

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS VETERINARIAS**



**Caracterización morfológica y molecular de la garrapata**  
***Rhipicephalus sanguineus* de perros del Estado de Baja**  
**California**

**PRESENTA**  
**ELIZABETH FRAGA RODRÍGUEZ**

**DIRECTOR DE TESIS:**  
**DRA. ALMA ROSSANA TAMAYO SOSA**

**Co DIRECTOR**  
**DR. VÍCTOR MANUEL DEL VILLAR PÉREZ**

MEXICALI, BAJA CALIFORNIA, MÉXICO

DICIEMBRE DEL

## RESUMEN

*Rhipicephalus sanguineus*, la “garrapata café del perro”, es un vector relevante por su capacidad de transmitir *Rickettsia rickettsii*, agente de la fiebre manchada de las Montañas Rocosas. Su identificación taxonómica es compleja debido a la similitud morfológica entre linajes, por lo que se utiliza el término *R. sanguineus* sensu lato. Los marcadores mitocondriales 12S y 16S han permitido diferenciar linajes como el tropical y el templado.

El objetivo de este estudio fue caracterizar morfológica y molecularmente garrapatas del complejo *R. sanguineus* colectadas de perros en siete municipios de Baja California. Se analizaron 70 garrapatas adultas mediante claves morfológicas y se amplificaron los genes 12S y 16S por PCR. Las secuencias obtenidas fueron evaluadas mediante análisis filogenético usando Neighbor-Joining con 1000 réplicas de bootstrap.

Se generaron 86 secuencias de calidad, 43 de ellas con pares complementarios, el análisis molecular del gen 12S mostró que Mexicali y San Felipe corresponden al linaje tropical (*Rhipicephalus linnaei*), mientras que Rosarito, Tecate y San Quintín se agruparon dentro del linaje templado. Estos resultados confirman la coexistencia de linajes del complejo *R. sanguineus* en Baja California y resaltan la necesidad de combinar métodos morfológicos y moleculares para comprender su diversidad genética.

**Palabras clave:** *Rhipicephalus sanguineus*; linajes; Baja California; 12S; 16S; filogenia.

## ABSTRACT

*Rhipicephalus sanguineus*, the “brown dog tick,” is an important vector due to its ability to transmit *Rickettsia rickettsii*, the agent of Rocky Mountain spotted fever. Its taxonomic identification is challenging because of morphological similarity among lineages, leading to the use of the term *R. sanguineus* sensu lato. Mitochondrial markers such as 12S and 16S have helped distinguish lineages, including the tropical and temperate groups.

The objective of this study was to characterize ticks of the *R. sanguineus* complex, collected from dogs in seven municipalities of Baja California, using morphological and molecular methods. Seventy adult ticks were identified using morphological keys, and the mitochondrial genes 12S and 16S were amplified by PCR. Sequences were analyzed phylogenetically using the Neighbor-Joining method with 1000 bootstrap replications.

A total of 86 high-quality sequences were obtained, 43 of them with complementary pairs, molecular analysis of the 12S gene showed that samples from Mexicali and San Felipe correspond to the tropical lineage (*Rhipicephalus linnaei*), while samples from Rosarito, Tecate, and San Quintín grouped within the temperate lineage. These findings confirm the coexistence of lineages of the *R. sanguineus* complex in Baja California and highlight the importance of integrating morphological and molecular approaches to understand their genetic diversity.

**Keywords:** *Rhipicephalus sanguineus*; lineages; Baja California; 12S; 16S; phylogeny

## Contenido

	Pág.
RESUMEN .....	i
ABSTRACT .....	ii
LISTA DE CUADROS .....	iii
LISTA DE FIGURAS .....	iv
INTRODUCCIÓN .....	1
REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
Problemas taxonómicos .....	6
Descripción morfológica .....	6
<i>Hembra</i> .....	8
<i>Macho</i> .....	8
Identificación molecular .....	11
MATERIALES Y METODOS .....	17
Localización del área de estudio .....	17
Duración del estudio .....	17
Origen de la muestra .....	17
Tamaño de la muestra y criterio de inclusión .....	17

Variables a evaluar .....	17
Colección de garrapatas e Identificación morfológica .....	18
Aislamiento de ADN genómico .....	18
Amplificación de los genes mitocondriales 12S rDNA y 16S rDNA .....	20
RESULTADOS .....	22
Identificación morfológica .....	22
Secuenciación y Análisis filogenético .....	25
Metodología .....	25
Alineamiento múltiple de secuencias .....	25
Análisis filogenético .....	27
DISCUSIÓN .....	32
CONCLUSIONES .....	34
LITERATURA CITADA .....	36

**LISTA DE CUADROS**

Cuadro	Pág.
1. Especies del grupo <i>Rhipicephalus sanguineus</i> .....	5

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA		Pág.
1.	Clasificación taxonómica de las garrapatas.....	5
2.	Estructuras morfológicas de la hembra de <i>Rhipicephalus sanguines</i> .....	9
3.	Estructuras morfológicas del macho de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> .....	10
4.	Mapa del Estado de Baja California que muestra los sitios de colección de garrapatas.....	19
5.	Estructuras morfológicas de la garrapata <i>Rhipicephalus sanguineus</i> .....	23
6.	Estructuras morfológicas del macho y hembra de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> .....	24
7.	Alineamiento múltiple del gen 12S rRNA .....	26
8.	Árbol filogenético basado en secuencias del gen 12S rRNA .....	29
9.	Árbol filogenético incluyendo cepas mexicanas basado en secuencias del gen 12S rRN .....	30
10.	Alineamiento múltiple de secuencias del gen 16S rRNA .....	31

## INTRODUCCIÓN

La garrapata *Rhipicephalus sanguineus*, conocida comúnmente como “garrapata café del perro”, fue descrita originalmente por Latreille en 1806 como *Ixodes sanguineus* en Francia (Nava et al., 2015). Es una de las especies de garrapatas con mayor distribución mundial y se reconoce por su relevancia en salud pública y veterinaria, debido a su capacidad para transmitir numerosos patógenos de importancia zoonótica (Dantas-Torres, 2010).

Esta especie puede encontrarse tanto en perros domésticos de zonas urbanas como rurales, y se adapta fácilmente a distintos ambientes, incluso dentro de las viviendas, manteniendo actividad durante todo el año (Dantas-Torres, 2010). Se considera que el género *Rhipicephalus* es originario del continente africano, y por ello se sugiere que *R. sanguineus* tiene un origen africano (Dantas-Torres, 2017).

La identificación de *R. sanguineus* tradicionalmente se ha basado en características morfológicas distintivas como la forma del gnatosoma, el escudo, los espiráculos y las placas adanales (Walker et al., 2003; Rosa & Crespo, 2012).

Sin embargo, la taxonomía de esta especie continúa siendo controversial debido a la descripción original incompleta y poco detallada de Latreille. Por esta razón, actualmente se emplea el término *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.) para referirse al complejo de especies relacionadas hasta que su estatus taxonómico se aclare (Dantas-Torres, 2017).

Por lo cual, en las últimas décadas los estudios moleculares han sido fundamentales para resolver estos problemas taxonómicos. Los genes mitocondriales, especialmente las regiones del ADN ribosómico 12S y 16S, así como el citocromo oxidasa I (COX1) y el espaciador transcrito interno 2 (ITS-2), se han empleado ampliamente para esclarecer la filogenia y evolución de estas garrapatas (Paternina et al., 2016).

En México, estudios recientes identificaron a la garrapata café del perro como perteneciente al linaje tropical, el cual se ha asociado con la transmisión de *Rickettsia rickettsii* en regiones del suroeste de Estados Unidos (California y Arizona) y el noroeste de México (Baja California, Sonora, Chihuahua, Coahuila y Nuevo León), agente causal de la fiebre manchada de las Montañas Rocosas (Villarreal et al., 2018).

En el Estado de Baja California, *R. sanguineus* ha sido responsable de la transmisión de *R. rickettsii* desde finales de 2008, registrándose más de mil casos humanos de rickettsiosis (Tinoco-Gracia et al., 2018). Además, estudios locales reportan una infestación del 65.1% en perros de Mexicali (Tinoco-Gracia et al., 2009), lo que representa un riesgo sanitario relevante para la región.

A pesar de la importancia epidemiológica de esta garrapata, existen pocos estudios que combinen la identificación morfológica con la caracterización molecular de *R. sanguineus* en Baja California. Dado que este vector también puede albergar otros patógenos como *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* y *Anaplasma phagocytophilum*, su correcta identificación es esencial para

fortalecer los programas de prevención y control de enfermedades transmitidas por garrapatas.

