



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**

**Trabajo de fin de Carrera titulado:**

Metagenómica bacteriana basada en el 16S de garrapatas obtenidas de bovinos de tres provincias del oriente ecuatoriano a través de secuenciación de tercera generación

**Realizado por:**

Ana Carolina Tituaña Puente

**Director del proyecto:**

José Rubén Ramírez Iglesias

**Como requisito para la obtención del título de:**

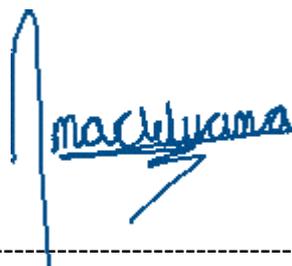
**MAGISTER EN BIOMEDICINA**

QUITO, 26 de marzo de 2024

## DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, Ana Carolina Tituaña Puente, ecuatoriana, con Cédula de ciudadanía N° 0603025693, declaro bajo juramento que el trabajo aquí desarrollado es de mi autoría, que no ha sido presentado anteriormente para ningún grado o calificación profesional, y se basa en las referencias bibliográficas descritas en este documento.

A través de esta declaración, cedo los derechos de propiedad intelectual a la UNIVERSIDAD INTERNACIONAL SEK, según lo establecido en la Ley de Propiedad Intelectual, reglamento y normativa institucional vigente.



Ana Carolina Tituaña Puente

C.I.: 0603025693

## **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.I.: 3050666993

**LOS PROFESORES INFORMANTES:**

Juan Carlos Navarro

Wilson David Dávila Aldas

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

---

Juan Carlos Navarro

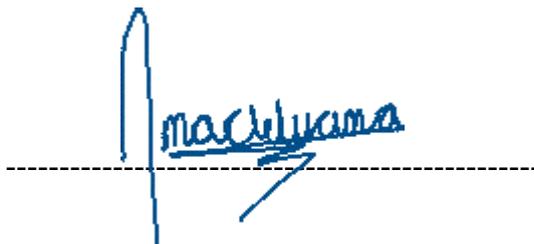
---

Wilson David Dávila Aldas

Quito, 26 de marzo de 2024

## DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigentes.



Ana Carolina Tituaña Puente

C.I.: 0603025693



Artículo de tesis

# Metagenómica bacteriana basada en el 16S de garrapatas obtenidas de bovinos de tres provincias del oriente ecuatoriano a través de secuenciación de tercera generación.

Carolina Tituaña<sup>1</sup>; José Rubén Ramírez<sup>2</sup> and Juan Carlos Navarro<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Maestría en Biomedicina, Fac Cs Salud, UISEK; ana.tituaana@uisek.edu.ec

<sup>2</sup> Universidad Internacional SEK, Grupo de Investigación en Enfermedades Emergentes, Epidemiología y Biodiversidad, Facultad de Ciencias de la Salud, [jose.ramirez@uisek.edu.ec](mailto:jose.ramirez@uisek.edu.ec)

<sup>3</sup> Universidad Internacional SEK, Grupo de Investigación en Enfermedades Emergentes, Epidemiología y Biodiversidad, Facultad de Ciencias de la Salud, [juancarlos.navarro@uisek.edu.ec](mailto:juancarlos.navarro@uisek.edu.ec)

**Resumen:** *Rhipicephalus microplus* es una especie de garrapata reconocida mundialmente por su impacto en la ganadería y la salud pública. La comprensión de su bacterioma es vital para entender su papel como vector de enfermedades. A pesar de su importancia, en Ecuador, el conocimiento sobre su diversidad bacteriana es escaso, marcando una notable deficiencia dada su influencia económica y sanitaria. El objetivo de la presente investigación fue determinar el perfil microbiano presente en las garrapatas recolectadas en tres provincias del oriente ecuatoriano (Orellana, Sucumbios y Napo) a través de la secuenciación de los amplicones de ADN V3-V4; V4-V5 de la región 16S usando la tecnología de Oxford Nanopore, con la finalidad de brindar una comprensión detallada de la diversidad bacteriana presente y sus posibles implicaciones en la salud pública. Utilizando 70 pools de ADN suministrados por el CIZ de la Universidad Central del Ecuador, se amplificaron las regiones anteriormente nombradas. Los amplicones resultantes se clasificaron según el lugar de recolección para posteriormente ser secuenciados. Los datos obtenidos se analizaron utilizando la plataforma EPI2ME. Se identificaron 45 géneros bacterianos en este estudio, clasificándose de la siguiente manera: 12.20% como endosimbiontes, 51.22% de origen ambiental, 12.20% como patógenos, y un 24.39% quedó sin clasificación clara. Entre los más prevalentes figuraron *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Ehrlichia*, con Sucumbios presentando mayores prevalencias de los tres primeros, y Napo resaltando por la presencia de *Ehrlichia*. Napo también reveló géneros exclusivos como *Paracoccus*, *Alcanivorax* y *Clostridium*. Los hallazgos sugieren interacciones endosimbióticas complejas, especialmente con *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas* y *Bacillus*, y resaltó la importancia de estos artrópodos en la diseminación de patógenos como *Brucella*, *Ehrlichia*, *Corynebacterium* y *Anaplasma* subrayando la urgencia de implementar medidas de vigilancia epidemiológica eficaces.

**Palabras clave:** *Rhipicephalus microplus*; Nanopore; bacterioma; microbiota; ganado; MinION; vectores zoonóticos; salud animal

**Abstract:** *Rhipicephalus microplus* is a species of tick recognized worldwide for its impact on livestock and public health. Understanding its bacteriome is vital to comprehend its role as a disease vector. Despite its importance, in Ecuador, knowledge about its bacterial diversity is scarce, marking a significant deficiency given its economic and health influence. The aim of this research was to determine the microbial profile present in ticks collected from three eastern Ecuadorian provinces (Orellana, Sucumbios, and Napo) through the sequencing of DNA amplicons V3-V4; V4-V5 of the 16S region using Oxford Nanopore technology, to provide a detailed understanding of the present bacterial diversity and its possible implications for public health. Using 70 DNA pools supplied by the CIZ of the Central University of Ecuador, the regions were amplified. The resulting amplicons were classified according to the collection site and then sequenced. The data obtained were analyzed using the EPI2ME platform. In this study, 45 bacterial genera were identified, classified as follows: 12.20% as endosymbionts, 51.22% of environmental origin, 12.20% as pathogens, and 24.39% remained without clear classification. Among the most prevalent were *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, and *Ehrlichia*, with Sucumbios showing higher prevalences of the first three, and Napo standing out for the presence of *Ehrlichia*. Napo also revealed exclusive genera such as *Paracoccus*, *Alcanivorax*, and *Clostridium*. The findings suggest complex endosymbiotic interactions, especially with *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, and *Bacillus*, and highlighted the importance of these arthropods in the spread of pathogens such as *Brucella*, *Ehrlichia*, *Corynebacterium*, and *Anaplasma*, underscoring the urgency of implementing effective epidemiological surveillance measures.

**Keywords:** *Rhipicephalus microplus*; Nanopore; bacteriome; microbiota; livestock; MinION; zoonotic vectors; animal health

## 1. Introducción

Las garrapatas, artrópodos del suborden Ixodida, se dividen en dos familias principales: Argasidae e Ixodidae. La familia Ixodidae, la más amplia, cuenta con 707 especies descritas (Hodosi et al., 2022; Nicholson et al., 2019).

El cuerpo de la garrapata consta de tres segmentos principales: el capitulum, el idiosoma y las patas. Estos artrópodos atraviesan cuatro fases en su ciclo de vida: huevo, larva, ninfa y adulto durante las cuales necesitan alimentarse de sangre y pueden sobrevivir sin hacerlo durante uno o más años (Hodosi et al., 2022; Nicholson et al., 2019). Estos ectoparásitos pueden transmitir enfermedades a sus hospederos, convirtiéndose en portadores de agentes patógenos que afectan tanto a animales como a humanos (Suminda et al., 2022). Gracias a su prolongada vida, alta tasa de reproducción y capacidad para alimentarse de diversos hospederos, las garrapatas se destacan como vectores altamente eficientes (Jongejan & Uilenberg, 2004; Madison-Antenucci et al., 2020; Nicholson et al., 2019).

Dentro de este contexto, la garrapata *Rhipicephalus microplus* emerge como una de las especies más prevalentes y ampliamente distribuidas que afectan al ganado (Janadaree Bandara & Parakrama Karunaratne, 2017). Con un ciclo de vida corto y monoxénico, depende de un único hospedador durante su desarrollo (Pereira et al., 2022). Esta garrapata ha sido identificada en la mayoría de los países tropicales y subtropicales, emergiendo como el ectoparásito de mayor relevancia económica para la industria ganadera a nivel global (Kumar, 2019). Su presencia en el ganado ocasiona daños directos como traumatismos, infecciones, deterioro de la piel y pérdida de peso, lo cual afecta negativamente la producción de leche, carne y cuero (Grisi et al., 2014). Además, esta especie se destaca por su capacidad para transmitir enfermedades al ganado, incluyendo la babesiosis (causada por *B. bovis* y *B. bigemina*), la theileriosis (ocasionada por *Theileria spp*) y la anaplasmosis (producida por *A. marginale*). Asimismo, puede transmitir *A. phagocytophilum* a los seres humanos, provocando la anaplasmosis granulocítica humana (Almazán et al., 2022).

