



## CIENCIAS AGRARIAS Y DE LA PESCA

Artículo original de investigación

### Clasificación taxonómica precisa de aislamientos cubanos de garrapatas del complejo *Rhipicephalus microplus* y *Amblyomma cajennense*

Alina Rodríguez Mallón <sup>1\*</sup> <https://orcid.org/0000-0002-6950-6793>  
Pedro Enrique Encinosa Guzmán <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-9827-0364>  
Alier Fuentes Castillo <sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0001-9761-3601>  
Rafmary Rodríguez Fernández <sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0003-2102-2391>  
Yilian Fernández Alonso <sup>3</sup> <https://orcid.org/0000-0002-0970-1917>  
Yuselys García Martínez <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-4184-6219>  
Yamil Bello Soto <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-0394-8561>  
Ana Laura Cano Argüelles <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-1056-8439>  
Mario Pablo Estrada García <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-9776-719X>  
Luis Méndez Mellor <sup>2</sup> <https://orcid.org/0000-0003-3121-298X>  
Daniela Aliaga Ramos <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0001-9038-1406>  
Angelina Díaz García <sup>3</sup> <https://orcid.org/0000-0003-4156-2248>  
Claudia Fernández Cuétara <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-0054-7738>  
Frank Luis Ledesma Bravo <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0002-1419-8148>  
José Ángel Silva Guirado <sup>1</sup> <https://orcid.org/0000-0003-4198-4010>  
Yorexis González Alfaro <sup>3</sup> <https://orcid.org/0000-0002-0831-7972>

<sup>1</sup> Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. La Habana, Cuba

<sup>2</sup> Laboratorio Nacional de Parasitología. Artemisa, Cuba

<sup>3</sup> Centro de Estudios Avanzados de Cuba. La Habana, Cuba

\* Autor para la correspondencia: [alina.rodriguez@cigb.edu.cu](mailto:alina.rodriguez@cigb.edu.cu)

#### Revisores

Miguel Pérez Ruano  
Universidad Agraria de La Habana.  
La Habana, Cuba

Belkis Corona González  
Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria.  
Mayabeque, Cuba

#### Editor

Amanda Gómez Bahamonde  
Academia de Ciencias de Cuba.  
La Habana, Cuba

#### Traductor

Yoan Karell Acosta González  
Academia de Ciencias de Cuba.  
La Habana, Cuba

#### RESUMEN

**Introducción:** La capacidad de las garrapatas como vectores de agentes patógenos específicos está determinada por la especie. Estudios recientes reevaluaron el taxón *Amblyomma cajennense* como un complejo de 6 especies y *A. mixtum* Koch, 1844 como la única presente en Cuba. Por su parte, *Rhipicephalus microplus* es la única especie monoxeno del género *Rhipicephalus* presente en la isla, la cual ha sido identificada como un complejo de 5 especies basado en análisis filogenéticos de genomas mitocondriales. El objetivo de este trabajo fue la clasificación taxonómica precisa de 4 aislamientos cubanos de garrapatas del complejo *Amblyomma cajennense* y de los ejemplares de las 2 colonias de garrapatas *R. microplus* establecidas en el Laboratorio Nacional de Parasitología. **Métodos:** Se realizó la caracterización morfológica y molecular de 4 aislamientos de campo cubanos pertenecientes al complejo *Amblyomma cajennense* y de ejemplares de 2 colonias de garrapatas *R. microplus* establecidas en el Laboratorio Nacional de Parasitología a partir de 2 aislamientos cubanos usando microscopía electrónica de barrido y las claves morfológicas descritas para cada especie combinado con análisis filogenéticos basados en secuencias de ADN de genes mitocondriales y nucleares. **Resultados y discusión:** La apertura genital en forma de

U combinada con setas largas y gruesas densamente distribuidas en el notum posterior de las hembras de las 4 poblaciones cubanas del complejo *A. cajennense* y el cuerpo redondeado de todos los especímenes han sido características morfológicas atribuidas a la especie *A. mixtum* y las características observadas en los especímenes de las 2 colonias del LNP coincidían con las características distintivas de las especies del complejo *R. microplus* pero no permitieron definir la especie. Las filogenias moleculares respaldaron con más de un 84 % de confiabilidad la presencia de *Amblyomma mixtum* en Cuba y con más de un 65 % la clasificación en el clado A o *R. microplus sensu stricto* (s. s.) de los especímenes cubanos del complejo *Rhipicephalus microplus*. En conclusión, estos resultados permitieron una identificación inequívoca de las 4 poblaciones cubanas como pertenecientes a la especie *A. mixtum* y de las colonias del LNP como *R. microplus s. s.*

**Palabras clave:** garrapatas; taxonomía; morfología; filogenia; *Amblyomma cajennense*; *Amblyomma mixtum*; *Rhipicephalus microplus*

## Accurate taxonomic classification of cuban ticks from the *Rhipicephalus microplus* and *Amblyomma cajennense* complexes

### ABSTRACT

**Introduction:** The capacity of ticks as vectors for specific pathogens is determined by the species. Recent studies reevaluated the taxon *Amblyomma cajennense* as a complex of 6 species and *A. mixtum* Koch, 1844 as the only one present in Cuba. On the other hand, *Rhipicephalus microplus* is the only monoxene species of the genus *Rhipicephalus* present on the island, which has been identified as a complex of 5 species based on phylogenetic analysis of mitochondrial genomes.

**Methods:** In this study, the morphological and molecular characterization of 4 Cuban field isolates belonging to the *Amblyomma cajennense* complex and of specimens of 2 colonies of *R. microplus* ticks established in the LNP from 2 Cuban isolates were performed using scanning electron microscopy and the morphological keys described for each species combined with phylogenetic analyses based on DNA sequences of mitochondrial and nuclear genes. **Results and discussion:** The U-shaped genital opening combined with long and thick setae densely distributed in the posterior notum of the female ticks from the 4 Cuban populations of the *A. cajennense* complex and the rounded bodies of all specimens are morphological characteristics attributed to the species *A. mixtum*. The characteristics observed in the specimens of the 2 colonies from the LNP coincided with the distinctive characteristics of the species belonging to the *R. microplus* complex but did not allow the species definition. The molecular phylogenies supported the presence of *A. mixtum* in Cuba with more than 84 % reliability and the classification in clade A or *R. microplus s. s.* of the Cuban specimens belonging to the *R. microplus* complex with more than 65 %. It is concluded that these results permitted an unequivocal identification of the four Cuban populations as belonging to the species *A. mixtum* and of the colonies from the LNP as *R. microplus s. s.*

**Keywords:** ticks; taxonomy; morphology; phylogeny; *Amblyomma cajennense*; *Amblyomma mixtum*; *Rhipicephalus microplus*

## INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son artrópodos ectoparásitos que pueden transmitir agentes patógenos que causan enfermedades a los humanos y animales que infestan. <sup>(1)</sup> Esta capacidad vectorial es específica de la especie, de ahí la importancia de la clasificación taxonómica precisa de las especies de garrapatas. <sup>(2)</sup>

Las especies *Rhipicephalus microplus sensu lato* (s. l.) y *Amblyomma cajennense* s. l. son las principales que parasitan

rumiantes en Cuba. <sup>(3,4)</sup> Diferentes estudios morfológicos, <sup>(5)</sup> moleculares <sup>(6)</sup> y de entrecruzamiento entre individuos de diversas áreas geográficas <sup>(7,8)</sup> han sugerido que el taxón *Amblyomma cajennense* que antes era considerado como una sola especie, es un complejo formado por 6 especies. <sup>(5,9)</sup> Según las características de un ejemplar cubano conservado en la colección nacional de garrapatas del museo de Georgia, Estados Unidos se determinó que *A. mixtum* era la única especie

del complejo presente en la isla de Cuba. <sup>(9)</sup> Sin embargo, otro estudio donde se evaluó la preferencia de hábitat de las especies de este complejo, según las condiciones de humedad y temperatura, sugirió que pudiera haber un solapamiento de los nichos para *A. mixtum* y *A. cajennense* en Cuba. <sup>(10)</sup> Después de estos informes, no han existido otros trabajos que hayan sustentado científicamente la posición taxonómica de los ejemplares del complejo *A. cajennense* presentes en Cuba.