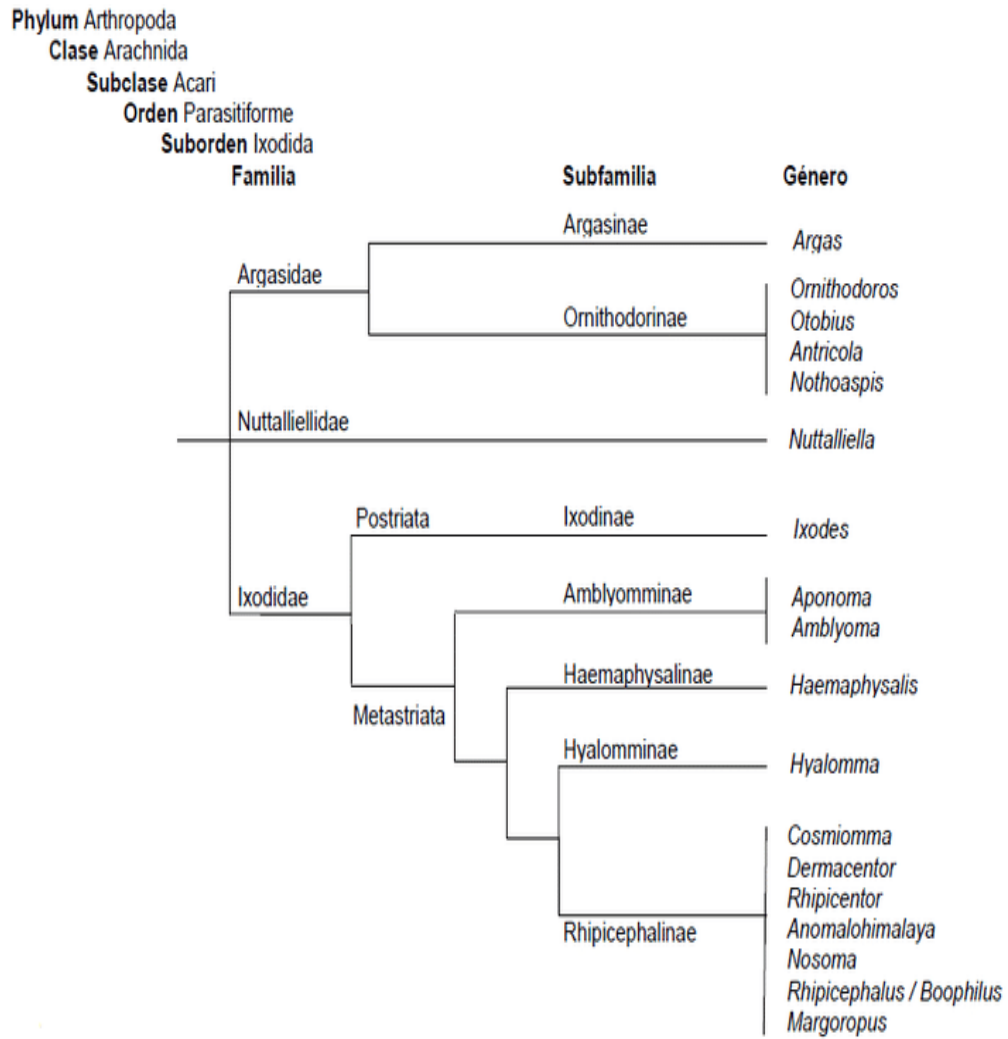
**Por lo anterior, el objetivo de este trabajo es realizar la caracterización morfológica y molecular de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* en perros del Estado de Baja California, con el fin de contribuir al conocimiento sobre su diversidad genética y su relevancia epidemiológica.**

## REVISIÓN DE LITERATURA

A nivel mundial se han descrito más de 800 especies de garrapatas. Taxonómicamente, estos ectoparásitos pertenecen al *phylum Arthropoda*, clase *Arachnida*, subclase *Acari*, orden *Parasitiforme* y suborden *Ixodida*. Dentro de este suborden se reconocen tres familias: *Argasidae*, *Ixodidae* y *Nuttalliellidae*. La especie objeto de estudio, *Rhipicephalus sanguineus*, pertenece a la familia *Ixodidae* las llamadas "garrapatas duras" y forma parte del grupo *Metastrata* caracterizado, entre otros rasgos, por la presencia de un surco que se encuentra detrás del ano (Figura 1) (Parola & Raoult, 2001).

*Rhipicephalus sanguineus*, sensu stricto fue descrita originalmente por Latreille (1806) como *Ixodes sanguineus* usando una breve y vaga descripción basada totalmente en la morfología. La escasez de material tipo y la vaguedad de la descripción original han generado incertidumbre sobre la delimitación de la especie, lo que motivó a la comunidad científica a emplear, de manera conservadora, la denominación *R. sanguineus* sensu lato (s.l.) para englobar al complejo taxonómico (Labruna et al., 2017; Dantas-Torres et al., 2015).

Estudios morfológicos, biológicos y genéticos realizados en distintas regiones han mostrado que lo que tradicionalmente se consideró una sola especie (*R. sanguineus* sensu stricto), en realidad corresponde a un complejo de



(Parola y Raoult 2001)

Figura 1. Clasificación taxonómica de las garrapatas.

especies hermanas con diferencias morfológicas y biológicas significativas. Por ejemplo, comparaciones entre poblaciones de Argentina y Brasil evidenciaron disparidades en tamaño y en compatibilidad reproductiva (hibridación con infertilidad), mientras los análisis de ADN mitocondrial revelaron relaciones genéticas que separan clústeres geográficos, lo que apoyó la distinción entre linajes "tropical" y "templado" (Oliveira et al., 2005; Burlini et al., 2010; Dantas-Torres et al., 2013).

### **Problemas Taxonómicos**

La ambigüedad en la definición de *R. sanguineus* tiene implicaciones prácticas: dificulta la identificación precisa en estudios epidemiológicos y complica la comparación entre investigaciones geográficas. Actualmente se han propuesto hasta 17 especies dentro del grupo *R. sanguineus* y, aunque algunas presentan rasgos morfológicos claramente diferenciables, otras muestran solapamiento de caracteres que impiden una identificación fiable únicamente por morfología (Cuadro 1) (Dantas-Torres, 2015). Frente a esto, la integración de datos morfológicos, morfométricos, biológicos y moleculares se ha convertido en la estrategia recomendada para resolver la delimitación de especies dentro del complejo (Moraes-Filho et al., 2011; Labruna et al., 2017).

### **Descripción morfológica**

La identificación fenotípica de *R. sanguineus* se apoya en caracteres morfológicos tradicionales: pedipalpos cortos y gruesos, base del capítulo

Cuadro 1. Especies del grupo *R. sanguineus*

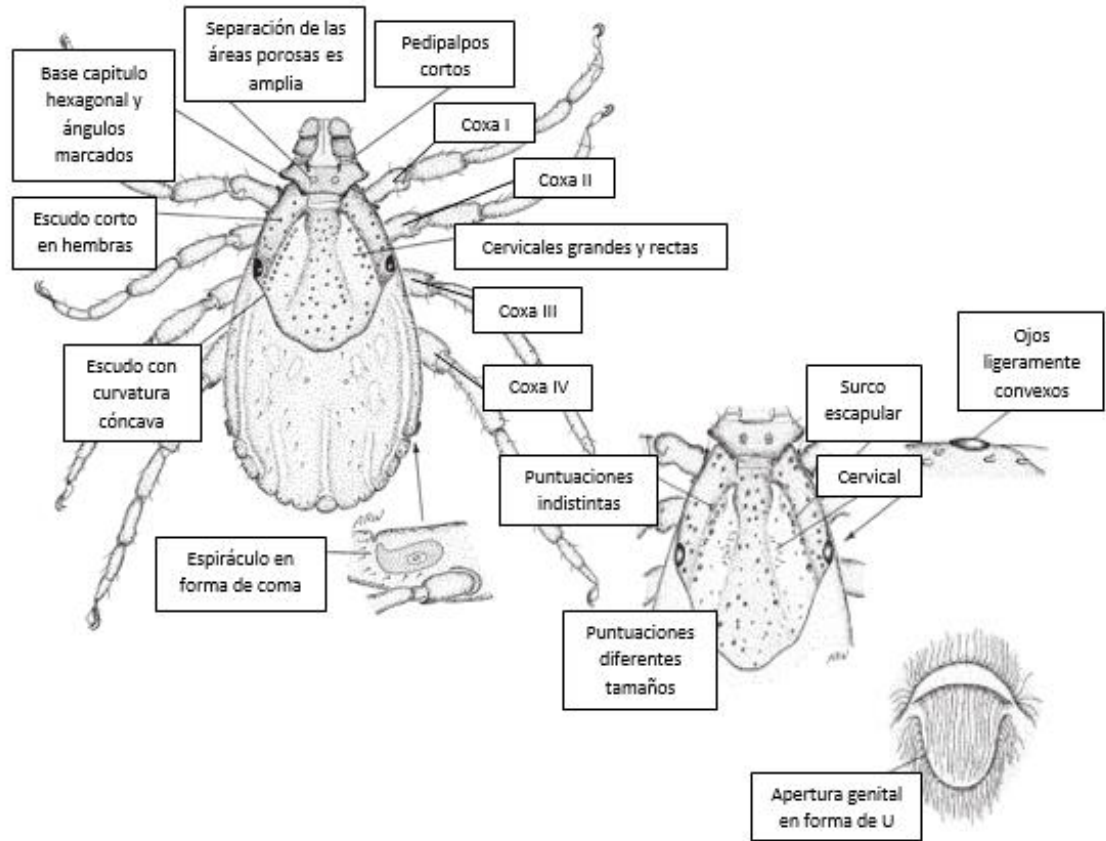
(Dantas-Torres y Otranto, 2015)

