

Universidad de El Salvador
Facultad de Ciencias Agronómicas
Escuela de Posgrado y Educación Continua



“Geolocalización y caracterización genética de garrapatas (Acari: Ixodidae) y *Rickettsia* spp. de perros (*Canis lupus familiaris*) de El Salvador”.

Por:

Luis Ernesto Romero Pérez

Requisito para optar al título de:
Doctor en Biología Molecular

San Salvador, enero 2025

Universidad de El Salvador
Facultad de Ciencias Agronómicas
Escuela de Posgrado y Educación Continua



“Geolocalización y caracterización genética de garrapatas (Acari: Ixodidae) y *Rickettsia* spp. de perros (*Canis lupus familiaris*) de El Salvador”.

Por:

Luis Ernesto Romero Pérez

Requisito para optar al título de:

Doctor en Biología Molecular

Asesor:

PhD. Marcelo Bahía Labruna

San Salvador, enero 2025

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

Rector de la Universidad:

Ing. M.Sc. Juan Rosa Quintanilla Quintanilla

Secretario General de la Universidad:

Lic. Pedro Rosalío Escobar Castaneda

FACULTAD DE CIENCIAS AGRONÓMICAS

Decano De La Facultad:

Ing. MAECE. Nelson Bernabé Granados Alvarado

Secretario de la Facultad:

Ing. Edgar Geovany Reyes Melara

Director de la Escuela de Posgrado y Educación Continua:

Ing. M.Sc. Juan Francisco Alvarado Panameño

Asesor(es):

Asesor principal:

PhD. Marcelo Bahía Labruna

Comité Académico de la Escuela de Posgrado y Educación Continua:

RESUMEN

El Salvador es el país con la menor cantidad de especies de garrapatas y el segundo con menor especies de *Rickettsia* reportadas en América Central. La diversidad de especies de garrapatas, desde ambientes silvestres y domésticos, existentes en Panamá y Costa Rica y su asociación con varias especies del género *Rickettsia*, incluyendo la especie más patógena e importante del mundo *Rickettsia rickettsii*, que ha causado la muerte de personas en estos países, contrastan con los datos de El Salvador. Evidencia serológica de *Rickettsia* ha sido demostrada en humanos de todos los países de América Central.

En este estudio se evaluó la presencia de *Rickettsia* en garrapatas colectadas desde ambientes silvestres y animales domésticos, principalmente el perro, considerando su rol como puente transmisor de garrapatas desde ambientes silvestres a zonas peridomésticas. Un total de 1,264 garrapatas fueron colectadas directamente de 210 perros desde diez distritos del país y otras 328 desde dos especies domésticas y 28 silvestres provenientes de áreas de conservación, centros de rescate y clínicas veterinarias.

Un análisis morfológico a través de claves dicotómicas fue realizado para la identificación inicial de garrapatas. El análisis molecular mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa y secuenciación fue realizado para la confirmación de especies de garrapatas empleando secuencias parciales del gen *16S RNA* y en la identificación de especies de *Rickettsia* empleando secuencias parciales de los genes *gltA* y *ompA*. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con otras existentes en el banco genético mundial y se emplearon para elaboración de un análisis filogenético.

Un total de 14 especies de garrapatas fueron identificadas, siete de ellas colectadas desde perros. Estas siete especies poseen reportes de afectación en humanos de América y cuatro de ellas también fueron colectadas desde ambientes silvestres. Entre el 20 y el 25% de las garrapatas analizadas de perros y ambientes silvestres, respectivamente, fueron positivas a especies del género *Rickettsia* del Grupo de la Fiebre Manchada, grupo al que pertenece *R. rickettsii*. Se identifican por primera vez en el país las siguientes seis especies de garrapatas: *Amblyomma longirostre*, *Ixodes* cf. *boliviensis*, *Ixodes* sp., *Dermacentor panamensis*, *Ornithodoros puertoricensis* y *Otobius megnini*; y al menos tres especies de *Rickettsia*: *Rickettsia parkeri* strain

Atlantic rainforest, *Rickettsia rhipicephali*, *Rickettsia* endosymbiont of *Ixodes boliviensis*, requiriendo mayor investigación la especie aquí denominada como *Rickettsia* sp. ES-A.cf.*parvum*. Se evidenció por primera vez en el país una especie de *Rickettsia* patógena para el ser humano, la especie *Rickettsia parkeri* en el distrito de Santa Tecla.

Considerando el reporte inédito de especies de garrapatas y *Rickettsia* para el país, es importante continuar en la caracterización de estos agentes para establecer su verdadero impacto como patógenos. El presente trabajo expone la posibilidad de ocurrencia de rickettsiosis en la población salvadoreña.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS Todopoderoso por su guía y fuerzas para la realización de este proyecto.

Agradecimientos especiales a las alcaldías, representantes de ADESCOS, médicos veterinarios y estudiantes de servicio social quiénes dieron su apoyo incondicional en la colecta de muestras para el desarrollo de la investigación; así mismo, a las persona e instituciones que permitieron el acceso a sus hogares e instalaciones para la inspección de sus animales.

Agradecimientos a la Universidad de El Salvador por proporcionar transporte para la realización de visitas a los diferentes lugares para la toma de muestras, al MINEDUCYT por el apoyo económico parcial en el desarrollo del doctorado.

Un profundo agradecimiento a la Universidad de Sao Paulo a las Dras. Lina Binder y María Carolina Serpa por el soporte en la realización de pruebas moleculares, de igual manera a mi tutor Dr. Marcelo Labruna por este mismo apoyo, quién además brindó dirección y otorgó confianza en la realización de este proyecto.

DEDICATORIA

A mi familia y amigos quiénes se mantuvieron alentándome en el proceso de estudios y desarrollo de la investigación. A todos ellos, ¡¡MUCHAS GRACIAS!!

TABLA DE CONTENIDOS

1	INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1	OBJETIVOS	10
1.1	2.2 Objetivo General:.....	10
1.2	2.3 Objetivos Específicos:	10
2	HIPÓTESIS.....	10
3	CAPÍTULO 1. DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE GARRAPATAS PROCEDENTES DE PERROS DE EL SALVADOR	11
4.1	Resumen.....	12
4.2	Introducción	13
4.3	Objetivos	16
4.4	Hipótesis.....	16
4.5	Materiales y Métodos.....	16
4.5.1	Área de estudio	16
4.5.2	Colecta de garrapatas.....	17
4.5.3	Identificación taxonómica y molecular de garrapatas.	17
4.5.4	Extracción de ADN desde garrapatas	17
4.5.5	Caracterización molecular de garrapatas.....	18
4.6	Resultados.....	18
4.6.1	Secuenciación	20
4.6.2	Mapa de distribución	21
4.7	Discusión	22
4.8	Conclusiones	27
4.9	Referencias.....	27
5	CAPÍTULO 2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES DE RICKETTSIA DESDE GARRAPATAS DE PERROS DE EL SALVADOR	33
5.1	Resumen.....	34
5.2	Introducción	35
5.3	Objetivos	38
5.4	Hipótesis.....	38

5.5	Materiales y métodos	39
5.5.1	<i>Toma de muestra.....</i>	39
5.5.2	<i>Extracción de ADN desde garrapatas</i>	39
5.5.3	<i>Detección de Rickettsia en garrapatas a través de PCR y secuenciación.....</i>	40
5.5.4	<i>Análisis Filogenético</i>	41
5.6	Resultados.....	42
5.7	Discusión	47
5.8	Conclusiones	51
5.9	Referencias.....	52
6	CAPÍTULO 3. REGISTRO DE GARRAPATAS Y RICKETTSIAS PROVENIENTES DE MEDIO AMBIENTE Y ANIMALES DE VIDA SILVESTRE	59
6.1	Resumen.....	60
6.2	Introducción	61
6.3	Objetivos	66
6.4	Hipótesis.....	66
6.5	Materiales y Métodos.....	66
6.5.1	<i>Colecta de garrapatas.....</i>	66
6.5.2	<i>Identificación morfológica y molecular de garrapatas</i>	67
6.5.3	<i>Análisis filogenético de garrapatas</i>	68
6.5.4	<i>Análisis Geográfico</i>	69
6.6	Resultados.....	69
6.7	Discusión	75
6.8	Conclusiones	81
6.9	Referencias.....	82
7	DISCUSIÓN GENERAL	89
8	CONCLUSIONES	97
10	REFERENCIAS.....	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 4.1. Mapa de distribución de garrapatas del género <i>Rhipicephalus</i> en perros de diez distritos de El Salvador.....	21
Figura 4.2 Mapa de distribución de garrapatas del género <i>Amblyomma</i> en perros de diez distritos de El Salvador.....	22
Figura 5.1 Mapa de distribución de especies del género <i>Rickettsia</i> encontradas en garrapatas de perros de diez distritos en El Salvador.....	44
Figura 5.2 Análisis filogenético molecular de especies de <i>Rickettsia</i> GFM en garrapatas de perros de El Salvador.....	46
Figura 5.3 Distribución geográfica de las 15 áreas de conservación de El Salvador.....	65
Figura 5.4 Árbol filogenético de máxima probabilidad inferido para un subconjunto de garrapatas neotropicales utilizando un alineamiento de 439pb del gen mitocondrial 16S rRNA.....	71
Figura 5.5 Distribución geográfica de especies de garrapatas y <i>Rickettsia</i> de El Salvador, durante los años 2019-2021.....	75
Figura 5.6 Ninfa de <i>Ixodes</i> sp. colectada en El Salvador, mostrando estructura de aurículas.....	79

LISTA DE CUADROS

Cuadro 4.1 Número y porcentaje de perros infestados con diferentes especies de garrapatas en diez distritos de El Salvador	20
Cuadro 5.1 Datos del boletín epidemiológico semana 52, años 2017 y 2018. Casos sospechosos a Dengue. Ministerio de Salud, El Salvador.....	38
Cuadro 5.2 Porcentaje de positividad a género <i>Rickettsia</i> por especie y estadio de garrapata.....	42
Cuadro 5.3 Distribución de muestras de garrapatas positivas por distrito.....	43
Cuadro 5.4 Identificación de especies de <i>Rickettsia</i> en garrapatas de diez distritos de El Salvador	45
Cuadro 5.5 Número y porcentaje de perros por distrito parasitados con garrapatas positivas a <i>Rickettsia</i>	47
Cuadro 5.6 Ubicación de colecta de garrapatas en El Salvador, durante los años 2019-2021	67
Cuadro 5.7 Garrapatas (M: machos; H: hembras; N: ninfas; L: larvas), hospederos asociados y lugar de colecta en El Salvador, durante los años 2019-2021	70
Cuadro 5.8 Datos de las secuencias parciales del gen mitocondrial <i>16S rRNA</i> generados desde diez especies de garrapatas de El Salvador	72
Cuadro 5.9 Datos de las secuencias parciales de los genes <i>gltA</i> y <i>ompA</i> generadas por especies de <i>Rickettsia</i> de El Salvador	74

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
Ca	<i>Candidatus</i>
cf.	<i>confer</i>
CNR	Centro Nacional de Registros
GenBank	Base de datos de secuencias genéticas de la Librería Nacional de Medicina
GFM	Grupo de la Fiebre Manchada
<i>gltA</i>	Gen de la Citrato sintasa
GT	Grupo Tifus
IDH	Índice de Desarrollo Humano
MAFFT	Programa de alineamiento múltiple
MARN	Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales
MEGA	Software de alineamiento de secuencias
MINSAL	Ministerio de Salud
<i>ompA</i>	Gen de la proteína de membrana A
<i>ompB</i>	Gen de la proteína de membrana B
OPS	Organización Panamericana de la Salud
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PhyML	Paquete de software para estimación filogenética
PNUD	Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo
<i>sca4</i>	Gen de la proteína de superficie celular PS-120
s.l.	<i>Sensu lato</i>
sp.	Referente a una especie sin nombre
spp.	Referente a varias especies del mismo género
s.s	<i>Sensu stricto</i>
USA	Estados Unidos
<i>16S rRNA</i>	Gen del ARN ribosómico 16S

1 INTRODUCCIÓN GENERAL

El Salvador es el país más pequeño de América Central, limita al oeste con Guatemala, al norte con Honduras, al este con Honduras y Nicaragua y al sur con el Océano Pacífico. Su extensión es de aproximadamente 21,040.56 kilómetros cuadrados, con 296 kilómetros de costa pacífica a lo largo de todo el país, es el único país centroamericano que no posee costa sobre el Mar Caribe. Localizado en latitud Norte, sus coordenadas geográficas están entre 13° y 14° norte y entre 87° y 90° oeste. La precipitación anual es cerca de 1,200 y 2,800 milímetros, con una temperatura anual entre 12.7°C y 26.9°C. Dos zonas montañosas paralelas de oeste a este separan al país en 2 regiones: montañas y valle central y planicie costera. La cadena montañosa sur está formada por 20 volcanes. Su división política incluye tres zonas geográficas: zona occidental, zona central y zona oriental. Administrativamente se divide en 14 departamentos, 44 municipios y 262 distritos. El país cuenta con un último censo poblacional elaborado en el año 2024 que registra 6,029,976 habitantes. En cuanto a su situación ambiental, existe un proceso de degradación que ha sido mayor en las últimas décadas, originado por factores antropogénicos, principalmente, pero también por factores naturales y de cambio climático (Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales [MARN], 2005; MARN, 2010; Banco Central de Reserva [BCR], 2024).

A pesar de su extensión territorial y alta densidad poblacional, El Salvador mantiene una diversidad biológica significativa que se ve amenazada por la reducción, el deterioro y la fragmentación de los hábitats, la sobreexplotación de los recursos y la contaminación. Hasta septiembre de 2024, El Salvador posee una extensión mayor a 78,000 hectáreas consideradas como Áreas Naturales Protegidas (MARN, 2024). Información actualizada hasta el año 2010, indica que el 23.80% del territorio nacional estaba ocupado por bosque, haciendo un total de 217,565.1 hectáreas; pero los bosques del país han sido severamente afectados y solo permanece el 2% de los bosques naturales (MARN, 2010). En el listado de fauna silvestre registrada para El Salvador, se indica los reportes de 376 especies de insectos, 337 peces, 36 anfibios, 103 reptiles, 584 aves (nativas y migratorias) y 159 mamíferos (MARN, 2018), pero entre los artrópodos los arácnidos no han sido considerados en ese listado; sin embargo, existen algunos esfuerzos publicados para conocer la diversidad de arañas en el país (Sorto 2011) y en cuanto a garrapatas, se ha establecido la presencia de al menos 12 especies (Romero et al., 2023).

Las garrapatas son un grupo de artrópodos perteneciente a los arácnidos, y corresponde a parásitos temporales obligados de animales vertebrados, que representan un grupo importante de vectores de enfermedades infecciosas. Son vectores de más agentes infecciosos que cualquier otro grupo de artrópodos y en importancia en salud pública son superados únicamente por los mosquitos (Guglielmone 2004). Existen cerca de 900 especies en el mundo, de las cuales alrededor de 200 son encontradas en la región Zoogeográfica Neotropical (que en su forma amplia comprende las islas del Caribe, Sur de México, América Central y Sur América); se distribuyen en casi todos los ecosistemas existentes, con la capacidad de infestar una gran variedad de hospederos y transmitir diversos agentes etiológicos, sirviendo no solamente como vectores sino también como reservorios de estos agentes (Organización Panamericana de la Salud [OPS], 2004; Estrada-Peña, 2015; Lopes et al., 2016). Las garrapatas se clasifican en tres familias: familia Argasidae, familia Ixodidae y familia Nuttalliellidae, esta última posee una sola especie descrita en África y comparte características de las otras dos familias por lo que se considera, por algunos, como el ancestro basal de las familias Argasidae e Ixodidae. En relación con las familias Argasidae e Ixodidae, éstas se denominan también como “garrapatas blandas” y “garrapatas duras”, respectivamente, y difieren tanto en su morfología como en su fisiología y biología. Las garrapatas blandas (Argasidae) incluyen alrededor de unas 190 especies, no poseen escudo quitinoso, su hipostoma se ubica en posición anterior ventral, se alimentan por cortos períodos de tiempo y procesan la sangre ingerida eliminando el agua a través del órgano coxal; mientras que, las garrapatas duras (Ixodidae) poseen en su parte dorsal un escudo esclerotizado (por lo que se les denomina como garrapatas duras), su hipostoma está en posición apical, se alimenta por largos períodos de tiempo (por días o semanas y pueden llegar a ingerir más de 100 veces su propia masa) y procesan la sangre ingerida eliminando el agua a través de las glándulas salivales (Estrada-Peña, 2015; Latif et al., 2012). El grupo de las garrapatas duras ha sido involucrado en la transmisión de agentes patógenos, como nematodos, protozoarios, virus y bacterias, además, toxinas que podrían afectar la salud de animales y del ser humano (Guglielmone 2004; Estrada-Peña, 2015).

En la Región Zoogeográfica Neotropical, se describen 137 especies de garrapatas de la familia Ixodidae, la mayoría de ellas endémicas. Su estudio posee relevancia, debido a que permite incrementar el conocimiento sobre taxonomía, especificidad de hospederos, enfermedades transmitidas y distribución de las especies (Guglielmone et al., 2021). Para el caso específico de

América Central y el Caribe, esta región posee reportes de un aproximado de 80 especies de garrapatas entre blandas y duras (Charles et al., 2021).

Las garrapatas representan los vectores más importantes de enfermedades hacia animales silvestres y domésticos en todo el mundo (Titcomb et al., 2017). Los animales de vida silvestre son importantes para el mantenimiento y dispersión de garrapatas, y patógenos asociados (Tsao et al., 2021) y se ha propuesto que la pérdida de hospederos silvestres puede incrementar la población de estos arácnidos o incrementar la búsqueda de hospedero y contribuir a un aumento en las enfermedades transmitidas por artrópodos (Titcomb et al., 2017; Esser et al., 2018). El conocimiento de las especies de garrapatas en vida silvestre resulta importante para establecer los posibles agentes circulando en un lugar y riesgo hacia animales domésticos y el ser humano.

El Salvador ha realizado esfuerzos de conservación de la biodiversidad, estableciendo Áreas Naturales Protegidas, muchas de las cuales consistían en pequeños terrenos sin conectividad con otras Áreas Naturales Protegidas. Esto motivó a la creación de las Áreas de Conservación, las cuales son espacios territoriales compuestos por Áreas Naturales Protegidas, zonas de amortiguamiento, corredores biológicos y zonas de influencia, considerando la proximidad geográfica, relación e interdependencia ecológica del Sistema de Áreas Naturales Protegidas. Esto permite optimizar la eficiencia administrativa y conectividad ecológica (MARN, 2011). Hasta septiembre de 2024, el país contaba con 208 Áreas Naturales Protegidas al interior de 15 Áreas de Conservación (MARN, 2024).

La presencia de animales domésticos viviendo en las Áreas de Conservación incrementa el riesgo de contacto con garrapatas y agentes patógenos provenientes de vida silvestre. Entre los animales domésticos, el perro puede verse afectado por diversas especies de estos ectoparásitos (Polsomboon et al., 2022).

La presencia de perros (*Canis familiaris*) es universal y esta especie se encuentra presente en todas las culturas, ocupando un lugar en la vida de la sociedad moderna, a tal punto que, para algunos propietarios, poseen un estatus más allá de un simple animal doméstico. Su proceso de domesticación inició miles de años antes que cualquier otro mamífero domesticado, incluyendo a los animales de importancia en agricultura (Galibert et al., 2011). Aunque sin duda alguna existe evidencia de los múltiples beneficios de los perros en la vida humana, también es cierto que representan un problema sanitario, en cuanto al manejo de desechos y la transmisión de

enfermedades infecciosas de forma directa y otras transmitidas por vectores. Es de preocupación la transmisión de agentes de vida silvestre por perros que deambulan libremente en áreas rurales, pero también en la ciudad (Day et al., 2012; Day 2016). Ellos permanecen más tiempo en el hábitat de las garrapatas que las personas y pueden funcionar como indicadores de exposición a garrapatas y agentes patógenos transmitidos por ellas, un ejemplo de ello se ha demostrado en los Estados Unidos, para el caso de la enfermedad de Lyme (Johnson et al., 2004). Además, los perros pueden representar un potencial riesgo de transmisión de garrapatas y patógenos hacia el ser humano ya que, al ser vagabundos, pueden adquirir distintas especies de garrapatas, transportándolas desde ambientes externos hacia las casas, donde la garrapata puede desprenderse y adherirse al ser humano, aumentando de esta forma el riesgo de interacciones entre perros, garrapatas y humanos, sobre todo en ambientes rurales (Bermúdez et al., 2016; Zazueta et al., 2021). Se ha demostrado que los perros pueden permanecer infectados por meses o años con patógenos zoonóticos transmitidos por garrapatas, por lo que pueden ser reservorios importantes (Day 2016). Para el caso del microorganismo *Rickettsia rickettsii*, causante de la rickettsiosis más severa del mundo, el perro tiene la capacidad de funcionar como hospedero amplificador y se ha relacionado la presencia de casos de rickettsiosis en humanos en ambientes con perros que deambulan libremente en la zona (Álvarez-Hernández et al., 2017).

Es necesario tomar en consideración que la distribución geográfica de las garrapatas varía de región a región y así mismo los patógenos asociados a ellas, resultando para cada región geográfica su propio riesgo de transmisión de patógenos específicos (Day 2016).

Los patógenos transmitidos por garrapatas son causa de una gran variedad de enfermedades en animales y humanos entre las que se puede mencionar la anaplasmosis, babesiosis, borreliosis, ehrlichiosis y rickettsiosis, con una distribución mundial que incluye las áreas tropicales, como es el caso de América Central. En la región, entre las enfermedades transmitidas por garrapatas que afectan a humanos, las correspondientes al grupo de rickettsias de la Fiebre Manchada, son las más frecuentes (Charles et al., 2021).

La rickettsiosis es una enfermedad de importancia en salud pública causada por bacterias intracelulares obligadas del género *Rickettsia*. Se le considera una amenaza por los ciclos zoonóticos que mantiene en la naturaleza, que puede representar un problema de salud mayor al que se le reconoce (Labruna et al., 2004; OPS, 2004). Existe una gran cantidad de especies y

candidatos a especie en el género, que han sido determinadas mediante el empleo de técnicas moleculares. Actualmente el género es clasificado en cuatro grupos: Grupo tifus, Grupo de la Fiebre Manchada, Grupo transicional y Grupo ancestral básico (Blanton, 2019). El Grupo de la Fiebre Manchada (GFM) es el más importante, con alrededor de 30 especies reconocidas distribuidas a nivel mundial, de las cuales al menos 15 causan enfermedad en el ser humano.

En América Central los cuatro grupos están representados por diferentes especies, en el GFM la especie más importante, no solo en América Central sino en el mundo, es *R. rickettsii*; sin embargo, el Grupo tifus (GT) también posee especies de interés como *Rickettsia prowazekii* y *Rickettsia typhi*; mientras que el Grupo transicional (denominado así porque sus miembros poseen características del grupo tifus y del grupo de la Fiebre Manchada), posee a las especies *Rickettsia akari*, *Rickettsia asembonensis* y *Rickettsia felis* (Blanton, 2019; Maina et al., 2019). Por último, el Grupo ancestral básico no posee rickettsias de patogenicidad conocida y comprende a *Rickettsia bellii* y especies que han sido aisladas de diferentes artrópodos terrestres (Küchler et al., 2009).

La rickettsiosis es transmitida por artrópodos que incluyen no solo a garrapatas sino también piojos, ácaros y pulgas a través de picadura, contaminación de mucosas o heridas. Es una importante enfermedad en el mundo y los síntomas que produce en el ser humano son indistinguibles de otras enfermedades febriles, por lo que su diagnóstico es difícil de realizar. En el GT, la especie *R. prowazekii* es transmitida por el piojo corporal (*Pediculus humanus humanus*) y es el ser humano el reservorio debido a que, una persona recuperada puede mantener la infección latente. Otra especie de importancia en el grupo es *R. typhi*, la cual posee al género *Rattus* como el principal reservorio y es la pulga de la rata (*Xenopsylla cheopis*) quien trasmite la rickettsia cuando defeca, contaminando heridas o mucosas del ser humano. Ambas especies son consideradas cosmopolitas ya que se encuentran ampliamente distribuidas en el mundo (Bermúdez & Troyo, 2018).

En el Grupo transicional, la especie *R. akari* fue descrita por primera vez en Estados Unidos y posteriormente, fue identificada en serología realizada a personas en Costa Rica (Bermúdez & Troyo, 2018). Esta especie es transmitida por el ácaro *Liponyssoides sanguineus* y además por la garrapata *R. sanguineus* s.l. y aunque su ciclo es propio de roedores, es capaz de causar enfermedad en el perro (Zavala-Castro et al., 2009). Otra especie del grupo, reportada en América Central es *R. asembonensis*, la cual fue descrita por primera vez en Kenya, pero actualmente es considerada

de distribución mundial, con reportes en la pulga *Ctenocephalides felis* en América desde Estados Unidos, México, Costa Rica, Colombia, Ecuador, Perú y Brasil (Maina et al., 2019). Así mismo, otra especie del grupo distribuida en todo el mundo es *R. felis*, que ha sido descrita en América Central en Guatemala, Nicaragua, Costa Rica y Panamá (Bermúdez & Troyo, 2018).

En el grupo ancestral, las especies identificadas son consideradas no patógenas y en América Central está representada por *R. bellii* en Costa Rica, El Salvador y Panamá, desde garrapatas de reptiles (Bermúdez & Troyo, 2018; Romero et al., 2021).

En cuanto al GFM, se identifica en la región de América Central a la especie *Rickettsia rhipicephali*, que corresponde a un solo reporte en una garrapata *Dermacentor latus* de Costa Rica. Esta especie fue primero reportada en Estados Unidos y luego en Sur América sin que se haya establecido patogenicidad para el ser humano. En este grupo también se ha identificado a la especie *Rickettsia amblyommatis*, la cual está ampliamente distribuida en América y es la especie más común en América Central con hallazgos en Belice, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Costa Rica y Panamá, en diez especies de garrapatas y una especie de pulga (Bermúdez & Troyo, 2018; Romero et al., 2021). Para el caso de *Rickettsia parkeri* existen reportes en Belice en garrapatas *Amblyomma ovale* y *Amblyomma maculatum* desde perros y animales de vida silvestre, esta especie es de relevancia al ser causante de enfermedad en humanos de Estados Unidos, Argentina, Uruguay y Brasil (Lopes et al., 2016; Polsomboon et al., 2017; Paddock, et al., 2020). Además de estas especies, se ha encontrado a la especie *Rickettsia africae* en garrapatas *Amblyomma* de Nicaragua, esta especie causa una rickettsiosis moderada en humanos en África; sin embargo, este reporte puede corresponder a una incorrecta identificación (Vogel et al., 2018; Krawczak & Labruna 2018). Por último, en este grupo, la especie que causa mayor interés es *R. rickettsii*, agente causal de la rickettsiosis más severa del mundo, pero restringida al continente americano desde Canadá hasta la Argentina, siendo la causa de mortalidad en humanos de hasta el 80% en casos no tratados, lo que la convierte en la enfermedad transmitida por garrapatas más importante de Latinoamérica (Soares et al., 2012; Bermúdez et al., 2016).

La rickettsiosis cursa en humanos como una enfermedad de fallo multisistémico con síntomas similares a otras enfermedades infecciosas presentes en la región (dengue, leptospirosis, chikungunya, zika). Estos síntomas incluyen fiebre, dolor de cabeza, malasia, mialgia, exantema, náusea y vómito; además, se asocia a incapacidad de largo tiempo o permanente como déficit

cognitivo, ataxia, hemiparesis, ceguera, sordera o amputación debido a gangrena (Tarragona et al., 2016; Álvarez-Hernández et al., 2017). En América Central, existe evidencia serológica de rickettsias del GFM en humanos de todos los países, pero únicamente Panamá y Costa Rica poseen evidencia molecular (Bermúdez & Troyo, 2018; Dye-Braumuller et al., 2022).

De acuerdo con la Organización Panamericana de la Salud, los esfuerzos en vigilancia de rickettsiosis requieren de investigación en garrapatas, ya que la mayoría de las especies de rickettsias de interés, incluidas las GFM, son transmitidas por estos artrópodos y la distribución de las distintas especies de rickettsias del GFM está relacionada a la distribución de sus vectores principales (OPS, 2004; Bermúdez & Troyo, 2018). El abordaje de esta enfermedad debe realizarse bajo el concepto de Una Salud, debido al involucramiento de los componentes humano, animal y de medio ambiente (Álvarez-Hernández et al., 2017).

El diagnóstico de la rickettsiosis a nivel mundial en animales y humanos ha sido realizado principalmente mediante sospecha clínica y el uso de pruebas serológicas como Inmunofluorescencia indirecta, aunque también se efectúan pruebas de aislamiento en cultivo celular; sin embargo, estas técnicas presentan considerables limitantes. La sospecha clínica puede resultar difícil ya que se manifiesta con sintomatología similar a otras enfermedades febriles de amplia diseminación en América Central y del Sur; mientras que en las pruebas serológicas en humanos, se ha demostrado que un alto porcentaje de la población sana puede presentar títulos positivos a *Rickettsia*, por lo que se requiere una seroconversión o un sero-refuerzo entre una primera y una segunda muestra; además, puede presentarse falsos positivos con anticuerpos como el IgM de factores reumatoides, por otro lado, la serología no permite identificar la especie de *Rickettsia*, ya que se producen reacciones cruzadas entre especies e incluso con otros géneros bacterianos. Por último, aunque el cultivo celular es la prueba de oro en el diagnóstico de la rickettsiosis, este resulta un proceso muy laborioso, realizado únicamente por laboratorios especializados con nivel 3 de bioseguridad y a esto se suma el hecho de que no todas las especies de *Rickettsia* crecen con la misma facilidad (Oteo et al., 2014); a pesar de dichas limitantes, el cultivo celular presenta gran valor para el estudio de las rickettsiosis.

Los métodos moleculares de amplificación de Ácido desoxirribonucleico (ADN), por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y el análisis de secuencias de ADN, representan herramientas rápidas, sensibles y específicas para el diagnóstico de la rickettsiosis e identificación de especies,

y resultan pruebas más seguras para el manipulador al trabajar con volúmenes pequeños y en tubos cerrados, permitiendo incluso caracterizar los agentes rickettsiales en sus vectores artrópodos (Oteo et al., 2014). El PCR se basa en la habilidad de la ADN polimerasa en sintetizar una nueva banda de ADN complementario a la banda original de la molécula. Como la ADN polimerasa agrega nucleótidos solo a partir de un grupo 3'OH preexistente, se producen secuencias cortas de ADN que permiten este proceso y que además delimitan una región específica del ADN de interés a amplificar. Para el diagnóstico molecular de organismos rickettsiales, se emplean principalmente seis genes para definir género y especie: *16S rRNA* (Gen del ARN ribosómico 16S), *gltA* (gen de la Citrato sintasa), *ompA* (gen de la proteína de membrana A), *ompB* (gen de la proteína de membrana B), *sca4* (Proteína de superficie celular PS-120) y el gen del antígeno de membrana externa 17-kDa (Scarpulla et al., 2016). El gen *gltA* es una de las dianas más sensibles para la determinación de género y el gen *ompA* la más específica para detección de especie del GFM en garrapatas (Santibáñez et al., 2013); además, debido a que producen proteínas de importancia que les confiere una selección neutral, se emplean como marcadores moleculares útiles para el reconocimiento de especies y para establecer sus relaciones filogenéticas, siendo ampliamente utilizados para el diagnóstico e identificación de especies de rickettsia desde garrapatas y humanos en la región (Labruna et al., 2004; Hun et al., 2008; Troyo et al., 2016; Polsomboon et al., 2017). El gen *gltA* codifica la enzima Citrato sintasa, cuya función es catalizar la primera reacción del ciclo del ácido cítrico, importante para la obtención de energía. Se encuentra presente en casi todos los organismos vivos y pertenece a genes conservados constituyendo un marcador molecular para determinar la relación evolucionaria dentro del género *Rickettsia* (Roux et al., 1997). El gen *ompA* codifica la proteína transmembrana A, importante en la patogenicidad de la rickettsia del GFM al mediar la invasión de células de mamíferos y se encuentra presente en todos los miembros del GFM, considerándolo de utilidad para el análisis filogenético ya que presenta un alto grado de variación inter-especie (Fournier et al., 1998; Hillman et al., 2013).

El empleo de PCR ha demostrado el hallazgo de un solo tipo de secuencia de *Rickettsia* por garrapata, indicando que garrapatas individuales mantienen un solo alelo de *gltA* bacteriano (Qiu et al., 2014), esto puede deberse a una exclusión entre especies simbiotes y patógenos de *Rickettsia* que limitan la distribución de la especie entre vectores (de la Fuente et al., 2017). Macaluso et al., (2002), demuestran el mantenimiento de una sola infección en garrapatas, indicando que una infección primaria, previene una infección secundaria de *Rickettsia*.

Con base a lo anterior, el primer capítulo de esta tesis trata sobre las especies de garrapatas identificadas en los perros que fueron incluidos en el estudio, lo que es necesario para establecer la distribución espacial de las distintas especies y su relación con agentes rickettsiales. El segundo capítulo, aborda la identificación y prevalencia de microorganismos del género *Rickettsia* del Grupo de la Fiebre Manchada en las especies de garrapatas procedentes de perros, así como su distribución espacial y relación filogenética con las especies presentes en la región. Finalmente se cuenta con un tercer capítulo que muestra los hallazgos inéditos de especies de garrapatas colectadas desde ambientes silvestres y de animales tanto domésticos como silvestres, además de las especies de *Rickettsia* asociadas a ellas.

1 OBJETIVOS

1.1 2.2 Objetivo General:

- Identificar, caracterizar genéticamente y georreferenciar especies de garrapatas y rickettsias provenientes de perros de El Salvador.

1.2 2.3 Objetivos Específicos:

- Identificar morfológica y molecularmente especies de garrapatas duras obtenidas desde perros de El Salvador.
- Determinar las especies de *Rickettsia* del grupo de la Fiebre Manchada en garrapatas duras procedentes de perros de El Salvador.
- Estimar las relaciones filogenéticas de las especies de *Rickettsia* identificadas en las garrapatas duras procedentes de perros de El Salvador.
- Elaborar un mapa de distribución de las especies de garrapatas y rickettsias procedentes de perros de El Salvador.

2 HIPÓTESIS

Existen especies de *Rickettsia* potencialmente zoonóticas en garrapatas de perros de El Salvador, que representan un riesgo de transmisión hacia el ser humano debido al estrecho contacto entre perros y humanos.

