

UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK
FACULTAD DE INGENIERÍAS Y CIENCIAS APLICADAS

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

**IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE GARRAPATAS DE
ORDEN *IXODIDAE* DE LAS REGIONES DE SIERRA, COSTA
Y ORIENTE ECUATORIANO MEDIANTE SECUENCIACIÓN
DE LECTURAS LARGAS**

Realizado por:

Mikaela Guerra Burbano

Director del proyecto:

Dr. José Rubén Ramírez Iglesias Ph.D.

Como requisito para la obtención del título de:


INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

Quito, 04 Diciembre 2023

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, MIKAELA GUERRA BURBANO, con cédula de identidad # 1722853692, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido previamente presentado para ningún grado a calificación profesional; y, que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

A través de la presente declaración, cedo mis derechos de propiedad intelectual correspondientes a este trabajo, a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normativa institucional vigente.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Mikaela Guerra Burbano', is centered on the page. The signature is fluid and cursive, with a large initial 'M' and 'G'.

DECLARATORIA

El presente trabajo de investigación titulado:

**“IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE GARRAPATAS DE
ORDEN IXODIDAE DE LAS REGIONES DE SIERRA, COSTA
Y ORIENTE ECUATORIANO MEDIANTE SECUENCIACIÓN
DE LECTURAS LARGAS”**

Realizado por:

MIKAELA GUERRA BURBANO

como Requisito para la Obtención del Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

ha sido dirigido por el profesor

Dr. JOSÉ RUBÉN RAMÍREZ IGLESIAS Ph.D

quien considera que constituye un trabajo original de su autor

DECLARACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación.



José Rubén Ramírez Iglesias

C.C.: 3050666993

LOS PROFESORES INFORMANTES

Los Profesores Informantes:

A handwritten signature in black ink, appearing to read "J. Navarro", with a horizontal line underneath.

JUAN CARLOS NAVARRO

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Gianina Suarez", enclosed in an oval shape.

GIANINA SUAREZ

Después de revisar el trabajo presentado,
lo han calificado como apto para su defensa oral ante
el tribunal examinador

DEDICATORIA

Dedicado a todos los profesores de la Facultad de Ingenierías y Ciencias Aplicadas de la Universidad Internacional SEK. A mi familia y mi novio.

Este trabajo de tesis fue realizado bajo el Programa de Investigación:

**ENFERMEDADES DESATENDIDAS, EMERGENTES,
ECOEPIDEMIOLOGÍA Y BIODIVERSIDAD**

Proyecto de Investigación de la Dirección de Investigación e Innovación

DII-P011617_2

Índice de Tablas

Tabla 1. Muestras de ADN de garrapata de las regiones de Ecuador	16
Tabla 2. Muestras de las especies con sus respectivos códigos de barras	19
Tabla 3. Clasificación de muestras con sus códigos de barras y carga de muestra	20
Tabla 4. Datos de la cuantificación y dilución	22
Tabla 5. Porcentajes de Identidad Blast	25
Tabla 6. Comparación morfológica con la base de datos internacional	27

Índice de Imágenes

Ilustración 1. Diagrama de flujo de las etapas desarrolladas en la investigación.	15
Ilustración 2. Árbol filogenético	28

RESUMEN

Las garrapatas del orden *Ixodida*, arácnidos parásitos, son agentes de considerable importancia médica y veterinaria a nivel global debido a su capacidad para transmitir enfermedades tanto a seres humanos como a animales. A pesar de su significancia, la investigación enfocada en estas criaturas en Ecuador ha sido limitada. Este estudio se propuso abordar esta laguna en el conocimiento al recolectar muestras de garrapatas de tres distintas regiones ecuatorianas: oriente, sierra y costa.

La metodología empleada abarcó una recolección meticulosa de muestras en diversos hábitats de las regiones del país. La extracción del ADN se llevó a cabo con técnicas especializadas para mantener la integridad del material genético. Se optó por la secuenciación de lecturas largas de tercera generación, lo que permitió la obtención de secuencias completas de múltiples genes, mejorando así la precisión en la identificación de especies y en el análisis filogenético. Los análisis bioinformáticos exhaustivos contribuyeron a la construcción de un árbol filogenético, ofreciendo una visión más clara de las relaciones evolutivas entre las especies estudiadas.

Los resultados revelaron una sorprendente variabilidad genética entre las garrapatas recolectadas en las tres regiones, incluso la identificación de nuevas especies previamente desconocidas. Este hallazgo crucial impulsó la creación de un árbol filogenético detallado, permitiendo una comprensión más profunda de las relaciones genéticas entre estas garrapatas.

La relevancia de estos descubrimientos radica en su impacto directo en la salud pública y veterinaria, aportando al diseño de estrategias más efectivas para el control y la prevención de enfermedades transmitidas por garrapatas en Ecuador y,

posiblemente, a nivel global. El objetivo general del estudio fue la identificación molecular de distintas especies de garrapatas presentes en las diversas regiones del país, brindando una valiosa contribución al análisis de su distribución evolutiva.

Este estudio representa un hito fundamental para una comprensión más profunda de la diversidad genética y la distribución de las garrapatas en Ecuador. Su impacto trasciende las fronteras nacionales al ofrecer información valiosa para el diseño de estrategias de control y prevención de enfermedades transmitidas por estos arácnidos, abriendo oportunidades para investigaciones futuras enfocadas en aspectos específicos de la epidemiología y ecología de estas especies recién identificadas. La colaboración internacional podría ampliar estos hallazgos, abordando la distribución global y la epidemiología de las enfermedades transmitidas por garrapatas.

Palabras claves: Garrapatas, caracterización, genotípica

ABSTRACT

Ticks of the order *Ixodida*, parasitic arachnids, are agents of considerable global medical and veterinary importance due to their ability to transmit diseases to both humans and animals. Despite their significance, research focused on these creatures in Ecuador has been limited. This study set out to address this gap in knowledge by collecting tick samples from three different Ecuadorian regions: the east, highlands, and coast.

The methodology used included a meticulous collection of samples in various habitats in the regions of the country. DNA extraction was carried out with

specialized techniques to maintain the integrity of the genetic material. Third-generation long read sequencing was chosen, which made it possible to obtain complete sequences of multiple genes, thus improving precision in species identification and phylogenetic analysis. Extensive bioinformatic analysis contributed to the construction of a phylogenetic tree, offering a clearer view of the evolutionary relationships between the studied species.

The results revealed surprising genetic variability among ticks collected in the three regions, including the identification of new, previously unknown species. This crucial finding prompted the creation of a detailed phylogenetic tree, allowing for a deeper understanding of the genetic relationships between these ticks.

The relevance of these discoveries lies in their direct impact on public and veterinary health, contributing to the design of more effective strategies for the control and prevention of diseases transmitted by ticks in Ecuador and, possibly, globally. The general objective of the study was the molecular identification of different species of ticks present in the various regions of the country, providing a valuable contribution to the analysis of their evolutionary distribution.

This study represents a fundamental milestone for a deeper understanding of the genetic diversity and distribution of ticks in Ecuador. Its impact transcends national borders by offering valuable information for the design of strategies for the control and prevention of diseases transmitted by these arachnids, opening opportunities for future research focused on specific aspects of the epidemiology and ecology of these newly identified species. International collaboration could expand these findings, addressing the global distribution and epidemiology of tick-borne diseases.

