Detección molecular de *Rickettsia* spp. en garrapatas (Acari, Ixodidae) asociadas a la herpetofauna de la hacienda San Juan de Carare, departamento de Santander

Juan José Cárdenas Carreño

Universidad del Magdalena

Facultad de Ciencias Básicas

Programa de Biología

Santa Marta, Colombia

2020

Detección molecular de *Rickettsia* spp. en garrapatas (Acari, Ixodidae) asociadas a la herpetofauna de la hacienda San Juan de Carare, departamento de Santander

Juan José Cárdenas Carreño

Trabajo presentado como requisito parcial para optar al título de:
Biólogo

Directora:
Ph.D. Lyda Raquel Castro García
Codirectora:
Andrea Paola Cotes Perdomo

Línea de Investigación:
Ecología y genética molecular
Grupo de Investigación:
Evolución, Sistemática y Ecología Molecular

Universidad del Magdalena
Facultad de Ciencias Básicas
Programa de Biología
Santa Marta, Colombia
2020

Nota de aceptación:

Aprobado por el Consejo de Programa en cumplimiento de los requisitos exigidos por el Acuerdo Superior N° 11 de 2017 y Acuerdo Académico N° 41 de 2017 para optar al título de Biólogo

_____

Jurado

_____

Jurado

Santa Marta, ____ de ____de _____

Dedicatoria

A mi madre, por ser un apoyo incansable e incondicional durante todo mi proceso formativo; a mis abuelos por inspirarme a ser mejor cada día; a la familia que elegí y me acompañó a lo largo de los años, amigos, colegas; a la versión de Dios en la que creo, la manifestación del hombre sustentando ser digno de la vida.

“La ciencia no tiene patria, pero el hombre de ciencia la tiene”.

Bernardo Houssay

AGRADECIMIENTOS

Esta experiencia se la dedico a cada una de las personas que me impulsaron y motivaron a nunca desistir en el proceso, que me inculcaron que con dedicación y esfuerzo somos capaces de lograr todo lo que nos propongamos. Agradezco a los miembros de GIESEMOL por ser incidentes en mi formación, Adriana, Ángel, Richard, Mateo.

Mi reconocimiento a la Universidad del Magdalena por propiciar escenarios de participación, proyectando la investigación como un pilar institucional y sustentando su aporte a través de convocatorias para apoyar el desarrollo de trabajos de grado en programas de pregrado, siendo este proyecto de investigación uno de los beneficiados.

Agradecimientos al programa de Biología y su cuerpo colegiado por ser parte íntegra y fundamental de mi formación profesional.

Mi sincero agradecimiento a la Doctora Lyda Raquel Castro por brindarme la oportunidad de explorar el maravilloso mundo de la Biología Molecular, permitirme ser su tesista e inspirarme a la excelencia.

A mi codirectora y amiga, Andrea Cotes, quién fue una de las primeras investigadoras que conocí y alguien a quien admiro profundamente, agradezco tu guía y apoyo a lo largo de todo este proceso.

A mis grandes amigos Álvaro Rodríguez, Aldair Barros, Omar Guerra, Eduar Lopesierra, Santiago García, Elkin Noguera, José Trillos, Jozuan González, Willy Toppel y Lauren Paternina, quienes hicieron posible que comprendiera que en la carrera de pregrado de Biología existe la oportunidad de fomentar la sana competencia, el compañerismo, la hermandad, la pluralidad de ideas y un común denominador, el deseo a la grandeza.

A mi familia, abuela y abuelo, por ser el motor de mi vida y unos padres para mí, a mi hermana por su apoyo y compañía a través de los años.

A mi madre, mi mayor inspiración, mi mejor amiga.

Contenido

Pág.

1. Introducción 1

2. Materiales y Métodos 4

2.1 Área de estudio 4

2.2 Identificación taxonómica de garrapatas 5

2.3 Extracción de ADN 6

2.4 Amplificación de gltA/ompA/ SCA1 7

2.5 Purificación y secuenciación 8

2.6 Edición y alineamiento de las secuencias 8

2.7 Análisis filogenéticos 8

3. Resultados 9

3.1 Identificación taxonómica de las garrapatas 9

3.2 Identificación molecular y reconstrucción filogenética de rickettsias detectadas en garrapatas 12

4. Discusión 17

5. Conclusión 20

6. Referencias Bibliográficas 21

Lista de figuras

Pág.