**3 CAPÍTULO 1. DETERMINACIÓN DE ESPECIES DE GARRAPATAS
 PROCEDENTES DE PERROS DE EL SALVADOR**

4.1 Resumen

En América Central se reconoce a los perros como hospederos de al menos siete especies de garrapatas. Estos se vuelven hospederos importantes en el transporte de garrapatas desde ambientes silvestres hasta áreas domésticas, incrementando la probabilidad de cruce de patógenos con otros animales y también seres humanos. El Salvador, no posee registros oficiales sobre diversidad de especies de garrapatas afectando perros del país.

Se obtuvieron 1,264 garrapatas procedentes de 230 perros de diez distritos del país y mediante análisis morfológico y molecular, se demostró la presencia de cinco especies de garrapatas: *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (s.l.), *Rhipicephalus microplus*, *Amblyomma mixtum*, *Amblyomma conifer* (cf.) *parvum* y *Amblyomma ovale*.

La especie *R. sanguineus* s.l. resultó la más abundante con presencia en todas las localidades investigadas y en un 80.87% de los perros en estudio; mientras que la garrapata *R. microplus*, presentó un solo hallazgo. La especie *A. mixtum* fue identificada en seis de los diez distritos, en 13.91% de los animales, *A. ovale* fue identificada en 10.87% de perros y estuvo limitada a dos distritos. Finalmente, para el caso de la especie *A. cf. parvum*, se observó en cinco distritos en un 10.43%, de los perros evaluados.

Todas las especies de garrapatas identificadas presentan potencial de parasitar seres humanos y su distribución espacial demuestra áreas geográficas compartidas, lo que supone una interacción entre las diferentes especies de garrapatas y el perro, incrementando el riesgo de adquisición y transmisión de microorganismos de importancia en medicina veterinaria y salud pública, requiriendo investigación para establecer su verdadero impacto.

4.2 Introducción

La fauna de garrapatas de la familia Ixodidae en Centro América es relativamente abundante (considerando su extensión territorial). Países como Costa Rica, Panamá y Guatemala poseen al menos 40, 39 y 33 especies distintas de garrapatas duras, respectivamente (Guglielmone et al., 2021). Esto puede deberse en parte a que la población y abundancia de garrapatas depende de factores ambientales tales como el clima, la cobertura y uso de tierra, así como presencia de hospederos adecuados (Estrada-Peña 2015; Bermúdez et al., 2016). El clima y microclima posee un impacto sobre la población de garrapatas; por ejemplo, la temperatura juega un importante rol en la regulación del ciclo de vida de la garrapata, altas temperaturas unidas a sequía, así como muy bajas temperaturas, pueden inducir alta mortalidad en la población de garrapatas; sin embargo, esto no aplica a garrapatas con comportamiento de interiores, debido a que ellas habitan en proximidad con su fuente de alimentación, sin verse influenciadas por el ambiente externo (Estrada-Peña 2015), por el contrario, condiciones óptimas pueden permitir el desarrollo de varias generaciones de garrapatas durante el año (Álvarez-Hernández et al., 2017). La cobertura y uso de la tierra representan un incremento en el riesgo de contacto con garrapatas y transmisión de patógenos, la fragmentación de hábitats, por actividades humanas como la agricultura, producen áreas boscosas inmersas en otros tipos de hábitat que puede modular no solo la población de garrapatas sino los tipos de hospederos (influyendo en el número de especies y abundancia) y por lo tanto la transmisión de agentes patógenos asociados a ellos (Estrada-Peña 2015; Bermúdez et al., 2016). Es conocido que, con relación a hospederos, algunas garrapatas son muy específicas y la ausencia de este podría prevenir la presencia de la garrapata en un lugar determinado, otras pueden adaptarse a diferentes hospederos y en general, el período de abundancia del hospedero determina la abundancia de la garrapata (Estrada-Peña 2015).

La expansión de las ciudades hacia áreas adyacentes con alta vegetación, y la movilización de animales domésticos entre estas zonas, incrementan el riesgo de adquirir diferentes especies de garrapatas y la transmisión de agentes patógenos (Bermúdez et al., 2016). Mientras que algunas garrapatas han logrado adaptarse a ambientes urbanos, como el caso de *R. sanguineus* s.l., otras como las especies del género *Amblyomma*, prefieren los ambientes de las áreas rurales. El medioambiente rural permite una mayor interacción garrapata-hospedero y se ha demostrado que favorecen la mayor variabilidad de especies afectando a perros (Bermúdez et al., 2016). El declive

del ambiente transformado por el ser humano y la introducción de animales domésticos, como el perro, puede permitir la presencia y mantenimiento de algunas especies de garrapatas y su adaptación a ambientes antropogénicos; de tal manera que las actividades agrícolas incrementan la probabilidad de cruce de parásitos entre el campo, la ciudad y la vida silvestre (Szabó et al., 2007; Bermúdez et al., 2016).

En América Central, los perros son hospederos de diversas especies de garrapatas y se reconoce a *Rhipicephalus sanguineus* s.l. como la especie más abundante y ampliamente distribuida (Campos-Calderón et al., 2016; Springer et al., 2018). Menos frecuente es el hallazgo de las especies *Amblyomma maculatum* en Costa Rica; *Amblyomma mixtum* en Nicaragua, Costa Rica y Panamá; *Amblyomma ovale* en El Salvador, Nicaragua, Costa Rica y Panamá; *Amblyomma triste* en Nicaragua; *Rhipicephalus microplus* en El Salvador, Costa Rica y Panamá e *Ixodes boliviensis* en Costa Rica y Panamá (Troyo et al., 2012; Vogel et al., 2018; Bermúdez et al., 2016; Campos-Calderón et al., 2016; Ferrel et al., 2017; Springer et al., 2018; Pacheco-Solano et al., 2019; Romero et al., 2021).

En El Salvador, a partir del año 2024, existen 44 municipios que comprenden 262 distritos con características poblacionales, sociales y ambientales que difieren entre sí. El departamento de Chalatenango está ubicado en la zona central del país y alberga la menor densidad poblacional del país. En este departamento se encuentran los distritos de Agua Caliente, Nueva Concepción y Santa Rita, actualmente formando parte del municipio de Chalatenango Centro, el cual posee un 74.9% de la población viviendo en zona rural y el 27.2% se consideran hogares en pobreza multidimensional. Este municipio ostenta la menor densidad poblacional del país con 84 habitantes por kilómetro cuadrado. En el departamento de Chalatenango también se encuentran los distritos de Chalatenango y San José Las Flores, actualmente formando parte del municipio de Chalatenango Sur, el cual posee un 63.7% de la población viviendo en zona rural y el 19.9% se consideran hogares en pobreza multidimensional. El departamento de La Libertad está ubicado en la zona central del país y comprende, entre otros, al distrito de Santa Tecla, actualmente formando parte del municipio de La Libertad Sur, el cual posee un 47.5% de la población viviendo en zona rural y el 16.8% se consideran hogares en pobreza multidimensional. El departamento de San Salvador está ubicado en la zona central del país y posee la mayor densidad poblacional del país. En este departamento se encuentra el distrito de Apopa, actualmente formando parte del municipio

de San Salvador Oeste, el cual posee un 11.1% de la población viviendo en zona rural y el 24.0% se consideran hogares en pobreza multidimensional. Este departamento también alberga al distrito de Ilopango, actualmente formando parte del municipio de San Salvador Este, el cual posee un 5.3% de la población viviendo en zona rural y el 10.9% se consideran hogares en pobreza multidimensional. Este municipio posee la segunda mayor densidad poblacional del país con 3,057 habitantes por kilómetro cuadrado. Además, este departamento incluye al distrito de San Marcos, actualmente formando parte del municipio de San Salvador Sur, el cual posee un 29.8% de la población viviendo en zona rural y el 26.0% se consideran hogares en pobreza multidimensional. El departamento de Santa Ana se encuentra ubicado en la zona occidental del país y se ubica en este el distrito de Metapán, actualmente formando parte del municipio de Santa Ana Norte, el cual posee un 72.1% de la población viviendo en zona rural y el 21.3% se consideran hogares en pobreza multidimensional (Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo [PNUD], 2024). Todos estos distritos mencionados, poseen áreas de vegetación con núcleos de población cercana y los distritos del departamento de Chalatenango y Santa Ana conforman un grupo con menor densidad poblacional y alto porcentaje de población residente en área rural; mientras que, los distritos pertenecientes al departamento de San Salvador y La Libertad conforman los cinco municipios con mayor densidad poblacional y cuatro con menor porcentaje de población residente en área rural del país.

La importancia de establecer especies de garrapatas afectando perros y su distribución en un lugar, se debe a que los perros, como mascotas, aumentan el riesgo de transmisión de garrapatas a sus propietarios, posibilitando la interacción con diferentes patógenos y el incremento de enfermedades zoonóticas transmitidas por estos vectores, como es el caso de las rickettsiosis (Ferrel et al., 2017; Jones et al., 2018). En El Salvador la información sobre garrapatas, su presencia en perros y distribución es limitada.

4.3 Objetivos

- Identificar morfológica y molecularmente especies de garrapatas duras obtenidas desde perros de El Salvador.
- Elaborar un mapa de distribución de las especies de garrapatas procedentes de perros de El Salvador.
- Establecer presencia de especies de garrapatas con potencial zoonótico desde perros de El Salvador.

4.4 Hipótesis

Perros de El Salvador presentan infestación de garrapatas duras provocadas por más de una especie, algunas con importancia en salud pública.

4.5 Materiales y Métodos

4.5.1 Área de estudio

La investigación fue realizada en diez distritos de El Salvador: Agua Caliente, Apopa, Chalatenango, Ilopango, Metapán, Nueva Concepción, San José las Flores, San Marcos, Santa Rita y Santa Tecla. Estos distritos fueron identificados con una afectación moderada para Arbovirosis, durante los años de 2017 y 2018 por el Ministerio de Salud de El Salvador, que incluye las enfermedades del Dengue, Zika y Chikungunya; además, estos distritos disponen de áreas con abundante vegetación y áreas de conservación o se encuentran limitando con ellas. La disposición y apoyo de las Alcaldías a las que corresponde cada municipio fue indispensable para la realización del estudio en cada uno de ellos. La selección de las zonas de colecta y la toma de las muestras se realizó con ayuda de las autoridades municipales y representantes de las comunidades, con los cuales fueron programadas las visitas, en áreas con núcleos poblacionales y áreas de vegetación. El distrito de Santa Tecla, en el departamento de La Libertad, fue incorporado a la investigación, al no poderse concretar la toma de muestras en un municipio previamente elegido; además, por la

situación de pandemia, fue una alternativa viable por su cercanía y al cumplir con características de presentar núcleos poblacionales y área de conservación.

4.5.2 *Colecta de garrapatas*

Los perros fueron seleccionados al azar, obteniendo al menos 21 perros de cada distrito, en coordinación con las alcaldías y lugareños. Un total de 230 perros con presencia de garrapatas fueron incorporados a la investigación, en el período comprendido entre agosto 2019 y agosto 2020, éstos se eligieron por ser perros que deambulaban libremente, con acceso a zonas con vegetación, con la finalidad de asegurar una mayor diversidad de especies de garrapatas. Los perros debían poseer propietarios quienes debieron proporcionar su permiso para trabajar con el animal. De cada perro se registró localidad y georreferenciación para el establecimiento de la distribución espacial de especies de garrapatas identificadas.

Con ayuda de los propietarios, los perros fueron revisados por exploración física, mediante inspección visual y palpación, con el fin de detectar bultos en el pelaje, producto de la presencia de una garrapata en el animal. Las garrapatas fueron removidas desde sus sitios de predilección: orejas, alrededor de los ojos, cuello, nariz, axilas y entre los dedos, registrándolas con un número único de identificación y conservándolas en etanol absoluto para realizar observación morfológica y análisis molecular.

4.5.3 *Identificación taxonómica y molecular de garrapatas.*

Las garrapatas colectadas fueron separadas en sus diferentes fases de desarrollo de su ciclo de vida: larva, ninfa y adulto. Se identificaron morfológicamente registrando especie, mediante el empleo de claves dicotómicas para garrapatas adultas según Barros-Battesti et al. (2006) y Martins et al. (2010). Larvas y ninfas del género *Amblyomma* fueron identificadas solo a nivel de género ante la ausencia de claves de identificación adecuadas.

4.5.4 *Extracción de ADN desde garrapatas*

La extracción de ADN se llevó a cabo para garrapatas adultas, ninfas y larvas con el empleo de Dneasy® Blood and Tissue Kit (Valencia, California). Una garrapata completa o una parte de esta (en el caso de garrapatas ingurgitadas), fue macerada y tratada con proteinasa K durante toda la

noche, posterior a completar la lisis, se continuó bajo el seguimiento del protocolo complementario aplicado a garrapatas, de acuerdo con las indicaciones del fabricante. La extracción de ADN se realizó en las instalaciones del laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador.

4.5.5 Caracterización molecular de garrapatas.

Al menos una garrapata de cada especie identificada morfológicamente y una fase inmadura provenientes de cada perro, fueron procesadas a través de la técnica de PCR, hasta la obtención de un fragmento de alrededor de 460pb, correspondiente a un segmento del gen mitocondrial 16S rRNA, según Mangold et al. (1998). La reacción fue realizada en las instalaciones del laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de El Salvador. Los productos de PCR obtenidos fueron trasladados al laboratorio del Departamento de Medicina Veterinaria Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de la Universidad de Sao Paulo, donde se procedió a realizar el proceso de secuenciación en secuenciador automático (Applied Biosystems/Perkin Elmer, Foster City, California), conforme a las instrucciones del fabricante y las secuencias obtenidas fueron comparadas con secuencias de garrapatas disponibles en la base de datos de secuencias genéticas de la Librería Nacional de Medicina o GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast), para identificación de especie. Para ello se empleó un espécimen de cada morfotipo de garrapata.

4.6 Resultados

Se obtuvieron 1264 garrapatas procedentes de 230 perros de diez distritos de El Salvador. El género *Rhipicephalus* fue más prevalente, con un total de 900 garrapatas desde 186 perros parasitados; mientras que para el género *Amblyomma* se obtuvieron 364 garrapatas desde 87 perros. Se observó infestaciones mixtas en 43 perros que poseían ambos géneros de garrapatas. Todos los perros evaluados en esta investigación fueron mestizos.

A través de la identificación morfológica y molecular, se demostró la presencia de cinco especies de garrapatas presentes en perros de El Salvador: se encontró infestación con el género *Rhipicephalus* de las especies *Rhipicephalus sanguineus* s.l. y *Rhipicephalus microplus*; mientras que, para el género *Amblyomma* se identificaron las especies *Amblyomma mixtum*, *Amblyomma*

cf. *parvum* y *Amblyomma ovale*. De las fases inmaduras de *Amblyomma*, 23 garrapatas fueron secuenciadas para identificación de especie.

Los datos obtenidos en este estudio muestran al género *Rhipicephalus* como el más abundante en perros de El Salvador, debido a que la especie *R. sanguineus* s.l. se encontró en el 100% de las localidades investigadas, con una frecuencia de infestación en perros evaluados que corresponde al 80.87%, resultando la garrapata más común en perros de las diferentes localidades (Tabla 1). En los distritos de Apopa y San José las Flores no se identificó perros con otra especie de garrapata distinta a *R. sanguineus* s.l. Esta garrapata se encontró asociada a una alta infestación en algunos hospederos. Otra especie del género identificada en el estudio corresponde a *R. microplus*, que representa un solo hallazgo en el distrito de Chalatenango.

En relación con el género *Amblyomma*, la especie *A. mixtum* fue identificada en seis de los diez distritos, con mayor presencia de animales infestados en el distrito de Chalatenango, con un 39.13% de los perros muestreados en ese distrito. El porcentaje general de animales afectados con esta especie fue del 13.91% y se coloca como la segunda especie más frecuente en perros de las localidades investigadas. La especie *A. ovale* fue identificada con un porcentaje general del 10.87% de los perros con infestación a garrapatas; pero este hallazgo corresponde únicamente a dos distritos: San Marcos y Santa Tecla, con mayor frecuencia en el distrito de Santa Tecla (65.22% de los perros evaluados), en este distrito fue además más frecuente que *R. sanguineus* s.l. Una tercera especie del género identificada en perros fue *A. cf. parvum*, observándose en cinco distritos, con mayor porcentaje en el distrito de Agua Caliente, representando un 59.09% de los perros con infestación de garrapatas en dicho distrito. En general, considerando los diez distritos, el porcentaje de hallazgo de esta especie corresponde al 10.43%, convirtiéndose en la cuarta especie de garrapata con mayor frecuencia en los distritos bajo estudio (Cuadro 4.1).

Debido a que no es posible realizar una adecuada identificación morfológica de garrapatas inmaduras en estado de ninfa y larva del género *Amblyomma*, se reporta un 11.74% de perros con presencia de *Amblyomma* spp., sin poder establecer la especie correspondiente.

Cuadro 3.1 Número y porcentaje de perros infestados con diferentes especies de garrapatas en diez distritos de El Salvador

Distrito	N° de perros	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l.		<i>Rhipicephalus microplus</i>		<i>Amblyomma mixtum</i>		<i>Amblyomma ovale</i>		<i>Amblyomma cf. parvum</i>		<i>Amblyomma</i> spp.	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
Agua Caliente	22	16	72.73%	-	-	2	9.09%	-	-	13	59.09%	-	-
Apopa	21	21	100.00%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Chalatenango	23	19	82.61%	1	4.35%	9	39.13%	-	-	-	-	10	43.48%
Ilopango	23	21	91.30%	-	-	1	4.35%	-	-	3	13.04%	-	-
Metapán	25	19	76.00%	-	-	7	28.00%	-	-	-	-	8	32.00%
Nueva Concepción	23	20	86.96%	-	-	7	30.43%	-	-	4	17.39%	9	39.13%
San José Las Flores	25	25	100.00%	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
San Marcos	24	16	66.67%	-	-	-	-	10	41.67%	1	4.17%	-	-
Santa Rita	21	16	76.19%	-	-	6	28.57%	-	-	3	14.29%	-	-
Santa Tecla	23	13	56.52%	-	-	-	-	15	65.22%	-	-	-	-
TOTAL	230	186	80.87%	1	0.43%	32	13.91%	25	10.87%	24	10.43%	27	11.74%

Una observación en este estudio sobre el género *Amblyomma*, en estadio adulto, es que se encontró en infestaciones bajas, con poca presencia de estas sobre sus hospederos, en ocasiones con un único ejemplar encontrado en el perro y para algunos casos se evidenció infestación con dos especies del género en un mismo perro involucrando a las especies *A. mixtum* y *A. cf. parvum*.

4.6.1 Secuenciación

El análisis de alineamiento de secuencias del fragmento correspondiente al gen mitocondrial 16S rDNA en las garrapatas, demostró que todas las secuencias fueron 100% idénticas a las secuencias correspondientes publicadas en el GenBank para las especies *A. mixtum* (1 adulto, 16 ninfas y 5 larvas), *A. ovale* (1 adulto y 1 ninfa), *A. cf. parvum* (2 adultos y 1 ninfa) y *R. microplus* (1 adulto).

Las secuencias obtenidas fueron depositadas en el GenBank bajo los números de acceso OP198636- OP198637, OP198638- OP198639, OP1986340 y OP198641.

4.6.2 Mapa de distribución

La distribución de garrapatas se georreferenció en dos diferentes mapas, para especies del género *Rhipicephalus* (Figura 4.1) y especies del género *Amblyomma* (Figura 4.2), con límites administrativos de El Salvador cuya información cartográfica base está disponible desde el Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales (MARN) y Centro Nacional de Registros (CNR) de El Salvador. Los mapas de distribución se realizaron con el uso de ArcGIS versión 9.0 disponible en el Laboratorio de Sistemas de Información Geográfica de la Escuela de Posgrado y Educación Continua de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador.

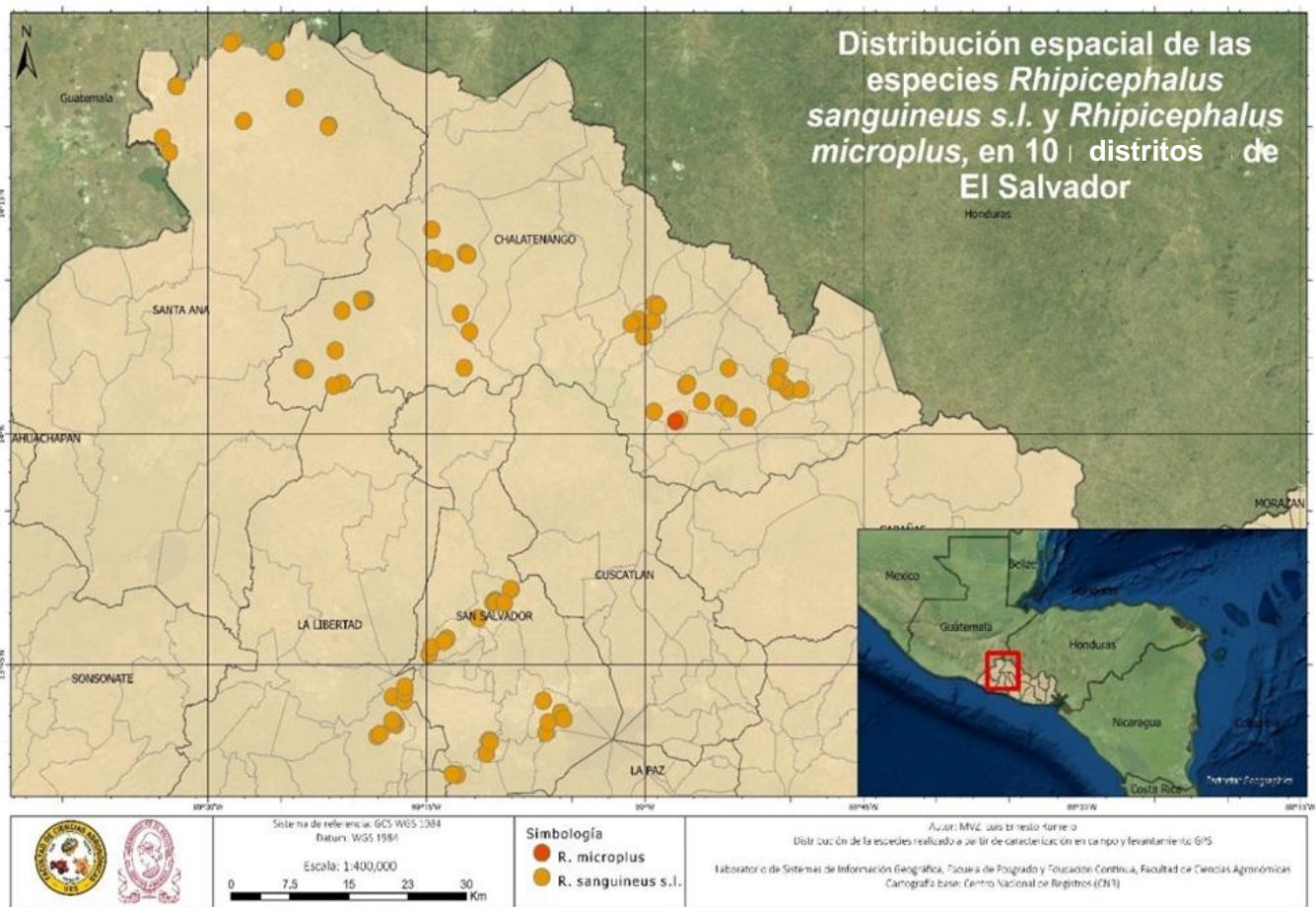


Figura 3.1. Mapa de distribución de garrapatas del género *Rhipicephalus* en perros de diez distritos de El Salvador.

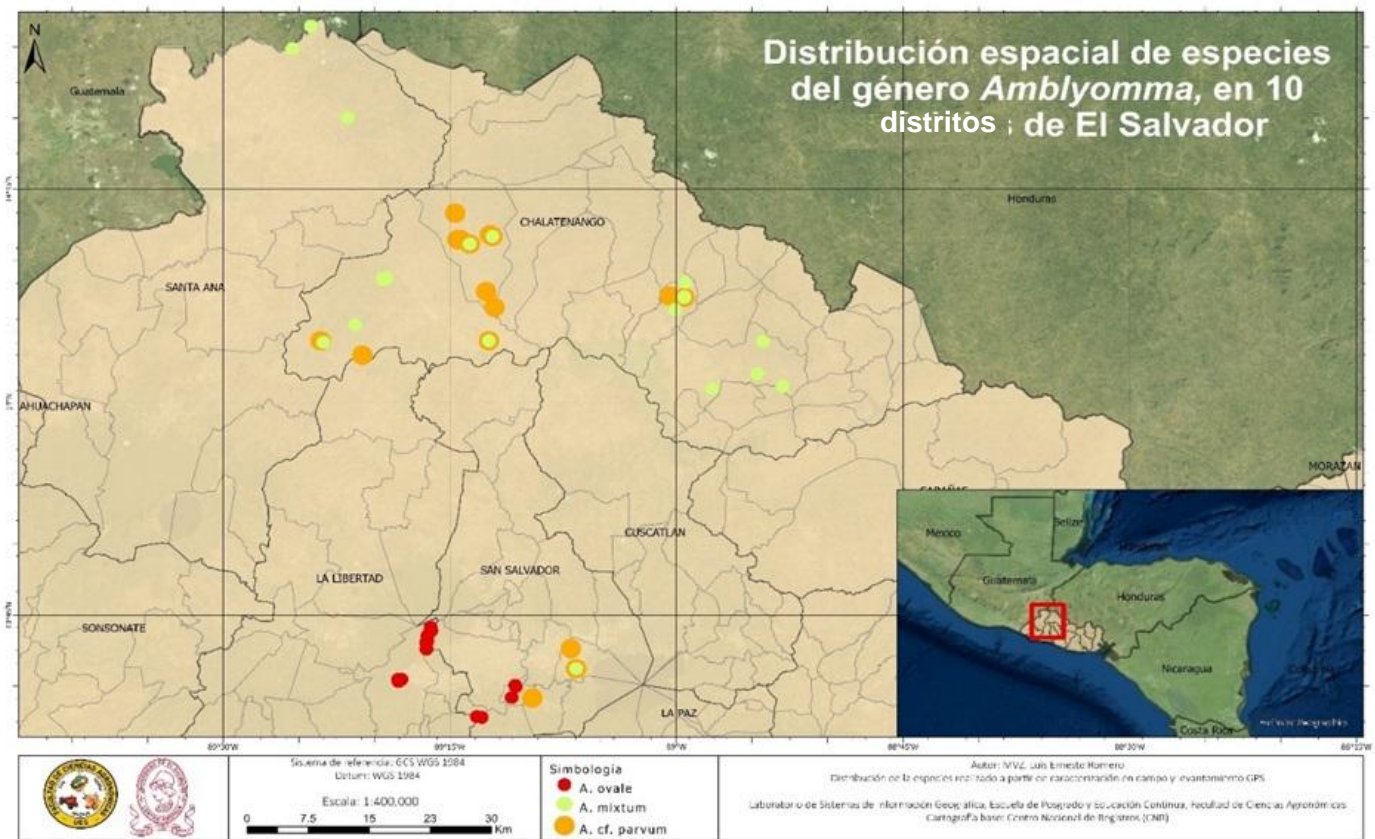


Figura 3.2 Mapa de distribución de garrapatas del género *Amblyomma* en perros de diez distritos de El Salvador

4.7 Discusión

Estos hallazgos mostraron similitud a los reportados en otras investigaciones de la región, con las garrapatas *R. sanguineus* s.l., *A. mixtum*, y *A. ovale* como las especies mayormente identificadas en perros (Vogel et al., 2018; Ferrel et al., 2017; Polsomboon et al., 2017; Springer et al., 2018; Pacheco-Solano et al., 2019); estos reportes incluyen también las especies *R. microplus*, *Ixodes boliviensis*, *A. cf. parvum*, *Amblyomma maculatum*, *Amblyomma sculptum* y *Amblyomma triste*, aunque en menor frecuencia; sin embargo, a excepción de *R. microplus*, estas últimas especies no fueron encontradas en los perros de los distritos incluidos en la investigación. Esto puede deberse a factores ambientales que pueden influir en la población y distribución de garrapatas (Ferrel et al., 2017). Otra diferencia importante se observó en la alta presencia de la garrapata *A. cf. parvum* en perros, la cual no ha sido reportada como una especie de alta prevalencia en la región de

América Central en dicho hospedero (Tian et al., 2024). A pesar de ello, en América, se reconoce al perro como un hospedero de *A. parvum*, hallazgo que ha sido reportado en investigaciones en México y Brasil (Szabó et al., 2007; Ojeda-Chi et al., 2019).

La garrapata *R. sanguineus* s.l. representa gran relevancia como vector de agentes patógenos de importancia en salud pública y medicina veterinaria. Es la especie más abundante y ampliamente distribuida en perros del mundo. En América Central su presencia se ha reportado en altas prevalencias y es por mucho la garrapata más frecuentemente identificada en el perro, con porcentajes de prevalencia que varían del 19.9% hasta el 48% en países de la región (Springer et al., 2018). Entre los agentes causantes de enfermedad en perros, que transmite esta garrapata, se encuentra *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* y *Anaplasma phagocytophilum*, bacterias que se han identificado molecularmente en *R. sanguineus* s.l. de América Central (Campos-Calderón et al., 2016). Esta garrapata, en todos sus estadios, prefiere al perro como hospedero y posee en éste un alto potencial reproductivo (Ojeda-Chi et al., 2019); sin embargo, puede aprovechar otros hospederos, incluyendo al ser humano (Guglielmone et al., 2006). *R. sanguineus* s.l. es una garrapata que se ha adaptado al medio ambiente antropogénico y habita al interior de los hogares, por lo que puede aprovechar hábitats interiores como muebles o grietas en paredes (Bermúdez et al., 2016), por lo tanto, perros domésticos transportan la garrapata hacia el interior de las casas desde ambientes peri domésticos e incrementan el riesgo de contacto entre la garrapata y el ser humano (Álvarez-Hernández et al., 2017). Estos hábitos confieren a esta garrapata mayor importancia, ya que se ha demostrado como transmisor de la bacteria *R. rickettsii* a seres humanos, principalmente en México, pero también con reportes en Estados Unidos, Brasil, Costa Rica y Panamá (Demma et al., 2005; Argüello et al., 2012; de Almeida et al., 2013; Álvarez-Hernández et al., 2017; Martínez-Caballero et al., 2018; Bermúdez y Troyo, 2018). La presencia de esta garrapata en perros de El Salvador ya había sido reportada, pero sin establecer frecuencia de afectación (Romero et al., 2021). Su presencia representa, por lo tanto, un riesgo importante para la transmisión de agentes a perros y humanos en el país. La infestación con *R. sanguineus* suele ser encontrada en alta carga en perros (Szabó et al., 2007), lo cual también fue observado en El Salvador.

Otra especie del género encontrada en esta investigación corresponde a *R. microplus*, esta es la garrapata común del bovino, distribuida en el trópico y subtropical del mundo, aunque también se

puede identificar en un amplio número de hospedadores, incluyendo al perro y el ser humano. Su presencia en un lugar está delimitada por la existencia de ganado bovino (Guglielmone et al., 2006). En la región de América Central existen reportes publicados de *R. microplus* en perros y corresponde a detección ocasional en este hospedero (Troyo et al., 2012; Ferrel et al., 2017). En cuanto a los agentes patógenos transmitidos por esta garrapata, se encuentran especies de los géneros *Anaplasma* y *Babesia* en bovinos, causando significantes pérdidas económicas; además, existe reportes de especies del género *Ehrlichia* en garrapatas de Asia y de Brasil, de las que se desconoce su patogenicidad y potencial zoonótico (Zweygarth et al., 2013). Hasta el momento, no se ha reportado transmisión de patógenos hacia el perro.

Con respecto a las especies del género *Amblyomma*, estas suelen ser recuperadas desde perros que acostumbran a deambular libremente, ingresando a zonas con vegetación, incrementando de esta manera la posibilidad de contacto con especies de garrapatas que provienen de animales de vida silvestre (Szabó et al., 2007). En El Salvador se identificó la presencia de tres especies del género *Amblyomma* en áreas rurales con abundante vegetación cercana. Una de las especies observadas fue la garrapata *A. mixtum*, la cual es considerada una especie muy agresiva, empleando como hospederos a diferentes especies animales tanto domésticas como silvestres, así como también al ser humano (Bermúdez et al., 2016; Bermúdez y Troyo 2018; Ojeda-Chi 2019). Su distribución es desde Texas hasta Ecuador y la presencia en perros de América Central se ha demostrado en diversos estudios desarrollados en Nicaragua, Costa Rica y Panamá, generalmente con frecuencias bajas (Vogel et al., 2018; Bermúdez et al., 2016; Campos-Calderón et al., 2016; Pacheco-Solano et al., 2019). *A. mixtum* se ha asociado con la transmisión de especies de *Rickettsia* en América Central, incluyendo *R. rickettsii*, especie causante de la rickettsiosis más severa en humanos, con reportes en Costa Rica y Panamá (Bermúdez y Troyo 2018). Esta especie de garrapata habita potreros, bosques deciduos y vegetación ribereña, aprovechando pastos, que le permiten parasitar diversas especies domésticas y de ambientes antrópicos. Es una especie común en bovinos y principalmente en equinos, exponiendo a personas que se dedican a la ganadería, por lo que es muy frecuente su hallazgo en seres humanos (Bermúdez et al., 2016; Bermúdez y Troyo 2018).