<b>Especies</b>	<b>Distribución geográfica</b>
<i>Rhipicephalus avaranensis</i> (Neumann, 1907)	Afrotropical
<i>Rhipicephalus bergeoni</i> (Morel y Balis, 1976)	Afrotropical
<i>Rhipicephalus boueti</i> (Morel, 1957)	Afrotropical
<i>Rhipicephalus camicasi</i> (Morel, Mouchet et al. Rodhain, 1976)	Afrotropical
<i>Rhipicephalus guilhoni</i> (Morel y Vassiliades, 1963)	Afrotropical
<i>Rhipicephalus leporis</i> (Pomerantzev, 1946)	Paleártico
<i>Rhipicephalus moucheti</i> (Morel, 1965)	Afrotropical
<i>Rhipicephalus pumilio</i> (Schulze, 1935)	Paleártico
<i>Rhipicephalus pusillus</i> (Gil Collado, 1936).	Paleártico
<i>Rhipicephalus ramachandrai</i> (Danda, 1966)	Oriental
<i>Rhipicephalus rosicus</i> (Yakimov y Kol-Yakimova, 1911)	Paleártico
<i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806)	Cosmopolita
<i>Rhipicephalus schulzei</i> (Olenev, 1929)	Paleártico
<i>Rhipicephalus sulcatus</i> (Neumann, 1908)	Afrotropical
<i>Rhipicephalus tetracornus</i> (Kitaoka y Suzuki, 1983)	Oriental
<i>Rhipicephalus turanicus</i> (Pomerantzev, 1940)	Afrotropical, Oriental, Paleártico
<i>Rhipicephalus ziemanni</i> (Neumann, 1904)	Afrotropical
<i>Rhipicephalus sanguineus</i> es considerada una especie de garrapata cosmopolita	Cosmopolita

hexagonal, escudo de tono marrón sin ornamentación marcada, la coxa I presenta una hendidura formando dos espinas muy cercanas y las coxas II, III y IV poseen un diente externo corto y un tubérculo romo en el ángulo posterior interno (Walker et al., 2003; Zemtsova et al., 2016).

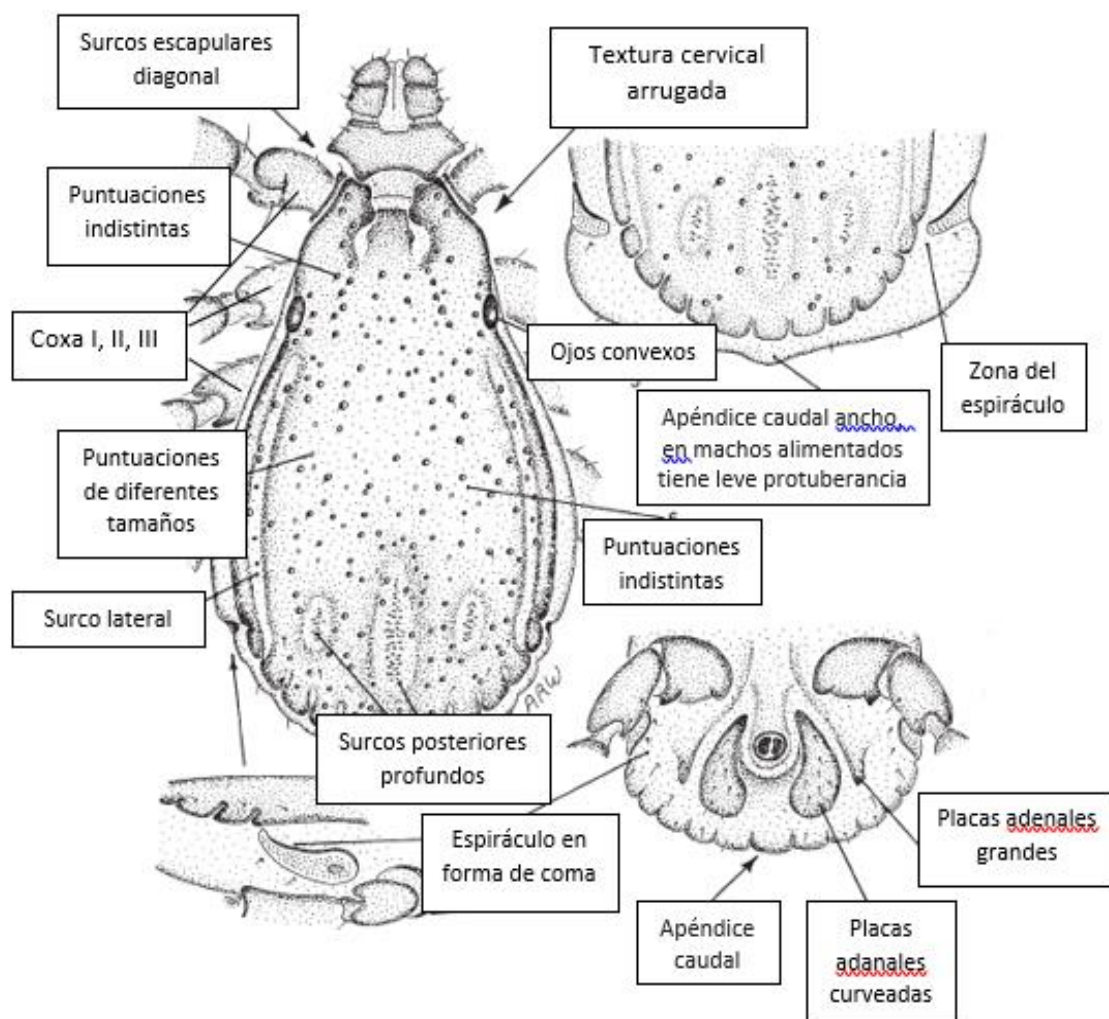
**Hembra:** presentan un escudo que no cubre completamente el dorso y un poro genital en forma de "U"; presenta puntuaciones en el surco cervical por debajo de la base del gnatosoma. Los ojos son ligeramente convexos y se localizan en la parte dorsal. Ventralmente, las coxas son semejantes a las del macho y la coxa I presenta dos espolones del mismo tamaño, el externo es más delgado que el interno, ambos terminan en punta aguda. (Figura 2) (Martínez et al., 2015).

**Macho:** muestran un escudo que cubre la mayor parte de la superficie dorsal, es de color café rojizo y placas adanales bien desarrolladas, presenta puntuaciones intersticiales por lo general pequeñas y esparcidas por toda la superficie del escudo. Los ojos son ligeramente convexos, el surco marginal está perfectamente definido y presenta tres surcos posteriores muy bien definidos (Figura 3). Ventralmente, la coxa I presenta dos espolones del mismo tamaño. Las coxas II, III y IV presentan un solo espolón ancho en su base y puntiagudo en su extremo; disminuye gradualmente de tamaño de tal forma que el más pequeño se encuentra en la coxa IV. Las placas adanales son planas y el borde posterior es recto, las accesorias son rudimentarias (Martínez et al., 2015).



(Walker et al., 2003)

Figura 2. Estructuras morfológicas de la hembra de *Rhipicephalus sanguineus*.



(Walker et al., 2003)

Figura 3. Estructuras morfológicas del macho de *Rhipicephalus sanguineus*.

Debido a que las garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* tienen un hipostoma corto, se adhieren más superficialmente en comparación con otras garrapatas (Dantas-Torres, 2010).