Además de albergar diversas bacterias patógenas, la composición bacteriana de *Rhipicephalus microplus* también incluye endosimbiontes, que pueden establecer relaciones comensales, mutualistas o parasitarias, formando lo que se conoce como su bacterioma (Kaur et al., 2021). El primer estudio que exploró el bacterioma de esta especie de garrapata mediante métodos no cultivables fue realizado por Andreotti et al. en 2011. En este estudio, se identificaron 11 géneros bacterianos en el intestino, destacando *Wolbachia*, *Coxiella* y *Borrelia*. En otra investigación llevada a cabo por Segura et al. (2019), se detectaron 112 géneros bacterianos en ejemplares recolectados. Además de *Coxiella*, *Anaplasma* y *Ehrlichia*, reconocidos como agentes importantes para la salud pública, se identificó el endosimbionte *Lysinibacillus*, previamente considerado una herramienta potencial para el control biológico y encontrado por primera vez en esta especie de garrapata. Un estudio más reciente realizado por Zhang et al. en 2022, encontró 95 géneros en muestras de *R. microplus*, incluyendo cinco géneros, no informados anteriormente en esta especie, identificados como *Mycobacterium*, *Brachyspira*, *Campylobacter*, *Occidentia* y *Neisseria*. Este estudio reveló también la presencia de *A. phagocytophilum*, un patógeno zoonótico, y *Brachyspira*, causante de la espiroquetosis intestinal porcina. Estos hallazgos subrayan la necesidad apremiante de comprender la diversidad microbiana en *R. microplus* y la implementación de medidas preventivas para salvaguardar la salud del ganado y de los seres humanos.

En Ecuador, a pesar del clima propicio para el desarrollo de *Rhipicephalus microplus*, la investigación sobre su bacterioma es escasa. Los pocos estudios existentes se han limitado a la exploración de patógenos específicos habituales en esta especie de garrapata. Por ejemplo, un análisis realizado en 2015 reveló la presencia de bacterias del género *Rickettsia* y *Anaplasma*, incluyendo especies como *Rickettsia monacensis*, *Rickettsia tamurae*, *Anaplasma phagocytophilum* y *Anaplasma marginale*. Es importante señalar que dicho estudio utilizó la técnica de PCR y se focalizó exclusivamente en 4 géneros: *Rickettsia spp.*, *Anaplasma spp.*, *Ehrlichia spp.* y *Borrelia spp.* (Pesquera et al., 2015). Además, dos estudios realizados en 2020 en las provincias de Santo Domingo y Los Ríos detectaron la presencia de *A. marginale* en diferentes fincas y en la Empresa Municipal del Cantón Quevedo (EMCQ), utilizando la misma técnica de PCR. En Santo Domingo, la prevalencia fue del 83%, mientras que en Los Ríos fue del 13.46%. Del total de muestras positivas en Los Ríos, el 22.58% provenía de muestras extraídas de haciendas, mientras que el resto correspondía a las recolectadas en la EMCQ (Escobar et al., 2015; Maya-Delgado et al., 2020). Estos resultados resaltan la necesidad urgente de investigar el bacterioma de *Rhipicephalus microplus* en Ecuador. La falta de información al respecto conlleva un riesgo potencial de propagación de enfermedades causadas por bacterias aún no estudiadas.

La investigación de bacterias zoonóticas en el bacterioma de la garrapata *Rhipicephalus microplus* es vital debido a la estrecha interacción humano-ganado en actividades agrícolas y ganaderas (Zeru et al., 2020). Entre estas bacterias se han reportado *Rickettsia rickettsii* y *Rickettsia parkeri*, causantes de la fiebre manchada de las Montañas Rocosas y la fiebre de las garrapatas, respectivamente (Dye-Braumuller et al., 2023; Lu et al., 2022; Sato et al., 2020; Xu et al., 2023). También se han detectado *Coxiella burnetii*, responsable de la fiebre Q, y especies de *Anaplasma* y *Borrelia* asociadas con la anaplasmosis y la enfermedad de Lyme (Ali et al., 2023; Cordeiro et al., 2018; Dye-Braumuller et al., 2023; Guo et al., 2019; Jiao et al., 2021; Morel et al., 2019; Rialch et al., 2022; Xu et al., 2023). La investigación en Ecuador está notablemente limitada, con apenas unos pocos estudios sobre seroprevalencia y detección de patógenos. En un estudio, Manock et al. (2009) descubrieron anticuerpos contra agentes rickettsiales, fiebre Q y brucelosis en pacientes con enfermedad febril aguda no diferenciada (EFAD) en la cuenca del Amazonas. Por otro lado, Pesquera et al. (2015) identificaron la presencia de *R. monacensis* y *A. phagocytophilum* en *R. microplus*. Mientras tanto, Echeverría et al. (2019) detectaron anticuerpos contra *Coxiella*

*burnetii* tanto en ganado como en trabajadores agrícolas, lo que sugiere la posible endemicidad de la fiebre Q en Ecuador. Por tanto, es crucial reconocer esta situación y prestar atención a la creciente amenaza que estas enfermedades representan para la salud pública (Suminda et al., 2022).

Una de las razones por las cuales el país ha subestimado el impacto de las enfermedades transmitidas por garrapatas (ETG) se debe a las limitaciones en la detección de microorganismos patógenos mediante técnicas como la PCR o la detección de anticuerpos a través de ELISA (Liu et al., 2022). Sin embargo, los avances tecnológicos en el análisis genómico, como las plataformas de secuenciación de próxima generación, han transformado este campo al posibilitar el procesamiento eficaz de grandes volúmenes de datos a un costo más asequible (Benavides et al., 2016). Entre estas innovaciones, destaca el MinION, el primer secuenciador comercial que emplea nanoporos para identificar las bases de ADN mediante cambios en la conductividad eléctrica, lo que proporciona portabilidad, accesibilidad y generación rápida de datos (Lu et al., 2016). Estos avances han impulsado la metagenómica bacteriana en el estudio de las garrapatas, mejorando la comprensión de la diversidad de microorganismos en este vector y evaluando su papel como reservorios de enfermedades. Además, han sido cruciales para proporcionar información esencial para la detección temprana y el control de epidemias y epizootias al identificar patógenos emergentes (Benavides et al., 2016).

En Ecuador, el sector agrícola, incluida la ganadería, representa alrededor del 7,80% del total del producto interno bruto (Argüello et al., 2012). La población bovina ecuatoriana, es de alrededor de 4,3 millones de cabezas, provenientes de 280.000 haciendas ganaderas a nivel nacional (Rodríguez-Hidalgo et al., 2017). Más del 75% de los rebaños de ganado se encuentran en áreas infectadas o potencialmente infestadas de garrapatas (Pesquera et al., 2015). El conocimiento exhaustivo de las bacterias presentes en las garrapatas permitirá prevenir brotes de enfermedades y desarrollar estrategias de mitigación efectivas, lo que a su vez contribuirá a reducir las pérdidas económicas y productivas en el sector ganadero. Además, es fundamental tener en cuenta que la Constitución de la República del Ecuador del 2018, en su artículo 32, establece el derecho de todos los ciudadanos a la salud, lo cual enfatiza aún más la importancia de estudiar el microbioma de las garrapatas para evitar la transmisión de enfermedades graves a las personas.

Es relevante destacar que la presente investigación se basa exclusivamente en muestras recolectadas de tres provincias del oriente ecuatoriano: Orellana, Sucumbíos y Napo. Estas muestras forman parte del proyecto más amplio conocido como "Artrópodos", llevado a cabo por el Centro de Investigación de Zoonosis de la Universidad Central del Ecuador. El objetivo principal del proyecto consiste en mapear las enfermedades zoonóticas y epizoóticas que afectan a animales y humanos en todo el territorio ecuatoriano, con el propósito de obtener información epidemiológica.

En el marco de esta investigación, se planteó la hipótesis de la posible presencia de bacterias de importancia epidemiológica, como *Rickettsia*, *Anaplasma*, *Borrelia* y *Coxiella*, en las garrapatas que infectan al ganado bovino en las tres provincias antes mencionadas. Además, se sugirió la existencia de similitudes en los géneros bacterianos encontrados tanto entre las provincias estudiadas como entre países vecinos, debido a factores ecológicos. Con base en lo anteriormente planteado, el objetivo de la presente investigación fue determinar el perfil microbiano presente en las garrapatas recolectadas en tres provincias del oriente ecuatoriano (Orellana, Sucumbíos y Napo) a través de la secuenciación de los amplicones de ADN V3-V4; V4-V5 de la región 16S usando la tecnología de Oxford Nanopore, con la finalidad de brindar una comprensión detallada de la diversidad bacteriana presente y sus posibles implicaciones en la salud pública.

## 2. Materiales y Métodos

### 2.1 Área de Estudio

En el presente estudio, se emplearon los mismos 70 pools de ADN de garrapatas utilizados previamente en la investigación realizada por Muñoz en 2023. Dicha investigación proporciona información detallada acerca de los lugares de recolección de las garrapatas, el protocolo utilizado para la extracción de ADN y la formación de los pools. Es importante destacar que todas las garrapatas utilizadas en este estudio pertenecen exclusivamente a la especie *Rhipicephalus microplus* y fueron facilitadas por el Centro de Investigación en Zoonosis de la Universidad Central del Ecuador (CIZ). El material genético utilizado en este estudio se extrajo meticulosamente de las glándulas salivales de estas garrapatas. Estos artrópodos fueron recolectados en las provincias de Napo, Orellana y Sucumbíos, ubicadas en la región amazónica de Ecuador.

### 2.2 Preparación de librerías

#### 2.2.1 Preparación de los extremos de las regiones V3-V4 y V4-V5 del gen 16S ARNr para la fijación del adaptador

### 2.2.1.1 Selección de Cebadores

Los cebadores que se utilizaron para la detección de ADN bacteriano se muestran en la tabla 1. Estos se escogieron por revisión bibliográfica y se sintetizaron con las colas especificadas en el protocolo de secuenciación de Nanopore, SQK-LSK109.

**Tabla 1:** Secuencias de cebadores

Región	Nombre	Secuencia	Referencia
V3-V4, forward	341F	5'- TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC CCCTACAGAGCTCTTCCGATCTGCCTAGGNGG CWGCA-3'	(Thijs et al., 2017)
V3-V4, reverse	806R	5'- ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC GGACTACHVGGGTWCTAAT-3'	(Walters et al., 2016)
V4-V5, forward	515F	5'- TTTCTGTTGGTGCTGATATTGC GTGCCAGCMGCCGCGTAA-3'	(Walters et al., 2016)
V4-V5, reverse	907R	5'- ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC CCGCAATTCMTTTRAGTTT-3'	(FUKUDA et al., 2016)

Las colas descritas en el protocolo de secuenciación Oxford Nanopore se encuentran diferenciadas en color rojo.