Figura 1. Ubicación geográfica del sitio de muestreo. Fuente: Autor. 5
Figura 2. Vista dorsal de garrapata macho, *Amblyomma dissimile*. 1. Base del capítulo, 2. Coxa 1, 3. Coxa 2, 4. Coxa 3, 5. Coxa 4, 6. Festones, 7. Hipostoma, 8. Ojos, 9. Palpo, 10. Scutum. Fuente: Autor. 10
Figura 3. Vista ventral de garrapata macho, *Amblyomma dissimile*. 1. Base del capítulo, 2. Coxa 1, 3. Coxa 2, 4. Coxa 3, 5. Coxa 4, 6. Espolón, 7. Festones, 8. Garra, 9. Hipostoma, 10. Palpo, 11. Poro anal, 12. Poro genital. Fuente: Autor. 11
Figura 4. Topología de arbol filogenético por Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana de secuencias concatenadas de los genes gltA, ompA y SCA1. 16

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1. Muestras de garrapatas colectadas de la Herpetofauna (especies hospederas), de la Hacienda San Juan de Carare, Santander. 6
Tabla 2. Secuencias y especificaciones de los primers del género *Rickettsia* implementados en la detección molecular de los patógenos. 7
Tabla 3. Condiciones de temperatura y tiempo en el termociclador para la realización de la PCR de los genes gltA, ompA y SCA1..... 8
Tabla 4. Datos de rickettsias secuenciadas e identificación a través de la herramienta BLAST..... 13
Tabla 5. Secuencias de rickettsias descargadas de GenBank, incluyendo la de los departamentos de Córdoba y Magdalena..... 14
Tabla 6. Patógenos presentes en garrapatas obtenidas de la herpetofauna de la Hacienda San Juan de Carare. 15

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Significado
gltA	Gen que codifica la “Citrate synthase gene” (citrato sintasa)
ompA	“Outer membrane protein A” (proteína A de la membrana externa)
SCA1	**“**surface cell antigen 1” (antígeno celular de superficie 1)
µL	Microlitros
BLAST	**“**Basic Local Alignment Search Tool” (herramienta básica de búsqueda de alineación local)

Resumen

El conocimiento acerca de las garrapatas como vectores de enfermedades en Colombia, es limitado y las zonas del país donde se han realizado estudios de este tipo son escasas. Por consiguiente, el objetivo de este trabajo, consistió en identificar molecularmente las rickettsias presentes en garrapatas (Acari, Ixodidae) asociadas a la Herpetofauna de la Hacienda San Juan de Carare, departamento de Santander. Además, caracterizar la diversidad de rickettsias y compararla con la de los departamentos de Córdoba y Magdalena. Se generaron secuencias del género *Rickettsia*, y posteriormente se realizaron análisis filogenéticos de inferencia bayesiana (BI) y máxima verosimilitud (ML) con las secuencias generadas en el estudio y otras secuencias de *Rickettsia* descargadas de GenBank. De todas las muestras secuenciadas en el presente estudio, se identificó la presencia de una especie de *Rickettsia*, la cual corresponde a Candidatus *Rickettsia colombianensi* según su agrupamiento con los individuos disponibles en GenBank producto de las investigaciones desarrolladas en Córdoba y el Magdalena. Además, todas las garrapatas recolectadas se identificaron como *Amblyomma dissimile*, siendo la primera ocasión en la que se registra parasitando a la serpiente *Leptodeira septentrionalis*. No obstante, la prevalencia de *Rickettsia* exhibió valores muy altos, motivo que sustenta la importancia de seguir realizando estudios de este tipo en el país, que posibiliten tener mayor conocimiento respecto a la distribución y ecología de estos microorganismos, que sirva para consolidar políticas claras conforme a la salud pública en zonas rurales y urbanas, acerca de la temática en mención.