La especie *Rhipicephalus microplus*, conocida como la garrapata del bovino, presenta similitudes morfológicas con otras especies que pertenecen a un complejo denominado *R. microplus* del cual forman parte *R. annulatus*, *R. australis* y *R. microplus* dividida en 3 clados (A, B y C). <sup>(11)</sup> El clado A o *sensu stricto* (s. s.) agrupa a individuos del sur de América, África y el sur de Asia; el clado B agrupa a individuos de China y el clado C incluye individuos del Norte de la India, Malasia, <sup>(12)</sup> Bangladesh, Pakistán y Myanmar. <sup>(13)</sup> El Laboratorio Nacional de Parasitología (LNP) de Cuba posee las únicas colonias de garrapatas *R. microplus* del país establecidas a partir de aislamientos en la provincia de Ciego de Ávila.

El objetivo de este trabajo fue la clasificación taxonómica precisa de 4 aislamientos cubanos de garrapatas del complejo *Amblyomma cajennense* y de los ejemplares de las 2 colonias de garrapatas *R. microplus* establecidas en el LNP usando las claves morfológicas descritas para cada especie y análisis filogenéticos basados en secuencias de ADN de genes mitocondriales y nucleares.

## MÉTODOS

### Especímenes de garrapatas

Se realizaron 4 aislamientos de garrapatas pertenecientes al complejo *Amblyomma cajennense* en localidades del

occidente y centro del país (figura 1). En el municipio Artemisa (22°48'49"N 82°45'48"O) y en la Isla de la Juventud (21°45'N 82°51'O) se colectaron ninfas alimentadas en caballos (*Equus ferus caballus*). En el municipio de Jatibonico (21°56'47"N 79°10'03"O) en la provincia de Sancti Spiritus se colectaron hembras repletas, alimentadas en carneros (*Ovis orientalis aries*) y en el municipio de la Ciénaga de Zapata (22°20'00"N 81°37'00"O) de la provincia de Matanzas se colectaron ninfas alimentadas en perros (*Canis lupus familiaris*). Todos los ejemplares colectados se mantuvieron en condiciones controladas (28 °C de temperatura y 80 % ± 5 % de humedad relativa) en el laboratorio de Salud Animal del CIGB hasta que alcanzaron el estado adulto usado para la clasificación. En el caso de las hembras repletas colectadas se pusieron a ovopositar y para la obtención de adultos, todos los estadios inmaduros fueron alimentados en conejos (*Oryctolagus cuniculus*) según la metodología establecida en nuestro laboratorio. <sup>(14)</sup>

Las colonias de garrapatas del LNP se nombraron de acuerdo a las localidades donde se colectaron los especímenes usados para el establecimiento de dichas colonias en Cayo Coco (CC) al norte de la provincia de Ciego de Ávila (22°30'32.45"N 78°24'25.1" O) y la localidad de Manga Larga (ML) en el municipio Bolivia de la provincia de Ciego de Ávila (22°04'30"N 78°21'1"O). El estudio de estas colonias se realizó usando adultos no alimentados recolectados de bovinos artificialmente infestados con larvas alrededor del día 15 después de la infestación (figura 1).

Secuencias de genes provenientes de especímenes de garrapatas *R. microplus* de una colonia mantenida en el LNP de la cepa mexicana de referencia Media Joya (MJ) se incluyeron en los análisis filogenéticos. Esta cepa perteneció a la especie *R. microplus* s. s. o clado A y fue amablemente proporcionada por el Centro Nacional de Servicios de Verifica-



**Fig. 1.** Mapa de Cuba. Las flechas negras indican las localidades en las que se llevaron a cabo los muestreos de especímenes de garrapatas del complejo *Amblyomma cajennense* y las rojas las localidades de los aislamientos a partir de los cuales se establecieron las colonias de garrapatas en el LNP. 1) Municipio de Artemisa en la provincia de Artemisa (22° 48' 49" N 82° 45' 48" O); 2) Localidad de Nueva Gerona en el Municipio Especial Isla de la Juventud (21° 53' 05" N 82° 48' 04" O); 3) Municipio Ciénaga de Zapata en la provincia de Matanzas (22° 20' 00" N 81° 37' 00" O) y 4) Municipio Jatibonico en la provincia de Sancti Spiritus (21° 56' 47" N 79° 10' 03" O); I) Cayo Coco al norte de la provincia de Ciego de Ávila (22° 30' 32.45" N 78° 24' 25.1" O) y II) Localidad de Manga Larga en el municipio Bolivia de la provincia de Ciego de Ávila (22° 04' 30" N 78° 21' 1" O).

ción de Sanidad Animal (CENAPA) de México. Esta cepa se aisló originalmente en el Instituto Nacional de Silvicultura, Agricultura y Ganadería (INIFAP) de Jiutepec en Morelos en el año 2001 a partir de ganado bovino infestado en el municipio de Tapalpa en el estado de Jalisco, México (19° 57' 0"N, 103° 46' 0"W).<sup>(15)</sup>

### Análisis morfológico

Se realizó a partir de 40 ejemplares adultos no alimentados de ambos sexos, 20 hembras y 20 machos de cada aislamiento y de cada colonia. Para los especímenes del complejo *A. cajennense* se analizaron las principales estructuras de valor taxonómico según la descripción de Nava *et al.*<sup>(9)</sup> y para los especímenes del complejo *R. microplus* las claves taxonómicas descritas por Walker<sup>(16)</sup>. Las características de coloración y ornamentación de los escudos se observaron bajo estereoscopio (Kyowa Optical, Model SDZ-8) y se tomaron fotografías con una cámara (Power Shot A640, Canon, Japón) acoplada al mismo. La caracterización y medición de las estructuras con valor taxonómico se realizó a partir de fotografías obtenidas mediante un microscopio electrónico de barrido (SEM, de sus siglas en inglés *scanning electron microscope*, TESCAN MIRA-3 FE) en el CEA y procesadas mediante el programa Digital Micrograph™ (Version 2.32.888.0).

Antes de ser observadas por SEM, las garrapatas se fijaron durante 20 min a 4 °C en 3 % de solución de glutaraldehído. Luego se lavaron 3 veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS-NaCl 135 mM, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, KCL 3 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, pH 7,2) y se sumergieron en 1 % de tetróxido de osmio (OsO<sub>4</sub>) durante 20 min a 4 °C. Posteriormente, se lavaron 3 veces con PBS y se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol desde el 50 al 99 % durante 10 min en cada una, a 4 °C. Posteriormente, se secaron a -62 °C y 1,2 Pa durante 18 h en una liofilizadora (modelo FD-10 V) y por último se recubrieron con una capa de oro de alrededor de 10 nm utilizando un juego de reactivos Desk Sputter Coater DSR1. Las mediciones de las estructuras de las garrapatas se compararon utilizando una prueba t de Student realizada en Prism (versión 6.0 para Windows; *software* GraphPad).