**Nota:** Elaboración propia.

### 2.2.1.2 PCR de las regiones V3-V4 y V4-V5 del gen 16S ARNr

Se utilizó el Máster Mix DreamTaq Green PCR (2X) de Thermo Científica™ K1081 para la amplificación de las regiones V3-V4 y V4-V5. El protocolo del fabricante fue seguido para ambas amplificaciones. Para la región V3-V4, se programó el termociclador de la siguiente manera: se realizó un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C durante 3 minutos, seguido de 25 ciclos de amplificación con una desnaturalización a 94 °C durante 30 segundos, una alineación a 50 °C durante 45 segundos, y una extensión a 72 °C durante 60 segundos. Finalmente, se realizó un ciclo de extensión final a 72 °C durante 10 minutos, y se mantuvo a una temperatura final de 4 °C. Para la región V4-V5, la programación del termociclador fue idéntica, con la única diferencia de que la temperatura de alineación se ajustó a 54 °C.

### 2.2.1.3 Verificación de la amplificación

Después de la amplificación, se visualizaron los productos de PCR en un gel de agarosa al 1,5%. Para confirmar la amplificación se buscaron bandas de 470 pb para la región V3-V4 y de 450 pb para la región V4-V5. Para los siguientes pasos, solo se utilizaron las muestras que fueron positivas para las 2 regiones.

### 2.2.2 Purificación y cuantificación

Los 38 amplicones positivos obtenidos tanto para la región V3-V4 como para la región V4-V5 fueron purificados utilizando el Kit de purificación de PCR PureLink™ de Invitrogen™, siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante. Se utilizó el protocolo específico para productos de PCR. Posteriormente, los amplicones purificados fueron cuantificados utilizando el sistema Qubit. Únicamente se utilizaron las muestras que presentaron una concentración igual o superior a 1,6 ng/μl tanto para la región V3-V4 como para la región V4-V5.

### 2.2.3 Asignación de códigos de barras mediante PCR

Se realizaron 6 grupos de amplicones clasificados según su provincia de origen. Dentro de cada grupo, se incluyeron los amplicones V3-V4 y V4-V5 correspondientes a la misma muestra. Se realizó la conversión de ng/μl a fmol/μl utilizando la herramienta NEBioCalculator de NEW ENGLAND BioLabs. Se ajustaron las concentraciones de cada grupo de tal forma que

sumadas dieron un total de entre 105 y 108 fmol por grupo (ver Tabla 2). Una vez alcanzada esta concentración, se llevó a cabo la PCR para asignarles un código de barras (B01-BC06) a cada conjunto utilizando el kit de cebadores para PCR de código de barras de Nanopore y el Máster Mix DreamTaq Green PCR (2X) de Thermo Scientific™ K1081. Los volúmenes de los reactivos utilizados se detallan en la Tabla 3. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: se realizó una desnaturalización inicial a 95 °C durante 3 minutos, seguida de 15 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos, hibridación a 62 °C durante 15 segundos y extensión a 72 °C durante 30 segundos. Por último, se realizó una extensión final a 72°C durante 30 segundos.

**Tabla 2** Concentraciones y códigos de barras asignados a las muestras por lugar de recolección

Muestras	Provincia	Concentración (fmol) de amplicones V3-V4	Concentración (fmol) de amplicones V4-V5	Código de barras para el grupo de amplicones	
1	Orellana	25,85	27,04	BC01	
2			26,96		
3	Napo	6,89	10,79	BC02	
4		10,33	8,99		
5		6,89	6,38		
6		6,89	6,15		
7		13,39	10,79		
8		13,56	7,19		
9		10,33	10,79		BC03
10		10,33	6,00		
11		10,33	7,19		
12		9,54	10,79		
13		10,33	6,51		
14		10,33	6,27		
15		Sucumbíos	10,33	7,19	
16			6,89	7,56	
17	8,81		7,96		
18	7,09		7,19		
19	8,99		7,19		
20	6,89		7,99	BC05	
21	6,89		7,19		
22	6,89		5,82		
23	6,89		7,19		
24	6,89		7,19		
25	10,33		10,79		
26	7,72		7,66		
27	6,89		7,19		

28		6,89	7,19	
Control Positivo	N/A	56,80	50,34	BC06

N/A: no aplica. Como control positivo se utilizó el estándar Microbial Community de ZymoBIOMICS. En Orellana se utilizó un solo código de barras porque solo se disponían de 4 muestras de amplicones.

**Nota:** Elaboración propia.

**Tabla 3** Volúmenes empleados para la PCR de código de barras

Reactivo/ Código de Barras	BC01	BC02	BC03	BC04	BC05	BC06
ADN	13,7 µl	12 µl		14 µl		3 µl
Agua	10,3 µl	12 µl		10 µl		21 µl
PCR de código de barras	1 µl					
Máster Mix DreamTaq Green	25 µl					

El volumen total de cada código de barra fue de 50 µl. **Nota:** Elaboración propia

#### 2.2.4 Purificación y cuantificación

Las bibliotecas codificadas se purificaron mediante el kit MagJET Magnetic Bead-Based Nucleic Acid Purification de Thermo Fisher. A continuación, se creó un pool único, combinando 2 µl de cada una de las bibliotecas. Este pool fue cuantificado utilizando el sistema Qubit, y se empleó una cantidad específica de 49,92 ng (175,61 fmol). Finalmente, se ajustó el volumen del pool único a 50 µl mediante la adición de agua libre de nucleasas.

#### 2.2.5 Reparación de ADN, preparación de los extremos de los amplicones y ligación de adaptadores

Se llevó a cabo la reparación de los extremos siguiendo las instrucciones establecidas en el protocolo SQK-LSK109 de Nanopore y utilizando los reactivos recomendados en dicho procedimiento. Posteriormente, se procedió a la ligación de adaptadores conforme a las indicaciones establecidas en el mismo protocolo y empleando los materiales recomendados. Para el enriquecimiento, se utilizó el buffer de fragmentos cortos.

#### 2.3 Preparación de la celda de flujo y carga de la biblioteca

Las etapas de la preparación de la celda de flujo, la biblioteca, y su carga en el dispositivo MinION Mk1C, se llevaron a cabo siguiendo el protocolo SQK-LSK109 de Nanopore. La celda de flujo que se utilizó fue la FLO-MIN106

#### 2.4 Adquisición de datos y basecalling

La adquisición de datos y el basecalling en tiempo real se llevaron a cabo utilizando el dispositivo MinION Mk1C. Las condiciones utilizadas fueron las siguientes: se seleccionó la celda de flujo FLO-MIN106, el kit SQK-LSK109 y el paquete de expansión de códigos de barras EXP-PBC001. La corrida se realizó durante 48 horas, con un qscore mínimo establecido en 7. No se definió una longitud mínima de lectura, y se habilitó el basecalling con la opción de "Alta precisión" (High-accuracy). Las opciones de barcoding y alineamiento se mantuvieron deshabilitadas, y el formato de salida para las lecturas fue el "Basecalled reads".

#### 2.5 Plan de análisis de resultados

Para obtener el perfil microbiano, los datos se analizaron utilizando la plataforma EPI2ME con el flujo de trabajo Fastq 16S. Las condiciones de análisis aplicadas fueron las siguientes: un qscore de 11, un filtro mínimo de lectura de 400, un filtro máximo de lectura de 500, un filtro de valor E BLAST de 0.01, una cobertura mínima del 95%, una identidad mínima del 90% (según la precisión esperada del kit V9 y las flowcells R.9), se permitió un máximo de 3 secuencias objetivo y el umbral mínimo de abundancia fue de 1%.

#### 2.6 Clasificación de géneros obtenidos

Para determinar la clasificación de los géneros bacterianos en el contexto de su relación con las garrapatas, se llevó a cabo una revisión bibliográfica. Utilizando la base de datos PubMed, se realizaron búsquedas con un conjunto de palabras clave que incluyó el nombre de cada género bacteriano en combinación con los siguientes términos "tick symbiosis", "tick-borne", "environmental presence", "tick microbiome", "pathogenicity", y "vector-borne diseases". Se definió como

endosimbiontes a aquellos géneros que mostraban una asociación simbiótica en la que el microorganismo vive dentro de la garrapata con un impacto fisiológico directo y que a menudo resulta en una relación mutuamente beneficiosa. Los géneros clasificados como ambientales fueron aquellos típicamente encontrados en el entorno natural de las garrapatas, como el suelo, el agua o su hospedero, y que podrían ser adquiridos por las garrapatas sin establecer una relación simbiótica. Los patógenos incluyeron aquellos géneros conocidos por ser transmitidos por garrapatas a humanos o animales y causar enfermedades. Finalmente, aquellos géneros que no mostraban evidencia clara de una relación simbiótica, patógena o ambiental con las garrapatas, o para los cuales la información era limitada o contradictoria, se colocaron en la categoría de sin información.

### 3 Resultados

#### 3.1 Detección de las regiones hipervariables V3-V4 y V4-V5 del gen 16S en los pools de garrapatas

Un total de 70 pools de garrapatas fueron analizados mediante PCR de punto final con el objetivo de seleccionar aquellos positivos para las regiones del 16S bacterianas, V3-V4 y V4-V5. Se utilizaron un total de 32 muestras de la provincia del Napo, de las cuales el 69% mostraron resultados positivos. Además, se utilizaron 10 muestras de la provincia de Orellana, de las cuales el 20% resultaron positivas. Por último, se analizaron 28 muestras de la provincia de Sucumbíos, con un 54% de ellas mostrando resultados positivos. Ver Tabla 4.

**Tabla 4:** Cantidad de muestras positivas y negativas para las regiones V3-V4 y V4-V5 del gen 16S en las 3 provincias analizadas

Provincia	Total	Muestras positivas
<b>Orellana</b>	10	2 (20%)
<b>Napo</b>	32	22 (69%)
<b>Sucumbíos</b>	28	15 (54%)

Las muestras clasificadas como positivas amplificaron tanto para la región V3-V4 como para la V4-V5. **Nota:** Elaboración propia.