Otra especie del género que fue identificada corresponde a *A. ovale*. Ésta es una garrapata que parasita una amplia variedad de hospederos, incluyendo aves y al ser humano; pero con preferencia a carnívoros (Murgas et al., 2013). Su distribución es desde México hasta Argentina. En América

Central se encuentra en baja frecuencia en perros, con porcentajes que varían desde el 0.9% en Nicaragua al 4.8% en Costa Rica (Springer et al., 2018); sin embargo, su presencia puede verse incrementada por las condiciones ambientales, como la existencia de zonas boscosas. Al respecto, en Nicaragua un estudio llevado a cabo en reservas biológicas determinó una abundancia correspondiente al 86% de las garrapatas colectadas (Vogel et al., 2018) y en Panamá, ha sido reportada como la segunda especie más abundante en perros del país (Ferrel et al., 2017). Recientes investigaciones han demostrado la presencia de *Ehrlichia canis* en *A. ovale*, sin que se haya demostrado su capacidad vectorial hacia perros (Ojeda-Chi et al., 2019); además, se sospecha como vector de *Hepatozoon canis*. El hallazgo de *A. ovale* en perros, corresponde a zonas rurales cercanas a bosque, volviéndola una especie muy común en este hospedero (Bermúdez et al., 2016). Su presencia en humanos ha sido señalada en Costa Rica, Panamá y Sur América, considerándola como una especie frecuente en humanos de América Central (Murgas et al., 2013; Guglielmone et al., 2006; Bermúdez et al., 2022), lo que representa interés en salud pública como posible vector de agentes causantes de enfermedad en el ser humano, como bacterias del género *Rickettsia*. Diferentes miembros del género *Rickettsia* han sido identificados en esta especie de garrapata en América Central, incluyendo *Rickettsia asemonensis* en Costa Rica, *Rickettsia amblyommatis* en Costa Rica y Panamá y *Rickettsia africae* en una reserva biológica de Nicaragua; sin embargo, para este último caso, puede haber ocurrido una incorrecta identificación, considerando que es un agente causante de rickettsiosis moderada en humanos en África y que la secuencia de ADN obtenida en dicha investigación es 100% idéntica a *Rickettsia parkeri* cepa Atlantic rainforest (Vogel et al., 2018; Bermúdez & Troyo 2018; Krawczak & Labruna 2018). *R. parkeri* también ha sido detectada en *A. ovale* proveniente de perros y de vida silvestre en Belice (Lopes et al., 2016; Polsomboon et al., 2017). Esta garrapata se considera como el principal vector de *R. parkeri* Atlantic rainforest en Brasil, causando enfermedad en humanos (Krawczak & Labruna 2018). Las cargas reportadas con esta garrapata suelen ser bajas, de dos a cinco por perro (Sánchez-Montes et al., 2019), en El Salvador se encontró más comúnmente una garrapata por perro principalmente alrededor de los ojos, atrás de orejas y en fosas nasales. Un aporte interesante es el hecho de haber identificado esta garrapata, a una altura promedio de 1652 msnm en un área que pertenece al Volcán de San Salvador en el municipio de Santa Tecla, cuando usualmente en Panamá es observada en altitudes entre 0 y 900 msnm (Bermúdez et al., 2016).

Un hallazgo particular corresponde a la especie de garrapata *A. cf. parvum*, la cual posee escasos reportes en perros de América Central (Tian et al., 2024); sin embargo, se reconoce como una garrapata importante en perros de Brasil (Szabó et al., 2007) y se cuenta además con reporte de un perro en México (Ojeda-Chi et al., 2019). Es importante establecer la ecología y taxonomía de esta garrapata ya que, de acuerdo con Lado et al. (2016), *A. cf. parvum* de América Central debería ser considerada una especie separada de *A. parvum* de América del Sur y representan especies crípticas, por lo tanto, al referirse a la especie de América Central se emplea el término “confer” que significa “confróntese con” y se abrevia “cf”, ante su similitud con *A. parvum* de América del Sur. Debido a que en Brasil *A. parvum* afecta diversas especies animales y presenta una amplia distribución geográfica, se le considera con potencial de llegar a ser una peste (Szabó et al., 2007). Aunque se desconoce su hospedero primario, los adultos han sido asociados a carnívoros y los estados inmaduros a roedores, experimentalmente se demostró a los perros como los mejores hospederos para la fase adulta de esta garrapata y al cobayo, caballo y pollo como ideales para las fases inmaduras (Olegário et al., 2011). Esta garrapata podría estar adaptada a la desecación, las altas temperaturas y además verse favorecida por la deforestación (Szabó et al., 2007), su presencia en animales domésticos y su ciclo de vida involucrando diferentes hospederos en sus estadios, podría incrementar la transmisión de agentes patógenos, hacia estos animales y el hombre (Olegário et al., 2011). En Sur América existen al menos 27 localidades con reporte de esta garrapata en humanos de Argentina y Brasil, sin que se demuestre hasta el momento presencia de agentes patógenos de relevancia, únicamente se han identificado especies de *Rickettsia* de patogenicidad desconocida (Guglielmone et al., 2006). En América Central existe escasos reportes de su presencia en humanos en Guatemala y Panamá (Bermúdez et al., 2022). Este se convierte en el primer reporte de *A. cf. parvum* en perros de El Salvador y además representa el primer reporte de alta frecuencia en perros de América Central (Tian et al., 2024). La falta de información en la región podría estar relacionada a que, esta garrapata, cuando no está alimentada, es similar a *R. sanguineus* s.l. y de alguna manera podría confundirse con esta última especie (Szabó et al., 2007). La infestación de perros con esta garrapata fue variable, de leve a moderada, encontrando algunos perros con muchas garrapatas, algo que ha sido evidenciado en Brasil (Szabó et al., 2007).

4.8 Conclusiones

Los hallazgos obtenidos, dan cuenta de la presencia de diversas especies de garrapatas en perros de El Salvador. Las cinco especies identificadas presentan potencial de parasitar seres humanos, lo cual supone un riesgo en la transmisión de patógenos zoonóticos, por lo que su relevancia es tanto a nivel de la medicina veterinaria como la salud pública bajo el enfoque de Una Salud.

La distribución espacial de garrapatas muestra una presencia amplia para la mayoría de las especies en los distritos evaluados, identificándose áreas geográficas compartidas con diferentes especies de garrapatas, lo cual representa la posibilidad de interacción entre estas diferentes especies de garrapatas con el perro e incrementa el riesgo de adquisición de microorganismos presentes en ellas.

La información obtenida, representa una importante base para incrementar el conocimiento sobre taxonomía y dinámica poblacional de las garrapatas en El Salvador y América Central posibilitando el reconocimiento de agentes patógenos asociados a ellas. Es importante el desarrollo de más estudio que den cuenta de la existencia de otras especies de garrapatas en perros y realización de estudios que determinen el riesgo de transmisión de agentes patógenos hacia animales y el ser humano.

4.9 Referencias

- Álvarez-Hernández, G., Roldán, J., Milan, N., Lash, R. R., Behravesh, C. B., & Paddock, C. D. (2017). Rocky Mountain spotted fever in Mexico: past, present, and future. *The Lancet. Infectious diseases*, 17(6), e189–e196. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30173-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30173-1)
- Argüello, A. P., Hun, L., Rivera, P., & Taylor, L. (2012). A fatal urban case of rocky mountain spotted fever presenting an eschar in San Jose, Costa Rica. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 87(2), 345–348. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0153>
- Barros-Battesti, D.M., Arzua, M. & Bechara, G.H. (2006). Carrapatos de 27anamanian27 médico-veterinária da Região Neotropical: Um 27ana ilustrado para identificação de

- espécies. São Paulo, Vox/ICTTD-3/Butantan.
- Bermúdez, S. E., Castro, A. M., Trejos, D., García, G. G., Gabster, A., Miranda, R. J., Zaldívar, Y., & Paternina, L. E. (2016). Distribution of Spotted Fever Group Rickettsiae in Hard Ticks (Ixodida: Ixodidae) from Panamanian Urban and Rural Environments (2007-2013). *EcoHealth*, 13(2), 274–284. <https://doi.org/10.1007/s10393-016-1118-8>
- Bermúdez, C., & Troyo, A. (2018). A review of the genus *Rickettsia* in Central America. *Research and reports in tropical medicine*, 9, 103–112. <https://doi.org/10.2147/RRTM.S160951>
- Bermúdez, S., Domínguez, L., Troyo, A., Montenegro, V.M., Venzal, J.M. (2022). Ticks infesting humans in Central America: A review of their relevance in public health. *Current Research in Parasitology & Vector-Borne Diseases*. 2:100065. <https://doi.org/10.1016/j.crpvbd.2021.100065>.
- Campos-Calderón, L., Ábrego-Sánchez, L., Solórzano-Morales, A., Alberti, A., Tore, G., Zobba, R., Jiménez-Rocha, A. E., & Dolz, G. (2016). Molecular detection and identification of Rickettsiales pathogens in dog ticks from Costa Rica. *Ticks and tick-borne diseases*, 7(6), 1198–1202. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.07.015>
- de Almeida, R. F., Garcia, M. V., Cunha, R. C., Matias, J., e Silva, E. A., de Fatima Cepa Matos, M., & Andreotti, R. (2013). Ixodid fauna and zoonotic agents in ticks from dogs: first report of *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus sanguineus* in the state of Mato Grosso do Sul, mid-western Brazil. *Experimental & applied acarology*, 60(1), 63–72. <https://doi.org/10.1007/s10493-012-9641-y>
- Demma, L. J., Traeger, M. S., Nicholson, W. L., Paddock, C. D., Blau, D. M., Eremeeva, M. E., Dasch, G. A., Levin, M. L., Singleton, J., Jr, Zaki, S. R., Cheek, J. E., Swerdlow, D. L., & McQuiston, J. H. (2005). Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. *The New England journal of medicine*, 353(6), 587–594. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa050043>
- PNUD. (2024). Mapa Socioeconómico Guía para los 44 nuevos municipios de El Salvador. El Salvador. URL: <https://www.undp.org/sites/g/files/zskgke326/files/2024-08/pdfmapasocioeconomico13agosto.pdf>

- Estrada-Peña, A. 2015. Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology. *Revue scientifique et technique*, 34, 53-65.
- Ferrell, A. M., Brinkerhoff, R. J., Bernal, J., & Bermúdez, S. E. (2017). Ticks and tick-borne pathogens of dogs along an elevational and land-use gradient in Chiriquí province, Panamá. *Experimental & applied acarology*, 71(4), 371–385. <https://doi.org/10.1007/s10493-017-0116-z>
- Guglielmone, A. A., Beati, L., Barros-Battesti, D. M., Labruna, M. B., Nava, S., Venzal, J. M., Mangold, A. J., Szabó, M. P., Martins, J. R., González-Acuña, D., & Estrada-Peña, A. (2006). Ticks (Ixodidae) on humans in South America. *Experimental & applied acarology*, 40(2), 83–100. <https://doi.org/10.1007/s10493-006-9027-0>
- Guglielmone, A.A., Nava, S., Robbins, R.G. (2021). Neotropical Hard Ticks (Acari: Ixodida: Ixodidae). Springer, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-72353-8>
- Jones, E. H., Hinckley, A. F., Hook, S. A., Meek, J. I., Backenson, B., Kugeler, K. J., & Feldman, K. A. (2018). Pet ownership increases human risk of encountering ticks. *Zoonoses and public health*, 65(1), 74–79. <https://doi.org/10.1111/zph.12369>
- Krawczak, F. S., & Labruna, M. B. (2018). The rice rat *Euryoryzomys russatus*, a competent amplifying host of *Rickettsia parkeri* strain Atlantic rainforest for the tick *Amblyomma ovale*. *Ticks and tick-borne diseases*, 9(5), 1133–1136. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.04.013>
- Lado, P., Nava, S., Labruna, M. B., Szabo, M., Durden, L. A., Bermudez, S., Montagna, M., Sánchez Quirós, A. C., & Beati, L. (2016). *Amblyomma parvum* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae): Phylogeography and systematic considerations. *Ticks and tick-borne diseases*, 7(5), 817–827. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.03.017>
- Lopes, M. G., May Junior, J., Foster, R. J., Harmsen, B. J., Sanchez, E., Martins, T. F., Quigley, H., Marcili, A., & Labruna, M. B. (2016). Ticks and rickettsiae from wildlife in Belize, Central America. *Parasites & vectors*, 9, 62. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1348-1>
- Mangold, A.J., Bargues, M.D. & Mas-Coma, S. (1998). Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, 84, 478-484.

- Martins, T. F., Onofrio, V. C., Barros-Battesti, D. M., & Labruna, M. B. (2010). Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescrptions, and identification key. *Ticks and tick-borne diseases*, 1(2), 75–99. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2010.03.002>
- Martínez-Caballero, A., Moreno, B., González, C., Martínez, G., Adames, M., Pachar, J. V., Varela-Petrucci, J. B., Martínez-Mandiche, J., Suárez, J. A., Domínguez, L., Zaldívar, Y., & Bermúdez, S. (2018). Descriptions of two new cases of Rocky Mountain spotted fever in Panama, and coincident infection with *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus sanguineus* s.l. in an urban locality of Panama City, Panama. *Epidemiology and infection*, 146(7), 875–878. <https://doi.org/10.1017/S0950268818000730>
- Murgas, I. L., Castro, A. M., & Bermúdez, S. E. (2013). Current status of *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) in Panama. *Ticks and tick-borne diseases*, 4(1-2), 164–166. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.09.002>
- Ojeda-Chi, M. M., Rodriguez-Vivas, R. I., Esteve-Gasent, M. D., Pérez de León, A. A., Modarelli, J. J., & Villegas-Perez, S. L. (2019). Ticks infesting dogs in rural communities of Yucatan, Mexico and molecular diagnosis of rickettsial infection. *Transboundary and emerging diseases*, 66(1), 102–110. <https://doi.org/10.1111/tbed.12990>
- Olegário, M. M., Gerardi, M., Tsuruta, S. A., & Szabó, M. P. (2011). Life cycle of the tick *Amblyomma parvum* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae) and suitability of domestic hosts under laboratory conditions. *Veterinary parasitology*, 179(1-3), 203–208. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.01.056>
- Pacheco-Solano, K., Barrantes-González, A., Dolz, G., Troyo, A., Jiménez-Rocha, A. E., Romero-Zuñiga, J. J., & Taylor, L. (2019). Exposure of dogs to *Rickettsia* spp. In Costa Rica: Risk factors for PCR-positive ectoparasites and seropositivity. *Parasite epidemiology and control*, 7, e00118. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2019.e00118>
- Polsomboon, S., Hoel, D.F., Murphy, J.R., Linton, Y.M., Motoki, M., Robbins, R.G., Bautista, K., Bricen, O.I., Achee, N.L., Grieco, J.P., Ching, W.M., Chao, C.C. (2017). Molecular Detection and Identification of *Rickettsia* Species in Ticks (Acari: Ixodidae) Collected

- From Belize, Central America. *Journal of medical entomology*, 54(6), 1718–1726.
<https://doi.org/10.1093/jme/tjx141>
- Romero, L., Costa, F. B., & Labruna, M. B. (2021). Ticks and tick-borne Rickettsia in El Salvador. *Experimental & applied acarology*, 83(4), 545–554.
<https://doi.org/10.1007/s10493-021-00610-w>
- Sánchez-Montes, S., Ballados-González, G. G., Hernández-Velasco, A., Zazueta-Islas, H. M., Solís-Cortés, M., Miranda-Ortiz, H., Canseco-Méndez, J. C., Fernández-Figueroa, E. A., Colunga-Salas, P., López-Pérez, A. M., Delgado-de la Mora, J., Licona-Enriquez, J. D., Delgado-de la Mora, D., Karpathy, S. E., Paddock, C. D., & Rangel-Escareño, C. (2019). Molecular Confirmation of Rickettsia parkeri in Amblyomma ovale Ticks, Veracruz, Mexico. *Emerging infectious diseases*, 25(12), 2315–2317.
<https://doi.org/10.3201/eid2512.190964>
- Springer, A., Montenegro, V. M., Schicht, S., Wölfel, S., Schaper, S. R., Chitimia-Dobler, L., Siebert, S., & Strube, C. (2018). Detection of Rickettsia monacensis and Rickettsia amblyommatis in ticks collected from dogs in Costa Rica and Nicaragua. *Ticks and tick-borne diseases*, 9(6), 1565–1572. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.08.002>
- Szabó, M. P., Olegário, M. M., & Santos, A. L. (2007). Tick fauna from two locations in the Brazilian savannah. *Experimental & applied acarology*, 43(1), 73–84.
<https://doi.org/10.1007/s10493-007-9096-8>
- Tian, Y., Juarez, J. G., Moller-Vasquez, A. M., Granados-Presa, M., Ferreira, F. C., Pennington, P. M., Padilla, N., Hamer, G. L., & Hamer, S. A. (2024). Dog ectoparasites as sentinels for pathogenic Rickettsia and Bartonella in rural Guatemala. *Research square*, rs.3.rs-4656611. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4656611/v1>
- Troyo, A., Calderón-Arguedas, O., Alvarado, G., Vargas-Castro, L. E., & Avendaño, A. (2012). Ectoparasites of dogs in home environments on the Caribbean slope of Costa Rica. *Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology: Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, 21(2), 179–183. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612012000200021>

Vogel, H., Foley, J., & Fiorello, C. V. (2018). *Rickettsia africae* and Novel Rickettsial Strain in *Amblyomma* spp. Ticks, Nicaragua, 2013. *Emerging infectious diseases*, 24(2), 385–387. <https://doi.org/10.3201/eid2402.161901>

Zweygarth, E., Schöl, H., Lis, K., Cabezas Cruz, A., Thiel, C., Silaghi, C., Ribeiro, M. F., & Passos, L. M. (2013). In vitro culture of a novel genotype of Ehrlichia sp. From Brazil. *Transboundary and emerging diseases*, 60 Suppl 2, 86–92. <https://doi.org/10.1111/tbed.12122>

5 CAPÍTULO 2. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES DE RICKETTSIA DESDE GARRAPATAS DE PERROS DE EL SALVADOR

Re-editado a partir de:

Romero, L. E., Binder, L. C., Marcili, A., & Labruna, M. B. (2023). Ticks and tick-borne rickettsiae from dogs in El Salvador, with report of the human pathogen *Rickettsia parkeri*. *Ticks and tick-borne diseases*, *14*(5), 102206. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2023.102206>

5.1 Resumen

En El Salvador, la información sobre las especies de *Rickettsia* es escasa y se limita al reporte de tres especies sin asociación a enfermedad en humanos: *R. bellii*; ‘*Candidatus Rickettsia colombianensi*’ y *R. amblyommatis*.

La investigación se desarrolló con 288 muestras de ADN de garrapatas, procedentes de perros de El Salvador. La técnica molecular de PCR, dirigida al gen *gltA* y el gen *ompA* fue empleada, encontrando 58 muestras positivas (20.14%) al género *Rickettsia*. A través del análisis de las secuencias parciales de ambos genes se logró la identificación de tres especies de *Rickettsia* pertenecientes al Grupo de las Fiebres Manchadas: *Rickettsia amblyommatis* en 56 muestras (96.55% de muestras positivas) en garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* s.l., *Amblyomma* cf. *parvum* y *Amblyomma mixtum*; *Rickettsia parkeri* strain Atlantic rainforest en una garrapata *Amblyomma ovale*; y *Rickettsia* spp. (denominada en este estudio como *Rickettsia* sp. ES-A.cf.*parvum*) en una garrapata *A. cf. parvum*.

El análisis filogenético confirmó las identidades taxonómicas de *R. amblyommatis* y *R. parkeri* strain Atlantic rainforest; mientras que para *Rickettsia* sp. ES-A.cf.*parvum*, se conformó un clado muy relacionado al clado *R. amblyommatis*.

Estos hallazgos suponen una asociación primaria de *R. amblyommatis* con *A. mixtum* en América Central y describe a *R. parkeri* como la primera detección molecular de una especie patógena al ser humano para El Salvador en una garrapata *A. ovale*, exponiendo un riesgo potencial de transmisión hacia el ser humano. La *Rickettsia* sp. ES-A.cf.*parvum*, requiere mayor investigación para determinar si es una nueva especie o cepa de *R. amblyommatis*.

5.2 Introducción

El clima tropical de América Central es propicio para el desarrollo de gran cantidad de enfermedades infecciosas, algunas de ellas con altas prevalencias, que pueden enmascarar a otras enfermedades menos frecuentes, pero con igual importancia. En la región, la sospecha inicial ante una enfermedad febril es dengue u otras arbovirosis (Zika, Chikungunya) y también se relaciona a enfermedades bacterianas como Leptospirosis. Las enfermedades transmitidas por garrapatas, como rickettsiosis, no son la sospecha inicial y suele realizarse su evaluación posterior a descartar enfermedades de mayor prevalencia; lo que provoca un retraso en el diagnóstico y empeoramiento de la prognosis del paciente. Dependiendo de la especie de rickettsia, los síntomas no son específicos y varían desde una fiebre moderada hasta la muerte. La rickettsiosis producida por *Rickettsia rickettsii* es la más letal, si el paciente no recibe tratamiento oportuno, sobre todo en niños y personas inmunocomprometidas (Bermúdez y Troyo 2018; Martínez-Caballero et al., 2018).

Debido a la similitud de la rickettsiosis con otras enfermedades febriles comunes en la región, como las arbovirosis, se ha establecido que deben efectuarse esfuerzos enfocados para el diagnóstico diferencial en aquellos lugares donde están presentes tales enfermedades y se reconoce la importancia de incrementar su estudio (Peniche-Lara et al., 2015; Martínez-Caballero et al., 2018; Faccini et al., 2020). La Organización Mundial de la Salud, a través de su oficina regional, recomienda a los países de las Américas realizar vigilancia epidemiológica proactiva hacia la rickettsiosis, y que éstas deben ser consideradas dentro del diagnóstico diferencial en enfermedades febriles; además, se debe caracterizar las áreas de transmisión y diseminar el conocimiento sobre esta enfermedad (OPS, 2004). En El Salvador, no existen reportes oficiales de rickettsiosis en humanos, pero se cuenta con evidencia serológica de *Rickettsia* en la población (Global surveillance of rickettsial diseases: memorandum from a WHO meeting, 1993; Dye-Braumuller et al., 2022); sin embargo, países cercanos que incluyen a México, Costa Rica, Honduras y Panamá, reportan presencia de enfermedad en humanos asociada a las especies del Grupo de la Fiebre Manchada, como *R. rickettsii* y también rickettsias de otros grupos tales como *R. prowazekii*, *R. typhi* y *R. akari* (Hun et al., 2008; Chen & Wilson, 2009; Labruna et al., 2011).

Estudios moleculares sobre especies de rickettsias del GFM y sus vectores, en América Central, han reportado hasta la fecha la presencia de *R. rickettsii* y *R. parkeri*. Esta última ha sido detectada

en especies de garrapatas *Amblyomma maculatum* colectada de perros y *Amblyomma ovale* colectadas desde puma y jaguar en Belice (Lopes et al., 2016; Polsomboon et al., 2017). *Rickettsia parkeri* ha sido involucrada como causante de enfermedad en humanos en Estados Unidos, Argentina, Uruguay y Brasil y aunque no existe reporte de afectación en humanos de América Central, su hallazgo en Belice hace considerar un potencial riesgo a la salud pública en América Central (Bermúdez & Troyo 2018). Con relación a *R. rickettsii*, esta se ha identificado en América Central en las especies de garrapatas *Amblyomma mixtum*, *Dermacentor nitens*, *Haemaphysalis leporispalustris*, *Amblyomma varium*, y *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (Parola et al., 2013; Troyo et al., 2016; Martínez-Caballero et al., 2018; Bermúdez & Troyo 2018). Aunque inicialmente se postuló a *A. mixtum* como el principal vector de *R. rickettsii* en Centro y parte de Sur América (Levin et al., 2017; Martínez-Caballero et al., 2018), se ha demostrado mayor participación de otras garrapatas como *R. sanguineus* s.l., conocida como la garrapata más común del perro, la cual se encuentra diseminada en todo el mundo (Peniche-Lara et al., 2015). De estas garrapatas vectores de rickettsias del GFM, *R. sanguineus* s.l., *A. maculatum* y *A. ovale* parasitan a perros de América Central (Argüello et al., 2012; Polsomboon et al., 2017; Martínez-Caballero et al., 2018; Springer et al., 2018), así como también humanos (Bermúdez & Troyo 2018; Springer, et al., 2018). *R. sanguineus* s.l. es por mucho la garrapata más frecuentemente identificada en el perro, por lo tanto, la relación estrecha de contacto entre perros y propietarios incrementa el riesgo de transmisión de especies de *Rickettsia* (Piranda et al., 2011). Esta garrapata se ha adaptado al medio ambiente antropogénico (medio creado por las diferentes actividades humanas) y requiere únicamente de perros para su presencia en altas poblaciones, por lo que puede aprovechar hábitats interiores como muebles o grietas en paredes (Bermúdez et al., 2016). Estas características de la garrapata confieren a los perros domésticos la capacidad de transportarla hacia el interior de las casas desde ambientes peri domésticos e incrementar el riesgo de contacto entre la garrapata y el ser humano (Álvarez-Hernández et al., 2017), sugiriendo que el perro en América del Norte y Central es un vector y amplificador de la rickettsiosis más importante que lo establecido inicialmente (Parola et al., 2013). En Costa Rica se ha identificado perros serológicamente positivos a *R. rickettsii* en áreas urbanas, con reportes de rickettsiosis en humanos, que varían entre el 21.4% al 26%, concluyendo el involucramiento de *R. rickettsii*, mayormente sobre otras especies de rickettsias, en los perros evaluados de la gran área metropolitana (Argüello et al., 2012; Hun, 2013).

En El Salvador, la información sobre las especies de *Rickettsia* y sus vectores es escasa y se limita al reporte de *R. bellii* desde *A. sabanerae*, *A. dissimile* y *A. ovale*; ‘*Candidatus Rickettsia colombianensi*’ desde *A. dissimile* y *A. scutatum*; y *R. amblyommatis* desde *A. mixtum*, *A. parvum*, *Dermacentor nitens* y *Amblyomma* sp. ninfas (Barbieri et al., 2012; Romero et al., 2021); sin embargo, ninguna de estas especies está asociada a enfermedad en humanos y no existen reportes de *R. rickettsii*, ni de alguna especie de *Rickettsia* patógena al ser humano. Otro aspecto destacado en el país es con relación al alto porcentaje de casos sospechosos a dengue, reportados por el Ministerio de Salud, que carecen de un diagnóstico confirmado mediante serología y PCR por el sistema público de salud. Datos en el año 2017 mostraron procesamiento de un total de 1,420 muestras sospechosas a dengue en el sistema público de salud, confirmando 232 muestras (16%) a dengue. Mediante pruebas de PCR se detectaron 2 de 44 muestras procesadas, por detección de antígeno NS1 se obtuvieron 71/ de 619 muestras procesadas y a través de serología se identificaron 159 de 757 muestras procesadas (Tabla 2). Los departamentos con mayor cantidad de casos no confirmados a dengue, en el mismo año, corresponden a Santa Ana, San Salvador, Chalatenango y La Libertad (MINSAL 2023^a); mientras que para el año 2018, el total de muestras procesadas fue de 3,120 de las cuales 789 (25%) fueron positivas a dengue (PCR 65/110; detección de antígeno 263/1567 y serología 461/1443) (Cuadro 5.1), siendo los mismos departamentos que en el 2017 (Santa Ana, Chalatenango, La Libertad, San Salvador) los que poseen la mayor cantidad de casos no confirmados (MINSAL 2023^b). Tomando en consideración que la rickettsiosis presenta una sintomatología muy general, que fácilmente puede confundirse con enfermedades comunes como el dengue (Peniche-Lara et al., 2015; Martínez-Caballero et al., 2018), la realización de un diagnóstico diferencial es importante.

El conocimiento y monitoreo de patógenos zoonóticos transmitidos por garrapatas es necesario para determinar cambios en su distribución geográfica y las posibles interacciones entre garrapatas, hospederos y patógenos. Los perros podrían funcionar como centinelas de especies de garrapatas circulando en un lugar (Polsomboon et al., 2022) y de esta manera permitirían establecer la circulación de agentes del género *Rickettsia* en una determinada zona.

Cuadro 5.1 Datos del boletín epidemiológico semana 52, años 2017 y 2018. Casos sospechosos a Dengue. Ministerio de Salud, El Salvador

Tipo de prueba	Semana 1-52, Año 2017			Semana 1-52, Año 2018		
	Positivo	Total	% positividad	Positivo	Total	% positividad
PCR	2	44	5	65	110	59
NS1	71	619	11	263	1567	17
IgM	159	757	21	461	1443	32
Total	232	1420	16	789	3120	25

Los resultados generados en esta investigación pretenden proporcionar evidencia de circulación de agentes con potencial zoonótico del género *Rickettsia* en garrapatas provenientes de perros y proveer de información epidemiológica relevante en el control y prevención de esta enfermedad hacia la población salvadoreña.

5.3 Objetivos

- Determinar las especies de *Rickettsia* del grupo de la Fiebre Manchada en garrapatas duras procedentes de perros de El Salvador.
- Estimar las relaciones filogenéticas de las especies de *Rickettsia* identificadas en las garrapatas duras procedentes de perros de El Salvador.
- Elaborar un mapa de distribución de las especies de *Rickettsia* procedentes de perros de El Salvador.

5.4 Hipótesis

Garrapatas duras procedentes de perros de El Salvador, poseen especies de *Rickettsia* potencialmente zoonóticas que representan riesgo en salud pública.

5.5 Materiales y métodos

5.5.1 Toma de muestra

La investigación se desarrolló con garrapatas obtenidas de algunos de los distritos con afectación moderada para arbovirosis ocurridas durante los años 2017 y 2018, que de acuerdo con el boletín epidemiológico del Ministerio de Salud de El Salvador (MINSAL), corresponden entre otros, a los distritos de Metapán (Departamento de Santa Ana), Agua Caliente, Chalatenango, Nueva Concepción, Las Flores, Santa Rita (Departamento de Chalatenango), Apopa, Ilopango y San Marcos (Departamento de San Salvador). El distrito de Santa Tecla fue incorporado al estudio posteriormente, debido a no poder realizarse el muestreo en un municipio originalmente seleccionado; además de ello por la situación de pandemia de COVID-19 se agregó este municipio por la facilidad de acceso. Todas las garrapatas provenían de perros seleccionados por conveniencia, contando con la ayuda del personal de las alcaldías y lugareños representantes de comunidades. Las zonas correspondían a núcleos poblacionales cercanos a áreas de vegetación y presencia de perros que deambulaban libremente en estas áreas. Las garrapatas fueron detectadas por inspección visual y palpación, estas fueron removidas y conservadas en etanol absoluto para posterior análisis molecular en búsqueda de agentes del género *Rickettsia*.

5.5.2 Extracción de ADN desde garrapatas

La extracción de ADN se llevó a cabo para garrapatas adultas, ninfas y larvas con el empleo de Dneasy® Blood and Tissue Kit (Valencia, California). Una garrapata completa o una parte de esta (en el caso de garrapatas ingurgitadas), fue macerada y tratada con proteinasa K durante toda la noche. Posteriormente al completar la lisis, se continuó bajo el seguimiento del protocolo complementario aplicado a garrapatas, de acuerdo con las indicaciones del fabricante. La extracción de ADN se realizó en las instalaciones del laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador.

El ADN extraído fue conservado en congelación a -20°C hasta su procesamiento por la técnica de PCR.

5.5.3 Detección de *Rickettsia* en garrapatas a través de PCR y secuenciación

Para la detección de especies de *Rickettsia*, se seleccionaron las diferentes especies y estadios de garrapatas presentes en cada perro bajo estudio, estas garrapatas fueron procesadas por medio de la técnica de PCR, conforme al procedimiento descrito por Labruna et al. (2004). Se emplearon los cebadores CS-78 5'-gcaagtatcggtaggatgtaat-3' y CS-323 5'-gcttccttaaaattcaataaatcaggat-3', que amplifican un fragmento de 401pb del gen de la proteína citrato sintasa (*gltA*), que está presente en todas las especies de rickettsias. Las muestras positivas a la primera prueba de PCR, fueron posteriormente procesadas por una segunda prueba de PCR de tipo semi-anidado, que en su primer reacción de PCR amplifica un fragmento de 617pb del gen *190-kDa* de la proteína de membrana externa (*ompA*), el cual está presente solamente en las rickettsias del Grupo de la Fiebre Manchada, empleando los cebadores Rr190.70F 5'-atggcgaatatttctccaaaa-3' y Rr190.701F 5'-gttcgtaatggcagcatct-3'; posteriormente los amplificados con resultado negativo fueron sometidos a una segunda reacción de PCR semi anidada con los cebadores Rr190.70F 5'-atggcgaatatttctccaaaa-3' y Rr190.602R 5'-agtgcagcattcgtccccct-3' que amplifican un fragmento de 512pb (Regnery et al., 1991). Las pruebas de PCR fueron llevadas a cabo en las instalaciones del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador y el Laboratorio del Departamento de Medicina Veterinaria Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinaria e Zootecnia de la Universidad de Sao Paulo.

Las reacciones de amplificación consistieron en el uso de 5X FIREPol® Master Mix, el cual se encuentra listo para su uso, bajo los siguientes volúmenes de reacción: 16.5µl de agua grado biología molecular, 4µl de master mix, 1µl de cada cebador y 2.5µl de ADN. El protocolo de amplificación para el gen *gltA* consistió en 95°C por 3 minutos; seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos y 72°C por 1 minuto; finalizando con 72°C por 7 minutos; mientras que para el gen *190-kDa* se utilizó una PCR semi anidada con una primera amplificación bajo el protocolo de temperatura inicial de 95°C por 3 minutos; seguido de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos y 72°C por 45 segundos; finalizando con 72°C por 10 minutos y una segunda amplificación bajo el mismo protocolo, pero con los cebadores correspondientes y empleando 1µl del producto amplificado en la primer PCR como muestra de ADN.

Un control positivo correspondiente al ADN de *Rickettsia vini* fue proporcionado por el Laboratorio del Departamento de Medicina Veterinaria Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de

Medicina Veterinária e Zootecnia de la Universidad de Sao Paulo, para ser incluido en la reacción de PCR con la finalidad de garantizar el correcto funcionamiento de la prueba. *Rickettsia vini* es una especie perteneciente al GFM, presente en Europa y ausente en América, que además permite identificar la producción de falsos positivos debidos a contaminación.

Los productos de PCR correspondientes a los fragmentos *ompA* y *gltA*, fueron purificados a través del reactivo ExoSAP-IT® y secuenciadas utilizando el “kit” comercial BigDye TM Terminator – Cycle Sequencing Ready Reaction – Applied Biosystems. Se empleó un secuenciador de ADN modelo ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems/Perkin Elmer), según el manual de instrucciones, realizando el proceso en las instalaciones del Laboratorio del Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia de la Universidad de Sao Paulo. Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa Bioedit® y sometidas a análisis de similitudes con las secuencias disponibles en el GenBank, a través del programa Basic Local Alignment Search Tool o BLAST (Altschul et al., 1990).