Keywords: Ticks, characterization, genotypic

1. Introducción

Las garrapatas del orden Ixodida son un grupo de arácnidos parásitos que se encuentran en todo el mundo y son conocidas por su importancia médica y veterinaria debido a su capacidad para transmitir enfermedades a humanos y animales. Son ectoparásitos que se alimentan de la sangre de sus hospedadores y pasan por varias etapas de desarrollo a lo largo de su ciclo de vida. La investigación sobre garrapatas del orden Ixodida a nivel mundial han sido extensas y abarcan una amplia gama de temas, incluyendo la taxonomía, la ecología, la biología, la genética, la epidemiología y la transmisión de enfermedades. Las garrapatas del orden Ixodida son importantes vectores de enfermedades tanto en animales como en humanos, y su estudio es esencial para entender su impacto en la salud pública, la sanidad animal y la ecología. (Guglielmo et al., 2010)

Las garrapatas que pertenecen al orden Ixodida y se dividen en varias familias, siendo las más comunes las familias *Argasidae* e *Ixodidae*. La familia *Nuttalliellidae* es menos conocida y contiene solo un género, *Nuttalliella*. Por lo contrario, las especies *Scapularis*, *Ricinus*, *Amblyomma americanum*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Hyalomma spp.*, son garrapatas de mayor relevancia por su alta transmisión de enfermedades como son la erliquiosis, la tularemia, la lyma, etc siendo causantes de muchas muertes, además de su prevalencia y poco control en el ambiente. (Klompen et al., 2002)

En las últimas tres décadas se han realizado investigaciones relacionadas con la genética de poblaciones de garrapatas. Se ha explorado la diversidad genética, la estructura de población, el intercambio genético, la evolución y la interacción huésped-parásito en diversas poblaciones. (Araya-Anchetta et al., 2015). La realización de investigaciones en este tema es importante debido a la constante evolución de la taxonomía y la revisión de las especies a medida que se descubren nuevas especies o se evalúan las existentes. (Guglielmo et al., 2010)

La región 18S es una región genómica que se refiere específicamente al gen ribosomal 18S, este gen desempeña un papel crucial en la síntesis de proteínas, ya que es una de las subunidades del ribosoma que se encarga de la lectura del ARN mensajero (ARNm) durante la traducción. La secuencia del gen 18S ribosomal es ampliamente conservada en los organismos, esto significa que es una región genómica bien estudiada y con datos disponibles para muchas especies de garrapatas. (Dobson & Barker, 1999)

Sin embargo, estudios recientes mencionan que, aunque la región 18S es útil, puede no ser suficiente por sí sola para una identificación precisa en todos los casos. En algunos casos, puede ser necesario utilizar múltiples marcadores genéticos, como el gen 16S ribosomal o el gen citocromo C oxidasa I (COI), para obtener una identificación más precisa, especialmente en grupos de garrapatas que son genéticamente cercanos o en especies con variabilidad genética intrapoblacional significativa. (Dobson & Barker, 1999)

En la actualidad existen avances en la sistemática molecular de las garrapatas para explorar a detalle las relaciones evolutivas entre distintas especies de garrapatas. A través de técnicas genéticas y análisis de ADN y ARN. También el uso de tecnologías de secuenciación de lecturas largas, como la secuenciación de próxima generación (NGS) de lecturas largas (por ejemplo, PacBio y Oxford Nanopore), tiene varias ventajas y utilidades significativas en la identificación molecular de garrapatas y en la investigación de su genómica y biología. (H.J. HUTCHESON, 2000)

Estos enfoques moleculares llevan a una reevaluación de la clasificación taxonómica tradicional, ya que las relaciones filogenéticas basadas en datos genéticos a menudo revelan conexiones inesperadas y complejas. Esta perspectiva molecular también ha permitido identificar linajes previamente desconocidos y proporciona información valiosa para la vigilancia de enfermedades transmitidas por garrapatas, así como para decisiones en salud pública y veterinaria. (H.J. HUTCHESON, 2000)

En el Ecuador se han hecho varias investigaciones con respecto a estos vectores y las transmisiones de enfermedades que causan. La presencia de diversas especies de bacterias transmitidas por garrapatas ha sido recolectada de tapires andinos, ganado bovino, equinos, caninos y vegetación en zonas protegida de la costa, sierra y oriente ecuatoriano, para analizar la diversidad y prevalencia de enfermedades como anaplasmosis, babesiosis, erliquiosis en donde las garrapatas son vectores. Los resultados de estos estudios han revelado que las bacterias *Rickettsia spp.*, *Anaplasma spp.*, *Ehrlichia spp.* y *Borrelia spp.* estaban presentes en diferentes proporciones de garrapatas recolectadas de estos huéspedes. Esto sugiere que tanto los tapires andinos como el ganado pueden estar expuestos a estas bacterias a través de las garrapatas que los parasitan. Además, la presencia de estas bacterias en la vegetación circundante también puede indicar la posibilidad de que otros animales o incluso humanos puedan estar en riesgo de exposición. (Pesquera et al., 2015a)

En el Ecuador, al igual que en otros países, se encuentran diferentes especies de garrapatas del orden Ixodida. Algunas de las especies más comunes en la región ecuatoriana incluyen: *Amblyomma cajennense*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma mixtum*, *Amblyomma dissimile*, de las cuales la información se sigue desarrollando. (Pesquera et al., 2015a)

El género *Amblyomma* incluye una amplia variedad de garrapatas que se encuentran en diferentes regiones neotropicales. Como estas especies están relacionadas entre sí a nivel taxonómico y filogenético varias investigaciones han utilizado la secuencia del segundo espaciador interno transcrito del ADN ribosomal y realizar análisis filogenéticos y comparaciones taxonómicas. La mayoría de los resultados que proporcionan hablan de las relaciones evolutivas y filogenéticas entre las especies de garrapatas del género *Amblyomma* en las regiones neotropicales. (Marrelli et al., 2007)

Un ejemplo de análisis filogenético es el *Amblyomma sphenodonti* que es una especie de garrapata que se encuentra en riesgo de desaparecer, lo que lo ha convertido en un objetivo importante para la investigación y conservación. Al realizar el análisis molecular y filogenético utilizando secuencias de ADN. Estos permiten inferir las relaciones evolutivas y filogenéticas de *Amblyomma sphenodonti* con otras especies de garrapatas y proporcionan información sobre su evolución y diversidad. (Miller et al., 2007)

La utilización de análisis filogenéticos implica estudiar las relaciones evolutivas entre diferentes especies basadas en sus características genéticas y morfológicas. Al analizar datos genéticos de diversas especies de garrapatas *Rhipicephaline*, varios investigadores han podido reconstruir un árbol evolutivo e identificar patrones de parentesco. El estudio desafía la clasificación tradicional del género *Rhipicephalus* y resalta la necesidad de una disposición taxonómica revisada que refleje con precisión la historia evolutiva de estas garrapatas. Esto tiene implicaciones para nuestra comprensión de la diversidad de garrapatas, su ecología y su potencial transmisión de enfermedades. (Murrell et al., 2000)

Todas las investigaciones sobre taxonomía molecular de garrapatas se han hecho con base en PCR y no hay la existencia de estudios en Ecuador que exploren la utilidad de marcadores 18S asociados a secuenciaciones de lecturas largas. Debido a su impacto en la salud pública y animal, el estudio de las garrapatas del orden Ixodida es un campo de investigación importante para comprender su biología, ecología, patogenicidad y estrategias de control. La prevención y el control de las enfermedades transmitidas por garrapatas son fundamentales para proteger la salud de las personas y los animales. (Pesquera et al., 2015a)

En este contexto, la continua confirmación de nuevos géneros de garrapatas sugiere una investigación del riesgo que estos vectores pueden llegar a producir, ya que son capaces de afectar principales fuentes de ingresos. Por ello, nace la necesidad de explorar el uso de nuevas tecnologías para taxonomía molecular de vectores además de realizar investigaciones tanto de la distribución geográfica como su filogenia, así también establecer, coordinar y supervisar un sistema de vigilancia activo para su control, prevención y efectivo tratamiento a nivel regional. Con base en lo anteriormente descrito, se planteó como objetivo general de investigación determinar la variabilidad y genotipificar diferentes tipos de garrapatas circulantes en las tres regiones del Ecuador, oriente, sierra y costa mediante secuencias de lecturas largas.