### Análisis molecular

Se procedió a la extracción del ADN genómico individual de 5 adultos no alimentados de cada población estudiada mediante el juego de reactivos DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante. A

partir de los ADN purificados de especímenes del género *Amblyomma* se amplificaron por PCR fragmentos de los genes mitocondriales codificantes de 16S rRNA y COXI y secuencias nucleares de ITS2. Para los especímenes de las colonias de *R. microplus* se amplificaron fragmentos de los genes mitocondriales codificantes de 12S rRNA, 16S rRNA y COXI y secuencias nucleares de ITS2. En todos los casos se utilizó un termociclador (Minicycler™, MJ Research, Inc., EE. UU.) y el reactivo GoTaq® Green Master Mix (Promega, EE. UU.) y oligonucleótidos específicos.<sup>(11,13,17-20)</sup> Los productos de PCR se purificaron utilizando el juego de reactivos para extracción de ADN del gel (QIAquick, Qiagen, Alemania) y se secuenciaron utilizando los servicios de la compañía coreana MacroGen (Corea del Sur).

### Análisis filogenéticos

Los alineamientos de secuencia y las inferencias filogenéticas se realizaron utilizando Clustalw<sup>(21)</sup> y MEGA 7.0,<sup>(22)</sup> respectivamente. Los árboles filogenéticos se construyeron utilizando el método de máxima verosimilitud (ML), con 1000 simulaciones y basado en el modelo de sustitución de nucleótidos de 3 parámetros de Tamura<sup>(23)</sup> para todas las secuencias y el modelo Tamura-Nei<sup>(24)</sup> para las secuencias COXI del género *Amblyomma*. Las secuencias incluidas en los análisis se seleccionaron solo si estaban avaladas por validaciones morfológicas de las especies de acuerdo con las reevaluaciones más recientes de cada complejo.<sup>(9,11-13)</sup> Secuencias de las especies *A. mixtum* y *R. sanguineus* se usaron como grupos externos para el análisis de los complejos *R. microplus* y *A. cajennense*, respectivamente.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los especímenes de los 4 aislamientos de garrapatas del género *Amblyomma* presentaron similares características morfológicas, por lo tanto, se ha mostrado solo una fotografía representativa para cada estructura analizada (figura 2). En todos los ejemplares se observó el cuerpo con un contorno redondo y las escápulas redondeadas. A continuación, se describen las características morfológicas de los especímenes machos:

- En los machos se observó un escudo ornamentado, liso, de apariencia brillante con manchas marrón delimitadas por franjas claras que ocupaban toda la superficie dorsal del idiosoma (figura 2 A).
- Se observaron manchas cervicales grandes y alargadas y manchas anteroaccesorias grandes y bien diferencia-



**Fig. 2.** Características morfológicas de los especímenes de garrapatas cubanas del complejo *Amblyomma cajennense*. Vista dorsal A) de un macho y B) una hembra al esteroscopio.

das. Las ramas de las manchas limitantes anchas y las ramas posteriores no fusionadas posteriormente. La primera, segunda y tercera manchas laterales fusionadas, pero bien diferenciadas y la última orientada horizontalmente. Se distinguieron las manchas posteroaccesorias pequeñas y la posteromedial alargada y más estrecha en la región basal que las regiones adyacentes claras, así como la franja marginal estrecha y de color marrón (figura 2 A).

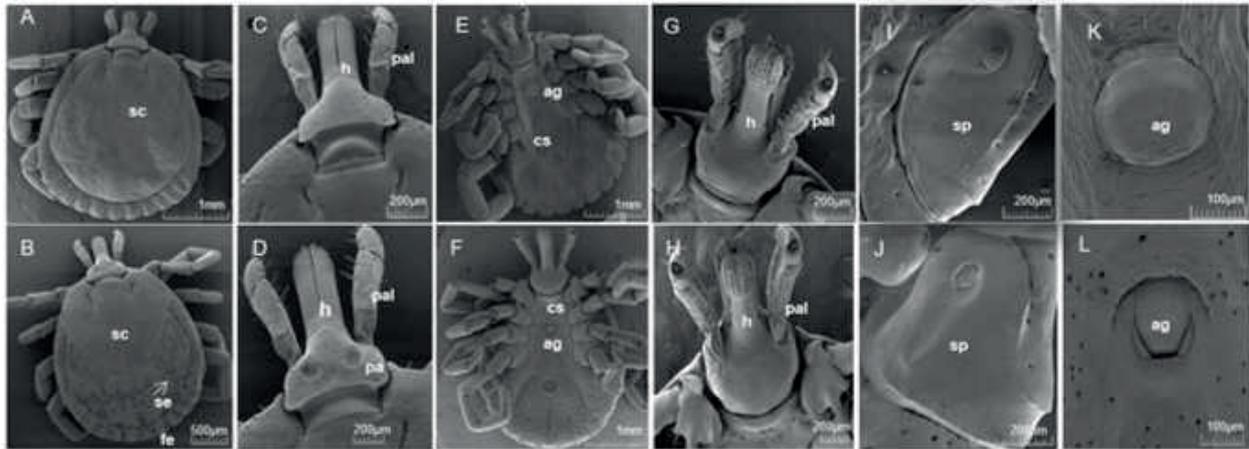
- Los surcos cervicales se mostraron pronunciados, cortos y en forma de coma ortográfica (figura 3 A-C). El surco marginal se mostró completo y delimitaba todos los festones hasta el nivel de las coxas IV y continuaba como una línea de puntos hasta el nivel de los ojos (figura 3 A). Ojos simples y aplanados (figura 2).
- La punteaduras eran poco profundas y grandes, moderadamente distribuidas hacia el extremo posterior del escudo, más pronunciadas y numerosas hacia las franjas claras (figura 3 A).
- Se observó la presencia de 11 festones más largos que anchos, con pocas y pequeñas punteaduras. El festón central de color marrón claro sin machas, la mitad interna de los festones 1, 2 y 5 de color marrón oscuro y los festones 3 y 4 con el borde interno del mismo color, pero más fino (figura 2 A y figura 3 A).
- La base del capítulo subrectangular se mostró con un margen posterior ligeramente cóncavo y cornuas redondeadas (figura 3 C).
- Los palpos estaban divididos en 4 segmentos con setas. En el segmento I se observó un espolón ventral pe-

queño y romo que se proyectaba posteriormente. En el hipostoma se observó una fórmula dental 3/3 en 6-7 filas y un ápice con finos y numerosos denticulos (figura 3 E-G). En la vista ventral, se distinguió la coxa I con espolones externos más largos que los internos, las coxas II-III con un espolón corto y redondeado que sobresalía del borde en forma de cresta y la coxa IV con un espolón interno largo y recto que no llegaba al nivel del ano. Los trocánteres se mostraron sin espolones (figura 3 E).

- Las placas espiraculares en forma de coma se mostraron con un proceso caudal tan ancho como el festón adyacente y posterior al último par de coxas (figura 3 E- I). La apertura genital en forma de U al nivel de la coxa II (figura 3 K).

A continuación, se describen las características morfológicas de los especímenes hembras:

- En las hembras el escudo ornamentado ocupaba alrededor de un tercio del largo total del cuerpo con manchas cervicales alargadas pero sin llegar a fusionarse con las manchas limitantes, las que se fusionaban a su vez con las manchas oculares y estas últimas con las accesorias.
- El área posteromedial del escudo presentaba un gran parche posterior claro con manchas color marrón pequeñas hacia la parte posterior del escudo y más grandes hacia la región central. Se mostraron punteaduras distribuidas uniformemente y más pronunciadas hacia los extremos laterales incluyendo las escápulas (figura 2 B).



**Fig. 3.** Imágenes de SEM de machos y hembras: A) vista dorsal de un macho, B) vista dorsal de una hembra, C) capítulo dorsal de un macho, D) capítulo dorsal de una hembra, E) vista ventral de un macho, F) vista ventral de una hembra, G) vista ventral del capítulo de un macho, H) vista ventral del capítulo de una hembra, I) placa espiracular de un macho, J) placa espiracular de una hembra, K) apertura genital de un macho, L) apertura genital de una hembra. sc) scutum, se) setas, fe) festones, h) hipostoma, pal) palpo, pa) área porosa, ag) apertura genital, cs) espolón coxal, sp) placa espiracular.