5.5.4 Análisis Filogenético

Las secuencias obtenidas a través de la técnica de PCR para los fragmentos de *ompA* y *gltA*, fueron analizadas con otras secuencias de especies de *Rickettsia* del GFM y una especie del Grupo Transicional (*Rickettsia australis*) disponible en el GenBank, empleando el algoritmo CLUSTAL y ajustado manualmente por GeneDoc. Los árboles filogenéticos fueron inferidos por los métodos Bayesiano y Máxima parsimonia. El alineamiento concatenado (*gltA* + *ompA*) fue analizado por los mismos métodos. Los árboles por el método de Máxima parsimonia fueron construidos utilizando el programa PAUP* v4.0b10 (Swofford 2002) a través de una búsqueda heurística con 100 réplicas de adiciones aleatorias de los terminales, seguido por ramificación (RAS-TBR branch-breaking). El análisis Bootstrap fue realizado en 100 réplicas con los mismos parámetros empleados en la búsqueda. El análisis Bayesiano fue realizado en el programa MRBayes v.3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003); empleando 1,000,000 de generaciones utilizando *Rickettsia asutralis* como un modelo de substitución y cuatro categorías de rangos, más una proporción de sitios invariantes. En el análisis Bayesiano, se obtuvieron valores de probabilidad “posteriori” para verificación de ramas empleando el programa MRBayes. *Rickettsia australis* fue designado como “outgroup”.

5.6 Resultados

Un total de 288 muestras de ADN de garrapatas colectadas desde 230 perros fueron analizadas a través de la técnica molecular de PCR, para detección de especies de *Rickettsia*. De estas, 187 (64.93%) pertenecían al género *Rhipicephalus* y 101 (35.07%) al género *Amblyomma* (Tabla 3).

Mediante la prueba de PCR dirigida al gen *gltA*, se obtuvieron 58 muestras positivas (20.14%), pertenecientes al género *Rickettsia*. De estas muestras, 50 resultaron positivas al gen *ompA* a través de la prueba de PCR semi-anidada. En ocho muestras no fue posible obtener amplificación al gen *ompA* mediante PCR.

Las muestras positivas procedían de diferentes especies de garrapatas: 7 *R. sanguineus* s.l., 36 *A. mixtum*, 12 *A. cf. parvum*, 1 *A. ovale* y 2 ninfas de *Amblyomma* spp. La especie *A. mixtum* mostró el mayor porcentaje de positividad correspondiente a un 90.00% de las garrapatas analizadas de esta especie (36/40), seguido por *A. cf. parvum* con un 50.00% de garrapatas positivas (12/24). Con respecto a la especie *A. ovale* se obtuvo un porcentaje de positividad del 4% (1/25) y para *R. sanguineus* s.l. 3.76% (7/186), finalmente para las fases inmaduras del género *Amblyomma* se obtuvo un 16.67% (2/12) de positividad. De forma general, el porcentaje de positividad del total de garrapatas analizadas corresponde al 20.14% (Cuadro 5.2).

Cuadro 5.2 Porcentaje de positividad a género *Rickettsia* por especie y estadio de garrapata

	Adulto		Ninfa		Larva		N° analizadas	Positivas (%)
	A	P	A	P	A	P		
<i>A. mixtum</i>	17	13	17	17	6	6	40	36 (90.00%)
<i>A. cf. parvum</i>	23	11	1	1	0	0	24	12 (50.00%)
<i>A. ovale</i>	24	1	1	0	0	0	25	1 (4.00%)
<i>R. sanguineus</i> s.l.	170	7	1	0	15	0	186	7 (3.76%)
<i>R. microplus</i>	1	0	0	0	0	0	1	0 (0%)
<i>Amblyomma</i> spp.	0	0	10	2	2	0	12	2 (16.67%)
TOTAL							288	58 (20.14%)

A = Analizadas P = Positivas

En cuanto a distribución de muestras positivas por distrito, en Nueva Concepción se obtuvieron 15 muestras (25.86%) y del municipio de Chalatenango 13 muestras (22.41%), obteniendo entre

ambos distritos un 48.27% del total de garrapatas positivas a *Rickettsia*; seguidos en porcentajes por los distritos de Metapán y Santa Rita con 18.97% y 13.79% respectivamente (Cuadro 5.3). Con respecto a los distritos de Apopa y San José Las Flores, no se evidenció ninguna garrapata positiva. En ambos distritos negativos se colectaron únicamente garrapatas de la especie *R. sanguineus* s.l. (Figura 5.1).

Cuadro 5.3 Distribución de muestras de garrapatas positivas por distrito

Municipio	Positivas		<i>R. sanguineus</i> s.l.	<i>A.</i> <i>mixtum</i>	<i>A. cf.</i> <i>parvum</i>	<i>A.</i> <i>ovale</i>	<i>Amblyomma</i> sp.
	N	%					
Agua Caliente	5	8.62		1	4		
Chalatenango	13	22.41		12			1
Ilopango	3	5.17		1	2		
Metapán	11	18.97	1	10			
Nueva Concepción	15	25.86	4	6	4		1
San Marcos	2	3.45	2				
Santa Rita	8	13.79		6	2		
Santa Tecla	1	1.72				1	
Total	58	100.00	7	36	12	1	2

De las muestras positivas, se obtuvo secuencia bidireccional del gen parcial *gltA* en 55 muestras y del gen parcial *ompA* en 50 muestras, permitiendo el análisis de BLAST de las 58 muestras, identificándose tres especies de *Rickettsia*: *Rickettsia amblyommatis* en 56 muestras, *Rickettsia parkeri* en una muestra y *Rickettsia* spp. en una muestra, todas ellas pertenecientes al GFM. Las secuencias parciales de los genes *gltA* y *ompA* de *Rickettsia amblyommatis* fueron 100% idénticas a las secuencias disponibles en el GenBank (JF694089 y MT712882, respectivamente) y de la misma manera hubo un 100% de identidad para *Rickettsia parkeri* strain Atlantic rainforest con la secuencia disponible en el GenBank (CP040325). Para el caso de *Rickettsia* spp., las secuencias parciales de los genes *gltA* y *ompA* fueron 100% y 99.8% idénticas, respectivamente, a *Rickettsia* sp. ApBA1 (MH445972) y ApBA2 (MH445973) y también fue 100% idéntica a *Rickettsia* sp. Gu263 desde una *Amblyomma auricularium* de Guatemala (JF523328).

Las secuencias del gen *gltA* y *ompA* respectivamente fueron depositadas en el GenBank bajo los siguientes números de acceso: *R. amblyommatis* OP375579, OP375580; *R. parkeri* OP375581, OP375582 y *Rickettsia* sp. ES-A.cf.*parvum* OP375583-OP375584.

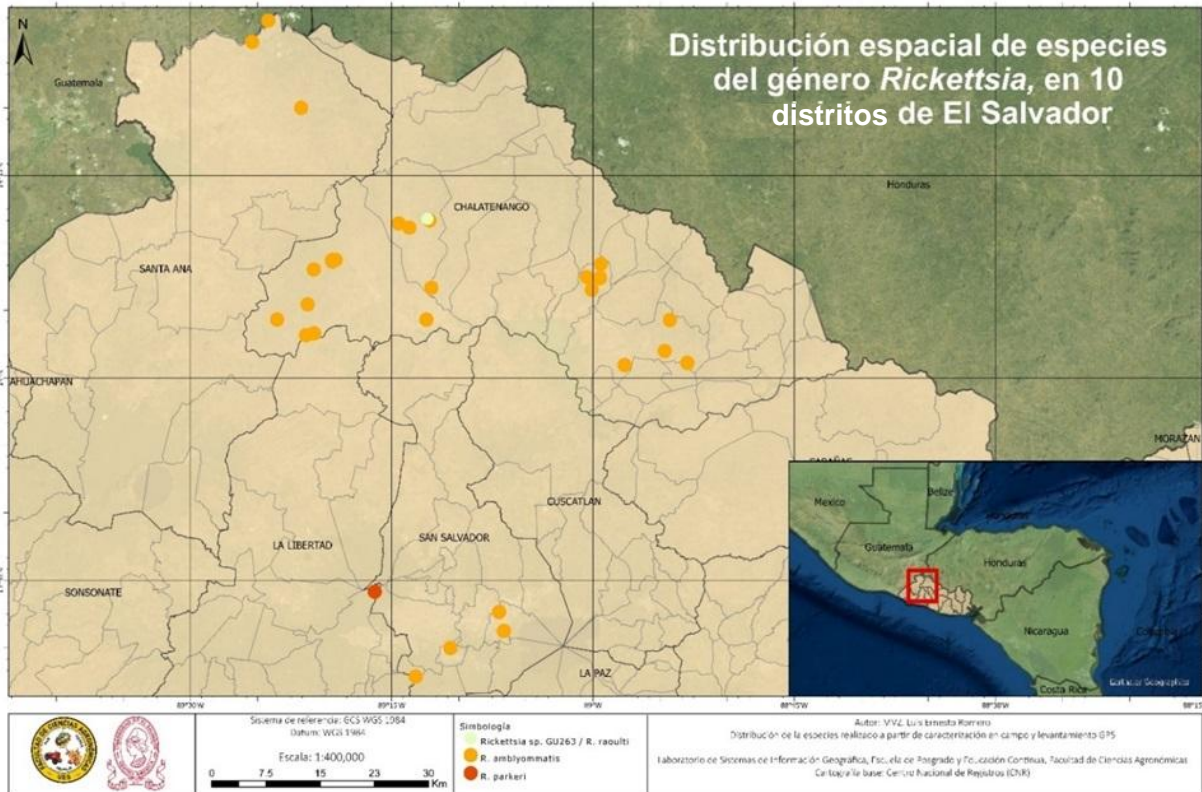


Figura 5.1 Mapa de distribución de especies del género *Rickettsia* encontradas en garrapatas de perros de diez distritos en El Salvador

R. amblyommatis fue identificada en el 96.55% de las muestras positivas a *Rickettsia*, en las especies de garrapatas *R. sanguineus* s.l., *A. cf. parvum*, *A. mixtum* y *Amblyomma* spp., representando la especie de *Rickettsia* más común en garrapatas de perros en los distritos investigados. La especie *Rickettsia parkeri*, se identificó en la única muestra positiva a *Rickettsia* en la especie de garrapata *A. ovale* y es también la única muestra positiva en el distrito de Santa Tecla; mientras que la muestra identificada como *Rickettsia* sp. denominada en este estudio como “*Rickettsia* sp. ES-A.cf.*parvum*”, proviene de una garrapata de la especie *A. cf. parvum* del distrito de Agua Caliente (Cuadro 5.4).

Cuadro 5.4 Identificación de especies de Rickettsia en garrapatas de diez distritos de El Salvador

Distrito	Especie de garrapata	Garrapatas analizadas	N° de positivas	Especie de <i>Rickettsia</i> (N° positivas)
Agua Caliente	<i>A. mixtum</i>	2	1	<i>R. amblyommatis</i> (1)
	<i>A. cf. parvum</i>	13	4	<i>R. amblyommatis</i> (3); <i>Rickettsia</i> sp. ES- <i>A.cf.parvum</i> (1)
	<i>R. sanguineus</i> s.l.	16	0	–
Total		31	5	
Apopa	<i>R. sanguineus</i> s.l.	21	0	–
Total		21	0	
Chalatenango	<i>A. mixtum</i>	12	12	<i>R. amblyommatis</i> (12)
	<i>Amblyomma</i> sp.	4	1	<i>R. amblyommatis</i> (1)
	<i>R. microplus</i>	1	0	–
	<i>R. sanguineus</i> s.l.	18	0	–
Total		35	13	
Ilopango	<i>A. mixtum</i>	1	1	<i>R. amblyommatis</i> (1)
	<i>A. cf. parvum</i>	3	2	<i>R. amblyommatis</i> (2)
	<i>R. sanguineus</i> s.l.	21	0	–
Total		25	3	
Metapán	<i>A. mixtum</i>	12	10	<i>R. amblyommatis</i> (10)
	<i>Amblyomma</i> sp.	2	0	
	<i>R. sanguineus</i> s.l.	20	1	<i>R. amblyommatis</i> (1)
Total		34	11	
Nueva Concepción	<i>A. mixtum</i>	6	6	<i>R. amblyommatis</i> (6)
	<i>Amblyomma</i> sp.	6	1	<i>R. amblyommatis</i> (1)
	<i>A. cf. parvum</i>	4	4	<i>R. amblyommatis</i> (4)
	<i>R. sanguineus</i> s.l.	20	4	<i>R. amblyommatis</i> (4)
Total		37	15	
San José Las Flores	<i>R. sanguineus</i> s.l.	25	0	–
Total		25	0	
San Marcos	<i>A. ovale</i>	10	0	–
	<i>A. cf. parvum</i>	1	0	–
	<i>R. sanguineus</i> s.l.	16	2	<i>R. amblyommatis</i> (2)
Total		27	2	
Santa Rita	<i>A. mixtum</i>	6	6	<i>R. amblyommatis</i> (6)
	<i>A. cf. parvum</i>	3	2	<i>R. amblyommatis</i> (2)
	<i>R. sanguineus</i> s.l.	16	0	–
Total		25	8	
Santa Tecla	<i>A. ovale</i>	15	1	<i>R. parkeri</i> (1)
	<i>R. sanguineus</i> s.l.	13	0	–
Total		28	1	
TOTAL GENERAL		288	58	

El análisis filogenético de las secuencias incluyó un análisis concatenado de los genes parciales secuenciados (longitud total de 961 pb). Las secuencias consenso obtenidas para *R. amblyommatis* y *R. parkeri* strain Atlantic rainforest generadas en este estudio, formaron parte del clado respectivo a sus secuencias conespecíficas, confirmando sus identidades taxonómicas; mientras que para *Rickettsia* sp. ES-A.cf.*parvum*, conformó un clado distinto junto a *Rickettsia* sp. ApBA A. *parvum* de Brazil, muy relacionado al clado *R. amblyommatis* (Figura 5.2).

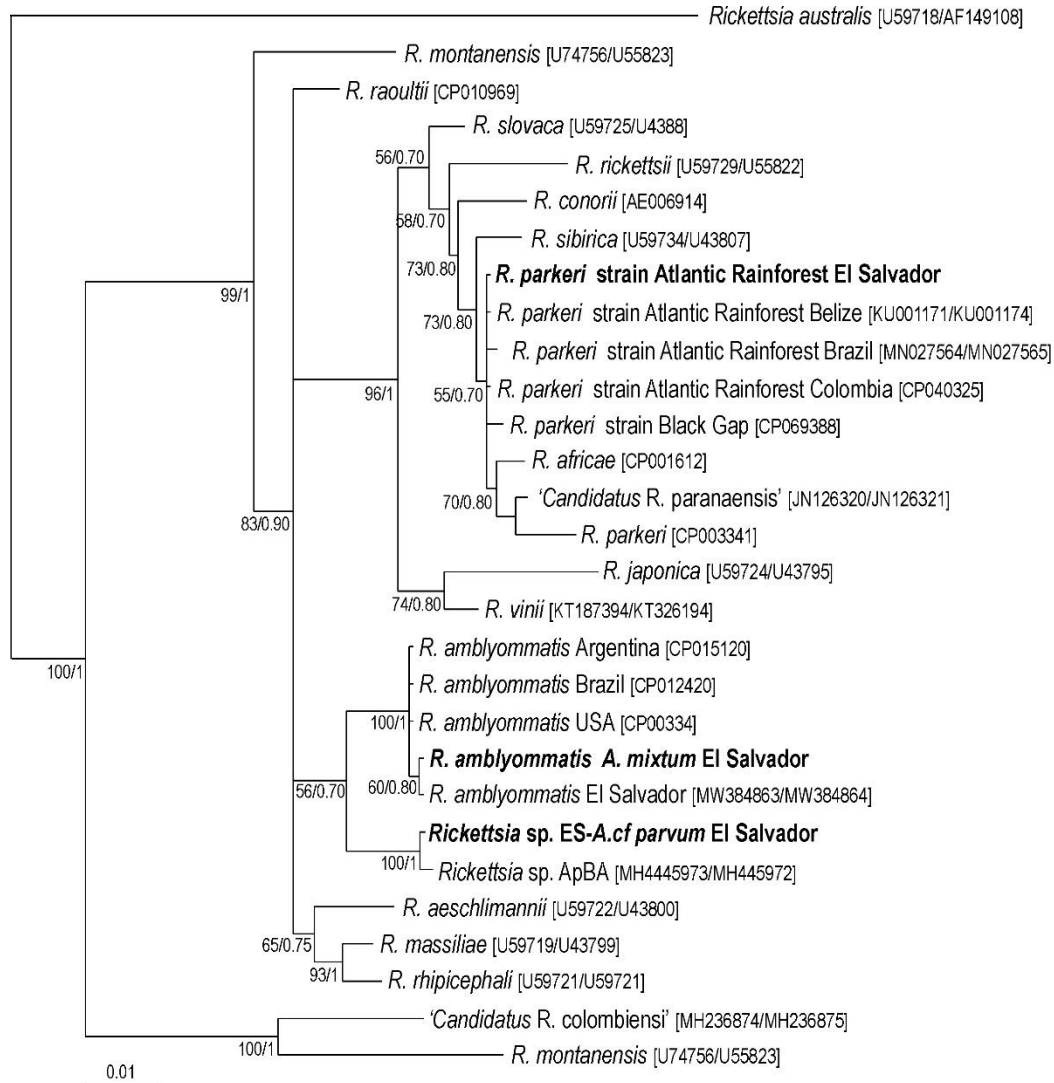


Figura 5.2 Análisis filogenético molecular de especies de Rickettsia GFM en garrapatas de perros de El Salvador

Un total de 961 nucleótidos (136 variables) provenientes de los genes concatenados *gltA* y *ompA*, analizados a través de inferencia de Máxima Parsimonia. Los valores Bootstrap se muestran en los nodos. Los números de acceso al GenBank de las secuencias incluidas para este análisis se muestran en corchetes. Los agentes detectados para El Salvador en el presente estudio se muestran remarcados.

Con relación a los 230 perros incorporados en el estudio, 48 de ellos; es decir, el 20.87% se encontraron infestados de garrapatas positivas a una especie de *Rickettsia*. El mayor porcentaje de perros afectados se evidenció en el distrito de Nueva Concepción, con muestras procedentes de 14 perros de 23 que ingresaron al estudio, lo cual indica un 60.87% de perros parasitados con garrapatas positivas a *Rickettsia*. Otros dos distritos con elevado porcentaje de perros afectados fueron Chalatenango y Santa Rita con más de 1/3 de animales parasitados con garrapatas positivas a *Rickettsia* (Cuadro 5.5).

Cuadro 5.5 Número y porcentaje de perros por distrito parasitados con garrapatas positivas a *Rickettsia*

Distrito	N° de perros	Perros infestados con garrapatas positivas	
		n	%
Agua Caliente	22	5	22.73
Apopa	21	0	0.00
Chalatenango	23	9	39.13
Ilopango	23	3	13.04
Metapán	25	7	28.00
Nueva Concepción	23	14	60.87
San José Las Flores	25	0	0.00
San Marcos	24	2	8.33
Santa Rita	21	7	33.33
Santa Tecla	23	1	4.35
TOTAL	230	48	20.87

5.7 Discusión

A pesar de que la especie de garrapata más abundante fue *R. sanguineus* s.l., el porcentaje de rickettsemia en esta especie fue del 3.76% (7/186); mientras que, para el género *Amblyomma*, el porcentaje fue del 50% (51/102). Esta diferencia en los porcentajes de positividad a especies del género *Rickettsia*, en los géneros más comunes de garrapatas de América Central, ha sido observado previamente con estudios que reportan una baja rickettsemia en la garrapata *R. sanguineus* s.l. con porcentajes del 1.3% en Costa Rica y 3.4% en Panamá (Troyo et al 2016; Bermúdez et al., 2016); sin embargo, se ha propuesto que los porcentajes pueden verse influidos por variación local y presencia de focos hiperendémicos, provocando resultados elevados como se

ha observado en Mexicali, México con resultados de hasta 30% (Springer et al., 2018). La situación para el género *Amblyomma* es contraria al género *Rhipicephalus* con porcentajes mucho más elevados en las diferentes especies (Trovo et al., 2016; Springer et al., 2018).

Con respecto a las especies identificadas del género *Rickettsia*, el alto porcentaje de muestras positivas a *R. amblyommatis* en esta investigación, concuerda con reportes en América donde, dependiendo de la especie de garrapata, el porcentaje de infestación varía entre 25% al 100% (Bermúdez et al., 2021^a). Esta especie endosimbionte es la más común en América Central, identificada en al menos 12 especies de garrapatas que incluyen *A. mixtum*, *A. ovale*, *R. sanguineus* s.l. y *A. cf. parvum* (Charles et al., 2021; Romero et al., 2021). Su presencia ha resultado muy baja en las garrapatas *A. ovale* y *R. sanguineus* s.l. pero alto en *A. mixtum* de Costa Rica y Panamá con porcentaje de hasta el 91% (Trovo et al., 2016; Bermúdez et al., 2021b). En El Salvador, también se ha observado previamente altos porcentajes con un 77% para *A. mixtum*, 50% para *A. cf. parvum* y 11% de ninfas de *Amblyomma* spp. y representó 2/3 de las especies de *Rickettsia* en garrapatas positivas, provenientes de diferentes tipos de hospederos (Romero et al., 2021).

El mantenimiento de esta especie en la naturaleza puede deberse a su alta capacidad de transmisión vía transovárica, que en la garrapata *Amblyomma americanum*, se ha demostrado entre el 96% - 100% (Levin et al., 2017). Sin embargo, se ha demostrado que su epidemiología es influida por la especie de garrapata a la que infecte; por ejemplo, se puede transmitir transestadial y vía transovárica en la garrapata *Amblyomma cajenense sensu stricto* (s.s.), pero no tiene capacidad de invadir glándulas salivales de la garrapata, por lo tanto, no se transmite al hospedero de la garrapata (no es un vector competente); distinto a lo observado para *A. auricularium* en donde la garrapata si puede transmitir la *Rickettsia* a su hospedero (Benatti et al., 2020).

A pesar de su abundancia en la región, no existe reportes de afectación en humanos, pero algunos autores advierten la posibilidad de esta *Rickettsia* en causar enfermedad. En este sentido, se ha evidenciado la capacidad de producir altos títulos de serología en perros (Panamá y Costa Rica) y enfermedad en cobayos (diseminándose desde su punto de inoculación hacia otros tejidos); además se ha observado títulos elevados en sueros pareados de personas con enfermedad sospechosa a rickettsiosis en Carolina del Norte (Apperson et al., 2008; Levin et al., 2017). Adicionalmente a ello, estudios en una cepa de esta *Rickettsia* aislada desde una *A. americanum* de Georgia, Estados Unidos, demostró que esta especie posee numerosos genes de virulencia caracterizados como responsables de la patogénesis de la Fiebre Manchada con 86% - 95% de identidad de aminoácidos,

al comparar con *R. rickettsii* y *R. conorii*. En el estudio se observó que, comparado a las especies patógenas, esta *Rickettsia* se replica más lento y presenta dificultad en su adhesión a células endoteliales, causando en ellas un mínimo daño en cultivo celular, pero aun así fue capaz de causar leve enfermedad en ratones, aunque en dosis mayores a las reportadas para especies de *Rickettsia* más patógenas. Los autores concluyen que *R. amblyommatis*, puede causar una enfermedad febril moderada autolimitante en humanos y otros animales, presentando un posible mayor riesgo en personas con inmunidad inmadura o comprometida; sin embargo, hasta el momento no existe ningún aislamiento de esta *Rickettsia* desde personas (Yen et al., 2021).

Un aspecto de relevancia hacia *R. amblyommatis* es la hipótesis en su capacidad de modular la epidemiología de otras especies del GFM. Se propuso que, debido a poseer una transmisión eficiente de forma transovárica en garrapatas, impide que otras especies de *Rickettsia* del GFM puedan transmitirse por esta vía; a pesar de ello, un estudio evaluando este proceso, demostró que *R. amblyommatis* no disminuye significativamente la transmisión por esta vía de *R. rickettsii* en la garrapata *A. americanum*, pero si disminuye un poco la transmisión de forma transestadial (Levin et al., 2017). Otro aspecto, observado en diferentes estudios, es que cobayos inoculados con *R. amblyommatis* no desarrollaron signos de enfermedad o desarrollaron signos leves cuando se les expone a *R. rickettsii*, aún en dosis letales, por lo que hace suponer la producción de inmunidad parcial (Blanton et al., 2014; Levin et al., 2017; Benatti et al., 2020). Más estudios son requeridos para establecer el verdadero impacto de *R. amblyommatis* y su relación con otras especies del GFM.

Con respecto a la especie *R. parkeri*, ésta es considerada como un patógeno emergente en América, su importancia incrementó luego del reporte en el 2004, de infección en humano en Estados Unidos (Paddock et al., 2004). Se ha propuesto la existencia de al menos cuatro cepas, de las cuales *R. parkeri* Atlantic rainforest y *R. parkeri* s.s., son patógenas al ser humano con reportes en Estados Unidos, Brasil, Argentina, Colombia y Uruguay (Torres-Chable et al., 2020; Weck et al., 2020; Arboleda et al., 2020). En América Central, se ha reportado únicamente en Belice desde *A. maculatum* procedente de perros y *A. ovale* procedente de puma, jaguar y perros, sin asociación con enfermedad en humanos (Lopes et al., 2016; Polsomboon et al., 2017; Polsomboon et al., 2022). En un estudio en Nicaragua se reporta a *R. africae* en la garrapata *A. ovale* de perros de una reserva ecológica y se ha propuesto una incorrecta identificación que realmente corresponde a *R. parkeri* (Krawczak & Labruna 2018). Otros países de la región con reportes de esta *Rickettsia* en

garrapatas corresponden a México en *A. maculatum* y *A. ovale*, Colombia en *A. ovale* y Bolivia en *Amblyomma tigrinum* sin que hasta el momento en estos países se haya identificado casos en humanos (Londoño et al., 2014; Tomassone et al., 2010; Torres-Chable et al., 2020). Debido a su capacidad de causar enfermedad en humanos, *R. parkeri* se ha posicionado como la especie de *Rickettsia* más importante en Uruguay y la segunda más relevante en Estados Unidos, Brasil y Argentina (Acosta et al., 2018). Entre las garrapatas involucradas en la transmisión hacia el ser humano se considera al complejo de especies *A. maculatum* (que comprende a tres especies *A. maculatum* en Norte América, junto a *Amblyomma triste* y *A. tigrinum* en Sur América), portando a *R. parkeri* s.s. y, además, la especie *A. ovale* de Brasil portando *R. parkeri* Atlantic rainforest (Weck et al., 2020). El porcentaje de prevalencia en garrapatas varía considerablemente, con reportes desde el 50% en *A. maculatum* (analizadas en grupos) de México (Torres-Chable et al., 2020), hasta 0.7% y 0.8% en *A. ovale* y *Amblyomma aureolatum* de Brasil, respectivamente (Faccini-Martínez et al., 2020).

En cuanto a su relación con animales vertebrados, se ha evidenciado infección y serología positiva a *R. parkeri* en perros y, aunque parece no afectarles, se ha propuesto la importancia de este animal como reservorio del agente, así también su función como medio de transporte de garrapatas infectadas hacia ambientes domésticos, donde pueden tomar contacto con el ser humano (Grasperge et al., 2012; Torres-Chable et al., 2020; Weck et al., 2020). En Brasil se ha observado porcentajes de seropositividad a *R. parkeri* en perros que varía del 11% hasta el 67% (Poubel et al., 2018; Faccini-Martínez et al., 2019; Weck et al., 2020). También en Brasil, se ha propuesto a la rata de arroz *Euryoryzomys russatus* (principal transmisor en Brasil de esta *Rickettsia*) como posible amplificador de *R. parkeri*, ya que en la garrapata *A. ovale* se ha observado una baja tasa de replicación de la bacteria, por lo que se ha considerado la participación de vertebrados amplificadores en las fases inmaduras de la garrapata. Se demostró, en la rata de arroz, que ésta podía adquirir y transmitir *R. parkeri* desde *A. ovale*, y que larvas alimentadas en ratas infectadas poseían infección hasta en el 60% al mudar a su fase de ninfa (Krawczak & Labruna, 2018).

Como enfermedad en humanos, *R. parkeri* genera síntomas inespecíficos de leves a moderados que incluyen fiebre y dolor de cabeza que vuelven difícil su diagnóstico, esta *Rickettsia*, además produce en el 90% de los casos, en el sitio de picadura de la garrapata, una escara y su presencia se asocia a una infección con este agente (Torres-Chable et al., 2020). Reller et al. (2016) indica que en América Central existe sospecha de afectación en humanos, con el reporte de incremento

de ocho veces en anticuerpos IgG a *R. parkeri* en una persona de Nicaragua, a través de la técnica de Inmunofluorescencia y también se describe la presencia de síntomas compatibles con los causados por *R. parkeri* en una persona que retornó a Estados Unidos luego de un viaje a Roatán, Honduras con reporte de picadura de garrapata y enfermedad febril.

La presente investigación, describe la primera detección molecular de *R. parkeri* para El Salvador en una garrapata *A. ovale* procedente del Municipio de Santa Tecla, en el Volcán de San Salvador. Su presencia en la garrapata *A. ovale* concuerda con lo reportado en Belice y otros países de la región como México y Brasil, y expone un riesgo potencial de transmisión hacia el ser humano, al poseer en su fase adulta hábitos antropofílicos, ya que fácilmente se adhiere y alimenta de perros que ingresan a su hábitat, del cual puede soltarse y posteriormente alimentarse de un ser humano, o este puede adquirir la garrapata al entrar a su hábitat. En Belice, un estudio sugiere que el perro puede actuar como un posible reservorio de *R. parkeri* y podría representar utilidad como centinela a este agente (Polsomboon et al., 2022). *A. ovale* es considerada como una de las garrapatas más importantes en picar a humanos en la región Neotropical y además como el más importante vector de *R. parkeri* (Lopes et al., 2016; Krawczak & Labruna 2018; Faccini-Martínez et al., 2019).

Finalmente, se realizó la detección de una *Rickettsia* en la garrapata *A. cf. parvum*, muy relacionada al clado *R. amblyommatis*, denominada en esta investigación como *Rickettsia* sp. ES-A.cf.parvum, que resultó 99.8 – 100% idéntica a especies de Brasil y Guatemala, lo que sugiere conespecificidad de estos agentes y asociación a la especie de garrapata *A. parvum* sensu lato. El rol de esta especie como patógeno humano o animal necesita de investigación.

5.8 Conclusiones

Los hallazgos suponen una asociación primaria de *R. amblyommatis* con *A. mixtum* en América Central, similar a lo observado con *Amblyomma americanum* en los Estados Unidos. Una asociación similar se observa para la especie de garrapata *A. cf. parvum*.

Esta investigación demuestra que garrapatas de perros en El Salvador se encuentran infectadas con agentes rickettsiales del GFM, incluyendo al patógeno humano *R. parkeri*. En tal sentido, las rickettsiosis deberían ser incluidas como diagnóstico diferencial en enfermedad febril en la población salvadoreña.

5.9 Referencias

- Acosta, I., Luz, H. R., Faccini-Martínez, Á. A., Muñoz-Leal, S., Cerutti Junior, C., & Labruna, M. B. (2018). First molecular detection of Rickettsia sp. Strain Atlantic rainforest in Amblyomma ovale ticks from Espírito Santo state, Brazil. *Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology: Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, 27(3), 420–422. <https://doi.org/10.1590/s1984-296120180017>
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Álvarez-Hernández, G., Roldán, J., Milan, N., Lash, R. R., Behravesh, C. B., & Paddock, C. D. (2017). Rocky Mountain spotted fever in Mexico: past, present, and future. *The Lancet. Infectious diseases*, 17(6), e189–e196. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30173-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30173-1)
- Apperson, C. S., Engber, B., Nicholson, W. L., Mead, D. G., Engel, J., Yabsley, M. J., Dail, K., Johnson, J., & Watson, D. W. (2008). Tick-borne diseases in North Carolina: is “Rickettsia amblyommii” a possible cause of rickettsiosis reported as Rocky Mountain spotted fever?. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, 8(5), 597–606. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0271>
- Arboleda, M., Acevedo-Gutiérrez, L. Y., Ávila, A., Ospina, D., Díaz, F. J., Walker, D. H., & Rodas, J. D. (2020). Human Rickettsiosis Caused by Rickettsia parkeri Strain Atlantic Rainforest, Urabá, Colombia. *Emerging infectious diseases*, 26(12), 3048–3050. <https://doi.org/10.3201/eid2612.200388>
- Argüello, A. P., Hun, L., Rivera, P., & Taylor, L. (2012). A fatal urban case of rocky mountain spotted fever presenting an eschar in San Jose, Costa Rica. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 87(2), 345–348. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0153>

- Benatti, H. R., Binder, L. C., Costa, F. B., Soares, H. S., Luz, H. R., & Labruna, M. B. (2020). Maintenance of the infection by *Rickettsia amblyommatis* in *Amblyomma cajennense* sensu stricto ticks and evaluation of vector competence. *Experimental & applied acarology*, 82(1), 151–159. <https://doi.org/10.1007/s10493-020-00537-8>
- Barbieri, A. R., Romero, L., & Labruna, M. B. (2012). *Rickettsia bellii* infecting *Amblyomma sabanerae* ticks in El Salvador. *Pathogens and global health*, 106(3), 188–189. <https://doi.org/10.1179/2047773212Y.0000000022>
- Bermúdez, S. E., Castro, A. M., Trejos, D., García, G. G., Gabster, A., Miranda, R. J., Zaldívar, Y., & Paternina, L. E. (2016). Distribution of Spotted Fever Group *Rickettsiae* in Hard Ticks (Ixodida: Ixodidae) from Panamanian Urban and Rural Environments (2007-2013). *EcoHealth*, 13(2), 274–284. <https://doi.org/10.1007/s10393-016-1118-8>
- Bermúdez, C. S. E., & Troyo, A. (2018). A review of the genus *Rickettsia* in Central America. *Research and reports in tropical medicine*, 9, 103–112. <https://doi.org/10.2147/RRTM.S160951>
- Bermúdez C, S., Zaldívar, Y., Domínguez A, L., Hernández, M., de Antinori, M. E. B., & Krawczak, F. S. (2021a). *Rickettsia amblyommatis* isolated from *Amblyomma mixtum* (Acari: Ixodida) from two sites in Panama. *Ticks and tick-borne diseases*, 12(1), 101597. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101597>
- Bermúdez, S., Martínez-Mandiche, J., Domínguez, L., Gonzalez, C., Chavarria, O., Moreno, A., Góndola, J., Correa, N., Rodríguez, I., Castillo, B., Smith, D., & Martínez, A. A. (2021b). Diversity of *Rickettsia* in ticks collected from wild animals in Panama. *Ticks and tick-borne diseases*, 12(4), 101723. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101723>
- Blanton, L. S., Mendell, N. L., Walker, D. H., & Bouyer, D. H. (2014). “*Rickettsia amblyommii*” induces cross protection against lethal Rocky Mountain spotted fever in a guinea pig model. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, 14(8), 557–562. <https://doi.org/10.1089/vbz.2014.1575>
- Charles, R. A., Bermúdez, S., Banović, P., Alvarez, D. O., Díaz-Sánchez, A. A., Corona-González, B., Etter, E., Rodríguez González, I., Ghafar, A., Jabbar, A., Moutailler, S., & Cabezas-Cruz, A. (2021). Ticks and Tick-Borne Diseases in Central America and the

- Caribbean: A One Health Perspective. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(10), 1273. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101273>
- Chen, L. H., & Wilson, M. E. (2009). Tick-borne rickettsiosis in traveler returning from Honduras. *Emerging infectious diseases*, 15(8), 1321–1323. <https://doi.org/10.3201/eid1508.090172>
- Dye-Braumuller, K. C., Aquino, M. S. R., Zellars, K., Waltz, H., Meyer, M., Gual-Gonzalez, L., Self, S. C. W., Kanyangarara, M., & Nolan, M. S. (2022). Antibody Prevalence and Risk Factors Associated with *Rickettsia* spp. in a Pediatric Cohort: SFGR Remains Underdiagnosed and Underreported in El Salvador. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 11(11), 1241. <https://doi.org/10.3390/pathogens11111241>
- Faccini, J., Luz, H. R., McIntosh, D., & Labruna, M. B. (2020). Tick-borne rickettsioses in Brazil: what lessons can be learned from the COVID-19 pandemic. *Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology: Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, 29(3), e012220. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612020056>
- Faccini-Martínez, Á. A., Muñoz-Leal, S., Krawczak, F. S., Acosta, I., Martins, T. F., Serpa, M., Barbieri, A., Tovar, J. R., Cerutti Junior, C., & Labruna, M. B. (2020). Epidemiological aspects of *Rickettsia parkeri* in the Atlantic forest biome of Espírito Santo state, Brazil. *Ticks and tick-borne diseases*, 11(2), 101319. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101319>
- Global surveillance of rickettsial diseases: memorandum from a WHO meeting. (1993). *Bulletin of the World Health Organization*, 71(3-4), 293–296. <https://iris.who.int/handle/10665/261674>
- Grasperge, B. J., Wolfson, W., & Macaluso, K. R. (2012). *Rickettsia parkeri* infection in domestic dogs, Southern Louisiana, USA, 2011. *Emerging infectious diseases*, 18(6), 995–997. <https://doi.org/10.3201/eid1806.120165>
- Hun, L., Cortés, X., & Taylor, L. (2008). Molecular characterization of *Rickettsia rickettsii* isolated from human clinical samples and from the rabbit tick *Haemaphysalis leporispalustris* collected at different geographic zones in Costa Rica. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 79(6), 899–902.