2. Metodología

La identificación molecular de las garrapatas se realizó a través de un proceso que implicó la aplicación de una serie de técnicas avanzadas de biología molecular. Este enfoque de investigación se basó en un detallado diagrama de flujo, el cual seguimos con meticulosidad y precisión para cumplir con los objetivos de nuestro estudio. **(Ilustración 1).**

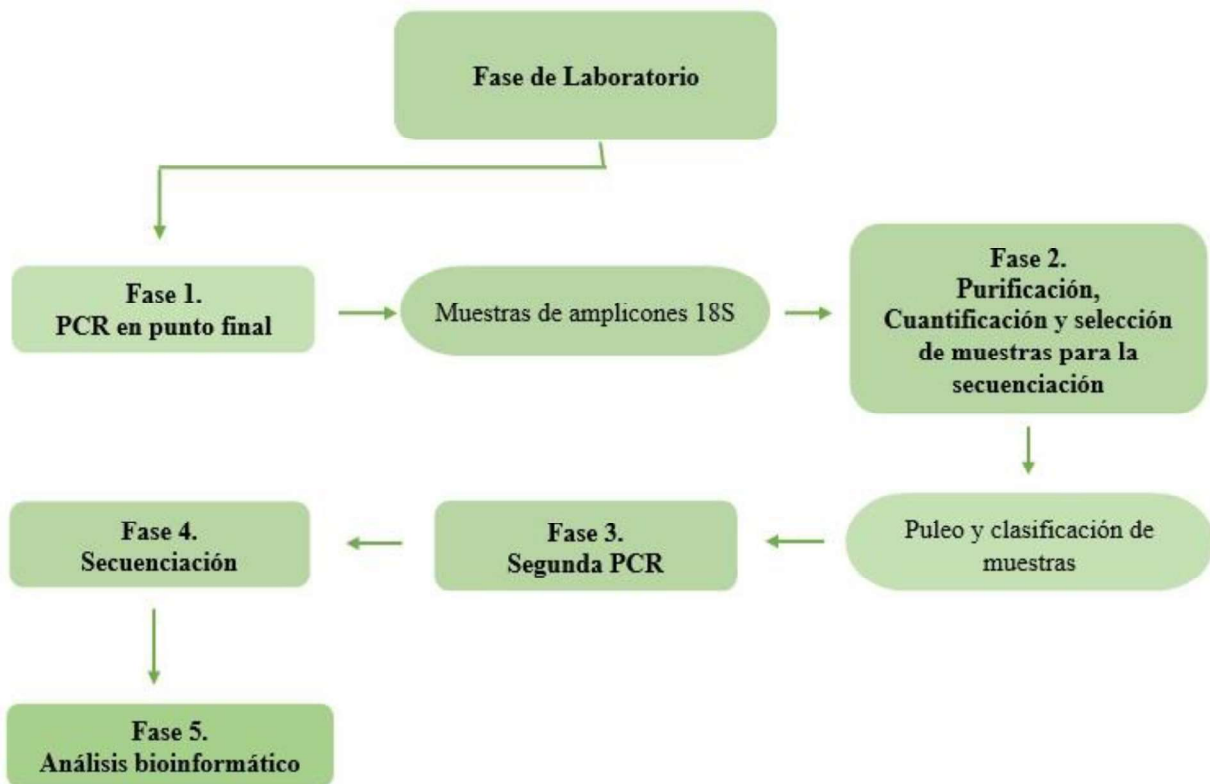


Ilustración SEQ Ilustración * ARABIC 1. Diagrama de flujo de las etapas de secuenciación de ADN de garrapatas.

2.1. Zona y población de estudio

Los ADN de garrapatas empleados en el presente estudio fueron facilitados por el Instituto de Investigación en Salud Pública y Zoonosis (CIZ) de la Universidad Central del Ecuador, bajo el convenio que mantienen ambas universidades. En total fueron 31 muestras de ADN de distintas especies de garrapatas, que previamente fueron morfológicamente identificadas **(Tabla 1).**

En la fase 1 se realizó la identificación de presencia de ADN de las distintas especies de garrapatas y para ello se realizó una amplificación de la sección del 18S con PCR en punto final en donde se utilizó un primer forward CRYPTO (5'-AACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3'), un primer reverse CRYPTOR (5'-GCTTGATCCTTCTGCAGGTTACCTAC-3'), el tamaño aproximado del amplicón es de 1700 pb. Para finalizar, la configuración del termociclador incluyó 95°C durante 15 min, seguido de 45 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 30 s, hibridación a 65°C durante 30 s y extensión a 72°C durante 1,5 min. La extensión final se realizó a 72°C durante 9 min, seguida de un paso de mantenimiento a 4°C. (Barbara L. Herwaldt, 2003)

Tabla 1. Muestras de ADN de garrapata de las regiones de Ecuador

ESPECIE	CÓDIGO TUBO ADN	PROVINCIA
<i>Dermacentor Nitens</i>	35a D.nitens	Orellana
<i>Amblyomma oblongoguttatum</i>	36a Am.oblon	Sucumbios
<i>Amblyomma humerale</i>	10a Am hu	Orellana
<i>Amblyomma ovale</i>	30 A.ov	MoronaSantiago
<i>Amblyomma scalpturatum</i>	24a A. scalp	Orellana
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	40 Rs	Pichincha
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	33a R.sangui	MoronaSantiago
<i>Amblyomma coelebs</i>	37a Am. Coelebs	Sucumbios
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	39Rs	Pichincha
<i>Ixodes luciae</i>	32a I.luciae	MoronaSantiago
<i>Amblyomma coelebs</i>	29a Am coelebs	Orellana
<i>Dermacentor Nitens</i>	41a D. nitens	Orellana
<i>Amblyomma latepunctatum</i>	53a Am latep	Orellana
<i>Amblyomma scalpturatum</i>	55b Am scalp	Orellana

<i>Amblyomma ovale</i>	82a Am ovale	Manabí
<i>Amblyomma dissimile</i>	62a Am dissi	Esmeraldas
<i>Amblyomma dissimile</i>	63a Am dissi	Esmeraldas
<i>Amblyomma maculatum</i>	90a Am macul	Manabí
<i>Amblyomma ovale</i>	73a Am ovale	Pichincha
<i>Amblyomma ovale</i>	75a Am ovale	Pichincha
<i>Amblyomma ovale</i>	76a Am ovale	Pichincha
<i>Amblyomma ovale</i>	78a Am ovale	Orellana
<i>Amblyomma ovale</i>	79a Am ovale	Orellana
<i>Amblyomma ovale</i>	80a Am oval	Manabí
<i>Amblyomma ovale</i>	89a Am oval	Manabí
<i>Amblyomma ovale</i>	86a Am ovale	Manabí
<i>Amblyomma ovale</i>	83a Am oval	Manabí
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	95a Rsangui	Pichincha
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	99a R. sangui	Pichincha
<i>Amblyomma maculatum</i>	92a Am macul	Manabí

2.2. PCR, Cuantificación y Purificación

En esta fase del estudio, la purificación de las muestras desempeñó un papel crucial en la obtención de material genético de alta calidad. El kit (PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit) se utilizó para eliminar impurezas y fragmentos no deseados, garantizando que el ADN resultante estuviera en las condiciones óptimas para su análisis.

La cuantificación de las muestras fue un paso esencial para evaluar la cantidad de ADN disponible en cada muestra. Esto se realizó mediante el kit (Qubit™ 1X dsDNA HS Assay Kit), siguiendo estrictamente las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Esta

información permitió identificar las muestras que presentaban concentraciones adecuadas para su posterior análisis, lo que fue fundamental para asegurar la fiabilidad de los resultados. La selección y clasificación de las muestras en función de su concentración fue un paso estratégico en cualquier investigación genética. Garantiza que solo se utilicen las muestras que cumplen con los requisitos de calidad necesarios, lo que optimiza el uso de recursos y evita la inclusión de muestras de baja calidad que podrían afectar la precisión de los resultados.

2.3. Preparación de Librerías y secuenciación

En la fase 3, las muestras positivas a la anterior fase fueron clasificadas por región y especie en donde se descartaron algunas especies que solo tenían una muestra de ADN. Después de una selección minuciosa con respecto a la cantidad de muestras de una misma especie, la cantidad de investigaciones, cantidad de muestra, se tomaron 25 muestras para la secuenciación.