- Se distinguieron surcos cervicales lineales y pronunciados dispuestos de forma oblicua, orientados desde el exterior hacia el interior (figura 3 B-D), el surco marginal completo, que delimitaba todos los festones (figura 3 B). Los ojos simples y aplanados (figura 2 B). Notum piloso con setas gruesas, largas y abundantes distribuidas de forma dispersa y con 3 surcos estrechos, poco profundos y lisos. El surco medial alcanzaba el festón central y los laterales terminaban entre los festones 2 y 3 (figura 2 B).
- Se observó la presencia de 11 festones más largos que anchos, cada uno con 2 hileras de setas (figura 3 B). La base del capítulo subrectangular en su vista dorsal se observó con un margen posterior ligeramente cóncavo y cornuas redondeadas como en los machos.
- Las placas porosas ovaladas se mostraron con el borde anterior poco definido y poco delimitado (figura 3 D).
- Los palpos se distinguieron con 4 segmentos y setas. En el segmento I, una pequeña espuela ventral roma proyectada posteriormente. Se mostró un hipostoma con una fórmula dental 3/3 dispuestos en 7-8 filas y un ápice con finos y numerosos dentículos (figura 3 H).
- La coxa I mostró un espolón externo aproximadamente 2 veces más largo que el interno y las coxas II-III con bordes en forma de cresta, la coxa IV con un pequeño espolón interno redondeado y un trocánter sin espinas (figura 3 F).
- Las placas espiraculares en forma de coma, posteriores al último par de coxas y con un pequeño proceso caudal tan ancho como el festón adyacente (figura 3 F-J). La apertura genital localizada entre la coxa II y la III en forma de U con 2 solapas laterales estrechas (figura 3 F-L).

A pesar de las similitudes morfológicas entre las especies del complejo *A. cajennense*, hay caracteres o combinaciones de ellos que han permitido diferenciar una especie de otra. <sup>(25)</sup> La apertura genital en forma de U de las hembras de estas poblaciones permitió diferenciarlas de *A. cajennense* s. s. *A. tonelliae* y *A. interandinum* que tienen una apertura genital en forma de V <sup>(9)</sup> (figura 3 F-L). La especie *A. patinoi* también podría descartarse porque incluso si tiene apertura genital en forma de U, las solapas laterales son cortas y abultadas y el cuerpo es de forma ovalada en lugar de solapas laterales estrechas y el cuerpo redondeado como en las hembras de los aislados cubanos. Además, la combinación de estas características en la apertura genital con setas largas y gruesas densamente distribuidas en el *notum* posterior es típicamente atribuido a la especie *A. mixtum*. <sup>(9,25,26)</sup>

Según la estructura de las filogenias obtenidas, las 4 poblaciones cubanas se agruparon en el clado de *A. mixtum* junto con las poblaciones de garrapatas de Colombia, México, Estados Unidos, Ecuador y Costa Rica con una confiabilidad del análisis de las secuencias 16S rRNA, ITS2 y COXI del 98 %, 84 % y 99 %, respectivamente (figura 4).

Los especímenes de las colonias CC y ML mostraron características morfológicas similares que coincidían con las características distintivas de la especie *R. microplus*.<sup>(27)</sup> Por tanto, cada carácter analizado se mostró sólo con una fotografía representativa si era coincidente para ambas colonias (figura 5). Todos los especímenes presentaron un contorno corporal ovalado sin festones con un escudo no ornamentado para ambos sexos y con los ojos presentes a ambos lados del escudo al nivel de las coxas II (figura 5 A y F). Aparato bucal corto y anterior, con el hipostoma más largo que los palpos para ambos sexos (figura 5 B y G).

## Machos

### Gnatosoma

En la vista dorsal se observa la base del capítulo hexagonal con un borde posterior recto, cornua corta triangular y pocas setas en sus márgenes laterales y transversalmente a lo largo de la superficie dorsal (figura 5 A y B). En la vista ventral se observan los márgenes internos de los artículos palpaes cortos y esencialmente derechos. Artículos palpaes I, II y III con protuberancias ventrales y setas (figura 5 C). Hipostoma con dentición 4/4 y de 6 a 8 dentículos por fila. Corona bien definida con dentículos diminutos (figura 5 C).

### Idiosoma

En la vista dorsal se observa un escudo con escápulas subtriangulares y fuertes. Surcos cervicales anchos y poco profundos. Surco posteromedial profundo con un par de surcos paramediales más anchos, pero más cortos. Apéndice caudal estrecho (figura 5 A y D). Abundantes y largas setas en el escudo ausentes en los surcos y depresiones (figura 5 A). En la vista ventral se observa la coxa I triangular con 2 espolones posteriores: el espolón interior romo y delgado y el externo más puntiagudo con un proceso anterior alargado, curvado dorsalmente y extendiéndose mucho más allá de la escápula visible dorsalmente (figura 5 D). Coxas II y III con espuelas internas y externas ampliamente redondeadas. Coxa 4 con un pequeño espolón (figura 5 D). Apertura genital al nivel de las coxas II y apertura anal posterior a las coxas IV a una distancia alrededor de dos tercios del espacio total entre el último par de coxas y el margen posterior del cuerpo. Surco anal ausente en todas las muestras (figura 5 D). Placas adanales largas a ambos lados del ano con espuelas afiladas hacia el final y un segundo espolón externo y posterior. Placas adanales accesorias con un solo espolón interno (figura 5 D). Placas espiraculares subcirculares y ubicadas detrás del último par de coxas (figura 5 D y E).

## Hembras

### Gnatosoma

En la vista dorsal se observan los capítulos de base hexagonal con un borde posterior recto y cornua indistinta. Pocas setas cortas solo en los márgenes laterales. Los ángulos laterales de la base del capítulo ligeramente puntiagudos. Áreas porosas en forma de riñón separadas entre sí por una distancia aproximadamente de 1 a 1,5 veces la distancia del eje mayor de un área porosa (figura 5 F y G). Margen interno dorsal del artículo II del palpo con una hendidura mediana que se continúa transversalmente como un suave surco.

En la vista ventral se observan los márgenes internos del artículo palpal I ligeramente cóncavos y cortos sin protuberancias. Márgenes internos de los artículos palpaes II y III con protuberancias claras (figura 5 H). Hipostoma con dentición 4/4 para las hembras de la colonia CC y para la mayoría de las de la colonia ML. Sin embargo, se encontraron hembras de ML con dentición 4.5 / 4.5 o 5/5 (figura 5 K, L, M). Corona bien definida con dentículos diminutos.