- Hun, L. (2013). Rickettsiosis en Costa Rica. *Acta Médica Costarricense*, 55, 25-28.
- Krawczak, F. S., & Labruna, M. B. (2018). The rice rat *Euryoryzomys russatus*, a competent amplifying host of *Rickettsia parkeri* strain Atlantic rainforest for the tick *Amblyomma ovale*. *Ticks and tick-borne diseases*, 9(5), 1133–1136. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.04.013>
- Labruna, M.B., Whitworth, T., Horta, M.C., Bouyer, D.H., McBride, J.W., Pinter, A., Popov, V., Gennari, S.M., Walker, D.H., 2004. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *J. Clin. Microbiol.* 42, 90–98. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.1.90-98.2004>
- Labruna, M.B., Mattar, S., Nava, S., Bermúdez, S., Venzal, J.M., Dolz, G., Abarca, K., Romero, L., de Sousa, R., Oteo, J. & Zavala-Castro, J. (2011). Rickettsiosis en América Latina, el Caribe, España y Portugal. *Rev. MVZ Córdoba*, 16, 2435-2457.
- Levin, M. L., Zemtsova, G. E., Killmaster, L. F., Snellgrove, A., & Schumacher, L. (2017). Vector competence of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) for *Rickettsia rickettsii*. *Ticks and tick-borne diseases*, 8(4), 615–622. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.04.006>
- Londoño, A. F., Díaz, F. J., Valbuena, G., Gazi, M., Labruna, M. B., Hidalgo, M., Mattar, S., Contreras, V., & Rodas, J. D. (2014). Infection of *Amblyomma ovale* by *Rickettsia* sp. Strain Atlantic rainforest, Colombia. *Ticks and tick-borne diseases*, 5(6), 672–675. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.04.018>
- Lopes, M. G., May Junior, J., Foster, R. J., Harmsen, B. J., Sanchez, E., Martins, T. F., Quigley, H., Marcili, A., & Labruna, M. B. (2016). Ticks and rickettsiae from wildlife in Belize, Central America. *Parasites & vectors*, 9, 62. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1348-1>
- Martínez-Caballero, A., Moreno, B., González, C., Martínez, G., Adames, M., Pachar, J. V., Varela-Petrucci, J. B., Martínez-Mandiche, J., Suárez, J. A., Domínguez, L., Zaldívar, Y., & Bermúdez, S. (2018). Descriptions of two new cases of Rocky Mountain spotted fever in Panama, and coincident infection with *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus sanguineus* s.l. in an urban locality of Panama City, Panama. *Epidemiology and infection*, 146(7), 875–878. <https://doi.org/10.1017/S0950268818000730>
- MINSAL. (2023^a). Boletines epidemiológicos 2017. URL <https://www.salud.gob.sv/boletines->

- [epidemiologicos-2017/](#)
- MINSAL. (2023b). Boletines epidemiológicos 2018. URL <https://www.salud.gob.sv/boletines-epidemiologicos-2018/>
- OPS. (2004). Consulta OPS/OMS de expertos sobre rickettsiosis en las Américas. Minas Gerais, Brasil. URL http://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=informes-reuniones-803&alias=75-reunion-rickettsiosis-5&Itemid=518
- Paddock, C. D., Sumner, J. W., Comer, J. A., Zaki, S. R., Goldsmith, C. S., Goddard, J., McLellan, S. L., Tamminga, C. L., & Ohl, C. A. (2004). Rickettsia parkeri: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. *Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 38(6), 805–811. <https://doi.org/10.1086/381894>
- Parola, P., Paddock, C. D., Socolovschi, C., Labruna, M. B., Mediannikov, O., Kernif, T., Abdad, M. Y., Stenos, J., Bitam, I., Fournier, P. E., & Raoult, D. (2013). Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clinical microbiology reviews*, 26(4), 657–702. <https://doi.org/10.1128/CMR.00032-13>
- Peniche-Lara, G., Jimenez-Delgadillo, B., & Dzul-Rosado, K. (2015). Rickettsia rickettsii and Rickettsia felis infection in Rhipicephalus sanguineus ticks and Ctenocephalides felis fleas co-existing in a small city in Yucatan, Mexico. *Journal of vector ecology: journal of the Society for Vector Ecology*, 40(2), 422–424. <https://doi.org/10.1111/jvec.12185>
- Piranda, E. M., Faccini, J. L., Pinter, A., Pacheco, R. C., Cançado, P. H., & Labruna, M. B. (2011). Experimental infection of Rhipicephalus sanguineus ticks with the bacterium Rickettsia rickettsii, using experimentally infected dogs. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, 11(1), 29–36. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0250>
- Polsomboon, S., Hoel, D. F., Murphy, J. R., Linton, Y. M., Motoki, M., Robbins, R. G., Bautista, K., Bricen O, I., Achee, N. L., Grieco, J. P., Ching, W. M., & Chao, C. C. (2017). Molecular Detection and Identification of Rickettsia Species in Ticks (Acari: Ixodidae) Collected From Belize, Central America. *Journal of medical entomology*, 54(6), 1718–1726. <https://doi.org/10.1093/jme/tjx141>

- Polsomboon Nelson, S., Bourke, B. P., Badr, R., Tarpey, J., Caicedo-Quiroga, L., Leiva, D., Pott, M., Cruz, A., Chao, C. C., Achee, N. L., Grieco, J. P., Jiang, L., Jiang, J., Farris, C. M., & Linton, Y. M. (2022). Ticks (Acari: Ixodidae) and Associated Pathogens Collected From Domestic Animals and Vegetation in Stann Creek District, Southeastern Belize, Central America. *Journal of medical entomology*, 59(5), 1749–1755. <https://doi.org/10.1093/jme/tjac112>
- Poubel, I.T., Cunha, N.C., Fonseca, A.B.M., Pinter, A., Fonseca, A.H., Cordeiro, M.D., Almosny, N.R.P. (2018). Seroprevalence of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia parkeri* in dogs during a Brazilian Spotted Fever outbreak in the State of Rio de Janeiro. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 70(3), 667–674. <https://doi.org/10.1590/1678-4162-9081>
- Regnery, R. L., Spruill, C. L., & Plikaytis, B. D. (1991). Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *Journal of bacteriology*, 173(5), 1576–1589. <https://doi.org/10.1128/jb.173.5.1576-1589.1991>
- Reller, M. E., Chikeka, I., Miles, J. J., Dumler, J. S., Woods, C. W., Mayorga, O., & Matute, A. J. (2016). First Identification and Description of Rickettsioses and Q Fever as Causes of Acute Febrile Illness in Nicaragua. *PloS neglected tropical diseases*, 10(12), e0005185. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005185>
- Romero, L., Costa, F. B., & Labruna, M. B. (2021). Ticks and tick-borne *Rickettsia* in El Salvador. *Experimental & applied acarology*, 83(4), 545–554. <https://doi.org/10.1007/s10493-021-00610-w>
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574. <http://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg180>.
- Springer, A., Montenegro, V. M., Schicht, S., Wölfel, S., Schaper, S. R., Chitimia-Dobler, L., Siebert, S., & Strube, C. (2018). Detection of *Rickettsia monacensis* and *Rickettsia amblyommatis* in ticks collected from dogs in Costa Rica and Nicaragua. *Ticks and tick-borne diseases*, 9(6), 1565–1572. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.08.002>

- Swofford, D. L. 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), version 4b10. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Tomassone, L., Conte, V., Parrilla, G., & De Meneghi, D. (2010). Rickettsia infection in dogs and Rickettsia parkeri in Amblyomma tigrinum ticks, Cochabamba Department, Bolivia. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, 10(10), 953–958. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0126>
- Torres-Chable, O. M., Jimenez-Delgadillo, B. G., Alvarado-Kantún, Y. N., Zaragoza-Vera, C. V., Arjona-Jimenez, G., Zaragoza-Vera, M., Baak-Baak, C. M., Cigarroa-Toledo, N., Brito-Argaez, L. G., Machain-Williams, C., & Garcia-Rejon, J. E. (2020). Rickettsia parkeri (Rickettsiales: Rickettsiaceae) detected in Amblyomma maculatum ticks collected on dogs in Tabasco, Mexico. *Experimental & applied acarology*, 82(3), 431–440. <https://doi.org/10.1007/s10493-020-00524-z>
- Troyo, A., Moreira-Soto, R. D., Calderon-Arguedas, Ó., Mata-Somarribas, C., Ortiz-Tello, J., Barbieri, A. R., Avendaño, A., Vargas-Castro, L. E., Labruna, M. B., Hun, L., & Taylor, L. (2016). Detection of rickettsiae in fleas and ticks from areas of Costa Rica with history of spotted fever group rickettsioses. *Ticks and tick-borne diseases*, 7(6), 1128–1134. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.08.009>
- Weck, B., Krawczak, F. S., Costa, F. B., Dall’Agnol, B., Marcili, A., Reck, J., & Labruna, M. B. (2020). Rickettsia parkeri in the Pampa biome of southern Brazil: Isolation, molecular characterization, and serological evidence of canine infection. *Veterinary parasitology, regional studies and reports*, 22, 100448. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2020.100448>
- Yen, W. Y., Stern, K., Mishra, S., Helminiak, L., Sanchez-Vicente, S., & Kim, H. K. (2021). Virulence potential of Rickettsia amblyommatis for spotted fever pathogenesis in mice. *Pathogens and disease*, 79(5), ftab024. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftab024>

6 CAPÍTULO 3. REGISTRO DE GARRAPATAS Y RICKETTSIAS PROVENIENTES DE MEDIO AMBIENTE Y ANIMALES DE VIDA SILVESTRE

Re-editado a partir de:

Romero, L. E., Alvarenga, F., Binder, L. C., Serpa, M. C. A., Muñoz-Leal, S., & Labruna, M. B. (2024). New records of ticks (Acari: Ixodida) and *Rickettsia* species in El Salvador. *Experimental and Applied Acarology*, 94(1):19. <https://doi.org/10.1007/s10493-024-00988-3>

6.1 Resumen

La diversidad de ectoparásitos y su interrelación con hospederos vertebrados y microorganismos, como especies de *Rickettsia*, representan interés en los ecosistemas silvestres, debido al acercamiento de seres humanos y de animales que deambulan entre los núcleos poblacionales y estos ecosistemas.

Durante el período del año 2019 al 2021 se colectaron garrapatas desde medio ambiente, animales domésticos y vida silvestres de El Salvador. El análisis morfológico y molecular determinó la presencia de diez especies de garrapatas de la familia Ixodidae: *Amblyomma dissimile*, *Amblyomma longirostre*, *Amblyomma mixtum*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma* cf. *parvum*, *Amblyomma sabanerae*, *Amblyomma scutatum*, *Dermacentor panamensis*, *Ixodes* cf. *boliviensis*, *Ixodes* sp. y dos especies de garrapatas de la familia Argasidae: *Ornithodoros puertoricensis* y *Otobius megnini*. Además, se logró la identificación de tres especies de *Rickettsia*: *Rickettsia rhipicephali*, *Rickettsia* endosymbiont of *Ixodes boliviensis* y *Rickettsia amblyommatis*.

El análisis de secuencias determinó 100% de similitud con las respectivas secuencias disponibles en el GenBank, para la mayoría de las garrapatas y las tres especies de *Rickettsia*; confirmando la identificación morfológica y molecular de estas especies. Para las especies de garrapatas *Ixodes* sp. y *D. panamensis*. no se encontró una secuencia de comparación disponible; mientras que, para la garrapata *I. cf boliviensis*, se observa un polimorfismo genético.

El presente hallazgo se convierte en el primer registro para El Salvador de las especies de garrapatas *A. longirostre*, *I. cf boliviensis*, *Ixodes* sp., *D. panamensis*, *O. puertoricensis* y *O. megnini* además de las especies de *Rickettsia*, *Rickettsia rhipicephali* y *Rickettsia* endosymbiont of *Ixodes boliviensis*.

6.2 Introducción

Las garrapatas son ectoparásitos con piezas bucales especializadas para alimentarse de sangre, poseen la capacidad de parasitar casi todos los grupos de vertebrados terrestres en todo el mundo (Beati and Klompen 2019). En la región Neotropical, al menos 87 especies de garrapatas blandas (Argasidae) y 137 especies de garrapatas duras (Ixodidae) han sido identificadas (Barros-Battesti et al. 2013; Guglielmone et al. 2021). Los países de América Central poseen una amplia fauna de garrapatas, que hasta el año 2021 contaba con alrededor de 80 especies (entre blandas y duras). Esta cantidad es considerable, tomando en consideración su extensión territorial de aproximadamente 522,000Km² y comparada a países como Brasil, que hasta 2019 se reportó al menos 70 especies de garrapatas pertenecientes a 47 especies de la familia Ixodidae y 23 de la familia Argasidae (Dantas-Torres et al., 2019). En América Central, Costa Rica es el país que posee el reporte de mayor cantidad de garrapatas duras con al menos 40 especies, seguido de Panamá con 39 especies (Bermúdez et al., 2021b; Guglielmone et al., 2021). Caso contrario ocurre para El Salvador con la menor cantidad de especies de garrapatas reportadas, presentando diez especies de garrapatas duras y dos especies de garrapatas blandas, con afectación en animales domésticos y silvestres. La familia Ixodidae en el país comprende a las especies *Amblyomma dissimile*, *Amblyomma mixtum*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma* cf. *parvum*, *Amblyomma sabanerae*, *Amblyomma scutatum*, *Dermacentor dissimilis*, *Dermacentor nitens*, *Rhipicephalus microplus* y *Rhipicephalus sanguineus* s.l.; mientras que la familia Argasidae se compone de *Ornithodoros dyeri* y *Ornithodoros yumatensis* (Romero et al., 2021). El Salvador junto a Guyana, son los únicos países continentales del neotrópico sin reportes de garrapatas del género *Ixodes*, lo cual es considerado que se debe a una deficiencia en el muestreo de garrapatas en estos países (Guglielmone et al. 2021).

El grupo más frecuente como hospedero para garrapata Ixodidae de la región Neotropical son los mamíferos, siendo este grupo el principal para todos los géneros (Guglielmone, et al., 2021). Los seres humanos pueden verse afectados por algunas especies de garrapatas y en el Neotrópico 49 especies de garrapatas poseen reporte de presencia en humanos. Para América Central se reportan al menos 28 especies de garrapatas en humanos, la mayoría pertenecientes al género *Amblyomma* (Guglielmone, et al., 2021; Bermúdez et al., 2021b). Al menos siete de las garrapatas presentes en El Salvador han sido asociadas a picadura en humanos en la región y corresponden a las especies

A. dissimile, *A. mixtum*, *A. ovale*, *A. sabanerae*, *D. nitens*, *R. microplus* and *R. sanguineus* s.l.; sin embargo, en el país únicamente se ha reportado infestación en personas con *R. microplus*, muy probablemente debido a un subregistro (Guglielmone et al., 2021).

Las garrapatas son vectores de agentes patógenos como las bacterias del género *Rickettsia* y en América Central, al menos 12 especies de *Rickettsia* han sido detectadas en ellas, aunque no todas formalmente descritas (Bermúdez & Troyo 2018; Charles et al. 2021). En cuanto a su importancia en Salud Pública, en países de la región, existe reportes de exposición a especies de *Rickettsia* del grupo de la Fiebre Manchada en Belice, Guatemala, Honduras y Nicaragua (Charles et al., 2021). La especie *Rickettsia rickettsii*, considerada la más patógena del mundo, ha sido identificada en garrapatas *A. mixtum*, *A. varium* y *Haemaphysalis leporispalustris* de Costa Rica y *D. nitens*, *A. mixtum* y *R. sanguineus* de Panamá (Charles et al., 2021); además, se ha identificado *R. parkeri* en garrapatas *A. ovale* y *A. maculatum* provenientes de animales domésticos y silvestres en Belice, aunque en este último caso sin reportes confirmados de afectación en humanos (Polsomboon et al., 2022). Entre las enfermedades transmitidas por garrapatas, las enfermedades producidas por especies de *Rickettsia* del Grupo de la Fiebre Manchas son las más reportadas en seres humanos que viven o viajan a la región de América Central y el Caribe (Charles et al., 2021). Es importante denotar, que existen otras especies detectadas en la región cuyo potencial patógeno aún es desconocido.

En El Salvador, cinco especies del género *Rickettsia* han sido identificadas y corresponden a ‘*Candidatus Rickettsia colombianensi*’, *R. amblyommatis*, *R. belli*, *R. parkeri* y *Rickettsia* sp. ES-*A.cf.parvum* estrechamente relacionada al clado *R. amblyommatis* (Barbieri et al., 2012; Romero et al., 2021; Romero et al., 2023). Con relación a especies de *Rickettsia* de importancia en Salud Pública en El Salvador, hasta la fecha, *R. parkeri* es la única especie detectada por técnicas moleculares (Bermúdez & Troyo 2018; Romero et al., 2023). Existen, sin embargo, algunas otras especies reportadas no apropiadamente caracterizadas en garrapatas de El Salvador (Dye-Braumuller et al. 2023). Entre estos agentes se incluye ADN de *R. rickettsii*, un patógeno muy conocido por su afectación en seres humanos, que fue reportado presente en *Rhipicephalus* spp. (Dye-Braumuller et al. 2023); sin embargo, este diagnóstico es considerado prematuro y requiere una mayor confirmación (Bermúdez et al. 2023).

A pesar de que las rickettsiosis han sido sospechadas desde hace mucho tiempo en El Salvador, tales enfermedades corresponden al grupo de enfermedades desatendidas y no existe una vigilancia nacional (Dye-Braumuller et al. 2022).

La rica fauna de garrapatas en América Central requiere de esfuerzos en estudios epidemiológicos para determinar la prevalencia y ecología de las garrapatas, además de establecer patógenos asociados a ellas. El conocimiento de la distribución de garrapatas es importante como primer paso para comprender la ecología de las especies en estudios científicos en los países (Guglielmone, et al., 2023). La alta diversidad de ectoparásitos y su interrelación con hospederos vertebrados y microorganismos, como especies de *Rickettsia*, representan interés en los ecosistemas silvestres, debido al acercamiento de seres humanos a estas áreas y de animales que deambulan entre los núcleos poblacionales y la vida silvestre, manteniendo contacto con sus ectoparásitos (Moreira-Soto et al., 2023). El transporte de especies de *Rickettsia* puede realizarse por animales domésticos que deambulan en áreas silvestres como el perro, que puede actuar como un posible reservorio (Polsomboon et al., 2022); además, el traslado de animales de vida silvestre a centros de rescate puede representar de forma involuntaria un riesgo de transporte de ectoparásitos y patógenos a nuevas áreas (Moreira-Soto et al., 2023).

De acuerdo con el Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales de El Salvador, el país cuenta con 15 Áreas de Conservación (Figura 5.3). Las Áreas de Conservación son los espacios territoriales que contienen Áreas Naturales Protegidas, zonas de amortiguamiento, corredores biológicos y zonas de influencia y consideran la proximidad geográfica, relación e interdependencia ecológica del Sistema de Áreas Naturales Protegidas (Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales [MARN], 2021).

Estas áreas de conservación albergan diferentes especies animales y vegetales, algunas bajo amenaza o en peligro de extinción. Entre las áreas de conservación podemos mencionar:

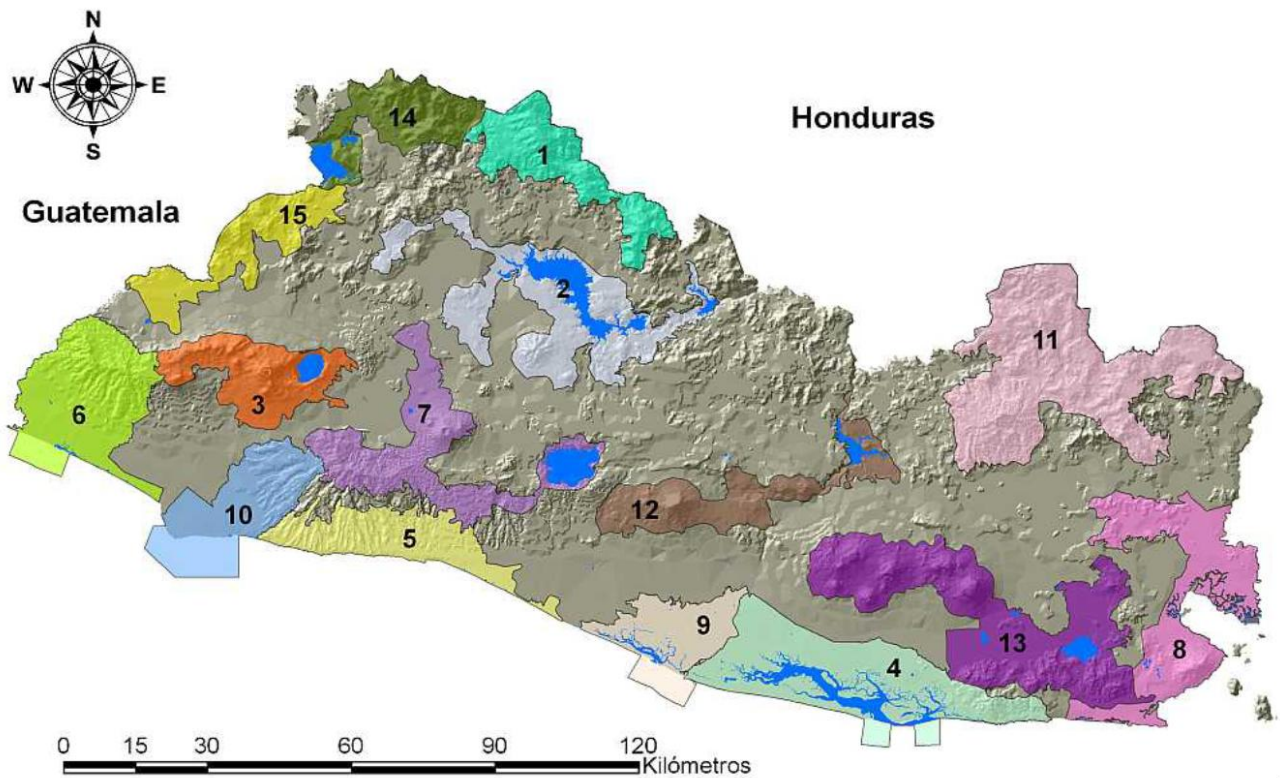
Alotepeque-La Montañona. El área de conservación se encuentra entre las que poseen altos porcentajes de pobreza y pobreza extrema (primer lugar a nivel nacional). Presenta el segundo más bajo índice de desarrollo humano (IDH) a nivel nacional. El 32% del territorio del área de conservación es ocupada por vegetación, principalmente bosque tropical semideciduo mixto submontano, bien drenado, secundario y/o intervenido, así como bosque tropical semideciduo mixto montano inferior, bien drenado, secundario y/o intervenido. Las aguas de sus ríos drenan

directamente al Río Lempa y contribuyen a la generación de hidroelectricidad, a la dilución de contaminantes provenientes de San Salvador, aportan belleza paisajística, contribuyen a regular el clima, etc. La ausencia de personal relacionado a la administración de recursos naturales en la zona ha permitido un incremento de las actividades de cacería y extracción forestal, sin mayor control. 71 especies han sido identificadas como de preocupación especial, amenazadas o en peligro de extinción. Estas incluyen, anfibios (5 en peligro y 2 amenazadas), aves (30 en peligro y 17 amenazadas), reptiles (12 amenazadas) y mamíferos (1 amenazada); flora (1 amenazada) (MARN, 2011).

Apaneca-Ilamatepec. Esta Área de Conservación posee porcentaje intermedio en pobreza y baja tasa de pobreza extrema. Presenta el valor de IDH más alto del país. El 10.71% del área es ocupada por vegetación y el 5.33% corresponde al Lago de Coatepeque propiciando un hábitat para diferentes especies. 104 especies han sido identificadas como de preocupación especial, amenazadas o en peligro de extinción. Estas incluyen, anfibios (2 amenazadas), aves (32 en peligro; 27 amenazadas), reptiles (12 amenazadas) y mamíferos (3 en peligro y 5 amenazadas); flora (11 amenazadas) (MARN, 2011).

El Imposible-Barra de Santiago. Esta Área de Conservación posee altos porcentajes en tasa de pobreza (el cuarto más alto del país) e intermedia en cuanto a pobreza extrema. El 44.78% del área es ocupada por vegetación principalmente bosque tropical deciduo latifoliado de tierras bajas, bien drenado, secundario y/o intervenido. Posee hábitats acuáticos (ríos, lago, estuario, océano) que permiten el desarrollo de diferentes especies. 160 especies han sido identificadas como de preocupación especial, amenazadas o en peligro de extinción. Estas incluyen, anfibios (1 en peligro y 3 amenazadas), aves (76 en peligro y 44 amenazadas), reptiles (6 en peligro y 13 amenazadas) y mamíferos (4 en peligro y 1 amenazada); flora (11 amenazadas) (MARN, 2011).

Tecapa-San Miguel. Esta Área de Conservación posee valores intermedios de pobreza, pobreza extrema e IDH. El 22.79% del área es ocupada por vegetación principalmente bosque tropical semideciduo latifoliado de tierras bajas, bien drenado, secundario y/o intervenido. 86 especies han sido identificadas como de preocupación especial, amenazadas o en peligro de extinción. Estas incluyen, anfibios (3 amenazadas), aves (37 en peligro y 32 amenazadas), reptiles (1 en peligro y 4 amenazadas) y mamíferos (1 amenazada) (MARN, 2011).



Áreas de Conservación

Fuente: Mapa compuesto de los SIG de las fuentes siguientes: Ministerio de Obras Públicas, Transporte, Vivienda y Desarrollo Urbano, 2004, Plan Nacional de Ordenamiento y Desarrollo Territorial (PNODT).

- | | | | |
|---|----------------------------------|----|-------------------------|
| 1 | Alotepeque - La Montañona | 9 | Jaltepeque - Bajo Lempa |
| 2 | Alto Lempa | 10 | Los Cóbanos |
| 3 | Apaneca - Ilamatepec | 11 | Nahuaterique |
| 4 | Bahía de Jiquilisco | 12 | San Vicente Norte |
| 5 | Costa del Bálsamo | 13 | Tecapa - San Miguel |
| 6 | El Imposible - Barra de Santiago | 14 | El Trifinio |
| 7 | El Playón | 15 | Volcán Chingo |
| 8 | Golfo de Fonseca | | |

Figura 5.3 Distribución geográfica de las 15 áreas de conservación de El Salvador

Esta investigación se orienta a la identificación de garrapatas obtenidas de medio ambiente de las áreas de conservación antes mencionadas, animales domésticos y silvestres de El Salvador. El estudio contribuye a la creación de reportes adicionales y nuevos sobre especies de garrapatas y agentes del género *Rickettsia* presentes en el país, proveyendo información epidemiológica relevante para estudios posteriores sobre estos agentes en ambientes domésticos y silvestres.

6.3 Objetivos

- Identificar morfológica y molecularmente especies de garrapatas obtenidas desde medio ambiente de áreas de conservación, además de animales domésticos y de vida silvestre.
- Identificar molecularmente especies de *Rickettsia* presentes en garrapatas obtenidas desde medio ambiente de áreas de conservación y las obtenidas desde animales domésticos y de vida silvestre.
- Elaborar un mapa de distribución de las especies de garrapatas y rickettsias procedentes desde animales domésticos, animales de vida silvestre y medio ambiente.

6.4 Hipótesis

La fauna de garrapatas y especies de *Rickettsia* para El Salvador está en concordancia con la variabilidad observada en otros países de América Central con especies que aún no han sido identificadas.

6.5 Materiales y Métodos

6.5.1 Colecta de garrapatas

Las muestras fueron colectadas durante el período del año 2019 al 2021 desde medio ambiente a través de la técnica del bandereo y de forma directa desde animales domésticos y silvestres. Para el caso de las muestras de medio ambiente, el bandereo fue realizado en cuatro Áreas de Conservación: El Imposible-Barra de Santiago en el distrito de San Francisco Menéndez, Apaneca-Illamatepec en el distrito de Santa Ana, Alotepeque-La Montañona en el distrito de San Ignacio y Tecapa-San Miguel en el distrito de Alegría. El rango de elevación fue de 250 – 1,700 m. La obtención de garrapatas de forma directa fue realizada en animales domésticos desde perros que viven en las Áreas de Conservación, además se incluyó un perro que visitó una clínica veterinaria en San Salvador y caballos de dos establos procedentes del distrito de San Juan Opico. Para el caso de garrapatas obtenidas desde animales de vida silvestre, estas fueron colectadas en dos centros de

rescate. De cada muestra, se registró la información correspondiente (Cuadro 5.6). Garrapatas de cada animal y garrapatas individuales colectadas por el método de bandereo fueron identificadas con un código único y preservadas en etanol absoluto hasta el momento de su análisis morfológico y molecular. Cada sitio de colecta fue georreferenciado para establecer una distribución espacial de las especies de garrapatas.

Cuadro 5.6 Ubicación de colecta de garrapatas en El Salvador, durante los años 2019-2021

No.	Nombre	Lugar	Elevación (msnm)	Coordenadas geográficas (Norte, Oeste)
1	Altepeque-La Montañona, San Ignacio. Chalatenango		1761	14°20'41",89°08'08"
2	Apaneca-Ilamatepec, Santa Ana. Santa Ana		1823	13°49'53",89°37'52"
3	Barrio El Carmen, Olocuilta. La Paz		463	13°34'10",89°06'43"
4	El Carrizal, Cojutepeque. Cuscatlán		940	13°42'57",88°56'25"
5	El Imposible-Barra de Santiago, San Francisco Menéndez. Ahuachapán		248	13°50'42",90°00'45"
6	El Imposible-Barra de Santiago, San Francisco Menéndez. Ahuachapán		780	13°49'43",89°56'44"
7	San Salvador. San Salvador		862	13°41'40",89°15'07"
8	San Salvador. San Salvador		746	13°40'27",89°12'27"
9	Sitio del Niño, San Juan Opico. La Libertad		465	13°46'58",89°22'35"
10	Sitio del Niño, San Juan Opico. La Libertad		459	13°47'13",89°22'51"
11	Tecapa-San Miguel, Alegría. Usulután		1328	13°29'41",88°29'34"
12	Tecapa-San Miguel, Jucuarán. Usulután		598	13°14'41",88°14'41"
13	Clínica Veterinaria, San Salvador		811	13°40'43",89°14'29"
14	Centro de rescate de vida silvestre 1, Berlín. Usulután		676	13°31'11",88°30'44"
15	Centro de rescate de vida silvestre 2, San Salvador		744	13°41'23",89°13'38"

6.5.2 Identificación morfológica y molecular de garrapatas

Para la identificación morfológica de las garrapatas, estas fueron separadas de acuerdo con su estado de ciclo de vida: adultas, ninfas y larvas. Para el caso de las garrapatas adultas, estas fueron identificadas morfológicamente empleando claves dicotómicas desarrolladas por Barros-Battesti et al. (2006), Martins et al. (2010) y Apanaskevich & Bermúdez (2013). Mientras que ninfas y larvas lograron solo ser identificadas a nivel de género debido a la ausencia de claves de

identificación desarrolladas para estas fases. Con relación a la identificación molecular, fue analizada al menos una garrapata de cada morfotipo y los estados inmaduros a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La extracción de ADN fue realizada individualmente mediante el uso de Kit comercial DNeasy® Blood and Tissue (Valencia, California), siguiendo las instrucciones del fabricante bajo un protocolo complementario para garrapatas.

El ADN fue procesado a través de un PCR convencional, dirigido a un fragmento de 460 pares de base (bp) del gen *16S rDNA* de garrapatas, de acuerdo con el procedimiento desarrollado por Mangold et al. (1998).