Para iniciar la secuenciación, se realizó la preparación de librerías con el protocolo de OXFORD NANOPORE. Oxford Nanopore nos brinda una celda de flujo (flow cell) con 800 nanoporos para secuenciar, los datos se acumulan con el tiempo a medida que los nanoporos secuencian el ADN o el ARN, luego se generan archivos de lectura individuales y están inmediatamente disponibles para su análisis. De esta manera realizamos la agrupación de nuestras muestras con cargas específicas, realizando un cálculo previo de las cantidades a utilizar de las muestras y los códigos de barras para tener un total de 10 códigos como máximo y con el cual se distinguieron nuestras muestras. **(Tabla 2) y (Tabla 3).**

Por último, en esta fase se realizó la secuenciación por nanoporos con el protocolo (PCR Barcoding Amplicons (SQK-LSK109), 2008) en cual se utilizó el basecalling model de High Accuracy (HAC) que tiene alrededor del 92,6% de precisión en las secuencias. Después de dos días del protocolo se inició la secuenciación en el dispositivo OXFORD NANOPORE SEQUENCING (ONT) con características preconfiguradas y se secuenció por aproximadamente 72 horas, se utilizó el workflow "What's In My Pot (WIMP)" una herramienta específica que se utilizó para filtrar las lecturas de acuerdo con criterios, como longitud y calidad, en esta investigación estos filtros fueron basado en una longitud de 1600-1800 pb y su calidad fue del 92%.(PCR Barcoding Amplicons (SQK-LSK109), 2008)

Tabla 2. Muestras de las especies con sus respectivos códigos de barras

<i>Zona</i>	<i>Especies</i>	<i>Barre Code</i>
	<i>Amblyomma ovale</i>	2
<i>Oriente</i>	<i>Amblyomma sculpturatum</i>	11
	<i>Amblyomma coelebs</i>	4
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	5
<i>Sierra</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	12
	<i>Amblyomma ovale</i>	7
<i>Costa</i>	<i>Amblyomma maculatum</i>	8
	<i>Amblyomma ovale</i>	9
	<i>Amblyomma dissimile</i>	10

Tabla 3. Clasificación de muestras con sus códigos de barras y carga de muestra

<i>Muestra</i>	<i>Carga (μL)</i>	<i>Código</i>
30 <i>A.ov</i>	4	
78a <i>Am ovale</i>	4	B2
79a <i>Am ovale</i>	4	
24a <i>A. scalp</i>	10,4	
55b <i>Am scalp</i>	1,6	B11
37a <i>Am. coelebs</i>	6	
29a <i>Am coelebs</i>	6	B4
33 a. <i>R. sangui</i>	12	B5
39 <i>R.sangui</i>	5,5	
95a <i>R.sangui</i>	1	B12
99a <i>R. sangui</i>	5,5	
73a <i>Am ovale</i>	4	
75a <i>Am ovale</i>	4	B7
76a <i>Am ovale</i>	4	
92a <i>Am macul</i>	6	
90a <i>Am macul</i>	6	B8
80a <i>Am oval</i>	2,35	B9

<i>89a Am oval</i>	2,35	
<i>86a Am ovale</i>	2,35	
<i>83a Am oval</i>	2,35	
<i>82a Am ovale</i>	2,6	
<i>62a Am dissi</i>	6	
<i>63a Am dissi</i>	6	B10

2.4. Análisis Bioinformático

En la cuarta fase de nuestra investigación, llevamos a cabo un análisis bioinformático fundamental para determinar la variabilidad genotípica de las garrapatas del orden Ixodida en las regiones de Sierra, Costa y Oriente ecuatoriano. Este análisis se basó en la secuenciación de lecturas largas y se llevó a cabo utilizando herramientas bioinformáticas especializadas.

En primer lugar, utilizamos la herramienta BLAST para identificar las especies que mostraron una mayor similitud genética con las secuencias obtenidas a través de nuestro secuenciador. Este paso nos permitió identificar y caracterizar las especies de garrapatas presentes en las diferentes regiones geográficas bajo estudio.

Además, evaluamos la evolución de las secuencias extraídas del secuenciador MINION mediante la herramienta CLUSTAL. Esta evaluación nos proporcionó información valiosa sobre cómo han evolucionado genéticamente las garrapatas en las distintas regiones ecuatorianas, lo que contribuyó a nuestro entendimiento de la variabilidad genotípica dentro de esta población de parásitos.

La fase 4 de nuestra investigación se centró en el análisis bioinformático de las secuencias genéticas de las garrapatas, empleando herramientas como BLAST y CLUSTAL, con el objetivo de determinar la variabilidad genotípica en las regiones de Sierra, Costa y Oriente ecuatoriano a través de la secuenciación de lecturas largas.

3. Resultados

3.1. Cuantificación de extracción de ADN de vectores

Después de realizar el análisis de las muestras a través de PCR, procedimos a cuantificar la cantidad de ADN en las mismas en unidades de (ng/ μ L). Observamos que algunas de las muestras tenían concentraciones muy bajas, mientras que otras tenían concentraciones muy altas. Para estandarizar y asegurar un volumen final consistente de 20 μ L en todas las muestras, se realizaron diluciones. En los casos en los que las concentraciones eran demasiado bajas, se llevaron a cabo adiciones de material genético para alcanzar el volumen deseado (**Tabla 4**). Estos ajustes permitieron obtener las secuencias completas de los códigos de barras, garantizando la uniformidad y la calidad de los datos obtenidos.

Tabla 4. Datos de la cuantificación y dilución

Especie	Cuantificación ng/ μ L	Dilución Cf:15 ng/ μ l Vf:20 μ l
<i>Dermacentor nitens</i>	16	18,75
<i>Amblyomma oblongoguttatum</i>	16,6	18,07
<i>Amblyomma humerale</i>	16,3	18,40
<i>Amblyomma ovale</i>	31,4	9,55
<i>Amblyomma scalpturatum</i>	19,7	15,23
<i>Rhipicephalus microplus</i>	21,1	14,22
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	18,2	16,48
<i>Amblyomma coelebs</i>	19	15,79
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	16,3	18,40
<i>Ixodes luciae</i>	14,9	20,13
<i>Amblyomma coelebs</i>	51,6	5,81
<i>Dermacentor nitens</i>	17,4	17,24

<i>Amblyomma latepunctatum</i>	20,2	14,85
<i>Amblyomma scalpturatum</i>	9	33,33
<i>Amblyomma ovale</i>	5,8	51,72
<i>Amblyomma dissimile</i>	65,2	4,60
<i>Amblyomma dissimile</i>	20,5	14,63
<i>Amblyomma maculatum</i>	22,5	13,33
<i>Amblyomma ovale</i>	26	11,54
<i>Amblyomma ovale</i>	24,1	12,45
<i>Amblyomma ovale</i>	30,4	9,87
<i>Amblyomma ovale</i>	37,1	8,09
<i>Amblyomma ovale</i>	25,8	11,63
<i>Amblyomma ovale</i>	21,8	13,76
<i>Amblyomma ovale</i>	19,1	15,71
<i>Amblyomma ovale</i>	30	10,00
<i>Amblyomma ovale</i>	22,4	13,39
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	14,1	21,28
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	21,1	14,22
<i>Amblyomma maculatum</i>	21,8	13,76

3.2. Carga de lecturas

La fase de secuenciación por nanoporos en nuestra investigación arrojó datos de alta calidad, y es fundamental analizar y discutir los resultados obtenidos para comprender su relevancia y aplicabilidad.

La precisión del modelo de basecalling HAC es un factor crítico que se destacó en esta investigación. Con una precisión de alrededor del 92.6%, las secuencias generadas se presentan como altamente confiables. Esta alta precisión es esencial para la calidad de los datos y, por ende, para la validez de los resultados que se derivarán de estos datos. La confiabilidad de las secuencias es un pilar fundamental en cualquier análisis genético, y esta precisión del 92.6% proporciona una sólida base para futuras interpretaciones y conclusiones.

