



PROPUESTA A PREMIO ANUAL DE LA ACADEMIA DE CIENCIAS DE CUBA.



**Título: Caracterización por primera vez de una cepa cubana
de garrapatas del complejo *Rhipicephalus sanguineus*.
Establecimiento de una colonia en el laboratorio.**

PROPUESTA A PREMIO ANUAL DE LA ACADEMIA DE CIENCIAS DE CUBA - 2017

Título: Caracterización por primera vez de una cepa cubana de garrapatas del complejo *Rhipicephalus sanguineus*. Establecimiento de una colonia en el laboratorio.

Unidad Ejecutora Principal del Resultado: Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB).

Autores principales: Pedro Enrique Encinosa Guzmán (20%), Alina Rodríguez Mallon (20%), Yamil Bello Soto (20%).

Coautores: Pedro Puente (5%), Mario Pablo Estrada García (5%), Carlos Montero (5%), Danny Pérez Pérez (5%), Lillian Gómez Pérez (4%), Lídice Méndez Pérez (4%), Cigry Pérez Pérez (4%), Milagros Vargas (3%), Yamilet Cárdenas Cuellar (1%), Marisdania Joglar Piñeiro (1%), Elsa Rodríguez Rodríguez (1%), Dailenis Abella Matos (1%), Jose Angel Silva Guirado (1%).

Filiación: CIGB. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

RESUMEN

Las garrapatas son ectoparásitos, vectores de agentes infecciosos causantes de enfermedades humanas y animales que provocan grandes pérdidas económicas en la esfera agropecuaria. El uso de químicos constituye la principal medida para el control de estos ectoparásitos. Su uso intensivo provoca contaminación ambiental, de los alimentos y el desarrollo de resistencia por parte de las garrapatas. La vacunación es un método alternativo que se considera eficaz y sostenible, pero en la actualidad no existe una vacuna con antígenos protectores contra las infestaciones de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) en perros. El desarrollo de una vacuna contra esta garrapata requiere de un modelo experimental que proporcione los datos biológicos pertinentes. El presente trabajo resume la caracterización morfológica y molecular por primera vez de un aislamiento de una cepa de campo cubana de garrapatas *R. sanguineus*. En el trabajo se demuestra que la cepa cubana está estrechamente relacionada con la especie *R. sanguineus* sensu lato perteneciendo al clado del linaje del norte o especies tropicales. Los resultados sugieren que esta cepa es resistente al amitraz. A partir de este aislamiento de garrapatas se estableció una colonia bajo condiciones controladas en el laboratorio. En estas condiciones el ciclo vital de estas garrapatas se completó en 85 días y después de cada ciclo; el 16% de los huevos iniciales totales son hembras capaces de poner huevos. Estos resultados garantizan el mantenimiento a largo plazo de la colonia y la producción fiable de ejemplares de garrapatas bajo condiciones estandarizadas adecuadas como modelo experimental para diferentes estudios biológicos, incluyendo la identificación con éxito de nuevos candidatos para vacunas anti-garrapatas. Los resultados de esta propuesta están avalados por publicaciones en dos reconocidas revistas internacionales de alto factor de impacto: International Journal of Acarology (Vol 42(1) (2016) y Veterinary Parasitology (Vol 215:78-87 (2016). Se han presentado en varios eventos científicos internacionales y cuentan con el aval de importantes especialistas en el tema. El uso de la colonia para la pesquisa de vacunas contra garrapatas se introdujo en los estudios con el candidato derivado de la proteína ribosomal P0 que se encuentra actualmente en fase de desarrollo experimental y se publicó en la revista Vaccine (Vol 30 (2012), pp. 1782-1789).

APORTE: CIENTIFICO X ECONOMICO ___ SOCIAL ___

Autores:

DMVZ. Pedro Enrique Encinosa Guzmán (CIGB): Participó en el diseño y ejecución de toda la investigación y en el procesamiento de los datos que sirvieron de base a las publicaciones que avalan la propuesta. (20 %)

Dra. Alina Rodríguez Mallon (CIGB): Participó en el diseño y ejecución de toda la investigación, así como en la escritura de las publicaciones que avalan la propuesta. (20 %)

Tec. Yamil Bello Soto (CIGB): Participó en la ejecución de toda la investigación. (20 %)

Coautores:

Lic. Pedro Puente (CIGB): Participó en la ejecución de partes de la investigación (5%)

Dr. Mario Pablo Estrada García (CIGB): Participó en la coordinación de la investigación. (5 %)

MSc. Carlos Montero: Participó en el diseño de partes de la investigación (5%)

MSc. Danny Pérez Pérez: Participó en el diseño de partes de la investigación (5%)

MSc. Lillian Gómez Pérez: Participó en la ejecución de partes de la investigación (5%)

MSc. Lídice Méndez Pérez: Participó en la ejecución de partes de la investigación (5%)

MSc. Milagros Vargas: Participó en el diseño de partes de la investigación (3%)

Tec. Cigry Pérez Pérez: Participó en el apoyo logístico de toda la investigación (3%)

MSc. Yamilet Cárdenas Cuellar: Participó en la discusión de los resultados de la investigación (1%)

Lic. Marisdania Joglar Piñeiro: Participó en la ejecución de algunas partes de la investigación (1%)

Lic. Elsa Rodríguez Rodríguez: Participó en la ejecución de algunas partes de la investigación (1%)

Lic. Dailenis Abella Matos: Participó en la discusión de los resultados de la investigación (1%).

Lic. Jose Angel Silva Guirado: Participó en el apoyo logístico de partes de la investigación (1%).

Autor para la correspondencia: Dra. Alina Rodríguez Mallon

Jefe del Departamento de Biotecnología Animal

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

Ave 31 entre 158 y 190. Cubanacán, Playa. Apartado Postal 6162

Teléfono: 7271 6022 Ext. 5103 ó 7250 4407

email: alina.rodriguez@cigb.edu.cu

Resultados y Discusión

El objetivo de este trabajo fue el desarrollo de un modelo experimental de garrapatas para el desarrollo de diferentes ensayos biológicos que permitan dilucidar los complejos mecanismos que subyacen en la interacción de las garrapatas con sus mamíferos hospederos y con los patógenos que ellas transmiten, así como en los ensayos para la pesquisa de nuevos antígenos con una función biológica importante dentro del artrópodo, de manera que la generación de anticuerpos contra ellos, sea fatal para las garrapatas. Para esto se realizó un aislamiento de una cepa cubana de campo de garrapatas *R. sanguineus*. Se partió de la recolección de 10 garrapatas hembras repletas naturalmente desprendidas de un perro en el patio de un propietario particular en el municipio mayabequense de Bejucal, un pueblo cerca de la ciudad de La Habana, Cuba (coordenadas geográficas: 22° 55'58 "N 82° 23'13" W). Las larvas obtenidas a partir de estas hembras se mezclaron y se designaron como el aislamiento de campo "Bejucal 2010".

Hay evidencias de que *R. sanguineus* puede estar compuesta por más de una especie, por lo que su estatus taxonómico es un tema actual de debate mundial. La pobre descripción original de la especie realizada por Latreille, la pérdida del espécimen tipo de la especie y las similitudes morfológicas entre las garrapatas que pertenecen al llamado grupo de especies "*R. sanguineus*" complican su clasificación taxonómica y hacen de la identificación de estos especímenes una tarea difícil, incluso para un taxonomista experimentado. Durante la última década, los estudios moleculares han mostrado la variabilidad genética de diferentes cepas de *R. sanguineus* sensu lato (s.l.) y han logrado diferenciar taxones estrechamente relacionados dentro del grupo pero provenientes de diferentes localidades geográficas. Estos estudios han demostrado la existencia de dos linajes divergentes dentro de *R. sanguineus* s.l.: el llamado "Linaje sur" o especies de clima templado, que incluyen garrapatas de localidades de Argentina, Uruguay, Chile e Italia y el "Linaje norte" o especies tropicales que incluyen garrapatas de Brasil, Paraguay, Colombia, Sudáfrica, Mozambique y de dos localidades del norte de Argentina. El tamaño, los pesos de las hembras alimentadas, la fecundidad y la duración del ciclo de vida de las garrapatas de esta especie pueden variar para los aislados de las diferentes regiones geográficas. Según la literatura existe una fuerte asociación entre la temperatura ambiente y la población de garrapatas. Las características morfológicas descritas en la literatura, que son distintivas para el género *Rhipicephalus*, se encontraron presentes en los individuos que pertenecen al aislamiento "Bejucal 2010" y las características relevantes para la diferenciación taxonómica de las diferentes especies del género presentes en el aislamiento se muestran en la Figura 1.

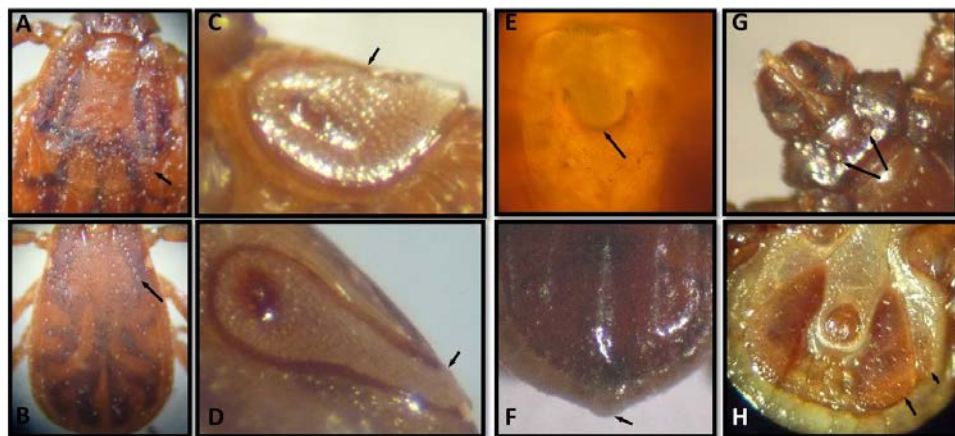


Figura 1. Características morfológicas presentes en los individuos del aislamiento "Bejucal 2010" taxonómicamente relevantes para la diferenciación de *Rhipicephalus* spp. (A) patrón de puntuación moderado y la forma del margen posterior del escudo dorsal en las hembras. (B) Patrón de puntuación moderado del escudo dorsal en los machos

(C) Espiráculos grandes en forma de coma en las hembras. (D) Placas espiraculares en forma de coma y con una cola dorsal alargada en los machos. (E) Labios posteriores a la abertura genital en las hembras en forma de U. (F) Proceso caudal corto y ligeramente redondeado en los machos alimentados. (G) Áreas Porosas en las hembras con una distancia de separación mayor con respecto al diámetro de estas áreas. (H) Placas adanales largas y en forma de trapecio en los machos y presencia de placas accesorias vestigiales estrechas. Las flechas señalan las características relevantes de cada imagen.

Las mediciones de las estructuras clave de las garrapatas machos y hembras examinadas en este estudio se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Medidas (media \pm desviación estándar) de las características claves para la diferenciación entre *Rhipicephalus spp.*

Estructura	Hembras (n=15)		Machos (n=15)	
	Longitud (mm)	Ancho (mm)	Longitud (mm)	Ancho (mm)
Gnatosoma	0.59 \pm 0.04	0.68 \pm 0.03	0.53 \pm 0.02	0.58 \pm 0.02
Base del Capítulo	0.26 \pm 0.04	0.67 \pm 0.06	0.23 \pm 0.02	0.58 \pm 0.02
Hypostoma	0.34 \pm 0.05	0.15 \pm 0.02	0.27 \pm 0.02	0.13 \pm 0.00
Idiosoma	2.25 \pm 0.09	1.35 \pm 0.06	2.27 \pm 0.06	1.41 \pm 0.03
Escudo	1.22 \pm 0.06	1.20 \pm 0.1	-	-
Placas Espiraculares (PE)	0.3 \pm 0.04	0.2 \pm 0.04	0.36 \pm 0.08	0.18 \pm 0.03
Tallo Dorsal en las PE	-	-	0.39 \pm 0.05	-
Distancia entre áreas porosas	0.35 \pm 0.05	-	-	-
Primer festón	-	0.14 \pm 0.02	-	0.14 \pm 0.02
Placas adanales	-	-	0.53 \pm 0.03	0.27 \pm 0.03

En la Figura 2 se muestran los árboles filogenéticos obtenidos para las secuencias de los fragmentos de ADN correspondientes a los genes mitocondriales 16S y 12S ribosomales amplificados por PCR a partir del ADN genómico de las larvas del aislamiento "Bejucal 2010". En ambos casos, los análisis filogenéticos realizados concordaron en agrupar el aislamiento "Bejucal 2010" con la especie *R. sanguineus* s.l. que pertenece al linaje norte o especies tropicales.

La sensibilidad del aislamiento de campo "Bejucal 2010" a amitraz, cumafos y flumetrina se determinó mediante ensayos de inmersión de larvas (LIT) y en el caso del amitraz también se llevó a cabo la prueba del paquete de larvas (LPT) con las modificaciones propuestas por Miller. Según el análisis Probit de los resultados de la mortalidad de los individuos del aislamiento "Bejucal 2010" a diferentes dosis de acaricida obtenida en los bioensayos correspondientes mostrados en la Tabla 2, Flumetrina resultó ser el acaricida más eficaz contra las garrapatas *R. sanguineus* s.l. del aislamiento según el valor de DL50 más bajo observado en el LIT seguido del de cumafos. La $DL_{90} > 0,04\%$, la pendiente de la recta de regresión < 2 y el porcentaje de mortalidad $< 95\%$ a una concentración de 0,03% de amitraz en LPT y LIT sugieren resistencia de las garrapatas del aislamiento al amitraz.

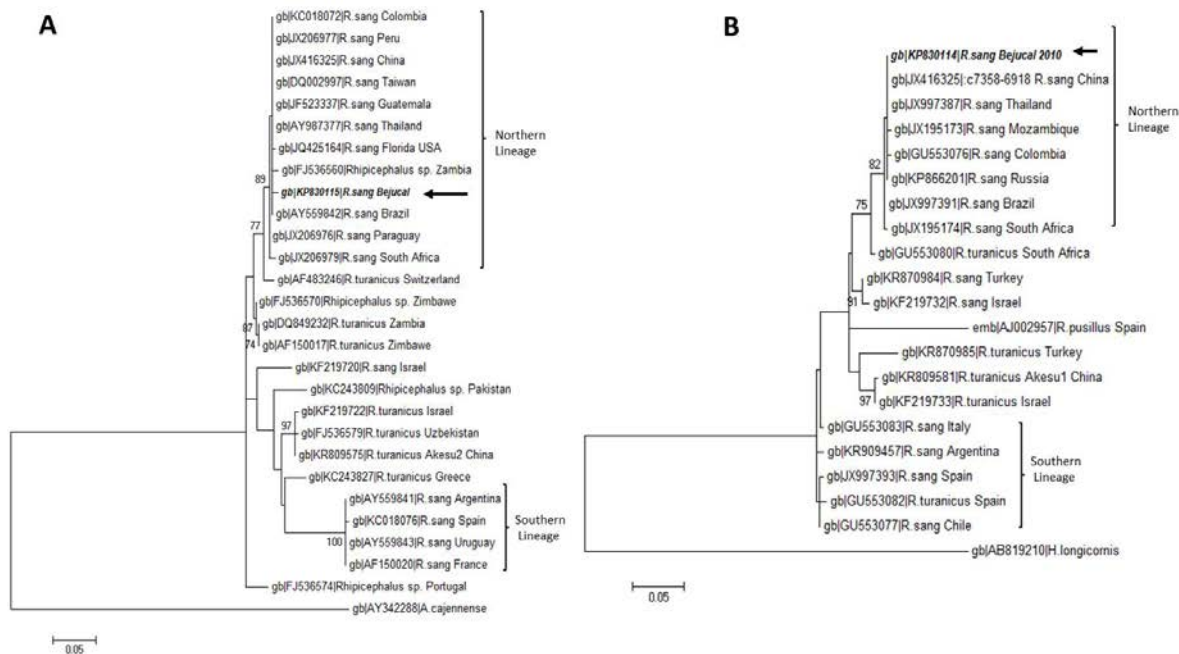


Figura 2. Dendrogramas generados en el análisis filogenético molecular de las secuencias 12S rDNA (A) y 16S rDNA (B) obtenidos para el aislamiento "Bejucal 2010" (aparece en letras negritas) y las secuencias de diferentes especies del complejo *Rhipicephalus sanguineus* disponibles en el GenBank para cada gen. Los números de acceso de las secuencias de 12S y 16S del aislamiento "Bejucal 2010" depositadas en la base de datos GenBank son KP830115 y KP830114, respectivamente. La historia evolutiva de estas secuencias se dedujo utilizando el método de Máxima Verosimilitud basado en el modelo de 3 parámetros de Tamura. Se muestran los árboles con la topología y la longitud de las ramas que maximiza la probabilidad de ajuste de los datos observados al modelo. El porcentaje de árboles en los que los taxones se agrupan juntos se muestra junto a las ramas. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron mediante la aplicación del método del Vecino más cercano (Neighbour-Joining) a una matriz de distancias entre pares de bases estimadas utilizando el Método de Máxima Verosimilitud Compuesta (MCL- Maximum Composite Likelihood). Una distribución gamma discreta de 5 categorías se utilizó para estimar las diferencias de tipo evolutivas entre sitios (+ G, el parámetro = 0,3758 y el parámetro = 0,3263 de 12S y 16S, respectivamente). Los árboles están dibujados a escala, con longitudes de rama medidos como el número de sustituciones por sitio. El análisis incluyó a 28 y 21 secuencias de nucleótidos de 12S y 16S, respectivamente. Se eliminaron todas las posiciones con cobertura de sitio inferior al 95%. Hubo un total de 328 y 356 posiciones en el último conjunto de datos para el 12S y 16S, respectivamente. Los análisis evolutivos se llevaron a cabo en MEGA6 [27].

Tabla 2. Resultados de los bioensayos de sensibilidad a acaricidas de las garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* del aislamiento "Bejucal 2010".

Acaricida	n	Pendiente (±S.E)	DL ₅₀ (95% CL) (%)	DL ₉₀ (95% CL) (%)	X ² (d.f.)
Amitraz (LIT)	4146	1.929±0.052	0.063 (0.050-0.078)	0.289 (0.215-0.422)	269 (28)
Amitraz (LPT)	5015	0.992±0.024	0.0315 (0.01433-0.06758)	0.61784 (0.22895-3.89936)	439 (10)
Cumafos (LIT)	3204	1.444±0.062	0.00037 (0.00020-0.00057)	0.00287 (0.00201-0.00464)	313 (28)
Flumetrina (LIT)	3157	2.069±0.067	0.00004 (0.00003-0.00005)	0.00016 (0.00014-0.00021)	48 (14)

LIT: Ensayo de Inmersión de Larvas; LPT: Ensayo del Paquete de Larvas

n: número de larvas; S.E.: error estandar; 95% CL: 95% de límite de confianza; x²: valor de chi-cuadrado, d.f.: grados de libertad.

Estos resultados constituyen el primer informe de caracterización de sensibilidad a acaricidas de una especie cubana de garrapatas *R. sanguineus* s.l. La información relativa a la distribución regional y la prevalencia de la resistencia a acaricidas en poblaciones cubanas de *R. sanguineus* es muy escasa. En consecuencia, la selección y el uso de acaricidas en el país se basa en criterios distintos de la eficacia, y las aplicaciones son a menudo insuficientes, lo que puede dar lugar a tratamientos costosos, pero ineficaces. Esto aumenta la probabilidad de desarrollar poblaciones de garrapatas resistentes.

A partir de este aislamiento bien caracterizado, se estableció una colonia en nuestro laboratorio. Todos los estadíos parasitarios de las garrapatas se alimentan sobre perros machos de la raza Beagle (*Canis familiaris*) no sensibilizados contra garrapatas, provenientes del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), dentro de cámaras elaboradas artesanalmente. Los estadíos fuera del hospedero en las fases no parasíticas, se mantienen en los laboratorios del CIGB, en frascos de vidrio con malla en la

tapa a 28°C y un 80% de humedad relativa con un fotoperíodo de 12 h luz: oscuridad. El ciclo biológico de las garrapatas *R. sanguineus* s.l. en la colonia bajo las condiciones establecidas se completó en 85 días como promedio, con un mínimo de 60 días y un máximo de 108 días. Este valor es muy cercano a los valores informados por otros autores. Sobre la base de la mortalidad calculada para cada etapa del ciclo vital, a partir de 1914 huevos puestos por una hembra como promedio, se obtuvieron 306 nuevas hembras capaces de poner huevos, lo que representa el 16% del total de huevos iniciales (Figura 3). Estos resultados garantizan el mantenimiento de la colonia y la producción de ejemplares de garrapatas bajo condiciones estandarizadas las que son útiles para la realización de diferentes ensayos biológicos y como modelo experimental en ensayos de desafío, para determinar la eficacia de nuevos antígenos candidatos a vacuna contra garrapatas.

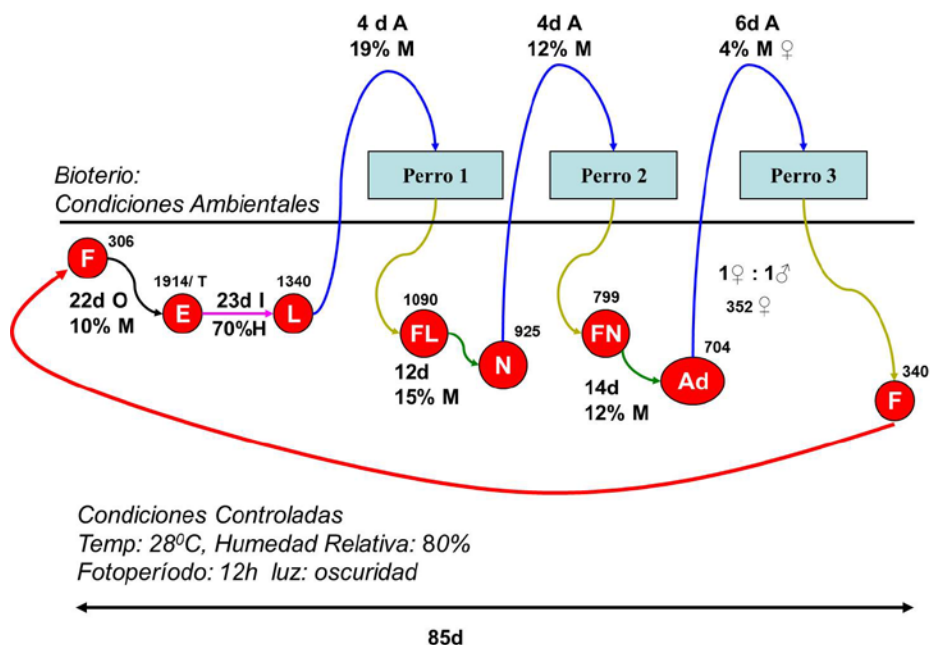


Figura 3. Ciclo parasitario de las garrapatas *R. sanguineus* s.l. en la colonia bajo las condiciones establecidas en el laboratorio. F: hembras repletas, E: huevos, L: larvas, FL: larvas alimentadas, N: ninfas, FN: ninfas alimentadas, Ad: Adultos, d: días, M: mortalidad, O: ovoposición, H: eclosión, I: Incubación, A: alimentación, ♀: hembras, ♂: machos.

Este resultado ha sido introducido en el proceso de investigaciones del CIGB en los trabajos desarrollados en el Proyecto para la búsqueda de nuevos antígenos contra garrapatas. Los tres estadios de las garrapatas *R. sanguineus* de la colonia establecida en el CIGB a partir del aislamiento de campo “Bejucal 2010” se usaron en el reto de conejos inmunizados con el candidato a vacuna anti-garrapatas basado en un péptido de la proteína ribosomal P0. Los resultados de este estudio fueron publicados en la revista “Vaccine” y demostraron que esta colonia de garrapatas es útil para este tipo de experimentos de inmunización-desafío. La validez del sistema conejo - *R. sanguineus* como modelo alternativo adecuado para probar nuevas vacunas contra garrapatas es corroborada además, con la obtención de un efecto similar de los anticuerpos anti- P0 sobre la especie de garrapatas del bovino *R. B. microplus*. Un obstáculo importante de experimentos con nuevos antígenos contra garrapatas para los laboratorios y la industria es el costo de la realización de ensayos en las especies diana. En estos casos, nuestro modelo podría hacer una importante contribución al desarrollo de vacunas contra garrapatas y ectoparásitos en general.

NOVEDAD CIENTÍFICA DEL TRABAJO

- Los resultados presentados en este trabajo constituyen el primer estudio de caracterización de la especie de garrapatas *R. sanguineus* en Cuba.
- Proporcionan un punto de partida para el estudio de las poblaciones cubanas de estas garrapatas.
- Este trabajo es además pionero en el establecimiento de una colonia de esta especie en condiciones de laboratorio en Cuba y aporta conocimientos sobre el comportamiento del ciclo vital de estas garrapatas en diferentes condiciones de humedad y temperatura y alimentado sobre diferentes mamíferos hospederos y esto puede ayudar en el estudio de los complejos mecanismos involucrados en el proceso de infestación de las garrapatas y sus relaciones con el organismo hospedero.

IMPORTANCIA PRÁCTICA PRINCIPAL DEL TRABAJO

- Contar con una colonia de garrapatas de esta especie, desde el punto de vista práctico nos permite desarrollar experimentos para comprender los mecanismos involucrados en la compleja interacción entre las garrapatas y sus hospederos y de las garrapatas como vectores de otros parásitos causantes de enfermedades y contar con un modelo experimental para la pesquisa de antígenos útiles para el desarrollo de vacunas contra garrapatas.
- Este trabajo aborda una temática de vigencia actual, que constituye un problema no resuelto a nivel mundial. En la actualidad, la lucha contra ectoparásitos continua basada fundamentalmente en el uso de sustancias químicas. Cualquier aplicación de tecnología que ayude a disminuir el uso y abuso de sustancias químicas contaminantes y generadoras de resistencia en los ectoparásitos, será un resultado importante y aplicable que dada la situación actual a la que se enfrenta el planeta, es una tarea de urgente prioridad.
- La colonia nos permitió ensayos con el nuevo candidato basado en la proteína ribosomal P0 y permitirá la evaluación de otros antígenos contra garrapatas y el diseño de estrategias más eficientes para el control de garrapatas y enfermedades transmitidas por ellas. La identificación de moléculas útiles contra las infestaciones de garrapatas, su obtención en cantidades suficientes, su inclusión dentro de una formulación vacunal y la demostración de su eficacia en ensayos de inmunización y reto constituyen retos científicos de gran relevancia en este tema.
- GAVAC es la única vacuna por técnicas de ADN recombinante contra garrapatas que se encuentra disponible comercialmente. La obtención de un nuevo antígeno que por vías biológicas diferentes pueda potenciar los efectos de GAVAC, es de gran importancia para mejorar la aplicación práctica de la vacuna en la lucha contra garrapatas y ectoparásitos en general y en la realización comercial de estos productos.
- Dentro de los problemas que hoy tiene Cuba, la batalla económica que nos disponemos a librar es de las más importantes y dentro de la economía está la producción de alimentos como un renglón fundamental para la subsistencia de los cubanos y para la sustitución de importaciones. La producción de carne y leche es un renglón al que el país presta especial atención pues la leche que importamos para satisfacer la

demanda de este producto se hace cada vez más costosa. De manera que si logramos una vacuna contra garrapatas, que mejore el desempeño de la ganadería cubana y disminuya los gastos de la economía cubana en la compra de acaricidas químicos, estaremos haciendo un aporte significativo al país y el hecho de contar con un modelo experimental de garrapatas que sea más factible desde el punto de vista económico que realizar los ensayos sobre especies dianas más costosas es una ventaja que hace el camino más expedito hacia el logro de los objetivos propuestos.

Avaless

- ✚ Encinosa PE; Bello Y; Rodríguez-Mallon A. Genetic and biological characterization of a Cuban tick strain from *Rhipicephalus sanguineus* complex and its sensitivity to different chemical acaricides. (2016) International Journal of Acarology 42 (1):18-25. DOI: 10.1080/01647954.2015.1113309. **Impact Factor:** 1.28.
- ✚ Sanches, G.S., Évora, P.M., Mangold, A.J., Jittapalapongd, S., Rodríguez-Mallon, A., Encinosa, P.E., Bechara, G.H., Camargo-Mathiasa, M.I. Molecular, biological and morphometric comparisons between different geographical populations of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae). (2016) Veterinary Parasitology 215 78–87. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.11.007>. **Impact Factor:** 2.5.

Presentaciones en eventos científicos

- ✚ Congreso Biotecnología Habana - 2011, Habana, Cuba.
- ✚ Fórum de Base de ciencia y Técnica 2013.
- ✚ Congreso Internacional Labiofam 2014
- ✚ Taller de Bioinformática sobre Evolución Viral y Epidemiología Molecular (VEME-Cuba)

Distinciones

- ✚ **2015** Trabajo premiado como Logro Científico-Técnico Anual del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba.

Otros Avaless:

- ✚ Aval del Prof. Gervasio Bechara. Profesor de Patología Animal. Universidad Pontificia Católica de Paraná. Curitiba-PR, Brasil.
- ✚ Aval del Dr. Mario Pablo Estrada García, Director de Investigaciones Agropecuarias del CIGB donde el resultado ha sido introducido en el proceso de investigaciones.
- ✚ Aval del Dr. Luis Méndez Mellor, Director del Laboratorio Nacional de Parasitología.
- ✚ Aval de la Dra. Rafmary Rodríguez Fernández, Presidenta de la Sociedad Cubana de Parasitología Veterinaria.
- ✚ Publicación de los estudios donde el resultado fue introducido en el proceso de investigación en la revista Vaccine. **Impact Factor:** 3.7

Trabajo Completo

“Caracterización por primera vez de una cepa cubana de garrapatas del complejo *Rhipicephalus sanguineus*. Establecimiento de una colonia en el laboratorio”.

Autores principales: Pedro Enrique Encinosa Guzmán, Alina Rodríguez Mallon y Yamil Bello Soto.

Coautores: Pedro Puente, Mario Pablo Estrada García, Carlos Montero, Danny Pérez Pérez, Lillian Gómez Pérez, Lídice Méndez Pérez, Cigry Pérez Pérez, Milagros Vargas, Yamilet Cárdenas Cuellar, Marisdania Joglar Piñeiro, Elsa Rodríguez Rodríguez, Dailenis Abella Matos, Jose Angel Silva Guirado.

Filiación:

CIGB. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

INTRODUCCIÓN

Los ectoparásitos hematófagos tales como mosquitos, pulgas y garrapatas constituyen vectores para la transmisión de agentes infecciosos causantes de enfermedades. Algunas de estas enfermedades afectan directamente al ser humano y/o a sus animales afectivos, mientras que otras son causantes de grandes pérdidas económicas en la esfera agropecuaria. El uso de pesticidas químicos continúa siendo la medida fundamental para el control de garrapatas. No obstante, el uso intensivo de estos acaricidas provoca la contaminación medioambiental y el desarrollo de cepas de garrapatas resistentes a los diferentes tipos de sustancias utilizadas [1]. Además de estos fenómenos, hay una creciente demanda de los consumidores por alimentos libres de químicos que han estimulado la investigación de otros métodos de control de estos ectoparásitos. La vacunación se considera una alternativa promisorio desde el punto de vista de su eficacia, seguridad ambiental y sostenibilidad económica [2]. La factibilidad del uso de antígenos producidos por vía recombinante con este propósito se ha demostrado con las vacunas comerciales contra la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, basadas en la proteína Bm86 (TickGARD, de Hoechst Animal Health, Australia y GAVAC, comercializada por Heber Biotec, Cuba). Ésta última ha resultado efectiva en estudios de campo cuando su aplicación se encuentra incluida dentro de un programa de control integrado. El uso de esta vacuna permite reducir las infestaciones por garrapatas en el ganado bovino y la frecuencia del uso de acaricidas, además de incrementar la producción animal y disminuir la incidencia de enfermedades hemoparasitarias en los lugares donde se ha aplicado [3-5]. Sin embargo, el progreso de vacunas contra garrapatas ha sido lento. Aunque nuevas proteínas se han identificado recientemente y se han propuesto como posibles moléculas protectoras, sólo un número limitado de ellas se han evaluado como antígenos producidos por vía recombinante en ensayos de vacunación. Estos ensayos requieren de un modelo experimental de garrapatas que proporcione los datos biológicos pertinentes como base para investigaciones posteriores.

Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) es una garrapata de tres hospederos que se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo. Su huésped natural es el perro [6], sin embargo, en condiciones de supervivencia puede encontrarse parasitando una gran variedad de animales salvajes y domésticos, incluidos los seres humanos, que no pertenecen a su "cadena trófica natural" [7-9]. Algunas infecciones transmitidas por esta especie de garrapatas son zoonóticas y es por ello que es una de las garrapatas más estudiadas y relevante para la salud pública mundial [9-11]. Sin

embargo, en la actualidad no existe una vacuna con antígenos protectores contra las infestaciones de *R. sanguineus* en los perros.

Esta especie de garrapatas pertenece a la subfamilia Rhipicephalinae en el linaje Metastrata de garrapatas duras, dentro de la familia Ixodidae. Hay evidencias de que *R. sanguineus* puede estar compuesta por más de una especie [12], por lo que su estatus taxonómico es un tema actual de debate mundial. La pobre descripción original de la especie realizada por Latreille [13], la pérdida del espécimen tipo de la especie y las similitudes morfológicas entre las garrapatas que pertenecen al llamado grupo de especies "*R. sanguineus*" [14] complican su clasificación taxonómica y hacen de la identificación de estos especímenes una tarea difícil, incluso para un taxonomista experimentado. Durante la última década, los estudios moleculares han mostrado la variabilidad genética de diferentes cepas de *R. sanguineus* sensu lato (s.l.) y han logrado diferenciar taxones estrechamente relacionados dentro del grupo pero provenientes de diferentes localidades geográficas [12, 15-19]. Estos estudios han demostrado la existencia de dos linajes divergentes dentro de *R. sanguineus* s.l.: el llamado "Linaje sur" o especies de clima templado, que incluyen garrapatas de localidades de Argentina, Uruguay, Chile e Italia y el "Linaje norte" o especies tropicales que incluyen garrapatas de Brasil, Paraguay, Colombia, Sudáfrica, Mozambique y de dos localidades del norte de Argentina [17]. El tamaño, los pesos de las hembras alimentadas, la fecundidad y la duración del ciclo de vida de las garrapatas de esta especie pueden variar para los aislados de las diferentes regiones geográficas. Según la literatura existe una fuerte asociación entre la temperatura ambiente y la población de garrapatas [12, 20]. Bajo condiciones de laboratorio, los parámetros biológicos del ciclo vital de garrapatas *R. sanguineus* varían grandemente en función de la temperatura, la humedad relativa y el tipo de hospedero utilizado [21].