Para el género *Rickettsia*, se empleó los cebadores CS-78 y CS-323 que se encuentran dirigidos a un fragmento de 401 bp del gen Citrato sintasa (*gltA*), que es universal para todos los miembros del género. Posterior a ello, las muestras positivas a *gltA* fueron procesadas por un PCR semi anidado, cuya primera reacción se realizó con los cebadores Rr190.70p y Rr190.701n, que amplifican un fragmento de 632bp y seguido de otro PCR empleando los cebadores Rr190.70p y Rr190.602, que amplifican un fragmento de 512bp que corresponde a la proteína A de la membrana externa de *Rickettsia* (*ompA*) presente en los miembros de *Rickettsia* del Grupo de la Fiebre Manchada (GFM). Todas las reacciones fueron desarrolladas según procedimientos previamente establecidos en la literatura (Regnery et al., 1991; Labruna et al., 2004). Como control positivo fue empleado ADN de *Rickettsia vini*.

Las amplificaciones fueron sometidas a proceso de secuenciación. Para ello fueron inicialmente purificadas utilizando ExoSAP-IT® y secuenciadas con BigDye™ Terminator – Cycle Sequencing Ready Reaction – Applied Biosystems y visualizadas en el secuenciador de ADN modelo ABI Prism 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems/Perkin Elmer). Las secuencias generadas fueron editadas con el programa Bioedit® y comparadas por BLAST con la base de datos del NCBI para buscar similitud entre secuencias.

6.5.3 Análisis filogenético de garrapatas

Alineamiento de secuencias parciales del gen 16S rRNA generadas en este estudio y otras 29 secuencias disponibles en GenBank, incluyendo secuencias conespecíficas (según disponibilidad) fueron empleadas para desarrollar un análisis filogenético con MAFFT (Katoh 2002). Los mejores modelos de sustitución de nucleótidos fueron calculados con MEGA 7 (Kumar et al. 2016). Un

árbol filogenético de máxima verosimilitud fue inferido con PhyML (Guindon & Gascuel 2003) empleando el modelo general tiempo reversible para sustitución nucleótida, con cinco categorías de sitio. Secuencias de *Otobius megnini* conformaron la raíz del árbol,

6.5.4 Análisis Geográfico

Cada sitio de muestreo fue georreferenciado y esta información fue empleada para la elaboración de mapas considerando las capas de fronteras, altitud y vegetación disponible en la información cartográfica del Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales (MARN) y el Centro Nacional de Registros (CNR) de El Salvador. Los mapas fueron creados utilizando ArcGIS versión 9.0, disponible en la Laboratorio de Sistemas de Información Geográfica de la Escuela de Posgrado y Educación Continua de la Facultad de Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador.

6.6 Resultados

La identificación morfológica determinó la presencia de ocho especies de garrapatas de la familia Ixodidae: *Amblyomma dissimile* (una hembra) obtenida de una serpiente (*Boa constrictor*), *Amblyomma longirostre* (dos machos, una hembra) desde un puercoespín (*Sphiggurus mexicanus*), *Amblyomma mixtum* (un macho, tres hembras) desde medio ambiente, *Amblyomma ovale* (nueve machos, 16 hembras) desde perros (*Canis lupus familiaris*), coati (*Nasua narica*) y medio ambiente, *Amblyomma parvum* (dos machos, tres hembras) desde oso hormiguero (*Tamandua mexicana*), perro y zorra gris (*Urocyon cinereoargenteus*), *Amblyomma scutatum* (nueve machos) desde garrobo (*Ctenosaura similis*), *Dermaceptor panamensis* (dos machos, una hembra) desde puercoespín y medio ambiente, *Ixodes cf boliviensis* (tres hembras) desde perro y medio ambiente; y dos especies de garrapatas de la familia Argasidae: *Ornithodoros puertoricensis* (ocho larvas) desde un perro y *Otobius megnini* (110 ninfas, 42 larvas) desde caballos (*Equus caballus*). La identificación morfológica no fue posible de realizar para una ninfa de *Ixodes* sp., colectada de medio ambiente y una larva y una ninfa de *Amblyomma* spp. obtenidas de medio ambiente y de oso hormiguero, respectivamente (Cuadro 5.7).

Cuadro 5.7 Garrapatas (M: machos; H: hembras; N: ninfas; L: larvas), hospederos asociados y lugar de colecta en El Salvador, durante los años 2019-2021

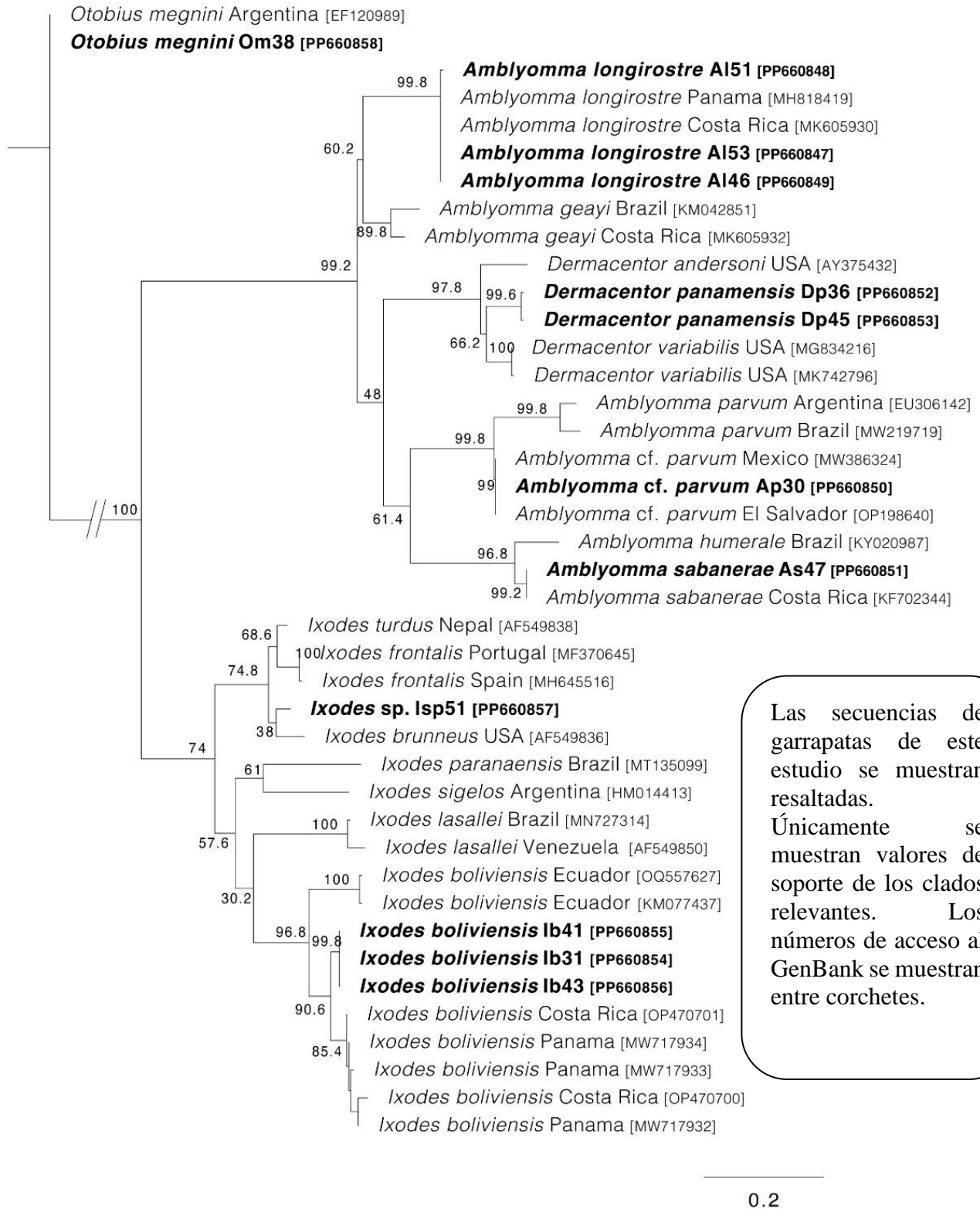
Especies de garrapatas*	No. especímenes	Hospederos (No. individuos)	Ubicación No ^a
<i>Amblyomma dissimile</i>	1H	<i>Boa constrictor</i> (1)	14
<i>Amblyomma longirostre</i>	2M, 1H	<i>Sphiggurus mexicanus</i> (1)	14
	1L	<i>Environment</i> (1)	1
<i>Amblyomma mixtum</i>	1M, 3H	<i>Environment</i> (2)	1,6
<i>Amblyomma ovale</i>	7M, 8H	<i>Canis familiaris</i> (8)	2,3,4,5,7,8,11
	2M, 6H	<i>Nasua narica</i> (1)	14
	2H	<i>Environment</i> (1)	11
<i>Amblyomma cf parvum</i>	2M	<i>Tamandua mexicana</i> (1)	14
	1H	<i>Canis familiaris</i> (1)	12
	2H	<i>Urocyon cinereoargenteus</i> (2)	14, 15
<i>Amblyomma sabanerae</i>	1N ^{&}	<i>Tamandua mexicana</i> (1)	14
<i>Amblyomma scutatum</i>	9M	<i>Ctenosaura similis</i> (1)	14
<i>Dermacentor panamensis</i>	1M, 1H	<i>Sphiggurus mexicanus</i> (1)	14
	1M	<i>Environment</i> (1)	1
<i>Ixodes cf boliviensis</i>	1H	<i>Canis familiaris</i> (1)	2
	2H	<i>Environment</i> (1)	2
<i>Ixodes sp.</i>	1L ^{&}	<i>Environment</i> (1)	1
<i>Ornithodoros puertoricensis</i>	8L	<i>Canis familiaris</i> (1)	13
<i>Otobius megnini</i>	110N, 42L	<i>Equus caballus</i> (10)	9, 10

* Adicional a las 12 especies de garrapatas en este cuadro, 87 N y 25 L fueron morfológicamente identificadas solo a nivel de género y fueron retenidas como *Amblyomma* spp. De estas, 31 N y 10 L fueron colectadas en medio ambiente por bandereo (Ubicación no. 1).

^a Números se refieren a ubicaciones en Tabla 1.

[&] Estas fueron identificadas a nivel de especie a través de análisis molecular (ver en texto).

Con relación a la identificación molecular de garrapatas, en *O. puertoricensis* no fue posible su realización al no conseguir extraer ADN desde la larva, únicamente se realizó el análisis morfológico. Para el resto de las especies el análisis molecular fue realizado.



Las secuencias de garrapatas de este estudio se muestran resaltadas. Únicamente se muestran valores de soporte de los clados relevantes. Los números de acceso al GenBank se muestran entre corchetes.

Figura 5.4 Árbol filogenético de máxima probabilidad inferido para un subconjunto de garrapatas neotropicales utilizando un alineamiento de 439pb del gen mitocondrial 16S rRNA

En el caso de los especímenes no identificados en el análisis morfológico, se obtuvo que la larva de *Amblyomma* sp. obtenida de medio ambiente, corresponde a *A. longirostre* y la ninfa de oso hormiguero a *A. sabanerae*. Las secuencias parciales del gen *16S rRNA* de *A. longirostre*, *A. cf parvum*, *A. sabanerae* y *O. megnini* mostraron 100% de similitud con las respectivas secuencias disponibles en el GenBank; confirmando su identificación morfológica y molecular (Figura 5.4).

Resultados diferentes se observaron para las restantes especies de garrapatas. Para el caso del adulto de *Ixodes* se obtuvieron porcentaje de variación del 96.88 – 97.11% en similitud con *I. cf boliviensis* de Costa Rica. Con relación a la ninfa de *Ixodes* sp., no se encontraron secuencias disponibles en el GenBank, siendo las especies más cercanas *I. brunneus* de Estados Unidos (AF549836) con 96.14% de similitud, pero con a penas un 38% de soporte de ramificación (Figura 5.4), *I. turdus* de Asia (AF549838) con 95.89% de similitud e *I. frontalis* de Portugal (MF370645) con 94.94% de similitud. También se observó una similitud de 97.56% con *I. silvanus* de Argentina (MT813512); sin embargo, la secuencia disponible para esta última especie es más corta que la obtenida en el presente estudio y solo se dispone de un segmento que cubre el 88% de la secuencia para comparación.

Cuadro 5.8 Datos de las secuencias parciales del gen mitocondrial 16S rRNA generados desde diez especies de garrapatas de El Salvador

Especie de garrapata	Estado	Hospedero/sustrato	Ubicación No. ^a	Identidad más cercana en GenBank con 100% de cobertura de secuencia	
				% similitud	Especie de garrapata, País (Número de acceso)
<i>Amblyomma longirostre</i>	Macho	<i>Sphiggurus mexicanus</i>	14	100	<i>A. longirostre</i> , Panamá (MH818419)
<i>A. longirostre</i>	Hembra	<i>S. mexicanus</i>	14	100	<i>A. longirostre</i> , Panamá (MH818419)
<i>A. longirostre</i>	Larva	Medioambiente	1	99.76	<i>A. longirostre</i> , Panamá (MH818419)
<i>Amblyomma cf parvum</i>	Hembra	<i>Canis familiaris</i>	12	100	<i>A. parvum</i> , El Salvador (OP198640)
<i>Amblyomma sabanerae</i>	Ninfa	<i>Tamandua mexicana</i>	14	100	<i>A. sabanerae</i> , Costa Rica (KF702344)
<i>Dermacentor panamensis</i>	Macho	Medioambiente	1	95.07	<i>D. variabilis</i> *, USA (MG834216)
<i>D. panamensis</i>	Hembra	<i>S. mexicanus</i>	14	95.07	<i>D. variabilis</i> *, USA (MG834216)
<i>Ixodes boliviensis</i>	Hembra	<i>C. familiaris</i>	2	96.88	<i>I. boliviensis</i> , Costa Rica (OP470701)
<i>I. boliviensis</i>	Hembra	Medioambiente	2	96.88	<i>I. boliviensis</i> , Costa Rica (OP470701)
<i>I. boliviensis</i>	Hembra	Medioambiente	2	97.11	<i>I. boliviensis</i> , Costa Rica (OP470701)
<i>Ixodes</i> sp.	Ninfa	Medioambiente	1	96.14	<i>I. brunneus</i> , USA (AF549836)
<i>Otobius megnini</i>	Ninfa	<i>Equus caballus</i>	9	100	<i>O. megnini</i> , Argentina (EF120989)

^a Números se refieren a ubicación de Tabla 1

* Al momento de este estudio, no había secuencia disponible del 16S rRNA de *D. panamensis* en GenBank.

Una situación similar a la ninfa de *Ixodes* sp., ocurrió con la especie de garrapata *D. panamensis*, para la que no se encontraron secuencias disponibles en el GenBank, por lo que no se obtuvo ninguna secuencia con similitud a alguna especie de *Dermacentor* conocida, la especie más cercana fue *Dermacentor variabilis* con un 95.07% de similitud (Cuadro 5.8).

Mediante el análisis molecular, también fue posible detectar e identificar especies de *Rickettsia* en las garrapatas (Cuadro 5.9). Todas las garrapatas *D. panamensis* e *I. cf boliviensis* analizadas, fueron positivas al género *Rickettsia*. En *D. panamensis* se obtuvieron secuencias parciales de los genes *gltA* y *ompA* con 100% y 99.13%, idénticas a *Rickettsia rhipicephali* obtenidas desde *Dermacentor latus* de Costa Rica (OM687366) y *D. variabilis* de Estados Unidos (OM960701), respectivamente. Desde las especies *I. cf. boliviensis*, se generaron secuencias idénticas con las secuencias parciales de los genes *gltA* y *ompA* en un 100% y 99.60%, respectivamente, a *Rickettsia* endosymbiont of *Ixodes boliviensis* (MW699695, MW699700) de Panamá. Finalmente, la única *A. cf parvum*, fue positiva a *Rickettsia amblyommatis* con 100% de similitud a las secuencias disponibles en el GenBank al gen *gltA* y el gen *ompA* desde *A. mixtum* de El Salvador (OP375579).

No se detectó ADN de alguna especie de *Rickettsia* en las garrapatas *A. dissimile*, *A. longirostre*, *A. mixtum*, *A. ovale*, *A. sabanerae*, *A. scutatum*, *O. megnini*, ni en la ninfa de *Ixodes* sp.

Todas las secuencias obtenidas en esta investigación fueron depositadas en el GenBank con los siguientes números de acceso para las especies de garrapatas: *A. longirostre* (PP660847, PP660848, PP660849), *A. cf. parvum* (PP660850), *A. sabanerae* (PP660851), *D. panamensis* (PP660852, PP660853), *I. boliviensis* (PP660854, PP660855, PP660856), *Ixodes* sp. (PP660857) y *O. megnini* (PP660858). Para las secuencias de *Rickettsia*, los números de acceso corresponden a los siguientes: *R. rhipicephali gltA* (PP662913) y *ompA* (PP662914); *Rickettsia* sp. *gltA* (PP662915) y *ompA* (PP662916) y *R. amblyommatis gltA* (PP662917).

Con relación a las garrapatas, un ejemplar de cada espécimen fue depositado en la “Coleção Nacional de Carrapatos Danilo Gonçalves Saraiva” de la Universidad de São Paulo, con los números de acceso CNC-4765 a CNC-4782.

Cuadro 5.9 Datos de las secuencias parciales de los genes *gltA* y *ompA* generadas por especies de *Rickettsia* de El Salvador

Especie de garrapata (ubicación No. ^a)	No. de especímenes con <i>Rickettsia</i> / No. Especímenes analizados	Resultado del análisis de BLAST de las secuencias de ADN de acuerdo con genes rickettsiales			
		Gen (No. nucleótidos)	Especie de <i>Rickettsia</i>	Mayor % de identidad	Número de acceso
<i>Dermacentor panamensis</i> (1)	1/1	<i>gltA</i> (350)	<i>R. rhipicephali</i>	100	OM687366
		<i>ompA</i> (572)	<i>R. rhipicephali</i>	99.13	OM960701
<i>D. panamensis</i> (14)	1/1	<i>gltA</i> (350)	<i>R. rhipicephali</i>	100	KX434745
<i>Ixodes boliviensis</i> (2)	3/3	<i>gltA</i> (350)	<i>Rickettsia</i> sp. endosymbiont of <i>I. boliviensis</i>	100	MW699695
		<i>ompA</i> (587)	<i>Rickettsia</i> sp. endosymbiont of <i>I. boliviensis</i>	99.60	MW699700
<i>Amblyomma dissimile</i> (14)	0/1				
<i>Amblyomma cf parvum</i> (12)	1/1	<i>gltA</i> (350)	<i>R. amblyommatis</i>	100	OP375579
<i>Amblyomma longirostre</i> (1,14)	0/3				
<i>Amblyomma mixtum</i> (1,6)	0/1				
<i>Amblyomma ovale</i> (2,3,4,5,7,8,11,14)	0/10				
<i>Amblyomma sabanerae</i> (14)	0/1				
<i>Otobius megnini</i> (9)	0/1				
<i>Ixodes</i> sp. (1)	0/1				

^a Números hacen referencia a ubicación según Tabla 1

En cuanto al análisis geográfico, se registró información de cada muestra, con georreferenciación y altitud de cada punto de obtención de garrapatas. El rango de altitud de las muestras se encuentra entre los 248 a 1,823 metros sobre el nivel del mar (msnm). La distribución geográfica de las especies de garrapatas y *Rickettsia* identificadas en el estudio se observa en la Figura 5.5.

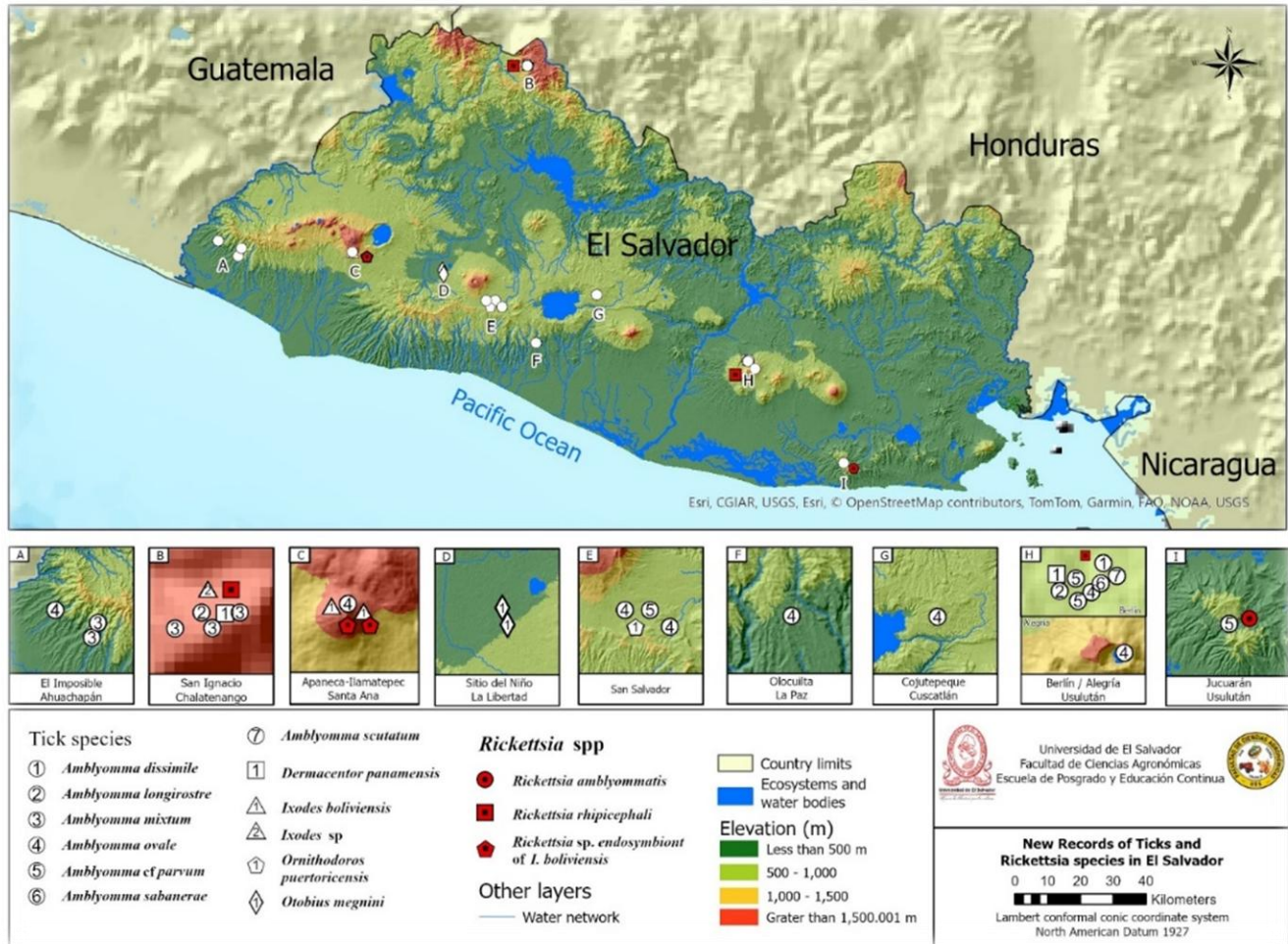


Figura 5.5 Distribución geográfica de especies de garrapatas y *Rickettsia* de El Salvador, durante los años 2019-2021

6.7 Discusión

Este estudio reporta la presencia de 12 especies de garrapatas y tres especies de *Rickettsia* en El Salvador. Las especies de garrapatas *A. dissimile*, *A. mixtum*, *A. ovale*, *A. cf parvum*, *A. sabanerae* y *A. scutatum* han sido previamente reportadas como especies comunes de animales domésticos y de vida silvestre en el país (Romero et al., 2021). Una situación diferente sucede para las especies de garrapatas *A. longirostre*, *D. panamensis*, *Ixodes cf boliviensis*, *O. puertoricensis* y *O. megnini*, de las cuales no existe reporte oficial en El Salvador. Para el caso de las especies de *Rickettsia*, *R. amblyommatis* es una especie común en el país (Romero et al., 2021), pero las especies *R. rhipicephali* y *Rickettsia* endosymbiont of *Ixodes boliviensis* no poseen reportes previos.

En garrapatas duras, el género *Amblyomma* es el grupo más numeroso en la región neotropical, con al menos 68 especies, 55 de las cuales son endémicas de la región (Guglielmone et al. 2021; Soares et al. 2023). El Salvador tiene identificadas seis especies de *Amblyomma*, y a pesar de que *A. longirostre* es una especie ampliamente distribuida en América, no existen reportes previos en El Salvador, por lo que este hallazgo incrementa la cantidad de especies del género a siete. En América Central se cuenta con reportes previos en Costa Rica, Honduras, y Panamá (Romero et al., 2021; Guglielmone et al., 2021). Las garrapatas adultas de esta especie se alimentan principalmente desde puercoespines, mientras que las larvas y ninfas son colectadas desde aves, principalmente Paseriformes. Es una especie que muy raramente afecta humanos solo reportado en Sur América (Guglielmone et al., 2021). Investigaciones realizadas en Brasil sugieren que *A. longirostre* es una garrapata arbórea, usando el dosel arbóreo en sus estados de vida libre (Labruna et al., 2007). En América Central, esta garrapata ha sido asociada con especies de *Rickettsia*, como *R. amblyommatis* y especies de rickettsia aun no determinadas (Charles et al., 2021).

Con relación al género *Dermacentor*, existen nueve especies en la región neotropical y cuatro de ellas son endémicas de la región (Guglielmone et al. 2021). En El Salvador el género está representado por dos especies que corresponden a *Dermacentor dissimilis* y *Dermacentor nitens* (Romero et al., 2021), por lo que *D. panamensis* corresponde a otra especie más, incrementando la cantidad a tres, para este género en el país. Esta garrapata es descrita solo en América Central con escasa información. Inicialmente fue mal identificada y confundida con *Dermacentor halli*, debido a su alta similitud morfológica. Su reconocimiento como nueva especie fue realizada en Panamá y se observó que fue mal identificada en Guatemala, Honduras, Nicaragua y Costa Rica sin reportes en Belice y El Salvador (Apanaskevich & Bermúdez 2013). El principal hospedero para la garrapata adulta es el puercoespín (*Sphiggurus mexicanus*); sin embargo, existen reportes de afectación en perezoso y ratón. Las larvas y ninfas están presentes en diversas especies de roedores y las ninfas también han sido observadas en puercoespín y murciélagos del género *Myotis* (Apanaskevich & Bermúdez 2013; Bermúdez et al., 2018). Hasta la fecha no es considerada un parásito de humanos (Charles et al., 2021). En Panamá, *D. panamensis* se encuentra en bosque nuboso con elevaciones entre 1770 – 2700 m (Apanaskevich & Bermúdez 2013; Bermúdez et al., 2018), que resulta un hallazgo similar a esta investigación. Este trabajo, provee la primera secuencia genética de *D. panamensis* y muestra que su 16S rRNA es al menos 5% diferente de cualquier otra especie de *Dermacentor* existente en el GenBank.

Con relación al género *Ixodes*, 62 especies son reportadas en la región neotropical, 49 de ellas endémicas (Guglielmone et al. 2021, Apanaskevich et al. 2022, Nava et al. 2023). La garrapata *I. boliviensis* es una especie neotropical descrita desde América del Norte hasta América del Sur (Charles et al., 2021). Aunque América Central posee registros en Belice, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Costa Rica y Panamá (Guglielmone et al., 2021), el presente hallazgo se convierte en el primer registro de miembros del género *Ixodes* en El Salvador (Guglielmone et al., 2023). La especie fue descrita por vez primera en Bolivia y se encuentra presente en Colombia, Ecuador y Perú en América del Sur (Guglielmone et al. 2021). Secuencias genéticas de garrapatas colectadas en Panamá mostraron alto polimorfismo genético (diferencias de 7-8% en el gen 16S rRNA) al compararse con secuencias de especímenes de América del Sur, lo que hace suponer la presencia de una especie diferente en América Central, por esta razón es reconocida provisionalmente como *Ixodes* cf. *boliviensis* (Bermúdez et al. 2021a). Una observación destacable en esta investigación es que los haplotipos del 16S rRNA de los especímenes salvadoreños fueron 3-4% diferentes de los especímenes de Panamá (GenBank sequences MW717932, MW717933, MW717934) y Costa Rica (OP470700, OP470701) y a la vez, 7% diferentes de los especímenes procedentes de América del Sur (KM077437, OK557627). El polimorfismo genético observado en *I. boliviensis* con diferente procedencia geográfica sugiere que el taxon muestra una alta diversidad genética o podría representar un complejo de especies que requiere de estudios de evaluación. Los hospederos para esta especie de garrapata son diversas órdenes de mamíferos, principalmente carnívoros, considerando al perro como el principal hospedero para el estado adulto, mientras que el principal hospedero para los estados inmaduros aún no ha sido determinado. Esta especie es considerada un parásito raro de humanos con reportes en México y América Central (Guglielmone et al., 2021; Bermúdez et al., 2021b). También en México y América Central es frecuentemente detectada en áreas montañosas con elevaciones entre los 800 – 2500 m (Bermúdez & Miranda, 2011; Bermúdez et al. 2015), reporte similar a lo observado en la presente investigación. Esta garrapata ha sido asociada a *Rickettsia* strain IbR/CRC en América Central y *Borrelia* sp. strain Talamanca, *Babesia odocoilei*, y *Hepatozoon* sp. strain Chiriquensis en Panamá (Charles et al., 2021; Bermúdez et al., 2021b).

Acerca de la ninfa de *Ixodes* sp., el haplotipo de la secuencia del 16S rRNA fue 95-97% similar a *I. silvanus*, *I. brunneus*, *I. turdus* e *I. frontalis*, especies de garrapatas que son parásitos de aves. Un estudio filogenético reciente ha demostrado que estas cuatro especies de *Ixodes* forman un

grupo natural, que las incluye en el subgénero *Trichotoixodes*, el cual está compuesto por nueve especies, todas asociadas a aves, este grupo incluye a *Ixodes copei* de Jamaica (Saracho-Bottero et al. 2021). *I. brunneus* es una garrapata de América del Norte, con reportes únicamente en Estados Unidos y Canadá. Este es un ectoparásito de aves, principalmente aves paserinas, incluyendo aves migratorias. Esta garrapata ha sido responsable de causar parálisis en aves paserinas (Hutcheson et al., 2021; Kennedy & Winter 2022). Un estudio reciente concluye que *I. brunneus* es una especie exclusiva del Neártico y que previos reportes de esta especie en Argentina representan en realidad un nuevo taxon, descrito ahora como *I. silvanus* y que los reportes procedentes de Colombia, Panamá y Venezuela podrían corresponder a otro taxon aún no determinado (Saracho-Bottero et al. 2021). Este mismo estudio reporta la ausencia de diferencias morfológicas discretas entre las ninfas de *I. brunneus* e *I. silvanus*, no logrando resaltar diferencias morfológicas discretas entre las ninfas de ambas especies (Saracho-Bottero et al. 2021). El análisis morfológico de la ninfa de *Ixodes* sp. de El Salvador demostró alta similitud con *I. brunneus* e *I. silvanus*; sin embargo, es claramente diferente a estas especies por la presencia de aurículas largas (Figura 5.6) que en *I. brunneus* e *I. silvanus* son cortas (Durden and Keirans 1996; Saracho-Bottero et al. 2021). Esta diferencia morfológica en conjunto con los resultados moleculares y filogenéticos indican que la ninfa de *Ixodes* sp. reportada en este estudio representa una especie adicional de *Ixodes* para El Salvador, que podría ser *I. copei* (cuya ninfa aún no cuenta con descripción morfológica) u otra especie estrechamente relacionada a *I. brunneus* pendiente de una descripción formal.

Para el grupo de garrapatas blandas, la región Neotropical comprende al menos 81 especies de las cuales 66 son endémicas; sin embargo, la diversidad de Argasidae en la región está probablemente subestimada (Nava et al., 2010). Hasta el momento, El Salvador está representado por dos especies de argásidos pertenecientes al mismo género: *Ornithodoros dyeri* y *Ornithodoros yumatensis* (Guglielmone et al., 2004). El género *Ornithodoros* posee al menos 70 especies neotropicales y la mayoría son endémicas (Guglielmone et al. 2004; Bermúdez et 2017; Muñoz-Leal et al. 2021). Las especies del género son usualmente encontradas en madrigueras y nidos de sus hospederos y puede sobrevivir parasitando animales domésticos y humanos (Bermúdez et al., 2017).