La utilización de EPI2ME, el servidor en la nube diseñado para el análisis de datos generados por secuenciadores de nanoporos, ha demostrado ser un recurso valioso en nuestra investigación. Esta plataforma en línea permitió la gestión eficiente y el procesamiento de grandes volúmenes de datos secuenciados, lo que resultó en un flujo de trabajo más efectivo. La capacidad de EPI2ME para realizar análisis avanzados y proporcionar información detallada facilitó en gran medida la interpretación de las secuencias y la identificación de patrones o características relevantes.

La secuenciación en sí, que se llevó a cabo durante un período de aproximadamente 72 horas, también es un aspecto relevante en nuestro estudio. Esta duración refleja el tiempo y el esfuerzo dedicados a la generación de datos de secuenciación. Aunque se trata de un proceso que requiere tiempo, la inversión es justificada por la calidad y confiabilidad de los datos obtenidos. La duración de la secuenciación es un aspecto importante a tener en cuenta al planificar proyectos de secuenciación y al considerar plazos y costos.

Los resultados de la fase de secuenciación por nanoporos han arrojado datos de alta calidad respaldados por la precisión del basecalling, la eficiencia de la plataforma EPI2ME y el tiempo dedicado al proceso de secuenciación. Estos datos sientan las bases sólidas para futuros análisis y descubrimientos en el marco de nuestra investigación. La precisión y la confiabilidad de los datos son esenciales para obtener resultados significativos y avanzar en nuestro entendimiento en este campo.

3.3. Blast en la plataforma NCBI

Tras completar el proceso de secuenciación, obtuvimos aproximadamente 20 secuencias por cada código de barras. Posteriormente, realizamos una clasificación de estas secuencias seleccionando las 5 mejores en función de su porcentaje de identidad con las especies de interés. Estas secuencias, obtenidas a partir del secuenciador MINION, fueron sometidas a un análisis de similitud utilizando la herramienta BLAST en la plataforma del National Center for

Biotechnology Information (NCBI) (**Tabla 5**). En la tabla se puede observar el porcentaje de identidad que se obtuvo del análisis bioinformático con la herramienta BLAST, dándonos así una equivalencia de que especies se acercaban más a la secuencia obtenida del MINION. Este paso nos permitió identificar las especies correspondientes y nos proporcionó información valiosa para concluir con los objetivos de la investigación.

Tabla 5. Porcentajes de Identidad Blast

Código de barras	Especie	% Identidad
BC2	<i>Amblyomma rotundatum 18S</i>	96,82
	<i>Amblyomma hadanii 18S</i>	96,79
	<i>Amblyomma hebraeum 18S</i>	96,7
	<i>Amblyomma hebraeum 18S</i>	96,69
	<i>Amblyomma variegatum 18S</i>	96,6
	<i>Amblyomma rotundatum 18S</i>	97,21
BC4	<i>Amblyomma hebraeum 18S</i>	97,2
	<i>Amblyomma hebraeum 18S</i>	97,2
	<i>Amblyomma hadanii 18S</i>	97,19
	<i>Amblyomma tholloni</i>	97,14
BC5	<i>Ixodes luciae 18S</i>	95,36
	<i>Ixodes scapularis small subunit ribosomal</i>	95,21
	<i>Ixodes scapularis small subunit ribosomal</i>	95,21
	<i>Ixodes scapularis small subunit ribosomal</i>	95,21
	<i>Ixodes scapularis small subunit ribosomal</i>	95,21
BR7	<i>Amblyomma rotundatum 18S</i>	96,18
	<i>Amblyomma hadanii 18S</i>	96,06
	<i>Amblyomma tuberculatum 18S</i>	96,02
	<i>Amblyomma variegatum 18S</i>	95,73
	<i>Amblyomma hebraeum</i>	95,67
	<i>Amblyomma maculatum 18S</i>	96,76
BR8	<i>Amblyomma tuberculatum 18S</i>	96,54
	<i>Amblyomma americanum 18S</i>	96,53
	<i>Amblyomma rotundatum 18S</i>	96,48
BR9	<i>Amblyomma marmoreum</i>	96,47
	<i>Amblyomma hebraeum</i>	95,63
	<i>Amblyomma hebraeum</i>	95,63

	<i>Amblyomma rotundatum 18S</i>	95,62
	<i>Amblyomma hadanii 18S</i>	95,59
	<i>Amblyomma tholloni</i>	95,51
	<i>Amblyomma hebraeum</i>	95,36
	<i>Amblyomma hebraeum</i>	95,36
BR10	<i>Amblyomma rotundatum 18S</i>	95,34
	<i>Amblyomma thollon</i>	95,31
	<i>Amblyomma hadanii 18S</i>	95,26
	<i>Amblyomma maculatum 18S</i>	94,97
	<i>Amblyomma americanum 18S</i>	94,94
BR11	<i>Amblyomma marmoreum</i>	94,93
	<i>Amblyomma marmoreum</i>	94,93
	<i>Amblyomma marmoreum</i>	94,93
	<i>Boophilus annulatus 18S</i>	97,42
	<i>Rhipicephalus zambeziensis</i>	97,36
BR12	<i>Rhipicephalus simus</i>	97,36
	<i>Rhipicephalus zambeziensis</i>	97,36
	<i>Rhipicephalus microplus</i>	97,36

3.4. Comparación con la base de datos internacional (NCBI)

Se llevó a cabo una comparación exhaustiva entre los datos morfológicos y las secuencias de identidad que obtuvimos a través de la herramienta BLAST. En la Tabla 6, se presentan los códigos de identificación de nuestras muestras en el secuenciador, las secuencias morfológicas, las secuencias obtenidas mediante BLAST y el porcentaje de identidad correspondiente. Estos datos revelan una interesante observación: si bien las muestras analizadas mostraron un alto grado de similitud con las secuencias de la base de datos internacional, no coincidieron con las identificaciones morfológicas previamente establecidas.

Este desacuerdo se puede atribuir a una limitación significativa en la base de datos utilizada en nuestro estudio. La base de datos internacional no contiene información detallada sobre la región específica que analizamos, en este caso, la región 18S. En su lugar, agrupa las secuencias bajo otras regiones como el 16S u otras. Esta limitación en la base de datos dificulta la obtención de una identificación precisa a nivel de 18S para nuestras muestras.

Por lo tanto, los resultados sugieren que existe una variabilidad genotípica entre las muestras estudiadas, pero la base de datos carece de información suficiente para realizar una

diferenciación más precisa en la región 18S. Este hallazgo subraya la importancia de contar con bases de datos genómicas más completas y específicas para regiones particulares, lo que permitiría una identificación más precisa y confiable en futuros estudios. Además, resalta la necesidad de desarrollar y mantener bases de datos genómicas actualizadas y detalladas para abordar estas limitaciones en la identificación de especies mediante secuenciación genética.

Tabla 6. Comparación morfológica con la base de datos internacional

BC	Morfología	BLAST	Identidad %
2 – 7 – 9	<i>Amblyomma Ovale</i>	<i>Amblyomma rotundatum</i> , <i>Amblyomma hebraeum</i> ,	96,18
4	<i>Amblyomma Coelebs</i>	<i>Amblyomma hadanii</i> <i>Amblyomma tholloni</i>	97,14
12 – 5	<i>Rhipicephalus Sanguineus</i>	<i>Ixodes scapularis</i> , <i>Rhipicephalus zambeziensis</i>	95,21
10	<i>Amblyomma Dissimile</i>	<i>Amblyomma hebraeum</i>	95,36
11	<i>Amblyomma Scalpturatum</i>	<i>Amblyomma americanum</i>	94,93

3.5. Árbol Filogenético

Para llevar a cabo una comparación de especies, empleamos la herramienta CLUSTAL, una herramienta ampliamente utilizada en bioinformática para alinear secuencias genéticas. En esta etapa, seleccionamos las secuencias de mayor porcentaje de identidad, que fueron identificadas a través de los resultados tanto de la secuenciación como del análisis BLAST de los códigos de barras. Además de esta selección, nos centramos en las secuencias de aquellas especies que eran de mayor relevancia para nuestro código de barras. Esta selección minuciosa nos condujo a un conjunto total de 23 secuencias que consideramos especialmente significativas para nuestros objetivos de investigación.