#### 3.2 Resumen de los resultados de la secuenciación Nanopore

Se obtuvieron un total de 3095 lecturas a partir de la secuenciación de las 38 muestras positivas de las 3 provincias analizadas. Solo el 12% de estas lecturas pudo ser correctamente clasificada. Es importante mencionar que todas estas lecturas cumplieron con los parámetros establecidos para la secuenciación. Ver Tabla 5.

**Tabla 5:** Resumen de resultados de la secuenciación realizada

Lecturas clasificadas	Lecturas totales obtenidas		QC y código de barras	
	Lecturas no clasificadas	Promedio de identidad (%)	Rendimiento total (Mbases)	Promedio de Qscore
365	2730	94,78	35,3	13,71

Los datos presentados son del total de muestras analizadas. **Nota:** Elaboración propia.

En la provincia de Orellana, solo el 12% de las lecturas pudo ser correctamente clasificado, mientras que, en Sucumbíos, el 22% de las lecturas fueron clasificadas y en Napo, el 20% de las lecturas fueron clasificadas. La mayor cantidad de lecturas se obtuvieron de la provincia de Sucumbíos. Es importante mencionar que en la provincia de Orellana se obtuvieron únicamente 5 lecturas en total. Ver Tabla 6.

**Tabla 6:** Lecturas obtenidas en cada provincia

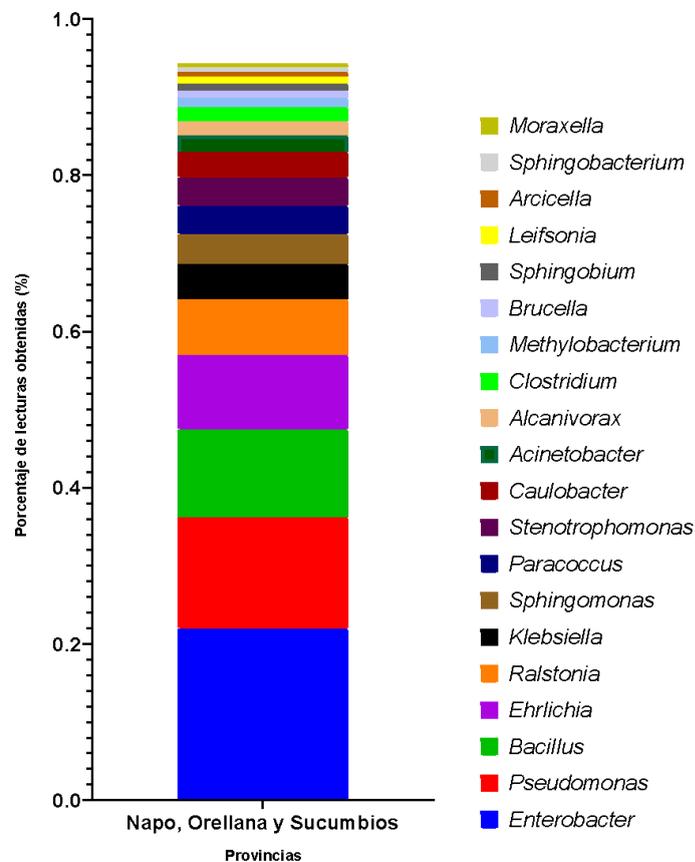
Provincia/Lecturas	Lecturas clasificadas	Lecturas no clasificadas
<b>Orellana</b>	2	3
<b>Napo</b>	116	406
<b>Sucumbíos</b>	237	944

Todas las lecturas presentadas cumplieron con todos los parámetros establecidos. **Nota:** Elaboración propia.

#### 3.3 Clasificación microbiana y porcentajes obtenidos de cada género en las 3 provincias

De los 45 géneros identificados en total el estudio, 20 de ellos presentaron abundancias superiores al 1%. Destacaron particularmente los géneros *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Ehrlichia*, que juntos representan más del 50% de la abundancia total observada, sumando específicamente un 57%. *Enterobacter* fue el más prevalente con un 22%, seguido de *Pseudomonas* con un 14%, *Bacillus* con un

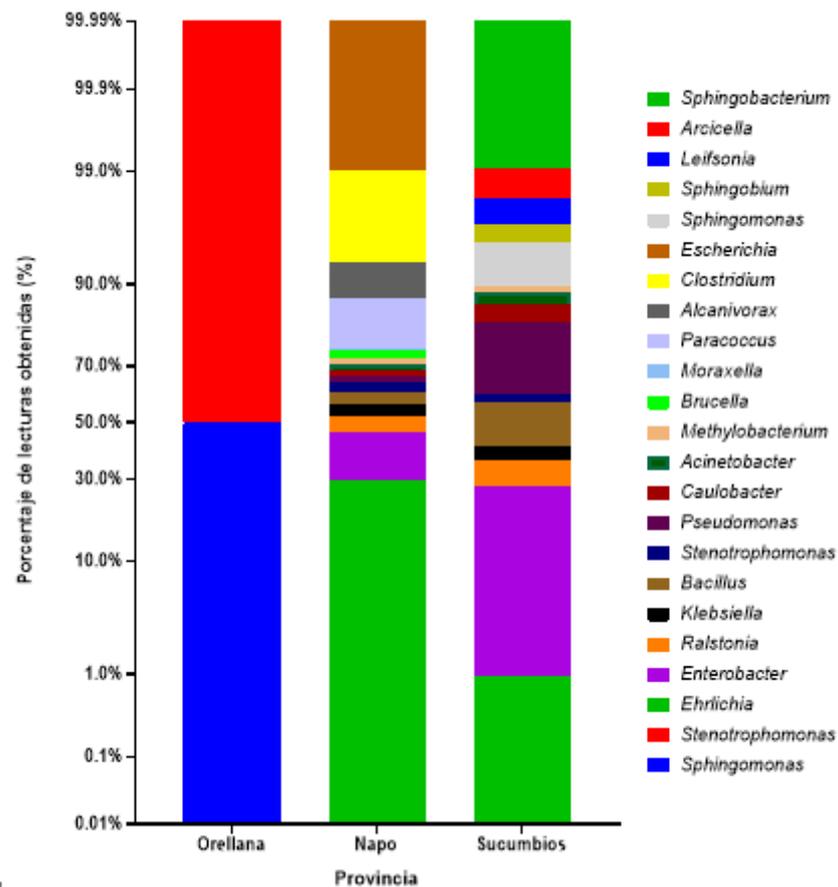
11% y *Ehrlichia* con un 9%, destacando su significativa contribución a la composición microbiana global.



**Figura 1.** Clasificación bacteriana a nivel de género, los datos representan los porcentajes de lecturas obtenidas para cada género en relación con el total de lecturas por las 3 provincias. Se han incluido únicamente los géneros con una abundancia superior al 1%. **Nota:** Elaboración propia.

### 3.4 Clasificación microbiana y porcentajes obtenidos de cada género en cada provincia

En la provincia de Orellana, se detectaron únicamente dos géneros, *Sphingomonas* y *Stenotrophomonas*, ambos con idéntico número de lecturas. En cuanto a las provincias de Napo y Sucumbios, se encontraron presentes los géneros *Ehrlichia*, *Enterobacter*, *Ralstonia*, *Klebsiella*, *Bacillus*, *Stenotrophomonas*, *Pseudomonas*, *Caulobacter*, *Acinetobacter* y *Methylobacterium*, aunque con variaciones en sus porcentajes de prevalencia. Los géneros que mostraron diferencias de prevalencia superiores al 5% entre estas dos provincias fueron *Enterobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus* y *Ehrlichia*. Específicamente, Sucumbios exhibió mayores prevalencias de *Enterobacter* (25%), *Pseudomonas* (20%) y *Bacillus* (15%) en comparación con Napo, donde las prevalencias registradas fueron de 16%, 2% y 4%, respectivamente, marcando diferencias de 9%, 18% y 11%. Por contraste, Napo mostró una prevalencia sustancialmente mayor de *Ehrlichia*, alcanzando un 28% frente al 1% observado en Sucumbios, lo que representa una notable diferencia del 27%. Además, se identificaron exclusivamente en Napo géneros como *Paracoccus* (11%), *Alcanivorax* (6%) y *Clostridium* (6%), todos con prevalencias superiores al 5%. Debido al limitado hallazgo de solo dos géneros en Orellana, esta provincia fue descartada para los análisis subsiguientes. Ver Figura 1 para más detalles.



**Figura 2.** Clasificación bacteriana a nivel de género, los datos representan los porcentajes de lecturas obtenidas para cada género en relación con el total de lecturas por provincia. Se han incluido únicamente los 15 géneros más abundantes. **Nota:** Elaboración propia.

### 3.5 Clasificación de los géneros encontrados

De los géneros bacterianos identificados, un 12.20% fueron categorizados como endosimbiontes, implicando una relación simbiótica con las garrapatas. La mayoría, representando un 51.22%, se clasificaron como de origen ambiental, señalando que podrían ser adquiridos de su entorno natural. Un 12.20% se identificaron como patógenos, conocidos por su capacidad de transmisión a través de garrapatas y causar enfermedades en hospederos, mientras que un 24.39% quedaron clasificados en la categoría de 'sin información', debido a la falta de datos concluyentes sobre su relación con las garrapatas.

**Tabla 7: Clasificación de géneros encontrados.**

Endosimbiontes	Ambientales	Patógenos	Sin información
<i>Pseudomonas</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Ehrlichia</i>	<i>Caulobacter</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Ralstonia</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Alcanivorax</i>
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Sphingomonas</i>	<i>Brucella</i>	<i>Leifsonia</i>
<i>Acinetobacter</i>	<i>Paracoccus</i>	<i>Anaplasma</i>	<i>Arcicella</i>
<i>Sphingobacterium</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Bordetella</i>	<i>Moraxella</i>

	<i>Methylobacterium</i>		<i>Microvirga</i>
	<i>Sphingobium</i>		<i>Bifidobacterium</i> :
	<i>Escherichia</i>		<i>Peptoniphilus</i>
	<i>Cloacibacterium</i>		<i>Klebsiella</i>
	<i>Brevundimonas</i> :		<i>Escherichia</i>
	<i>Phenylobacterium</i>		
	<i>Martellella</i>		
	<i>Methylorubrum</i>		
	<i>Massilia</i>		
	<i>Khuyvera</i>		
	<i>Raoultella</i>		
	<i>Rhodanobacter</i>		
	<i>Aeromicrobium</i> :		
	<i>Marmoricola</i>		
	<i>Rochothrix</i> :		
	<i>Staphylococcus</i>		

En esta tabla se enumeran todos los géneros encontrados, incluyendo aquellos que no se muestran en la figura 1 debido a su baja abundancia. **Nota:** Elaboración propia.