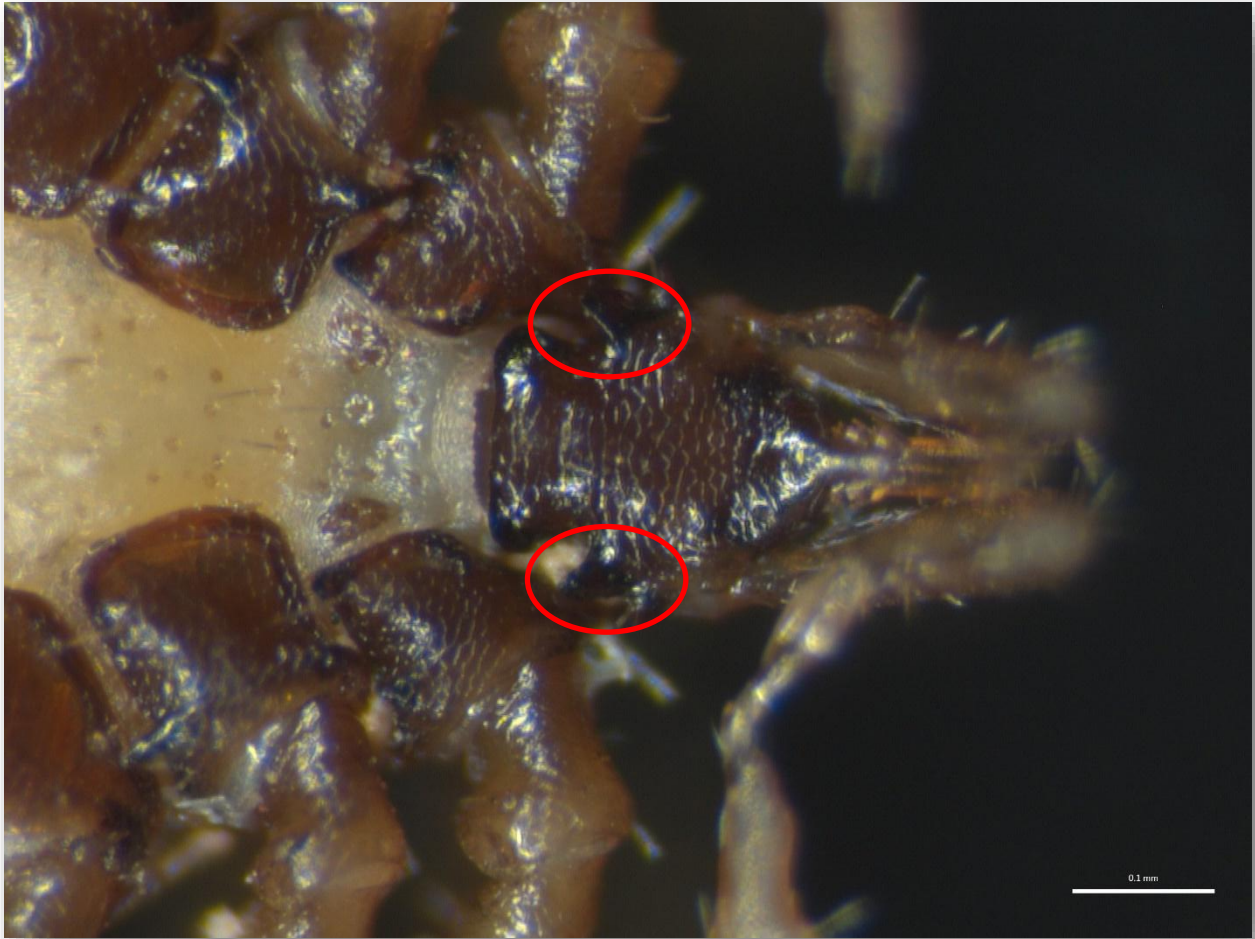


Figura 5.6 Ninfa de *Ixodes* sp. colectada en El Salvador, mostrando estructura de aurículas

La garrapata *O. puertoricensis*, es un artrópodo nidícola con reportes en América Central, el Caribe y Norte de América del Sur (Guglielmone et al., 2004). Investigaciones realizadas en Panamá sugieren que *Ornithodoros*, posee como hospederos a vertebrados como pequeños roedores y especies de *Dasyprocta*, pudiendo parasitar una amplia variedad de vertebrados incluyendo aves, perros y humanos. *O. puertoricensis* ha sido reportado como un parásito común de perros en algunas áreas rurales de Colombia, probablemente debido a la constante exposición de perros a vertebrados silvestres que son atraídos por los ambientes humanos. En humanos, se ha observado que la garrapata parasita en la noche, alimentándose y completando su ciclo de vida, causando lesiones o un leve dolor (Paternina et al., 2009; Bermúdez et al., 2017; Bermúdez et al., 2021a; López et al., 2021). Esta garrapata es considerada reservorio y vector competente de la fiebre

recurrente transmitida por garrapatas, debida al agente *Borrelia puertoricensis* en Panamá, representando una preocupación en salud pública (Bermúdez et al., 2021b).

Con respecto al género *Otobius*, existen dos especies a nivel mundial, pero solo *O. megnini* está presente en la región Neotropical (Guglielmone et al., 2004). Las ninfas poseen numerosas proyecciones similares a espinas, este estado habita en el canal auricular externo del hospedero, como el caballo y por estas características se le conoce como la garrapata espinosa del oído. Esta especie está ampliamente distribuida en México; pero en América Central solo existe reporte en Guatemala (Guglielmone et al., 2004; Nava et al., 2009; Hutcheson et al., 2021). La fase adulta de esta garrapata no es parásita, mientras que larvas y ninfas infestan diversas especies de animales domésticos, silvestres incluyendo el caballo (como el presente reporte) y ocasionalmente al ser humano (Hutcheson et al., 2021). Esta garrapata se encuentra adaptada a condiciones áridas y semi-áridas, así como lugares húmedos (Nava et al., 2009). El presente registro en El Salvador proviene de áreas calientes y moderadamente húmedas. *O. megnini* está implicada en la transmisión del agente de la fiebre Q, causando miotomía en un caballo (Zarate-Ram et al., 2014; Hutcheson et al., 2021).

Sobre la presencia de miembros del género *Rickettsia*, las tres especies detectadas pertenecen al GFM, grupo que posee especies que producen la enfermedad de la fiebre manchada en humanos, como *R. rickettsii* y *R. parkeri* (Parola et al. 2013). En esta investigación se detectó a *R. amblyommatis* que es la especie más común en América Central, previos estudios la asocian al menos a diez especies de garrapatas. Su rol como patógeno en vertebrados aun no es claro, pero algunos autores sospechan de alguna importancia en salud pública (Bermúdez & Troyo 2018). En el país, esta especie de *Rickettsia* ha sido previamente detectada en 50% de los especímenes analizados de la especie de garrapata *A. cf. parvum* (Romero et al., 2021).

Además de *R. amblyommatis*, del GFM se observó la presencia de *R. rhipicephali*, especie de la cual existe muy poca información en América Central, detectada una sola vez en *Dermacentor latus* de Costa Rica, aunque a nivel mundial existe muchos reportes que la convierten entre las especies de *Rickettsia* del GFM más ampliamente distribuida debido a sus reportes en América, África Central, Europa y Taiwán (Zeringóta et al., 2017; Bermúdez & Troyo 2018). Esta especie es la más detectada en la garrapata *Dermacentor occidentalis* de California en Estados Unidos con porcentajes que varían entre el 6.4% - 29.6% (Paddock et al., 2018). La patogenicidad de esta

Rickettsia aún permanece sin determinar (Bermúdez & Troyo 2018). Este se convierte en la primera asociación con un microorganismo y el primer registro de esta especie de *Rickettsia* en la garrapata *D. panamensis*, ya que no existe información previa al respecto (Bermúdez et al., 2018).

En cuanto a *Rickettsia* endosymbiont of *Ixodes boliviensis*, existe registro en Costa Rica y Panamá (Troyo et al. 2014; Bermúdez et al. 2021a; Moreira-Soto et al. 2023). Estudios previos han mostrado una relación filogenética de este agente a otros agentes endosimbiontes de otras especies de garrapatas del género *Ixodes*, especialmente especies pertenecientes al complejo *Ixodes ricinus* (Bermúdez et al., 2021a). Es importante notar que al menos uno de estos agentes endosimbiontes de *Ixodes* nombrada como *Rickettsia monacensis*, ha sido asociada con enfermedad clínica en humanos de Europa (Parola et al., 2013). La presencia de esta *Rickettsia* en todas las garrapatas analizadas tanto de vida libre como sobre el hospedero podría estar relacionado a una transmisión vertical, lo que propiciaría una alta prevalencia en la población de garrapatas. Su presencia en estados de vida libre podría estar relacionado a transmisión transestadial. Esta *Rickettsia* representa una especie con potencial patógeno desconocido (Bermúdez et al., 2021a).

6.8 Conclusiones

En esta investigación se reportan seis especies de garrapatas y dos especies de *Rickettsia* inéditas para El Salvador: las especies de garrapatas *A. longirostre*, *D. panamensis*, *I. cf boliviensis*, *Ixodes* sp., *O. puertoricensis*, *O. megnini* y las especies de rickettsias *Rickettsia* endosymbiont of *Ixodes boliviensis* y *R. rhipicephali*. Con el presente estudio, la fauna de garrapatas en El Salvador se incrementa a 17 especies, con 13 garrapatas duras (Ixodidae) y cuatro garrapatas blandas (Argasidae), agregando un nuevo género en cada familia (*Ixodes* y *Otobius* respectivamente). Queda pendiente la identificación de especie de la ninfa de *Ixodes* encontrada en este estudio. En cuanto al género *Rickettsia* se incrementa a seis con el reporte de *R. parkeri* como el único agente patógeno confirmado en garrapatas de El Salvador

6.9 Referencias

- Apanaskevich, D.A., Apanaskevich, M.A., Klimov, P.B., Edgy, B.M., Bermudez, S.E., Labruna, M.B., Korzeev, A.I., Barker, S.C. (2022). Description of eight new species of *Ixodes* Latreille, 1795 (Acari: Ixodidae) and redescription of *I. auritulus* Neumann, 1904, parasites of birds in the Australasian, Nearctic and Neotropical Regions. *Zootaxa* 5173(1):1-73. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5173.1.1>
- Apanaskevich, D. A., & Bermúdez, S. E. (2013). Description of a new Dermacentor (Acari: Ixodidae) species, a parasite of wild mammals in Central America. *Journal of medical entomology*, 50(6), 1190–1201. <https://doi.org/10.1603/me13121>
- Barbieri, A.R., Romero, L., Labruna, M.B. (2012). *Rickettsia bellii* infecting *Amblyomma sabanerae* ticks in El Salvador. *Pathog Glob Health* 106(3):188-189. <https://doi.org/10.1179/2047773212Y.0000000022>
- Barros-Battesti, D. M., Ramirez, D. G., Landulfo, G. A., Faccini, J. L., Dantas-Torres, F., Labruna, M. B., Venzal, J. M., & Onofrio, V. C. (2013). Immature argasid ticks: diagnosis and keys for Neotropical region. *Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, 22(4), 443–456. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612013000400002>
- Beati, L., & Klompen, H. (2019). Phylogeography of Ticks (Acari: Ixodida). *Annual review of entomology*, 64, 379–397. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043027>
- Bermúdez, S., & Miranda, R. (2011). Distribution of ectoparasites of *Canis lupus familiaris* L. (Carnivora: Canidae) from Panama. *Revista MVZ Córdoba*, 16(1), 2274-2282. Retrieved October 25, 2024, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0122-02682011000100002&lng=en&tlng=en.
- Bermúdez, S., Mejia, L., Hernández, L. & Apanaskevich, D. (2015). First record of *Ixodes boliviensis* Neumann, 1904 and *Dermacentor dissimilis* Cooley, 1947 (Ixodida: Ixodidae) as parasites of domestic mammals in Nicaragua. *Systematic and Applied Acarology*. 20. 462-464. 10.11158/saa.20.4.12
- Bermúdez, S.E., Castillo, E., Pohlenz, T.D., Kneubehl, A., Krishnavajhala, A., Domínguez, L.,

- Suárez, A., López, J.E. (2017). New records of *Ornithodoros puertoricensis* Fox 1947 (Ixodida: Argasidae) parasitizing humans in rural and urban dwellings, Panama. *Ticks Tick Borne Dis* 8(4):466–469. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.02.004>
- Bermúdez, C., & Troyo, A. (2018). A review of the genus *Rickettsia* in Central America. *Research and reports in tropical medicine*, 9, 103–112. <https://doi.org/10.2147/RRTM.S160951>
- Bermúdez, S., Apanaskevich, D., Domínguez, L. (2018). Garrapatas Ixodidae de Panamá. ISBN 978-9962-699-25-5. 129 pp.
- Bermúdez, C.S.E., Félix, M.L., Domínguez, A.L., Kadoch, N., Muñoz-Leal, S., Venzal, J.M. (2021a). Molecular screening for tick-borne bacteria and hematozoa in *Ixodes* cf. *boliviensis* and *Ixodes tapirus* (Ixodida: Ixodidae) from western highlands of Panama. *Curr Res Parasitol Vector Borne Dis* 1:100034. <https://doi.org/10.1016/j.crvbd.2021.100034>
- Bermúdez, C.S., Domínguez, A.L., Troyo, A., Montenegro, H.V. M., & Venzal, J. M. (2021b). Ticks infesting humans in Central America: A review of their relevance in public health. *Current research in parasitology & vector-borne diseases*, 2, 100065. <https://doi.org/10.1016/j.crvbd.2021.100065>
- Bermúdez, S., Romero, L., Labruna, M. (2023) Letter to the editor comment on: First report of multiple *Rickettsia* sp., *Anaplasma* sp., and *Ehrlichia* sp. in the San Miguel department of El Salvador from Zoonotic Tick Vectors. *Acta Trop.* 243:106932. <http://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.106932>
- Charles, R. A., Bermúdez, S., Banović, P., Alvarez, D. O., Díaz-Sánchez, A. A., Corona-González, B., Etter, E., Rodríguez González, I., Ghafar, A., Jabbar, A., Moutailler, S., & Cabezas-Cruz, A. (2021). Ticks and Tick-Borne Diseases in Central America and the Caribbean: A One Health Perspective. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(10), 1273. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101273>
- Dantas-Torres, F., Fernandes Martins, T., Muñoz-Leal, S., Onofrio, V. C., & Barros-Battesti, D. M. (2019). Ticks (Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil: Updated species checklist and taxonomic keys. *Ticks and tick-borne diseases*, 10(6), 101252. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.06.012>

- Durden, L.A., & Keirans, J.E. (1996) Nymphs of the genus *Ixodes* (Acari: Ixodidae) of the United States: taxonomy, identification key, distribution, hosts, and medical/veterinary importance. Monographs, Thomas Say Publication in Entomology. Entomological Society of America, Lanham, Maryland, 95 pp. <https://doi.org/10.4182/MAMR9602.1996.5>
- Dye-Braumuller, K. C., Rodríguez Aquino, M. S., Self, S., Kanyangarara, M., & Nolan, M. S. (2022). Spotted Fever Group Rickettsioses in Central America: The Research and Public Health Disparity among Socioeconomic Lines. *Insects*, 13(8), 674. <https://doi.org/10.3390/insects13080674>
- 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>
- Guglielmone, A.A., Estrada-Peña, A., Keirans, A.J, Robbins, R.G. (2004). Las garrapatas (Acari. Ixodida) de la región zoogeográfica neotropical. ISBN 985-521-125-7, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires, Argentina, 142 pp.
- Guglielmone, A.A., Nava, S., & Robbins, R.G. (2021). Neotropical Hard Ticks (Acari: Ixodida: Ixodidae). Cham: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-72353-8>
- Guglielmone, A. A., Nava, S., & Robbins, R. G. (2023). Geographic distribution of the hard ticks (Acari: Ixodida: Ixodidae) of the world by countries and territories. *Zootaxa*, 5251(1), 1–274. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5251.1.1>
- Guindon, S., & Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52:696–704. <https://doi.org/10.1080/10635150390235520>
- Hutcheson, H. J., Mertins, J. W., Kondratieff, B. C., & White, M. M. (2021). Ticks and Tick-Borne Diseases of Colorado, Including New State Records for *Argas radiatus* (Ixodida: Argasidae) and *Ixodes brunneus* (Ixodida: Ixodidae). *Journal of medical entomology*, 58(2), 505–517. <https://doi.org/10.1093/jme/tjaa232>

- Katoh, K. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* 30:3059–3066. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf436>
- Kennedy, A., & Winter, W. (2022). First records of *Ixodes brunneus* (Acari: Ixodidae) in Delaware. *Ticks and tick-borne diseases*, 13(2), 101888. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101888>
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol* 33:1870–1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Labruna, M. B., Whitworth, T., Horta, M. C., Bouyer, D. H., McBride, J. W., Pinter, A., Popov, V., Gennari, S. M., & Walker, D. H. (2004). Rickettsia species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *Journal of clinical microbiology*, 42(1), 90–98. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.1.90-98.2004>
- Labruna, M. B., Sanfilippo, L. F., Demetrio, C., Menezes, A. C., Pinter, A., Guglielmone, A. A., & Silveira, L. F. (2007). Ticks collected on birds in the state of São Paulo, Brazil. *Experimental & applied acarology*, 43(2), 147–160. <https://doi.org/10.1007/s10493-007-9106-x>
- López, Y., Robayo-Sánchez, L. N., Muñoz-Leal, S., Aleman, A., Arroyave, E., Ramírez-Hernández, A., Cortés-Vecino, J. A., Mattar, S., & Faccini-Martínez, Á. A. (2021). *Ornithodoros puertoricensis* (Ixodida: Argasidae) Associated With Domestic Fowl in Rural Dwellings From Córdoba Department, Caribbean Colombia. *Frontiers in veterinary science*, 8, 704399. <https://doi.org/10.3389/fvets.2021.704399>
- Mangold, A.J., Barges, M.D. & Mas-Coma, S. (1998). Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, 84, 478-484.
- Martins, T. F., Onofrio, V. C., Barros-Battesti, D. M., & Labruna, M. B. (2010). Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescrptions, and identification key. *Ticks and tick-borne diseases*, 1(2), 75–99.

<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2010.03.002>

Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2011). *Integración de la información existente relacionada con el estudio en formato fichas de las áreas de conservación*. MARN.

https://www.birdlist.org/downloads/cam/el_salvador/areas_protegidas_prioritarias_el_salvador.pdf

Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2021). *Legislación Ambiental El Salvador, 2021* (segunda edición). MARN.

<https://bibliotecaambiental.ambiente.gob.sv/por-categoria/?cat=legislacion-ambiental>

Moreira-Soto, R.D., Moreira-Soto, A., Calderón-Arguedas, Ó., Jiménez, M., Corrales-Aguilar, E., & Troyo, A. (2023). Detection of Rickettsia spp. in ticks of wildlife fauna from Costa Rica: First report of Rickettsia rhipicephali in Central America. *Ticks and tick-borne diseases*, 14(1), 102071. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.102071>

Muñoz-Leal, S., Venzal, J.M., Jorge, F.R., Teixeira, B.M., Labruna, M.B. (2021). A new species of soft tick from dry tropical forests of Brazilian Caatinga. *Ticks Tick Borne Dis* 12(5):101748. <http://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101748>

Nava S, Mangold AJ, Guglielmone AA (2009) Field and laboratory studies in a Neotropical population of the spinose ear tick, *Otobius megnini*. *Med Vet Entomol* 23(1):1–5. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2008.00761.x>

Nava, S., Venzal, J. M., Terassini, F. A., Mangold, A. J., Camargo, L. M. A., & Labruna, M. B. (2010). DESCRIPTION OF A NEW ARGASID TICK (ACARI: IXODIDA) FROM BAT CAVES IN BRAZILIAN AMAZON. *The Journal of Parasitology*, 96(6), 1089–1101. <http://www.jstor.org/stable/40962042>

Nava, S., Beati, L., Venzal, J.M., Durden, L.A., Bermudez, S.E., Tarragona, E.L., Mangold, A.J., Gleason, D., Mastropaolo, M., Guglielmone, A.A. (2023). Description of two new species in the *Ixodes ricinus* complex from the New World (Acari: Ixodidae), and redescription of *Ixodes affinis* Neumann, 1899. *Zootaxa* 5361(1):53-73. <http://doi.org/10.11646/zootaxa.5361.1.2>

Paddock, C. D., Yoshimizu, M. H., Zambrano, M. L., Lane, R. S., Ryan, B. M., Espinosa, A.,

- Hacker, J. K., Karpathy, S. E., & Padgett, K. A. (2018). Rickettsia Species Isolated from Dermacentor occidentalis (Acari: Ixodidae) from California. *Journal of medical entomology*, 55(6), 1555–1560. <https://doi.org/10.1093/jme/tjy100>
- Parola, P., Paddock, C.D., Socolovschi, C., Labruna, M.B., Mediannikov, O., Kernif, T., Abdad, M.Y., Stenos, J., Bitam, I., Fournier, P.E., Raoult, D. (2013). Update on tickborne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin Microbiol Rev* 26:657–702. <https://doi.org/10.1128/CMR.00032-13>
- Paternina, L., Díaz, Y., Paternina, M., & Bejarano, E. (2009). Canis familiaris, a New Host of Ornithodoros (A.) puertoricensis Fox, 1947 (Acari: Ixodida) in Colombia. *Acta Biológica Colombiana*. 14. 154-160.
- Polsomboon, N.S., Bourke, B.P., Badr, R., Tarpey, J., Caicedo-Quiroga, L., Leiva, D., Pott, M., Cruz, A., Chao, C.C., Achee, N.L., Grieco, J.P., Jiang, L., Jiang, J., Farris, C.M., & Linton, Y.M. (2022). Ticks (Acari: Ixodidae) and Associated Pathogens Collected From Domestic Animals and Vegetation in Stann Creek District, Southeastern Belize, Central America. *Journal of medical entomology*, 59(5), 1749–1755. <https://doi.org/10.1093/jme/tjac112>
- Regnery, R.L., Spruill, C.L. & Plikaytis, B.D. (1991). Genotypic identification of *Rickettsiae* and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *Journal of Bacteriology*, 173, 1576-1589.
- Romero, L., Costa, F. B., & Labruna, M. B. (2021). Ticks and tick-borne Rickettsia in El Salvador. *Experimental & applied acarology*, 83(4), 545–554. <https://doi.org/10.1007/s10493-021-00610-w>
- Romero, L. E., Binder, L. C., Marcili, A., & Labruna, M. B. (2023). Ticks and tick-borne rickettsiae from dogs in El Salvador, with report of the human pathogen Rickettsia parkeri. *Ticks and tick-borne diseases*, 14(5), 102206. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2023.102206>
- Saracho-Bottero, M.N., Beati, L., Venzal, J.M., Guardia, L., Thompson, C.S., Mangold, A.J., Guglielmo, A.A., Nava, S. (2021). *Ixodes silvanus* n. sp. (Acari: Ixodidae), a new member of the subgenus *Trichotoixodes* Reznik, 1961 from northwestern Argentina. *Ticks Tick Borne Dis* 12(1):101572. <http://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101572>

- Soares, J.F., Labruna, M.B., de Amorim, D.B., Baggio-Souza, V., Fagundes-Moreira, R., Giroto-Soares, A., Weck, B., Nunes, P.H., Martins, T.F. (2023). Description of *Amblyomma monteiroae* n. sp. (Acari: Ixodidae), a parasite of the great horned owl (Strigiformes: Strigidae) in southern Brazil. *Ticks Tick Borne Dis* 14(6):102239. <http://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2023.102239>
- Troyo, A., Moreira-Soto, A., Carranza, M., Calderón-Arguedas, O., Hun, L., & Taylor, L. (2014). Detection of an undescribed *Rickettsia* sp. in *Ixodes boliviensis* from Costa Rica. *Ticks and tick-borne diseases*, 5(6), 883–886. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.07.017>
- Zarate-Ram, J.J. & Nevarez-Ga, A.M. & Zamora-Avi, D.E. & Rodriguez-Tovar, Luis. (2014). Myotonia and Colic Associated with the Spinose Ear Tick, *Otobius megnini*, in a Horse in Northern Mexico. *Research Journal of Parasitology*. 9. 16-20. 10.3923/jp.2014.16.20
- Zeringóta, V., Maturano, R., Luz, H. R., Senra, T., Daemon, E., Faccini, J., & McIntosh, D. (2017). Molecular detection of *Rickettsia rhipicephali* and other spotted fever group *Rickettsia* species in *Amblyomma* ticks infesting wild birds in the state of Minas Gerais, Brazil. *Ticks and tick-borne diseases*, 8(1), 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.10.001>

7 DISCUSIÓN GENERAL

Las garrapatas son ectoparásitos que representan importancia como zoonosis, reconociendo en América Central al menos 15 especies con capacidad de parasitar humanos (Springer et al., 2018). Al menos ocho de estas especies reportadas en personas fueron registradas para El Salvador y la presencia de especies aún no completamente identificadas junto a la existencia de posibles nuevas especies, como el caso de la ninfa de *Ixodes*, incrementan la posibilidad de encontrar algunas de importancia en salud pública. Esta situación también incrementa la posibilidad de hallazgo de agentes patógenos asociados a estas garrapatas. Entre los microorganismos que pueden transmitir las garrapatas, las especies del género *Rickettsia* son relevantes, debido a que las garrapatas son vectores importantes de estos agentes pudiendo adquirirlos y transmitirlos entre hospederos.

La rickettsiosis en El Salvador forma parte de un grupo de enfermedades desatendidas, de las cuales no se cuenta con registros de afectación, aunque existe evidencia de circulación de los agentes responsables de la enfermedad en el país (Global surveillance of rickettsial diseases: memorandum from a WHO meeting, 1993; Dye-Braumuller et al., 2022).

En el mundo al menos 60 especies de *Rickettsia* han sido detectadas en garrapatas, entre especies patógenas, no patógenas y de patogenicidad desconocida (Bermúdez et al., 2021b). En esta investigación se ha demostrado en El Salvador la presencia de agentes del género *Rickettsia* del GFM, en garrapatas procedentes de animales domésticos y animales silvestres, así como garrapatas obtenidas de ambientes silvestres a la espera de un hospedador competente y se reportan especies inéditas para el país, que requieren de investigación para establecer su importancia como agentes patógenos.

El hallazgo de doce especies de garrapatas de la familia Ixodidae: *Amblyomma dissimile*, *Amblyomma longirostre*, *Amblyomma mixtum*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma* cf. *parvum*, *Amblyomma sabanerae*, *Amblyomma scutatum*, *Dermacentor panamensis*, *Ixodes* cf. *boliviensis*, *Ixodes* sp, *Rhipicephalus sanguineus* s.l., *Rhipicephalus microplus* y dos especies de garrapatas de la familia Argasidae: *Ornithodoros puertoricensis* y *Otobius megnini*; de las cuales cinco especies corresponden al primer reporte en El Salvador, exponen la necesidad de evaluar las especies de garrapatas presentes en el país, en tanto que países cercanos poseen registro de gran diversidad de especies de garrapatas (Guglielmone et al., 2021). Con estos hallazgos, El Salvador incrementa su

fauna de garrapatas en 17 especies, 13 de ellas pertenecientes a garrapatas duras, muy por debajo de los reportes del resto de países de América Central como Costa Rica y Panamá con 40 y 39 especies de garrapatas duras respectivamente, seguidos de Guatemala con 33, Nicaragua con 24, Belice con 22 y Honduras con 19 especies (Guglielmone et al., 2021). El Salvador continúa siendo el país con menor cantidad de especies de garrapatas duras registradas, pero con esta investigación deja de formar parte de los únicos dos países en América continental sin reporte de especies del género *Ixodes* (Guglielmone et al., 2021). Queda aún pendiente la identificación de especie de la ninfa de *Ixodes* con la que se presentan dos especies del género.

De las especies de garrapatas identificadas en este estudio cuatro fueron compartidas entre animales domésticos y animales o ambientes silvestres y corresponden a las especies *A. mixtum*, *A. ovale*, *A. cf. parvum* e *I. cf. boliviensis*. Otras cuatro especies se reportaron únicamente en animales domésticos: *R. sanguineus* s.l., *R. microplus* y *O. puertoricensis* en perros; y *O. megnini* en equinos; sin embargo, para el caso de miembros del género *Ornithodoros*, éstos se encuentran asociados primariamente a madrigueras o nidos de diversidad de vertebrados silvestres (Bermúdez et al., 2017). Las restantes seis especies de garrapatas fueron propias de animales o ambientes silvestres: *A. dissimile*, *A. longirostre*, *A. sabanerae*, *A. scutatum* y *D. panamensis*. A este grupo se agrega la ninfa de *Ixodes* sp. encontrada en ambiente silvestre. Casi todas las especies identificadas para El Salvador en animales domésticos, incluyendo a las compartidas con vida silvestre, poseen reportes de afectación en humanos de América Central, a excepción de *O. megnini* la cual posee reportes de afectación en humanos de Norte América (Eisen 2022). El hallazgo de especies de garrapatas compartidas entre animales domésticos y silvestres en El Salvador evidencia un posible riesgo de transmisión de microorganismos entre ambos grupos de animales y el ser humano, que incluye a patógenos del género *Rickettsia*.

De las especies de *Rickettsia*, se logró la identificación de tres especies: *R. amblyommatis*, *R. parkeri* strain Atlantic rainforest y *Rickettsia rhipicephali*. Además, se detectaron dos especies aún no completamente identificadas: *Rickettsia* endosymbiont of *Ixodes boliviensis* y *Rickettsia* sp. ES-A.cf.*parvum*, esta última muy relacionado al clado *R. amblyommatis*.

Con estos hallazgos, El Salvador incrementa la cantidad de especies de *Rickettsia* a cuatro conocidas y tres especies aún no completamente identificadas desde garrapatas, posicionándose como el segundo país de América Central con mayor cantidad de especies de *Rickettsia*

identificadas en garrapatas. Estudios previos hacen cuenta de al menos cinco especies conocidas para Costa Rica y cuatro especies aún no completamente identificadas desde garrapatas. Este país presenta la mayor cantidad de especies reconocidas y la única especie obtenida desde garrapatas de la familia Argasidae. Seguido se encuentra Panamá con tres especies reconocidas y cuatro aún no completamente identificadas, Nicaragua con dos especies conocidas (una de ellas con una posible incorrecta identificación) y dos sin identificar, Belice posee al menos dos especies identificadas y una sin identificar, Honduras una especie identificada y una aún no completamente identificada y Guatemala posee un único reporte, sin identificar la especie correspondiente (Bermúdez & Troyo 2018; Krawczak & Labruna 2018; Bermúdez et al., 2021b).

El reporte de relación entre especies de *Rickettsia* y especies de garrapatas en El Salvador es importante para establecer la epidemiología de los agentes circulantes y posibles riesgos de transmisión hacia animales y población salvadoreña. Entre las garrapatas detectadas en animales domésticos y ambientes silvestres, la especie *A. mixtum* es un importante agente en humanos de América Central, muy agresiva en todos sus estadios, por lo que se considera una especie relevante para la salud humana por su relación con patógenos y afectaciones a la salud (Bermúdez et al., 2021c). Ha sido propuesta como el vector de *R. rickettsii* en área rural de Panamá (Martínez-Caballero et al., 2018) y parece tener una estrecha relación con *R. amblyommatis*, considerando los elevados porcentajes de hallazgo con este microorganismo en 36 de las 39 garrapatas *A. mixtum* (92%) provenientes de perro en la presente investigación y resultados similares en América Central con porcentajes tan elevados como el 91% (Troyo et al., 2016; Bermúdez et al., 2021b). En la presente investigación no se detectó alguna *Rickettsia* en esta especie de garrapata proveniente de ambientes silvestres. Con relación a *R. amblyommatis* aunque hasta el momento no ha sido aislada desde humanos con síntomas de rickettsiosis, su ubicación en el GFM y la presencia de una gran cantidad de genes de virulencia con similitud de aminoácidos de hasta un 95% con las especies patógenas de este grupo, unido al hecho de enfermedad observada en animales de laboratorio y la propuesta de posibilidad de causar enfermedad febril autolimitante en humanos, con mayor riesgo en personas inmunocomprometidas (Yen et al., 2021), determinan la necesidad de continuar con estudios y vigilancia de este agente y sus vectores. Esta especie de *Rickettsia* también parece presentar asociación con la garrapata *A. cf parvum*, de El Salvador, estudios previos en el país demuestran porcentajes de asociación del 50% (Romero et al., 2021), mismo resultado obtenido

en la presente investigación. En un par de perros incluidos en este estudio, se observó coinfección con ambas especies de garrapatas, con presencia de *R. amblyommatis* en ellas.

También en la especie de garrapata *A. cf. parvum*, en una de las muestras, se obtuvo secuencias de una rickettsia aquí denominada como *Rickettsia* sp. ES-A.cf.parvum, cuyo análisis filogenético conformó un clado muy relacionado a *R. amblyommatis*. Estudios de patogenicidad de *R. amblyommatis* han permitido establecer la hipótesis de que la existencia de diferentes cepas de esta especie podría ser la causa de resultados variables descritos en cuanto a su virulencia (Richardson et al., 2023). Debido a que el análisis filogenético de *Rickettsia* sp. ES-A.cf.parvum revela que esta podría representar una nueva especie estrechamente relacionada a *R. amblyommatis* o una cepa de ésta, el hallazgo representa importancia para su vigilancia en salud pública. En cuanto a la garrapata *A. cf. parvum* posee reportes muy poco frecuentes de afectación al ser humano en América Central (Bermúdez et al., 2021c) y asimismo posee pocos reportes de su presencia en especies animales que incluye a equinos y bovinos de Nicaragua y perros de Guatemala (Düttmann et al., 2016; Tian et al., 2024); sin embargo, resultó una especie muy prevalente en amplio rango geográfico en perros de El Salvador con poco más del 10% de perros parasitados. Hasta el momento, para esta garrapata, los resultados de divergencia genética permitieron establecer la hipótesis de especies crípticas y se estableció que en realidad *A. parvum* representa un complejo de especies en la región, determinando que la garrapata presente en América Central es diferente a la especie *A. parvum* existente en América del Sur (Lado et al., 2016), por lo que, de la especie en América Central, aún se desconoce su potencial transmisor de agentes y afectación en humanos y animales.

Una situación similar a la especie *A. cf. parvum* podría ocurrir en América Central con la garrapata *I. cf. boliviensis*, relacionado a variabilidad genética que podría deberse a presencia de especies diferentes en la región. Investigaciones en esta especie han establecido que la garrapata de América Central podría no ser la misma de Sur América; esto es relevante en salud pública ya que los reportes de afectación en humanos existen únicamente en América Central y no en Sur América (Bermúdez et al., 2021a). Los hallazgos de la presente investigación revelan diferencias en la secuenciación de genes de identificación con un marcado polimorfismo con relación a *I. boliviensis* de América del Sur, pero además los haplotipos del 16S rRNA de los especímenes salvadoreños fueron diferentes a especímenes procedentes de Costa Rica y Panamá, lo que podría

deberse a la presencia de un complejo de especies o a un taxón con alta diversidad genética. La garrapata *I. cf. boliviensis* se asocia principalmente a carnívoros silvestres y domésticos, pero puede afectar a otros hospederos mamíferos de forma ocasional, incluyendo al ser humano (Bermúdez et al., 2021a). Al igual que las especies de garrapatas anteriores, es considerada relevante en salud pública en América Central por su relación con patógenos y afectaciones a la salud (Bermúdez et al., 2021c). Con respecto a presencia de microorganismos en esta garrapata, aunque el género *Ixodes* presenta especies de *Rickettsia* asociados a ellas y algunas causantes de enfermedad en humanos, en la especie de América Central se ha detectado únicamente a la *Rickettsia* endosymbiont of *Ixodes boliviensis*, con registros en Costa Rica y Panamá sin establecer su importancia como patógeno en animales o el ser humano (Bermúdez et al. 2021a; Moreira-Soto et al. 2023). En la presente investigación esta especie de *Rickettsia* fue observada en garrapatas *I. cf. boliviensis* colectadas desde ambiente y proveniente de hospedero de la misma zona.