La razón detrás de este enfoque es la importancia de realizar una comparación exhaustiva y precisa de las secuencias, que es esencial para el éxito de nuestro estudio. Dado que nuestro objetivo era identificar las especies y analizar su relación genética, esta selección estratégica

nos permitió concentrarnos en las secuencias más informativas y representativas. La **(Ilustración 2)** representa este conjunto de secuencias seleccionadas y es una parte crítica en nuestro proceso de análisis y descubrimiento de datos en el marco de esta investigación. Básicamente lo que obtuvimos es que casi todas las secuencias se agrupan entre sí, con excepción de *Rhipicephalus Sanguineus* que está en medio del árbol. Se identifica que hay una detección a nivel de género más no es posible determinar la especie.

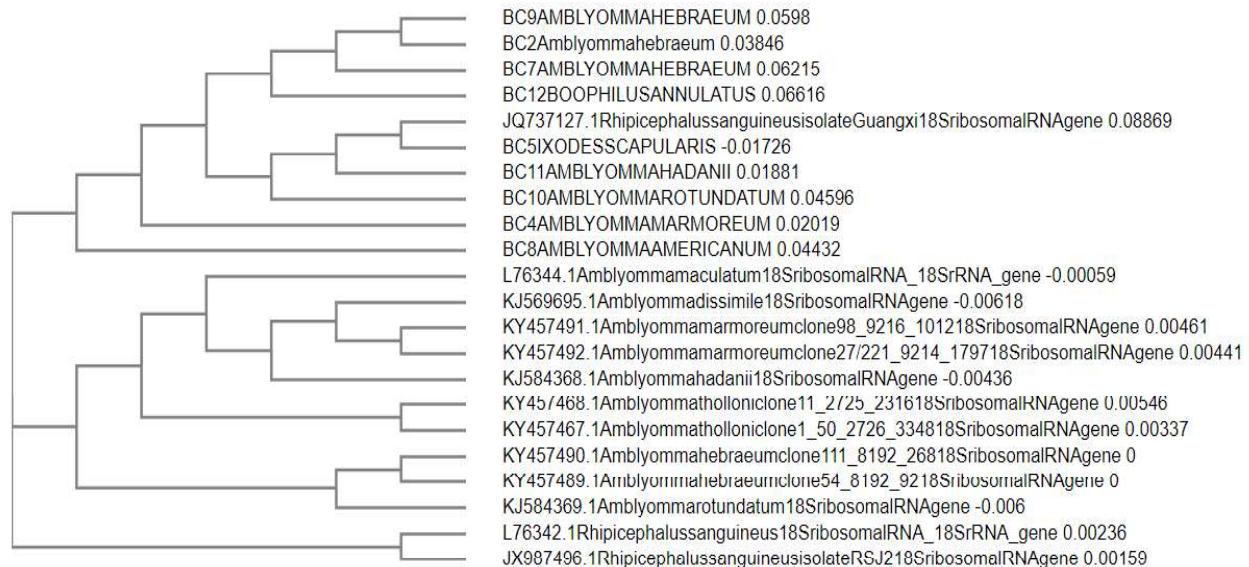


Imagen 2. Árbol Filogenético

4. Discusión de Resultados

El presente estudio de análisis genotípico de la región 18S de garrapatas mediante la tecnología de secuenciación representa un avance significativo en nuestra comprensión de la diversidad de artrópodos en las tres regiones del Ecuador: Oriente, Sierra y Costa. La investigación tuvo como objetivo proporcionar datos valiosos para la ecoepidemiología y la biodiversidad en estas áreas geográficas. A lo largo del estudio, analizamos un total de 31 muestras, de las cuales 23 se utilizaron para la construcción de la biblioteca genómica. Posteriormente, seleccionamos una secuencia representativa de cada código de barras, lo que resultó en un conjunto de 10 secuencias de nuestro interés, y complementamos estas con otras 13 secuencias obtenidas a través de la herramienta NCBI. Estas secuencias se utilizaron para construir un árbol filogenético.

El proceso de secuenciación arrojó lecturas con longitudes notables, comprendidas entre 1600 y 1800 pares de bases (pb), lo cual era fundamental para nuestros objetivos de investigación. Esta extensión permitió llevar a cabo un análisis detallado de las especies a través de la herramienta NCBI, realizando un análisis de blast para determinar el grado de similitud. La amplificación exitosa del gen 18S mediante la técnica de PCR (reacción en cadena de la polimerasa) facilitó la obtención de secuencias de alta calidad y contribuyó a la efectividad taxonómica de este gen en la diferenciación de especies de garrapatas en nuestro estudio.

No obstante, es importante destacar que el uso de la región 18S no está exento de limitaciones, especialmente en lo que respecta a la disponibilidad de información en la base de datos de NCBI para algunas especies, como *Amblyomma ovale*, *Amblyomma dissimile*, *Amblyomma sculpturatum*, *Rhipicephalus sanguineus*, entre otras. Esto resalta la necesidad de desarrollar bases de datos más completas y específicas para mejorar futuros estudios de este tipo. Además, se ha señalado que, en ciertas aplicaciones, como la detección de patógenos transportados por garrapatas, el gen 18S podría no proporcionar información suficiente sobre la presencia o ausencia de patógenos específicos, lo que podría requerir el uso de marcadores más específicos. (Lado et al., 2016)

En relación con la diversidad y distribución de las especies analizadas en esta investigación, podemos observar patrones interesantes. Por ejemplo, la especie *Amblyomma ovale* se encontró en las tres regiones del Ecuador (códigos BR2, BR7 y BR9) y mostró similitud significativa entre las regiones Costa y Oriente. No obstante, la región Sierra exhibió una mayor diversidad, lo que se reflejó en las secuencias obtenidas. La **(Imagen 2)** revela una ramificación distinta para la secuencia BR12, que corresponde a *Rhipicephalus sanguineus*, y comparte similitudes con la región Sierra.

En cuanto a otro grupo de ramificaciones, se ha identificado que este grupo es parafilético, dado que comparte un ancestro común. Por ejemplo, se observa que *Rhipicephalus sanguineus* (BR5) en la región del Oriente muestra similitud con secuencias en la base de datos de NCBI, y una situación similar se presenta con *Amblyomma dissimile* y *Amblyomma sculpturatum* (BR10 y BR11) en las regiones de Costa y Oriente. Estas similitudes indican una distribución amplia de estas especies en toda América Latina, lo que abarca países como Colombia y Ecuador, especialmente en entornos selváticos y áreas boscosas con vegetación densa. Estos descubrimientos apuntan a que la variabilidad genética no difiere significativamente entre las especies y las regiones bajo estudio. (Sanches et al., 2016)

Este hallazgo ilustra la coherencia entre la taxonomía clásica y la identificación molecular, ya que las similitudes genéticas reflejan la relación evolutiva entre estas especies de garrapatas y sus respectivas ramificaciones geográficas. La capacidad de la identificación molecular para corroborar las relaciones taxonómicas establecidas previamente en la taxonomía clásica subraya la utilidad de las técnicas moleculares en el estudio de la diversidad biológica y la filogenia de las garrapatas. Estos resultados refuerzan nuestra comprensión de la relación entre las especies de garrapatas y su distribución geográfica en América Latina.