### **Identificación molecular**

Dado el solapamiento morfológico y la existencia de linajes con distinta aptitud vectorial, las herramientas moleculares han demostrado ser esenciales. Los marcadores mitocondriales son los más empleados. Así mismo, los genes mitocondriales se heredan por vía materna, tienen una tasa de mutación relativamente alta y no suelen recombinarse, lo que los hace muy útiles para estudios de identificación de especies y relaciones filogenéticas entre poblaciones cercanas. Las regiones del ARNr mitocondrial 12S y 16S han mostrado alta resolución para la separación entre linajes y especies cercanas; el gen COX1 (citocromo oxidasa I) complementa la información al detectar variabilidad intraespecífica, y el ITS-2 se utiliza cuando es necesario comparar regiones nucleares (Paternina et al., 2016; Caro, 2021).

Diversos trabajos donde se han combinado la morfología y la genética han evidenciado existencia de dos clados bien definidos. Por ejemplo, análisis de muestras de Brasil, Europa y el Mediterráneo permitieron delimitar grupos genéticos congruentes con diferencias morfológicas observadas (Dantas-Torres et al., 2013; Caetano et al., 2017). Estudios en Portugal y otras regiones europeas asignaron múltiples muestras al linaje templado, mientras que la mayoría de los registros latinoamericanos se agrupan en el linaje tropical, con excepciones

locales que evidencian historia biogeográfica compleja (Dantas-Torres et al., 2017; Caetano et al., 2017).

Así mismo, los árboles filogenéticos constituyen una herramienta esencial en la caracterización molecular, ya que permiten representar de manera gráfica las relaciones evolutivas entre distintas poblaciones o especies del complejo *R. sanguineus*. A través del análisis de secuencias genéticas, principalmente de genes mitocondriales como 12S, 16S y COX1, estos árboles facilitan la identificación de clados genéticamente diferenciados y la inferencia de su historia evolutiva (Mendoza-Revilla, 2012).

La estructura y ramificación de los árboles permiten distinguir linajes templados y tropicales, evidenciando divergencias que no siempre son detectables mediante criterios morfológicos. En consecuencia, los análisis filogenéticos no solo fortalecen la delimitación taxonómica, sino que también aportan información sobre la dispersión geográfica, la variabilidad genética y la capacidad vectorial de las poblaciones, aspectos clave para comprender la epidemiología de las enfermedades transmitidas por garrapatas (Mendoza-Revilla, 2012).

En 1982, fue publicado el primer árbol filogenético para Ixodidae, por Hoogstraal y Aeschlimann, basado en morfología, ciclos de vida y asociaciones de huéspedes, sin embargo, este árbol fue aprobado a mediados de la década de 1990 (Baker y Murrell, 2002).

El gen 12S ARNr mitocondrial evoluciona moderadamente rápido, por lo que sirve para distinguir especies cercanas dentro de un mismo género, ha demostrado ser un marcador confiable y eficiente para la identificación de diferentes especies (Caro, 2021). En *Rhipicephalus*, el 12S ha permitido diferenciar *R. sanguineus* de otras especies como *R. turanicus* o *R. annulatus*.

Mientras que el gen 16S ARNr ribosómico es similar al 12S, pero un poco más conservado. Se usa mucho para comparaciones filogenéticas más amplias entre especies de garrapatas de distintos géneros (por ejemplo, *Rhipicephalus*, *Haemaphysalis*, *Amblyomma*). Es útil para confirmar identidad de especie y complementar resultados del COX1 (Caro, 2021).

A su vez el gen mitocondrial COX1 (citocromo c oxidasa subunidad 1, también conocido como COI), detecta la variabilidad genética intraespecífica y se utiliza para identificar y reconocer la diversidad de especies con base en los grupos de artrópodos que exhiben regiones para este gen (Patermina et al. 2016). Es el marcador estándar de “DNA barcoding” (código de barras genético) en animales. Evoluciona más rápidamente que los genes ribosomales, lo que permite distinguir especies crípticas o poblaciones geográficamente aisladas. En *R. sanguineus*, el COX1 es el marcador más usado para identificar linajes genéticos distintos, como el linaje “tropical” y el “templado”, que tienen diferencias genéticas y distribución geográfica diferente. Es considerado el marcador más informativo para la caracterización molecular de esta garrapata.

Por último, el ITS-2 (espaciador transcrito interno-2), se encuentra en el ADN nuclear. Evoluciona relativamente rápido y puede mostrar variaciones intraespecíficas e interespecíficas. Es útil para diferenciar especies muy cercanas o morfológicamente similares. En *R. sanguineus* s.l., el ITS-2 complementa los datos mitocondriales y puede ayudar a confirmar si se trata de una misma especie o de linajes distintos dentro del complejo, estudios han empleado herramientas moleculares para confirmar la identidad y analizar la diversidad genética de *Rhipicephalus sanguineus* en distintas regiones del mundo.

Cervantes et al. (2020) identificaron garrapatas asociadas a casos de ehrlichiosis canina en Chiclayo, Perú. De 297 especímenes recolectados, las características morfológicas observadas bajo estereoscopio como la base hexagonal del capítulo, palpos cortos y placas espiraculares en forma de coma permitieron clasificarlas como *R. sanguineus*. La identificación molecular, mediante la amplificación del gen mitocondrial 16S ADNr y la comparación con secuencias del GenBank, confirmó la correspondencia con esta especie, validando la eficacia de los análisis combinados.

De manera similar, Dantas-Torres et al. (2013) evaluaron 278 garrapatas procedentes de Brasil, Italia, Portugal, España y Grecia para estudiar su variabilidad morfológica y genética. El análisis de caracteres como la abertura genital, la placa adanal y los espiráculos permitió distinguir siete especies dentro del grupo *Rhipicephalus sanguineus* (*R. bursa*, *R. guilhoni*, *R. microplus*, *R. muhsamae*, *R. pusillus*, *R. sanguineus*, *R. turanicus*). Posteriormente, el análisis

molecular de los genes mitocondriales 12S y 16S ADNr confirmó la diferenciación genética entre ellas y respaldó la existencia de clados filogenéticos claramente definidos.

En un estudio posterior, Dantas-Torres et al. (2017) analizaron 347 garrapatas recolectadas de perros en Portugal. De ellas, 311 fueron identificadas morfológicamente como *R. sanguineus sensu lato* y, a través del análisis del gen 16S ARNr en 61 muestras, se determinó que la mayoría pertenecían al linaje templado. Este hallazgo amplió el conocimiento sobre la distribución geográfica y la identidad filogenética del linaje en Europa.

Asimismo, Caetano et al. (2017) estudiaron 30 garrapatas machos procedentes de seis estados de Brasil. Las observaciones morfológicas coincidieron con las descripciones de *R. sanguineus*, mientras que los análisis moleculares de los genes mitocondriales COX1 y 12S ADNr revelaron dos clados diferenciados: uno asociado a las especies templadas (Rio Grande do Sul y Santa Catarina) y otro correspondiente al linaje tropical presente en los demás estados. Estos resultados confirmaron la coexistencia de ambos linajes en Brasil y su clara divergencia genética.

En conjunto, estos estudios demuestran que la combinación de los análisis morfológicos y moleculares, especialmente mediante genes mitocondriales como 12S, 16S y COX1, es fundamental para delimitar especies, identificar linajes y

comprender la distribución filogeográfica de *Rhipicephalus sanguineus* a nivel mundial.

Tinoco et al. (2009) y Rubio et al. (2015) confirmaron la presencia de *Rhipicephalus sanguineus* en perros del norte y noroeste de México mediante análisis morfológico, identificando consistentemente las características diagnósticas descritas para la especie.

Sánchez et al. (2016) compararon poblaciones de *R. sanguineus sensu lato* de distintas regiones del mundo (Brasil, Cuba, Tailandia, Argentina y España), y demostraron, mediante análisis morfométricos y filogenéticos de los genes 12S y 16S ADNr, la existencia de dos linajes principales: uno compuesto por garrapatas de Brasil, Cuba, Tailandia apareciendo estrechamente con *R. sanguineus* de Mozambique, Sudáfrica, Taiwán y zonas tropicales de Argentina, denominadas de la “cepa tropical” y el segundo compuesto por garrapatas de España emparentado con *R. sanguineus* de Francia, Alemania, Chile, Uruguay y zonas templadas de Argentina de la “cepa templada”.

De manera similar, Hu et al. (2022) identificaron una infestación doméstica en Nanchang, China, y a través de análisis morfológicos y moleculares (genes 16S, 18S, COX1 e ITS2) propusieron un nuevo linaje genético denominado “linaje del sur de China”. Estos estudios refuerzan la utilidad de los marcadores mitocondriales y de los árboles filogenéticos para diferenciar linajes y comprender la distribución global del complejo *R. sanguineus*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Localización del área de estudio**

El estudio se llevó a cabo en el Laboratorio de Salud Pública Veterinaria del Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias de la Universidad Autónoma de Baja California.