El presente trabajo resume la caracterización por primera vez de un aislamiento de una cepa cubana de campo de garrapatas *R. sanguineus* incluyendo su sensibilidad a diferentes tipos de acaricidas. A partir de este aislamiento de campo que fue clasificado taxonómicamente a partir de estudios morfológicos, morfométricos y moleculares, se estableció una colonia de garrapatas mantenida en perros, su huésped natural. En el laboratorio se establecieron todas las condiciones para el desarrollo de su ciclo de vida en estadios parasitarios y no parasitarios y cada parámetro relevante de su ciclo vital se caracterizó en las condiciones establecidas. Esta colonia por tanto, garantiza la producción de ejemplares de garrapatas bajo condiciones estandarizadas las que son útiles para la realización de diferentes ensayos

biológicos y como modelo experimental en ensayos de desafío, para determinar la eficacia de nuevos antígenos candidatos a vacuna contra garrapatas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento de campo de garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* y establecimiento de una colonia en condiciones de laboratorio.

Se partió de la recolección de 10 hembras repletas naturalmente desprendidas de un perro en el patio de un propietario particular en el municipio mayabequense de Bejucal, un pueblo cerca de la ciudad de La Habana, Cuba (coordenadas geográficas: 22° 55'58 "N 82° 23'13" W). Las larvas obtenidas a partir de estas hembras se mezclaron y se designaron como el aislamiento de campo "Bejucal 2010". A partir de este aislamiento, se estableció una colonia en nuestro laboratorio. Todos los estadios parasitarios de las garrapatas se alimentan dentro de cámaras [22] sobre perros machos de la raza *Beagle* (*Canis familiaris*) no sensibilizados contra garrapatas, provenientes del Centro Nacional de Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB), los cuales se mantienen en perreras del Área Abierta del Bioterio del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) y en jaulas individuales durante los períodos de infestación. Los perros se alimentan con una dieta de pellets (producida por CENPALAB, La Habana, Cuba) y agua *ad libitum*, con fotoperiodo natural y se manejan de acuerdo con las guías internacionales para la experimentación con animales [23]. Una vez que los perros se han utilizado, se incluyen en un programa de adopción.

Las cámaras de alimentación se construyen artesanalmente en el laboratorio. Para la elaboración de las mismas se utilizan pedazos de tela y caucho cortados en círculos de 15 cm de diámetro, roscas cortadas de pomos reciclados de medios de cultivo con sus respectivas tapas (Figura 1). Las telas y el caucho se pegan con cola de contacto (Supergen, España). A las tapas se les abren orificios para propiciar la oxigenación de los sitios de adherencia. Estas cámaras se pegan en la región dorso-costal de los perros. Para ello, los perros se rasuran con una máquina (Electric 2000/2000s Hauptner Herberhotz) inmediatamente antes de pegar las cámaras. La zona rasurada se frota con etanol al 70% para eliminar los pelos cortados y las secreciones sebáceas que pueden interferir con el pegado de las cámaras. La cola de contacto se pone en la piel del animal y en la tela de la cámara teniendo especial cuidado de no poner pegamento en las zonas donde deben adherirse las garrapatas. Los bordes de las cámaras se refuerzan con pegamento, para evitar el desprendimiento de las mismas durante los días que dure la alimentación del estadio de garrapatas correspondiente. Se utilizan collares isabelinos para evitar que los perros se desprendan las cámaras (Figura 1). A las 24 h de haber colocado las cámaras se procede a infestar a los perros con los estadios correspondientes de garrapatas. Cada estadio se

coloca en una cámara independiente. A partir de este momento, los perros se observan diariamente para cosechar las garrapatas alimentadas.

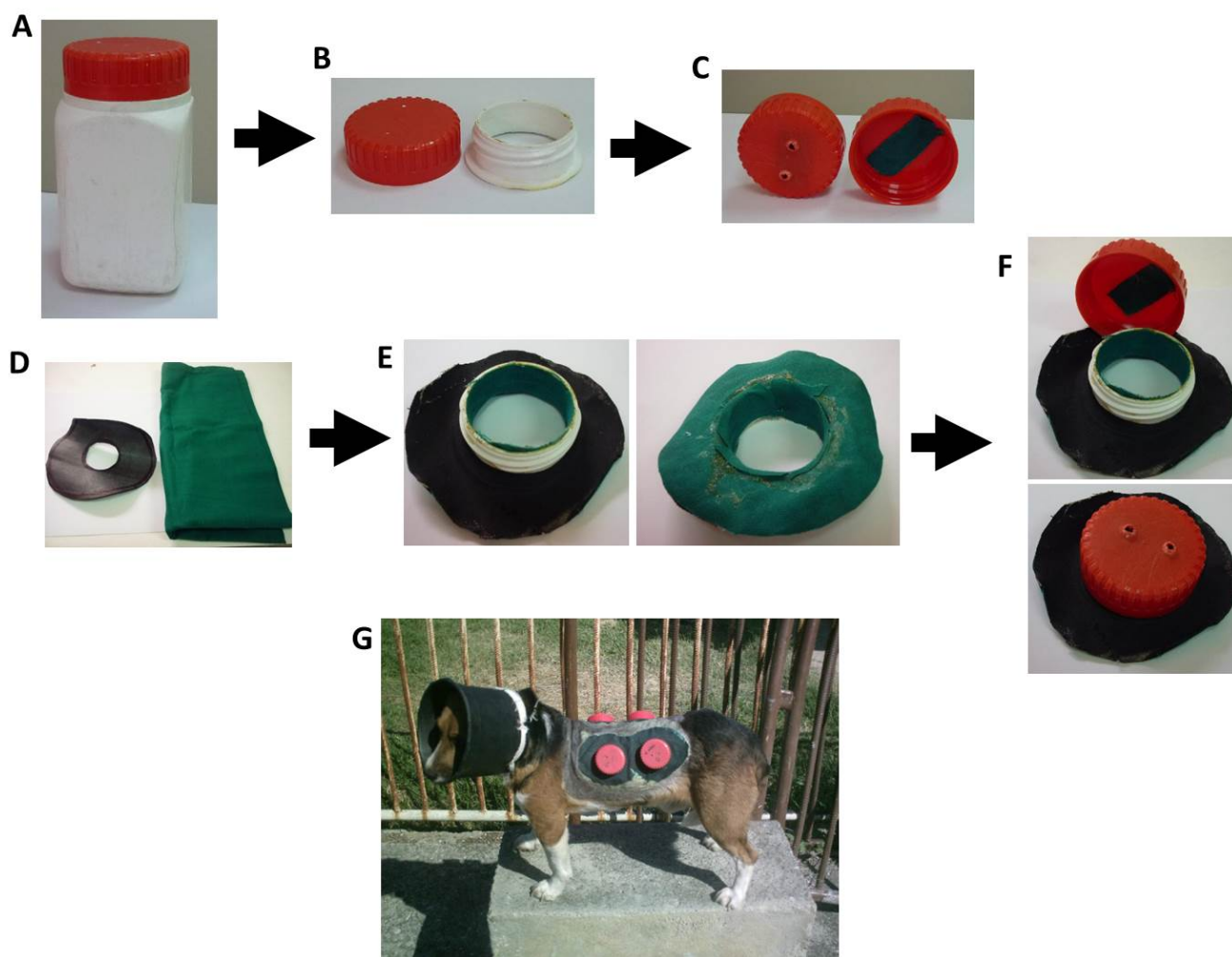


Figura 1. Cámaras de alimentación artesanales utilizadas para alimentar a todos los estadios parasitarios de las garrapatas en la colonia. (A) Pomos reciclados de medios de cultivo (Oxoid); (B) tapas de rosca de los pomos reciclados de medios de cultivo; (C) Agujeros en las tapas para promover la oxigenación; (D) Círculos de caucho y tela utilizados para construir las cámaras; (E, F) Aspecto de las cámaras después del montaje de todos los componentes utilizando cola adhesiva; (G) Cámaras de alimentación pegadas con cola adhesiva a la piel afeitada de los perros.

Los estadios fuera del hospedero en las fases no parasíticas, se mantienen en los laboratorios del CIGB, en frascos de vidrio con malla en la tapa, en una incubadora (WiseCube, DAHIAN Scientific Co., Ltd) con un fotoperiodo de 12 h luz: oscuridad a 28°C y un 80% de humedad relativa.

Clasificación taxonómica de los especímenes de garrapatas "Bejucal 2010".

La caracterización morfológica y morfométrica del aislamiento se realizó mediante la observación bajo un estereoscopio (Kyowa óptico, SDZ-8 Modelo) o un microscopio óptico (Olympus, BH2). Las fotografías se tomaron con una cámara digital (Potencia de disparo A640, Canon, Japón) acoplada a los microscopios por un adaptador (Adaptador para Canon A610 / A620, 52 mm, Soligor). Los especímenes adultos utilizados para la identificación se colocaron a -20°C durante 15 minutos antes de ser fotografiados para evitar el movimiento.

Los genes mitocondriales 12S y 16S ribosomales de la garrapata *R. sanguineus* se utilizaron para la identificación molecular del aislamiento "Bejucal 2010". Se diseñaron cebadores específicos para un PCR convencional (Tabla 1). El ADN genómico de las larvas se purificó utilizando un Sistema de Purificación de ADN de Sangre y Tejidos (Qiagen, Alemania). Las reacciones de PCR se realizaron con el Sistema de Mezcla Verde de GoTaq® (Promega, EE.UU.) y se llevaron a cabo en un ciclador térmico Minicycler™ (MJ Research, Inc., EE.UU.). Las condiciones de PCR incluyeron un paso de desnaturalización a 95°C durante 2 minutos seguido por 35 ciclos de desnaturalización, hibridación y una extensión final a 72°C durante 5 minutos (Tabla 1).

Tabla 1. Oligonucleótidos específicos utilizados en la PCR para la clasificación taxonómica.

Nombre	Secuencia del cebador	Condiciones de PCR
12S rRNAmit F	AAACTAGGATTAGATACCCTATTATTTTAG	D: 95°C por 1 minuto A: 55°C por 1 minuto E: 72°C por 1 minuto
12S rRNAmit R	ACCTCCCTGTGTCAGGATTG	
16S rRNAmit F	CTGCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGTGG	D: 95°C por 1 minuto A: 54°C por 1 minuto E: 72°C por 1 minuto
16S rRNAmit R	CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT	

D- Desnaturalización
A- Hibridación
E- Extensión

Los fragmentos de ADN amplificados se extrajeron de un gel de agarosa utilizando el Sistema de extracción QIAquick (Qiagen, Alemania) y se ligaron al vector pGEM-T Easy (Promega, EE.UU.) para su posterior secuenciación a través de los servicios de la compañía coreana Macrogen (http://www.macrogen.com/eng/macrogen/macrogen_main.jsp). Los análisis de identidad de secuencia se realizaron utilizando el programa BLASTN [24]. Las secuencias obtenidas fueron alineadas utilizando el programa Muscle [25]. La historia evolutiva de estas secuencias se infirió utilizando el método de máxima probabilidad basado en el modelo de 3 parámetros de Tamura [26]. Los árboles

filogenéticos iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron mediante la aplicación del método del Vecino más cercano y los algoritmos BioNJ a una matriz de distancias de pares de bases estimadas utilizando el método de máxima probabilidad compuesta (MCL), y luego se seleccionó el árbol con la topología y la longitud de las ramas que tenía la máxima probabilidad de ser el generador de las secuencias observadas. Una distribución gamma discreta se utilizó para modelar las diferencias de tipo evolutivas entre sitios (5 categorías (+ G, parámetro = 0.3758 para el análisis de los genes 12S y parámetro = 0.3263 para el análisis de los genes 16S)). Los árboles fueron dibujados a escala, con longitudes de rama medidos en el número de sustituciones por sitio. El análisis incluyó a 28 secuencias de nucleótidos para el gen 12S y 21 secuencias de nucleótidos para el gen 16S. Se eliminaron todas las posiciones con cobertura de sitios inferior al 95%. Es decir, se incluyeron todas las posiciones con menos de 5% de saltos en el alineamiento. Datos ausentes y bases ambiguas fueron permitidos en cualquier posición. La fiabilidad de nuestros árboles filogenéticos se estimó mediante el método de "Bootstrap" con 1000 repeticiones. Los análisis evolutivos se llevaron a cabo usando el Programa MEGA6 [27]. En el análisis de cada gen, secuencias homólogas de otros géneros de garrapatas se utilizaron como grupos externos.

Bioensayos para determinar la sensibilidad del aislamiento de campo "Bejucal 2010" a diferentes acaricidas químicos.

La sensibilidad del aislamiento de campo "Bejucal 2010" a amitraz, cumafos y flumetrina se determinó mediante ensayos de inmersión de larvas (LIT) [28] usando sus productos comerciales respectivos en formulaciones de concentrados emulsionables de Bayer: Bovitraz 12,5%, Asuntol 20% y Bayticol 3%, respectivamente. Cada uno de estos productos pertenece a una clase distinta de acaricidas. El amitraz es un pesticida del tipo formamidina, cumafos es un organofosforado (OP) y flumetrina pertenece a la clase piretroide de los pesticidas. Para los ensayos se prepararon diez diluciones seriadas en base 2, en agua destilada partiendo de 2%, 0,1% y 0,0015% de los productos comerciales, respectivamente. Filtros Whatman, N° 1 (Maidstone, Inglaterra) de 7 cm de diámetro, se humedecieron con 1,7 ml de las diluciones de cada producto en placas Petri desechables. Aproximadamente 100 larvas por placa se colocaron sobre los papeles de filtro humedecidos. Luego se añaden 2,2 ml del acaricida a la concentración correspondiente. Un segundo papel de filtro se coloca en la parte superior de cada dilución y se añaden finalmente 1,7 ml de la dilución acaricida correspondiente en la parte superior del segundo filtro. El contacto de las larvas con el acaricida debe

durar 10 minutos. Después de 10 min, los filtros que contienen las larvas se secan con toallas de papel estériles. Una vez que los filtros se secan, las larvas se incuban durante 72 horas a 28°C y 80% de humedad relativa en viales de vidrio. Después de transcurrido ese tiempo las larvas vivas y muertas en las diferentes concentraciones de los acaricidas se cuentan en un estereoscopio. El criterio de mortalidad es la incapacidad de las larvas de caminar.

La prueba del paquete de larvas (LPT) con las modificaciones propuestas por Miller [29] también se llevó a cabo para probar la susceptibilidad a amitraz usando Bovitraz 12,5% de Bayer. A los resultados de los bioensayos se les realizó un análisis Probit [30, 31] utilizando el programa Polo-PC [32]. El modelo Probit calcula las pendientes de las rectas de regresión, las dosis DL_{50} y DL_{90} (DL_{50} es la concentración del acaricida para la cual la mortalidad de las larvas es 50%), y los intervalos de confianza para cada parámetro calculado.

Características relevantes del ciclo de vida de la colonia de garrapatas *R. sanguineus*.

Las viabilidades de larvas, ninfas y adultos en condiciones de inanición se determinaron a 28°C y 80% de humedad relativa con un fotoperiodo de 12 horas de luz: oscuridad. Estos parámetros son importantes para el mantenimiento de la colonia porque permiten conocer el tiempo máximo en el que cada estadio de garrapata mantiene su viabilidad sin alimentarse. Alargar o acortar el ciclo de vida en el laboratorio de manera artificial puede ser importante para garantizar la entrega simultánea de un gran número de ejemplares de garrapatas en los diferentes estadios del ciclo para ensayos de desafío con animales vacunados. Trescientas larvas recién nacidas, separadas en frascos con 50 larvas cada uno, 200 ninfas o 200 adultos, recién mudados, separados en frascos de vidrio con 10 ninfas o adultos cada uno, se mantuvieron en la incubadora y se observaron diariamente para determinar la mortalidad. Los períodos de pre-alimentación y alimentación de los diferentes estadios de garrapata se determinaron utilizando perros infestados con 300 larvas, divididas en tres cámaras, cada una con 100 larvas; 200 ninfas divididas en cuatro cámaras, con 50 ninfas en cada una; y 360 garrapatas adultas (200 hembras y 160 machos), con 25 hembras y 20 machos por cada cámara. Todas las garrapatas tenían 5 días de hambre antes de la alimentación. Las cámaras se observaron dos veces al día. El período de pre-alimentación se determina como el tiempo transcurrido desde que las garrapatas se ponen en las cámaras hasta que se pegan a la piel del perro. El período de alimentación se determinó como el tiempo transcurrido desde que las garrapatas fueron liberadas en las cámaras hasta que las

garrapatas alimentadas se desprenden de la piel del animal hospedero de forma natural. Este último período incluye el período de pre-alimentación.

Las larvas y ninfas alimentadas se contaron y se pesaron en una balanza analítica, y se mantuvieron por separado en frascos de vidrio en la incubadora en las condiciones descritas anteriormente. El período de muda a la siguiente etapa y la mortalidad se determinaron mediante observaciones diarias. Las hembras repletas naturalmente desprendidas de los perros se recogieron, se lavaron en PBS 1X (NaCl 135 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KCl 3 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, pH 7,2) y se secaron sobre papel de filtro (Whatman 3 MM). Se identificaron y se pesaron individualmente. Cada hembra repleta se pega con su lado dorsal hacia abajo en una placa Petri desechable usando cinta adhesiva de doble cara [33] (Figura 2) y se mantienen en la incubadora durante la ovoposición. Los períodos de pre-ovoposición y ovoposición se registraron. El período de pre-ovoposición es el tiempo transcurrido entre el desprendimiento de la hembra repleta y el comienzo de la ovoposición. El período de ovoposición es el tiempo transcurrido desde que apareció el primer huevo hasta que los huevos dejaron de salir por la abertura genital. La masa de huevos puestos por cada hembra se pesó. Una muestra de masas de huevos se pesó cada dos días para hacer una curva de ovoposición. El índice de eficiencia de conversión (CEI) se calculó según Bennett, como el porcentaje del peso de las hembras alimentadas convertido a huevos [34]. Los coeficientes de correlación de Pearson (r) entre el peso de la hembra y los períodos de pre-ovoposición, ovoposición, el peso del aove y el CEI se calcularon usando el Programa estadístico Prism (versión 4.0 para Windows, GraphPad Software, San Diego, California, EE.UU.).

Se estudiaron las masas de huevos para determinar el período de incubación y el porcentaje de huevos eclosionados. Cada masa de huevo se incubó por separado en viales de vidrio en las condiciones descritas anteriormente. Cuando se completó la incubación y los huevos eclosionaron, entonces se contaron las larvas. El porcentaje de eclosión se calcula como el número de larvas / número de huevos x 100 donde el número de huevos se calcula como el peso de la masa de huevos / peso de un huevo el cual se determinó previamente en nuestro laboratorio.

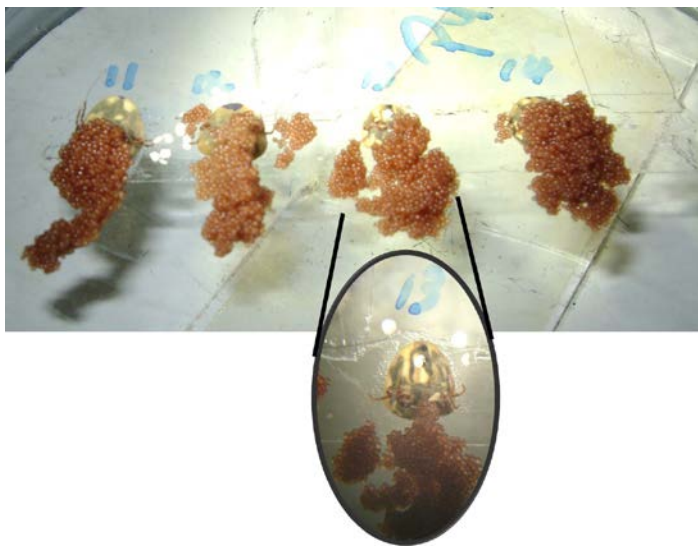


Figura 2. Hembras repletas pegadas con cinta de doble cara a una placa Petri desechable con su parte dorsal hacia abajo, para evitar el movimiento y también evitar la obstrucción de la abertura genital por donde salen los huevos. Las hembras se mantienen en la incubadora durante la ovoposición.

El número de huevos de 174 masas de huevos, previamente pesadas, se determinó contando bajo el estereoscopio. El peso de un huevo se determinó dividiendo el peso de cada masa de huevo por el número correspondiente de huevos contados para cada aove. El promedio entre todas las determinaciones se tomó como el peso de un huevo. De aquí en adelante, el número de huevos puesto por una hembra repleta se determina dividiendo el peso de la masa de huevos por el peso de un huevo determinado.

RESULTADOS y DISCUSIÓN.

Caracterización morfológica, morfométrica y molecular del aislamiento "Bejucal 2010".

Las características morfológicas descritas en la literatura, que son distintivas para el género *Rhipicephalus*, se encontraron en los individuos que pertenecen al aislamiento "Bejucal 2010" [35]. Estas características son: la presencia del aparato bucal anterior y el capítulo corto con la base en forma hexagonal, la presencia de ojos, los espiráculos grandes en forma de coma ortográfica posteriores al cuarto par de patas, la presencia de un surco anal en posición posterior al ano, dos placas adanales y 2 placas accesorias vestigiales presentes a ambos lados del ano en los machos, las coxas I bífidas con dos espolones largos y anchos iguales, las coxas II-IV cada una con un espolón, las coxas IV de talla normal, las extremidades delgadas, el escudo no ornamentado y la presencia de 11 festones en individuos adultos no alimentados de ambos sexos. Las características relevantes para la diferenciación taxonómica de las diferentes especies del género *Rhipicephalus* también se examinaron en los ejemplares del aislamiento "Bejucal 2010" (Figura 3). La presencia de dentición 3/3, el patrón de puntuación del escudo dorsal y la forma de las placas espiraculares en ambos sexos; las placas adanales y escudos accesorios, la proyección dorsal de las placas espiraculares y el proceso caudal en los machos y la forma de la abertura genital, las áreas porosas y el margen posterior del escudo dorsal en las hembras presentaron rasgos compatibles con *R. sanguineus*, sensu lato (sl), según aparecen descritos en la literatura [13, 15, 17, 18, 36, 37]. Las mediciones de las estructuras clave de las garrapatas machos y hembras examinadas en este estudio se resumen en la Tabla 2.

Actualmente, la caracterización morfológica tradicional de los géneros y las especies de garrapatas [38] siempre debe ir acompañada de métodos moleculares, que son herramientas importantes en la sistemática de ácaros y garrapatas [10, 11]. En el caso de la especie *R. sanguineus*, esto es aún más necesario, debido a que su ubicación taxonómica es actualmente un debate en curso a nivel internacional [39]. Los fragmentos de ADN de aproximadamente 0,4 kb y 0.46Kb correspondientes a los genes mitocondriales 16S y 12S ribosomales, respectivamente, fueron amplificados a partir del ADN genómico de larvas del aislamiento "Bejucal 2010" por PCR. Estas secuencias de nucleótidos se depositaron en la base de datos GenBank (12S rDNA: KP830115 and 16S rDNA: KP830114). La comparación de la secuencia de estos fragmentos de ADN utilizando el programa BLASTN mostró identidades entre 100 y 90% con las secuencias que codifican estos genes ribosomales de diferentes cepas del complejo de especies *Rhipicephalus sanguineus*. En la Figura 4 se muestran los árboles

filogenéticos obtenidos por el Método de Máxima Verosimilitud (ML-Maximum Likelihood) que presentan la topología y la longitud de las ramas que maximizan la probabilidad de ser los generadores de las secuencias observadas. Junto a las ramas aparecen los porcentajes $\geq 70\%$ en que esa ramificación aparece y los taxones o especies resultaron agrupados. Como en el análisis de las secuencias, se eliminaron todas las posiciones con menos de 95% de confiabilidad, hubo un total de 328 posiciones y 356 posiciones en el último conjunto de datos para los genes 12S y 16S, respectivamente. En ambos casos, los análisis filogenéticos realizados concordaron en agrupar el aislamiento “Bejucal 2010” con *R. sanguineus* s.l. que pertenece al linaje norte o especies tropicales [12].

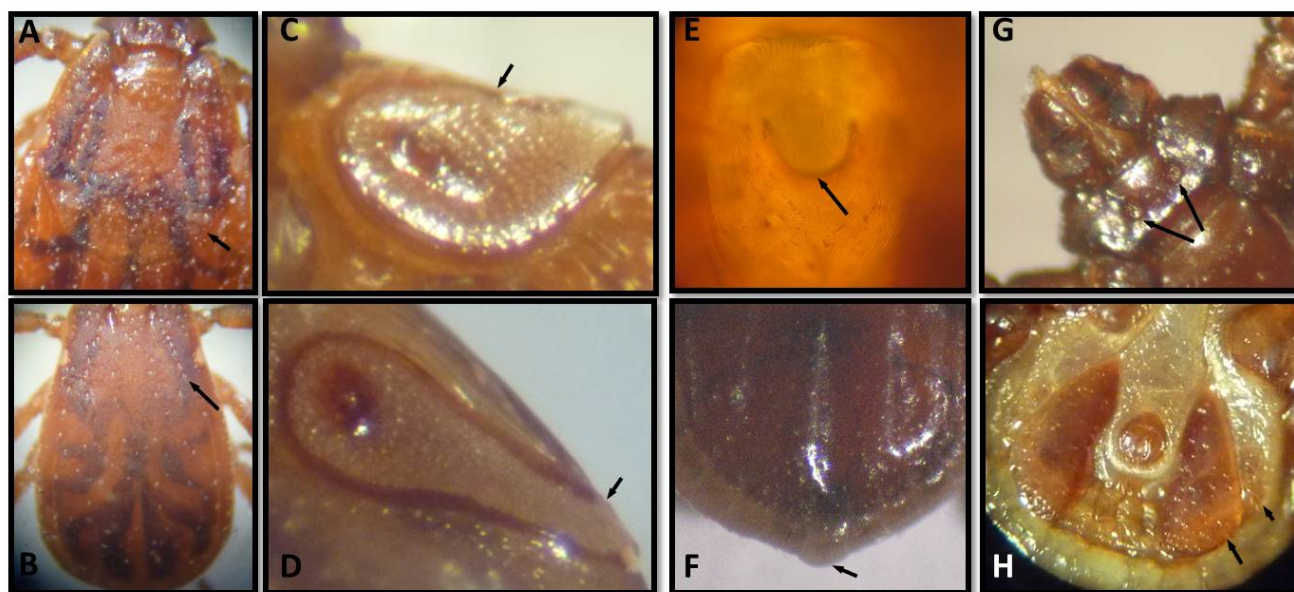


Figura 3. Características morfológicas presentes en los individuos del aislamiento "Bejucal 2010" taxonómicamente relevantes para la diferenciación de *Rhipicephalus* spp. (A) patrón de puntuación moderado y la forma del margen posterior del escudo dorsal en las hembras. (B) Patrón de puntuación moderado del escudo dorsal en los machos (C) Espiráculos grandes en forma de coma en las hembras. (D) Placas espiraculares en forma de coma y con una cola dorsal alargada en los machos. (E) Labios posteriores a la abertura genital en las hembras en forma de U. (F) Proceso caudal corto y ligeramente redondeado en los machos alimentados. (G) Áreas Porosas en las hembras con una distancia de separación mayor con respecto al diámetro de estas áreas. (H) Placas adanales largas y en forma de trapecio en los machos y presencia de placas accesorias vestigiales estrechas. Las flechas señalan las características relevantes de cada imagen.

Tabla 2. Medidas (media \pm desviación estándar) de las características claves para la diferenciación entre *Rhipicephalus spp.*

Estructura	Hembras (n=15)		Machos (n=15)	
	Longitud (mm)	Ancho (mm)	Longitud (mm)	Ancho (mm)
Gnatosoma	0.59 \pm 0.04	0.68 \pm 0.03	0.53 \pm 0.02	0.58 \pm 0.02
Base del Capítulo	0.26 \pm 0.04	0.67 \pm 0.06	0.23 \pm 0.02	0.58 \pm 0.02
Hypostoma	0.34 \pm 0.05	0.15 \pm 0.02	0.27 \pm 0.02	0.13 \pm 0.00
Idiosoma	2.25 \pm 0.09	1.35 \pm 0.06	2.27 \pm 0.06	1.41 \pm 0.03
Escudo	1.22 \pm 0.06	1.20 \pm 0.1	-	-
Placas Espiraculares (PE)	0.3 \pm 0.04	0.2 \pm 0.04	0.36 \pm 0.08	0.18 \pm 0.03
Tallo Dorsal en las PE	-	-	0.39 \pm 0.05	-
Distancia entre áreas porosas	0.35 \pm 0.05	-	-	-
Primer festón	-	0.14 \pm 0.02	-	0.14 \pm 0.02
Placas adanales	-	-	0.53 \pm 0.03	0.27 \pm 0.03

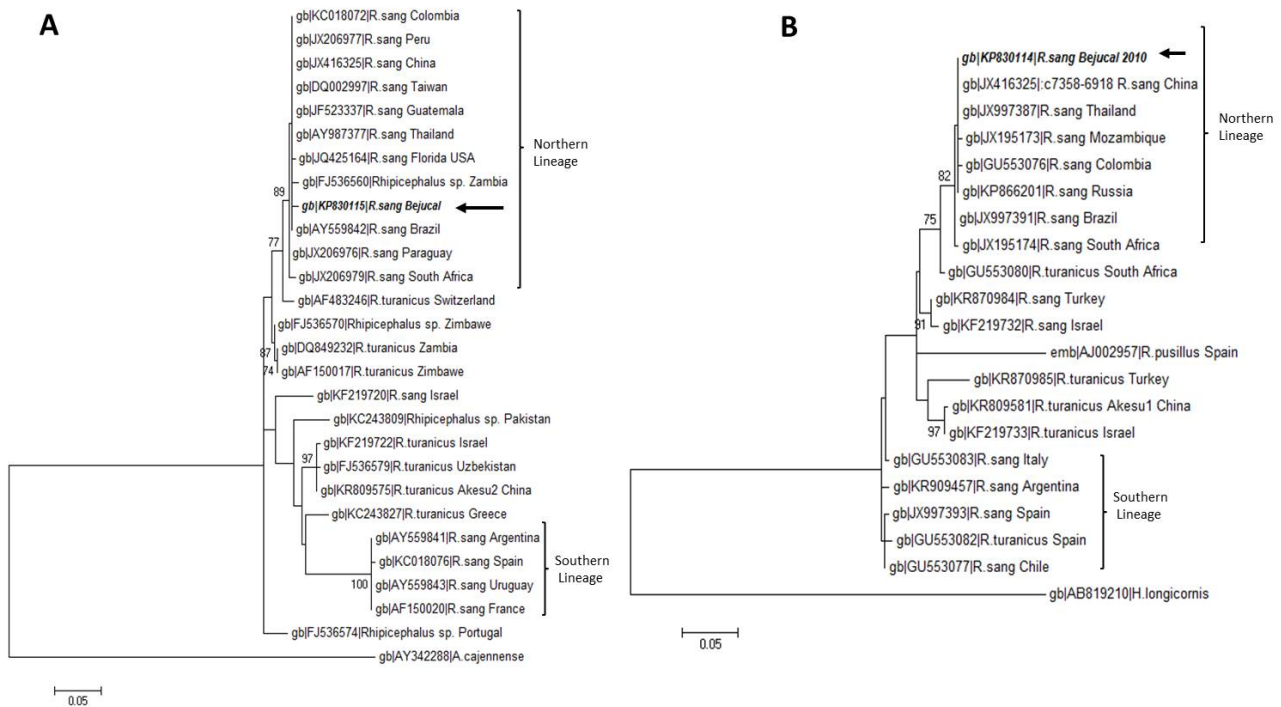


Figura 4. Dendrogramas generados en el análisis filogenético molecular de las secuencias 12S rDNA (A) y 16S rDNA (B) obtenidos para el aislamiento “Bejucal 2010” (aparece en negrita) y las secuencias de diferentes especies del complejo *Rhipicephalus sanguineus* disponibles en el GenBank para cada gen. Los números de acceso de las secuencias de 12S y 16S del aislamiento "Bejucal 2010" depositadas en la base de datos GenBank son KP830115 y KP830114, respectivamente. La historia evolutiva de estas secuencias se dedujo utilizando el método de Máxima Verosimilitud basado

en el modelo de 3 parámetros de Tamura [26]. Se muestran los árboles con la topología y la longitud de las ramas que maximiza la probabilidad de ajuste de los datos observados al modelo (-1049.8298 y -1069.4637 de 12S y 16S, respectivamente). El porcentaje de árboles en los que los taxones se agrupan juntos se muestra junto a las ramas. Los árboles iniciales para la búsqueda heurística se obtuvieron mediante la aplicación del método del Vecino más cercano (Neighbour-Joining) a una matriz de distancias entre pares de bases estimadas utilizando el Método de Máxima Verosimilitud Compuesta (MCL- Maximum Composite Likelihood). Una distribución gamma discreta de 5 categorías se utilizó para estimar las diferencias de tipo evolutivas entre sitios (+ G, el parámetro = 0,3758 y el parámetro = 0,3263 de 12S y 16S, respectivamente). Los árboles están dibujados a escala, con longitudes de rama medidos como el número de sustituciones por sitio. El análisis incluyó a 28 y 21 secuencias de nucleótidos de 12S y 16S, respectivamente. Se eliminaron todas las posiciones con cobertura de sitio inferior al 95%. Hubo un total de 328 y 356 posiciones en el último conjunto de datos para el 12S y 16S, respectivamente. Los análisis evolutivos se llevaron a cabo en MEGA6 [27].

Sensibilidad de las garrapatas *R. sanguineus* s.l. del aislamiento "Bejucal 2010" a amitraz, cumafos y flumetrina.