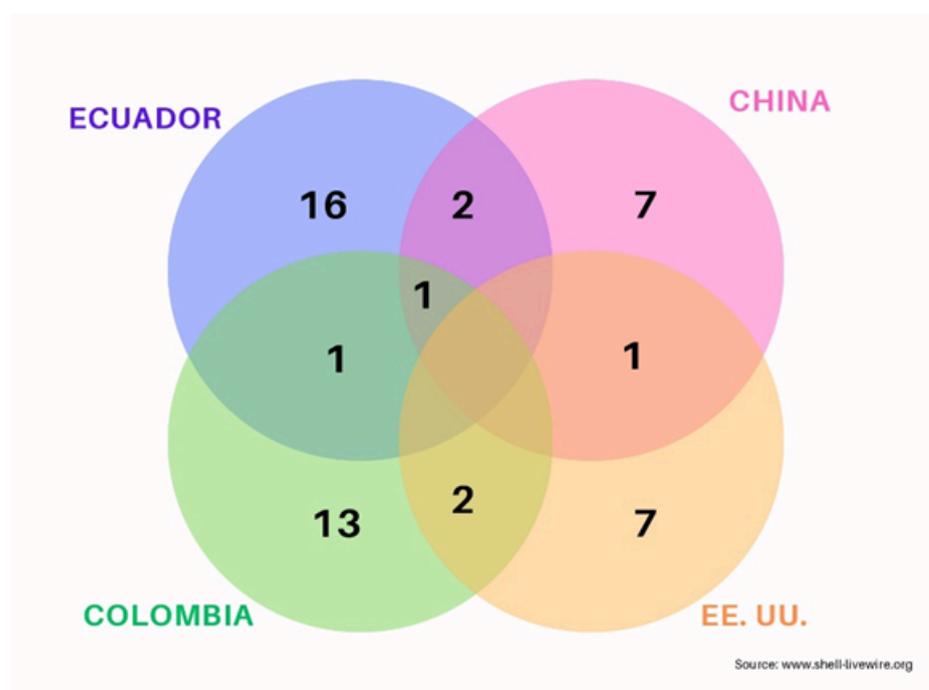
#### 4. Discusión

Este estudio abordó en detalle el perfil microbiano de las garrapatas *Rhipicephalus microplus* recolectadas en el oriente ecuatoriano, empleando secuenciación masiva con la tecnología Oxford Nanopore, lo cual representa una innovación pionera en el país. Mediante el análisis de 38 muestras, que equivalen a alrededor de 114 garrapatas en total, se logró la identificación de un conjunto de 45 géneros bacterianos presentes en las tres provincias. La detección de una amplia diversidad de géneros bacterianos en las garrapatas no es un hallazgo aislado, pues investigaciones anteriores también han confirmado la presencia de este fenómeno. Andreotti et al. (2011) identificaron 11 géneros bacterianos en el intestino de garrapatas adultas en Estados Unidos mediante pirosecuenciación de amplicones etiquetados (Roche 454). Desde entonces, se han realizado investigaciones similares. Segura et al. (2020) exploraron la diversidad bacteriana en el intestino y glándulas salivales de garrapatas hembra en Colombia, detectando 112 géneros bacterianos con MiSeq de Illumina. Además, Zhang et al. (2022) encontraron 95 géneros bacterianos utilizando la misma tecnología en el intestino de garrapatas hembra en Hunan, China. Aunque el presente estudio indica una diversidad mayor a la observada en Estados Unidos, es menor comparada con la de Colombia y China. Esto puede deberse a variaciones en factores ambientales y biológicos como la geografía, clima, tipo de suelo, y las características específicas de las garrapatas y sus hospederos, lo que resalta la complejidad de las interacciones ecológicas y la importancia de estudios locales para comprender la biodiversidad microbiana en vectores de enfermedades (Greay et al., 2018)

La ubicación geográfica y las condiciones ambientales juegan un papel crucial en la variabilidad del microbioma de las garrapatas, como lo evidencian estudios previos (Gurfield et al., 2017; Krawczyk et al., 2022; Kueneman et al., 2021). A pesar de que la especie de garrapata y su hospedador (el ganado bovino) se mantienen consistentes con investigaciones anteriores, la ubicación específica, el oriente ecuatoriano, resulta ser un factor determinante en la diversidad microbiológica. Según un modelo de nicho ecológico de 2020, Texas presenta una alta idoneidad para *Rhipicephalus microplus*, mientras que Antioquia y el oriente ecuatoriano muestran idoneidades medias, y Hunan, una baja (Marques et al., 2020). Por ende, se esperaría que la cantidad de géneros microbiológicos encontrados en

este estudio (45) fuese similar a la registrada en Antioquia (112). No obstante, la discrepancia observada sugiere que la disminución en la diversidad microbiológica podría atribuirse a la técnica de secuenciación empleada. La tecnología de Oxford Nanopore (ONT) enfrenta limitaciones para clasificaciones y cuantificaciones precisas, a diferencia de Illumina, la cual proporciona una mayor exactitud en la determinación de la abundancia relativa a nivel de género. Es probable que algunos géneros de baja abundancia no hayan sido detectados debido a la plataforma seleccionada. Las mayores tasas de error de ONT podrían comprometer la identificación de secuencias bacterianas, especialmente en presencias de baja abundancia o secuencias genéticas complejas (Akaçin et al., 2022). Adicionalmente, la diversidad podría haberse visto influenciada por el hecho de que en el estudio realizado en Colombia se analizaron tanto las glándulas salivales como los intestinos de las garrapatas, órganos que podrían albergar comunidades microbiológicas diferentes, incrementando así la diversidad observada.

Al comparar los géneros bacterianos identificados en el presente estudio con los resultados obtenidos en investigaciones similares previas realizadas en diferentes ubicaciones geográficas, se destacan similitudes notables, especialmente en la presencia de *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, *Enterobacter* y *Bacillus* (ver Figura 3) (Andreotti et al., 2011; Segura et al., 2020; Zhang et al., 2022). Estos géneros compartidos podrían estar desempeñando funciones específicas tanto en las glándulas salivales como en el intestino de *R. microplus*, influenciando aspectos clave de su fisiología y su interacción con el hospedero. Es interesante observar que, a pesar de las diferencias en los enfoques de estudio y las ubicaciones geográficas, los géneros bacterianos compartidos podrían ser representativos de endosimbiontes obligados para *R. microplus*, sugiriendo una convergencia evolutiva significativa en la relación entre las garrapatas y su microbioma (Narasimhan & Fikrig, 2015a; Wiesinger et al., 2023a). En particular, la presencia de *Pseudomonas* en las glándulas salivales, aunque no reportada previamente en esta ubicación específica, plantea interrogantes sobre su función potencial en la alimentación de la garrapata (Adegoké et al., 2022; Chicana et al., 2019; Díaz-Sánchez et al., 2019; Li et al., 2022; Narasimhan et al., 2021; Narasimhan & Fikrig, 2015b; Tveten et al., 2013; Wiesinger et al., 2023a; Williams-Newkirk et al., 2014). Se postula que su capacidad para modificar proteínas en la saliva podría influir en la respuesta inmune del hospedero durante la alimentación (Wiesinger et al., 2023b). Del mismo modo, *Stenotrophomonas* podría estar asociada con la resistencia a patógenos transmitidos por las garrapatas, destacando la importancia de comprender la interacción entre estos microorganismos y su hospedero en el contexto de la salud pública y la ecología (Adegoké et al., 2022; Díaz-Sánchez et al., 2019; Duan et al., 2020; Li et al., 2022; Narasimhan & Fikrig, 2015b). *Bacillus*, previamente documentado en otras especies de garrapatas, se postula que podría tener un papel en la modulación de la respuesta inmune del hospedador (Narasimhan et al., 2021; Sonenshine & Stewart, 2021). Por otro lado, parece que *Enterobacter* no está asociado fisiológicamente con la garrapata, sino que más bien actúa como un colonizador oportunista que se adquiere junto con la sangre ingerida, y puede permanecer durante el proceso de alimentación gracias a su sistema redox bien desarrollado (Adegoké et al., 2022; Díaz-Sánchez et al., 2019; Karim et al., 2017; Li et al., 2022; Narasimhan & Fikrig, 2015b; Sonenshine & Stewart, 2021). Estos hallazgos subrayan la importancia de estudios que investiguen la diversidad y función de los microorganismos asociados con garrapatas, no solo para el control de enfermedades transmitidas por garrapatas, sino también para comprender mejor la biología de estos vectores y su impacto en los ecosistemas que habitan.



**Figura 3.** Análisis de la coincidencia de géneros entre estudios similares sobre *R. microplus*. Se presenta la cantidad de géneros compartidos con diferentes estudios, considerando únicamente aquellos con una prevalencia superior al 1%. Se observan las siguientes coincidencias: Ecuador-China (*Enterobacter*, *Bacillus*), Ecuador-Colombia-China (*Pseudomonas*), Ecuador-Colombia (*Stenotrophomonas*), Colombia-Estados Unidos (*Staphylococcus*, *Escherichia*), y China-Estados Unidos (*Enterococcus*). Los estudios analizados son los de Andreotti et al. (2011) en Estados Unidos, Zhang et al. (2022) en China y Segura et al. (2020) en Colombia. Cada uno de estos estudios contribuye con géneros obtenidos del intestino en los dos primeros casos, mientras que el último aporta géneros obtenidos de glándulas salivales e intestino. Elaboración propia utilizando [www.shell-livewire.org](http://www.shell-livewire.org).