Palabras clave: Vectores, *Rickettsia*, análisis filogenéticos, *Amblyomma*.

ABSTRACT

Knowledge about ticks as vectors of diseases in Colombia is limited and the areas of the country where studies of this type have been carried out are scarce. Therefore, the objective of this work was to molecularly identify the rickettsiae present in ticks (Acari, Ixodidae) associated with the Herpetofauna of Hacienda San Juan de Carare, Santander department. In addition, characterize the diversity of rickettsiae and compare it with that of the departments of Córdoba and Magdalena. Sequences of the genus Rickettsia were generated, and subsequently Bayesian inference (BI) and maximum likelihood (ML) phylogenetic analyzes were performed with the sequences generated in the study and other Rickettsia sequences downloaded from GenBank. Of all the samples sequenced in the present study, the presence of a Rickettsia species was identified, which corresponds to Candidatus Rickettsia colombianensi according to its grouping with the individuals available in GenBank as a result of the investigations carried out in Córdoba and Magdalena. Furthermore, all the collected ticks were identified as Amblyomma dissimile, being the first time it has been recorded parasitizing the snake Leptodeira septentrionalis. However, the prevalence of Rickettsia exhibited very high values, reason that supports the importance of continuing to carry out studies of this type in the country, which make it possible to have greater knowledge regarding the distribution and ecology of these microorganisms, which serves to consolidate clear policies according public health in rural and urban areas, on the subject in question.

Keywords: Vectors, *Rickettsia*, phylogenetic analysis, *Amblyomma*.

1. Introducción

En Colombia existen limitados estudios eco-epidemiológicos con respecto a garrapatas, comportándose como vectores (transmisores) de enfermedades y los realizados han sido focalizados en áreas donde han ocurrido brotes inusitados, generando de este modo que exista un vacío de información conforme al conocimiento de la diversidad de garrapatas en zonas del país que han sido inexploradas, debido a su silencio epidemiológico (Acevedo *et* al, 2020; Zamudio y Soler, 2020). Así mismo, existe desconocimiento acerca de la dinámica de transmisión dada en la extensión total del territorio colombiano, lo que imposibilita establecer políticas claras en lo concerniente a la salud pública. Por consiguiente, resulta pertinente conocer e identificar los factores eco-epidemiológicos relacionados con áreas de transmisión, riesgo y alerta, potenciales vectores, hospederos y su papel como reservorios, nivel de conocimiento de la población del área de salud y población civil sobre estas enfermedades, relación de casos con actividades humanas, condiciones socio-económicas y demás; propios de cada región del país (Susser, 2004). Además de la importancia de realizar una delimitación de las áreas endémicas de enfermedades enzoóticas (Azad y Beard, 1998), a partir de sus contextos territoriales, lo que permitirá definir políticas de gestión de recursos y acciones de vigilancia y control (Zamudio y Soler, 2020)

El número de reportes de patógenos asociados a especies silvestres ha aumentado en los últimos años, dado el incremento de estudios dirigidos hacia estas. Sin embargo, en Colombia aún son muy limitados, lo cual genera una complejidad en la ecología de las enfermedades asociadas con las variaciones en los ecosistemas. Dicho desconocimiento podría ocasionar serias implicaciones en la salud pública (Medina, 2010). Por lo tanto, la vigilancia epidemiológica necesita establecer lineamientos que prioricen la generación y divulgación de información con respecto a las enfermedades, además de estandarizar protocolos de respuesta y vigilancia, para consigo asegurar respuestas rápidas que promuevan la prevención de epidemias y brinden un manejo eficaz de la población infectada (Heras y Sierra, 2016).