La mortalidad de los individuos del aislamiento "Bejucal 2010" a diferentes dosis de acaricida que resultó de los bioensayos correspondientes para amitraz, cumafos y flumetrina se muestra en la Figura 5. Las pendientes de las rectas de regresión, las DL_{50} y DL_{90} para cada acaricida se estimaron mediante un análisis Probit de estos datos (Tabla 3). Flumetrina resultó ser el acaricida más eficaz contra las garrapatas *R. sanguineus* s.l. del aislamiento según el valor de DL_{50} más bajo observado en el LIT seguido del de cumafos. La $DL_{90} > 0,04\%$, la pendiente de la recta de regresión < 2 y el porcentaje de mortalidad $< 95\%$ a una concentración de 0,03% de amitraz en LPT y LIT sugieren resistencia del aislamiento al amitraz [40]. Estos resultados constituyen el primer informe de caracterización de la sensibilidad a acaricidas de una especie cubana de garrapatas *R. sanguineus* s.l. Las DL_{50} obtenidas para esta cepa cubana se compararon con estudios similares realizados con garrapatas de otras regiones geográficas debido a la ausencia de una cepa de referencia nacional y de datos para este tipo de bioensayos para la misma especie en nuestro país. Miller y colaboradores describieron la susceptibilidad a amitraz, cumafos y permetrina en otras cepas de *R. sanguineus* [41]. La permetrina es un piretroide como la flumetrina. La comparación de estos resultados con la DL_{50} observada para "Bejucal 2010" sugiere que los individuos en el aislamiento son resistentes a amitraz y muy sensibles a cumafos y flumetrina. Hay muchos trabajos que describen resistencia de las garrapatas a los diferentes acaricidas químicos [42-46] y los mecanismos biológicos implicados en este tipo de resistencias [47-49]. De la misma manera, la resistencia al amitraz ha sido ampliamente discutida por varios autores en

garrapatas *R. microplus* [29, 43, 50, 51]. El modo de acción de los plaguicidas del tipo formamidina tales como amitraz se especula que está relacionado a los efectos tóxicos de estas sustancias sobre el receptor acoplado a proteína G del neuromodulador octopamina [52]. Un mecanismo común de resistencia de los artrópodos a un pesticida es la aparición de mutaciones en el sitio blanco donde ejerce su efecto dicho pesticida lo que genera la insensibilidad [53]. Esta resistencia en otras poblaciones de garrapatas *R. sanguineus* en Cuba y el estudio de sus receptores de octopamina serán un tema interesante para futuros estudios. La información relativa a la distribución regional y la prevalencia de la resistencia a acaricidas en poblaciones cubanas de *R. sanguineus* es muy escasa. En consecuencia, la selección y el uso de acaricidas en el país se basa en criterios distintos de la eficacia, y las aplicaciones son a menudo insuficientes, lo que puede dar lugar a tratamientos costosos, pero ineficaces. Esto aumenta la probabilidad de desarrollar poblaciones de garrapatas resistentes [54].

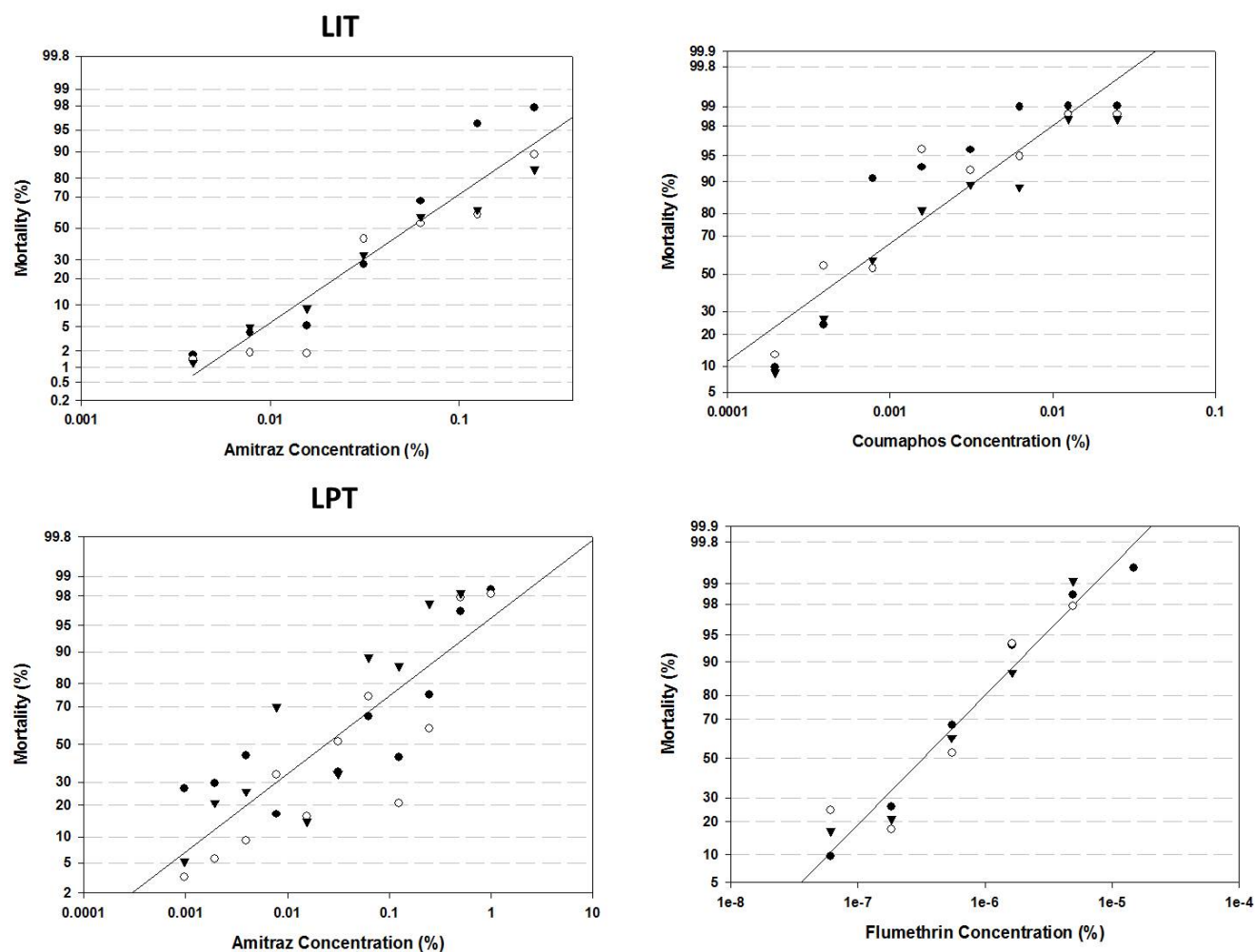


Figura 5. Líneas de regresión que representan la relación entre el porcentaje de mortalidad de las larvas del aislamiento de campo "Bejucal 2010" (en escala de probabilidad) y la dosis del acaricida (en escala logarítmica) para amitraz, cumafos y

flumetrina usando el ensayo de inmersión de larvas (LIT) y la Prueba del paquete de larvas (LPT) (sólo con amitraz). En el gráfico se muestra la mortalidad de las tres repeticiones para cada dosis.

Tabla 3. Resultados de los bioensayos de sensibilidad a acaricidas de las garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* del aislamiento "Bejucal 2010".

Acaricida	n	Pendiente (\pm S.E)	DL ₅₀ (95% CL) (%)	DL ₉₀ (95% CL) (%)	X ² (d.f.)
Amitraz (LIT)	4146	1.929 \pm 0.052	0.063 (0.050-0.078)	0.289 (0.215-0.422)	269 (28)
Amitraz (LPT)	5015	0.992 \pm 0.024	0.0315 (0.01433-0.06758)	0.61784 (0.22895-3.89936)	439 (10)
Cumafos (LIT)	3204	1.444 \pm 0.062	0.00037 (0.00020-0.00057)	0.00287 (0.00201-0.00464)	313 (28)
Flumetrina (LIT)	3157	2.069 \pm 0.067	0.00004 (0.00003-0.00005)	0.00016 (0.00014-0.00021)	48 (14)

LIT: Ensayo de Inmersión de Larvas; LPT: Ensayo del Paquete de Larvas

n: número de larvas; S.E.: error estandar; 95% CL: 95% de límite de confianza; x²: valor de chi-cuadrado, d.f.: grados de libertad.

Caracterización de la colonia de garrapatas.

La Tabla 4 resume los parámetros biológicos asociados con cada etapa del ciclo de vida de las garrapatas *R. sanguineus* bajo las condiciones establecidas en el laboratorio. En general, las garrapatas en nuestra colonia mostraron menor resistencia a la inanición respecto a otros informes de diferentes especies de garrapatas [6, 55-58]. Esta menor resistencia a la inanición puede ser debido a una característica de la especie o que 28°C es una temperatura elevada que favorece el desarrollo acelerado de las garrapatas pero incrementa la mortalidad. Las condiciones de temperatura y humedad son clave en el desarrollo del ciclo de vida de las garrapatas [55, 57-59]. En nuestro laboratorio, tratamos de reproducir las condiciones tropicales de alta temperatura y humedad relativa (28°C y 80%, respectivamente) para el mantenimiento de las garrapatas en la colonia. Es interesante observar que en estas condiciones el desarrollo de los tres estadios después de la muda es más corto en nuestros ejemplares que en otros informes [55, 57-60] debido a que los períodos de pre-alimentación determinados en nuestros ensayos fueron muy cortos. De las ninfas alimentadas que mudaron a garrapatas adultas, el 50% fueron hembras. El peso de las ninfas alimentadas que dio lugar a las hembras adultas fue significativamente mayor ($P < 0,0001$) que el peso promedio de las ninfas alimentadas que mudaron a machos adultos. Se ha documentado en la literatura anterior que el peso de las ninfas alimentadas es un buen indicador para estimar el sexo resultante después de la muda [55, 61-64]. La Tabla 5 muestra los promedios de los parámetros asociados con la ovoposición de las hembras de la colonia. De las hembras repletas recogidas, el 10% no realizó la ovoposición, se volvieron

oscuras y murieron. Este fenómeno ha sido descrito por otros autores [22], pero la causa es desconocida.

Tabla 4. Parámetros biológicos asociados con las garrapatas *R. sanguineus* del aislamiento “Bejucal 2010” en las condiciones establecidas en el laboratorio.

Parámetros	Larvas (n=300)	Ninfas (n=200)	Adultas (n=200)
Inanición (días)	94 (Mort: 100%)	88 (Mort: 59%)	151 (Mort: 0%)
Período de pre-alimentación (h)	17 (100%)	17 (>90%)	24 (68%)
Período de alimentación (días)	4 ± 0.56 (3-5)	4±0.49 (4-5)	6±1.03 (5-9)
Mortalidad en la alimentación (%)	19	12	4
Período de muda (días)	12±0.66 (11-14)	14±0.97(12-17)	-
Mortalidad en la Muda (%)	15	12	-

Tabla 5. Parámetros biológicos asociados con la ovoposición de las garrapatas *R. sanguineus* del aislamiento “Bejucal 2010” en las condiciones establecidas en nuestro laboratorio (n = 174).

Parámetros	X	DE	CV	Rango
Peso de hembras repletas (mg)	147.07	26.02	17.69	69.2-237
Período de Pre-ovoposición (días)	6	1.29	21.07	3-10
Período de Ovoposición (días)	16	3.42	21.75	7-22
Huevos/hembra	1914	516	26.94	735-3202
Peso del Aove (mg)	88.02	23.71	26.94	33.8-147.3
IEC (%)	59.93	11.87	19.81	20.33-81.78

X = Media Aritmética del parámetro.

DE = Desviación Estándar.

CV = Coeficiente de Variación.

IEC = Índice de Eficiencia de Conversión.

La curva de ovoposición muestra que el pico de la producción de huevos se produjo los días 5 y 6 después del inicio del proceso de la ovoposición (Figura 6). Para los días 9 y 10, el porcentaje de ovoposición estaba por debajo del 5% y por debajo del 1% en los días 11 y 12. De acuerdo con la literatura, en otras especies del género *Rhipicephalus*, la mayor parte de la ovoposición se produce en la primera semana del período y las curvas obtenidas son similares a la obtenida en este trabajo [33, 55, 65].

El peso promedio de un huevo de nuestra cepa de garrapatas *R. sanguineus* fue de 46µg. De acuerdo con los coeficientes de Pearson (r) obtenidos, hay una correlación estadísticamente significativa y positiva entre el peso de una hembra alimentada repleta de sangre y el período de ovoposición y el

número de huevos puestos por hembra (Tabla 6). No hubo correlación entre el peso de la hembra repleta de sangre y el período de pre-ovoposición y el IEC. El IEC descrito para otras especies del género *Rhipicephalus* es similar al obtenido en este trabajo [33, 65]. La literatura anterior describe una correlación positiva entre el peso de las hembras repletas y el peso de los huevos de diferentes especies de garrapatas [61, 66-68].

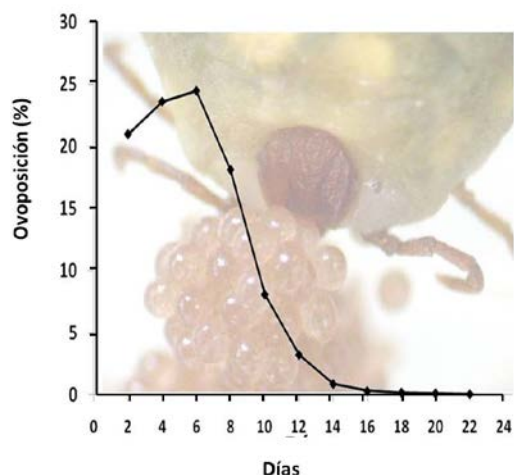


Figura 6. Curva de ovoposición de las garrapatas *R. sanguineus* en la colonia (n = 37).

Tabla 6. Coeficientes de correlación entre los pesos de las hembras repletas y los parámetros biológicos asociados con la ovoposición de las garrapatas *R. sanguineus* bajo las condiciones establecidas en el laboratorio.

Parámetros	PPO	PO	No. huevos	CEI
r de Pearson	0.037	0.23	0.63	-0.040
Valor de P	0.3119	0.0012	$P < 0.0001$	0.2991
Significación de P	NS	**	***	NS

PPO Período de Pre-Ovoposición
PO Período de Ovoposición
CEI Índice de Eficiencia de Conversión
NS No significativo
P Probabilidad

El período de incubación promedio de los huevos hasta la eclosión fue de 23 días con un rango entre 15 y 26 días. De acuerdo con el cálculo que se describió en Materiales y Métodos, el 70% de los huevos eclosionaron. El porcentaje de eclosión obtenido en este trabajo es inferior a muchos de los informes en la literatura [22]. La diferencia puede deberse a la forma en que se realizan los cálculos. En otros laboratorios, este cálculo se lleva a cabo dividiendo por la suma del número de huevos no eclosionados y las larvas contados bajo el estereoscopio (Méndez, L., 2012, comunicación personal), o el promedio de la evaluación visual del % de eclosión de tres personas diferentes [22]. El ciclo

biológico de las garrapatas *R. sanguineus* s.l. en nuestra colonia se completó en 85 días como promedio, con un mínimo de 60 días y un máximo de 108 días. Este valor es muy cercano a los valores informados por otros autores [6, 22]. Sobre la base de la mortalidad calculada para cada etapa del ciclo vital, a partir de 1914 huevos puestos por una hembra como promedio, se obtuvieron 306 nuevas hembras capaces de poner huevos, lo que representa el 16% del total de huevos iniciales (Figura 7).

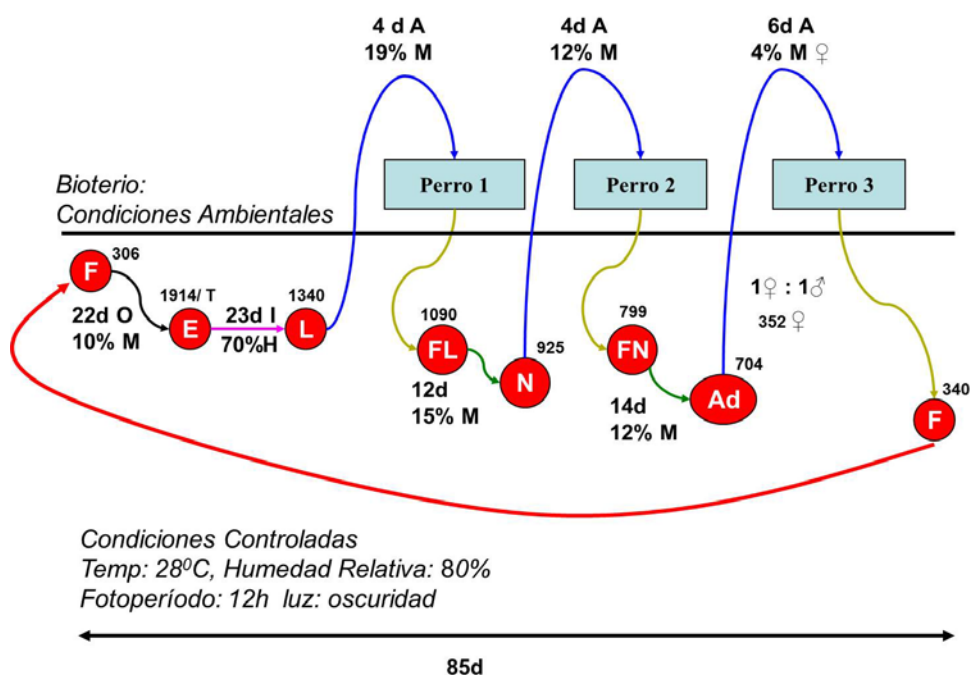


Figura 7. Ciclo parasitario de las garrapatas *R. sanguineus* en la colonia bajo las condiciones establecidas en el laboratorio. F: hembras repletas, E: huevos, L: larvas, FL: larvas alimentadas, N: ninfas, FN: ninfas alimentadas, Ad: Adultos, d: días, M: mortalidad, O: ovoposición, H: eclosión, I: Incubación, A: alimentación, ♀: hembras, ♂: machos.

Estos resultados garantizan el mantenimiento de la colonia y la producción de ejemplares de garrapatas bajo condiciones estandarizadas las que son útiles para la realización de diferentes ensayos biológicos y como modelo experimental en ensayos de desafío, para determinar la eficacia de nuevos antígenos candidatos a vacuna contra garrapatas. De hecho este resultado fue introducido en la práctica durante nuestro proceso de investigación en el Departamento de Biotecnología Animal y en colaboración con el Laboratorio Nacional de Parasitología donde se evaluó la utilidad del péptido de la proteína ribosomal P0 como antígeno vacunal [69] usando conejos como mamífero hospedero y los especímenes de la colonia de garrapatas *R. sanguineus* s.l. establecida en el laboratorio del CIGB a partir del aislamiento de campo “Bejucal 2010, en el reto a cada animal infestándolo con 250 larvas,

100 ninfas y 55 adultos (30 machos y 25 hembras) en cámaras de alimentación independientes para cada estadio como se ha descrito previamente en esta sección para la alimentación de las garrapatas sobre perros (Figura 8).



Figura 8. Cámaras artesanales de alimentación de garrapatas en conejos utilizados en los experimentos de pesquisa de nuevos antígenos contra garrapatas

Todos los datos de la colecta, conteo, pesaje y análisis de la muda de las garrapatas, así como los datos reproductivos de las hembras (peso de los huevos y porcentaje de eclosión) fueron analizados y procesados para determinar la eficacia de los candidatos estudiados. La Tabla 7 muestra un resumen de los resultados obtenidos en ese experimento los cuales validan el uso de la colonia para este tipo de experimentos de inmunización-desafío.

Tabla 7. Efecto de la vacunación de conejos sobre las infestaciones de las garrapatas *R. sanguineus* de la colonia establecida en el CIGB a partir del aislamiento de campo “Bejucal 2010”.

Porciento de Reducción respecto al grupo control de							
Grupos Experimentales	Viabilidad de larvas (I _{VL})	Recuperación de ninfas (I _{RN})	Recuperación de adultas (I _{RA})	Viabilidad de adultas (I _{VA})	Oviposición (I _{OA})	Eclosión (I _{FE})	E(%)
pP0-KLH (n=7)	74% (39±17/184±85) ^c	23% (52±26) ^a	38% (13±10) ^b	8% (83/93) ^a	3% (90.61±36.13) ^a	12% (1307±402/2241±928) ^b	90.25%
Bm86 (n=6)	39% (78±19/156±107) ^b	6% (63±13) ^a	0% (23±3) ^a	4% (147/157) ^a	0% (96.06±36.08) ^a	11% (1413±471/2401±902) ^a	51.04%
KLH (n=7,Control)	(101±66/124±55) ^a	(67±16) ^a	(21±8) ^a	(142/146) ^a	(92.52±30.40) ^a	(1529±520/2313±760) ^a	

I_{VL}=100x(1-VL), I_{RN}=100x(1-RN), I_{RA}=100x(1-RA), I_{VA}=100x(1-VA), I_{OA}=100x(1-OA) and I_{FE}=100x(1-FE).
E Eficacia calculada como 100x[1-(VL x RN x RA x VA x OA x FE)] donde VL, RN, RA, VA, OA and FE representan la viabilidad de las larvas, la recuperación de ninfas, la recuperación de adultas, la viabilidad de adultas, la oviposición y la fertilidad de los huevos respectivamente calculados como se describió en materiales y métodos.
 En paréntesis se muestran los promedios ± SD de ninfas vivas / larvas recuperadas, ninfas recuperadas, hembras recuperadas, número de hembras que ovipositaron / hembras recuperadas, peso del aove (mg) y larvas/huevos.
 a, b, c Letras diferentes significan grupos estadísticamente diferentes en las columnas.

La validez del sistema conejo - *R. sanguineus* como modelo alternativo adecuado para probar nuevas vacunas contra garrapatas es corroborada además, con la obtención de un efecto similar de los

anticuerpos anti- P0 sobre la especie de garrapatas del bovino *R. B. microplus* [70]. Un obstáculo importante de experimentos con nuevos antígenos contra garrapatas para los laboratorios y la industria es el costo de la realización de ensayos en las especies diana. En estos casos, nuestro modelo podría hacer una importante contribución al desarrollo de vacunas contra garrapatas y ectoparásitos en general.

Los resultados presentados en este trabajo constituyen el primer estudio sobre la caracterización de la especie de garrapatas *R. sanguineus* en Cuba, y proporciona un punto de partida para el estudio de las poblaciones cubanas de estas garrapatas y su ubicación taxonómica precisa. Este trabajo es además pionero en el establecimiento de una colonia de *R. sanguineus* en condiciones de laboratorio en Cuba. La caracterización de esta colonia nos proporciona un modelo experimental para diferentes ensayos biológicos que nos ayuden a entender los mecanismos que subyacen en las garrapatas como vectores de otros parásitos causantes de enfermedades, además de los estudios de nuevas moléculas propuestas como candidatos a vacuna contra ectoparásitos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

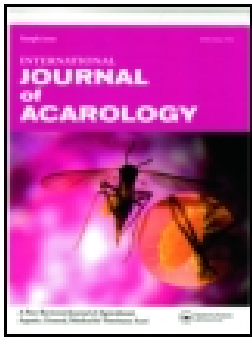
- [1] Shahein YE. Molecular cloning and expression of a larval immunogenic protein from the cattle tick *Boophilus annulatus*. Vet Immunol Immunopathol. 2008;121:281-9.
- [2] de la Fuente J, Kocan KM. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. Parasite Immunol. 2006;28:275-83.
- [3] de la Fuente J, Rodriguez M, Montero C, Redondo M, Garcia-Garcia JC, Mendez L, et al. Vaccination against ticks (*Boophilus spp.*): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac. Genet Anal. 1999;15:143-8.
- [4] de la Fuente J, Almazan C, Canales M, Perez de la Lastra JM, Kocan KM, Willadsen P. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. Anim Health Res Rev. 2007;8:23-8.
- [5] Redondo M, Fragoso H, Ortiz M, Montero C, Lona J, Medellin JA, et al. Integrated control of acaricide-resistant *Boophilus microplus* populations on grazing cattle in Mexico using vaccination with Gavac and amidine treatments. Exp Appl Acarol. 1999;23:841-9.
- [6] Dantas-Torres F. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. Vet Parasitol. 2008;152:173-85.
- [7] Estrada-Peña A, Jongejan F. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. Exp Appl Acarol. 1999;23:685-715.
- [8] Dantas-Torres F, Figueredo LA, Brandao-Filho SP. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2006;39:64-7.
- [9] Dantas-Torres F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. Parasit Vectors. 2010;3:26.
- [10] Black WC, Klompen JS, Keirans JE. Phylogenetic relationships among tick subfamilies (Ixodida: Ixodidae: Argasidae) based on the 18S nuclear rDNA gene. Mol Phylogenet Evol. 1997;7:129-44.
- [11] Cruickshank RH. Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. Systematic & Applied Acarology. 2002;7:3-14.
- [12] Szabo MP, Mangold AJ, Joao CF, Bechara GH, Guglielmone AA. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. Vet Parasitol. 2005;130:131-40.
- [13] Gray J, Dantas-Torres F, Estrada-Peña A, Levin M. Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. Ticks Tick Borne Dis. 2013;4:171-80.
- [14] Camicas J, Hervy J, Adam F, Morel P. Les tiques du monde. Nomenclature, stades décrits, hôtes, répartition (Acarida, Ixodida). Paris 1998.
- [15] Dantas-Torres F, Latrofa MS, Annoscia G, Giannelli A, Parisi A, Otranto D. Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato from the new and old worlds. Parasit Vectors. 2013;6:213-30.
- [16] Burlini L, Teixeira KR, Szabo MP, Famadas KM. Molecular dissimilarities of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Brazil and its relation with samples throughout the world: is there a geographical pattern? Exp Appl Acarol. 2010;50:361-74.
- [17] Moraes-Filho J, Marcili A, Nieri-Bastos FA, Richtzenhain LJ, Marcelo B, Labruna MB. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. Acta Trop. 2011;117:51-5.
- [18] Levin M, Studer E, Killmaster L, Zemtsova G, Mumcuoglu K. - Crossbreeding between different geographical populations of the brown dog tick. Exp Appl Acarol. 2012;58:51-68.

- [19] Nava S, Mastropaolo M, Venzal J, Mangold A, Guglielmone A. Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) in the Southern Cone of South America. *Vet Parasitol.* 2012;190:547-55.
- [20] Uspensky I, Loffe-Uspensky I. The dog factor in brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) infestations in and near human dwellings. *Int J Med Microbiol.* 2002;291 Suppl 33:156-63.
- [21] Bellato V, Daemon E. Influência da temperatura de manutenção de fase não parasitária sobre a fase parasitária de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Rev Bras Parasitol Vet.* 1997;6:15-9.
- [22] Bechara GH, Szabó MPJ, Ferreira BR. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. *Braz J Vet Parasitol.* 1995;4:61-6.
- [23] Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition: The National Academies Press; 2011.
- [24] Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSIBLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997;25:3389-402.
- [25] Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research.* 2004;32: 1792-7.
- [26] 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.
- [27] Tamura K, Stecher G, D. P, A. F, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution.* 2013;30:2725-9.
- [28] Soberanes N, Santamaría M, Fragoso H, García Z. Primer caso de resistencia al amitraz en la garrapata del ganado *Boophilus microplus*. *Técnica Pecuaria en México.* 2002;40:81-92.
- [29] Miller RJ, Davey RB, George JE. Modification of the food and agriculture organization larval packet test to measure amitraz-susceptibility against ixodidae. *J Med Entomol.* 2002;39:645-51.
- [30] Finney DJ. Probit Analysis. London: Third edition, Cambridge University Press; 1971.
- [31] Russell RM, Robertson JL, Savin NE. POLO: A New Computer Program for Probit Analysis. *Bulletin of the ESA.* 1977;23:209-13.
- [32] A User's Guide to Probit or Logit Analysis. Berkeley, CA.: Le Ora Software; Le Ora Software, 1987.
- [33] Gallardo J, Morales J. *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae): Preoviposición, oviposición, incubación de los huevos y geotropismo. *Bioagro.* 1999;11:77-87.
- [34] Bennett GF. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarida: Ixodidae). II. Influence of temperature, humidity and light. *Acarologia.* 1974;16:251-7.
- [35] 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.
- [36] de Oliveira PR, Bechara GH, Denardi SE, Saito KC, Nunes ET, Szabo MP, et al. Comparison of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil and Argentina. *Vet Parasitol.* 2005;129:139-47.
- [37] Mehlhorn H. *Rhipicephalus* Species. In: Mehlhorn H, editor. *Encyclopedia of Parasitology*: Springer Berlin Heidelberg; 2015. p. 1-8.
- [38] Guimarães JH, Tucci EC, Moraes D. Ectoparasitos de Importância Veterinária. São Paulo Plêiade/Fapesp. 2001.

- [39] Nava S, Estrada-Peña A, Petney T, Beati L, Labruna MB, Szabó MPJ, et al. The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). *Veterinary Parasitology*. 2015;208:2-8.
- [40] Ducornez S, Barre N, Miller RJ, Garine-Wichatitsky M. Diagnosis of amitraz resistance in *Boophilus microplus* in New Caledonia with the modified Larval Packet Test. *Vet Parasitol*. 2005;130:285-92.
- [41] Miller RJ, George JE, Guerrero F, Carpenter L, Welch JB. Characterization of acaricide resistance in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae) collected from the Corozal Army Veterinary Quarantine Center, Panama. *J Med Entomol*. 2001;38:298-302.
- [42] Fernández-Salas A, Rodríguez-Vivas RI, Alonso-Díaz MA. First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*. 2012;183:338-42.
- [43] Benavides E, Rodriguez JL, Romero A. Isolation and partial characterization of the Montecitos strain of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1877) multiresistant to different acaricides. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;916:668-71.
- [44] Heath AC, Levot G. Parasiticide resistance in flies, lice and ticks in New Zealand and Australia. *N Z Vet J*. 2014;3:1-32.
- [45] Webster A, Reck J, Santi L, Souza UA, Dall'Agnol B, Klafke GM, et al. Integrated control of an acaricide-resistant strain of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* by applying *Metarhizium anisopliae* associated with cypermethrin and chlorpyrifos under field conditions. *Vet Parasitol*. 2015;207:302-30811.
- [46] Sharma AK, Kumar R, Kumar S, Nagar G, Singh NK, Rawat SS, et al. Deltamethrin and cypermethrin resistance status of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from six agro-climatic regions of India. *Vet Parasitol*. 2012;188:337-45.
- [47] Nodari EF, Roma GC, Furquim KC, Bechara GH, Camargo-Mathias MI. Action of permethrin on *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari Ixodidae) semi-engorged females: Morphophysiological evaluation of salivary glands. *Ticks Tick Borne Dis*. 2012;3:219-26.
- [48] Pereira CP, Oliveira PR, Furquim KC, Bechara GH, Camargo-Mathias MI. Effects of fipronil (active ingredient of Frontline) on salivary gland cells of *Rhipicephalus sanguineus* females (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol*. 2009;166:124-30.
- [49] Roma GC, Camargo-Mathias MI, de Oliveira PR, Furquim KC, Bechara GH. Neurotoxic action of permethrin in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) female ticks. Morphological and cytochemical evaluation of the central nervous system. *Vet Parasitol*. 2013;196:482-91.
- [50] Jonsson NN, Miller RJ, Kemp DH, Knowles A, Ardila AE, Verrall RG, et al. Rotation of treatments between spinosad and amitraz for the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* populations with amitraz resistance. *Vet Parasitol*. 2010;169:157-64.
- [51] Jonsson NN, Hope M. Progress in the epidemiology and diagnosis of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol*. 2007;146:193-8.
- [52] Evans PD, Gee JD. Action of formamidine pesticides on octopamine receptors. *Nature*. 1980;287:60-2.
- [53] Chen AC, He H, Davey RB. Mutations in a putative octopamine receptor gene in amitraz-resistant cattle ticks. *Vet Parasitol*. 2007;148:379-83.
- [54] Andreotti R, Guerrero FD, Soares MA, Barros JC, Miller RJ, Perez de Leon A. Acaricide resistance of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in the Brazilian state of Mato Grosso do Sul. *Rev Bras Parasitol*. 2011;20 127-33.

- [55] Chen Z, Yu Z, Yang X, Zheng H, Liu J. The life cycle of *Hyalomma asiaticum kozlovi* Olenov, 1931 (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Vet Parasitol.* 2009;160:134-7.
- [56] Rodríguez-Vivas R, Rosado A, Basto G, Sotero Z, Rosario R, Fragoso H. Manual técnico para el control de garrapatas en el ganado bovino. Jiutepec., Morelos, México: Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria; 2006.
- [57] Chen Z, Li Y, Liu Z, Yang J, Yin H. The life cycle of *Hyalomma rufipes* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Exp Appl Acarol.* 2009.
- [58] Troughton DR, Levin ML. Life cycles of seven ixodid tick species (Acari: Ixodidae) under standardized laboratory conditions. *J Med Entomol.* 2007;44:732-40.
- [59] Labruna MB, Cabrera RR, Pinter A. Life cycle of *Ixodes luciae* (Acari: Ixodidae) in the laboratory. *Parasitol Res.* 2009;105:1749-53.
- [60] Jacobs PA, Fourie LJ, Horak IG. A laboratory comparison of the life cycles of the dog ticks *Haemaphysalis leachi* and *Rhipicephalus sanguineus*. *Onderstepoort J Vet Res.* 2004;71:15-28.
- [61] Gladney WJ, Dawkins CC, Price MA. *Amblyomma inornatum* (Acarina: ixodidae): Natural hosts and laboratory biology. *J Med Entomol.* 1977;14:85-8.
- [62] Koch HG. Suitability of birds and mammals as hosts for immature stages of the lone star tick, *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol.* 1981;18:93-8.
- [63] Hu R, Rowley WA. Relationship between weights of the engorged nymphal stage and resultant sexes in *Ixodes scapularis* and *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) ticks. *J Med Entomol.* 2000;37:198-200.
- [64] Guglielmone 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.
- [65] Yeruham I, Hadani A, Galkar F. The life cycle of *Rhipicephalus bursa* Canestrini and Fanzago, 1877 (Acarina: ixodidae) under laboratory conditions. *Vet Parasitol.* 2000;89:109-16.
- [66] Arthur DR, Snow KR. The implications of size as shown in *Hyalomma anatolicum anatolicum* (Koch, 1844) (Ixodoidea: Ixodidae). *Wiad Parazytol.* 1967;13:497-509.
- [67] Drummond RO, Whetstone TM, Gladney WJ. Oviposition of the lone star ticks. *Ann Entomol Soc Am.* 1971;64:191-4. .
- [68] Norval RAI. The life cycle of *Amblyomma hebraeum* Kock, 1844 (Acarina: Ixodidae). *J Entomol Soc Southern Africa.* 1974;37:357-67.
- [69] Rodríguez-Mallon A, Fernández E, Encinosa PE, Bello Y, Méndez-Pérez L, Cepero L, et al. A novel tick antigen shows high vaccine efficacy against the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Vaccine.* 2012;30:1782-9
- [70] Rodríguez-Mallon A, Encinosa PE, Méndez-Pérez L, Bello Y, Rodríguez Fernández R, Garay H, et al. High efficacy of a 20 amino acid peptide of the acidic ribosomal protein P0 against the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*. *Ticks and Tick-Borne Diseases.* 2015;6:530-7.