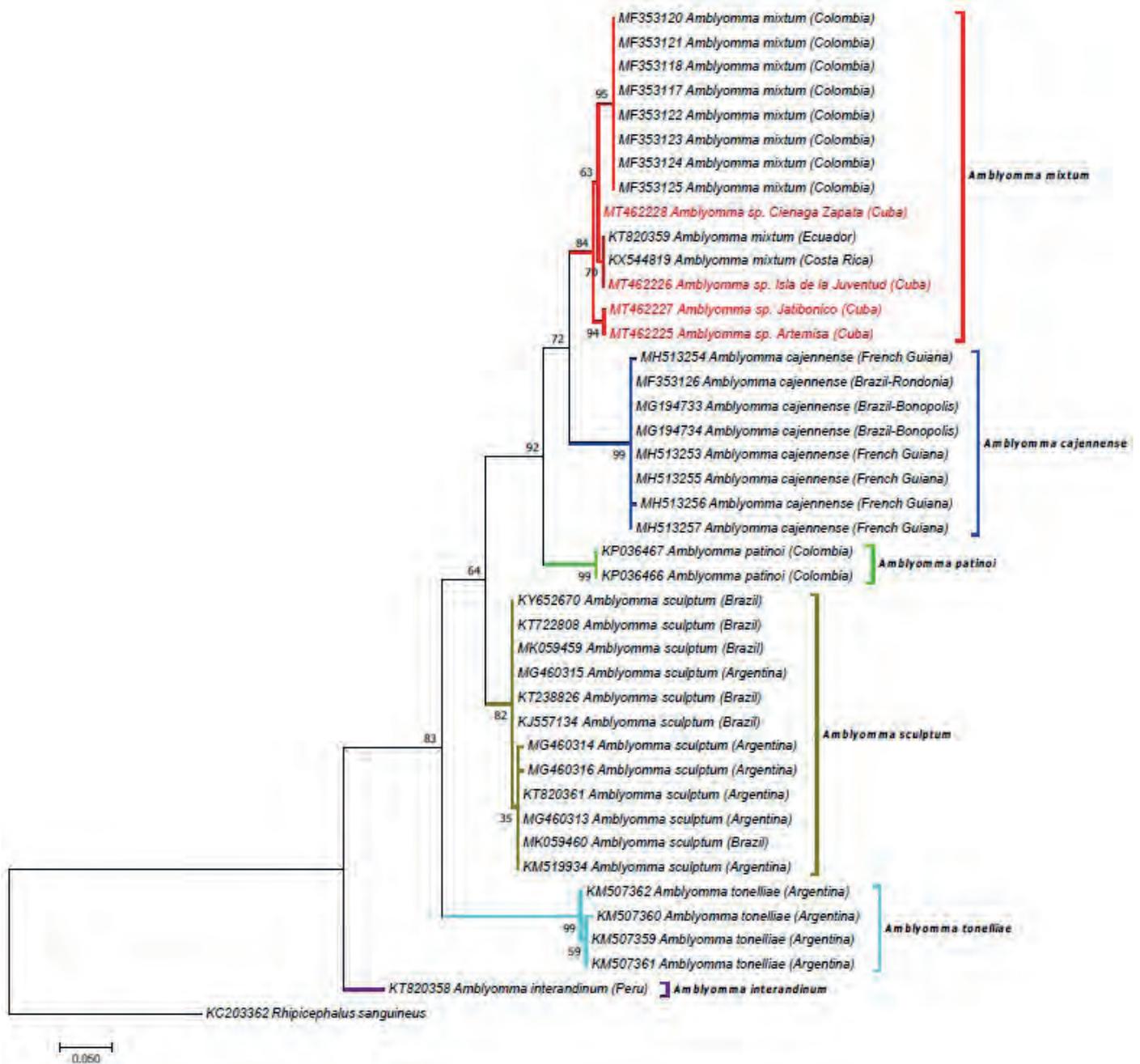
### Idiosoma

En la vista dorsal se observa un escudo con contornos suaves ocupando solo 1/3 del cuerpo con márgenes anterolaterales rectos y posterolaterales sinuosos. Ángulo posterior redondeado y relativamente ancho. Escápulas subtriangulares (figura 5 F y G). Setas largas y escasas, generalmente a lo largo de los márgenes anterolaterales hasta el nivel de los ojos, pero ausentes en los surcos cervicales del escudo medio (figura 5 F y G). Setas abundantes de medianas a largas en el aloescudo. Surcos medianos y posterolaterales bien definidos y alargados. Los últimos, confluentes con depresiones poco profundas en cada lado que se extienden a los surcos cervicales (figura 5 F).

La vista ventral muestra la coxa I triangular con 2 espolones redondeados más pequeños que los de los machos. En las coxas II, III y IV solo espuelas externas (figura 5 I). La apertura genital al nivel de las coxas II con largas setas en la superficie anterior (figura 5 I). Apertura anal posterior a las coxas IV. Placas espiraculares subcirculares detrás del último par de coxas (figura 5 I y J).

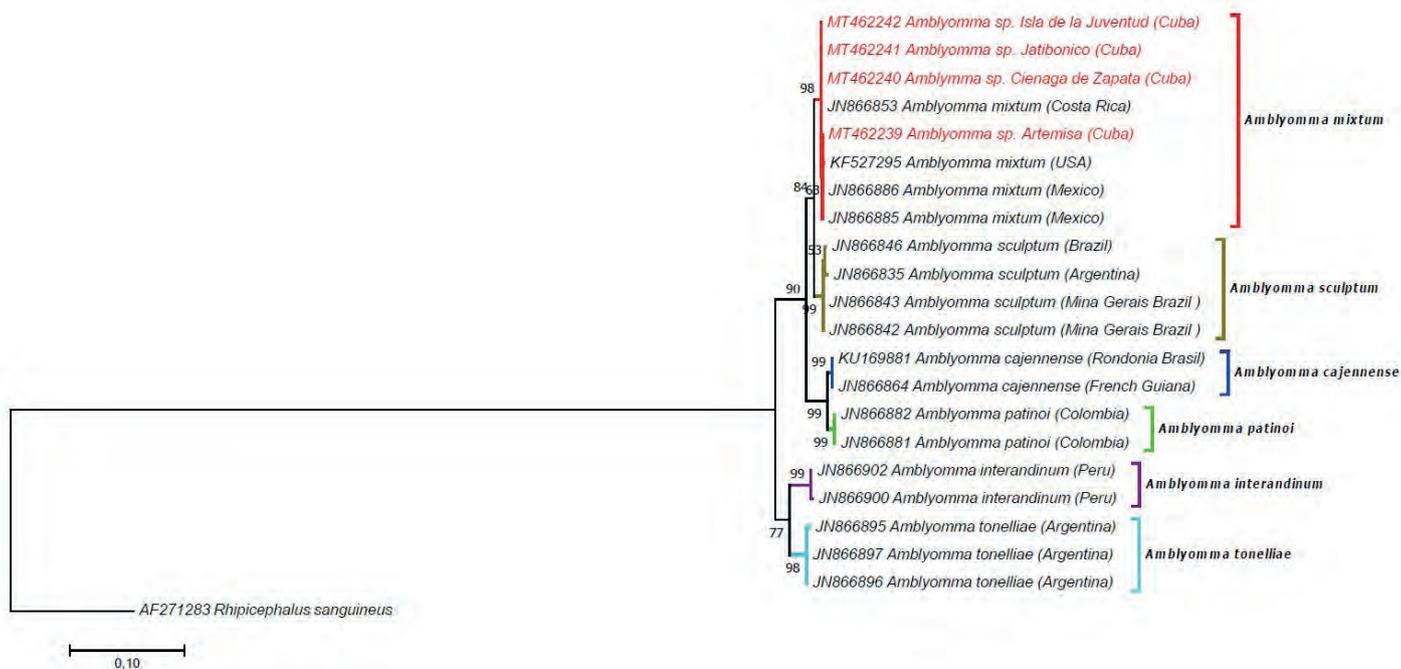
Todas estas características morfológicas encontradas en los especímenes de las colonias CC y ML fueron útiles para clasificarlas como pertenecientes al complejo *R. microplus* ya que son distintivas de las especies miembros de este complejo.<sup>(13,27-29)</sup> Sin embargo, la gran variabilidad en los ca-

A



**Fig. 4.** Análisis filogenéticos inferidos a partir de las secuencias de ARNr 16S (A), ITS2 (B) y COX I (C) mediante el método de máxima verosimilitud basado en el modelo del parámetro 3 de Tamura (23) para A) y B) y de Tamura-Nei (24) para C) usando el software Mega 7. (22) El porcentaje de árboles en los que los taxones que aparecen agrupados fueron asociados se muestran junto a las ramas. Los árboles están dibujados a escala, con las longitudes de las ramas medidas en el número de sustituciones por sitio. La barra representa 0,05 sustituciones por sitio para A) y C) y 0,1 para B). Las secuencias generadas en el presente estudio aparecen resaltadas en rojo. Los nombres de las especies están precedidos por los números de acceso al GenBank y seguidos por la región de colecta. Cada especie del complejo *A. cajennense* (9) aparece con un color diferente. *Rhipicephalus sanguineus* s.l. se utilizó como grupo externo en todos los casos.

