



FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

Trabajo de Fin de Carrera Titulado:

“Caracterización de la microbiota bacteriana por secuenciación de 3era generación en *Amblyomma* spp. (Acari: Ixodidae) colectadas en las regiones Costa, Sierra y Amazonía, Ecuador”

Realizado por:

Estefany Carolina Jarrín Porras

Director del proyecto:

José Rubén Ramírez Iglesias

Como requisito para la obtención del título de:

MAGISTER EN BIOMEDICINA

Quito, 04 de septiembre de 2024

DECLARACIÓN JURAMENTADA

Yo, **Estefany Carolina Jarrín Porras**, ecuatoriana, con cédula de ciudadanía N° 1723265789, declaro bajo juramento que el Proyecto de Desarrollo titulado:

Caracterización de la microbiota bacteriana por secuenciación de 3era generación en *Amblyomma* spp. (Acari: Ixodidae) colectadas en las regiones Costa, Sierra y Amazonía, Ecuador 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.

Estefany Carolina Jarrín Porras

C.I.: 1723265789

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

Los Profesores Informantes:

Juan Carlos Navarro

Daniel Romero

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

Juan Carlos Navarro

Daniel Romero

Quito, 04 de septiembre de 2024

Resumen

Introducción: Las garrapatas son ectoparásitos obligados y hematófagos, consideradas el vector más importante en la transmisión de enfermedades en animales, y el segundo en los seres humanos. Alrededor del mundo se han realizado múltiples investigaciones sobre la microbiota en garrapatas y la influencia en su biología, lo que ha permitido caracterizar la variedad de virus, bacterias y protozoarios. *Amblyomma* es el género más diverso reportado dentro de Ecuador y frecuentemente se la encuentra en zonas compartidas entre animales domésticos y fauna silvestre. El estudio de la microbiota requiere el uso de técnicas moleculares como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o técnicas de secuenciación. La mayoría de los estudios de la microbiota emplean técnicas de secuenciación de siguiente generación (NGS), pero estas plataformas solo permiten la secuenciación de fragmentos cortos de un gen. La tecnología Nanopore (MinION) ha permitido la secuenciación de fragmentos largos de ADN a bajo costo. En Ecuador se han identificado por PCR algunos géneros de bacterias en diferentes especies de garrapatas, pero no se ha reportado una caracterización completa de la microbiota bacteriana presente en las garrapatas del género *Amblyomma*, por lo que se desconoce los posibles agentes infecciosos adicionales a los ya reportados que puedan estar circulando en animales de vida silvestre y domésticos.

Objetivo: Caracterizar la microbiota bacteriana en especies de garrapatas del género *Amblyomma* mediante secuenciación de tercera generación, contribuyendo así en el conocimiento sobre las especies de bacterias que se encuentran circulando en el Ecuador continental.

Métodos: Se seleccionarán 41 muestras de ADN de garrapatas, recolectadas en diez provincias del área continental del Ecuador y que pertenezcan a especies del género *Amblyomma*. Se realizará la amplificación del gen 16S ARNr empleando primers internos unidos a una secuencia adicional de anclaje. Los amplicones serán purificados y cuantificados, y posteriormente se construirán las librerías según las indicaciones del kit SQK-LSK114 y EXP-PBC001. La secuenciación de las librerías se realizará con el

secuenciador MinION empleando la celda de flujo FLO-MIN114 R10.4.1 siguiendo las instrucciones del fabricante. El análisis de las secuencias será realizado mediante el programa EPI2ME.

Resultados esperados: Se espera obtener la composición de la microbiota bacteriana presente en las garrapatas, estableciendo las diferencias entre las especies del género *Amblyomma* analizadas y su relación con el lugar de origen. También, se espera obtener la riqueza y diversidad de la microbiota bacteriana de las especies de *Amblyomma*, lo cual permitirá realizar una comparación entre las regiones o provincias donde fueron recolectadas cada garrapata. Y con la información de los géneros y especies de bacterias encontradas en *Amblyomma* spp., se espera realizar una clasificación de las bacterias según su relevancia en la salud pública y veterinaria, así como de las bacterias simbiotes, contribuyendo a la vigilancia de estos ectoparásitos.

Palabras clave: Garrapata, MinION, barcoding, diversidad bacteriana, vectores, patógenos.

La información detallada del presente proyecto de desarrollo reposa en la Facultad de
Ciencia de la Salud de la UISEK.

Abstract

Introduction: Ticks are obligate and hematophagous ectoparasites, considered the most important vector in the transmission of diseases in animals and the second in humans. Worldwide, numerous studies have been carried out on the microbiota of ticks and its influence on their biology, allowing the characterization of the diversity of viruses, bacteria and protozoa. *Amblyomma* is the most diverse genus reported in Ecuador and is often found in areas shared by domestic and wild animals. The study of microbiota requires the use of molecular techniques such as polymerase chain reaction (PCR) or sequencing techniques. Most microbiota studies use next-generation sequencing techniques (NGS), but these platforms can only sequence short fragments of a gene. Nanopore technology (MinION) has made it possible to sequence long fragments of DNA at low cost. In Ecuador, some bacterial genera have been identified by PCR in different tick species, but a complete characterization of the bacterial microbiota present in *Amblyomma* ticks has not been reported, so the possible additional infectious agents that may be circulating in wild and domestic animals are unknown.

Objective: To characterize the bacterial microbiota in tick species of the genus *Amblyomma* by third generation sequencing, thus contributing to the knowledge of the bacterial species circulating in continental Ecuador.

Methods: 41 DNA samples of ticks belonging to species of the genus *Amblyomma* collected in ten provinces of continental Ecuador will be selected. Amplification of the 16S rRNA gene will be performed using internal primers linked to an additional anchor sequence. The amplicons will be purified and quantified and then libraries will be constructed according to the instructions of the SQK-LSK114 and EXP-PBC001 kits. The libraries will be sequenced on the MinION sequencer using the FLO-MIN114 R10.4.1 flow cell according to the manufacturer's instructions. Sequence analysis will be performed using the EPI2ME program.

Expected results: It is expected to obtain the composition of the bacterial microbiota present in the ticks, establishing the differences between the species of the genus *Amblyomma*

analyzed and their relationship with the place of origin. It is also expected to obtain the richness and diversity of the bacterial microbiota of *Amblyomma* species, which will allow a comparison between the regions or provinces where each tick was collected. And with the information of the genera and species of bacteria found in *Amblyomma* spp. it is expected to make a classification of bacteria according to their relevance in public and veterinary health, as well as symbiont bacteria, contributing to the surveillance of these ectoparasites.

Key words: *Tick, MinION, barcoding, bacterial diversity, vectors, pathogens.*

The detailed information of the present Development Project rests in the Faculty of
Health Science of the UISEK.