Publicaciones



Genetic and biological characterization of a Cuban tick strain from *Rhipicephalus sanguineus* complex and its sensitivity to different chemical acaricides

Pedro E. Encinosa Guzmán, Yamil Bello Soto & Alina Rodríguez-Mallon

To cite this article: Pedro E. Encinosa Guzmán, Yamil Bello Soto & Alina Rodríguez-Mallon (2015): Genetic and biological characterization of a Cuban tick strain from *Rhipicephalus sanguineus* complex and its sensitivity to different chemical acaricides, International Journal of Acarology, DOI: [10.1080/01647954.2015.1113309](https://doi.org/10.1080/01647954.2015.1113309)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/01647954.2015.1113309>



Published online: 19 Nov 2015.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Genetic and biological characterization of a Cuban tick strain from *Rhipicephalus sanguineus* complex and its sensitivity to different chemical acaricides

Pedro E. Encinosa Guzmán, Yamil Bello Soto and Alina Rodríguez-Mallon

Animal Biotechnology Department, Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Havana, Cuba

ABSTRACT

The chemical control with acaricides is still the most efficient method to control ticks. Vaccination is an alternative method, but currently there is no vaccine with protective antigens against infestations of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) in dogs. However, the anti-tick vaccine progress requires a tick experimental model to provide relevant biological data. The present communication summarizes the characterization of the first isolation of a *R. sanguineus* Cuban field strain. The Cuban strain was closely related to *R. sanguineus* sensu lato belonging to the northern lineage or tropical species. This strain was resistant to amitraz. A colony of *R. sanguineus* ticks was established from this isolation. Feeding protocols and environmental requirements for maintenance under controlled laboratory conditions of this tick strain are described and its laboratory life cycle is characterized. The cycle was completed in 85 days under the conditions established in the laboratory and after each cycle; 16% of the total initial eggs are females able to lay eggs. These results provide the colony's long-term maintenance and reliable production of ticks under standardized conditions suitable as an experimental model for a variety of biological studies including the successful identification of new candidates for anti-tick vaccines.

ARTICLE HISTORY

Received 10 August 2015
Accepted 21 October 2015

KEYWORDS

Rhipicephalus sanguineus;
life cycle; tick strain;
acaricide resistant; tick
model

1. Introduction

Acaricides are routinely used in tick control. The irrational use of these compounds has generated resistant ticks (Rodríguez-Vivas et al. 2006b, 2006c). In addition to this phenomenon, there is a consumer growing demand of chemical-free foods which have stimulated research for another tick control methods. Vaccination is a potentially effective alternative for controlling tick and tick-borne diseases (de la Fuente and Kocan 2006). However, assays for development of new antigens require a tick experimental model to provide the relevant biological data as basic background for further investigations.

Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) is a three-host tick. It has been spread throughout the world by dogs (Dantas-Torres 2008), its natural host. However, for survival, it can be found on a diverse range of wild and domestic animals, as well as humans, which do not belong to its "natural trophic chain" (Estrada-Peña and Jongejan 1999; Dantas-Torres et al. 2006; Dantas-Torres 2010). Some brown dog tick-borne infections are zoonotic and will become increasingly relevant for public health (Dantas-Torres 2010). For this reason, *R. sanguineus* is one of the most studied ticks (Black et al. 1997; Cruickshank 2002). It belongs to the subfamily Rhipicephalinae in the Metastriata lineage of hard ticks, within the family Ixodidae. Its taxonomic status is presently an ongoing debate. Over the last decade, molecular investigations have assessed the genetic variability of *R. sanguineus* sensu lato (s.l.) and differentiated closely related taxa within the *R. sanguineus* group from different geographical localities (Szabo et al. 2005; Burlini et al. 2010; Moraes-Filho et al. 2011; Levin et al. 2012; Nava et al. 2012; Dantas-Torres et al. 2013). Latreille's very poor original description of *R. sanguineus* (Gray et al. 2013), the loss of the type specimen of this species and the morphological similarities among ticks belonging to the so-called "*R. sanguineus* group" (Camicas et al. 1998) complicate their taxonomical classification and make the identification of specimens a difficult task, even for an experienced taxonomist. There is evidence that *R. sanguineus* may be comprised of more than one

species (Szabo et al. 2005). These studies have claimed the existence of two divergent lineages within *R. sanguineus* s.l.: the so-called "southern lineage" or temperate species, which includes ticks from localities of Argentina, Uruguay, Chile and Italy and the northern lineage or tropical species that includes ticks from Brazil, Paraguay, Colombia, South Africa, Mozambique and from two localities of Northern Argentina (Moraes-Filho et al. 2011). The size, engorgement weights, fecundity and the duration of the life cycle of *R. sanguineus* may vary for isolates from different geographical regions. There appears to be a strong association between ambient temperature and tick population (Uspensky and Ioffe-Uspensky 2002; Szabo et al. 2005). Under laboratory conditions, the biological parameters of *R. sanguineus* ticks vary greatly with temperature, relative humidity and host type (Bellato and Daemon 1997).

The present communication summarizes the characterization of the first *R. sanguineus* Cuban field isolate including its sensitivity to different kinds of acaricides. Starting from this field isolation which was taxonomically classified, a colony of *R. sanguineus* ticks maintained on dogs, its natural host, was established as our experimental model for producing a reliable supply of ticks, under standardized conditions, suitable for testing new molecules as anti-tick vaccine candidates. All conditions for the development of its life cycle in parasitic and non-parasitic stages were established. Each relevant parameter of its life cycle was characterized under the established conditions as a start point to determine efficacy of new anti-tick candidate antigens in a challenge trial.

2. Materials and methods

2.1. Field isolation of ticks *Rhipicephalus sanguineus* and establishment of a colony under laboratory conditions

Ten engorged females, naturally detached from dogs, were collected from a private yard in Bejucal, a town near Havana city, Cuba (geographical coordinates: 22°55'58"N 82°23'13"W). Larvae obtained from these females were mixed and designated as field

isolate "Bejucal 2010". From this isolation, a tick colony was established in our laboratory. All parasitic stages of ticks are fed inside craft feeding chambers glued to shaved flanks of Beagle breed, male dogs (*Canis familiaris*) as previously described (Bechara et al. 1995). Dogs not sensitized against ticks are obtained from the National Center for Laboratory Animal Production (CENPALAB), and kept in kennels in the open area of the Vivarium of the Center for Genetic Engineering and Biotechnology (CIGB). Individual boxes are used during infestation periods. Dogs are fed with a pellet diet (produced by CENPALAB, Havana, Cuba) and water *ad libitum*, with natural photoperiod, and are handled according to international guidelines for experimentation with animals (Guide for the care ... 2011). Once the dogs have been used, they are included in an adoption programme.

The feeding chambers are constructed using circles of cloth and rubber, 15 cm in diameter, and screw-tops of recycled culture media bottles. Holes are opened in the caps to promote oxygenation. In general, three chambers are glued to the dog's skin in the dorsal and costal regions with bonding cement (Supergen, Spain). Dogs are shaved with clippers (Electric 2000/2000s Hauptner Herberhotz) immediately before gluing the chambers. The shaved area is washed with 70% ethanol to remove the cut hairs and sebaceous secretions that might interfere with the bonding. Twenty-four hours after placing the chambers, ticks to be fed are placed into them. Each stage is placed in an independent chamber. From this moment, dogs are kept under daily observation to harvest the fed ticks. Elizabethan collars are used during infestation periods to prevent chamber removal. The non-parasitic stages are kept in glass flasks with mesh tops, in an incubator (Wisecube, Dahian Scientific Co., Ltd.) with a photoperiod of 12 h light: 12 h dark, at 28°C, with 80% relative humidity.

2.2. Taxonomic classification of "Bejucal 2010" tick specimens

Morphological and morphometric characterizations of collected specimens were performed by observation under a stereoscope (Kyowa Optical, Model SDZ-8) or a light microscope (Olympus, BH 2). Pictures were taken with a digital camera (Power Shot A640, Canon, Japan) coupled to the microscopes by an adapter (Adapter for Canon A610/A620, 52 mm, Soligor). The specimens used for identification were placed at -20°C for 15 minutes before being photographed to prevent movement.

The 12S and 16S ribosomal mitochondrial genes of the *R. sanguineus* tick were used for molecular identification of the isolate "Bejucal 2010". Specific primers were designed for conventional Polymerase Chain Reaction (PCR) (Table 1). Genomic DNA from larvae was purified using DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Germany). The PCR reactions were performed using the System GoTaq® Green Master Mix (Promega, USA) and was carried out in a Minicycler™ thermal cycler (MJ Research, Inc., USA). PCR conditions included an initial denaturation step at 95°C for 2 minutes followed by 35 cycles of denaturation, annealing and a final extension at 72°C for 5 minutes (Table 1). The amplified DNA fragments were extracted from an agarose gel using the QIAquick Gel Extraction kit (250) (Qiagen, Germany) and ligated to the pGEM-T Easy Vector (Promega, USA) for subsequent sequencing through the services of the Korean company

MacroGen (http://www.macrogen.com/eng/macrogen/macro_gen_main.jsp). Sequence identity analysis was performed using BLASTn (Altschul et al. 1997). The sequences obtained were aligned using Muscle programme (Edgar 2004). The evolutionary history of these sequences was inferred by using the maximum likelihood method based on the Tamura 3-parameter model (Tamura 1992). Initial tree(s) for the heuristic search were obtained by applying the neighbour-joining method and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood (MCL) approach, and then selecting the topology with superior log-likelihood value. A discrete Gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites (five categories (+G, parameter = 0.3758 for 12S gene analysis and parameter = 0.3263 for 16S gene analysis)). The trees were drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis involved 28 nucleotide sequences for 12S gene and 21 nucleotide sequences for 16S gene. All positions with less than 95% site coverage were eliminated. That is, fewer than 5% alignment gaps, missing data and ambiguous bases were allowed at any position. The reliability of our phylogenetic trees was estimated by the Bootstrap Method with 1000 replicates. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6 (Tamura et al. 2013). For each gene, homologous sequences from other tick genera were used as out-groups.

2.3. Bioassays to determine the sensitivity of the field isolate "Bejucal 2010" to chemical acaricides

The sensitivity of the field isolate "Bejucal 2010" to amitraz, coumaphos and flumethrin was determined by the Larval Immersion Test (LIT) (Soberanes et al. 2002), using the commercial products in emulsifiable concentrate formulations from Bayer: Bovitraz 12.5%, Asuntol 20% and Bayticol 3%, respectively. Each one belongs to a different major class of acaricides. Amitraz is a pesticide of the formamidine type, coumaphos is an organophosphate (OP) and flumethrin belongs to the pyrethroid class of pesticides. Ten serial dilutions in distilled water with base 2 from 2%, 0.1% and 0.0015% of the commercial products were prepared, respectively. Whatman filters, No. 1 (Maidstone, England), 7 cm diameter, were moistened with 1.7 mL of the dilutions of each product in disposable Petri dishes. Approximately 100 larvae were placed per dish. Acaricide (2.2 mL) of the corresponding concentration was added. A second filter paper was placed on top of each dilution and finally 1.7 mL of the corresponding acaricide dilution was added on top of the second filter. The larval contact with the acaricide should last 10 minutes. After 10 minutes, the filters containing larvae were dried with sterile paper towels. Once the filters had dried, the larvae were incubated for 72 h at 28°C and 80% relative humidity in glass vials. Live and dead larvae in different acaricide concentrations were counted under a stereoscope. The mortality criterion is the inability of tick larvae to walk. The Larval Packet Test (LPT) with the modifications proposed by Miller (Miller et al. 2002) was also performed to test susceptibility to amitraz using Bovitraz 12.5% from Bayer. Probit analysis (Finney 1971; Russell et al. 1977) was run on the bioassay results using Polo-PC (Le Ora Software 1987). The Probit model calculates the slopes of the regression lines, the LD₅₀ and LD₉₀ dosages (LD₅₀ is the concentration for which 50%

Table 1. Specific oligonucleotide primers used in PCR for taxonomic classification.

Name	Sequence	PCR conditions
12S rRNAmit F	AAACTAGGATTAGATACCCTATTATTTTAG	D: 95°C for 1 minute A: 55°C for 1 minute E: 72°C for 1 minute
12S rRNAmit R	ACCTCCCTGTGTGTCAGGATTG	
16S rRNAmit F	CTGCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGTGG	D: 95°C for 1 minute A: 54°C for 1 minute E: 72°C for 1 minute
16S rRNAmit R	CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT	

D: denaturalization; A: annealing; E: extension.

mortality of larvae is expected), and the confidence intervals for each acaricide.

2.4. Relevant characteristics of the life cycle of the *Rhipicephalus sanguineus* tick colony

The larval, nymph and adult viabilities under starvation conditions were determined at 28°C and 80% relative humidity with a photoperiod of 12 h light: 12 h dark. It is important to know the maximum time in which each tick stage keeps its viability unfed, to ensure the simultaneous delivery of a large number of specimens for challenge trials on vaccinated animals. Three hundred newly hatched larvae, separated into flasks with 50 larvae each, 200 nymphs and 200 adults, newly moulted, separated in glass flasks with 10 nymphs or adults each were kept in the incubator and observed daily to determine their mortality.

The pre-feeding and feeding periods of the different tick life stages were determined using dogs infested with 300 larvae, divided into three chambers, each with 100 larvae; 200 nymphs divided into four chambers, with 50 nymphs each; and 360 adult ticks (200 females and 160 males), with 25 females and 20 males per chamber. All ticks had 5 starvation days prior to feeding. Chambers were observed twice a day. The pre-feeding periods were determined as the time elapsed from when the ticks were released into the chambers until they attached to the dog's skin. The feeding period was determined as the time elapsed from when the ticks were released into the chambers until the engorged ticks dropped off naturally. This latter period includes the pre-feeding period.

The fed larvae and nymphs were counted, weighed on an analytical balance, and kept separately in glass flasks in the incubator under the conditions described above. The moulting period to the next stage and mortality were determined by daily observations. Dropped-off, engorged females were collected, washed in PBS 1X (135 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, 3 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.2) and dried on filter paper (Whatman 3 MM). They were identified and weighed individually. Each engorged female was stuck, dorsal side down, on double-sided tape in a disposable Petri dish (Gallardo and Morales 1999) and maintained in the incubator during oviposition. The pre-oviposition and oviposition periods were recorded. The pre-oviposition period is the elapsed time between the engorged female detaching and the oviposition starting. The oviposition period is the elapsed time from when the first egg appeared until eggs ceased to emerge from the genital opening. The egg mass laid by each female was weighed. A sample of egg masses was weighed every 2 days to do an oviposition curve. The conversion efficiency index (CEI) was calculated as the percentage of the female's weight

converted into eggs, according to Bennett (Bennett 1974). Pearson's correlation coefficients (*r*) between female weight and pre-oviposition period, oviposition period, the CEI and the egg weight were calculated using Prism statistical software (version 4.0 for Windows, GraphPad Software, San Diego, California, USA).

One hundred egg masses were studied to determine the incubation period and the percentage of hatched larvae. Each egg mass was incubated separately in glass vials under the conditions described above. When the hatching was completed, the larvae were counted. The hatching percentage is calculated as the number of larvae/number of eggs × 100, where the number of eggs was calculated as egg mass weight/weight of one egg, which was determined previously in our laboratory.

The egg number of 174 egg masses, previously weighed, was determined by counting under the stereoscope. The weight of one egg was determined by dividing the weight of each egg mass by the corresponding number of eggs. The average among all determinations was taken as the weight of one egg. From here onward, the egg number laid by an engorged female will be determined by dividing the egg mass weight by this one-egg weight.

3. Results and discussion

3.1. Morphological and molecular characterization of isolate "Bejucal 2010"

Morphological characteristics described in the literature, which are distinctive for the genus *Rhipicephalus*, were found in the specimens belonging to "Bejucal 2010" (Estrada-Peña et al. 2004). These characteristics are the following: the presence of a short capitulum with anterior mouthparts and hexagonal shape of the entire basis capituli, the presence of eyes, large spiracular plates posterior to the fourth pair of legs, with scattered goblets and comma-shaped, the presence of an anal groove posterior to the anus, two adanal plates and two vestigial accessory plates present to either side of the anus in males, coxae I bifid with two equal long and broad spurs, coxae II–IV each with one spur, coxae IV of normal size, the presence of 11 festoons in unfed adult individuals of both sexes, the scutum without ornamentation and slender legs with pale rings. The taxonomically relevant characteristics for *Rhipicephalus* spp. differentiation were also examined (Figure 1). Dentition 3/3, the punctuation pattern on dorsal scutum and shape of spiracular plates in both sexes; adanal plates, accessory shields, dorsal projection of spiracular plates and caudal process in males and genital opening shape, porose areas and posterior margin of dorsal scutum in females were closely related to *R. sanguineus* s.l., as reported in the previous literature

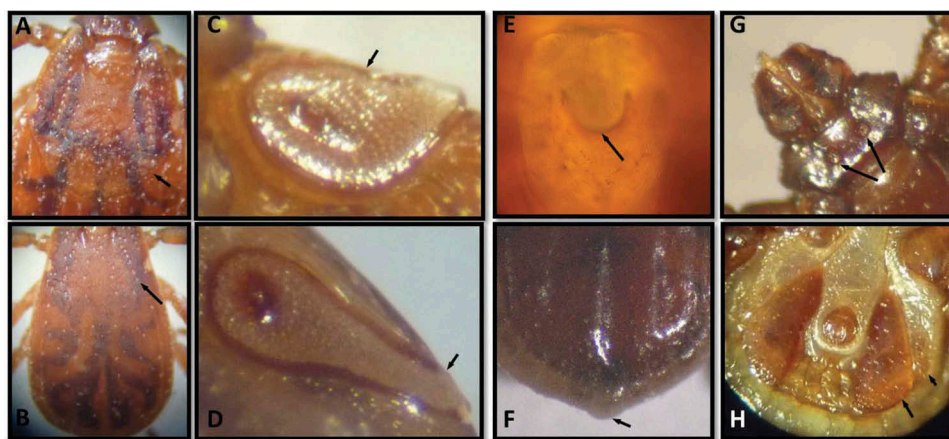


Figure 1. Taxonomically relevant morphological characteristics for *Rhipicephalus* spp. differentiation in individuals of isolate "Bejucal 2010". (A) Moderate punctuation pattern in the dorsal scutum and shape of posterior margin in females. (B) Moderate punctuation pattern in the dorsal scutum in males; (C) comma-shaped spiracles in females; (D) comma-shaped and dorsal tail of spiracular plates in males. (E) U-shaped posterior lips of the genital opening in females. (F) Short and slightly rounded caudal process in fed males. (G) Porose areas in females with broad separation distance relative to the diameter of these areas. (H) Long trapezoid and narrow adanal plates and vestigial accessory plates in males. Arrows point the relevant characteristics in each picture.

Table 2. Measurements (mean \pm standard deviation) of key characteristics for differentiation among *Rhipicephalus* spp.

Structure	Females (n = 15)		Males (n = 15)	
	Length (mm)	Breadth (mm)	Length (mm)	Breadth (mm)
Gnathosome	0.59 \pm 0.04	0.68 \pm 0.03	0.53 \pm 0.02	0.58 \pm 0.02
Basis capituli	0.26 \pm 0.04	0.67 \pm 0.06	0.23 \pm 0.02	0.58 \pm 0.02
Hypostome	0.34 \pm 0.05	0.15 \pm 0.02	0.27 \pm 0.02	0.13 \pm 0.00
Idiosome	2.25 \pm 0.09	1.35 \pm 0.06	2.27 \pm 0.06	1.41 \pm 0.03
Scutum	1.22 \pm 0.06	1.20 \pm 0.1	–	–
Spiracular plates	0.3 \pm 0.04	0.2 \pm 0.04	0.36 \pm 0.08	0.18 \pm 0.03
Dorsal tail in spiracular plates	–	–	0.39 \pm 0.05	–
Distance between porose areas	0.35 \pm 0.05	–	–	–
First festoon	–	0.14 \pm 0.02	–	0.14 \pm 0.02
Adanal plates	–	–	0.53 \pm 0.03	0.27 \pm 0.03

(de Oliveira et al. 2005; Moraes-Filho et al. 2011; Levin et al. 2012; Dantas-Torres et al. 2013; Gray et al. 2013; Mehlhorn 2015). Measurements for key structures of males and female ticks examined in this study are summarized in Table 2.

Currently, traditional morphological characterization of the genera and species of ticks (Guimarães et al. 2001) should always be accompanied by molecular methods, which are important tools in the systematics of mites and ticks (Black et al. 1997; Cruickshank 2002). In the case of the species *R. sanguineus*, this is even more necessary, because its taxonomic status is presently an ongoing debate (Nava et al. 2015). DNA fragments of about 0.46 Kb and 0.4 Kb corresponding to the 16S and 12S ribosomal mitochondrial genes, respectively, were amplified from larval genomic DNA of “Bejucal 2010” by PCR. These nucleotide sequences have been deposited in the GenBank database (12S rDNA: KP830115 and 16S rDNA: KP830114). The sequence comparison of these DNA fragments using the BLASTn programme showed identities between 100% and 90% with sequences encoding

these ribosomal genes of different strains from *R. sanguineus* complex. The phylogenetic trees with the highest log likelihood obtained according to the maximum likelihood method are shown (Figure 2). The percentage of trees in which the associated taxa clustered together with $\geq 70\%$ reliability is shown next to the branches. As in the sequence analysis, all positions with less than 95% site coverage were eliminated; there were a total of 328 positions and 356 positions in the final data set for the genes 12S and 16S, respectively. In both cases, phylogenetic analyses were concordant in clustering our isolate with *R. sanguineus* s.l. belonging to the northern lineage or tropical species (Szabo et al. 2005).

3.2. Sensitivity of *Rhipicephalus sanguineus* ticks from isolate “Bejucal 2010” to amitraz, coumaphos and flumethrin

The mortality of individuals of isolate “Bejucal 2010” to different doses of acaricide resulting from the corresponding bioassays for amitraz, coumaphos and flumethrin is shown in Figure 3. Slopes of the regression lines, LD₅₀ and LD₉₀ for each acaricide were estimated by probit analysis of these data (Table 3). The most effective acaricide against *R. sanguineus* ticks in our isolation was flumethrin as shown by the lowest LD₅₀ observed in the LIT followed by coumaphos. The LD₉₀ $\geq 0.04\%$, a slope of the regression line <2 and a percentage of mortality $<95\%$ at 0.03% of amitraz in LPT and LIT suggest resistance to amitraz (Ducornez et al. 2005). These results constitute the first report of acaricide sensitivity characterization in a Cuban *R. sanguineus* species. The LD₅₀ from our *R. sanguineus* strain was compared with similar studies in other locations due to the absence of a national reference strain and data for this kind of bioassay for the same species in our country. Miller described susceptibility to amitraz, coumaphos and permethrin in other *R. sanguineus* strains (Miller et al. 2001). Permethrin is a pyrethroid-like flumethrin. The comparison of these results with the LD₅₀ observed for “Bejucal 2010” suggests that individuals in our colony are resistant to amitraz

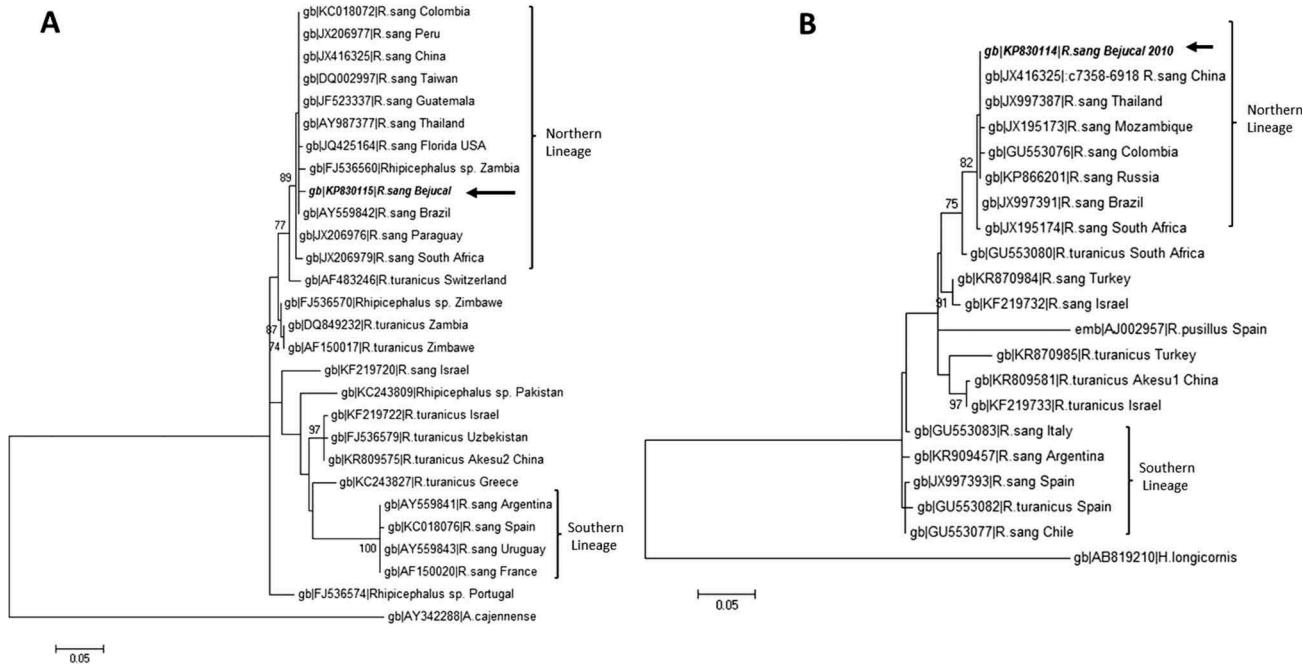


Figure 2. Dendrograms generated in the molecular phylogenetic analysis from the sequences of 12S rDNA (A) and 16S rDNA (B) obtained for isolate Bejucal 2010 (appear in bold) and the sequences of *Rhipicephalus sanguineus* complex available in GenBank for each gene. The accession numbers for the 12S and 16S sequences of the “Bejucal 2010” isolate deposited in the GenBank database are KP830115 and KP830114, respectively. The evolutionary history was inferred by using the maximum likelihood method based on the Tamura 3-parameter model (Tamura 1992). The trees with the highest log likelihood (–1049.8298 and –1069.4637 for 12S and 16S, respectively) are shown. The percentage of trees in which the associated taxa clustered together is shown next to the branches. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained by applying the neighbour-joining method to a matrix of pairwise distances estimated using the maximum composite likelihood (MCL) approach. A discrete Gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites (five categories (+G, parameter = 0.3758 and parameter = 0.3263 for 12S and 16S, respectively)). The trees are drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The analysis involved 28 and 21 nucleotide sequences for 12S and 16S, respectively. All positions with less than 95% site coverage were eliminated. There were a total of 328 and 356 positions in the final data set for 12S and 16S, respectively. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6 (Tamura et al. 2013).

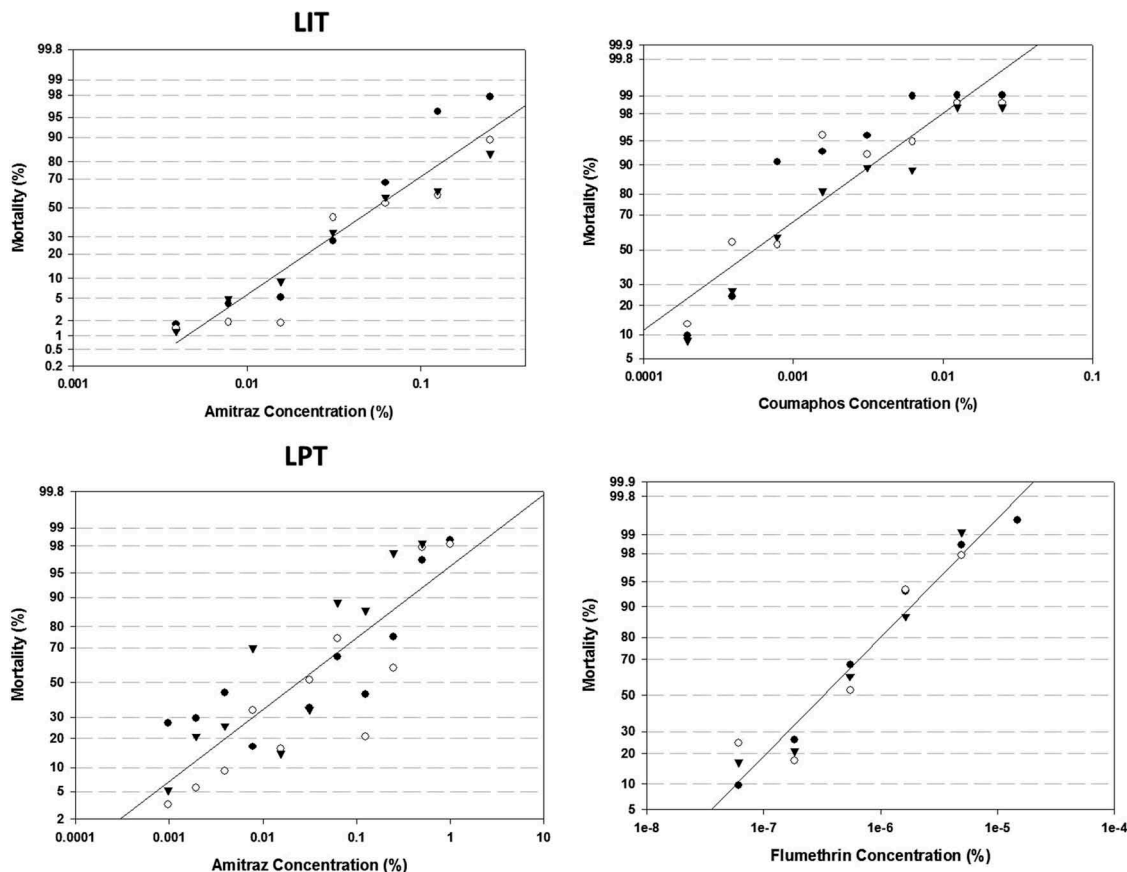


Figure 3. Regression lines representing the relationship between the percentage of larval mortality of the field isolate “Bejucal 2010” (in probability scale) and the acaricide dose (in logarithmic scale) for amitraz, coumaphos and flumethrin using the Larval Immersion Test (LIT), and the Larval Packet Test (LPT) (only with amitraz). The mortality of three replicates at each dose is shown in the graph.

Table 3. Bioassay results for acaricide sensitivity of *Rhipicephalus sanguineus* ticks in the isolation “Bejucal 2010”.

Acaricide	n	Slope (\pm S.E.)	LD ₅₀ (95% CL)	LD ₉₀ (95% CL)	χ^2 (d.f.)
Amitraz (LIT)	4146	1.929 \pm 0.052	0.063 (0.050–0.078)	0.289 (0.215–0.422)	269 (28)
Amitraz (LPT)	5015	0.992 \pm 0.024	0.0315 (0.01433–0.06758)	0.61784 (0.22895–3.89936)	439 (10)
Coumaphos (LIT)	3204	1.444 \pm 0.062	0.00037 (0.00020–0.00057)	0.00287 (0.00201–0.00464)	313 (28)
Flumethrin (LIT)	3157	2.069 \pm 0.067	0.00004 (0.00003–0.00005)	0.00016 (0.00014–0.00021)	48 (14)

LIT: Larval Immersion Test; LPT: Larval Packet Test; n: number of larvae; S.E.: standard error; 95% CL: 95% confidence limits; χ^2 : chi-squared value, d.f.: degrees of freedom.

and very sensitive to coumaphos and flumethrin. There are many works that describe tick resistance to different chemical acaricides (Benavides et al. 2000; Fernández-Salas et al. 2012; Sharma et al. 2012; Heath and Levot 2014; Webster et al. 2015) and the biological mechanisms involved in such resistances (Pereira et al. 2009; Nodari et al. 2012; Roma et al. 2013). In the same way, amitraz resistance has been widely discussed by several authors in *R. microplus* ticks (Benavides et al. 2000; Miller et al. 2002; Jonsson and Hope 2007; Jonsson et al. 2010). The mode of action of formamidine pesticides such as amitraz is believed to be the toxic effects on a G protein-coupled receptor for the octopamine neuromodulator (Evans and Gee 1980). One common pesticide resistance mechanism of arthropods is mutations in the pesticide target rendering the target site insensitive to the pesticide (Chen et al. 2007). This resistance in other *R. sanguineus* populations in Cuba and the study of their octopamine receptors will be an

interesting topic for future studies. Information concerning the regional distribution and the prevalence of acaricide resistance among Cuban *R. sanguineus* populations is very scarce. Consequently, selection and use of acaricides is based on criteria other than effectiveness, and applications are often inadequate, which may result in costly but ineffective treatments. This increases the likelihood that resistant tick populations will develop (Andreotti et al. 2011).

3.3. Characterization of the tick colony

Table 4 summarizes the biological parameters associated with each stage of the *R. sanguineus* ticks under our conditions. In general, ticks in our colony showed lesser resistance to the starvation than different species in other reports (Rodríguez-Vivas et al. 2006a; Troughton and Levin 2007; Dantas-Torres 2008;

Table 4. Biologic parameters associated with *R. sanguineus* ticks under controlled laboratory conditions.