### **Duración del estudio**

De enero 2023 a diciembre del año 2024.

### **Origen de la muestra**

Se colectaron garrapatas adultas no repletas removidas de perros infestados naturalmente, de clínicas veterinarias y/o Centros de Control Animal de Mexicali, Tijuana, Tecate, Ensenada, San Felipe, San Quintín y Playas de Rosarito.

### **Tamaño de muestra y Criterios de inclusión**

Para el estudio morfológico y molecular se analizaron un total de 70 garrapatas (10 por municipio). En el estudio se incluyeron garrapatas machos y hembras en estadio adulto no repletas.

### **Variables a evaluar**

Para el estudio molecular se identificaron los fragmentos de los genes mitocondriales 12S y 16S de las garrapatas identificadas morfológicamente con *R. sanguineus*, a fin de caracterizar su linaje.

## **Colección de garrapatas e Identificación morfológica**

Las garrapatas fueron removidas con pinzas finas, tomando la base de la boca y haciendo tracción constante y firme, perpendicular a la piel asegurando que saliera toda la pieza bucal, de acuerdo a la metodología de Fernández-Lerones et al. (2016). Las garrapatas se tomaron de cualquier región anatómica de los perros infestados, fueron transportadas vivas y en etanol al 70%, algunas se conservaron en congelación a -20°C para su posterior análisis.

De las garrapatas colectadas de cada municipio se seleccionaron un total de 70 garrapatas, 10 de cada uno de los municipios (Cuadro 4). Para la identificación morfológica se empleó un microscopio estereoscópico (Leica-MZ125, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemania) siguiendo las claves taxonómicas descritas por Walker et al. (2003).

## **Aislamiento de ADN genómico**

El ADN genómico (gDNA) se obtuvo a partir de garrapatas individuales sin haber ingerido sangre. Previamente a la extracción de ADN, las garrapatas fueron lavadas con agua destilada y una solución de fosfatos (PBS) para remover completamente el etanol y los contaminantes del medio ambiente. Después fueron secadas sobre papel y posteriormente se colocaron dentro de un vial y se diseccionaron con un bisturí en forma de cruz en 4 partes.

Se realizó la extracción individual de cada una de las 10 garrapatas de cada municipio utilizando el kit comercial DNeasy Blood & Tissue QIAGEN, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se evaluó la presencia de ADN

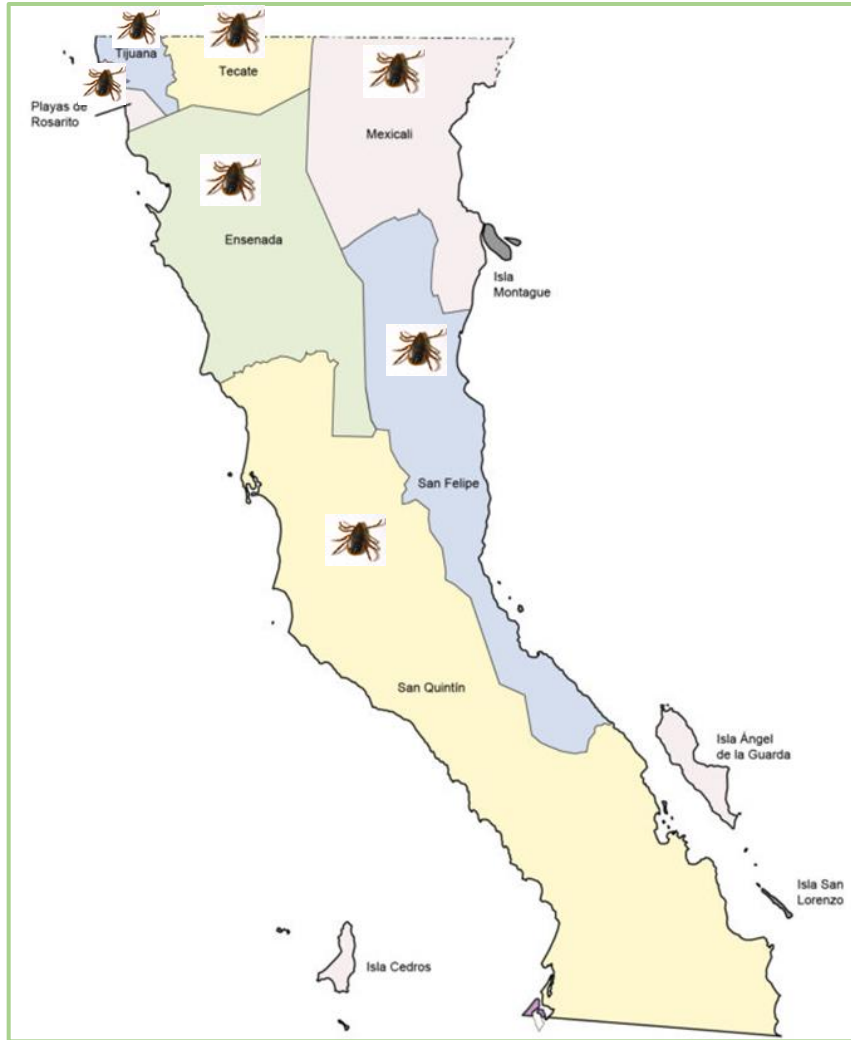


Figura 4. Mapa del Estado de Baja California que muestra los sitios de colección de garrapatas.

mediante electroforesis utilizando un gel de agarosa al 1%. El ADN se almacenó a -20°C hasta su utilización.

### **Amplificación de los genes mitocondriales 12S rDNA y 16S rDNA**

La amplificación de los genes mitocondriales 12S rDNA y 16S rDNA se realizó mediante PCR utilizando el sistema utilizando DreamTaq Hot Start Green (Master Mix, Germany), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para el gen 12S rDNA se emplearon los oligonucleótidos 12S1: (5'-AACTAGGATTAGATACCCTATTATTTTAG-3') y 12S2: (5'-CTATGTAACGACTTATCTTAATAAAGAGTG-3'). Para el gen 16S rDNA se utilizaron los oligonucleótidos 16S1: (5'-CTGCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGTGG-3') y 16S2: (5'-TTACGCTGTTATCCCTAGAG-3').

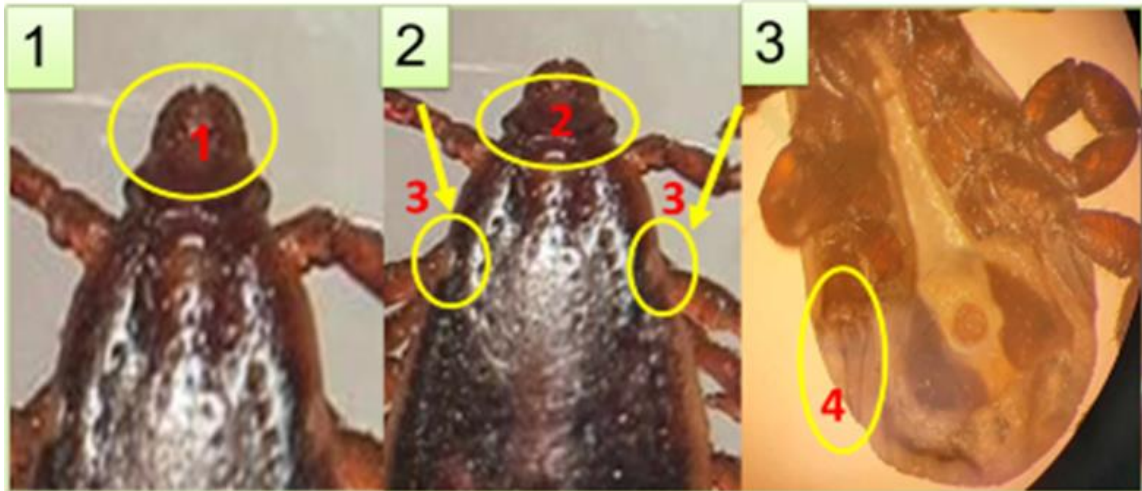
Las condiciones de la PCR se establecieron de acuerdo con los protocolos descritos por Szabó et al. (2005) y Burlini et al. (2010). Cada reacción se preparó en un volumen final de 25 µl, que incluyó 1 µl de gDNA y agua libre de nucleasas, y se procesó en un termociclador T100™ (Bio-Rad). Como control negativo se empleó agua libre de nucleasas. Posterior a la amplificación, 10 µl de cada reacción se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 2 % para verificar la presencia de fragmentos amplificados, utilizando como un marcador de peso molecular (1 kb Plus DNA Ladder™, Promega). Las bandas obtenidas fueron recortadas del gel, purificadas con el kit QIAquick PCR & GEL CLEANUP KIT

(Germany), y enviadas a Eurofins Genomics (Sacramento, California) para su secuenciación.