La comparación entre los géneros encontrados en las muestras de Napo y Sucumbíos revela diferencias relevantes. Mientras que en Sucumbíos los géneros identificados, así como sus prevalencias, están frecuentemente asociados con *R. microplus*, como *Pseudomonas* y *Bacillus*, en Napo ocurre lo contrario (Adegoke et al., 2022; Díaz-Sánchez et al., 2019; Narasimhan et al., 2021; Narasimhan & Fikrig, 2015; Segura et al., 2020). Es destacable la alta prevalencia de *Ehrlichia* (28%) en Napo, en contraste con las bajas prevalencias de *Pseudomonas* (2%) y *Bacillus* (4%). La presencia en proporciones significativas de un género patógeno como *Ehrlichia* no es común (Cabezas-Cruz et al., 2016; Cicculli et al., 2019; Melo et al., 2021; Zhang et al., 2022). Esta discrepancia en las prevalencias podría sugerir una competencia entre bacterias, similar a lo observado en las garrapatas *Ixodes*, donde una mayor abundancia de microbios ambientales como *Bacillus* y *Pseudomonas* está relacionada con una disminución en la colonización de patógenos (Ross et al., 2018). Aunque no se ha demostrado que una alta presencia de patógenos disminuya estos microbios ambientales, este patrón sugiere una competencia entre ellos. No obstante, esta hipótesis requiere de más investigaciones para su corroboración. Además, en Napo se han identificado tres géneros poco comunes de garrapatas con prevalencias significativas: *Paracoccus* (11%), *Alcanivorax* (6%), y *Clostridium* (6%). Es posible que *Paracoccus* y *Clostridium* hayan sido adquiridos por las garrapatas del entorno o de la piel del hospedero, actuando como bacterias transitorias (Karim et al., 2017; Machado-Ferreira et al., 2012). En cuanto a *Alcanivorax*, su detección en garrapatas es un hallazgo notable, ya que hasta donde alcanza nuestro conocimiento, no se había reportado este género en estos artrópodos. Dado que *Alcanivorax* es comúnmente encontrado en ambientes marinos y es conocido por su habilidad para degradar hidrocarburos alifáticos, su presencia en áreas no marinas sugiere una posible contaminación ambiental (Zadjelovic et al., 2020). Es probable que esta bacteria haya sido transportada al suelo a través de materiales contaminados, como desechos petroleros o aguas residuales, y las garrapatas hayan entrado en contacto con ella al contacto con el suelo.

La identificación de géneros con posibles implicaciones patógenas se convierte en un aspecto de suma relevancia en este estudio. Entre ellos, destaca *Brucella*, que, a pesar de haberse encontrado en cantidades reducidas en Napo (1.96%) y en Sucumbíos (menos del 1%), merece un análisis detenido. *Brucella* es el agente causal de la brucelosis, una enfermedad altamente infecciosa que puede tener efectos devastadores en la producción de ganado, incluyendo abortos y pérdidas económicas. También presenta un riesgo para la salud humana, ya que puede causar la fiebre de Malta (Saleem, 2019). En Ecuador, donde la brucelosis es prevalente en el ganado bovino (5,7%), este hallazgo cobra una importancia crítica al explorar la posible contribución de las garrapatas en la transmisión de esta enfermedad (Agrocalidad, 2018). Otro género de interés es *Corynebacterium*, que, aunque generalmente actúa como comensal en las glándulas mamarias de las vacas, plantea interrogantes sobre su papel en la salud del ganado y su influencia en la producción de leche al estar relacionado con la mastitis (Gonçalves et al., 2016). Además, se ha encontrado evidencia de la presencia de *Anaplasma*, el agente causante de la anaplasmosis en el ganado bovino. Se destaca adicionalmente la posibilidad de que se trate de la especie *A. phagocytophilum*, que representa una amenaza zoonótica para la salud pública, ya que puede infectar a una variedad de animales, incluyendo seres humanos (Francis et al., 2020; Han et al., 2019). En cuanto a *Bordetella*, no existe información certera sobre si forma parte de la microbiota comensal de las garrapatas, si las obtienen de la piel o el pelaje del ganado, o si pueden colaborar en la transmisión de enfermedades (Karim et al., 2017; Khalaf et al., 2018; Rejmanek et al., 2013). Todos estos hallazgos subrayan la importancia crítica de investigar y comprender la dinámica de estas bacterias en las garrapatas y su posible papel en la transmisión de enfermedades tanto en animales como en humanos.

Es destacable el hallazgo de un alto porcentaje de abundancia del género *Ehrlichia* en la provincia de Napo, alcanzando un sorprendente 29.41%. Este género raramente se encuentra en proporciones tan elevadas, como lo demuestran investigaciones previas (Benyedem et al., 2022; Tokarz et al., 2019). *Ehrlichia* es el responsable de desencadenar la ehrlichiosis, una enfermedad febril aguda que generalmente está asociada con los caninos y no se transmite de manera transovarial a través de las garrapatas. La infección puede ser causada por diversas especies bacterianas, incluyendo *E. chaffeensis*, *E. ewingii* y *Panola Mountain Ehrlichia* (Trout Fryxell & DeBruyn, 2016). Estos resultados discrepan de los obtenidos por Pesquera et al. (2015), quienes no encontraron evidencia de la presencia de esta bacteria en garrapatas en una reserva ecológica ecuatoriana mediante la técnica de PCR. Sin embargo, estudios más recientes, como el realizado por Chalco-Torres et al. (2023) en perros en Ecuador, revelaron una prevalencia del 40% de infección con *Ehrlichia canis* utilizando un kit ELISA comercial. Además, en la investigación llevada a cabo por Díaz et al. (2021) en animales de vida silvestre de Ecuador, se detectó la presencia de *Ehrlichia spp.* mediante microscopía en un mono lanudo marrón, un tamarino de manto marrón y un venado colorado pequeño (*M. rufina*). Estos estudios más recientes confirman la presencia de este género en el país. La alta

prevalencia de *Ehrlichia* en las garrapatas es motivo de inquietud, especialmente debido a la forma en que este género bacteriano se transmite, lo que plantea la posibilidad de que las garrapatas están adquiriendo las bacterias directamente de sus hospederos. Esto aumenta la probabilidad de un brote o epidemia en el ganado vacuno de la región. Por lo tanto, resulta imperativo implementar una vigilancia epidemiológica rigurosa para abordar esta preocupante situación.

Por último, es fundamental reconocer ciertas limitaciones de esta investigación que pudieron haber influido en la interpretación de los hallazgos. En primer lugar, el uso de cebadores específicos dirigidos a las regiones del gen 16S, como V3-V4 y V4-V5, ha restringido la resolución taxonómica, proporcionando información parcial sobre la composición microbiana de las garrapatas a nivel de especies. Esto se debe a que varios géneros bacterianos pueden compartir la misma región amplificada. Además, la secuenciación basada en ADN del gen 16S carece de la capacidad para distinguir entre células microbianas activas y no activas, lo que limita la comprensión de los aspectos funcionales de estos microorganismos. Estas limitaciones han dificultado la investigación de las interacciones entre los componentes no patógenos de la microbiota de las garrapatas y los patógenos, así como su influencia en la presencia y transmisión de estos últimos (Cabezas-Cruz et al., 2018). Asimismo, el uso de la celda R9.4.1, que presenta tasas de error promedio en las lecturas de aproximadamente del 10% al 20% y una calidad promedio de Q10, también ha obstaculizado la identificación precisa a nivel de especie (Cabezas-Cruz et al., 2018). Por lo tanto, para futuras investigaciones, se recomienda abordar estas limitaciones mediante la secuenciación del gen 16S del ARNr completo para lograr una cobertura genética más amplia. También se sugiere la adopción de enfoques de ARN y metatranscriptómica para capturar la actividad microbiana, así como la consideración de la celda de flujo R10.4, que ofrece una mayor precisión, con el objetivo de lograr niveles de identificación de especies más precisos y completos.

## 5. Conclusiones

En este estudio se identificaron 45 géneros bacterianos en las garrapatas *Rhipicephalus microplus*, destacando la utilidad de la tecnología de secuenciación masiva de Oxford Nanopore para explorar la diversidad microbiana. La selección de la tecnología de secuenciación se reveló como un aspecto crucial, resaltando cómo cada plataforma tiene sus propias ventajas y limitaciones que pueden influir significativamente en la precisión de la identificación y cuantificación de los géneros bacterianos. Asimismo, se subrayó la importancia de considerar el órgano de extracción de ADN en la investigación microbiológica de las garrapatas, evidenciando que la composición microbiana puede variar considerablemente entre diferentes tejidos.

La presencia de géneros bacterianos como *Pseudomonas*, *Stenotrophomonas*, y *Bacillus* sugiere una compleja interacción simbiótica con las garrapatas, posiblemente afectando su fisiología y relaciones con los hospederos. Además, la detección de patógenos como *Brucella*, *Ehrlichia*, *Corynebacterium* y *Anaplasma* resalta el papel de las garrapatas como vectores significativos de enfermedades, enfatizando la necesidad de una vigilancia epidemiológica rigurosa. En particular, la identificación de *Brucella*, causante de la brucelosis, y la prevalencia alarmante de *Ehrlichia*, plantean preocupaciones serias sobre la salud del ganado y la posible transmisión de estas enfermedades.

Este trabajo subrayó la importancia de continuar avanzando en el estudio de la biodiversidad microbiana en vectores de enfermedades, como las garrapatas, utilizando tecnologías de secuenciación avanzadas y tomando en cuenta la variabilidad de la microbiota según el órgano analizado. Tales investigaciones son clave para profundizar nuestro entendimiento sobre las interacciones ecológicas de las garrapatas, su papel en la transmisión de patógenos y para el desarrollo de estrategias efectivas de control y prevención de enfermedades transmitidas por vectores.