Parameters	Larvae (n = 300)	Nymphs (n = 200)	Adults (n = 200)
Starvation (days)	94 (Mort: 100%)	88 (Mort: 59%)	151 (Mort: 0%)
Pre-feeding period (h)	17 (100%)	17 (>90%)	24 (68%)
Feeding period (days)	4 \pm 0.56 (3–5)	4 \pm 0.49 (4–5)	6 \pm 1.03 (5–9)
Feeding mortality (%)	19	12	4
Moulting period (days)	12 \pm 0.66 (11–14)	14 \pm 0.97 (12–17)	–
Moulting mortality (%)	15	12	–

Chen et al. 2012, 2009). This lower resistance to starvation may be due to a characteristic of the species or that 28°C is very hot. The temperature and humidity conditions are shown to be key in the development of the tick life cycle (Troughton and Levin 2007; Labruna et al. 2009; Chen et al. 2012, 2009). In our laboratory, we try to reproduce the tropical conditions of high temperature and humidity keeping ticks at 28°C and 80% of relative humidity. It is interesting to note that in these conditions the development of all of three stages after moulting in our colony was shorter than other reports (Jacobs et al. 2004; Troughton and Levin 2007; Labruna et al. 2009; Chen et al. 2012, 2009) because the pre-feeding periods determined in our assays were very short. Of the fed nymphs that moulted into adult ticks, 50% were females. The weight of fed nymphs which gave rise to adult females was significantly ($P < 0.0001$) higher than the average weight of fed nymphs that moulted to adult males. It has been documented in previous literature that the weight of the fed nymphs is a good indicator to estimate the resulting sex after moult (Gladney et al. 1977; Koch 1981; Hu and Rowley 2000; Guglielmone et al. 2004; Chen et al. 2009). Table 5 shows the averages of the factors associated with oviposition by females in the colony. Of the collected engorged females, 10% did not perform oviposition. They turned dark and died. The death of such engorged females has been described by other authors (Bechara et al. 1995), but the cause is unknown. The oviposition curve shows that the egg production peak occurred on days 5 and 6 after the start of the oviposition process. For days 9 and 10, the oviposition percentage was below 5% and below 1% on days 11 and 12. According to literature, in other *Rhipicephalus* species, most oviposition occurs in the first week of the period and curves are obtained similar to that obtained in this work (Gallardo and Morales 1999; Yeruham et al. 2000; Chen et al. 2009). The average weight of one egg of our *R. sanguineus* was 46 µg. According to the Pearson coefficients (r) obtained, there is a statistically significant, positive correlation between the weight of an engorged female and the oviposition period and the number of eggs laid by that female. There was no correlation between the weight of the engorged female and the pre-oviposition period and the CEI. The CEI described for other species of the genus *Rhipicephalus* is similar to that obtained in this work (Gallardo and Morales 1999; Yeruham et al. 2000). Previous literature describes a positive correlation between the weight of engorged females and the egg weight for different species of ticks (Arthur and Snow 1967; Drummond et al. 1971; Norval 1974; Gladney et al. 1977).

The average incubation period of eggs for hatching was 23 days with a range between 15 and 26 days. According to the calculation described in “Materials and methods” section, 70% of the eggs hatched. The percentage of hatching obtained in this work is lower than previous reports (Bechara et al. 1995). The difference may be due to the way in which the calculations are made. In other laboratories, this calculation is performed by dividing by the sum of the number of unhatched eggs and larvae counted under the stereoscope (Méndez, L., 2012, personal communication), or the average of visual assessment of hatching % from three different people (Bechara et al. 1995). The biological cycle of *R. sanguineus* ticks in our colony was completed in 85 days, on average, with a minimum of 60 days

Table 5. Biological factors associated with oviposition of *R. sanguineus* ticks under the controlled conditions established in our laboratory ($n = 174$).

Parameters	X	DE	CV	Range
Engorged female weight (mg)	147.07	26.02	17.69	69.2–237
Pre-oviposition period (days)	6	1.29	21.07	3–10
Oviposition period (days)	16	3.42	21.75	7–22
Eggs/female	1914	516	26.94	735–3202
Egg mass weight (mg)	88.02	23.71	26.94	33.8–147.3
IEC (%)	59.93	11.87	19.81	20.33–81.78

X = arithmetic mean of the parameter; DE = standard deviation; CV = variation coefficient; IEC = index of conversion efficiency.

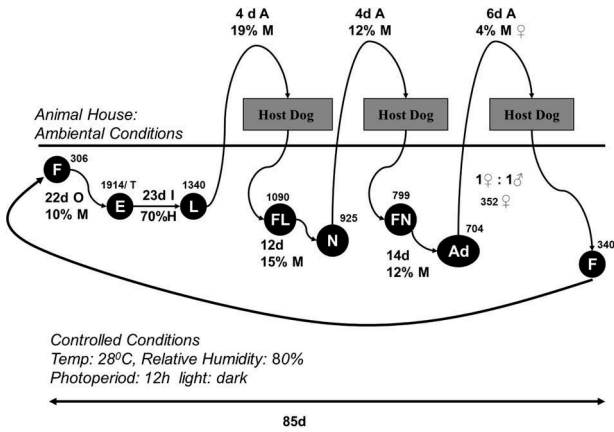


Figure 4. Parasitic cycle of *R. sanguineus* under the controlled conditions in our laboratory. F: engorged females, E: eggs, L: larvae, FL: fed larvae, N: nymphs, NA: fed nymphs, Ad: Adults, d: days, M: mortality, O: oviposition, E: hatching, I: incubation, A: feeding, ♀: females, ♂: males.

and a maximum of 108 days. This value is very close to the values reported by other authors (Bechara et al. 1995; Dantas-Torres 2008). Based on the mortality for each stage, from 1914 eggs laid by a single female on average, 306 new females laying eggs will be obtained, which represents 16% of the total initial eggs (Figure 4).

The results reported in this work constitute the first study on the characterization of the tick species *Rhipicephalus sanguineus* in Cuba, and provide a starting point for the study of Cuban populations of these ticks. This work pioneers the establishment of an *R. sanguineus* colony under laboratory conditions in Cuba. The characterization of this colony provides us with an experimental model for trials, including studies of new molecules proposed as vaccine candidates against ectoparasites and experiments to understand the mechanisms underlying ticks as vectors of other disease-causing parasites.

Acknowledgements

The authors thank Dr John van der Meer (PAMBA) for his valuable English review of this article.

References

Guide for the care and use of laboratory animals. 2011. 8th ed. Washington (DC): The National Academies Press.

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang JH, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. 1997. Gapped BLAST and PSIBLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* 25:3389–3402.

Andreotti R, Guerrero FD, Soares MA, Barros JC, Miller RJ, Perez de Leon A. 2011. Acaricide resistance of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 20:127–133.

Arthur DR, Snow KR. 1967. The implications of size as shown in *Hyalomma anatolicum anatolicum* (Koch, 1844) (Ixodoidea: Ixodidae). *Wiadomosci Parazytologiczne* 13:497–509.

Bechara GH, Szabó MPJ, Ferreira BR. 1995. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology* 4:61–66.

Bellato V, Daemon E. 1997. Influência da temperatura de manutenção de fase não parasitária sobre a fase parasitária de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 6:15–19.

Benavides E, Rodriguez JL, Romero A. 2000. Isolation and partial characterization of the Montecitos strain of *Boophilus microplus*

- (Canestrini, 1877) multiresistant to different acaricides. *Annals of the New York Academy of Sciences* 916:668–671.
- Bennett GF. 1974. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarida: Ixodidae). II. Influence of temperature, humidity and light. *Acarologia* 16:251–257.
- Black WC, Klompen JS, Keirans JE. 1997. Phylogenetic relationships among tick subfamilies (Ixodida: Ixodidae: Argasidae) based on the 18S nuclear rDNA gene. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 7:129–144.
- Burlini L, Teixeira KRS, Szabo MPJ, Famadas KM. 2010. Molecular dissimilarities of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Brazil and its relation with samples throughout the world: is there a geographical pattern? *Experimental and Applied Acarology* 50:361–374.
- Camicas J, Hervy J, Adam F, Morel P. 1998. Les tiques du monde. Nomenclature, stades décrits, hôtes, répartition (Acarida, Ixodida). Paris: ORSTOM.
- Chen AC, He H, Davey RB. 2007. Mutations in a putative octopamine receptor gene in amitraz-resistant cattle ticks. *Veterinary Parasitology* 148:379–383.
- Chen Z, Li Y, Liu Z, Yang J, Yin H. 2012. The life cycle of *Hyalomma rufipes* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Experimental and Applied Acarology*. Jan;56(1):85–92.
- Chen Z, Yu Z, Yang X, Zheng H, Liu J. 2009. The life cycle of *Hyalomma asiaticum kozlovi* Olenov, 1931 (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Veterinary Parasitology* 160:134–137.
- Cruickshank RH. 2002. Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. *Systematic & Applied Acarology* 7:3–14.
- Dantas-Torres F. 2008. The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Veterinary Parasitology* 152:173–185.
- Dantas-Torres F. 2010. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & Vectors* 3:26.
- Dantas-Torres F, Figueredo LA, Brandao-Filho SP. 2006. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39:64–67.
- Dantas-Torres F, Latrofa MS, Annoscia G, Giannelli A, Parisi A, Otranto D. 2013. Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato from the new and old worlds. *Parasites & Vectors* 6:213–230.
- de la Fuente J, Kocan KM. 2006. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Parasite Immunology* 28:275–283.
- de Oliveira PR, Bechara GH, Denardi SE, Saito KC, Nunes ET, Szabo MPJ, Mathias MIC. 2005. Comparison of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil and Argentina. *Veterinary Parasitology* 129:139–147.
- Drummond RO, Whetstone TM, Gladney WJ. 1971. Oviposition of the lone star ticks. *Annals of the Entomological Society of America* 64:191–194.
- Ducornez S, Barre N, Miller RJ, Garine-Wichatitsky M. 2005. Diagnosis of amitraz resistance in *Boophilus microplus* in New Caledonia with the modified Larval Packet Test. *Veterinary Parasitology* 130:285–292.
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32:1792–1797.
- Estrada-Peña A, Bouattour A, Camicas J, Walker A. 2004. Ticks of domestic animals in the Mediterranean region. A guide to identification of species. Zaragoza (España): University of Zaragoza.
- Estrada-Peña A, Jongejan F. 1999. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. *Experimental and Applied Acarology* 23:685–715.
- Evans PD, Gee JD. 1980. Action of formamidine pesticides on octopamine receptors. *Nature* 287:60–62.
- Fernández-Salas A, Rodríguez-Vivas RI, Alonso-Díaz MA. 2012. First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology* 183:338–342.
- Finney DJ. 1971. Probit analysis. 3rd ed. London: Cambridge University Press.
- Gallardo J, Morales J. 1999. *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae): preoviposición, oviposición, incubación de los huevos y geotropismo. *Bioagro* 11:77–87.
- Gladney WJ, Dawkins GG, Price MA. 1977. *Amblyomma inornatum* (Acarina: ixodidae): natural hosts and laboratory biology. *Journal of Medical Entomology* 14:85–88.
- Gray J, Dantas-Torres F, Estrada-Peña A, Levin M. 2013. Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Ticks and Tick-borne diseases* 4:171–180.
- Guglielmone AA, Bechara GH, Szabó MPJ, Barros-Battesti DM, Faccini JL. 2004. Ticks of importance for domestic animals in Latin America and Caribbean countries. ICTTD-2 of the European Commission INCO-DEV programme.
- Guimarães JH, Tucci EC, Moraes D. 2001. Ectoparasitos de Importância Veterinária. São Paulo: Plêiade/Fapesp.
- Heath AC, Levot G. 2014. Parasiticide resistance in flies, lice and ticks in New Zealand and Australia. *New Zealand Veterinary Journal* 3:1–32.
- Hu R, Rowley WA. 2000. Relationship between weights of the engorged nymphal stage and resultant sexes in *Ixodes scapularis* and *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) ticks. *Journal of Medical Entomology* 37:198–200.
- Jacobs PA, Fourie LJ, Horak IG. 2004. A laboratory comparison of the life cycles of the dog ticks *Haemaphysalis leachi* and *Rhipicephalus sanguineus*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 71:15–28.
- Jonsson NN, Hope M. 2007. Progress in the epidemiology and diagnosis of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology* 146:193–198.
- Jonsson NN, Miller RJ, Kemp DH, Knowles A, Ardila AE, Verrall RG, Rothwell JT. 2010. Rotation of treatments between spinosad and amitraz for the control of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* populations with amitraz resistance. *Veterinary Parasitology* 169:157–164.
- Koch HG. 1981. Suitability of birds and mammals as hosts for immature stages of the lone star tick, *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology* 18:93–98.
- Labruna MB, Cabrera RR, Pinter A. 2009. Life cycle of *Ixodes luciae* (Acari: Ixodidae) in the laboratory. *Parasitology Research* 105:1749–1753.
- Le Ora Software. 1987. A user's guide to probit or logit analysis. Berkeley (CA): Le Ora Software.
- Levin M, Studer E, Killmaster L, Zemtsova G, Mumcuoglu K. 2012. Crossbreeding between different geographical populations of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology* 58:51–68.
- Mehlhorn H. 2015. *Rhipicephalus* species. In: Mehlhorn H, editor. *Encyclopedia of parasitology*. Berlin: Springer; p. 1–8.
- Miller RJ, Davey RB, George JE. 2002. Modification of the food and agriculture organization Larval Packet Test to measure amitraz-susceptibility against ixodidae. *Journal of Medical Entomology* 39:645–651.
- Miller RJ, George JE, Guerrero F, Carpenter L, Welch JB. 2001. Characterization of acaricide resistance in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae) collected from the Corozal Army Veterinary Quarantine Center, Panama. *Journal of Medical Entomology* 38:298–302.
- Moraes-Filho J, Marcili A, Nieri-Bastos FA, Richtzenhain LJ, Marcelo B, Labruna MB. 2011. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. *Acta Tropica* 117:51–55.
- Nava S, Estrada-Peña A, Petney T, Beati L, Labruna MB, Szabó MPJ, Venzal JM, Mastropaolo M, Mangold AJ, Guglielmone AA. 2015.

- The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). *Veterinary Parasitology* 208:2–8.
- Nava S, Mastropaolo M, Venzal J, Mangold A, Guglielmone A. 2012. Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) in the Southern Cone of South America. *Veterinary Parasitology* 190:547–555.
- Nodari EF, Roma GC, Furquim KCS, Bechara GH, Camargo-Mathias MI. 2012. Action of permethrin on *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) semi-engorged females: morpho-physiological evaluation of salivary glands. *Ticks and Tick-borne Diseases* 3:219–226.
- Norval RAI. 1974. The life cycle of *Amblyomma hebraeum* Kock, 1844 (Acarina: Ixodidae). *Journal of the Entomological Society of Southern Africa* 37:357–367.
- Pereira CP, Oliveira PR, Furquim KC, Bechara GH, Camargo-Mathias MI. 2009. Effects of fipronil (active ingredient of Frontline®) on salivary gland cells of *Rhipicephalus sanguineus* females (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Veterinary Parasitology* 166:124–130.
- Rodriguez-Vivas RI, Rosado A, Basto G, Sotero Z, Rosario R, Fragoso H, editors. 2006a. Manual técnico para el control de garrapatas en el ganado bovino. Jiutepec (Morelos): Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria.
- Rodriguez-Vivas RI, Alonso-Diaz MA, Rodriguez-Arevalo F, Fragoso-Sanchez H, Santamaria VM, Rosario-Cruz R. 2006b. Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the State of Yucatan, Mexico. *Veterinary Parasitology* 136:335–342.
- Rodriguez-Vivas RI, Rodriguez-Arevalo F, Alonso-Diaz MA, Fragoso-Sanchez H, Santamaria VM, Rosario-Cruz R. 2006c. Prevalence and potential risk factors for amitraz resistance in *Boophilus microplus* ticks in cattle farms in the State of Yucatan, Mexico. *Preventive Veterinary Medicine* 75:280–286.
- Roma GC, Camargo-Mathias MI, de Oliveira PR, Furquim KCS, Bechara GH. 2013. Neurotoxic action of permethrin in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) female ticks. Morphological and cytochemical evaluation of the central nervous system. *Veterinary Parasitology* 196:482–491.
- Russell RM, Robertson JL, Savin NE. 1977. POLO: a new computer program for probit analysis. *Bulletin of the ESA* 23:209–213.
- Sharma AK, Kumar R, Kumar S, Nagar G, Singh NK, Rawat SS, Dhakad ML, Rawat AK, Ray DD, Ghosh S. 2012. Deltamethrin and cypermethrin resistance status of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from six agro-climatic regions of India. *Veterinary Parasitology* 188:337–345.
- Soberanes N, Santamaría M, Fragoso H, García Z. 2002. Primer caso de resistencia al amitraz en la garrapata del ganado *Boophilus microplus*. *Técnica Pecuaria en México* 40:81–92.
- Szabo MPJ, Mangold AJ, Joao CF, Bechara GH, Guglielmone AA. 2005. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. *Veterinary Parasitology* 130:131–140.
- Tamura K. 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong transition-transversion and G + C-content biases. *Molecular Biology and Evolution* 9:678–687.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution* 30:2725–2729.
- Troughton DR, Levin ML. 2007. Life cycles of seven ixodid tick species (Acari: Ixodidae) under standardized laboratory conditions. *Journal of Medical Entomology* 44:732–740.
- Uspensky I, Ioffe-Uspensky I. 2002. The dog factor in brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) infestations in and near human dwellings. *International Journal of Medical Microbiology* 291:156–163.
- Webster A, Reck J, Santi L, Souza UA, Dall'Agnol B, Klafke GM, Beys-da-Silva WO, Martins JR, Schrank A. 2015. Integrated control of an acaricide-resistant strain of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* by applying *Metarhizium anisopliae* associated with cypermethrin and chlorpyrifos under field conditions. *Veterinary Parasitology* 207:302–308.
- Yeruham I, Hadani A, Galker F. 2000. The life cycle of *Rhipicephalus bursa* Canestrini and Fanzago, 1877 (Acarina: Ixodidae) under laboratory conditions. *Veterinary Parasitology* 89:109–116.



Research paper

Molecular, biological, and morphometric comparisons between different geographical populations of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae)



Gustavo S. Sanches^{a,b}, Patrícia M. Évora^b, Atílio J. Mangold^c, Sattaporn Jittapalapong^d, Alina Rodriguez-Mallon^e, Pedro E.E. Guzmán^e, Gervásio H. Bechara^{b,f,*}, Maria I. Camargo-Mathias^a

^a Instituto de Biociências, Departamento de Biologia, Unesp Campus Rio Claro, Av. 24 A, no. 1515, 13506-900 Rio Claro, SP, Brazil

^b Laboratório de Imunopatologia, Departamento de Patologia Veterinária, Unesp Campus Jaboticabal, Via de Acesso Paulo Donato Castellane, s/n, 14884-900 Jaboticabal, SP, Brazil

^c Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Santa Fe, Argentina

^d Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Bangkok, Thailand

^e Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología—CIGB, Habana, Cuba

^f Pontifícia Universidade Católica do Paraná—PUCPR, Rua Imaculada Conceição, 1155 Curitiba, PR, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 August 2015

Received in revised form 4 November 2015

Accepted 12 November 2015

Keywords:

Rhipicephalus sanguineus

Genetic analysis

Morphometry

Taxonomy

ABSTRACT

In this study, different geographical populations of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato were compared by molecular, biological, and morphometric methods. Phylogenetic trees were constructed using 12S and 16S rDNA sequences and showed two distinct clades: one composed of ticks from Brazil (Jaboticabal, SP), Cuba (Havana) Thailand (Bangkok) and the so-called “tropical strain” ticks. The second clade was composed of ticks from Spain (Zaragoza), Argentina (Rafaela, Santa Fe) and the so-called “temperate strain” ticks. Morphometric analysis showed good separation between females of the two clades and within the temperate clade. Males also exhibited separation between the two clades, but with some overlap. Multiple biological parameters revealed differences between the two clades, especially the weight of the engorged female. These results confirm the existence of at least two species under the name “*R. sanguineus*”.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The “*Rhipicephalus sanguineus* complex” includes 17 species: *Rhipicephalus aurantiacus* Neumann, 1907; *Rhipicephalus bergeoni* Morel and Balis, 1976; *Rhipicephalus boueti* Morel, 1957; *Rhipicephalus camicasi* Morel, Mouchet and Rodhain, 1976; *Rhipicephalus guilhoni* Morel and Vassiliades, 1963; *Rhipicephalus leporis* Pomerantzev, 1946; *Rhipicephalus moucheti* Morel, 1965; *Rhipicephalus pumilio* Schulze, 1935; *Rhipicephalus pusillus* Gil Collado, 1936; *Rhipicephalus ramachandrai* Dhanda, 1966; *Rhipicephalus rossicus* Yakimov and Kol-Yakimova, 1911; *R. sanguineus* sensu stricto (s.s.); *Rhipicephalus schulzei* Olenev, 1929; *Rhipicephalus sulcatus* Neumann, 1908; *Rhipicephalus tetracornis* Kitaoka and Suzuki, 1983;

Rhipicephalus turanicus Pomerantzev, 1940; and *Rhipicephalus ziemanni* Neumann, 1904. Some of these are closely related, morphologically similar, and, consequently, have been misidentified (Walker et al., 2000 reviewed in Dantas-Torres and Otranto, 2015).

Historically, *R. sanguineus* sensu stricto (s.s) is the most controversial species in the “*R. sanguineus* complex”. Originally, was classified as *Ixodes sanguineus* by Latreille (1806) and later transferred to the genus *Rhipicephalus* by Koch (1844). Moreover, the original description does not provide a definition of the morphological basis for the species. According to Nava et al. (2015), in light of these data, *R. sanguineus* s.s. could be relegated to a *nomen nudum*. Following this description, many species and subspecies belonging to the “*R. sanguineus* complex” were synonymized as *R. sanguineus* s.s. around the world (Camicas et al., 1998; Walker et al., 2000). The type locality is Gallia (France). In this context, Guglielmone et al. (2014) deemed *R. sanguineus* s.s. a Palearctic species, considering all other records of this species around the world as speculative.

* Corresponding author at: Pontifícia Universidade Católica do Paraná—PUCPR, Rua Imaculada Conceição, 1155 Curitiba, PR, Brazil.

E-mail address: gervasio.bechara@pucpr.br (G.H. Bechara).

Over the last decade, some studies started to indicate that what was known until the moment as *R. sanguineus* (s.s.) could be represented by more than one species. Szabó et al. (2005) and Oliveira et al. (2005) suggested that the taxon of *R. sanguineus* would be composed of at least two morphologically and genetically distinct strains in the Neotropics. Moraes-Filho et al. (2011) proposed a so-called “southern lineage,” located in temperate localities (Argentina, Uruguay, Chile, Italy, and south Brazil), and a “northern lineage,” located in tropical and subtropical localities (Brazil, Paraguay, Colombia, South Africa, Mozambique, and northern Argentina). Nava et al. (2012) observed these same lineages in the Southern Cone of South America. Dantas-Torres et al. (2013) also recognized these lineages in the Old World and suggested the possibility of other genetic lineages under the name “*R. sanguineus*.” Despite these findings, the taxonomy status of this species is far from resolved. Along this line, a consensual redescription of *R. sanguineus* s.s. and a description of the other(s) species under this name are required, after an exhaustive worldwide revision of this species complex (Dantas-Torres et al., 2013). However, morphological variations within the same genetic strain of *R. sanguineus* (Pegram et al., 1987; Dantas-Torres et al., 2013) are quite common, which is the main current taxonomic issue. Levin et al. (2012) and Gray et al. (2013) drew attention to the need of studies addressing morphology, genetic and biological aspects, considering variations of these ticks over a large geographical range.

In view of these data, the present study aimed to compare, genetically, morphometrically and biologically, the different geographical populations of *R. sanguineus* sensu lato (s.l.) from the so-called tropical (Brazil, Cuba, and Thailand) and temperate (Argentina and Spain) strains. The results obtained in this study may contribute to a better understanding of *R. sanguineus*’ biosystematic status.

2. Materials and methods

2.1. Ticks

The specimens used in this study were obtained from colonies established at the Department of Veterinary Pathology, Universidade Estadual Paulista—UNESP, Campus of Jaboticabal, São Paulo State, Brazil from isolates made in Cuba, Thailand, Argentina and Spain (Table 1 and Fig. 1). The identification of isolates was confirmed by each provider according to Walker et al. (2000). To maintain colonies, pools of ticks were periodically fed on 5–8 month-old New Zealand white rabbits. Non parasitic stages were kept under controlled conditions to 27 °C, 80% relative humidity, and 12-h photoperiod for tropical strains and to 20 °C, 80% relative humidity, and 12-h photoperiod for temperate strains.

2.2. Molecular analysis

Phylogenetic analyses were performed from mitochondrial DNA of ticks from the colonies described in Table 1. A sample of *R. sanguineus* from La Libertad, Magdalena, Colombia (4° 35' N; 74° 04' W), kindly provided by Dr. Efraim Benavides Ortiz (University of La Salle, Bogotá, Colombia), was added to the molecular analysis. From each

strain, DNA extraction was separately performed using two individual adult ticks, according to a previously described protocol (Mangold et al., 1998). A 380 base pair (bp) fragment of the 12S rDNA gene and a 460 bp fragment of the 16S rDNA gene were amplified by PCR using previously described primers (Black and Piesman, 1994; Szabó et al., 2005). Amplified DNA was purified using a Wizard PCR Preps DNA Purification System (Promega) according to the manufacturer's recommendations. Purified PCR products were submitted for sequencing using an ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit in an Applied Biosystems 373A gene sequencer. Sequences were manually edited using Bioedit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999) and aligned using Clustal W software (Larkin et al., 2007). Additionally, GenBank available *Rhipicephalus* spp. 12S and 16S rDNA partial sequences were included in the molecular analysis. Only sequences published in reference's studies or unpublished sequences with host and geographical origin information were used. The GenBank accession numbers of these sequences and the geographical origins are presented in the phylogenetic trees. GenBank available partial 12S rDNA (AF150034) and 16S rDNA (L34307) sequences of *Hyalomma marginatum* were used as outgroups. The nucleotide sequences obtained in this study were deposited in the GenBank database (12S rDNA: KC018070, KC018072, KC018074, KC018075, KC018076; 16S rDNA: JX997387, JX997389, JX997390, JX997391, JX997393). The percentage of nucleotide variation among sequences of a given species was calculated by pairwise comparison (Kimura 2-parameter model) using the MEGA 5.0 software (Tamura et al., 2007). The formula $D = 1 - (M/L)$ was used to compare the sequences obtained in this work with the *Rhipicephalus* spp. consensus sequence. In this formula D is the sequence difference, M is the number of alignment positions at which the two sequences have a base in common and L is the total number of alignment positions over which the two sequences are compared (Chilton et al., 1995). The maximum likelihood (ML) method was used to make the phylogenetic analysis, which was also conducted in MEGA 6.0 Program. ML trees were generated using the Tamura–Nei substitution model with uniform rates among sites. The partial deletion option was used for gap analysis in MP trees with 95% of site coverage cutoff. A bootstrap test with 1000 replications was applied to estimate the confidence of the tree branching patterns.

2.3. Morphometric comparison

For morphometric comparisons, 10 couples of each *R. sanguineus* strain were slide-mounted according to the method of Famadas et al. (1996). Measurements were performed using a MC80DX light microscope coupled with a digital camera (Leica Microsystems). The following characteristics were measured: basis capituli (length and width); palps (length); tarsus I (length and width); dorsal scutum (length and width); idiosoma (length from scapular apices to posterior idiosomal margin and width); spiracular plates (length and width); and male adanal plates (length and width at base). All measurements are in millimeters and expressed as mean \pm standard deviation. Voucher tick specimens were deposited in the Laboratory of Immunopathology, Department

Table 1
Rhipicephalus sanguineus strains used in the present study.

Species	Location	Coordinates	Provided by
1. <i>R. sanguineus</i> s.l.	Havana, Cuba	23° 07' N; 82° 22' W	Dr. Alina R. Mallon
2. <i>R. sanguineus</i> s.l.	Jaboticabal, SP, Brazil	21° 15' S; 48° 18' W	Dr. Gervásio H. Bechara
3. <i>R. sanguineus</i> s.l.	Bangkok, Thailand	7° 59' N; 98° 20' E	Dr. Sathaporn Jittapalapong
4. <i>R. sanguineus</i> s.l.	Rafaela, Santa Fe, Argentina	31° 15' S; 61° 29' W	Dr. Santiago Nava
5. <i>R. sanguineus</i> s.l.	Zaragoza, Spain	41° 39' N; 00° 52' W	Dr. Agustín Estrada-Peña

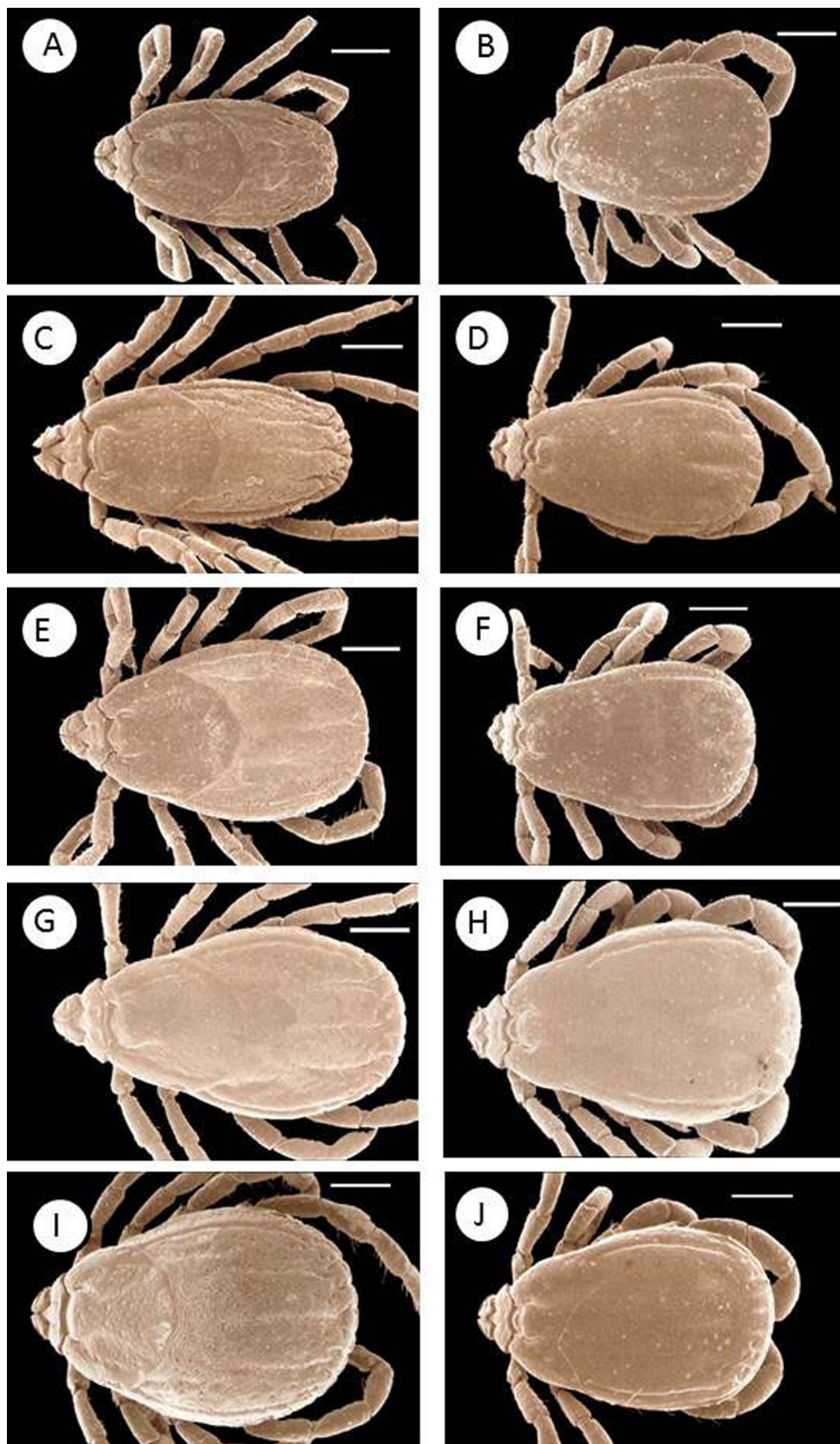


Fig. 1. Scanning electron micrographs showing dorsal view of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato female (left column) and male (right column) from Cuba (Havana) (A and B); Brazil (Jaboticabal, SP) (C and D); Thailand (Bangkok) (E and F); Argentina (Rafaela, Santa Fe) (G and H) and Spain (Zaragoza) (I and J). Scale bars: 100 μ m.

Table 2
Structure measurements of *R. sanguineus* sensu lato from Cuba (Havana), Brazil (Jaboticabal, SP), Thailand (Bangkok), Argentina (Rafaela, Santa Fe) and Spain (Zaragoza). Means standard deviations are shown.

Structure	♀ RsCub	♀ RsBra	♀ RsThai	♀ RsArg	♀ RsSpa	♂ RsCub	♂ RsBra	♂ RsThai	♂ RsArg	♂ RsSpa
Idiosoma: length	2.27 (2.08–2.47)	2.34 (2.19–2.46)	2.42 (2.26–2.58)	3.15 (3.00–3.24)	2.69 (2.58–2.78)	2.22 (2.07–2.31)	2.35 (2.19–2.56)	2.34 (2.17–2.43)	2.87 (2.80–2.95)	2.64 (2.40–2.97)
Idiosoma: width	1.50 (1.27–1.77)	1.48 (1.30–1.66)	1.69 (1.58–1.86)	2.32 (2.27–2.45)	2.12 (2.02–2.18)	1.44 (1.31–1.55)	1.33 (1.16–1.46)	1.50 (1.32–1.61)	1.87 (1.74–1.91)	1.68 (1.59–1.77)
Scutum: length	1.20 (1.13–1.24)	1.14 (1.04–1.24)	1.18 (1.06–1.29)	1.47 (1.43–1.50)	1.30 (1.27–1.32)	2.09 (1.95–2.21)	2.22 (1.08–2.41)	2.14 (1.98–2.28)	2.50 (2.34–2.64)	2.36 (2.21–2.64)
Scutum: width	1.18 (1.04–1.31)	1.15 (1.02–1.26)	1.20 (1.08–1.30)	1.59 (1.52–1.63)	1.54 (1.45–1.61)	1.23 (1.12–1.33)	1.18 (1.08–1.26)	1.22 (1.12–1.26)	1.56 (1.43–1.62)	1.36 (1.12–1.48)
Basis capituli: length	0.26 (0.21–0.33)	0.37 (0.33–0.43)	0.35 (0.30–0.40)	0.36 (0.32–0.38)	0.37 (0.31–0.43)	0.23 (0.19–0.27)	0.35 (0.33–0.38)	0.35 (0.32–0.37)	0.36 (0.30–0.34)	0.39 (0.36–0.45)
Basis capituli: width	0.69 (0.66–0.71)	0.67 (0.63–0.72)	0.70 (0.65–0.73)	0.83 (0.79–0.85)	0.78 (0.74–0.80)	0.56 (0.52–0.60)	0.58 (0.54–0.64)	0.57 (0.51–0.60)	0.70 (0.66–0.72)	0.65 (0.59–0.75)
Notosoma: length	0.56 (0.52–0.60)	0.59 (0.54–0.66)	0.61 (0.55–0.67)	0.67 (0.63–0.72)	0.63 (0.58–0.67)	0.48 (0.38–0.49)	0.53 (0.45–0.59)	0.53 (0.49–0.58)	0.60 (0.60–0.60)	0.61 (0.57–0.70)
Palpal length	0.31 (0.28–0.34)	0.28 (0.26–0.33)	0.33 (0.31–0.36)	0.41 (0.41–0.42)	0.35 (0.34–0.37)	0.26 (0.25–0.27)	0.23 (0.20–0.27)	0.30 (0.27–0.32)	0.31 (0.26–0.34)	0.26 (0.24–0.29)
Tarsus I: length	0.12 (0.11–0.13)	0.13 (0.13–0.14)	0.14 (0.12–0.15)	0.16 (0.14–0.17)	0.16 (0.15–0.19)	0.12 (0.11–0.13)	0.13 (0.13–0.15)	0.15 (0.13–0.17)	0.16 (0.13–0.20)	0.17 (0.16–0.18)
Tarsus I: width	0.06 (0.05–0.06)	0.05 (0.05–0.05)	0.06 (0.05–0.06)	0.06 (0.06–0.07)	0.06 (0.05–0.06)	0.05 (0.04–0.05)	0.05 (0.04–0.05)	0.05 (0.04–0.05)	0.05 (0.05–0.06)	0.05 (0.05–0.06)
Spiracular plate: length	0.37 (0.31–0.39)	0.37 (0.31–0.42)	0.37 (0.34–0.40)	0.42 (0.40–0.47)	0.46 (0.42–0.48)	0.40 (0.34–0.47)	0.44 (0.40–0.52)	0.47 (0.43–0.49)	0.55 (0.50–0.58)	0.50 (0.42–0.60)
Spiracular plate: width	0.26 (0.22–0.30)	0.25 (0.22–0.31)	0.29 (0.26–0.32)	0.32 (0.28–0.36)	0.37 (0.34–0.40)	0.22 (0.16–0.27)	0.21 (0.17–0.27)	0.22 (0.18–0.24)	0.27 (0.22–0.30)	0.24 (0.19–0.27)
Adanal plate: length	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	0.56 (0.47–0.63)	0.59 (0.49–0.65)	0.62 (0.52–0.69)	0.80 (0.71–0.86)	0.70 (0.59–0.84)
Adanal plate: width	n.a	n.a	n.a	n.a	n.a	0.25 (0.21–0.29)	0.23 (0.21–0.25)	0.29 (0.26–0.30)	0.37 (0.30–0.41)	0.29 (0.25–0.34)

of Veterinary Pathology, Sao Paulo State University—UNESP, Campus of Jaboticabal, Sao Paulo State, Brazil.