## RESULTADOS

### Identificación morfológica

Las garrapatas colectadas de los distintos municipios fueron identificadas como *R. sanguineus* de acuerdo a las claves morfológicas (Walker et al., 2003) observándose la base del capítulo en forma hexagonal, el hipostoma corto y romo del mismo tamaño que los palpos, ojos convexos, espiráculos en forma de coma (Figura 5); en las hembras el poro genital en forma de "U" ancha y en el macho las placas adanales de forma trapezoidales, así como el surco anal distintivo detrás del ano en ambos sexos (Figura 6).



1) Capitulo (gnatosona y pedipalpos), 2) Base del capítulo de forma hexagonal, 3) Ojos convexos, 4) Espiráculo, 5) Placas adanales en forma trapezoidales.

Figura 5. Estructuras morfológicas la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*.

## ➤ Macho



Base del  
capitulo  
(hexagonal)

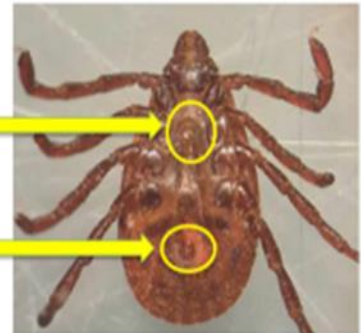


Placas adanales

## ➤ Hembra



Escudo



Poro genital  
"U"

Poro anal

Figura 6. Estructuras morfológicas del macho y hembra de *Rhipicephalus sanguineus*.

## **Secuenciación y Análisis filogenético**

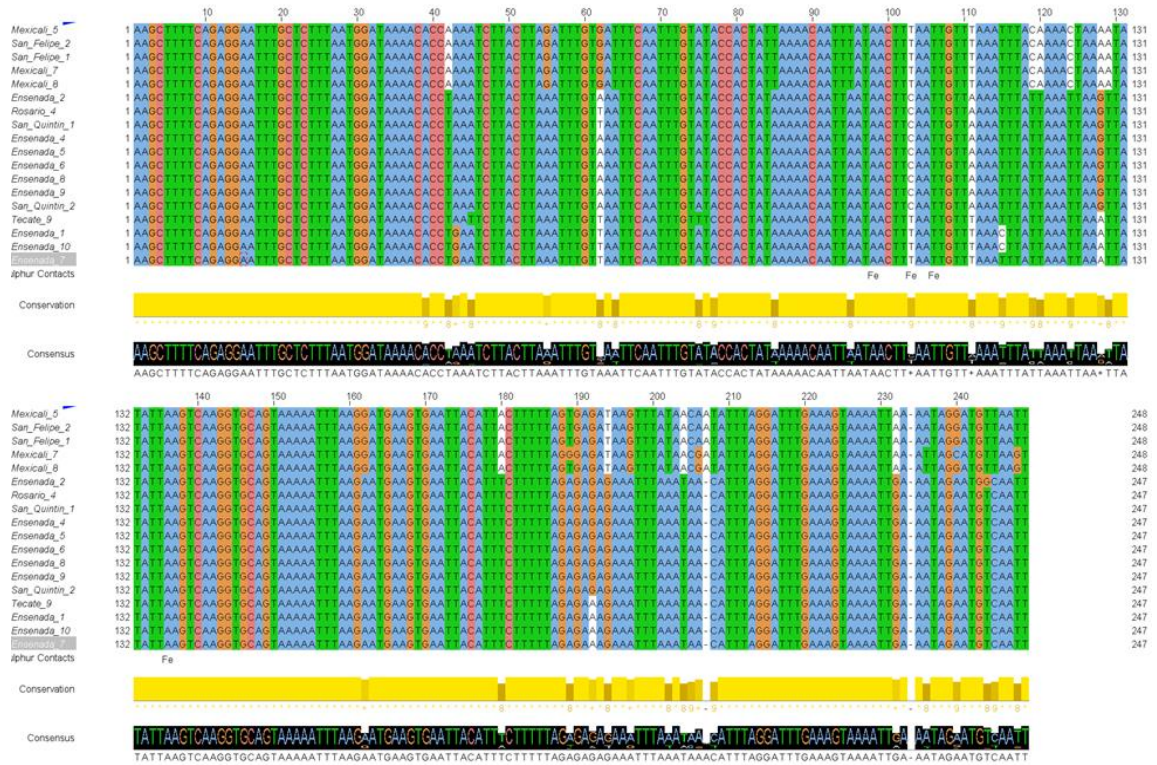
En total se obtuvieron 280 secuencias de las garrapatas de todos los municipios, de las cuales se seleccionaron 86 que cumplieron con la calidad y longitud necesaria para su análisis, y que además contaban con su par complementario, creando así un total de 43 secuencias, 21 correspondieron al gen 12S rDNA y 22 al gen 16S rDNA.

### **Metodología**

Las secuencias del gen 12S rRNA se obtuvieron por secuenciación de Sanger a partir de ADN genómico de garrapatas colectadas en seis municipios de Baja California. Cada secuencia fue identificada mediante un código que incluye el municipio de muestreo y el número del aislado. Las secuencias fueron inspeccionadas para eliminar regiones ambiguas y se ajustaron a una longitud uniforme de 286 pb. Se incorporaron además tres secuencias mexicanas previamente reportadas en bases de datos públicas.

### **Alineamiento múltiple de secuencias**

El alineamiento múltiple de nucleótidos se realizó utilizando Clustal Omega versión en línea (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>) empleando los parámetros por defecto (Figura 7). Posteriormente, el alineamiento fue visualizado y evaluado en Jalview 2.11.5.0, (Waterhouse et al. 2009), haciendo uso de coloración por conservación para destacar patrones evolutivos entre los



**Figura 7. Alineamiento múltiple del gen 12S rRNA.** Alineamiento múltiple de secuencias del gen 12S rRNA obtenido mediante Clustal Omega y visualizado en Jalview. Las secuencias corresponden a garrapatas colectadas en seis municipios diferentes de Baja California. Los ID asignados a cada secuencia indican el municipio de origen del muestreo y el número identificador del aislado. El alineamiento muestra patrones de conservación nucleotídica entre las muestras, resaltando regiones altamente conservadas y variaciones específicas. Los colores representan el esquema de conservación por tipo de residuo aplicado por Jalview.

aislados. El alineamiento final fue exportado en formato FASTA para su análisis filogenético.

### **Análisis filogenético**

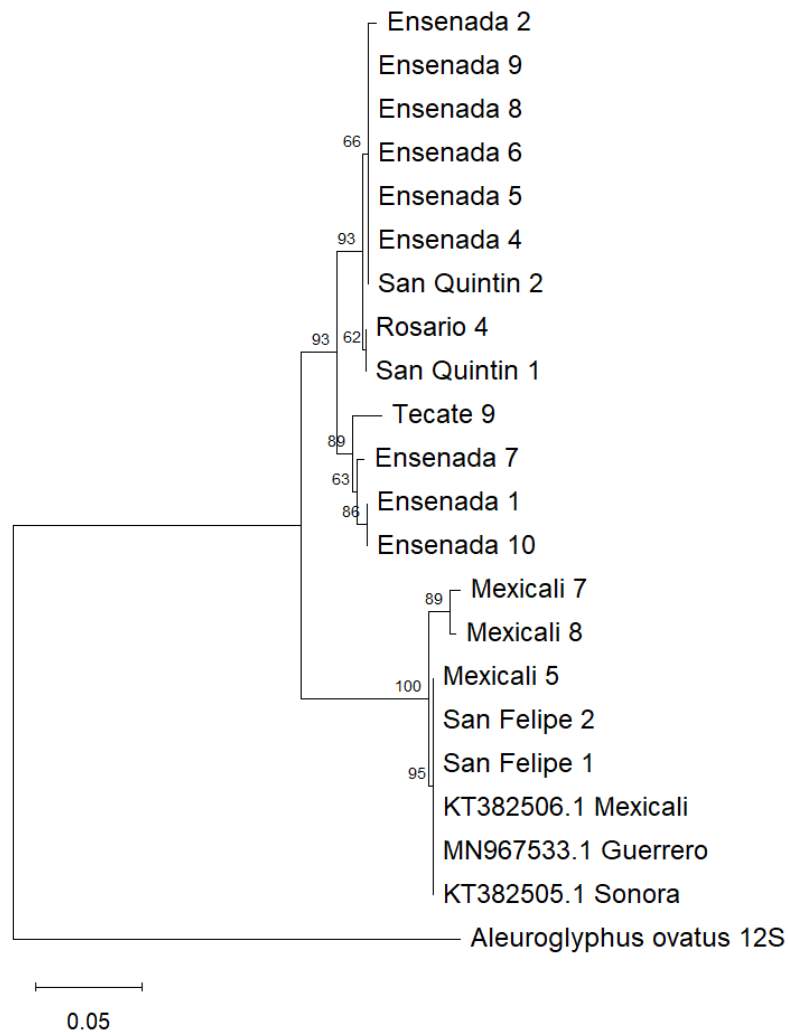
Los árboles filogenéticos se generaron utilizando el algoritmo Neighbor-Joining (NJ) (Saitou & Nei, 1987) en el software MEGA12 (Kumar et al., 2024). La confiabilidad de cada nodo se evaluó mediante bootstrap con 1000 réplicas, siguiendo la metodología de Felsenstein (1985). Los porcentajes de soporte se muestran sobre las ramas de los árboles. Los árboles se dibujaron a escala, con longitudes de ramas proporcionales a las distancias evolutivas utilizadas. En todos los análisis se incluyó el ácaro *Aleuroglyphus ovatus* (AF529910.1) como grupo externo utilizado para enraizar la topología. También se incluyeron secuencias de cepas mexicanas reportadas en la base de datos de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Derivado del análisis de las secuencias, del gen 12S rDNA se eligieron 18 secuencias compuestas por 286 nucleótidos. Se llevaron a cabo comparaciones con la base de datos del NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) encontrando que corresponden a genes 12S de *Rhipicephalus sanguineus* previamente reportados. Las muestras procedentes de Rosario, Tecate y San Quintín tienen mayor similitud con secuencias del linaje de *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato localizadas en diversas partes del mundo, por ejemplo: Francia (KU255849.1), Portugal (MF425935.1), Italia (PV558893.1), Túnez