**Financiamiento/Fondos:** Esta investigación recibió apoyo de la UISEK-Dii bajo el proyecto DII-P011617\_2.

**Agradecimientos:** Al Centro de Investigación en Zoonosis (CIZ) de la Universidad Central del Ecuador

**Conflictos de Interés:** “Los autores declaran no tener conflicto de interés”.

## Referencias citadas

- 1 Adegoke, A., Kumar, D., Budachetri, K., & Karim, S. (2022). Hematophagy and tick-borne Rickettsial pathogen shape the microbial community structure and predicted functions within the tick vector, *Amblyomma maculatum*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1037387>
- 2 Akaçin, İ., Ersoy, Ş., Doluca, O., & Güngörmüşler, M. (2022). Comparing the significance of the utilization of next generation and third generation sequencing technologies in microbial metagenomics. *Microbiological Research*, 264, 127154. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.127154>
- 3 Ali, A., Obaid, M. K., Almutairi, M. M., Alouffi, A., Numan, M., Ullah, S., Rehman, G., Islam, Z. U., Khan, S. B., & Tanaka, T. (2023). Molecular detection of *Coxiella* spp. in ticks (Ixodidae and Argasidae) infesting domestic and wild animals: with notes on the epidemiology of tick-borne *Coxiella burnetii* in Asia. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1229950>

- 4 Almazán, C., Scimeca, R. C., Reichard, M. V., & Mosqueda, J. (2022). Babesiosis and Theileriosis in North America. *Pathogens*, 11(2), 168. <https://doi.org/10.3390/pathogens11020168>
- 5 Andreotti, R., De León, A. A. P., Dowd, S. E., Guerrero, F. D., Bendele, K. G., & Scoles, G. A. (2011). Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* through tag-encoded pyrosequencing. *BMC Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-6>
- 6 Argüello, A. P., Hun, L., Rivera, P., & Taylor, L. (2012). Case report: A fatal urban case of Rocky Mountain spotted fever presenting an eschar in San José, Costa Rica. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87(2), 345–348. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0153>
- 7 Benavides, E., Romero Prada, J., Villamil Jiménez, L., Resiliencia, P., & Naturales, R. (2016). Las garrapatas del ganado bovino y los agentes de enfermedad que transmiten en escenarios epidemiológicos de cambio climático Guía para el manejo de garrapatas y adaptación al cambio climático. Instituto Interamericano de Cooperación Para La Agricultura (IICA).
- 8 Benyedem, H., Lekired, A., Mhadhbi, M., Dhibi, M., Romdhane, R., Chaari, S., Rekik, M., Ouzari, H.-I., Hajji, T., & Darghouth, M. A. (2022). First insights into the microbiome of Tunisian *Hyalomma* ticks gained through next-generation sequencing with a special focus on *H. scupense*. *PLOS ONE*, 17(5), e0268172. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0268172>
- 9 Cabezas-Cruz, A., Vayssier-Taussat, M., & Greub, G. (2018). Tick-borne pathogen detection: what's new? *Microbes and Infection*, 20(7–8), 441–444. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2017.12.015>
- 10 Chalco-Torres, L. E., Guerrero-López, A. E., Sánchez-Prado, R. G., Pérez Rodríguez, J. E., Oliveira, C., Gómez, J. A., Lenin-Aguilar, F., & Nirchio-Tursellino, M. (2023). Detección molecular de coinfección por *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia ewingii* en un perro en Ecuador. *Revista Científica de La Facultad de Ciencias Veterinarias*, XXXIII(1), 1–6. <https://doi.org/10.52973/rcfcv-e33219>
- 11 Chicana, B., Couper, L. I., Kwan, J. Y., Tahiraj, E., & Swei, A. (2019). Comparative Microbiome Profiles of Sympatric Tick Species from the Far-Western United States. *Insects*, 10(10), 353. <https://doi.org/10.3390/insects10100353>
- 12 Cicculi, V., Masse, S., Capai, L., de Lamballerie, X., Charrel, R., & Falchi, A. (2019). First detection of *Ehrlichia minasensis* in *Hyalomma marginatum* ticks collected from cattle in Corsica, France. *Veterinary Medicine and Science*, 5(2), 243–248. <https://doi.org/10.1002/vms3.140>
- 13 Cordeiro, M. D., Bahia, M., Magalhães-Matos, P. C., Cepeda, M. B., Guterres, A., & Fonseca, A. H. (2018). Morphological, molecular and phylogenetic characterization of *Borrelia theileri* in *Rhipicephalus microplus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 27(4), 555–561. <https://doi.org/10.1590/s1984-296120180083>
- 14 de Bravo, N. B., Smalligan, R. D., Russell, K. L., Manock, S. R., Espin, J. F., Jacobsen, K. H., Fleming, L. C., Espinoza, W. R., Sanchez, J. L., Kochel, T., MacCormick, F., Blair, P. J., Quist, B. K., Negrete, M., & Olson, J. G. (2009). Etiology of Acute Undifferentiated Febrile Illness in the Amazon Basin of Ecuador. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81(1), 146–151. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2009.81.146>
- 15 Díaz-Sánchez, S., Hernández-Jarguín, A., Torina, A., de Mera, I. G. F., Blanda, V., Caracappa, S., Gortazar, C., & de la Fuente, J. (2019). Characterization of the bacterial microbiota in wild-caught *Ixodes ventraloi*. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 10(2), 336–343. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.11.014>
- 16 Duan, D.-Y., Liu, G.-H., & Cheng, T.-Y. (2020). Microbiome analysis of the saliva and midgut from partially or fully engorged female adult *Dermacentor silvarum* ticks in China. *Experimental and Applied Acarology*, 80(4), 543–558. <https://doi.org/10.1007/s10493-020-00478-2>
- 17 Dye-Braumuller, K. C., Lynn, M. K., Cornejo Rivas, P. M., Lee, C., Rodríguez Aquino, M. S., Chandler, J. G., Trout Fryxell, R. R., Self, S. C. W., Kanyangarara, M., & Nolan, M. S. (2023). First report of multiple *Rickettsia* sp., *Anaplasma* sp., and *Ehrlichia* sp. in the San Miguel Department of El Salvador from zoonotic tick vectors. *Acta Tropica*, 242, 106909. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.106909>
- 18 Escobar, A., Falquez, O. F. C., Villareal, P., Patiño, M. S. C., Patiño, H. M. C., & Mendoza, E. P. (2015). Prevalencia y detección por PCR anidada de *Anaplasma marginale* en bovinos y garrapatas en la zona central del Litoral ecuatoriano. *Revista Ciencia y Tecnología*, 8(1), 11–17.
- 19 Francis, L., Paddock, C. D., Dykstra, E. A., & Karpathy, S. E. (2020). *Rickettsia* and *Anaplasma* species in *Dermacentor andersoni* ticks from Washington. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 11(4), 101422. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101422>
- 20 Greay, T. L., Gofton, A. W., Papparini, A., Ryan, U. M., Oskam, C. L., & Irwin, P. J. (2018). Recent insights into the tick microbiome gained through next-generation sequencing. *Parasites & Vectors*, 11(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2550-5>
- 21 Grisi, L., Leite, R. C., Martins, J. R. de S., Barros, A. T. M. de, Andreotti, R., Cançado, P. H. D., León, A. A. P. de, Pereira, J. B., & Villela, H. S. (2014). Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 23(2), 150–156. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014042>
- 22 Guo, W.-P., Zhang, B., Wang, Y.-H., Xu, G., Wang, X., Ni, X., & Zhou, E.-M. (2019). Molecular identification and characterization of *Anaplasma capra* and *Anaplasma platys*-like in *Rhipicephalus microplus* in Ankang, Northwest China. *BMC Infectious Diseases*, 19(1), 434. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4075-3>