2.4. Comparison of feeding and reproductive parameters

Ten New Zealand white rabbits, 5–8 months old, weighing approximately 1 kg and certified to have no previous history of tick infestation, were used as hosts. Each host was fitted with five feeding chambers, fixed with synthetic glue (Brascoplast®, Brascocla Ltda., Brazil) on the dorsal region of the animal as described by Bechara et al. (1995). Ten couples of each *R. sanguineus* population (Brazil, Cuba, Thailand, Argentina, and Spain) were confined in the separated feeding chambers. The chambers were examined daily, and engorged detached females were weighed individually and kept under constant temperature and relative humidity, as described previously. The following data were recorded: tick yield, engorged female and egg mass weights, engorging, pre-oviposition and incubation periods, larval hatchability rate, and efficiency rate of female ticks in converting their food reservoir to eggs. The larval hatchability rate was assessed according to the method used by Szabó et al. (1995): briefly, the larval hatching rate for each tick was obtained by calculating the mean value of visual double-blind evaluation, separately performed by three persons. Procedures performed in this study were approved by the ethics committee on animal experimentation (CEUA/UNESP 02.287/10).

2.5. Data analyses

Morphometric variables of the ticks included in this study were used to carry out a principal component analysis (PCA) based on Pearson correlation matrix, in order to perform a comparison of the specimens among each geographical population. Data from the feeding and reproductive parameters of each population were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test; a *p*-value < 0.05 was considered statistically significant. Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 5.0 software.

3. Results

3.1. Phylogenetic analysis

3.1.1. Partial 12S rDNA sequences

The tree generated by ML (Fig. 2) shows *R. sanguineus* from Brazil, Cuba, Colombia and Thailand closely related to *R. sanguineus* from Paraguay, Peru, tropical areas of Argentina, Mozambique, Taiwan, China, Saint Kitts, Mexico and Guatemala. *R. sanguineus* from Spain appeared clustered with *R. sanguineus* from Portugal, USA, Israel, Switzerland, Uruguay and temperate areas from Argentina. The nucleotide divergence between *R. sanguineus* sequences from Brazil (Jaboticabal, SP), Cuba (Havana), Colombia (La Libertad, Magdalena), and Thailand (Bangkok) and those from the tropical lineages of America (Peru, Paraguay, Guatemala, Mexico, Saint Kitts, and Argentina—Ingeniero Juarez [Formosa] and Dragones [Salta] localities) ranged from 0.0 to 0.7%. The nucleotide divergence between *R. sanguineus* from Spain and sequences from temperate lineages (Uruguay and Argentina—Formosa [Formosa], Taco Pozo [Chaco], Bernardo de Irigoyen [Misiones], Bahia Blanca [Buenos Aires], and Rafaela [Santa Fe] localities) was 0.2%. The nucleotide divergence between sequences from these tropical and temperate groups ranged from 6.7 to 7.2%. The nucleotide differences of *R. sanguineus* (s.l.) sequences within some regions of the USA (California, Arizona) ranged 0.7%, and they were different from those from tropical and temperate lineages by 6.9–7.7% and 0.7–1.7%, respectively.

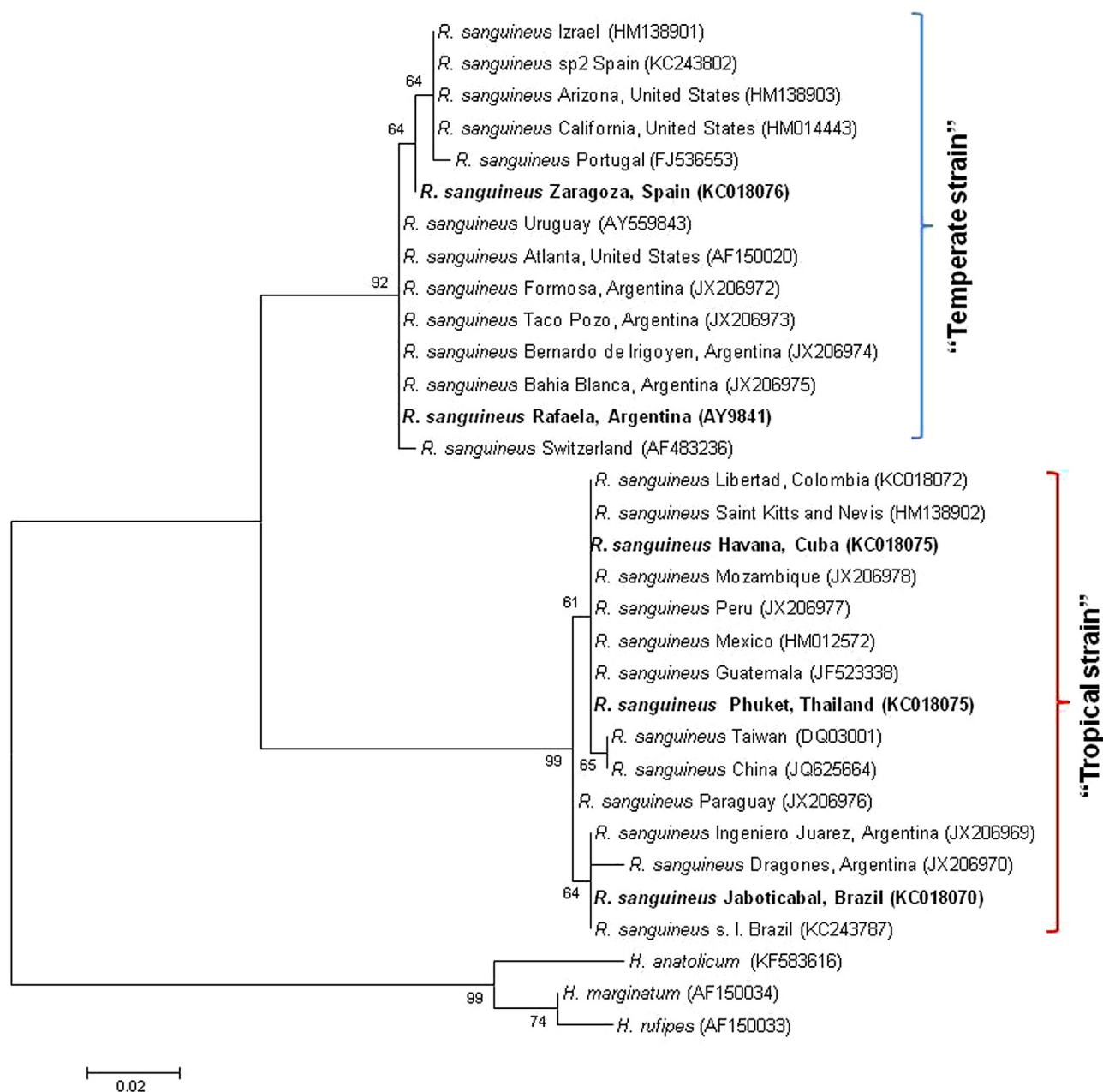


Fig. 2. Maximum likelihood tree based on 12S rDNA sequences of *Rhipicephalus* spp. Geographic origin and GenBank accession number are reported. Bootstrap values are based on 1000 replicates and only bootstraps > 50% are indicated.

3.1.2. Partial 16S rDNA sequences

The tree generated by ML (Fig. 3) shows that *R. sanguineus* from Brazil, Cuba, Colombia, and Thailand appeared closely related to *R. sanguineus* from Mozambique, South Africa, Taiwan, and tropical areas of Argentina. On the other hand, *R. sanguineus* from Spain appeared clustered with *R. sanguineus* from France, Germany, Chile, Uruguay, and temperate areas from Argentina.

The nucleotide divergence between *R. sanguineus* sequences from Brazil (Jaboticabal, SP), Cuba (Havana), Colombia (La Libertad, Magdalena), and Thailand (Bangkok) and those from tropical lineages from America (Tropical A: Brazil—Uberlândia, Cuiabá (MT), Sinop (MT), Guarantã do Norte (MT), Recife (PE), Fortaleza (CE), Cumbuco (CE), Tropical B: Brazil—Garopaba (SC), Seropédica (RJ), Itabira (MG), Nova Venécia (ES), João Pessoa (PB), Teresina (PI), Macapá (AP), Porto Velho (RO); Venezuela—Mérida, Los Roques Archipelago; Panamá—Panamá

City; Costa Rica—San José; México—Linares; Argentina—Ingeniero Juarez (Formosa), Dragones (Salta); Colombia—Los Córdoba (Córdoba); Paraguay—Assunción) ranged from 0.0 to 0.5%. The nucleotide divergence between *R. sanguineus* from Spain and sequences from temperate lineages (Uruguay—Montevideo (Montevideo), Salto (Salto), José Ignacio (Maldonado); Brazil—Santa Maria (RS); Argentina—Villa San José (Santa Fe), San Cristobal (Santa Fe), Rafaela (Santa Fe), El Dorado (Misiones), Bernardo de Irigoyen (Misiones), Corrientes (Corrientes), Formosa (Formosa), Salta (Salta), Metan (Salta), Malargue (Mendoza), San Salvador de Jujuy (Jujuy), Taco Pozo (Chaco), Puerto Madryn (Chubut), Bahia Blanca (Buenos Aires), Ciudad de Buenos Aires (Buenos Aires), San Juan (San Juan); Chile—Eastern Island, Santiago, Viña del Mar localities) ranged from 0.3 to 1.0%. The nucleotide divergence between sequences from these tropical and temperate groups ranged from 4.7 to 6.3%.

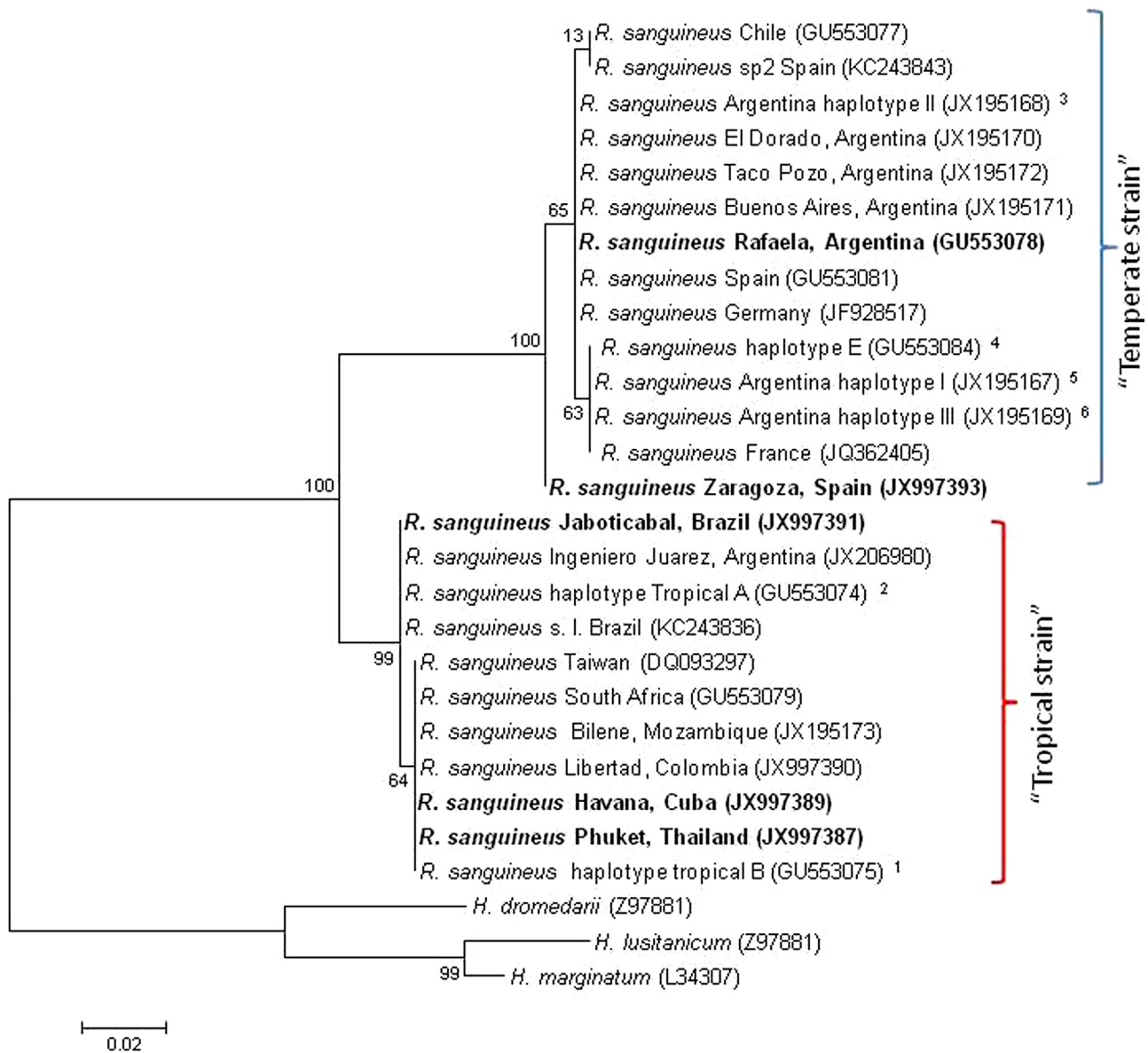


Fig. 3. Maximum likelihood tree based on 16S rDNA sequences of *Rhipicephalus* spp. Geographic origin and GenBank accession number are reported. Bootstrap value are based on 1000 replicates and only bootstraps > 50% are indicated. 1 = Brazil: Garopaba, SC; Seropédica, RJ; Itabira, MG; Nova Venécia, ES; João Pessoa, PB; Teresina, PI; Macapá, AP; Porto Velho, RO; Venezuela: El Vigía, Mérida; Los Roques Archipelago; Panamá City, Panamá; San José, Costa Rica; Linares, Novo Leon, México; 2 = Brazil: Uberlândia, MG; Cuiabá, MT; Sinop, MT; Guarantã do Norte, MT; Recife, PE; Fortaleza, CE; Cumbuco, CE; 3 = Argentina: San Cristobal, Santa Fe; Corrientes, Corrientes; Salta, Salta; Metan, Salta; Taco Pozo, Chaco; Malargue, Mendoza; 4 = Montevideo, Uruguay; Santa Maria, SC, Brazil; 5 = Argentina: Villa San José, Santa Fe; Corrientes, Corrientes; Bernardo de Irigoyen, Misiones; Formosa, Formosa; Salta, Salta; San Salvador de Jujuy, Jujuy; Taco Pozo, Chaco; San Juan, San Juan; Puerto Madryn, Chubut; Aires Bahía Blanca, Buenos Aires; San Juan, San Juan; Uruguay: Montevideo, Salto, José Ignacio; 6 = Argentina: El Dorado, Misiones; Bernardo de Irigoyen, Misiones; Formosa, Formosa; Puerto Madryn, Chubut.

3.2. Morphometric comparison

The measurements of each structure are presented in Table 2 and the PCA of female and male are presented in Figs. 4 and 5, respectively.

The PCA performed with morphometric characters of female ticks showed a clear separation between ticks from the tropical and the temperate groups and a separation within the temperate group (Argentina and Spain). The first principal component (explaining 69.66% of total variance) is loaded most heavily by length of idiosoma, width of idiosoma and width of scutum. The second component (explaining 10.31% of total variance) is mainly loaded with length of basis capituli and width of tarsus I.

The PCA performed with morphometric characters of male ticks also showed a separation between ticks from the tropical and the

temperate groups but with some overlap between them. The first principal component (explaining 59.46% of total variance) is loaded most heavily by length of idiosoma, width of idiosoma and width of basis capituli. The second principal component (explaining 11.07% of total variance) is mainly loaded with length of basis capituli.

3.3. Comparison of feeding and reproductive parameters

Statistical analysis of engorged female weight and egg mass weight revealed that populations from the tropical strain (*R. sanguineus* from Jaboticabal, Cuba, and Thailand) were significantly different from the temperate strain (*R. sanguineus* from Argentina and Spain). No significant differences were observed within the tropical and temperate groups for these parameters, although, in the tropical group, engorged *R. sanguineus* females from Cuba

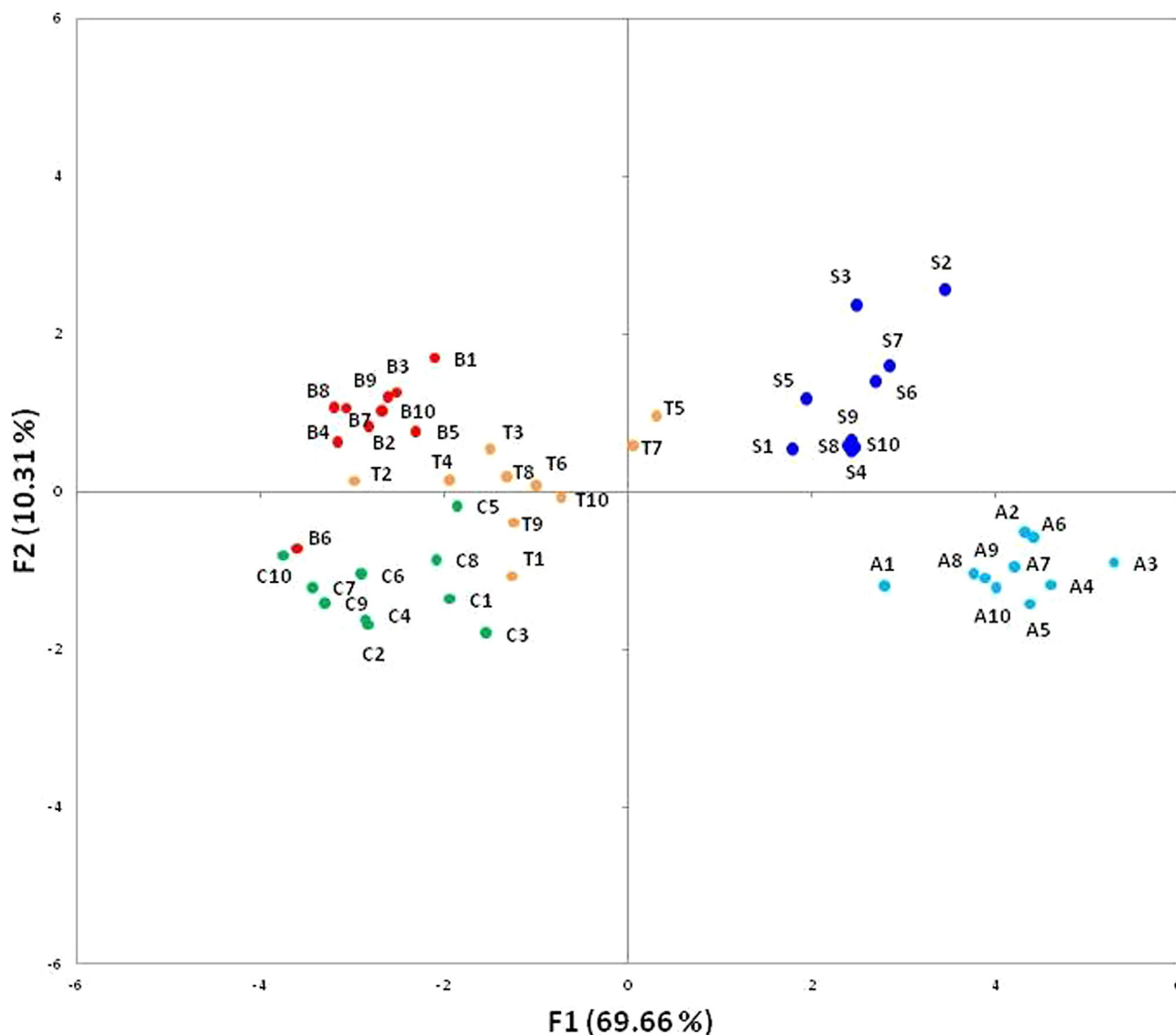


Fig. 4. Principal components analysis of the body measurements of *R. sanguineus sensu lato* females from Cuba (Havana) (C1–C10), Brazil (Jaboticabal, SP) (B1–B10), Thailand (Bangkok) (T1–T10), Argentina (Rafaela, Santa Fe) (A1–A10) and Spain (Zaragoza) (S1–S10).

Table 3

Means, standard deviation and statistical analysis of the biological parameters of *R. sanguineus sensu lato* female from Cuba (Havana), Brazil (Jaboticabal, SP), Thailand (Bangkok), Argentina (Rafaela, Santa Fe) and Spain (Zaragoza) fed on tick-bite naive rabbits.

Parameter	Rs Cub	Rs Braz	Rs Thai	Rs Arg	Rs Spa
EFW	85.9 ± 30.23 ^a	132.3 ± 25.13 ^a	166.8 ± 29.96 ^a	285.1 ± 68.78 ^b	332.2 ± 123.29 ^b
EP	10.5 ± 1.27 ^a	10.7 ± 0.82 ^a	9.9 ± 1.57 ^a	10.4 ± 2.59 ^a	16.2 ± 3.57 ^b
EMW	45.7 ± 8.35 ^a	66.2 ± 16.39 ^a	105.6 ± 24.65 ^a	158.1 ± 20.98 ^b	164.6 ± 65.13 ^b
POP	4.0 ± 1.00 ^a	4.3 ± 1.18 ^a	4.0 ± 1.00 ^a	4.00 ± 0.81 ^a	2.3 ± 0.51 ^b
IP	20.5 ± 1.73 ^a	19.3 ± 1.75 ^a	20.0 ± 1.41 ^a	21.4 ± 1.14 ^a	21.8 ± 0.99 ^a
LH (%)	92.8 ± 2.16 ^a	91.9 ± 3.78 ^a	95.6 ± 3.78 ^a	93.4 ± 4.21 ^a	92.7 ± 2.96 ^a
ERCE (%)	53. ± 3.62 ^a	50.0 ± 8.07 ^a	58.4 ± 13.30 ^a	50.4 ± 1.14 ^a	49.0 ± 6.31 ^a
Tick yield (%)	93.3 ± 11.54 ^a	90 ± 1.14 ^a	96.6 ± 5.77 ^a	76.6 ± 15.27 ^a	90 ± 10.00 ^a

EFW=engorged female weight; EP=engorging period; EMW=egg mass weight; POP=pre-oviposition period; IP=incubation period; LH=larval-hatchability rate; ERCE=efficiency rates of female ticks in converting their food reservoir to eggs. Means in a line followed by the same letter do not differ significantly ($p < 0.05$).

were 35% and 48% lighter than *R. sanguineus* from Jaboticabal and Thailand, respectively. In the temperate group, *R. sanguineus* from Spain was approximately 14% heavier than *R. sanguineus* from Argentina. The engorgement period of *R. sanguineus* females from Spain was significantly longer than those from Brazil, Cuba, Thailand, and Argentina, and the pre-oviposition period was signif-

icantly shorter than those from Brazil, Thailand, and Argentina. No significant differences were observed in incubation period, larval hatchability rate, efficiency rate of female ticks in converting their food reservoir to eggs, and tick yield of each strain. The results are presented in Table 3.

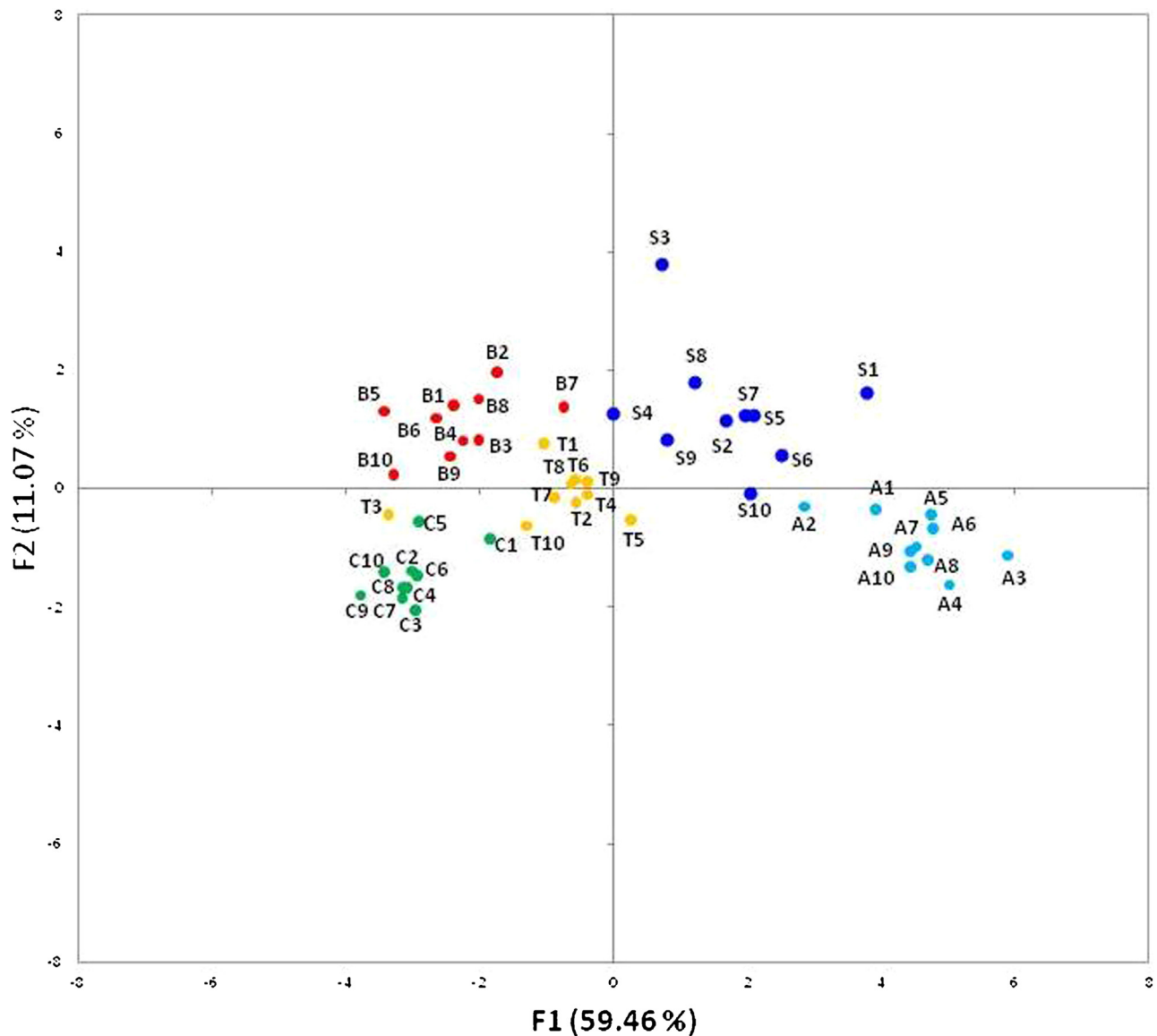


Fig. 5. Principal components analysis of the body measurements of *R. sanguineus* sensu lato males from Cuba (Havana) (C1–C10), Brazil (Jaboticabal, SP) (B1–B10), Thailand (Bangkok) (T1–T10), Argentina (Rafaela, Santa Fe) (A1–A10) and Spain (Zaragoza) (S1–S10).

4. Discussion

The conducted phylogenetic analysis of 16S and 12S rDNA sequences from *R. sanguineus* (s.l.) segregated ticks from Brazil (Jaboticabal, SP), Cuba (Havana), Thailand (Bangkok), Argentina (Rafaela, Santa Fe), and Spain (Zaragoza) into two distinct clades. Moraes-Filho et al. (2011), Nava et al. (2012), and Dantas-Torres et al. (2013) also observed these two clades, analyzing *R. sanguineus* specimens in Latin America, the Southern Cone of South America and in the New and Old Worlds, respectively. They proposed the so-called “tropical strain” for the clade composed of tropical and subtropical populations, and the “temperate strain” for the clade composed of temperate populations of *R. sanguineus* ticks. In this context, the sequences of *R. sanguineus* from Brazil (Jaboticabal, SP), Cuba (Havana) and Thailand (Bangkok) were clustered with other tick sequences in the “tropical strain”, and *R. sanguineus* from Argentina (Rafaela, Santa Fe) and Spain (Zaragoza) were clustered with other tick sequences in the “temperate strain”. This segregation into different clades indicated the occurrence of two different

species under the name “*R. sanguineus*”, as previously reported in studies conducted in Brazil, Argentina, the United States, China and Europe (Szabó et al., 2005; Liu et al., 2007; Moraes-Filho et al., 2011; Levin et al., 2012; Nava et al., 2012; Dantas-Torres et al., 2013). According to Nava et al. (2012), the “temperate strain” cluster, formed by *R. sanguineus* from Western Europe and southern South America, probably represents *R. sanguineus* s.s. and the “tropical strain” cluster represents another species that is not the true *R. sanguineus*.

The results obtained with morphometric methods were coherent with those acquired using molecular markers. The tropical group presented small-sized ticks (female idiosomal length \times breadth ranging from 2.08×1.27 to 2.58×1.86) when compared to ticks belonging to the temperate group (female idiosomal length \times breadth ranging from 2.58×2.02 to 3.24×2.45). Oliveira et al. (2005), comparing females from Brazil (tropical strain) and Argentina (temperate strain), previously reported this observation. The PCA performed with morphometric characters also showed a clear separation between female ticks from the

tropical and the temperate groups, mainly loaded with idiosomal length and width and variations of size within the same group were observed. The PCA performed with morphometric characters showed some separation between male ticks from the tropical and the temperate groups, mainly loaded with idiosomal length and width, but with overlap between them. This difference in male and female PCA could be explained by their distinct role in mating and reproduction once that males take only small blood meals in the adult stage (Fairbairn, 1997). Size variations among individual ticks within the same lineage may be explained by phenotypic plasticity. According to West-Eberhard (2003), virtually all organisms can exhibit some degree of plasticity, affected by external conditions. The plasticity phenomena can be classified in different ways (e.g., morphological, physiological, and behavioral), and the external conditions can be understood as diet, population density, temperature, and photoperiod (Minelli and Fusco, 2010).

The analysis of biological parameters showed that engorged females from the temperate strain were statistically heavier than engorged females from the tropical strain, corroborating the differences obtained in the idiosomal size of females. A relationship between feeding and tick body size has been observed in several other tick species (Dietrich et al., 2012). Amin and Sonenshine (1970) and Koch (1986) observed that incomplete feeding of immature stages has been shown to result in smaller adults in *Ixodes ricinus*, *Dermacentor variabilis*, *Hyalomma asiaticum* and *Amblyomma americanum*. According to Obenchain et al. (1980), the egg mass laid is directly related to the female engorged weight, and female engorged weight is directly related to unfed tick size.

Although no significant difference were observed within the tropical and temperate groups for the female engorged weight, in the tropical group, *R. sanguineus* females from Cuba were 35% and 48% lighter than those from Jaboticabal and Thailand, respectively, and in the temperate group, *R. sanguineus* from Spain was approximately 14% heavier than those from Argentina.

Speybroeck et al. (2002, 2004), studying the *R. appendiculatus* complex in Africa, hypothesized that body size is related to diapausing intensity. Different seasonal activity patterns are observed at different latitudes. Near the equator, ticks usually feed throughout the year and the quantity of ticks vary less in time than at higher latitudes. The size of ticks also tends to be smaller near the equator than the size of ticks at higher latitudes. This finding helps explain, at least in parts, the variation in tick size that we observed between the two lineages.

Finally, our results confirmed that *R. sanguineus* s.l. is represented by at least two genetic lineages that are biologically and morphometrically different. Furthermore, variations within the same lineage were observed and make the morphology-based classification of these tick species a more difficult task.

Acknowledgments

We would like to thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for the financial support and scholarship (Processes #2010/00415-8 and #2013/10394-6). M.I. Camargo-Mathias and G.H. Bechara are recipients of academic career research fellowships from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). We also thank Dr. Santiago Nava (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Santa Fe, Argentina) and Professor Agustín Estrada-Peña (Universidad de Zaragoza, Spain) for the valuable comments and constructive suggestions on this manuscript.