Con respecto a la garrapata *A. ovale*, esta también se considera una especie relevante para la salud humana en América Central por su relación con patógenos y afectaciones a la salud. Se ha reportado como una especie frecuente en humanos de América Central y asociada a un caso de parálisis en un soldado de Estados Unidos en Panamá (Bermúdez et al., 2021c). En la presente investigación se detectó a una garrapata de esta especie infectada con *R. parkeri* strain Atlantic rainforest proveniente de un perro del distrito de Santa Tecla, específicamente en el área del Volcán de San Salvador. En América Central el reporte oficial corresponde a Belice y ahora El Salvador; sin embargo, como se ha descrito anteriormente, el reporte de *R. africae* en Nicaragua puede corresponder en realidad a *R. parkeri*. Esta especie de *Rickettsia* está asociada a la garrapata *A. ovale* y es un patógeno importante en humanos de América del Norte y del Sur (Acosta et al., 2018). Aunque no existen aislamientos en humanos de la región, se ha reportado serología positiva a este agente en humanos en Nicaragua y Honduras (Reller et al., 2016). En El Salvador, la zona de detección del agente posee áreas recreacionales y parques ecoturísticos cercanos; además de núcleos poblacionales. Todo lo expuesto anteriormente, justifica una vigilancia del agente y su vector en el país, debido a que el hallazgo establece un posible riesgo de afectación en la población salvadoreña.

Entre las especies de garrapatas identificadas únicamente en animales domésticos, se encuentran especies importantes en Medicina Veterinaria y Salud Pública. *R. sanguineus* s.l., se considera

una especie relevante en América Central por su relación con patógenos y afectaciones a la salud humana. Esta garrapata se ha adaptado a ambientes domésticos que le ofrecen condiciones adecuadas para su establecimiento y aunque se reportan hallazgos esporádicos en humanos (Bermúdez et al., 2021c), su importancia se ha demostrado como potencial vector de *R. rickettsii* en el área urbana en Panamá, por su asociación con este agente en garrapatas de ese país (Martínez-Caballero et al., 2018). Hasta el momento en El Salvador, como evidenciado en esta investigación, en cuanto a especies de *Rickettsia*, únicamente se ha relacionado con la especie *R. amblyommatis*. Otra especie del género *Rhipicephalus* observada en este estudio fue la garrapata *R. microplus*, con un solo hallazgo en un perro del distrito de Chalatenango. Esta garrapata posee reportes esporádicos parasitando humanos en América Central e incluye a El Salvador. Esta es la garrapata más importante en ganado bovino en todo el mundo y responsable de la transmisión de *Babesia* y *Anaplasma* en ganado bovino (Bermúdez et al., 2021c). No se evidenció presencia de alguna especie de *Rickettsia* en la presente investigación.

También en animales domésticos se reportan para el país dos especies de garrapatas de la familia Argasidae que corresponden a nuevos hallazgos para el país: *O. puertoricensis* y *O. megnini*. Para el caso de la primera especie perteneciente al género *Ornithodoros*, en América Central se considera una especie de importancia en salud humana por su relación con *Borrelia puertoricensis*, causante de la fiebre recurrente transmitida por garrapatas en Panamá, de la que esta garrapata es considerada reservorio y vector competente (Bermúdez et al., 2021c). Un estudio llevado a cabo también en Panamá estableció la probabilidad de que esta garrapata pueda completar parte de su ciclo alimentándose exclusivamente de seres humanos (Bermúdez et al., 2017). Los reportes de fiebre recurrente en América Central y de agentes presentes en esta especie de garrapata en Panamá y el actual hallazgo de *O. puertoricensis* en El Salvador, establecen la necesidad de continuar la vigilancia de esta garrapata en el país y establecer el riesgo de causa de fiebre recurrente en la población salvadoreña. Con respecto a la garrapata del género *Otobius*, la especie *O. megnini* se caracteriza por su ubicación en el canal auricular externo de animales domésticos que incluyen a bovinos, ovinos, caprinos, camélidos de Sur América, perros y caballos; sin embargo, existe reporte de afectación en humanos y corresponde a la especie de garrapata blanda con mayores reportes de afectación en humanos de Estados Unidos (Nava et al., 2009; Eisen 2022). Aunque existe una amplia presencia de esta especie de garrapata en América del Norte y del Sur, su presencia en América Central ha sido limitada a equinos de Guatemala (Guglielmone et al., 2004).

Nava et al. (2009), sugiere conespecificidad entre garrapatas de América del Norte y del Sur con diferencias biológicas debido a adaptaciones de sobrevivencia a condiciones ambientales. En el presente estudio, el análisis filogenético de *O. megnini* de El Salvador, conformó un mismo clado con *O. megnini* de Argentina sugiriendo conespecificidad. Ninguna especie de *Rickettsia* fue encontrada en esta especie de garrapata.

Referente a las garrapatas encontradas únicamente desde ambientes silvestres, *A. dissimile*, *A. sabanerae* y *A. scutatum* corresponden a garrapatas comunes en reptiles y anfibios de El Salvador (Romero et al., 2021); aunque en ellas no se evidenció presencia de alguna especie de *Rickettsia* en el presente estudio, previamente se han encontrado infectadas con “*Ca. Rickettsia colombianensi*” en *A. dissimile* y *A. scutatum* y *R. bellii* en *A. dissimile* y *A. sabanerae* en El Salvador (Romero et al., 2021). Estas mismas especies de garrapatas poseen reportes de “*Ca. Rickettsia colombianensi*” o *R. bellii* en Honduras, Costa Rica y Panamá (Barbieri et al., 2012; Bermúdez & Troyo 2018). Las especies *A. dissimile* y *A. sabanerae* poseen reportes muy raros de afectación en humanos de América Central (Bermúdez et al., 2021c).

En vida silvestre también se identificaron las especies de garrapatas *A. longirostre* y *D. panamensis*. Ambas especies de garrapatas, en su fase adulta, poseen como hospedero principal al puercoespín, que también fue evidenciado para El Salvador. En la presente investigación se determinó presencia de especie de *Rickettsia* en todas las garrapatas *D. panamensis*, reportando el primer hallazgo de un agente asociado a esta especie de garrapata e incluyéndola entre las especies con reporte de *R. rhipicephali* en el mundo. Un resultado diferente se observó para la especie de garrapata *A. longirostre* en la que no se evidenció ningún agente del género *Rickettsia*; sin embargo, en América Central existe reporte de presencia de *R. amblyommatis* en Costa Rica y Honduras (Charles et al., 2021). Una observación interesante en la presente investigación es el hecho de haber identificado *R. rhipicephali* en *D. panamensis* pero no en *A. longirostre* a pesar de que algunas garrapatas de ambas especies fueron colectadas al mismo tiempo desde el mismo hospedero.

El análisis de los resultados permite establecer que, aunque no se evidenció la presencia de *R. rickettsii* en ninguna de las muestras de garrapata en la presente investigación, se identifican especies del género *Rickettsia* pertenecientes al GFM, incluyendo a *R. parkeri* strain Atlantic rainforest, causante de enfermedad en humanos de América del Norte y del Sur. El GFM posee

especies patógenas para el ser humano y animales, por lo que el hallazgo de diferentes especies de este grupo en garrapatas de animales domésticos y desde ambientes silvestres representa interés en salud pública. Los perros pueden funcionar como vínculo entre garrapatas y sus patógenos en áreas silvestres hacia ambientes humanos (Ortiz et al., 2021) y en la búsqueda de rickettsias desde áreas silvestres, también resulta importante evaluar perros que poseen la libertad de desplazarse entre los diferentes ambientes. Evaluaciones serológicas en perros domésticos de Brasil, ha evidenciado alta seroprevalencia a *Rickettsia*, hasta del 64.2%, indicando contacto previo con estos agentes (de Sousa et al., 2018). En América Central, Costa Rica y Panamá evidencian serología positiva a *Rickettsia* en perros con porcentajes del 10 y 65% respectivamente (Bermúdez et al., 2011; Pacheco-Solano et al., 2019). En el área metropolitana de Costa Rica en zonas de reporte de rickettsiosis en humanos, perros evaluados presentaron seroreactividad en un 18.5% debido principalmente a *R. rickettsii* o una especie muy similar, así como a *R. amblyommatis* y *R. rhipicephali* (Moreira-Soto et al., 2016). La población salvadoreña, puede mantener contacto con garrapatas y especies de *Rickettsia*, a través de perros, además de factores de riesgo como el uso de tierras, fragmentación de bosques y creación de asentamientos cercanos a bosques, lo que incrementa el contacto de animales domésticos y el ser humano con garrapatas de ambientes silvestres y que a la vez aumenta el riesgo de contacto con patógenos desde estas áreas (Ortiz et al., 2021). Este podría ser el caso de *A. ovale* en América Central, debido a que esta garrapata habita en la cercanía a bosques y bajo circunstancias como la deforestación o la pérdida de hábitat obliga a pequeños mamíferos, de los que fases inmaduras de esta garrapata se alimenta, a contacto con áreas periurbanas; otro ejemplo es la garrapata *A. mixtum* importante agente de humanos, que debido a la deforestación por ganaderías puede incrementar contacto con humanos y animales. Este mismo riesgo se observa con la garrapata *R. sanguineus* s.l., debido a que la alteración del ambiente con presencia de perros permite su establecimiento y se ha hipotetizado que puede constituir ciclos urbanos con agentes patógenos silvestres, como se ha observado en *R. rickettsii*, y su presencia en áreas urbanizadas desde vida silvestre (Ortiz et al., 2021).

Considerando el reporte de especies de garrapatas y de especies de *Rickettsia* inéditas para el país, algunas aún no completamente identificadas, es clara la necesidad de continuar en el proceso de caracterización de estos agentes para establecer su verdadero impacto como patógenos para animales y la población salvadoreña.

8 CONCLUSIONES

Debido a la diversidad genética observada en garrapatas de El Salvador, el empleo de técnicas moleculares resulta indispensable para la confirmación de especies, hasta el establecimiento de claves de identificación específicas para la fauna de garrapatas de América Central.

Perros y caballos de El Salvador representan riesgo de transmisión de garrapatas a la población salvadoreña ya que pueden albergar al menos ocho especies diferentes de estos ectoparásitos, con reportes de afectación en seres humanos. Al menos siete de estas especies de garrapatas fueron colectadas desde perros y de estas, cuatro estuvieron también presentes en animales silvestres.

El análisis filogenético de las especies de garrapatas y *Rickettsia* identificadas en El Salvador revela una diversidad genética importante en América Central, que podría representar la presencia de nuevas especies tanto de garrapatas como de *Rickettsia* aún no descritas en la comunidad científica internacional, con importancia en salud pública aún desconocida.

Las secuencias del gen 16S rRNA de garrapatas, generadas en esta investigación, proveen de información útil para la caracterización molecular de estas especies. Al menos dos secuencias en particular, para las que previamente no se contaba con secuencias en el banco genético mundial, serán de utilidad para comparación de secuencias futuras en el país y el mundo.

Se ha demostrado que garrapatas desde ambientes domésticos y silvestres en El Salvador cuentan con especies de *Rickettsia* del GFM, con potencial riesgo de afectación en la salud de animales y humanos. La presencia de *R. parkeri* strain Atlantic rainforest, reconocido patógeno de humanos en América, presenta el mayor riesgo de rickettsiosis que debería considerarse en el diagnóstico diferencial de enfermedades febriles en la población salvadoreña.

La distribución geográfica observada para las especies de garrapatas parece establecer áreas delimitadas para ciertas especies como *I. cf. boliviensis* y más amplia para otras como *R. sanguineus* s.l. Los resultados claramente establecen la necesidad de investigar una mayor cantidad de hospederos y establecer una distribución espacial más detallada para enriquecer la información epidemiológica de las especies de garrapatas y la distribución de las especies de *Rickettsia* asociadas a ellas en El Salvador, principalmente desde ambientes silvestres.

10 REFERENCIAS

- Acosta, I., Luz, H. R., Faccini-Martínez, Á. A., Muñoz-Leal, S., Cerutti Junior, C., & Labruna, M. B. (2018). First molecular detection of Rickettsia sp. strain Atlantic rainforest in Amblyomma ovale ticks from Espírito Santo state, Brazil. *Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology: Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, 27(3), 420–422. <https://doi.org/10.1590/s1984-296120180017>
- Álvarez-Hernández, G., Roldán, J. F. G., Milan, N. S. H., Lash, R. R., Behravesh, C. B., & Paddock, C. D. (2017). Rocky Mountain spotted fever in Mexico: past, present, and future. *The Lancet. Infectious diseases*, 17(6), e189–e196. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30173-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30173-1)
- Barbieri, A. R., Romero, L., & Labruna, M. B. (2012). Rickettsia bellii infecting Amblyomma sabanerae ticks in El Salvador. *Pathogens and global health*, 106(3), 188–189. <https://doi.org/10.1179/2047773212Y.0000000022>
- Banco Central de Reserva. (2024). VII censo de población y VI de vivienda El Salvador 2024. <https://censo2024.bcr.gob.sv/wp-content/uploads/tablas-geoportal/informe-resultados-censo-poblacion-vivienda-el-salvador-2024.pdf?download=1>
- Bermúdez, C. S., Zaldívar, A. Y., Spolidorio, M. G., Moraes-Filho, J., Miranda, R. J., Caballero, C. M., Mendoza, Y., & Labruna, M. B. (2011). Rickettsial infection in domestic mammals and their ectoparasites in El Valle de Antón, Coclé, Panamá. *Veterinary parasitology*, 177(1-2), 134–138. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2010.11.020>
- Bermúdez, S. E., Castro, A. M., Trejos, D., García, G. G., Gabster, A., Miranda, R. J., Zaldívar, Y., & Paternina, L. E. (2016). Distribution of Spotted Fever Group Rickettsiae in Hard Ticks (Ixodida: Ixodidae) from Panamanian Urban and Rural Environments (2007-2013). *EcoHealth*, 13(2), 274–284. <https://doi.org/10.1007/s10393-016-1118-8>
- Bermúdez, S. E., Castillo, E., Pohlenz, T. D., Kneubehl, A., Krishnavajhala, A., Domínguez, L., Suárez, A., & López, J. E. (2017). New records of Ornithodoros puertoricensis Fox 1947 (Ixodida: Argasidae) parasitizing humans in rural and urban dwellings, Panama. *Ticks and tick-borne diseases*, 8(4), 466–469. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.02.004>

- Bermúdez, C., & Troyo, A. (2018). A review of the genus *Rickettsia* in Central America. *Research and reports in tropical medicine*, 9, 103–112. <https://doi.org/10.2147/RRTM.S160951>
- Bermúdez C, S. E., Félix, M. L., Domínguez A, L., Kadoch, N., Muñoz-Leal, S., & Venzal, J. M. (2021a). Molecular screening for tick-borne bacteria and hematozoa in *Ixodes* cf. *boliviensis* and *Ixodes* *tapirus* (Ixodida: Ixodidae) from western highlands of Panama. *Current research in parasitology & vector-borne diseases*, 1, 100034. <https://doi.org/10.1016/j.crpvbd.2021.100034>
- Bermúdez, S., Martínez-Mandiche, J., Domínguez, L., Gonzalez, C., Chavarria, O., Moreno, A., Góndola, J., Correa, N., Rodríguez, I., Castillo, B., Smith, D., & Martínez, A. A. (2021b). Diversity of *Rickettsia* in ticks collected from wild animals in Panama. *Ticks and tick-borne diseases*, 12(4), 101723. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101723>
- Bermúdez C, S., Domínguez A, L., Troyo, A., Montenegro H, V. M., & Venzal, J. M. (2021c). Ticks infesting humans in Central America: A review of their relevance in public health. *Current research in parasitology & vector-borne diseases*, 2, 100065. <https://doi.org/10.1016/j.crpvbd.2021.100065>
- Blanton L. S. (2019). The Rickettsioses: A Practical Update. *Infectious disease clinics of North America*, 33(1), 213–229. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.010>
- Charles, R. A., Bermúdez, S., Banović, P., Alvarez, D. O., Díaz-Sánchez, A. A., Corona-González, B., Etter, E., Rodríguez González, I., Ghafar, A., Jabbar, A., Moutailler, S., & Cabezas-Cruz, A. (2021). Ticks and Tick-Borne Diseases in Central America and the Caribbean: A One Health Perspective. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 10(10), 1273. <https://doi.org/10.3390/pathogens10101273>
- Day, M. J., Breitschwerdt, E., Cleaveland, S., Karkare, U., Khanna, C., Kirpensteijn, J., Kuiken, T., Lappin, M. R., McQuiston, J., Mumford, E., Myers, T., Palatnik-de-Sousa, C. B., Rubin, C., Takashima, G., & Thiermann, A. (2012). Surveillance of zoonotic infectious diseases transmitted by small companion animals. *Emerg Infect Dis*, 18(12). <http://dx.doi.org/10.3201/eid1812.120664>
- Day M. J. (2016). Pet-Related Infections. *American family physician*, 94(10), 794–802.
- De la Fuente, J., Antunes, S., Bonnet, S., Cabezas-Cruz, A., Domingos, A. G., Estrada-Peña,

- A., Johnson, N., Kocan, K. M., Mansfield, K. L., Nijhof, A. M., Papa, A., Rudenko, N., Villar, M., Alberdi, P., Torina, A., Ayllón, N., Vancova, M., Golovchenko, M., Grubhoffer, L., Caracappa, S., ... Rego, R. (2017). Tick-Pathogen Interactions and Vector Competence: Identification of Molecular Drivers for Tick-Borne Diseases. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 7, 114. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00114>
- de Sousa, K. C. M., Herrera, H. M., Rocha, F. L., Costa, F. B., Martins, T. F., Labruna, M. B., Machado, R. Z., & André, M. R. (2018). Rickettsia spp. among wild mammals and their respective ectoparasites in Pantanal wetland, Brazil. *Ticks and tick-borne diseases*, 9(1), 10–17. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.10.015>
- Dye-Braumuller, K. C., Aquino, M. S. R., Zellars, K., Waltz, H., Meyer, M., Gual-Gonzalez, L., Self, S. C. W., Kanyangarara, M., & Nolan, M. S. (2022). Antibody Prevalence and Risk Factors Associated with *Rickettsia* spp. in a Pediatric Cohort: SFGR Remains Underdiagnosed and Underreported in El Salvador. *Pathogens (Basel, Switzerland)*, 11(11), 1241. <https://doi.org/10.3390/pathogens11111241>
- Düttmann, C., Flores, B., Kadoch Z, N., & Bermúdez C., S. (2016). Hard ticks (Acari: Ixodidae) of livestock in Nicaragua, with notes about distribution. *Experimental & applied acarology*, 70(1), 125–135. <https://doi.org/10.1007/s10493-016-0059-9>
- Eisen L. (2022). Tick species infesting humans in the United States. *Ticks and tick-borne diseases*, 13(6), 102025. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.102025>
- Esser, H. J., Hartemink, N. A., & de Boer, W. F. (2018). Comment on Titcomb *et al.*'s 'Interacting effects of wildlife loss and climate on ticks and tick-borne disease'. *Proceedings. Biological sciences*, 285(1878), 20180037. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.0037>
- Estrada-Peña, A. 2015. Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology. *Revue scientifique et technique*, 34, 53-65.
- Fournier, P. E., Roux, V., & Raoult, D. (1998). Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae by study of the outer surface protein rOmpA. *International journal of systematic bacteriology*, 48 Pt 3, 839–849. <https://doi.org/10.1099/00207713-48-3-839>
- Galibert, F., Quignon, P., Hitte, C., & André, C. (2011). Toward understanding dog

- evolutionary and domestication history. *Comptes rendus biologiques*, 334(3), 190–196.
<https://doi.org/10.1016/j.crvi.2010.12.011>
- Global surveillance of rickettsial diseases: memorandum from a WHO meeting. (1993).
Bulletin of the World Health Organization, 71(3-4), 293–296.
<https://iris.who.int/handle/10665/261674>
- Guglielmone, A.A., Estrada-Peña, A., Keirans, A.J, Robbins, R.G. (2004). Las garrapatas (Acari. Ixodida) de la región zoogeográfica neotropical. ISBN 985-521-125-7, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Buenos Aires, Argentina, 142 pp.
- Guglielmone, A.A., Nava, S., Robbins, R.G. (2021). Neotropical Hard Ticks (Acari: Ixodida: Ixodidae). Springer, Cham. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-72353-8>
- Hillman, R. D., Jr, Baktash, Y. M., & Martinez, J. J. (2013). OmpA-mediated rickettsial adherence to and invasion of human endothelial cells is dependent upon interaction with $\alpha 2\beta 1$ integrin. *Cellular microbiology*, 15(5), 727–741. <https://doi.org/10.1111/cmi.12068>
- Hun, L., Cortés, X., & Taylor, L. (2008). Molecular characterization of *Rickettsia rickettsii* isolated from human clinical samples and from the rabbit tick *Haemaphysalis leporispalustris* collected at different geographic zones in Costa Rica. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 79(6), 899–902.
- Johnson, J. L., Ginsberg, H. S., Zhioua, E., Whitworth, U. G., Jr, Markowski, D., Hyland, K. E., & Hu, R. (2004). Passive tick surveillance, dog seropositivity, and incidence of human lyme disease. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, 4(2), 137–142.
<https://doi.org/10.1089/1530366041210710>
- Küchler, S. M., Kehl, S., & Dettner, K. (2009). Characterization and localization of *Rickettsia* sp. In water beetles of genus *Deronectes* (Coleoptera: Dytiscidae). *FEMS microbiology ecology*, 68(2), 201–211. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2009.00665.x>
- Labruna, M. B., Whitworth, T., Horta, M. C., Bouyer, D. H., McBride, J. W., Pinter, A., Popov, V., Gennari, S. M., & Walker, D. H. (2004). *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *Journal of clinical microbiology*, 42(1), 90–98.
<https://doi.org/10.1128/JCM.42.1.90-98.2004>

- Lado, P., Nava, S., Labruna, M. B., Szabo, M. P. J., Durden, L. A., Bermudez, S., Montagna, M., Sánchez Quirós, A. C., & Beati, L. (2016). *Amblyomma parvum* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae): Phylogeography and systematic considerations. *Ticks and tick-borne diseases*, 7(5), 817–827. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.03.017>
- Latif, A. A., Putterill, J. F., de Klerk, D. G., Pienaar, R., & Mans, B. J. (2012). *Nuttalliella* 102anaman (Ixodoidea: Nuttalliellidae): first description of the male, immature stages and re-description of the female. *PloS one*, 7(7), e41651. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041651>.
- Lopes, M. G., May Junior, J., Foster, R. J., Harmsen, B. J., Sanchez, E., Martins, T. F., Quigley, H., Marcili, A., & Labruna, M. B. (2016). Ticks and rickettsiae from wildlife in Belize, Central America. *Parasites & vectors*, 9, 62. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1348-1>
- López-Pérez, A. M., Sánchez-Montes, S., Maya-Badillo, B. A., Orta-Pineda, G., Reveles-Félix, S., Becker, I., Bárcenas-Barreto, K., Torres-Monroy, A., Ojeda-Flores, R., & Sánchez-Betancourt, J. I. (2022). Molecular detection of *Rickettsia amblyommatis* and *Rickettsia parkeri* in ticks collected from wild pigs in Campeche, Mexico. *Ticks and tick-borne diseases*, 13(1), 101844. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101844>
- Macaluso, K. R., Sonenshine, D. E., Ceraul, S. M., & Azad, A. F. (2002). Rickettsial infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) inhibits transovarial transmission of a second *Rickettsia*. *Journal of medical entomology*, 39(6), 809–813. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-39.6.809>
- Maina, A. N., Jiang, J., Luce-Fedrow, A., St John, H. K., Farris, C. M., & Richards, A. L. (2019). Worldwide Presence and Features of Flea-Borne *Rickettsia asembonensis*. *Frontiers in veterinary science*, 5, 334. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00334>
- Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2005). Conferencia mundial sobre la reducción de desastres (Kobe-Hyogo, Japón, 2005) Informe de País El Salvador. Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Servicio Nacional de Estudios Territoriales (SNET). 52p.
- Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2010). Resumen ambiental Nacional El Salvador 2010. Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 46p.

- Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2011). Fichas de las Áreas de Conservación de El Salvador. San Salvador, El Salvador. 258p.
- Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2018). Listado de fauna silvestre registrada para El Salvador. Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 62p.
- Ministerio de Medio Ambiente y Recursos Naturales. (2024). Listado de inmuebles declarados como área natural protegidas. URL <https://www.transparencia.gob.sv/institutions/marn/documents/otra-informacion-de-interes>
- Martínez-Caballero, A., Moreno, B., González, C., Martínez, G., Adames, M., Pachar, J. V., Varela-Petrucelli, J. B., Martínez-Mandiche, J., Suárez, J. A., Domínguez, L., Zaldívar, Y., & Bermúdez, S. (2018). Descriptions of two new cases of Rocky Mountain spotted fever in Panama, and coincident infection with *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus sanguineus* s.l. in an urban locality of Panama City, Panama. *Epidemiology and infection*, *146*(7), 875–878. <https://doi.org/10.1017/S0950268818000730>
- Moreira-Soto, A., Carranza, M. V., Taylor, L., Calderón-Arguedas, O., Hun, L., & Troyo, A. (2016). Exposure of dogs to spotted fever group rickettsiae in urban sites associated with human rickettsioses in Costa Rica. *Ticks and tick-borne diseases*, *7*(5), 748–753. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.03.007>
- Moreira-Soto, R. D., Moreira-Soto, A., Calderón-Arguedas, Ó., Jiménez, M., Corrales-Aguilar, E., & Troyo, A. (2023). Detection of *Rickettsia* spp. in ticks of wildlife fauna from Costa Rica: First report of *Rickettsia rhipicephali* in Central America. *Ticks and tick-borne diseases*, *14*(1), 102071. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2022.102071>
- Nava, S., Mangold, A. J., & Guglielmo, A. A. (2009). Field and laboratory studies in a Neotropical population of the spinose ear tick, *Otobius megnini*. *Medical and veterinary entomology*, *23*(1), 1–5. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2008.00761.x>
- Organización Panamericana de la Salud. (2004). Consulta OPS/OMS de expertos sobre rickettsiosis en las Américas. Minas Gerais, Brasil. URL http://www.paho.org/panaftosa/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=informes-reuniones-803&alias=75-reunion-rickettsiosis-5&Itemid=518

- Ortiz, D. I., Piche-Ovares, M., Romero-Vega, L. M., Wagman, J., & Troyo, A. (2021). The Impact of Deforestation, Urbanization, and Changing Land Use Patterns on the Ecology of Mosquito and Tick-Borne Diseases in Central America. *Insects*, *13*(1), 20. <https://doi.org/10.3390/insects13010020>
- Oteo, J. A., Nava, S., Sousa, R. d., Mattar, S., Venzal, J. M., Abarca, K., Labruna, M. B., Zavala-Castro, J., & RIICER (2014). Guías Latinoamericanas de la RIICER para el diagnóstico de las rickettsiosis transmitidas por garrapatas [Latinamerican guidelines of RIICER for diagnosis of tick-borne rickettsioses]. *Revista chilena de 104anamanian104104: 104anama oficial de la Sociedad Chilena de Infectologia*, *31*(1), 54–65. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182014000100009>
- Pacheco-Solano, K., Barrantes-González, A., Dolz, G., Troyo, A., Jiménez-Rocha, A. E., Romero-Zuñiga, J. J., & Taylor, L. (2019). Exposure of dogs to *Rickettsia* spp. in Costa Rica: Risk factors for PCR-positive ectoparasites and seropositivity. *Parasite epidemiology and control*, *7*, e00118. <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2019.e00118>
- Paddock, C. D., Hecht, J. A., Green, A. N., Waldrup, K. A., Teel, P. D., Karpathy, S. E., & Johnson, T. L. (2020). *Rickettsia parkeri* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in the Sky Islands of West Texas. *Journal of medical entomology*, *57*(5), 1582–1587. <https://doi.org/10.1093/jme/tjaa059>
- Polsomboon, S., Hoel, D. F., Murphy, J. R., Linton, Y. M., Motoki, M., Robbins, R. G., Bautista, K., Bricen O, I., Achee, N. L., Grieco, J. P., Ching, W. M., & Chao, C. C. (2017). Molecular Detection and Identification of *Rickettsia* Species in Ticks (Acari: Ixodidae) Collected From Belize, Central America. *Journal of medical entomology*, *54*(6), 1718–1726. <https://doi.org/10.1093/jme/tjx141>
- Polsomboon Nelson, S., Bourke, B. P., Badr, R., Tarpey, J., Caicedo-Quiroga, L., Leiva, D., Pott, M., Cruz, A., Chao, C. C., Achee, N. L., Grieco, J. P., Jiang, L., Jiang, J., Farris, C. M., & Linton, Y. M. (2022). Ticks (Acari: Ixodidae) and Associated Pathoge Collected From Domestic Animals and Vegetation in Stann Creek District, Southeastern Belize, Central America. *Journal of medical entomology*, *59*(5), 1749–1755. <https://doi.org/10.1093/jme/tjac112>

- Qiu, Y., Nakao, R., Ohnuma, A., Kawamori, F., & Sugimoto, C. (2014). Microbial population analysis of the salivary glands of ticks; a possible strategy for the surveillance of bacterial pathogens. *PloS one*, 9(8), e103961. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103961>
- Reller, M. E., Chikeka, I., Miles, J. J., Dumler, J. S., Woods, C. W., Mayorga, O., & Matute, A. J. (2016). First Identification and Description of Rickettsioses and Q Fever as Causes of Acute Febrile Illness in Nicaragua. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(12), e0005185. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005185>
- Richardson, E. A., Roe, R. M., Apperson, C. S., & Ponnusamy, L. (2023). *Rickettsia amblyommatis* in Ticks: A Review of Distribution, Pathogenicity, and Diversity. *Microorganisms*, 11(2), 493. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020493>
- Romero, L., Costa, F. B., & Labruna, M. B. (2021). Ticks and tick-borne Rickettsia in El Salvador. *Experimental & applied acarology*, 83(4), 545–554. <https://doi.org/10.1007/s10493-021-00610-w>
- Romero, L. E., Binder, L. C., Marcili, A., & Labruna, M. B. (2023). Ticks and tick-borne rickettsiae from dogs in El Salvador, with report of the human pathogen Rickettsia parkeri. *Ticks and tick-borne diseases*, 14(5), 102206. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2023.102206>
- Roux, V., Rydkina, E., Ereemeeva, M., & Raoult, D. (1997). Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. *International journal of systematic bacteriology*, 47(2), 252–261. <https://doi.org/10.1099/00207713-47-2-252>
- Santibáñez, S., Portillo, A., Santibáñez, P., Palomar, A. M., & Oteo, J. A. (2013). Usefulness of rickettsial PCR assays for the molecular diagnosis of human rickettsioses. *Enfermedades infecciosas y 105anamanian105105a 105anaman*, 31(5), 283–288. <https://doi.org/10.1016/j.eimc.2012.08.001>
- Scarpulla, M., Barlozzari, G., Marcario, A., Salvato, L., Blanda, V., De Liberato, C., D'Agostini, C., Torina, A., & Macrì, G. (2016). Molecular detection and characterization of spotted fever group rickettsiae in ticks from Central Italy. *Ticks and tick-borne diseases*, 7(5), 1052–1056. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.06.003>
- Soares, J. F., Soares, H. S., Barbieri, A. M., & Labruna, M. B. (2012). Experimental infection

- of the tick *Amblyomma cajennense*, Cayenne tick, with *Rickettsia rickettsii*, the agent of Rocky Mountain spotted fever. *Medical and veterinary entomology*, 26(2), 139–151. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2011.00982.x>
- Sorto, R. (2011). Inventario de insectos y arácnidos. Área natural protegida El Espino-Bosque Los Pericos. SalvaNATURA-Fundación Ecología. 40p.
- Springer, A., Montenegro, V. M., Schicht, S., Wölfel, S., Schaper, S. R., Chitimia-Dobler, L., Siebert, S., & Strube, C. (2018). Detection of *Rickettsia monacensis* and *Rickettsia amblyommatis* in ticks collected from dogs in Costa Rica and Nicaragua. *Ticks and tick-borne diseases*, 9(6), 1565–1572. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.08.002>
- Tian, Y., Juarez, J. G., Moller-Vasquez, A. M., Granados-Presa, M., Ferreira, F. C., Pennington, P. M., Padilla, N., Hamer, G. L., & Hamer, S. A. (2024). Dog ectoparasites as sentinels for pathogenic *Rickettsia* and *Bartonella* in rural Guatemala. *Research square*, rs.3.rs-4656611. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4656611/v1>
- Titcomb, G., Allan, B. F., Ainsworth, T., Henson, L., Hedlund, T., Pringle, R. M., Palmer, T. M., Njoroge, L., Campana, M. G., Fleischer, R. C., Mantas, J. N., & Young, H. S. (2017). Interacting effects of wildlife loss and climate on ticks and tick-borne disease. *Proceedings. Biological sciences*, 284(1862), 20170475. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.0475>
- Troyo, A., Moreira-Soto, R. D., Calderon-Arguedas, Ó., Mata-Somarribas, C., Ortiz-Tello, J., Barbieri, A. R., Avendaño, A., Vargas-Castro, L. E., Labruna, M. B., Hun, L., & Taylor, L. (2016). Detection of rickettsiae in fleas and ticks from areas of Costa Rica with history of spotted fever group rickettsioses. *Ticks and tick-borne diseases*, 7(6), 1128–1134. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.08.009>
- Tsao, J. I., Hamer, S. A., Han, S., Sidge, J. L., & Hickling, G. J. (2021). The Contribution of Wildlife Hosts to the Rise of Ticks and Tick-Borne Diseases in North America. *Journal of medical entomology*, 58(4), 1565–1587. <https://doi.org/10.1093/jme/tjab047>
- Vogel, H., Foley, J., & Fiorello, C. V. (2018). *Rickettsia africae* and Novel Rickettsial Strain in *Amblyomma* spp. Ticks, Nicaragua, 2013. *Emerging infectious diseases*, 24(2), 385–387. <https://doi.org/10.3201/eid2402.161901>

Zavala-Castro, J. E., Zavala-Velázquez, J. E., del Rosario García, M., León, J. J., & Dzul-Rosado, K. R. (2009). A dog naturally infected with *Rickettsia akari* in Yucatan, México. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, 9(3), 345–347. <https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0189>

Zazueta, O. E., Armstrong, P. A., Márquez-Elguea, A., Hernández Milán, N. S., Peterson, A. E., Ovalle-Marroquín, D. F., Fierro, M., Arroyo-Machado, R., Rodríguez-Lomeli, M., Trejo-Dozal, G., & Paddock, C. D. (2021). Rocky Mountain Spotted Fever in a Large Metropolitan Center, Mexico-United States Border, 2009-2019. *Emerging infectious diseases*, 27(6), 1567–1576. <https://doi.org/10.3201/eid2706.191662>