- 23 Gurfield, N., Grewal, S., Cua, L. S., Torres, P. J., & Kelley, S. T. (2017). Endosymbiont interference and microbial diversity of the Pacific coast tick, *Dermacentor occidentalis*, in San Diego County, California. *PeerJ*, 2017(4). <https://doi.org/10.7717/peerj.3202>
- 24 Han, R., Yang, J.-F., Mukhtar, M. U., Chen, Z., Niu, Q.-L., Lin, Y.-Q., Liu, G.-Y., Luo, J.-X., Yin, H., & Liu, Z.-J. (2019). Molecular detection of *Anaplasma* infections in ixodid ticks from the Qinghai-Tibet Plateau. *Infectious Diseases of Poverty*, 8(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s40249-019-0522-z>
- 25 Hodosi, R., Kazimirova, M., Soltys, K., Oliver, R., Rego, M., Filatov, S., & Karim, S. (2022). What do we know about the microbiome of *I. ricinus*? OPEN ACCESS EDITED BY. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.990889>
- 26 Janadaree Bandara, K. M. U., & Parakrama Karunaratne, S. H. P. (2017). Mechanisms of acaricide resistance in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Sri Lanka. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 139, 68–72. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2017.05.002>
- 27 Jiao, J., Zhang, J., He, P., OuYang, X., Yu, Y., Wen, B., Sun, Y., Yuan, Q., & Xiong, X. (2021). Identification of Tick-Borne Pathogens and Genotyping of *Coxiella burnetii* in *Rhipicephalus microplus* in Yunnan Province, China. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.736484>
- 28 Jongejans, F., & Uilenberg, G. (2004). The global importance of ticks. In *Parasitology* (Vol. 129, Issue SUPPL.). <https://doi.org/10.1017/S0031182004005967>
- 29 Karim, S., Budachetri, K., Mukherjee, N., Williams, J., Kausar, A., Hassan, M. J., Adamson, S., Dowd, S. E., Apanskevich, D., Arijó, A., Sindhu, Z. U., Kakar, M. A., Khan, R. M. D., Ullah, S., Sajid, M. S., Ali, A., & Iqbal, Z. (2017). A study of ticks and tick-borne livestock pathogens in Pakistan. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(6), e0005681. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005681>
- 30 Kaur, R., Yadav, A., Rafiqi, S. I., Godara, R., Sudan, V., Chakraborty, D., & Katoch, R. (2021). Epidemiology, haematology and molecular characterization of haemoprotozoan and rickettsial organisms causing infections in cattle of Jammu region, North India. *BMC Veterinary Research*, 17(1), 219. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02915-9>
- 31 Khalaf, J. M., Mohammed, I. A., & Karim, A. J. (2018). The epidemiology of tick in transmission of Enterobacteriaceae bacteria in buffaloes in Marshes of the south of Iraq. *Veterinary World*, 1677–1681. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2018.1677-1681>
- 32 Krawczyk, A. I., Röttjers, L., Fonville, M., Takumi, K., Takken, W., Faust, K., & Sprong, H. (2022). Quantitative microbial population study reveals geographical differences in bacterial symbionts of *Ixodes ricinus*. *Microbiome*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01276-1>
- 33 Kueneman, J. G., Esser, H. J., Weiss, S. J., Jansen, P. A., & Foley, J. E. (2021). Tick Microbiomes in Neotropical Forest Fragments Are Best Explained by Tick-Associated and Environmental Factors Rather than Host Blood Source. <https://journals.asm.org/journal/aem>
- 34 Kumar, R. (2019). Molecular markers and their application in the monitoring of acaricide resistance in *Rhipicephalus microplus*. *Experimental and Applied Acarology*, 78(2), 149–172. <https://doi.org/10.1007/s10493-019-00394-0>
- 35 Li, S.-S., Zhang, X.-Y., Zhou, X.-J., Chen, K.-L., Masoudi, A., Liu, J.-Z., & Zhang, Y.-K. (2022a). Bacterial microbiota analysis demonstrates that ticks can acquire bacteria from habitat and host blood meal. *Experimental and Applied Acarology*, 87(1), 81–95. <https://doi.org/10.1007/s10493-022-00714-x>
- 36 Li, S.-S., Zhang, X.-Y., Zhou, X.-J., Chen, K.-L., Masoudi, A., Liu, J.-Z., & Zhang, Y.-K. (2022b). Bacterial microbiota analysis demonstrates that ticks can acquire bacteria from habitat and host blood meal. *Experimental and Applied Acarology*, 87(1), 81–95. <https://doi.org/10.1007/s10493-022-00714-x>
- 37 Lu, H., Giordano, F., & Ning, Z. (2016). Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 14(5), 265–279. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.05.004>
- 38 Machado-Ferreira, E., Piesman, J., Zeidner, N. S., & Soares, C. A. G. (2012). A prevalent alpha-proteobacterium *Paracoccus* sp. in a population of the Cayenne ticks (*Amblyomma cajennense*) from Rio de Janeiro, Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 35(4), 862–867. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572012005000067>
- 39 Madison-Antenucci, S., Kramer, L. D., Gebhardt, L. L., & Kauffman, E. (2020). Emerging Tick-Borne Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 33(2). <https://doi.org/10.1128/CMR.00083-18>
- 40 Marques, R., Krüger, R. F., Peterson, A. T., de Melo, L. F., Vicenzi, N., & Jiménez-García, D. (2020). Climate change implications for the distribution of the babesiosis and anaplasmosis tick vector, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Research*, 51(1), 81. <https://doi.org/10.1186/s13567-020-00802-z>
- 41 Maya-Delgado, A., Madder, M., Benítez-Ortiz, W., Saegerman, C., Berkvens, D., & Ron-Garrido, L. (2020). Molecular screening of cattle ticks, tick-borne pathogens and amitraz resistance in ticks of Santo Domingo de los Tsáchilas province in Ecuador. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 11(5). <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101492>
- 42 Melo, A. L. T., Luo, T., Zhang, X., Muraro, L. S., Pereira, N. A., Cabezas-Cruz, A., Dantas-Torres, F., McBride, J. W., & de Aguiar, D. M. (2021). Serological evidence of *Ehrlichia minasensis* infection in Brazilian dogs. *Acta Tropica*, 219, 105931. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2021.105931>

- 43 Morel, N., De Salvo, M. N., Cicuttin, G., Rossner, V., Thompson, C. S., Mangold, A. J., & Nava, S. (2019). The presence of *Borrelia theileri* in Argentina. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 17, 100314. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100314>
- 44 Narasimhan, S., & Fikrig, E. (2015). Tick microbiome: the force within. *Trends in Parasitology*, 31(7), 315–323. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.03.010>
- 45 Nicholson, W. L., Sonenshine, D. E., Noden, B. H., & Brown, R. N. (2019). Ticks (Ixodida). In *Medical and Veterinary Entomology* (pp. 603–672). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814043-7.00027-3>
- 46 Pereira, E. P. V., van Tilburg, M. F., Florean, E. O. P. T., & Guedes, M. I. F. (2019). Egg yolk antibodies (IgY) and their applications in human and veterinary health: A review. *International Immunopharmacology*, 73, 293–303. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.05.015>
- 47 Pesquera, C., Portillo, A., Palomar, A. M., & Oteo, J. A. (2015). 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>
- 48 Polanco-Echeverry, D., & Ríos-Osorio, L. (2016). Aspectos biológicos y ecológicos de las garrapatas duras. *Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria*, 17(1), 81–95.
- 49 Rejmanek, D., Freycon, P., Bradburd, G., Dinstell, J., & Foley, J. (2013). Unique strains of *Anaplasma phagocytophilum* segregate among diverse questing and non-questing *Ixodes* tick species in the western United States. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 4(6), 482–487. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.06.003>
- 50 Rialch, A., Sankar, M., Silamparasan, M., Madhusoodan, A. P., Kharayat, N. S., Gautam, S., Gurav, A. R., & Thankappan, S. (2022). Molecular detection of Coxiella-like endosymbionts in *Rhipicephalus microplus* from north India. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 36, 100803. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2022.100803>
- 51 Rodríguez-Hidalgo, R., Pérez-Otáñez, X., Garcés-Carrera, S., Vanwambeke, S. O., Madder, M., & Benítez-Ortiz, W. (2017). The current status of resistance to alpha-cypermethrin, ivermectin, and amitraz of the cattle tick (*Rhipicephalus microplus*) in Ecuador. *PLOS ONE*, 12(4), e0174652. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174652>
- 52 Saleem, M. (2019). Role of ticks in transmission of brucellosis and skin/hide damage in small and large ruminants. University of Veterinary and Animal Sciences, Lahore.
- 53 Sato, T. P., Moura-Martinião, N. O., Vizzoni, V. F., Silva, A. B., Oliveira, S. V., Amorim, M., & Gazêta, G. S. (2020). *Rhipicephalus* ( *Boophilus* ) *microplus* : Rickettsiae infection in Brazil. *International Journal of Acarology*, 46(2), 88–93. <https://doi.org/10.1080/01647954.2020.1720289>
- 54 Segura, J. A., Isaza, J. P., Botero, L. E., Alzate, J. F., & Gutiérrez, L. A. (2020). Assessment of bacterial diversity of *Rhipicephalus microplus* ticks from two livestock agroecosystems in Antioquia, Colombia. *PLoS ONE*, 15(7 July). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234005>
- 55 Sonenshine, D. E. (2018). Range expansion of tick disease vectors in north america: Implications for spread of tick-borne disease. In *International Journal of Environmental Research and Public Health* (Vol. 15, Issue 3). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijerph15030478>
- 56 Sonenshine, D. E., & Stewart, P. E. (2021). Microbiomes of Blood-Feeding Arthropods: Genes Coding for Essential Nutrients and Relation to Vector Fitness and Pathogenic Infections. A Review. *Microorganisms*, 9(12), 2433. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122433>
- 57 Suminda, G. G. D., Bhandari, S., Won, Y., Goutam, U., Kanth Pulicherla, K., Son, Y.-O., & Ghosh, M. (2022). High-throughput sequencing technologies in the detection of livestock pathogens, diagnosis, and zoonotic surveillance. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 20, 5378–5392. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2022.09.028>
- 58 Tokarz, R., Tagliaferro, T., Sameroff, S., Cucura, D. M., Oleynik, A., Che, X., Jain, K., & Lipkin, W. I. (2019). Microbiome analysis of *Ixodes scapularis* ticks from New York and Connecticut. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 10(4), 894–900. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.04.011>
- 59 Trout Fryxell, R. T., & DeBruyn, J. M. (2016). The Microbiome of Ehrlichia-Infected and Uninfected Lone Star Ticks (*Amblyomma americanum*). *PLOS ONE*, 11(1), e0146651. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146651>
- 60 Tveten, A.-K., Riborg, A., & Vadseth, H. T. (2013). DGGE Identification of Microorganisms Associated with *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato- or *Anaplasma phagocytophilum* -Infected *Ixodes ricinus* Ticks from Northwest Norway. *International Journal of Microbiology*, 2013, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2013/805456>
- 61 Wiesinger, A., Wenderlein, J., Ulrich, S., Hiereth, S., Chitimia-Dobler, L., & Straubinger, R. K. (2023). Revealing the Tick Microbiome: Insights into Midgut and Salivary Gland Microbiota of Female *Ixodes ricinus* Ticks. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(2), 1100. <https://doi.org/10.3390/ijms24021100>
- 62 Williams-Newkirk, A. J., Rowe, L. A., Mixson-Hayden, T. R., & Dasch, G. A. (2014). Characterization of the Bacterial Communities of Life Stages of Free Living Lone Star Ticks (*Amblyomma americanum*). *PLoS ONE*, 9(7), e102130. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102130>
- 63 Xu, J., Gu, X.-L., Jiang, Z.-Z., Cao, X.-Q., Wang, R., Peng, Q.-M., Li, Z.-M., Zhang, L., Zhou, C.-M., Qin, X.-R., & Yu, X.-J. (2023). Pathogenic *Rickettsia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* in *Rhipicephalus microplus* ticks collected from cattle and laboratory hatched tick larvae. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 17(8), e0011546. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011546>

- 64 Zadjelovic, V., Gibson, M. I., Dorador, C., & Christie-Oleza, J. A. (2020). Genome of *Alcanivorax* sp. 24: A hydrocarbon degrading bacterium isolated from marine plastic debris. *Marine Genomics*, 49, 100686. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2019.05.001>
- 65 Zeru, M. A., Shibru, S., & Massebo, F. (2020). Exploring the impact of cattle on human exposure to malaria mosquitoes in the Arba Minch area district of southwest Ethiopia. *Parasites & Vectors*, 13(1), 322. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04194-z>
- 66 Zhang, X. L., Deng, Y. P., Yang, T., Li, L. Y., Cheng, T. Y., Liu, G. H., & Duan, D. Y. (2022). Metagenomics of the midgut microbiome of *Rhipicephalus microplus* from China. *Parasites and Vectors*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05161-6>