B



C

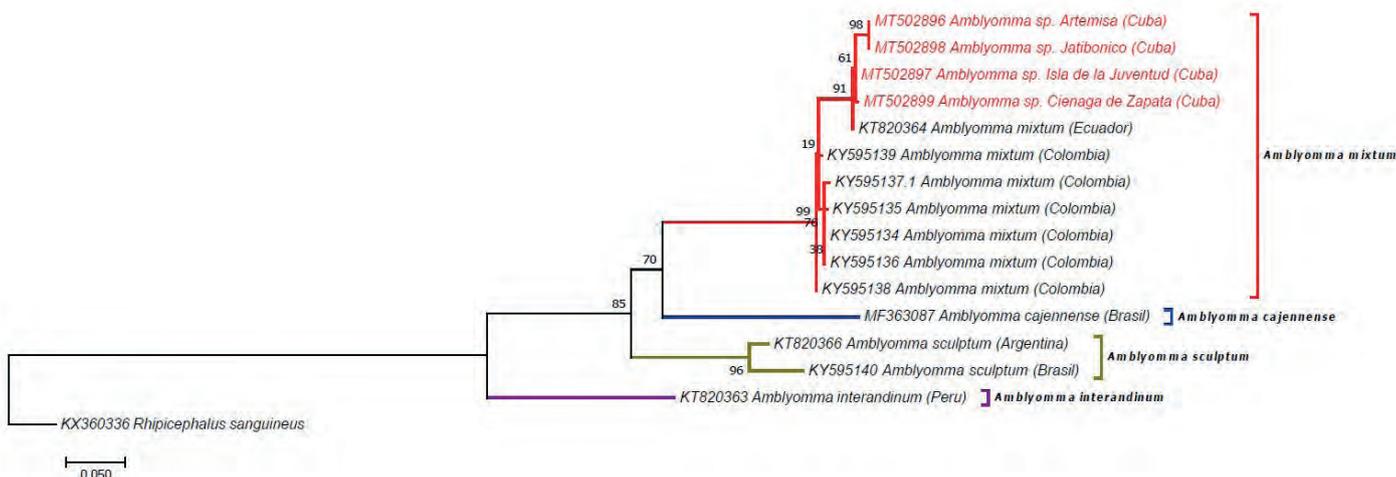


Fig. 4. (continuación).

racteres morfológicos que existe entre individuos dentro de la misma especie en este complejo dificulta la clasificación taxonómica precisa de estos especímenes. <sup>(16,27,30-32)</sup>

Las historias evolutivas inferidas de los análisis de las secuencias de ARNr 12S, ARNr 16S y COXI, permitieron clasificar a los especímenes de las colonias CC y ML como pertenecientes al clado A o s. s. del complejo *R. microplus* junto a la cepa mexicana de referencia MJ y a aislamientos de Argentina, Bolivia, Brasil, Mozambique, Costa Rica, Panamá, Paraguay, Perú, Tanzania, Estados Unidos, Uruguay y Sudáfrica con una confiabilidad del 69 %, 93 % y 98 %, respectivamente (figura 6).

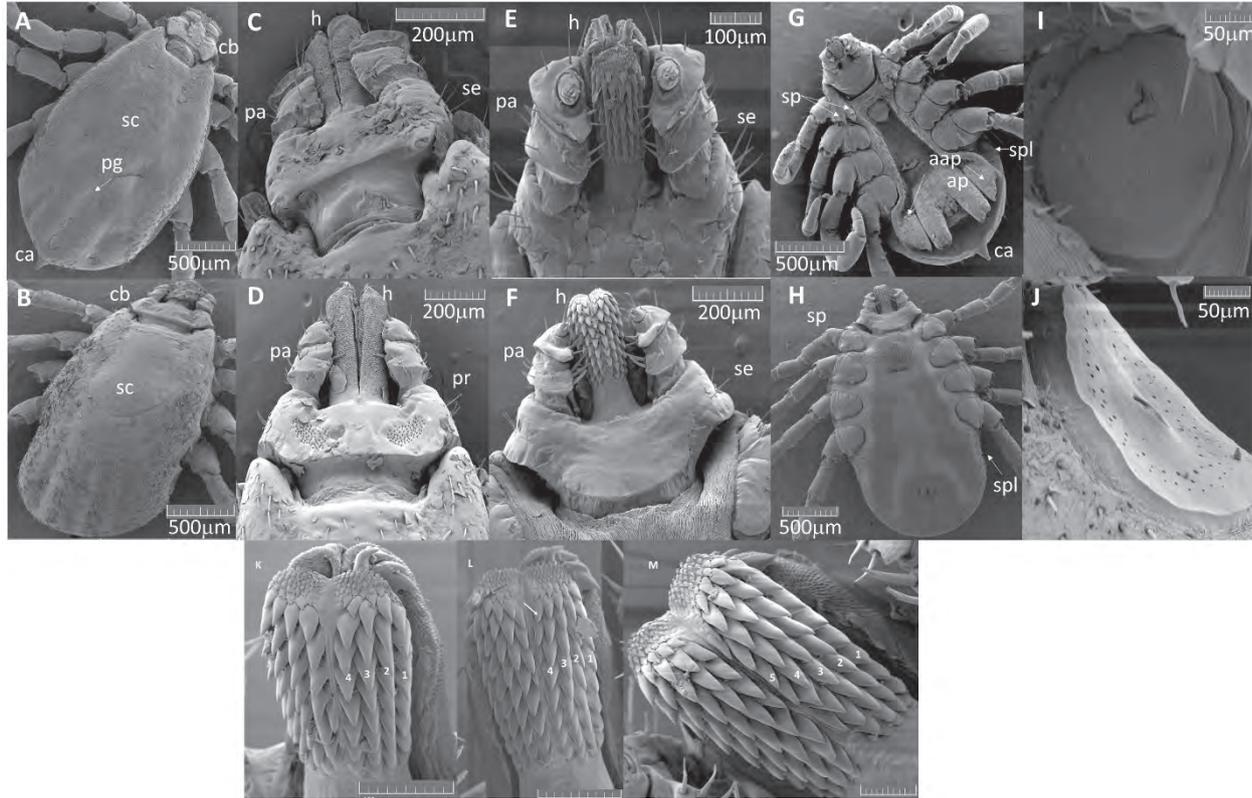
Estas filogenias basadas en secuencias de genes mitocondriales identificaron congruentemente los 5 clados previamente incluidos en el complejo *R. microplus* como filogenéticamente bien delimitados y apoyaron moderadamente el clado A como hermano del clado *R. australis*. Por su parte, el análisis basado en las secuencias nucleares de ITS2 no pudo sustentar la división de la especie *R. microplus* en los clados A, B y C aunque se ha planteado su utilidad para apoyar la monofilia del subgénero *Boophilus* y las relaciones entre especies del género *Rhipicephalus* (figura 6). <sup>(11)</sup> Estos resultados han concordado con informes anteriores que apuntaban a que los genes mitocondriales 16S y COXI

eran los mejores marcadores para resolver las relaciones de filogenia entre los 5 clados descritos dentro del complejo *R. microplus*.<sup>(11-13)</sup>