(PV053674.1) y USA (PP215069.1). Por su parte, los aislados provenientes de Mexicali y San Felipe corresponden al linaje tropical, recientemente definido como *Rhipicephalus linnae* localizadas en países como: Brasil (PX339967.1), Ecuador (PV536166.1), Colombia (PQ374114.1) y México (KT382506.1).

La comparación de las secuencias del gen 12S ribosomal generadas en este estudio revela las diferencias de nucleótidos a lo largo de la secuencia (figura 8), lo cual se ve reflejado en la inferencia filogenética, en la que se forma un clado independiente entre las secuencias provenientes de Mexicali y San Felipe (Figura 9).





**Figura 9. Árbol filogenético incluyendo cepas mexicanas basado en secuencias del gen 12S rRNA.** Árbol filogenético construido mediante el método Neighbor-Joining (NJ) utilizando secuencias del gen 12S rRNA obtenidas de garrapatas colectadas en seis municipios de Baja California, junto con tres secuencias mexicanas previamente reportadas (ID del GeneBank mostrados en el árbol). Para permitir la comparación entre todos los aislados, las secuencias fueron recortadas y ajustadas a una longitud uniforme de 256 pares de bases. Los ID de cada secuencia indican el municipio de origen del muestreo y el número identificador del aislado. Se incorporó un ácaro como grupo externo para enraizar el árbol. Los valores de soporte muestran los porcentajes de bootstrap obtenidos a partir de 1000 réplicas. El análisis filogenético fue realizado en MEGA.

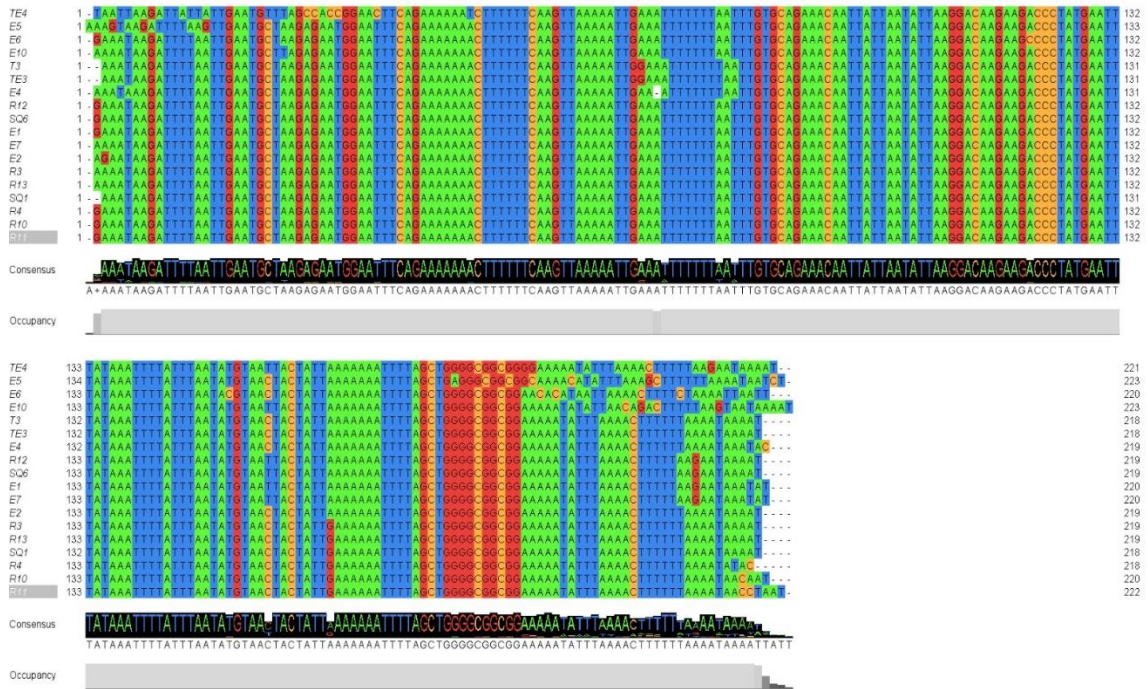


Figura 10. Alineamiento múltiple de secuencias del gen 16S rRNA. Secuencias alineadas del gen 16S rRNA se debe de realizar análisis posteriormente para su relación filogenética.

En el caso del gen 16S rDNA, aunque se obtuvieron secuencias de calidad aceptable para su identificación preliminar, no fue posible utilizarlas en este momento para la construcción de árboles filogenéticos. No obstante, las secuencias cuentan con el potencial necesario para ser analizadas en trabajos posteriores y eventualmente incorporarse a un análisis filogenético más completo.

## Discusión

Las morfologías presentadas en los especímenes recolectados en este estudio, muestran la misma similitud morfológica de acuerdo a la especie reportada en otros países, donde se encuentra y ha sido estudiada y descrita la especie *Rhipicephalus sanguines*.

El proceso de control de calidad y depuración de las lecturas evidenció una pérdida considerable de datos, ya que de los 280 archivos analizados solo 86 lecturas (30.7%) cumplieron con los criterios establecidos. Este porcentaje relativamente bajo sugiere que durante la secuenciación pudieron presentarse problemas como baja calidad en la lectura de bases, presencia de artefactos, o fallos en la amplificación previa, que afectaron la recuperación total de secuencias útiles. Situaciones similares han sido reportadas en estudios que utilizan regiones ribosomales mitocondriales, donde la calidad de las lecturas puede verse comprometida por la degradación del ADN, la eficiencia variable de los cebadores o la presencia de inhibidores en las muestras.

La separación de las lecturas por genes permitió obtener 42 secuencias de la región 12S y 44 de 16S, lo cual indica una mayor eficiencia en la amplificación del gen 16S. Este resultado es consistente con reportes previos donde la región 16S, al ser más conservada y poseer cebadores más robustos,

suele presentar un desempeño más estable frente a muestras de diversa calidad. En contraste, la región 12S puede ser más susceptible a fallos en la amplificación, lo que explicaría su menor número de lecturas recuperadas.

Posteriormente, las 86 lecturas de calidad permitieron reconstruir 43 secuencias consenso gracias a la disponibilidad del par complementario para cada lectura. La generación de secuencias consenso mejora sustancialmente la confiabilidad de los datos obtenidos, ya que permite corregir errores aislados de secuenciación y obtener un ensamblaje más representativo de la molécula original. La división final en 21 secuencias para el gen 12S y 22 para 16S continúa reflejando la tendencia observada en la etapa de filtrado de lecturas, destacando nuevamente la mayor estabilidad del gen 16S durante el proceso.

En conjunto, los resultados muestran que, aunque el porcentaje de recuperación de lecturas útiles fue limitado, el material procesado permitió obtener un número adecuado de secuencias consenso para ambos genes ribosomales mitocondriales. Estas secuencias serán fundamentales para los análisis posteriores, como la identificación taxonómica o la inferencia de relaciones filogenéticas. No obstante, los datos también subrayan la importancia de optimizar las etapas de extracción, amplificación y secuenciación para reducir la pérdida de lecturas en futuros estudios.