References

- Amin, O.M., Sonenshine, D.E., 1970. Development of the American dog tick, *Dermacentor variabilis*, following partial feeding by immatures. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 63, 128–133.
- Bechara, G.H., Szabó, M.P.J., Ferreira, B.R., Garcia, M.V., 1995. *Rhipicephalus sanguineus* in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 4, 61–66.
- Black 4th, W.C., Piesman, J., 1994. Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 10034–10038.
- Camicas, J.L., Hervy, J.P., Adam, F., Morel, P.C. (Eds.), 1998. Les tiques du monde. Editions de l'Orstom, Paris, 223 pp.
- Chilton, N.B., Gasser, R.B., Beveridge, I., 1995. Differences in a ribosomal DNA sequence of morphologically indistinguishable species within the *Hypodontus macropi* complex (Nematoda: Strongyloidea). *Int. J. Parasitol.* 25, 647–651.
- Dantas-Torres, F., Latrofa, M.S., Annoscia, G., Giannelli, A., Parisi, A., Otranto, D., 2013. Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* from the New and Old Worlds. *Parasites Vectors* 6, 213.
- Dantas-Torres, F., Otranto, D., 2015. Further thoughts on the taxonomy and vector role of *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. *Vet. Parasitol.* 208, 9–13.
- Dietrich, M., Beati, L., Elguero, E., Boulinier, T., McCoy, K.D., 2012. Body size and shape evolution in host races of the tick *Ixodes uriae*. *Biol. J. Linn. Soc.* 108, 323–334.
- Fairbairn, D.J., 1997. Allometry for sexual size dimorphism: pattern and process in the coevolution of body size in males and females. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 28, 659–687.
- Famadas, K.M., Serra-Freire, N.M., Faccini, J.L.H., 1996. A note on slide-mounting technique of unfed immature stages of *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91, 139–140.
- Gray, J., Dantas-Torres, F., Estrada-Peña, A., Levin, M., 2013. Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Ticks Tick-Borne Dis.* 4, 171–180.
- Guglielmone, A.A., Robbins, R.G., Apanaskevich, D.A., Petney, T.N., Estrada-Peña, A., Horak, I.G., 2014. The Hard Ticks of the World (Acari: Ixodida: Ixodidae). Springer, Dordrecht, 738 pp.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.
- Koch, H.G., 1986. Development of the lone star tick, *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae), from immatures of different engorgement weights. *J. Kansas Entomol. Soc.* 59, 309–313.
- Koch, C.L., 1844. Systematische Übersicht über die Ordnung der Zecken. *Arch. Naturgesch.* 10, 217–239.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N.P., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J.D., Gibson, T.J., Higgins, D.G., 2007. Clustal W and clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23, 2947–2948.
- Latreille, P.A., 1806. Genera crustaceorum et insectorum secundum ordinem naturalem in familia disposita, iconibus exemplisque plurimis explicata. Paris et Argentorati 1, 302.
- Levin, M.L., Studer, E., Killmaster, L., Zemtsova, G., Mumcuoglu, K.Y., 2012. Crossbreeding between different geographical populations of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.* 58, 51–68.
- Liu, G.H., Chen, F., Chen, Y.Z., Song, H.Q., Lin, R.Q., Zhou, D.H., Zhu, X.Q., 2007. Complete mitochondrial genome sequence data provides genetic evidence that the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) represents a species complex. *Int. J. Biol. Sci.* 9, 361–369.
- Mangold, A.J., Bargues, M.D., Mas-Coma, S., 1998. Mitochondrial 16S rRNA sequences and phylogenetic relationships of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.* 84, 478–484.
- Moraes-Filho, J., Marcili, A., Nieri-Bastos, F., Richtzenhain, L.J., Labruna, M.B., 2011. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. *Acta Trop.* 117, 51–55.
- Minelli, A., Fusco, G., 2010. Developmental plasticity and evolution of animal complex life cycles. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 365, 631–640.
- Nava, S., Mastropaolo, M., Venzal, J.M., Mangold, A.J., Guglielmone, A.A., 2012. Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Acari: Ixodidae) in Southern Cone of South America. *Vet. Parasitol.* 190, 547–555.
- Nava, S., Estrada-Peña, A., Petney, T., Beati, L., Labruna, M.B., Szabó, M.P.J., Venzal, J.M., Mastropaolo, M., Mangold, A.J., Guglielmone, A.A., 2015. The taxonomy status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). *Vet. Parasitol.* 208, 2–8.
- Obenchain, F.D., Leahy, M.G., Oliver Jr., M.H., 1980. Implications of tick size on the quantifications of engorgement in female *Dermacentor variabilis*. *J. Parasitol.* 66, 282–286.
- Oliveira, P.R., Bechara, G.H., Denardi, S.E., Saito, C.S., Nunes, E.T., Szabó, M.P.J., Camargo Mathias, M.I., 2005. Comparison of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari, Ixodidae) ticks from Brazil and Argentina. *Vet. Parasitol.* 129, 139–147.
- Pegram, R.G., Clifford, C.M., Walker, J.B., Keirans, J.E., 1987. Clarification of the *Rhipicephalus sanguineus* group (Acari, Ixodidae). I. *R. sulcatus* Neumann, 1908 and *R. turanicus* Pomerantsev, 1936. *Syst. Parasitol.* 10, 3–26.
- Speybroeck, N., Madder, M., Van den Bossche, P., Mtambo, J., Berkvens, N., Chaka, G., Mulumba, M., Brandt, J., Tirry, L., Berkvens, D., 2002. Distribution and phenology of ixodid ticks in southern Zambia. *Med. Vet. Entomol.* 16, 430–441.

- Speybroeck, N., Madder, M., Thulke, H.H., Mtambo, J., Tirry, L., Chaka, G., Marcotty, T., Berkvens, D., 2004. Variation in body size in the tick complex *Rhipicephalus appendiculatus*/*Rhipicephalus zambeziensis*. *J. Vector Ecol.* 29, 347–354.
- Szabó, M.P.J., Mukai, L.S., Rosa, P.C.S., Bechara, G.H., 1995. Differences in the acquired resistance of dogs, hamsters, and guinea pigs to repeated infestations with adult ticks *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 32, 43–50.
- Szabó, M.P.J., Mangold, A.J., Joao, C.F., Bechara, G.H., Guglielmone, A.A., 2005. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari, Ixodidae) in South America. *Vet. Parasitol.* 130, 131–140.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. *MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0*. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596–1599.
- Walker, J.B., Keirans, J.E., Horak, I.G., 2000. *The Genus Rhipicephalus (Acari: Ixodidae): A Guide to the Brown Ticks of the World*. Cambridge University Press, Cambridge, 643 pp.
- West-Eberhard, M.J., 2003. *Developmental Plasticity and Evolution*. Oxford University Press, New York, 794 pp.

Eventos

El comité organizador otorga el presente

CERTIFICADO AL TRABAJO

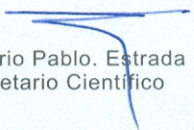
Characterization of the biological cycle of a *Rhipicephalus sanguineus* field isolate in laboratory conditions

Título:

Pedro E Encinosa, Yamil Bello, Alina Rodríguez-Mallon

Autor:

Dado en la Ciudad de La Habana a los 28 días del mes de Noviembre del 2011.



Dr. Mario Pablo. Estrada
Secretario Científico



Dr. Carlos Borroto
Presidente del Comité Organizador



CENTRO
DE INGENIERÍA GENÉTICA Y
BIOTECNOLOGÍA



FORUM DE BASE DE CIENCIA Y TÉCNICA 2013

DESTACADO

Trabajo: Caracterización de una cepa cubana de *Rhipicephalus sanguineus* y determinación de su ciclo biológico en condiciones de laboratorio

Autores: Pedro Enrique Ecinosa, Yamil Bello Soto, Alina Rodríguez Mallou



... Este espíritu de cooperación que ha creado este movimiento, eso es SOCIALISMO ...
Fidel Castro


Dr. Luis Herrera Martínez
Director General

CONGRESO INTERNACIONAL LABIOFAM 2014 CON LOS



CERTIFICADO DE AUTOR

SE OTORGA A: Pablo Escalona, Yamil Bello, Alina Rodríguez

TÍTULO DEL TRABAJO: Caracterización del ciclo biológico de I.

cieltado de campo de Rhepicephalus San-
quiereus en condiciones de laboratorio.

EN LA MODALIDAD DE:

☐ CONFERENCIA MAGISTRAL

☐ CONFERENCIA

☐ SIMPOSIO

☐ TEMA LIBRE

☒ ORAL ☐ PÓSTER

☐ MESA REDONDA

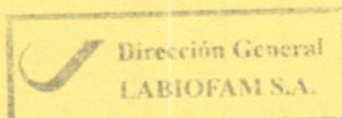
☐ PRESIDENTE DE SESIÓN

☐ SECRETARIO DE SESIÓN

☐ COORDINADOR

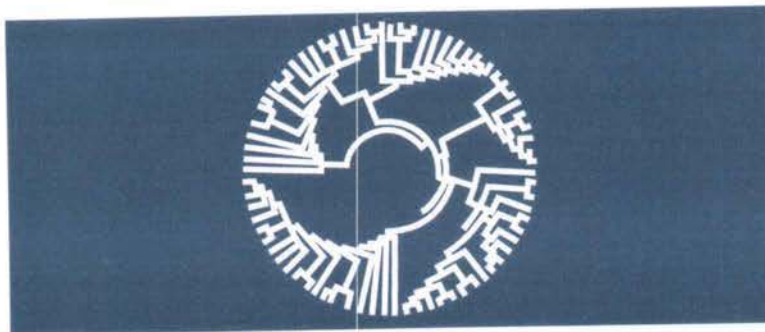
☐ MODERADOR


.....
ING. ISBEL GONZÁLEZ MARRERO
Presidente del Comité Científico




.....
DR. JOSÉ A. FRAGA CASTRO
Presidente del Comité Organizador

SEPTIEMBRE, DEL
22 AL 25 PALACIO
DE CONVENCIONES,
LA HABANA



**BIOINFORMATICS WORKSHOP
VEME-CUBA 2016**

CERTIFICATE

The Organizing Committee of VEME-CUBA 2016 certifies that the poster

**Genetic and biological characterization of a Cuban tick strain
from *Rhipicephalus sanguineus* complex**

by

Alina Rodríguez, Pedro E. Encinosa and Yamil Bello

was presented at

Bioinformatics Workshop on Viral Evolution and Molecular Epidemiology
held at University of Informatics Sciences (UCI), Havana, Cuba
July 11-15, 2016

Prof. Dr. Anne-Mieke Vandamme
Scientific Committee

Prof. Dr. Rafael A. Trujillo Rasúa
Organizing Committee

Prof. Dr. Miriam Nicado García
Rector of UCI



Avales



TO WHOM IT MAY CONCERN

Rhipicephalus sanguineus sensu stricto is a cosmopolitan tick species with considerable public health and economic importance worldwide. Actually, in the last decade, some studies has suggested that the taxon of *R. sanguineus* would be composed of at least two morphologically and genetically distinct strains in the Neotropics, a so-called “southern lineage” distributed in temperate regions of Argentina, Uruguay, Chile, southern Brazil, Spain, Italy, and a “northern lineage” located in tropical and subtropical localities of Brazil, Paraguay, northern Argentina, Colombia, Cuba, South Africa, Mozambique and Thailand.

The results presented herein are the first characterization study of *R. sanguineus* ticks in Cuba, and provide a starting point for the study of the Cuban populations of these ticks. This work is also pioneer in the establishment of a colony of this species in laboratory conditions in Cuba and allows the Centro de Ingenieria Genetica y Biotecnologia - CIGB, Habana to develop experiments to understand the mechanisms involved in the complex interaction between ticks and their hosts and ticks as vectors of other biopathogens causing diseases. The colony of ticks also allows CIGB researchers to have an experimental model for successful identification of new candidates for anti-tick vaccines. These results have been published in two renowned international journals of high impact factor: International Journal of Acarology [vol. 42 (1) (2016)] and Veterinary Parasitology (vol. 215: 78-87, 2016) and the use of the colony as a model in experimental challenge for testing different anti-tick vaccine candidates in the prestigious journal Vaccine (vol. 30: 1782-1789, 2012).

Taking into account the above considerations I would strongly recommend this work for Prize of the Cuban Academy of Science.

Curitiba, October 22, 2016

Dr. Gervasio H. Bechara ESTVM

Professor of Animal Pathology

Pontificia Universidade Catolica do Parana

Curitiba-PR, Brazil

Phone +554132711492



Artemisa, miércoles 6 de septiembre de 2017
"Año 59 de la Revolución"

Aval

Los ectoparásitos hematófagos tales como mosquitos, pulgas y garrapatas constituyen vectores en la transmisión de agentes infecciosos causantes de enfermedades. Algunas de estas enfermedades afectan directamente al ser humano y/o a sus animales afectivos, mientras que otras son causantes de grandes pérdidas económicas en la esfera agropecuaria. De ahí la importancia de su estudio desde el punto de vista médico y veterinario.

Existen aproximadamente 907 especies de garrapatas conocidas. Dado que estas especies pueden diferir en su capacidad de transmitir patógenos a los animales y humanos, la identificación precisa de las especies es crucial para el establecimiento de programas eficaces de vigilancia de las poblaciones de garrapatas, así como para el desarrollo de estrategias sostenibles de tratamiento y control contra las enfermedades que ellas transmiten.

Tradicionalmente, la identificación de las especies de garrapatas se realizó a través de criterios morfológicos, sin embargo, las especies que se encuentran estrechamente relacionadas comparten características morfológicas similares y a veces incluso para los taxonomistas experimentados resulta complicada la identificación de estas especies. Durante la última década, varios estudios han evaluado la idoneidad de una serie de marcadores moleculares para lograr identificaciones rápidas y confiables de diferentes especies de garrapatas.

En Cuba, se han descrito por diferentes autores la presencia de entre 32 y 33 especies diferentes de garrapatas donde se incluye una especie autóctona (*Ixodes capromydis*). Los trabajos publicados sobre la clasificación taxonómica de las especies de garrapatas en Cuba son escasos y muchos de ellos son bastante antiguos.

En este contexto se enmarca el trabajo "Caracterización por primera vez de una cepa cubana de garrapatas del complejo *Rhipicephalus sanguineus*. Establecimiento de una colonia en el laboratorio" presentado como propuesta a Premio de la ACC por el CIGB, donde se combinan las características morfológicas, morfométricas y moleculares de un aislamiento de garrapatas para su correcta clasificación taxonómica dentro del complejo *Rhipicephalus sanguineus*. Este trabajo es además relevante dado el contexto mundial en que se debate la clasificación de las 5 especies dentro del complejo.

Otro mérito importante del trabajo es el establecimiento y mantenimiento de una colonia de garrapatas de esta especie en condiciones de laboratorio lo cual constituye una fuente de ejemplares para diferentes estudios biológicos que permitan comprender la complejidad de las relaciones entre las garrapatas y sus hospederos y los patógenos que ellas transmiten así como el diseño de estrategias novedosas para su control. Y por



último constituye también un punto de partida para el estudio de otras poblaciones cubanas de esta especie de garrapatas.

Este trabajo además ha sido publicado en dos Revistas Internacionales prestigiosas en el tema. Por todo lo cual, el Laboratorio Nacional de Parasitología considera que este trabajo debe ser presentado a la ACC para ser considerado como Logro de la Ciencia en Cuba.

Dr. Luis Méndez Mellor

Director

Presidente del Consejo Científico del LNP





SOCIEDAD CUBANA DE PRASITOLOGÍA VETERINARIA

CONSEJO CIENTÍFICO VETERINARIO DE CUBA

6 de septiembre de 2017
"Año 59 de la Revolución"

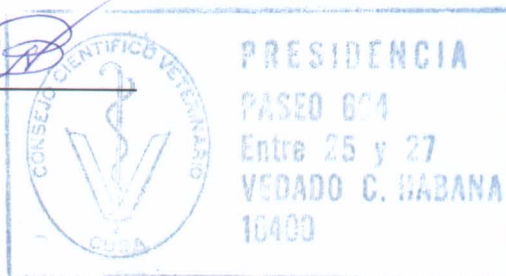
Aval

El trabajo **"Caracterización por primera vez de una cepa cubana de garrapatas del complejo *Rhipicephalus sanguineus*. Establecimiento de una colonia en el laboratorio"**, de los autores principales: Pedro Enrique Encinosa Guzmán, Alina Rodríguez Mallon y Yamil Bello Soto expone el establecimiento de una colonia de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* en condiciones de laboratorio en Cuba por lo que condiciona las posibilidades de realizar otras investigaciones de interés en el papel de esta garrapata en la transmisión de organismos patógenos a la población canina y otras temáticas afines como la acción de productos garrapaticidas existentes y nuevas propuestas de formulaciones de acaricidas para su control. También este resultado permite la utilización de individuos de esta colonia en ensayos biológicos de candidatus vacunales con el objetivo de su inserción como una herramienta dentro del programa de lucha, lo que constituye una estrategia renovadora en el control de esta garrapata.

Los logros obtenidos con este trabajo, constituyen resultados novedosos y de avanzada en una temática de permanente vigencia por lo que tiene una repercusión científica trascendental que aporta conocimientos actualizados no solo a las ciencias veterinarias sino, al universo investigativo cubano como una experiencia base para acometer otros proyectos de interés para el desarrollo agropecuario del país.

Dra. Rafmary Rodríguez Fernández, MSc. _____
Presidenta SCPV

Dra. Beatriz Amaro Villanueva, MSc. _____
Presidenta CCVC





CENTRO DE INGENIERÍA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA

P.O. Box. 6162, Habana 10600, Cuba.

TEL: 271 6022, 271 8466; FAX: 2731779

Ciudad de La Habana, 30 de octubre de 2017

“Año 59 de la Revolución”



Carta Aval de introducción del resultado propuesto a premio de la ACC “Caracterización por primera vez de una cepa cubana de garrapatas del complejo *Rhipicephalus sanguineus*. Establecimiento de una colonia en el laboratorio”.

GAVAC es la única vacuna obtenida por técnicas de ADN recombinante contra garrapatas que se encuentra actualmente disponible comercialmente. La ausencia de otros productos de este tipo a nivel mundial, abren la posibilidad de comercializar nuestra vacuna en otros países que sufren de infestaciones de garrapatas y de los fenómenos de resistencia de estas a los químicos. El efecto del inmunógeno GAVAC no es como el de los acaricidas químicos que provocan la muerte inmediata del parásito sino que por su acción biológica provoca un efecto a largo plazo en la reducción de la población de garrapatas, afectando su potencial biótico. Esto hace que, para que la vacuna tenga efecto, debe aplicarse acompañada de un programa de control y manejo integrado que hacen más compleja su aplicación efectiva y su comercialización. La obtención de un nuevo antígeno que por vías biológicas diferentes pueda potenciar los efectos de GAVAC, es de gran importancia para mejorar la aplicación práctica de la vacuna en la lucha contra garrapatas y ectoparásitos en general y en la realización comercial de estos productos. Si además, este resultado contribuye a mejorar la eficiencia y productividad de la industria ganadera estaremos haciendo un aporte de vital importancia para la satisfacción de las necesidades crecientes de alimentos de la población mundial y de Cuba.

De manera que si logramos una vacuna contra garrapatas, que mejore el desempeño de la ganadería cubana y disminuya los gastos de la economía cubana en la compra de acaricidas químicos, estaremos haciendo un aporte significativo al país. Sin embargo, los ensayos de nuevos antígenos contra garrapatas en especies diana son muy costosos y el hecho de poder contar con un modelo de garrapatas mantenido en el laboratorio que es capaz de parasitar una amplia gama de mamíferos incluidos aquellos que son animales de laboratorio como perros y conejos es una ventaja importante y es un resultado de gran importancia práctica en nuestras investigaciones.

Atentamente

Dr. Mario Pablo Estrada García
Directo de IAP
CIGB



A novel tick antigen shows high vaccine efficacy against the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*

Alina Rodríguez-Mallon^{a,*}, Erlinda Fernández^a, Pedro E. Encinosa^a, Yamil Bello^a,
Lídice Méndez-Pérez^a, Lázaro Cepero Ruiz^b, Danny Pérez^a, Mayte González^a,
Hilda Garay^c, Osvaldo Reyes^c, Luis Méndez^b, Mario Pablo Estrada^a

^a Animal Biotechnology Department, Center for Genetic Engineering and Biotechnology, 31th Avenue and 190, P.O. Box 6162, Havana 10600, Cuba

^b Parasitology Department, National Center for Parasitology, Avenue San Antonio-Rincón, Km 1 1/2, Havana, Cuba

^c Peptide Synthesis Department, Center for Genetic Engineering and Biotechnology, 31th Avenue and 190, P.O. Box 6162, Havana 10600, Cuba

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 October 2011

Received in revised form 3 January 2012

Accepted 4 January 2012

Available online 14 January 2012

Keywords:

Tick

Vaccination

P0 protein

Peptide immunization

ABSTRACT

Ticks are acaridae ectoparasites that, while taking a blood meal, can transmit viruses, bacteria, protozoa and filarial nematodes, which cause a variety of human and animal illnesses. The use of chemical pesticides constitutes the primary measure for control of these ectoparasites. However, the intensive use of these chemicals has drawbacks such as the contamination of food, environmental pollution and development of resistance by ectoparasites. Vaccination is considered a promising alternative for controlling infestations by ectoparasites. Although emerging tick proteins have been identified recently, and have been proposed as potential targets for generating protective molecules, only a limited number of them have been evaluated in vaccine trials.

More than 80 proteins are found in eukaryotic ribosomes. The protein P0 is essential for the assembly of the 60S ribosomal subunit. We have identified an immunogenic region of the ribosomal protein P0 from *Rhipicephalus* sp. ticks that is not very conserved compared to host P0. The efficacy of a 20 amino acid synthetic peptide from this sequence was assayed as a vaccine antigen against *Rhipicephalus sanguineus* infestations in an immunization and challenge experiment on rabbits. A remarkable diminution in the viability of newly molted nymphs from larvae fed on vaccinated rabbits was observed. The number of adults and the number of eggs hatching were significantly reduced, with an overall efficacy of 90%. Our results demonstrated that immunization with an immunogenic peptide of tick protein P0 greatly reduced survival of ticks, suggesting that it has promise as an effective tick control agent.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Ticks are considered the second most important transmitters of pathogens to humans after mosquitoes [1]. Haemoparasitic infections transmitted by ticks cause annual losses on the order of billions of U.S. dollars in the livestock industry, primarily affecting cattle production in tropical and subtropical areas. Among the diseases most important in this regard are anaplasmosis, babesiosis, Lyme disease (caused by *Borrelia burgdorferi*) and the so-called East Coast fever (caused by *Theileria parva*).

A wide variety of chemicals and drugs have been used to control tick infestations. The use of pesticides such as amidines, organophosphates, and others currently constitutes the fundamental measure to control these ectoparasites. However, the intensive

use of these chemicals produces environmental and food (meat and milk) contamination and resistance development by ectoparasites [2,3].

Vaccination is considered an efficient, environmentally safe and economically sustainable alternative for control of ectoparasite infestations. The feasibility of using antigens produced by recombinant DNA techniques for this purpose has been demonstrated with Bm86-based commercial vaccines against *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* ticks (TickGARD, Hoechst Animal Health, Australia, and Gavac marketed by Heber Biotec, Cuba). The latter has proven effective in field studies where the application is included within an integrated control program [4–6]. Identification of novel protective antigens is the limiting step in increasing the effectiveness of these vaccines.

Eukaryotic ribosomes are composed of individual molecules of ribosomal RNA (rRNA) and more than 80 proteins organized into major and minor subunits. Most ribosomal proteins are basic (isoelectric point (pI) > 8.5)), but there is also a group of acidic proteins

* Corresponding author. Tel.: +53 7 2504407/2716022x5103; fax: +53 7 2731779.
E-mail address: alina.rodriguez@cigb.edu.cu (A. Rodríguez-Mallon).

($pI = 3.0\text{--}5.0$) which form a stalk-like structure in the largest ribosome subunit. These acidic proteins are called P proteins (P0, P1 and P2), due to their ability to be phosphorylated, which plays a fundamental role in regulating translational activity of ribosomes. P0 binds directly to P1, P2, 28S rRNA and the factor eEF2. Its absence leads to the generation of defective 60S ribosomal subunits, loss of protein synthesis, and cell death [7].

The ribosomal protein P0, in particular, is a promising vaccine candidate against several protozoa and bacteria. It was immunogenic as antigen (either using the whole protein or just the C-terminal region consisting of the last 11–16 amino acids) whether produced by recombinant techniques or by naked DNA immunization against *Toxoplasma gondii*, *Neospora caninum* [8], *Trypanosoma cruzi* [9], *Leishmania infantum* [10,11], several species of *Babesia* [12–14] and *Plasmodium* [15,16]. The immune response obtained in most of these experiments was characterized by the generation of high titers of specific antibodies capable of conferring active and passive protection against infection, activation of T lymphocytes and production of gamma interferon (IFN γ) as part of a Th1 response pattern.

Recent experiments with specific interference RNA silencing the expression of this protein in *Haemaphysalis longicornis* ticks showed a significant decrease in weight gain of ticks, and a mortality of 96%, caused by structural level effects on salivary gland and cuticle, suggesting that P0 ribosomal protein is necessary for the ingestion of blood and viability of ticks, and possibly of other ectoparasites [17]. However, the development of a vaccine candidate based on this antigen against ticks has as a drawback the high degree of identity between the reported P0 sequences of host vertebrates and their ectoparasites. This can result in the induction of tolerance or the generation of auto antibodies in the host organism.

In this paper, we used a peptide of 20 amino acids from the ribosomal P0 protein of *Rhipicephalus* ticks as antigen in a vaccination and challenge trial. This peptide is located in a highly immunogenic region within the P0 protein, which coincides with areas of low sequence similarity between the tick protein and those of its host organisms. We propose as model the *Rhipicephalus sanguineus*-rabbit system. High tick mortality and poorly hatchable eggs were observed in the group vaccinated with the P0 peptide. The general efficacy of the P0 peptide as vaccine was 90%.

2. Materials and methods

2.1. Ticks

R. sanguineus ticks were obtained from a culture established in our laboratory from the Bejugal 2010 field strain. All tick stages were fed on dogs. Off-host ticks were maintained in a 12 h light: 12 h dark photoperiod at 28 °C and 70% relative humidity.

2.2. Animals

Twenty Californian male rabbits aged between 12 and 14 weeks and body mass of 2.5 kg were obtained from National Center of Parasitology (Cuba). The animals were fed with a pellet diet (produced by CENPALAB, Havana, Cuba) and water *ad libitum*. The trial was conducted in the open area of the Animal House in the National Center of Parasitology. Rabbits were maintained in separated cages until the end of the experiment. The sampling exercise and all procedures were carried out in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [18].

2.3. P0 sequences

Complementary DNAs (cDNAs) were obtained by reverse-transcription from total RNA of *R. microplus* and *R. sanguineus*

larvae. The reactions were carried out following the instructions in the Reverse Transcription System kit (Promega, USA # A3500). Nucleotide sequences that encode P0 ribosomal protein of *R. microplus* and *R. sanguineus* were amplified by polymerase chain reaction (PCR) from the obtained cDNAs. Synthetic oligonucleotides designed from the nucleotide sequence reported in Genbank for the P0 protein of *H. longicornis* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/>) under the accession number EU048401 were used as PCR primers:

Forward oligonucleotide: 5' ATGGTCAGGGAGGACAAGACCACCTGG 3'

Reverse oligonucleotide: 5' CTAGTCGAAGAGTCCGAAGCCCATGTCG 3'

PCR reactions were prepared in a final volume of 50 μ L and contained 4 μ L of the cDNA synthesis reaction, 5 μ L of 10 \times Pfu polymerase buffer, 40 pmol of each oligonucleotide, 200 μ M dNTPs and 6 units of Pfu polymerase. The reaction mixtures were subjected to an initial denaturation of 5 min at 95 °C, followed by 35 cycles of denaturation-annealing-extension (1 min at 95 °C, 1 min at 56 °C and 2 min at 74 °C) and a final extension of 8 min at 74 °C. The amplified fragments obtained were cloned into the commercial vector pGEM-TEasy (Promega, USA) for sequencing.

2.4. Bioinformatics analysis

Analysis of amino acid sequence identity was performed using BlastX and ClustalW programs (<http://www.ebi.ac.uk/>). Other protein analyses such as hydrophobicity, prediction of the accessibility degree of amino acid residues in the protein and prediction of potential B epitopes inside the protein were carried out using bioinformatic programs [19].

2.5. Synthesis of peptide and conjugation to the Keyhole Limpet Hemocyanin (KLH)

The peptide (NH₂-AAGGGAAAKPEESKKEEAK-COOH) was obtained by chemical synthesis. The purification was performed by reverse phase chromatography using an RP-HPLC system (Zorbax 883995-902, a flow of 0.8 mL/min and the eluents A (TFA/H₂O 0.01%) and B (TFA/acetonitrile 0.05%) in a gradient from 5 to 60% B in 35 min). This peptide (pP0) corresponds to the last 20 amino acids of the region with the lowest sequence similarity of the tick protein P0 to the mammalian protein P0. The molecular mass and purity of the peptide was verified by mass spectrometry.

The synthetic peptide was conjugated to KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) of *Megathura crenulata* (SIGMA) by the soluble carbodiimide method [20]. The conjugation was performed using succinic anhydride (SA) spacer agent. Briefly, the carrier protein reacted in pH 8.5 buffer with SA for 30 min. Later, the SA remains were removed by dialysis to prevent unwanted crossovers. For the conjugation, the carrier protein carboxyl groups were activated with 1-ethyl-3-(dimethylaminopropyl)-carbodiimide (DIEC) for 5 min and then the synthetic peptide was added. The separation of the conjugates (pP0-KLH) was performed by gel filtration chromatography. The final concentration of the conjugate was estimated using the bicinchoninic acid method [21].

2.6. Immunization and challenge experiment

The immunogens contained in PBS1X were adjuvanted in VG Montanide 888 (prepared to 10% in mineral oil) in a 60/40 proportion of immunogen/adjuvant. Rabbits were allocated at random into three experimental groups as follows:

Group 1 (7 animals): Subcutaneous immunization with pP0-KLH conjugate at doses of 500 μ g/animal (equivalent to 250 μ g pP0/animal) on days 0, 21, 36 and 60.

Group 2 (7 animals as negative control): Subcutaneous immunization with KLH in doses of 250 µg/animal on days 0, 21, 36 and 60.

Group 3 (6 animals as positive control): Subcutaneous immunization with the *R. (Boophilus) microplus* Bm86 protein in doses of 100 µg/animal on days 0 and 28 [22].

The trial lasted 120 days. The general behavior and body temperature of the animals were observed daily throughout the test. Each rabbit was infested with approximately 250 larvae, 100 nymph and 50 adult (20 male and 30 female) *R. sanguineus* ticks on experiment day 75. Ticks were released inside feeding chambers (each stage in an independent chamber) that had been glued to shaved flanks of rabbits one day before the challenge, as described previously [23]. Elizabethan collars were used to avoid chamber removal.

The collection, counting, weighing and molt analysis of ticks were performed between days 78 and 120. The fed ticks of each stage were kept in the conditions described previously in this section until molt. The engorged females were immobilized in individual plastic Petri dishes until oviposition in the same conditions. The eggs were kept until they hatched. All newly molted stages and hatched eggs from preceding stages fed on immunized rabbits were placed on naive dogs to analyze their capacities to infest tick-naive animals.

2.7. Characterization of the immune response by ELISA

The antibody response against pP0, Bm86 and KLH immunogens in each rabbit was evaluated by indirect ELISA. Animal serum samples were taken on days 0, 14, 21, 28, 36, 59, 73 and 87. One microgram per well of purified recombinant Bm86, KLH (Sigma) and chemically synthesized pP0 were used to coat ELISA plates overnight at 4 °C. Sera were serially diluted in base 1:2 in PBS 1 ×. The plates were incubated with the diluted sera for 1 h at 37 °C and then incubated with 1:10,000 anti-rabbit IgG–HRP conjugate (Sigma) for 1 h at 37 °C. The color reaction was developed with a substrate solution containing o-phenylenediamine 0.4 mg/mL in 0.1 M citric acid and 0.2 M Na₂HPO₄, pH 5.0 and 0.015% hydrogen peroxide. The reaction was stopped with 2.5 M H₂SO₄ and the OD_{490 nm} was determined. The antibody titer was established as the reciprocal of the highest dilution, at which the mean OD of the serum in question was three times the mean OD of the negative control serum. The antibody titer mean was determined from individual values in each group.

2.8. Data analysis

R. sanguineus is a three-host tick (it leaves the host to develop and molt between the three developmental stages); thus, the effects of vaccination on ticks were analyzed in each stage to calculate the final overall effect. The mean feeding time and tick yield were analyzed for larvae, nymphs and adults. Molting and the capacity of the next stage to infest a tick-naive animal were also examined in the case of larvae and nymphs. In these cases, survival or viability was analyzed as the ratio between the viable next stages with respect the number of previous stages recovered and molted. For adults, viability was measured as the final number of female ticks capable of surviving after incubation with the capacity to lay eggs. For adults, we studied also the engorged female weight, the egg weight and their hatching rate. The efficiency of conversion to eggs was calculated, as described previously, as the female weight percentage converted to eggs [24]. All data were compared by ANOVA and Bonferroni multiple comparisons test. Proportion data were transformed to the arcsine of its square root prior to the statistical analysis.

The overall efficacy of each antigen (*E*) was calculated including the effects on each tick stage as done in previous reports [4,25,26]. We define *E* in percentage as:

$$E (\%) = 100 \times [1 - (VL \times RN \times RA \times VA \times OA \times FE)]$$

where

VL is the effect of each immunogen on the larval viability. It was calculated as the ratio between the average of viable larvae newly molted to nymphs that were fed on vaccinated groups (vlv) compared to the average of viable larvae newly molted to nymphs in the control group (vlc) divided by the average of recovered larvae from the groups vaccinated (rlv) compared to the average of those recovered on the control (rlc). $VL = (vlv/vlc) \times (rlc/rlv)$.

RN is the effect of each immunogen on the nymph yield. It was calculated as the ratio between the average of recovered nymphs from the vaccinated groups (rnv) and the average of recovered nymphs from the control group (rnc). $RN = (rnv/rnc)$.

RA is the effect of each immunogen on the adult yield. It was calculated as the ratio between the average of females recovered in the vaccinated groups (rav) and the average of those recovered from the control group (rac). $RA = (rav/rac)$.

VA is the effect of each immunogen on the adult viability. It was calculated as the ratio between the number of females able to lay eggs (vav) and the number of females recovered in the vaccinated groups (rav) compared to the same ratio in the control group (vac/rac). $VA = (vav/rav) \times (rac/vac)$.