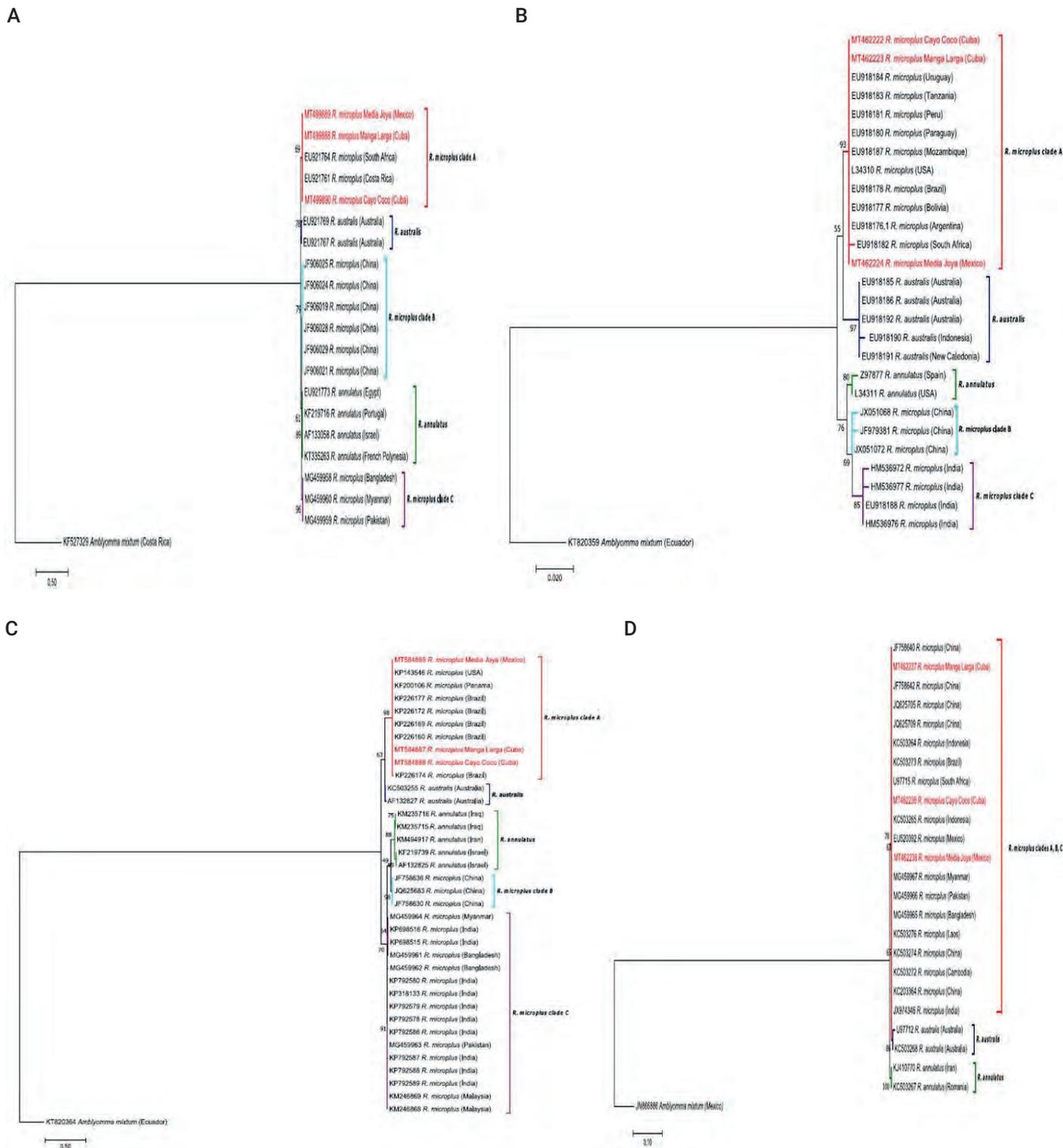
## Conclusiones

Estos resultados permitieron una identificación inequívoca de todos los especímenes cubanos pertenecientes a los

complejos *A. cajennense* y *R. microplus*. Las 4 poblaciones del complejo *A. cajennense* pertenecen a la especie *A. mixtum* y los especímenes de las colonias del LNP fueron clasificados dentro del clado A o s. s. del complejo *R. microplus*. Este trabajo ha constituido la primera caracterización molecular de garrapatas de estas especies en Cuba y ha confirmado la presencia de *A. mixtum* en el país.



**Fig. 5.** Microscopía electrónica de barrido (SEM) de especímenes de garrapatas *R. microplus* cubanas. Rasgos distintivos de los machos: A) vista dorsal del escudo (sc), la flecha señala el surco posteromedial (pg), se indican además la base del capítulo (cb) y el apéndice caudal (ca). B) vista dorsal del capítulo. C) vista ventral del capítulo; el hipostoma (h), los palpos (pa) y las setas (se) se indican en las proyecciones del capítulo. D) vista ventral; las flechas indican las espuelas (sp), las placas adanales accesorias (aap), las placas adanales (ap) y las placas espiraculares (spl). E) ampliación de una placa espiracular. Rasgos distintivos de las hembras. F) vista dorsal, se indican el escudo (sc) y la base del capítulo (cb). G) vista dorsal del capítulo. Las flechas señalan las áreas porosas (pr). Se indican el hipostoma (h) y los palpos (pa). H) vista ventral del capítulo. Se indican el hipostoma (h), los palpos (pa) y las setas (se). I) vista ventral. Las flechas señalan las espuelas (sp) y las placas espiraculares (spl). J) ampliación de una placa espiracular. K) hipostoma con dentición 4/4 presente en la mayoría de las garrapatas hembras de la colonia ML. L) hipostoma con dentición 4,5 / 4,5 encontrada en 2 garrapatas hembras de la colonia ML, la flecha indica la dentición 0,5. M) Hipostoma con dentición 5/5 observada en una hembra de la colonia ML.