## CONCLUSIONES

La identificación morfológica confirmó que todas las garrapatas recolectadas corresponden a *Rhipicephalus sanguineus*, basándose en rasgos anatómicos característicos. El análisis molecular de los genes 12S y 16S rDNA complementó esta determinación y permitió evaluar la diversidad genética de las poblaciones del estado.

Los resultados filogenéticos revelaron la presencia de dos linajes dentro del complejo *R. sanguineus* en Baja California. Las muestras de Rosario, Tecate y San Quintín se agruparon con el linaje *R. sanguineus* sensu lato, ampliamente distribuido a nivel mundial, mientras que los aislados de Mexicali y San Felipe se relacionaron con el linaje tropical, actualmente reconocido como *Rhipicephalus linnae*. Las diferencias nucleotídicas observadas en las secuencias de 12S confirman esta separación. Sin embargo, es necesario realizar un análisis más detallado de este gen y completarlos con la información del gen 16S a fin de profundizar en las relaciones evolutivas y moleculares de los aislados de garrapatas en los municipios de Baja California.

Este estudio evidencia que la combinación de métodos morfológicos y moleculares es fundamental para lograr una identificación precisa de *R. sanguineus*.

Además, confirma la presencia de dos linajes distintos en la región, lo que resalta la necesidad de profundizar en investigaciones sobre su distribución, variabilidad genética y su posible relevancia epidemiológica.

## LITERATURA CITADA

- Barker, S., & Murrell, A. (2002). Phylogeny, evolution and historical zoogeography of ticks: A review of recent progress. *Experimental and Applied Acarology*, 28, 55–68.
- Burlini, L., Teixeira, K., Szabó, M., & Famadas, K. (2010). Molecular dissimilarities of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Brazil and its relation with samples throughout the world: Is there a geographical pattern? *Experimental and Applied Acarology*, 50, 361–374.
- Caetano, R., et al. (2017). Ultrastructural morphology and molecular analyses of tropical and temperate “species” of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) in Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 54, 1201–1212. <https://doi.org/10.1093/jme/tjx066>
- Caro, O. (2021). Tipificación génica de *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato en Mexicali, Baja California (Tesis de maestría). Instituto de Investigaciones en Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Baja California.
- Cervantes, M., Masgo, D., Ramirez, L., Alvarez, G., Li, O., Vasquez, A., Gomez, L. A., & Hoyos, L. (2020). Identificación morfológica y molecular de garrapatas colectadas de perros (*Canis lupus familiaris*) con ehrlichiosis en Chiclayo, Perú. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 31, e17820.
- Dantas-Torres, F. (2010). Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & Vectors*, 3, 26.
- Dantas-Torres, F., Latrofa, M. S., Annoscia, G., Giannelli, A., Parisi, A., & Otranto, D. (2013). Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato from the New and Old Worlds. *Parasites & Vectors*, 6, 213.
- Dantas-Torres, F. (2015). Climate change, biodiversity, ticks and tick-borne diseases: The butterfly effect. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4, 454–461.
- Dantas-Torres, F., & Otranto, D. (2015). Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. *Veterinary Parasitology*, 208, 9–13.
- Dantas-Torres, F., Maya, C., Latrofa, M. S., Annoscia, G., Cardoso, L., & Otranto, D. (2017). Genetic characterization of *Rhipicephalus sanguineus* (sensu lato) ticks from dogs in Portugal. *Parasites & Vectors*, 10, 133.
- De Oliveira, P. R., Bechara, G. H., Denardi, S. E., Saito, K. C., Takagi, E., Szabó, M. P. J., & Camargo, M. I. (2005). Comparison of the external morphology of

- Rhipicephalus sanguineus* ticks from Brazil and Argentina. *Veterinary Parasitology*, 129, 139–147.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783–791. <https://doi.org/10.2307/2408678>.
- Fernández-Lerones, M., A. de la Fuente-Rodríguez, E. Mora-Sáez y M. Landaluce-Fuentes. 2016. Picadura de garrapata: ¿una simple retirada del artrópodo? Centro de Salud Altamira, Puente San Miguel, Cantabria, España. *Sociedad Española de Médicos Generales y de Familia*. 5 (3):116-121.
- Hu, H., Du, X., Ma, H., Chen, S., & Zheng, W. (2022). Severe *Rhipicephalus sanguineus* tick infestation in a home from rural area of Nanchang in China. *Parasitology International*, 90, 102610.
- Kumar, S., Stecher, G., Suleski, M., Sanderford, M., Sharma, S., & Tamura, K. (2024). Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 12 for adaptive and green computing. *Molecular Biology and Evolution*, 41, 1–9.
- Labruna MB, Gerardi M, Krawczak FS, Moraes-Filho J. Comparative biology of the tropical and temperate species of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) under different laboratory conditions. *Ticks Tick Borne Dis*. 2017 Jan;8(1):146-156. doi: 10.1016/j.ttbdis.2016.10.011. Epub 2016 Oct 24. PMID: 27793613.
- Martínez, F. (2015). Garrapatas de importancia veterinaria. En *Técnicas para el diagnóstico de parásitos con importancia en salud pública y veterinaria* (pp. 288–300). AMPAVE-CONASA.
- Mendoza-Revilla, J. (2012). Aportes de la filogenética a la investigación médica. *Revista Médica Herediana*, 23, 120–128.
- Moraes-Filho, J., Marcili, A., Nieri-Bastos, F. A., Richtzenhain, L. J., & Labruna, M. B. (2011). Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. *Acta Tropica*, 117, 51–55.
- Nava, S., Estrada-Peña, A., Petney, T., Beati, L., Labruna, M. B., Szabó, M. P. J., Venzal, J. M., Mastropaolo, M., Mangold, A. J., & Guglielmone, A. A. (2015). The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). *Veterinary Parasitology*, 208, 2–8.
- Nei, M., & Kumar, S. (2000). *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press.
- Parola, P., & Raoult, D. (2001). Ticks and tick-borne bacterial diseases in humans: An emerging infectious threat. *Clinical Infectious Diseases*, 32, 899.

- Paternina, L., Vergara, D., & Bejarano, E. (2016). Comparación y utilidad de las regiones mitocondriales de los genes 16S y COX1 para los análisis genéticos en garrapatas (Acari: Ixodidae). *Biomédica*. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v36i2.3116>
- Rubio, M. C., Gaxiola, S. M., Enríquez, I., Cota, S. C., & Castro, N. (2015). *Rhipicephalus sanguineus* en caninos en Sinaloa, México. *REDVET*, 16, 1–10.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Sanches, G. S., Évora, P. M., Mangold, A. J., Jittapalapong, S., Rodríguez-Mallon, A., Guzmán, P. E. E., & Bechara, G. H. (2016). Molecular, biological, and morphometric comparisons between different geographical populations of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology*, 215, 78–87.
- Szabo, M. P., A. Mangold, C. Joao, G. Bechara, A. Guglielmone. 2005. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. *Vet. Parasitology*. 130(1–2):131–140.
- Tinoco-Gracia, L., Quiroz-Romero, H., Quintero-Martínez, M. T., Rentería-Evangelista, T. B., González-Medina, Y., Barreras-Serrano, A., Hori-Oshima, S., Moro, M. H., & Vinasco, J. (2009). Prevalence of *Rhipicephalus sanguineus* ticks on dogs in a region on the Mexico-USA border. *Veterinary Record*, 164, 59–61.
- Tinoco-Gracia, L., M. Lomelí, S. Hori-Oshima, N. Stephenson, y J. Foley. 2018. Molecular confirmation of Rocky Mountain spotted fever epidemic agent in Mexicali, México. *Emerg. Infect. Dis.* 24 (9):1723-1725.
- Villarreal, Z., N. Stephenson y J. Foley. 2018. Possible northward introgression of a tropical lineage of *Rhipicephalus sanguineus* ticks at a site of emerging Rocky Mountain spotted fever. *J. Parasitol.* 104(3):240–245.
- Walker, A. R., Bouattour, A., Camicas, J.-L., Estrada-Peña, A., Horak, I. G., Latif, A. A., Pegram, R. G., & Preston, P. M. (2003). *Ticks of Domestic Animals in Africa: A Guide to Identification of Species*. Bioscience Reports.
- Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., & Barton, G. J. (2009). Jalview Version 2—A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*, 25(9), 1189–1191. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>

Zemtsova, G. E., Apanaskevich, D. A., Reeves, W. K., Hahn, M., Snellgrove, A., & Levin, M. L. (2016). Phylogeography of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato and its relationships with climatic factors. *Experimental and Applied Acarology*, 69, 191–203.