OA is the effect of each immunogen on the oviposition of females. It was calculated as the ratio between the averages of egg weights by recovered females in the vaccinated groups (ewv) compared to the average egg weight by recovered females in the control group (ewc). $OA = (ewv/ewc)$.

FE is the effect of each immunogen on the fertility of eggs. It was calculated as the ratio between the averages of larvae (hlv) compared to the average number of laid eggs by ticks fed on vaccinated animals (elv) divided by the same parameters for the control. $FE = (hlv/elv) \times (elc/hlc)$.

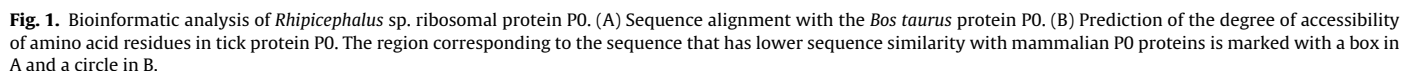
3. Results

3.1. Characterization of P0 sequence

The deduced 318 amino acid sequences from the amplified DNA sequences of the *R. microplus* and *R. sanguineus* ticks were identical and showed a 95% and 93% identity compared to the sequences of P0 ribosomal protein of *H. longicornis* and *Ixodes scapularis* (Genebank accession number DQ066213), respectively. This sequence also showed 96% identity with the polypeptide sequence deduced from the partial open reading frame included in the TC533 of the *Amblyoma variegatum* database, and 99% with those deduced from two open reading frames contained in TC1424 and TC9038, the EST databases for *Rhipicephalus appendiculatus* and *R. microplus*, respectively.

The polypeptide sequence corresponding to the P0 protein of *R. sanguineus* and *R. microplus* ticks also showed a sequence identity of 70% with the bovine P0 (*Bos taurus*, AAX09097 Genebank accession number), being 87% for the last 16 amino acids of the C-terminal region, described as the most immunogenic in the protein [16]. This sequence also showed a sequence identity of 71% with the dog P0 protein (*Canis familiaris*, Genebank accession number XM535894).

The region of the tick P0 proteins that has less sequence similarity (37% of sequence identity) with mammalian P0 proteins is between amino acids 267 and 301 (Fig. 1A). We also found that this region of the P0 protein coincides with an area of low



In general, larvae, nymphs and adults fed on Bm86 immunized rabbits took a longer feeding time than the same stages fed on control or pP0-vaccinated animals. The mean yield of larvae showed no statistically significant differences among the experimental groups. In the case of nymph yield, despite a tendency to recover fewer

Statistical analysis of female and egg weight did not find any significant differences for both parameters among experimental groups. Consequently, the efficiency of conversion to eggs was not significantly different between the vaccinated groups and control group. At this point, we note that in spite of a lack of statistical significance, 11% of adults fed on rabbits immunized with pP0-KLH did not lay eggs; whereas about 3% in the control group immunized with KLH and 6% in the group fed on rabbits immunized with Bm86 did not lay eggs. There were statistically significant differences ($p < 0.01$) in percentage of hatched eggs in the group immunized with pP0-KLH compared to the control group immunized with KLH.

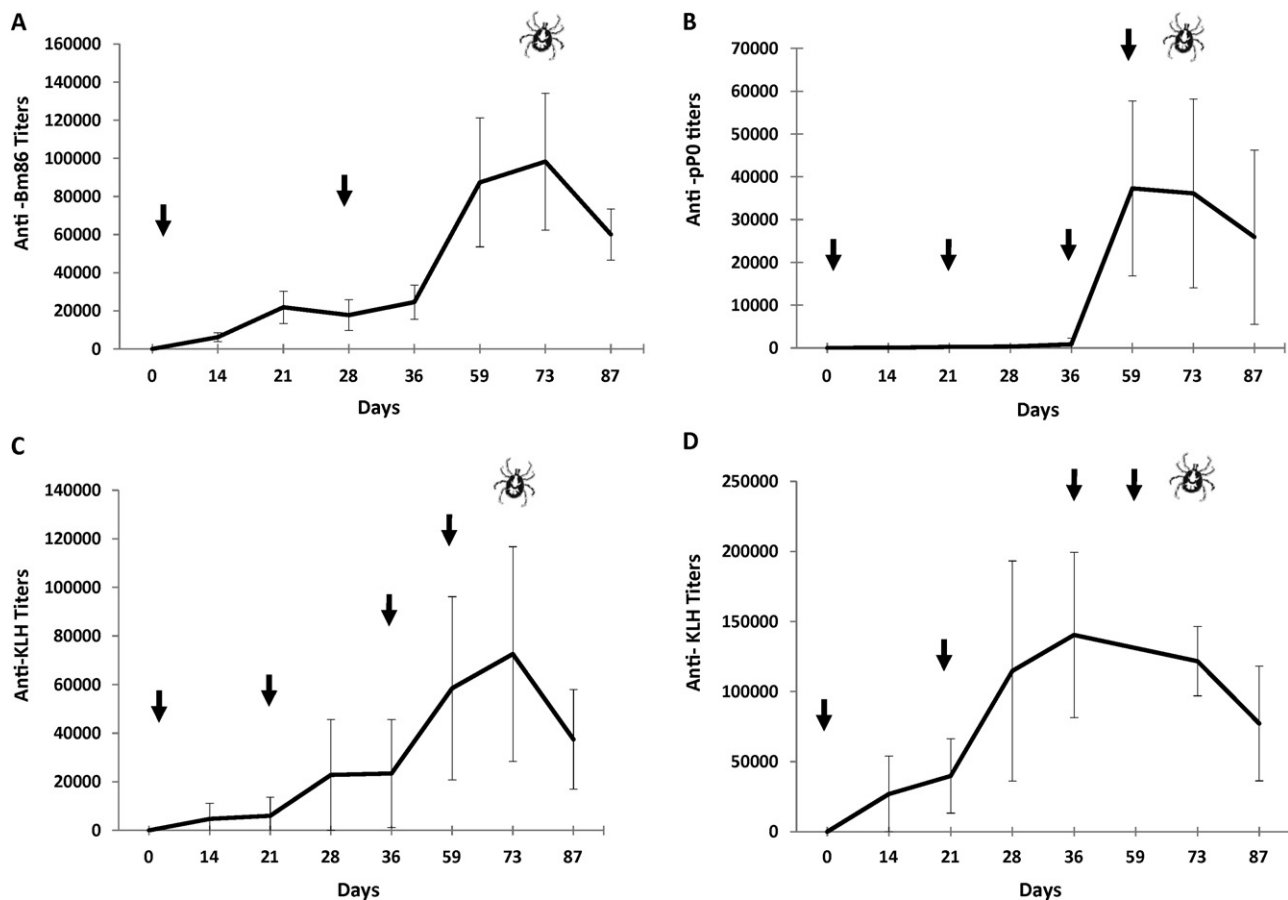


Fig. 2. Antibody responses from immunized rabbits. Data are expressed as the reciprocal of the average of antibody titer, determined as the last serum dilution with an average OD greater than three times the average OD of negative control groups according the case. Standard deviations are represented. Arrows indicate immunization days and ticks indicate the challenge day. (A) Anti-Bm86 titers in group 3. (B) Anti-pP0 titers in group 1. (C) Anti-KLH titers in group 1. (D) Anti-KLH titers in group 2.

Although the eggs laid by females fed on the group immunized with Bm86 hatched less than those in the negative control group, the differences were not significantly different. Larvae hatched from the eggs of the three experimental groups were able to infest naive dogs and feed normally.

To sum the effects of the antigens used in this experiment over all *R. sanguineus* tick stages, the pP0 and Bm86's efficacies were calculated as described in Materials and Methods. As shown in Table 1, the Bm86 antigen had a 51% of efficacy whereas the pP0 antigen showed a 90% efficacy.

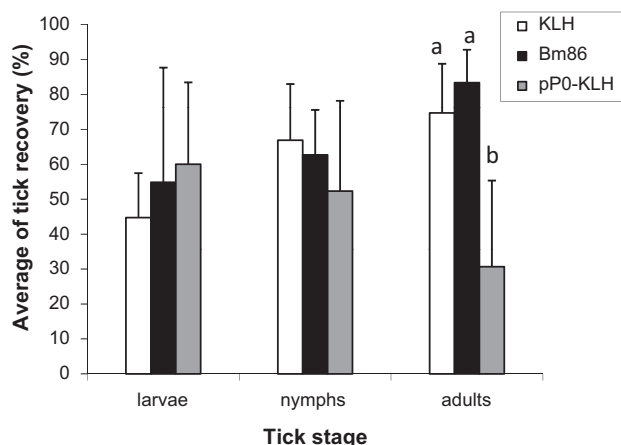


Fig. 3. Yield of *R. sanguineus* larvae, nymphs and adults on immunized rabbits. Data are expressed as the average percentages of larvae, nymphs and adults recovered on the different experimental groups. The standard deviations of the groups are represented by error bars in the positive direction. Different letters represent statistically significant differences among the experimental groups (ANOVA and Bonferroni multiple comparison test [$p < 0.01$]).

4. Discussion

Rabbits from group 1 responded to the pP0 antigen, increasing antibody titers after the booster on day 36. The peptide of the tick protein P0 with 37% of amino acid identity with the mammalian protein P0 used in our experiment escaped induction of tolerance that could result from a high degree of sequence identity between these proteins, as demonstrated by the antibody response obtained. The immunization schedule with high doses (500 µg of conjugate/rabbit) and four immunizations was followed to ensure a high antibody response against the pP0, in keeping with other reports using peptides as immunogens [31,32]. This strategy resulted in a stronger immunogenic response than that obtained by administration of the antigen alone or with fewer booster immunizations. Previous experiments done in our lab with lower doses showed anti-P0 titers lower than 1/100 (data not shown). As is known, peptides are generally less immunogenic, requiring more booster immunizations. There are a number of contributing reasons, among which is the fact that the peptide sequences used to present epitopes are generally short. As a consequence, they contain insufficient information to fold into the correct shape necessary to mimic conformation-dependent epitopes and even if the



Fig. 4. Newly molted *R. sanguineus* nymphs from larvae fed on different experimental groups. (A) Negative control group. (B) Immunized with Bm86. (C) Immunized with the pP0-KLH conjugate. (D) Appearance of dead nymphs molted from larvae fed on rabbits immunized with pP0-KLH.

peptide is recognized by a B cell, the B cell must still receive help from a helper T cell recognizing a sequence within the same immunogen. Traditionally the site of T-cell recognition has been provided by a carrier protein to which peptides are covalently coupled [27]. We chose KLH as the carrier protein because it has proven to be effective in numerous vaccine applications due to its many foreign epitopes, large molecular mass and poor solubility [28–30]. Further development of this peptide as a vaccine antigen will require the optimization of its carrier protein, adjuvant and immunization schedule.

Auto-antibodies in the host organism were not measured; but animals did not display any clinical sign of autoimmunity. Nevertheless, we did a cross-reactivity *in vitro* assay using the rabbit cell line RK13, were anti-P0 antibodies generated in our experimental animals could not detect any protein by western blot in lysates from the rabbit cell line (data not shown). Nevertheless, this issue might be an important subject to be addressed in future experiments to ensure there is no downside to using this P0 peptide.

As reported in controlled trials, the Gavac efficacy against *Rhipicephalus annulatus* is higher than 95% [4,26]. Gavac vaccine is able to control artificial *R. (Boophilus) microplus* infestations in vaccinated

cattle for tick strains isolated from different regions of the world ranging between 51 and 91% efficacy [4]. Recently, it was shown that the Bm86 antigen used as a vaccine in dogs reduced the viability and biotic potential of the *R. sanguineus* ticks [33]. We are reporting here, a 51% of efficacy for Bm86 antigen against *R. sanguineus* ticks on vaccinated rabbits, which demonstrates that our model could be an adequate alternative system to test new anti-tick vaccines. A major obstacle to this kind of experiment for laboratories and industries is the cost of conducting assays in target species. In these cases, our rabbit model could make an important contribution to tick vaccine development. Notably, the efficacy of pP0 was 90% in the three-host tick *R. sanguineus*. These results suggest that P0 might be a good vaccine candidate and encourage the evaluation of this antigen for the control of *R. microplus* in vaccinated bovines.

The protective effect of host anti-pP0 antibodies has several possible explanations. It has been reported that the overall mass and protein in the salivary glands increased about 25-fold during tick feeding in female *Amblyomma americanum* [34]. New gene expression was observed in the salivary glands of female ticks after attachment, mating, and feeding [35]. In a previous study, the tick cuticle was demonstrated to increase in thickness during the first few days after attachment for the accommodation of a large blood meal during the later phase of rapid engorgement [36]. These changes in the protein expression level are directly dependent on the function of ribosomes. P0 protein is a multifunctional protein and its presence in all organisms as a structural component of ribosomes is essential for cell viability [37,38]. Moreover, dephosphorylated P0 detaches from the ribosome and is transported to the nucleus, where it shows apurinic/apyrimidinic endonuclease (APE) activities that are involved in DNA repair and apoptosis [39,40]. Although the P0 protein sequence has no signal sequence or transmembrane domain, the protein can get transported to the surface *via* an unknown mechanism. The surface localization of P0 proteins of parasites could be important for the cell's invasion process [41,42]. This localization of P0 is not limited to parasite cells but includes yeast and mammalian cells [43,44]. Experiments on gene silencing of P0 led to the failure of blood-sucking and subsequent death of ticks. The death of ticks fed on P0-silenced hosts was probably due to a nonfunctional ribosomal large subunit in cell growth or an induction of apoptosis [17].

Further studies are needed to elucidate the effects of host anti-pP0 antibodies on the tick P0 protein. It is known that the primary structure of the P0 protein includes three functional domains. The rRNA-binding domain is located in the N-terminal part of the polypeptide chain and comprises about 200 amino acids. This

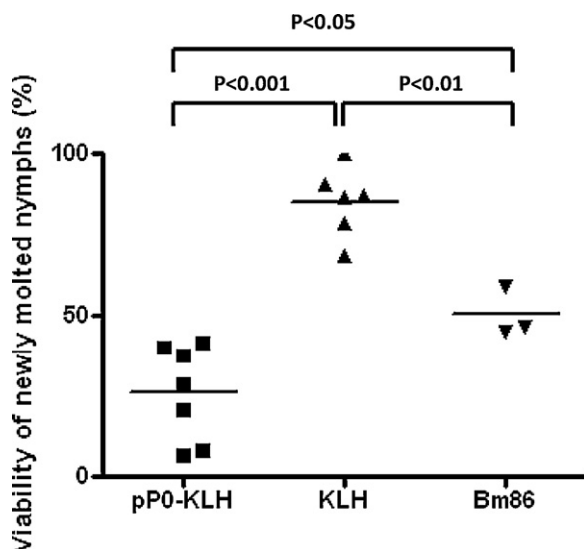


Fig. 5. Viability of newly molted nymphs from larvae fed on the three experimental groups. Statistically significant differences are indicated (ANOVA followed by Bonferroni multiple comparison test from the transformed data).

Table 1
Effect of rabbit vaccination on *R. sanguineus* infestations.

Experimental groups	Reduction percent respect to control of						
	Larvae viability (I_{VL})	Nymph yield (I_{RN})	Adult yield (I_{RA})	Adult viability (I_{VA})	Oviposition of females (I_{OA})	Hatched eggs (I_{FE})	E (%)
pPO-KLH ($n=7$)	74% (39+17/184+85) ^c	23% (52+26) ^a	38% (13+10) ^b	8% (83/93) ^a	3% (90.61+36.13) ^a	12% (1307+402/2241+928) ^b	90.25%
Bm86 ($n=6$)	39% (78+19/156+107) ^b	6% (63+13) ^a	0% (23+3) ^a	4% (147/157) ^a	0% (96.06+36.08) ^a	11% (1413+471/2401+902) ^a	51.04%
KLH ($n=7$,Control)	(101+66/124+55) ^a	(67+16) ^a	(21+8) ^a	(142/146) ^a	(92.52+30.40) ^a	(1529+520/2313+760) ^a	

$I_{VL} = 100 \times (1 - VL)$, $I_{RN} = 100 \times (1 - RN)$, $I_{RA} = 100 \times (1 - RA)$, $I_{VA} = 100 \times (1 - VA)$, $I_{OA} = 100 \times (1 - OA)$ and $I_{FE} = 100 \times (1 - FE)$.
E, Efficacy is calculated as $100 \times [1 - (VL \times RN \times RA \times VA \times OA \times FE)]$, where VL, RN, RA, VA, OA and FE represent the larvae viability, nymphs yield, adult yield, adult viability, female oviposition and egg fertility respectively calculated as described in materials and methods.
In parenthesis are shown average \pm SD of alive nymphs/recovered larvae, recovered nymphs, recovered females, number of egg laying females/recovered females, egg weight (mg) and hatched larvae/eggs.
a,b,c: Different letters mean statistically different groups in the columns.

domain is implicated in the interaction of the P0 protein with the rRNA GTPase center [45]. The second functional region of the P0 protein, located between amino acids 200 and 280, is responsible for the interaction with P1/P2 proteins [46]. The third functional region in the P0 protein is implicated in the interactions with elongation factors during translation [47]. This domain is placed in the highly conserved C-terminal part of the polypeptide. One or some of the divergent parts of the molecule seem to contribute to the solubility of P0 [48]. The role of our anti-peptide antibodies remains to be studied but it is clear that there are involvements in morphological changes that lead to tick death.

In conclusion, the results presented here support the development of pPO as a vaccine antigen to control tick infestations. Although controlled trials can serve as indicator for vaccine efficacy, field trials are necessary to evaluate the vaccine under field conditions. Nevertheless, the experience with Gavac shows that protection in the field is usually higher than in controlled conditions [4]. Another interesting question remaining to be answered is whether co-immunization with Bm86 and pPO together would produce synergistic effects on ticks, taking into account the different pathways in which these proteins appear to be involved.

Acknowledgements

The authors thank Dr. John van der Meer (President of PAMBA) for his valuable review of this article. This work was supported by the Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Havana, Cuba.

References

- [1] Parola P, Raoult D. Ticks and tick-borne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin Infect Dis* 2001;32(6):897–928.
- [2] Yasser Ezzat S. Molecular cloning and expression of a larval immunogenic protein from the cattle tick *Boophilus annulatus*. *Vet Immunol Immunopathol* 2008;121(3–4):281–9.
- [3] Ahmad M, Arif MI, Ahmad Z, Denholm I. Cotton whitefly (*Bemisia tabaci*) resistance to organophosphate and pyrethroid insecticides in Pakistan. *Pest Manag Sci* 2002;58(2):203–8.
- [4] de la Fuente J, Rodríguez M, Montero C, Redondo M, García-García JC, Méndez L, et al. Vaccination against ticks (*Boophilus* spp.): the experience with the Bm86-based vaccine Gavac. *Genet Anal* 1999;3–5:143–8.
- [5] de la Fuente J, Almazan C, Canales M, Pérez de la Lastra JM, Kocan KM, Willadsen P. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Anim Health Res Rev* 2007;2(1):3–8.
- [6] Redondo M, Frago H, Ortiz M, Montero C, Lona J, Medellín JA, et al. Integrated control of acaricide-resistant *Boophilus microplus* populations on grazing cattle in Mexico using vaccination with Gavac and amidine treatments. *Exp Appl Acarol* 1999;10(10):841–9.
- [7] Wojda I, Cytryńska M, Frajnt M, Jakubowicz T. Protein kinases CKI and CKII are implicated in modification of ribosomal proteins of the yeast *Trichosporon cutaneum*. *Acta Biochim Pol* 2002;49(4):947–57.
- [8] Zhang H, Lee EG, Liao M, Compaore MK, Zhang G, Kawase O, et al. Identification of ribosomal phosphoprotein P0 of *Neospora caninum* as a potential common vaccine candidate for the control of both neosporosis and toxoplasmosis. *Mol Biochem Parasitol* 2007;153(2):141–8.
- [9] Skeiky YA, Benson DR, Guderian JA, Sleath PR, Parsons M, Reed SG. Trypanosoma cruzi acidic ribosomal P protein gene family. Novel P proteins encoding unusual cross-reactive epitopes. *J Immunol* 1993;151(10):5504–15.
- [10] Iborra S, Soto M, Carrion J, Nieto A, Fernandez E, Alonso C, et al. The *Leishmania infantum* acidic ribosomal protein P0 administered as a DNA vaccine confers protective immunity to Leishmania major infection in BALB/c mice. *Infect Immun* 2003;656(11):2–72.
- [11] Iborra S, Carrion J, Anderson C, Alonso C, Sacks D, Soto M. Vaccination with the *Leishmania infantum* acidic ribosomal P0 protein plus CpG oligodeoxynucleotides induces protection against cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice but does not prevent progressive disease in BALB/c mice. *Infect Immun* 2005;73(9):5842–52.
- [12] Terkawi MA, Jia H, Zhou J, Lee EG, Igarashi I, Fujisaki K, et al. Babesia gibsoni ribosomal phosphoprotein P0 induces cross-protective immunity against *B. microti* infection in mice. *Vaccine* 2007;25(11):2027–35.
- [13] Terkawi MA, Jia H, Gabriel A, Goo YK, Nishikawa Y, Yokoyama N, et al. A shared antigen among *Babesia* species: ribosomal phosphoprotein P0 as a universal babesial vaccine candidate. *Parasitol Res* 2007;102(1):35–40.
- [14] Terkawi MA, Zhang G, Jia H, Aboge G, Goo YK, Nishikawa Y, et al. C3 contributes to the cross-protective immunity induced by *Babesia gibsoni*

- phosphoriboprotein P0 against a lethal *B. rodhaini* infection. *Parasite Immunol* 2008;30(6–7):365–70.
- [15] Chatterjee S, Singh S, Sohoni R, Singh NJ, Vaidya A, Long C, et al. Antibodies against ribosomal phosphoprotein P0 of *Plasmodium falciparum* protect mice against challenge with *Plasmodium yoelii*. *Infect Immun* 2000;68(7):4312–8.
 - [16] Rajeshwari K, Patel K, Nambeesan S, Mehta M, Sehgal A, Chakraborty T, et al. The P domain of the P0 protein of *Plasmodium falciparum* protects against challenge with malaria parasites. *Infect Immun* 2004;72(9):5515–21.
 - [17] Gong H, Liao M, Zhou J, Hatta T, Huang P, Zhang G, et al. Gene silencing of ribosomal protein P0 is lethal to the tick *Haemaphysalis longicornis*. *Vet Parasitol* 2008;151(2–4):268–78.
 - [18] Guide for the care and use of laboratory animals. Washington, DC: National Academy Press; 1996.
 - [19] Bomie H, Armen HTJ. User-friendly and versatile software for analysis of protein hydrophobicity. *BioTechniques* 1998;25:256–63.
 - [20] Sehgal D, Vijay IK. A method for the high efficiency of water-soluble carbodiimide-mediated amidation. *Anal Biochem* 1994;218(1):87–91.
 - [21] Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, et al. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985;150(1):76–85.
 - [22] Vargas M, Montero C, Sanchez D, Perez D, Valdes M, Alfonso A, et al. Two initial vaccinations with the Bm86-based Gavacplus vaccine against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* induce similar reproductive suppression to three initial vaccinations under production conditions. *BMC Vet Res* 2010;6:43.
 - [23] Bechara GH, Szabo MPJ, Ferreira BR. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. *Braz J Vet Parasitol* 1995;4:61–6.
 - [24] Bennett GF. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarida: Ixodidae). II. Influence of temperature, humidity and light. *Acarologia* 1974;16(October (2)):251–7.
 - [25] Almazan C, Kocan KM, Bergman DK, Garcia-Garcia JC, Blouin EF, de la Fuente J. Identification of protective antigens for the control of *Ixodes scapularis* infestations using cDNA expression library immunization. *Vaccine* 2003;21(13–14):1492–501.
 - [26] Hajdusek O, Almazan C, Loosova G, Villar M, Canales M, Grubhoffer L, et al. Characterization of ferritin 2 for the control of tick infestations. *Vaccine* 2010;28(17):2993–8.
 - [27] Jackson DC, Fitzmaurice CJ, Brown LE, Zeng W. Preparation and properties of totally synthetic immunogens. *Vaccine* 1999;18(3–4):355–61.
 - [28] Gil FI, Brun A, Wigdorovitz A, Catalá R, Martínez-Torrecedrada JL, Casal I, et al. High-yield expression of a viral peptide vaccine in transgenic plants. *FEBS Lett* 2001;488(1–2):13–7.
 - [29] Langeveld JPM, Ignacio Casal J, Cortás E, van de Wetering G, Boshuizen RS, Schaaper WMM, et al. Effective induction of neutralizing antibodies with the amino terminus of VP2 of canine parvovirus as a synthetic peptide. *Vaccine* 1994;12(15):1473–80.
 - [30] Langeveld JP, Casal JI, Osterhaus AD, Cortes E, de Swart R, Vela C, et al. First peptide vaccine providing protection against viral infection in the target animal: studies of canine parvovirus in dogs. *J Virol* 1994;68(7):4506–13.
 - [31] Lugo JM, Oliva A, Morales A, Reyes O, Garay HE, Herrera F, et al. The biological role of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in growth and feeding behavior in juvenile fish. *J Pept Sci* 2010;16(11):633–43.
 - [32] Van Regenmortel MHV, Muller S. In: Pillai S, Van der Vliet PC, editors. Synthetic peptides as antigens. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, vol. 28. Elsevier Science B.V.; 1999.
 - [33] Perez-Perez D, Bechara GH, Machado RZ, Andrade GM, Del Vecchio RE, Pedrosa MS, et al. Efficacy of the Bm86 antigen against immature instars and adults of the dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol* 2010;167(2–4):321–6.
 - [34] Shipley MM, Dillwith JW, Bowman AS, Essenberg RC, Sauer JR. Changes in lipids of the salivary glands of the lone star tick, *Amblyomma americanum*, during feeding. *J Parasitol* 1993;79(6):834–42.
 - [35] Oaks JF, McSwain JL, Bantle JA, Essenberg RC, Sauer JR. Putative new expression of genes in ixodid tick salivary gland development during feeding. *J Parasitol* 1991;77(3):378–83.
 - [36] Obenchain FD, Galun R. Physiology of ticks. Oxford: Pergamon Press; 1982.
 - [37] Uchiumi T, Kominami R. Direct evidence for interaction of the conserved GTPase domain within 28 S RNA with mammalian ribosomal acidic phosphoproteins and L12. *J Biol Chem* 1992;267(27):19179–85.
 - [38] Justice MC, Ku T, Hsu MJ, Carniol K, Schmatz D, Nielsen J. Mutations in ribosomal protein L10e confer resistance to the fungal-specific eukaryotic elongation factor 2 inhibitor sordarin. *J Biol Chem* 1999;274(8):4869–75.
 - [39] Sanchez-Madrid F, Vidales FJ, Ballesta JP. Functional role of acidic ribosomal proteins. Interchangeability of proteins from bacterial and eukaryotic cells. *Biochemistry* 1981;20(11):3263–6.
 - [40] Yacoub A, Kelley MR, Deutsch WA. Drosophila ribosomal protein P0 contains apurinic/aprimidinic endonuclease activity. *Nucleic Acids Res* 1996;24(21):4298–303.
 - [41] Chatterjee S, Singh S, Sohoni R, Kattige V, Deshpande C, Chiplunkar S, et al. Characterization of domains of the phosphoriboprotein P0 of *Plasmodium falciparum*. *Mol Biochem Parasitol* 2000;107(2):143–54.
 - [42] Goswami A, Singh S, Redkar VD, Sharma S. Characterization of P0, a ribosomal phosphoprotein of *Plasmodium falciparum*. Antibody against amino-terminal domain inhibits parasite growth. *J Biol Chem* 1997;272(18):12138–43.
 - [43] Sehgal A, Kumar N, Carruthers VB, Sharma S. Translocation of ribosomal protein P0 onto the *Toxoplasma gondii* tachyzoite surface. *Int J Parasitol* 2003;33(14):1589–94.
 - [44] Singh S, Sehgal A, Waghmare S, Chakraborty T, Goswami A, Sharma S. Surface expression of the conserved ribosomal protein P0 on parasite and other cells. *Mol Biochem Parasitol* 2002;119(1):121–4.
 - [45] Rodriguez-Gabriel MA, Remacha M, Ballesta JP. The RNA interacting domain but not the protein interacting domain is highly conserved in ribosomal protein P0. *J Biol Chem* 2000;275(3):2130–6.
 - [46] Santos C, Ballesta JP. The highly conserved protein P0 carboxyl end is essential for ribosome activity only in the absence of proteins P1 and P2. *J Biol Chem* 1995;270(35):20608–14.
 - [47] Uchiumi T, Kikuchi M, Terao K, Iwasaki KN, Ogata K. Cross-linking of elongation factor 2 to rat-liver ribosomal proteins by 2-iminothiolane. *Eur J Biochem* 1986;156:37–48.
 - [48] Shimizu T, Nakagaki M, Nishi Y, Kobayashi Y, Hachimori A, Uchiumi T. Interaction among silkworm ribosomal proteins P1, P2 and P0 required for functional protein binding to the GTPase-associated domain of 28S rRNA. *Nucleic Acids Res* 2002;30(12):2620–7.



DICTAMEN

Con fecha 18 de octubre de 2017 se reunió el Consejo Científico del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) y acordó presentar como propuesta para PREMIO NACIONAL DE LA ACADEMIA 2017, el trabajo titulado Caracterización por primera vez de una cepa cubana de garrapatas del complejo *Rhipicephalus sanguineus*. Establecimiento de una colonia en el laboratorio

Tipo de aporte: científico-técnico y social.

Rama: Ciencias agrarias

Autor(es) Principal(es): Pedro Enrique Encinosa Guzmán, Alina Rodríguez Mallon y Yamil Bello Soto.

Importancia del resultado y valor para la ciencia y la tecnología:

Desde el punto de vista científico, los resultados presentados en este trabajo constituyen el primer estudio de caracterización de la especie de garrapatas *R. sanguineus* en Cuba y proporcionan un punto de partida para el estudio de las poblaciones cubanas de estas garrapatas. Este tema adquiere mayor relevancia puesto que actualmente hay un debate mundial acerca de la clasificación taxonómica de las especies de garrapatas que pertenecen al complejo *R. sanguineus* motivado por la pobre descripción de la cepa original, la pérdida del espécimen tipo de esta especie y las similitudes morfológicas entre las garrapatas que pertenecen a este grupo. Desde el punto de vista práctico, este trabajo es pionero en Cuba, en el establecimiento de una colonia de esta especie en condiciones de laboratorio y permite desarrollar experimentos para comprender los mecanismos involucrados en la compleja interacción entre las garrapatas y sus hospederos y de las garrapatas como vectores de otros parásitos causantes de enfermedades y además sirve como modelo experimental para la pesquisa de antígenos útiles para el desarrollo de vacunas contra garrapatas.



E. Pimentel

Eulogio Pimentel Vázquez
Director General
Presidente del Consejo Científico
CIGB



La Habana, 23 de octubre de 2017

Año 59 de la Revolución

Aval del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología sobre presentación como propuesta para PREMIO NACIONAL DE LA ACADEMIA 2017, del trabajo titulado "Caracterización por primera vez de una cepa cubana de garrapatas del complejo *Rhipicephalus sanguineus*. Establecimiento de una colonia en el laboratorio".

Los resultados presentados en este trabajo constituyen el primer estudio de caracterización de la especie de garrapatas *R. sanguineus* en Cuba, y proporcionan un punto de partida para el estudio de las poblaciones cubanas de estas garrapatas. Este trabajo es además pionero en el establecimiento de una colonia de esta especie en condiciones de laboratorio en Cuba y nos permite desarrollar experimentos para comprender los mecanismos involucrados en la compleja interacción entre las garrapatas y sus hospederos y en las garrapatas como vectores de otros parásitos causantes de enfermedades. La colonia de garrapatas nos permite además contar con un modelo experimental para la identificación con éxito de nuevos candidatos para vacunas anti-garrapatas. Estos resultados han sido publicados en dos reconocidas revistas internacionales de alto factor de impacto:

International Journal of Acarology (Vol 42(1) (2016) y Veterinary Parasitology (Vol 215:78-87 (2016) y el uso de la colonia como modelo experimental para ensayos de reto con diferentes candidatos a vacunas en la prestigiosa revista Vaccine (Vol 30 (2012), pp. 1782-1789).

Por todo lo antes expuesto, consideramos que este trabajo cumple con el rigor científico y técnico necesario para ser presentado para optar por el Reconocimiento Nacional de la Academia de Ciencias de Cuba de este año 2017.

Atentamente,



E Pimentel
Eulogio Pimentel Vázquez
Director General
CIGB

La Habana, 30 de octubre de 2017

Año 58 de la Revolución

Aval de la OSDE BioCubaFarma sobre presentación como propuesta para PREMIO NACIONAL DE LA ACADEMIA 2017, del trabajo titulado "Caracterización por primera vez de una cepa cubana de garrapatas del complejo *Rhipicephalus sanguineus*. Establecimiento de una colonia en el laboratorio", cuya Unidad Ejecutora Principal es el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología.

Este trabajo se enmarca dentro de los trabajos desarrollados por este Centro en la búsqueda de nuevos candidatos para el control de ectoparásitos. Desde la década de los 90 se desarrolló una vacuna contra garrapatas (GAVAC), que actualmente es la única producida por técnicas de ADN recombinante disponible en el mercado mundial. Esta vacuna tiene efectividad fundamentalmente contra la garrapata del ganado bovino y ha permitido el ahorro de toneladas de químicos que dejaron de utilizarse para su control con los consiguientes beneficios para el medio ambiente. Sin embargo, no existen actualmente vacunas disponibles contra la garrapata del perro. Para el desarrollo de estas vacunas se hace necesario contar con un modelo experimental que permita realizar los ensayos de prueba con los candidatos propuestos. En este sentido se realizó un aislamiento de la especie de garrapatas *Rhipicephalus sanguineus*, el cual fue profundamente caracterizado desde el punto de vista morfológico, morfométrico y molecular. A partir de este aislamiento se estableció una colonia de garrapatas mantenida en condiciones de laboratorio que permite la producción fiable de ejemplares en condiciones normalizadas adecuadas como modelo experimental para una variedad de estudios biológicos, incluyendo la identificación con éxito de nuevos candidatos para vacunas anti-garrapatas. Estos resultados han sido publicados en prestigiosas revistas internacionales que abordan estos temas.

Por todo lo expuesto, consideramos que este trabajo cumple con el rigor científico y técnico necesario para ser presentado para optar por el Premio Nacional de la Academia de Ciencias de Cuba de este año 2017.

Atentamente,



Dr. Rolando Pérez Rodríguez
Director Política Científica
OSDE BioCubaFarma