**Fig. 6.** Análisis filogenéticos basados en las secuencias de 12S ARNr (A), 16S ARNr (B), COX I (C) e ITS2 (D) mediante el método de máxima verosimilitud y el modelo de 3 parámetros de Tamura. (23) El porcentaje de árboles en los que los taxones que aparecen asociados fueron agrupados se muestra junto a las ramas. Los árboles están dibujados a escala, con las longitudes de las ramas medidas en el número de sustituciones por sitio. La barra representa 0,5 sustituciones por sitio para A y C, 0,02 para B y 0,1 para D. Los datos de secuencia generados en el presente estudio aparecen resaltados en rojo. Los nombres de las especies están precedidos por los números de acceso al GenBank y seguidos por el lugar de colecta. Cada clado aparece con un color diferente. Secuencias de la especie *Amblyomma mixtum* se usaron como grupo externo en todos los análisis.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Jasiorowski HA. Opening statement for the FAO Expert Consultation on Revision of Strategies for the Control of Ticks and Tick-borne Diseases. *Parassitologia*. 1990;32(1):13-4.
2. Dantas Torres F. Species Concepts: What about Ticks? *Trends Parasitol*. 2018;34(12):1017-26.
3. Álvarez DO, Corona González B, Rodríguez Mallón A, Rodríguez González I, Alfonso P, Noda Ramos AA, *et al*. Ticks and tick-borne diseases in Cuba, half a century of scientific research. *Pathogens*. 2020;9(8):616.
4. Pérez Viguera J. Lista de los Ixódidos de Cuba. *Circulares del Museo y Biblioteca de Zoología de La Habana*. 1954:1389-90.
5. Nava S, Beati L, Labruna MB, Cáceres AG, Mangold AJ, Guglielmon AA. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2014;5:252-76.
6. Beati L, Nava S, Burkman EJ, Barros Battesti DM, Labruna MB, Guglielmon AA, *et al*. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787)(Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. *BMC Evolutionary Biology*. 2013;13(1):267.
7. Labruna MB, Soares JF, Martins TF, Soares HS, Cabrera RR. Cross-mating experiments with geographically different populations of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Experimental and applied acarology*. 2011;54(1):41-9.
8. Mastropaolo M, Nava S, Guglielmon AA, Mangold AJ. Biological differences between two allopatric populations of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in Argentina. *Experimental and Applied Acarology*. 2011;53(4):371-5.
9. Nava S, Beati L, Labruna MB, Cáceres AG, Mangold AJ, Guglielmon AA. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp. *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp. and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). *Ticks Tick Borne Dis*. 2014;5(3):252-76.
10. Estrada Peña A, Tarragona EL, Vesco U, De Meneghi D, Mastropaolo M, Mangold AJ, *et al*. Divergent environmental preferences and areas of sympatry of tick species in the *Amblyomma cajennense* complex (Ixodidae). *International journal for parasitology*. 2014;44(14):1081-9.
11. Burger TD, Shao R, Barker SC. Phylogenetic analysis of mitochondrial genome sequences indicates that the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, contains a cryptic species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2014;76:241-53.
12. Low VL, Tay ST, Kho KL, Koh FX, Tan TK, Lim YA, *et al*. Molecular characterisation of the tick *Rhipicephalus microplus* in Malaysia: new insights into the cryptic diversity and distinct genetic assemblages throughout the world. *Parasit Vectors*. 2015;8:341.
13. Roy BC, Estrada Peña A, Krucken J, Rehman A, Nijhof AM. Morphological and phylogenetic analyses of *Rhipicephalus microplus* ticks from Bangladesh, Pakistan and Myanmar. *Ticks Tick Borne Dis*. 2018;9(5):1069-79.
14. Rodríguez Mallón A. Developing anti-tick vaccines. *Vaccine Design*: Springer; 2016. p. 243-59.
15. Quintanilla REL, Domínguez García DI, Velázquez MM, Romero HQ, Rosario Cruz R. Molecular cloning and variability of a subolesin recombinant peptide from a Mexican *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick strain. *Biochemistry & Molecular Biology* 2014; 2:17-23.
16. Walker AR. Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species: Bioscience Reports Edinburgh; 2003.
17. Black WC, Piesman J. Phylogeny of hard-and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1994;91(21):10034-8.
18. Zahler M, Gothe R, Rinder H. Diagnostic DNA amplification from individual tick eggs, larvae and nymphs. *Exp Appl Acarol*. 1995;19(12):731-6.
19. McLain DK, Wesson DM, Oliver JH, Jr., Collins FH. Variation in ribosomal DNA internal transcribed spacers 1 among eastern populations of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol*. 1995;32(3):353-60.
20. Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 1994; 3:294-9.
21. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*. 1997;25(24):4876-82.
22. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*. 2016;33:1870-4.
23. Tamura K. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution*. 1992;9:678-87.
24. Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol*. 1993;10:512-26.
25. Rivera Páez FA, Labruna MB, Martins TF, Sampieri BR, Camargo Mathias MI. *Amblyomma mixtum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae): First record confirmation in Colombia using morphological and molecular analyses. *Ticks Tick Borne Dis*. 2016;7(5):842-8.
26. Aguilar Domínguez M, Romero Salas D, Sánchez Montes S, Barradas Pina F, Rosas Saito G, Cruz Romero A, *et al*. Occurrence of *Amblyomma mixtum* on the water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Mexico. *Int J Parasitol Parasites Wildl*. 2018;7(3):405-8.
27. Estrada Peña A, Bouattour A, Camicas J, Walker A. Ticks of domestic animals in the Mediterranean region. A guide to identification of species. Zaragoza, España: University of Zaragoza. 2004.
28. Estrada Peña A, Venzal JM, Nava S, Mangold A, Guglielmon AA, Labruna MB, *et al*. Reinstatement of *Rhipicephalus (Boophilus) australis* (Acari: Ixodidae) with redescription of the adult and larval stages. *J Med Entomol*. 2012;49(4):794-802.
29. Guglielmon AA, Bechara GH, Szabó MPJ, Barros-Battesti DM, Faccini JL. Ticks of importance for domestic animals in Latin America and Caribbean countries. ICTTD-2 of the European Commission INCO- DEV programme. 2004.
30. Barker SC, Walker AR. Ticks of Australia. The species that infest domestic animals and humans. *Zootaxa*. 2014(3816):1-144.

31. Barros Battesti DM, Hernández MR, Famadas KM, Onofrio VC, Beati L, Guglielmo AA. The ixodid ticks (Acari: Ixodidae) of Cuba. *Systematic and Applied Acarology*. 2009;14(2):101-28.
32. Berry CM. Resolution of the taxonomic status of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* [PhD Thesis]. Scotland, UK: University of Glasgow; 2017.

---

Recibido: 02/06/2022  
Aprobado: 18/09/2022

---

### Agradecimientos

Los autores agradecemos a Marisdania Joglar, Carlos Montero Espinosa, Milagros Vargas, Omar Gell Cuesta y Lilianne López Nocado del CIGB que colaboraron en la realización de este trabajo. Agradecemos también Ricardo Lleonart Cruz y Carolina de la Guardia del Instituto de Investigaciones Científicas y Servicios de Alta Tecnología (INDICASAT AIP) de Panamá por su colaboración en la secuenciación de los genes involucrados en el análisis filogenético.

### Conflictos de interés

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

### Contribuciones de los autores

- Conceptualización: Alina Rodríguez Mallón, Pedro Enrique Encinosa Guzmán, Mario Pablo Estrada García
- Curación de datos: Alina Rodríguez Mallón, Pedro Enrique Encinosa Guzmán
- Análisis formal: Alina Rodríguez Mallón, Pedro Enrique Encinosa Guzmán
- Adquisición de fondos: Alina Rodríguez Mallón, Alier Fuentes Castillo, Rafmary Rodríguez Fernández, Yilian Fernández Alonso, Yamil Bello Soto, Luis Méndez Mellor, Angelina Díaz García
- Investigación: Pedro Enrique Encinosa Guzmán, Alier Fuentes Castillo, Rafmary Rodríguez Fernández, Yilian Fernández Alonso, Yuselys García Martínez, Yamil Bello Soto, Ana Laura Cano Argüelles, Daniela Aliaga Ramos, Claudia Fernández Cuétara, Frank Luis Ledesma Bravo

- Metodología: Alina Rodríguez Mallón, Pedro Enrique Encinosa Guzmán, Alier Fuentes Castillo, Rafmary Rodríguez Fernández, Yilian Fernández Alonso, Yamil Bello Soto, Luis Méndez Mellor, José Ángel Silva Guirado
- Administración del proyecto: Alina Rodríguez Mallón, Mario Pablo Estrada García
- Recursos: Yorexis González Alfaro
- Supervisión: Alina Rodríguez Mallón, Mario Pablo Estrada García, Luis Méndez Mellor, Angelina Díaz García, Yorexis González Alfaro
- Redacción – borrador original: Alina Rodríguez Mallón, Pedro Enrique Encinosa Guzmán, Yuselys García Martínez, Ana Laura Cano Argüelles
- Redacción – revisión y edición: Alina Rodríguez Mallón, Pedro Enrique Encinosa Guzmán

### Financiamiento

La investigación fue financiada por el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), el Laboratorio Nacional de Parasitología (LNP) y el Centro de Estudios Avanzados de Cuba (CEA).

### Cómo citar este artículo

Rodríguez Mallón A, Encinosa Guzmán PE, Fuentes Castillo A, Rodríguez Fernández R, *et al*. Clasificación taxonómica precisa de aislamientos cubanos de garrapatas del complejo *Rhipicephalus microplus* y *Amblyomma cajennense*. *An Acad Cienc Cuba* [internet] 2022 [citado en día, mes y año];12(3):e1249. Disponible en: <http://www.revistaccuba.cu/index.php/revacc/article/view/1249>

El artículo se difunde en acceso abierto según los términos de una licencia Creative Commons de Atribución/Reconocimiento-NoComercial 4.0 Internacional (CC BY-NC-SA 4.0), que le atribuye la libertad de copiar, compartir, distribuir, exhibir o implementar sin permiso, salvo con las siguientes condiciones: reconocer a sus autores (atribución), indicar los cambios que haya realizado y no usar el material con fines comerciales (no comercial).

© Los autores, 2023.