En comparación con estudios similares realizados en Australia en 2014, que identificaron 70 especies de garrapatas, lo que proporcionó una visión general de la diversidad de garrapatas en el país. Proporcionó guías de diagnóstico que ayudaron a identificar tres especies específicas de garrapatas: *Ixodes holocyclus*, *Ixodes cornuatus* y *Rhipicephalus australis*. Observamos que la variabilidad genotípica en Ecuador es relativamente menor. Esto podría deberse a diferencias en los métodos y regiones de análisis, lo que destaca la importancia de considerar los contextos geográficos y técnicos en la interpretación de los resultados. (Barker & Burger, 2018)

En conjunto, el análisis genotípico de la región 18S de garrapatas mediante la tecnología de secuenciación tiene implicaciones significativas en diversas áreas. Permite la identificación precisa de especies, lo cual es crucial para investigaciones relacionadas con enfermedades transmitidas por garrapatas y estrategias de control en la agricultura y la ganadería. Además, esta técnica facilita la detección de patógenos transmitidos por las garrapatas, lo que reviste una importancia fundamental para la salud pública y la medicina veterinaria. La información generada en este estudio brinda apoyo a la toma de decisiones informadas en la selección de estrategias de control y contribuye a la conservación de la biodiversidad en las distintas regiones del Ecuador.

Este análisis genotípico también tiene un potencial relevante para el desarrollo de vacunas y terapias dirigidas específicamente contra garrapatas y los patógenos que transmiten. La capacidad de comprender la diversidad genética de estas especies y sus poblaciones puede mejorar significativamente la eficacia de las estrategias de control y, en última instancia, ayudar a prevenir enfermedades transmitidas por estos ectoparásitos tanto en humanos como en animales.

Una de las contribuciones destacadas de este estudio es la identificación y clasificación de especies de garrapatas en diferentes regiones del Ecuador, lo que arroja luz sobre las dinámicas

de diversidad y ecoepidemiología en este país. La capacidad de caracterizar y diferenciar especies específicas es crucial en investigaciones epidemiológicas y de conservación, así como en la planificación de estrategias de manejo y control.

A pesar de los logros de este estudio, se reconocen las limitaciones inherentes al uso de la región 18S como marcador genético. La falta de información precisa en la base de datos de NCBI para algunas especies de garrapatas subraya la necesidad de una expansión continua y la mejora de las bases de datos genómicas. Además, en aplicaciones específicas, como la detección de patógenos transportados por garrapatas, la región 18S puede no proporcionar datos suficientes sobre la presencia o ausencia de patógenos específicos. En tales casos, se podría requerir la utilización de marcadores más específicos y otros métodos complementarios. (Pesquera et al., 2015b)

El análisis de la distribución geográfica de las especies de garrapatas en las diferentes regiones del Ecuador destaca la complejidad de estos ecosistemas y sus interacciones. La presencia de especies comunes en múltiples regiones, así como las similitudes genéticas entre ellas, puede reflejar adaptaciones a hábitats variados y desafíos ambientales. Estos resultados proporcionan información valiosa para la conservación de la biodiversidad y la gestión de recursos naturales en el país.

Comparando estos hallazgos con estudios similares realizados en otras partes del mundo, como en Australia en 2014, observamos diferencias significativas en la variabilidad genética de las garrapatas. La relativamente menor variabilidad genotípica en Ecuador puede deberse a factores geográficos y ecológicos específicos, lo que destaca la importancia de considerar el contexto local en la interpretación de los resultados de investigaciones genómicas. (Barker et al., 2014)

En contexto con la localidad surge otra problemática de salud, es de suma importancia comprender la transmisión de enfermedades que estos artrópodos pueden causar. Un estudio realizado recientemente nos menciona que en Latinoamérica las garrapatas son vectores conocidos de diversas enfermedades infecciosas, como la enfermedad de Lyme y la fiebre de las Montañas Rocosas, que pueden afectar tanto a seres humanos como a animales en estas regiones por factores climáticos. El estudio de variabilidad genotípica de las garrapatas es esencial para comprender mejor cómo estas enfermedades se propagan y evolucionan en diferentes áreas geográficas. La región 18S del ADN es especialmente relevante, ya que es una

parte crucial para la identificación de las especies y la detección de patógenos en las garrapatas. (Burger et al., 2014)

Con respecto a los métodos utilizados, la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) es una técnica altamente sensible que permite amplificar secuencias específicas de ADN, lo que nos facilitó la detección del 18S en nuestras secuencias y podría ayudar en investigaciones derivadas. La secuenciación de tercera generación, por su parte, ofrece la capacidad de generar secuencias de ADN más largas y precisas, lo que fue esencial para analizar la variabilidad genética en detalle y obtener información de las especies y géneros analizados en las regiones de la Costa, Sierra y Oriente ecuatoriano.

Como se conoce la técnica de secuenciación de lecturas largas utilizando la tecnología Oxford Nanopore Technologies (ONT) es una poderosa herramienta, sin embargo, durante la investigación surgieron limitaciones de la técnica que deben ser tenidas en cuenta. La tecnología ONT es una herramienta costosa tanto en términos de adquisición de equipos como en los costos asociados a la secuenciación y el análisis de datos. Aunque ONT es capaz de producir lecturas largas, la calidad de las secuencias a menudo es inferior en comparación con otras tecnologías de secuenciación o como en esta investigación se realizó una comparación con secuencias en la base de datos de NCBI, esto hizo que el ensamblaje y la alineación de las secuencias fuesen más desafiantes. La tecnología ONT tiende a tener tasas de error más altas en comparación con otras tecnologías de secuenciación, lo que algunos casos pudo dificultar la identificación precisa de variaciones genéticas. Por último, la técnica ONT no ofrece una cobertura uniforme en todo el genoma, lo que puede hacer que algunas regiones sean menos representativas en el análisis de la variabilidad genotípica. (Araya-Anchetta et al., 2015)

Al investigar la variabilidad genotípica de las garrapatas en diferentes regiones ecuatorianas, se podrán obtener datos valiosos sobre la distribución de estas especies y la posible adaptación a diferentes entornos. Esto es esencial para anticipar y mitigar los riesgos de enfermedades transmitidas por garrapatas en la población humana y en la ganadería, así como para desarrollar medidas de salud pública y veterinaria más efectivas.

En resumen, el análisis genotípico de la región 18S de garrapatas mediante la tecnología de secuenciación tiene un alcance amplio y relevante. Contribuye al entendimiento de la diversidad y distribución de especies de garrapatas en el Ecuador, proporcionando una base sólida para investigaciones posteriores en ecoepidemiología, conservación y control de enfermedades

transmitidas por estos vectores. La información generada a partir de este estudio puede tener un impacto significativo en la salud pública, la agricultura y la medicina veterinaria, al mejorar la capacidad de prevenir y gestionar enfermedades transmitidas por garrapatas. Este estudio también resalta la importancia de la expansión de bases de datos genómicas y la consideración de marcadores específicos en investigaciones futuras para abordar cuestiones genéticas más detalladas en las garrapatas y los patógenos que transportan.

5. Conclusiones

El estudio de la identificación molecular de garrapatas del orden Ixodida, a través de la secuenciación de tercera generación, ha revelado una notable variabilidad genotípica en las regiones de Costa, Sierra y Oriente del Ecuador. Los resultados obtenidos brindan información invaluable sobre la diversidad y la distribución de las especies de garrapatas en estas tres áreas de estudio, y sus implicaciones son de gran relevancia en los campos de la salud pública, la veterinaria y la ecología.

Entre las especies de garrapatas identificadas se encuentran *Amblyomma ovale*, *Amblyomma dissimile*, *Amblyomma sculpturatum* y *Rhipicephalus sanguineus*. Este estudio confirmó la variabilidad genotípica dentro de estas especies de artrópodos, lo cual tiene repercusiones significativas en la salud tanto de los seres humanos como de los animales en la región, ya que estas garrapatas son conocidas portadoras y transmisoras de enfermedades graves, como la enfermedad de Lyme y la fiebre de las Montañas Rocosas. (Márquez-Jiménez et al., 2005)

Una de las contribuciones notables de este estudio fue la capacidad de la identificación molecular de garrapatas para distinguir con precisión entre especies estrechamente relacionadas. Sin embargo, se identificaron ciertas limitaciones, como la capacidad insuficiente del análisis molecular de la región 18S para diferenciar entre subespecies o poblaciones locales de garrapatas que pueden tener similitudes genéticas.

Además, los análisis filogenéticos revelaron una variabilidad genotípica amplia pero cuantificable tanto entre especies como entre las tres regiones estudiadas. Aunque algunas de las especies se encontraban en la base de datos de NCBI, se reconoce una limitación en la falta de datos exhaustivos en este ámbito. Estos resultados han contribuido a enriquecer nuestra comprensión de la evolución y la historia de estas garrapatas.

En este estudio se demuestra una coherencia esencial entre la taxonomía clásica y la identificación molecular de garrapatas, al tiempo que se destaca la capacidad de la secuenciación de tercera generación para proporcionar resoluciones taxonómicas precisas. Las limitaciones identificadas resaltan la necesidad de una mayor investigación y una base de datos más completa para mejorar nuestra comprensión de estas especies y sus implicaciones en la salud pública y la ecología.

6. Recomendaciones

Se recomienda ampliar el número de muestras en futuras investigaciones para garantizar una representación más completa de las poblaciones de garrapatas en las regiones Costa, Sierra y Oriente del Ecuador. Además, sería beneficioso realizar un análisis exhaustivo de la base de datos de especies existente, lo que contribuirá a una identificación más precisa.

Un paso fundamental sería llevar a cabo estudios adicionales para caracterizar los patógenos identificados en las garrapatas y evaluar su potencial impacto en la salud tanto humana como animal. Esto incluiría investigaciones sobre la epidemiología de las enfermedades transmitidas por garrapatas en estas regiones, lo que proporcionaría información crucial para la prevención y el tratamiento. Dado el papel fundamental de las garrapatas como vectores de enfermedades, se sugiere mantener una vigilancia continua de la población de garrapatas y los patógenos que transportan en la región de estudio. Esta vigilancia permitirá la detección temprana de nuevas amenazas para la salud pública y facilitará la implementación de medidas preventivas efectivas.

Además, sería valioso realizar estudios sobre los hospedadores de las garrapatas identificadas, lo que proporcionaría una comprensión más profunda de los ciclos de vida y las interacciones entre las garrapatas y sus hospederos. Este conocimiento contribuiría a la gestión de poblaciones de garrapatas y a la prevención de enfermedades.

Otra recomendación importante sería explorar la utilización de marcadores moleculares adicionales, además del gen 18S ribosomal, para mejorar la precisión en la identificación de especies de garrapatas, especialmente en grupos taxonómicos cercanos.

Por último, dada la preocupación por el desarrollo de resistencia a los insecticidas en las poblaciones de garrapatas, se sugiere llevar a cabo investigaciones adicionales para evaluar la resistencia a los insecticidas en las garrapatas identificadas en estas regiones. Esto es esencial para el desarrollo de estrategias de control efectivas y sostenibles.

7. Referencias

- Araya-Anchetta, A., Busch, J. D., Scoles, G. A., & Wagner, D. M. (2015). Thirty years of tick population genetics: A comprehensive review. In *Infection, Genetics and Evolution* (Vol. 29, pp. 164–179). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.11.008>
- Barbara L. Herwaldt, S. C. F. G. H. A. S. B. S. P. P. G. M. R. E. U. H. G. P. S. P. K. L. S. T. and N. J. P. (2003). *Molecular Characterization of a Non-Babesia divergens Organism Causing Zoonotic Babesiosis in Europe*. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Barker, S. C., & Burger, T. D. (2018). Two new genera of hard ticks, *Robertsicus* n. gen. and *Archaeocroton* n. gen., and the solution to the mystery of Hoogstraal's and Kaufman's "primitive" tick from the Carpathian Mountains. In *Zootaxa* (Vol. 4500, Issue 4, pp. 543–552). Magnolia Press. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4500.4.4>
- Barker, S. C., Walker, A. R., & Campelo, D. (2014). A list of the 70 species of Australian ticks; diagnostic guides to and species accounts of *Ixodes holocyclus* (paralysis tick), *Ixodes cornuatus* (southern paralysis tick) and *Rhipicephalus australis* (Australian cattle tick); and consideration of the place of Australia in the evolution of ticks with comments on four controversial ideas. In *International Journal for Parasitology* (Vol. 44, Issue 12, pp. 941–953). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.08.008>
- 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>
- Dobson, S. J., & Barker, S. C. (1999). *Phylogeny of the Hard Ticks (Ixodidae) Inferred from 18S rRNA Indicates That the Genus Aponomma Is Paraphyletic*. <http://www.idealibrary.com>
- Guglielmone, A. A., Robbins, R. G., Apanaskevich, D. A., Petney, T. N., Estrada-Peña, A., Horak, I. G., Shao, R., & Barker, S. C. (2010). Article The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*, 2528, 1–28. www.mapress.com/zootaxa/
- H.J. HUTCHESON, W. C. B. I. J. S. H. K. J. E. K. D. E. N. & S. C. B. (2000). *CURRENT PROGRESS IN TICK MOLECULAR SYSTEMATICS*.

- Klompen, H., Dobson, S. J., & Barker, S. C. (2002). A new subfamily, bothriocrotoninae n. subfam., for the genus *Bothriocroton* Keirans, King & Sharrad, 1994 status amend. (Ixodida: Ixodidae), and the synonymy of *Aponomma* Neumann, 1899 with *Amblyomma* Koch, 1844. *Systematic Parasitology*, 53(2), 101–107. <https://doi.org/10.1023/A:1020466007722>
- Lado, P., Nava, S., Labruna, M. B., Szabo, M. P. J., Durden, L. A., Bermudez, S., Montagna, M., Sánchez Quirós, A. C., & Beati, L. (2016). *Amblyomma parvum* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae): Phylogeography and systematic considerations. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 7(5), 817–827. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.03.017>
- Márquez-Jiménez, F. J., Hidalgo-Pontiveros, A., Contreras-Chova, F., Rodríguez-Liébana, J. J., & Muniain-Ezcurra, M. Á. (2005). Las garrapatas (Acarina: Ixodida) como transmisores y reservorios de microorganismos patógenos en España. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23(2), 94–102. <https://doi.org/10.1157/13071613>
- Marrelli, M. T., Souza, L. F., Marques, R. C., Labruna, M. B., Matioli, S. R., Tonon, A. P., Ribolla, P. E. M., Marinotti, O., & Schumaker, T. T. S. (2007). Taxonomic and Phylogenetic Relationships Between Neotropical Species of Ticks from Genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) Inferred from Second Internal Transcribed Spacer Sequences of rDNA. In *J. Med. Entomol* (Vol. 44, Issue 2).
- Miller, H. C., Conrad, A. M., Daugherty, C. H., & Barker, S. C. (2007). Distribution and phylogenetic analyses of an endangered tick, *Amblyomma sphenodonti*. *New Zealand Journal of Zoology*, 34(2), 97–105. <https://doi.org/10.1080/03014220709510068>
- Murrell, A., Campbell, N. J. H., & Barker, S. C. (2000). Phylogenetic analyses of the rhipicephaline ticks indicate that the genus *Rhipicephalus* is paraphyletic. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 16(1), 1–7. <https://doi.org/10.1006/mpev.2000.0762>
- PCR barcoding amplicons (SQK-LSK109)*. (2008).
- Pesquera, C., Portillo, A., Palomar, A. M., & Oteo, J. A. (2015a). Investigation of tick-borne bacteria (*Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. and *Borrelia* spp.) in ticks collected from Andean tapirs, cattle and vegetation from a protected area in Ecuador. *Parasites and Vectors*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0662-3>
- Pesquera, C., Portillo, A., Palomar, A. M., & Oteo, J. A. (2015b). Investigation of tick-borne bacteria (*Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. and *Borrelia* spp.) in ticks collected from

Andean tapirs, cattle and vegetation from a protected area in Ecuador. *Parasites and Vectors*, 8(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0662-3>

Sanches, G. S., Évora, P. M., Mangold, A. J., Jittapalapong, S., Rodriguez-Mallon, A., Guzmán, P. E. E., Bechara, G. H., & Camargo-Mathias, M. I. (2016). Molecular, biological, and morphometric comparisons between different geographical populations of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 215, 78–87. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.11.007>