El género *Rickettsia* ha sido agente causal de epidemias en distintas zonas del mundo, en las que grupos biológicos tales como ácaros, garrapatas, piojos y/o pulgas han sido los principales vectores (Vélez, Hidalgo y González, 2012). Una de las enfermedades que este grupo de bacterias transmite es la rickettsiosis, la cual a través de las garrapatas ha tomado un papel protagónico como enfermedad emergente y reemergente que ha producido una gran cantidad de afecciones a animales y humanos (Hidalgo, Faccini y Valbuena, 2013). Este género bacteriano se encuentra conformado por especies Gramnegativas, parásitos intracelulares obligados, motivo por el cual durante su ciclo de vida infectan diversos taxones, tales como anfibios, reptiles, aves, mamíferos, y artrópodos, comportándose estos últimos como vectores (Bernabeu y Segura, 2005). Adicionalmente, la transmisión de enfermedades por medio de vectores sucede mayoritariamente en los trópicos, área geográfica en la que existe una evidente carencia de servicios sanitarios, especialmente en zonas rurales o con altos niveles de pobreza, siendo puntos focales para la presencia de estos patógenos (Gubler, 2009). Particularmente en Colombia las rickettsiosis no se encuentran incluidas entre las manifestaciones clínicas que conforman las “enfermedades de declaración obligatoria” (Ortiz *et* al, 2015).

La presencia de *Rickettsia* ha sido reportada en reptiles y anfibios (Cabagna *et* al, 2014; Novakova *et* al, 2015). Estos organismos, durante los últimos años han sido estudiados desde una perspectiva epidemiológica, evaluando su posible rol en la epidemiología de diversas enfermedades zoonóticas (Aguillón *et* al, 2007). No obstante, en algunas circunstancias el asentamiento abrupto del ser humano en espacios rurales, posibilita que estos hagan parte del ciclo epidemiológico de enfermedades zoonóticas y altera las relaciones existentes entre vectores y reservorios de estas, causando la aparición de enfermedades emergentes y reemergentes, que provienen de la fauna silvestre o son propiciadas por su desaparición (Monsalve, Mattar y Gonzalez, 2009). Debido a que las garrapatas pertenecientes a la familia Ixodidae están relacionadas con la transmisión de *Rickettsia* y ante el evidente desconocimiento de la patogénesis de las especies del género, es decir, la epidemiología que comprende la interacción de estos microorganismos con taxones (Miranda, Mattar y Gonzalez, 2017), es imperativo su estudio y conocer su relación con los diferentes grupos vertebrados a los que parasitan.

Las rickettsiosis fueron descritas inicialmente en Colombia en 1937 por el Dr. Luis Patiño debido a un brote de una enfermedad con síntomas no específicos y fue nombrada como fiebre de Tobia (Patiño *et* al, 1989). En Colombia en los últimos años se han producido varios brotes de rickettsiosis de la fiebre manchada; los sucesos más destacados tuvieron lugar en los municipios de Necoclí y Turbo, en el departamento de Antioquia en los años 2006 y 2008, respectivamente, y un tercero en Córdobas en el año 2007, sector que es una localidad del departamento de Córdoba (Hidalgo, 2011). Así mismo, nuevos estudios realizados en la zona, han permitido corroborar la presencia de una alta prevalencia de anticuerpos para *Rickettsia* del grupo de las fiebres manchadas (GFM) en personas sanas y demuestran que el noreste del país es una zona endémica de al menos una especie de *Rickettsia* del GFM (Londoño *et* al, 2017).

En los departamentos de La Guajira, Magdalena y Córdoba, se han hallado rickettsias asociadas a garrapatas presentes en reptiles y anfibios, las cuales corresponden a una misma cepa de patogenicidad desconocida pero muy cercana a especies patógenas del viejo mundo como *R. monacencis* y *R. tamurae*, como lo demuestran los análisis filogenéticos correspondientes (Miranda *et* al, 2012; Cotes *et* al., 2018; Santodomingo *et* al, 2018, 2019). Estas especies junto con *R. slovaca*, *R. aeschlimannii* y *R. massiliae* fueron inicialmente consideradas no patógenas, pero en la actualidad se sabe que causan enfermedad en humanos (Parola, Davoust, y Raoult, 2005; Jado *et* al, 2007). Esto hace imperativo tener registro de la presencia de rickettsias, su extensión y sus relaciones evolutivas, en función de poder tomar medidas sanitarias apropiadas cuando sea necesario. Con base en lo anteriormente planteado, surge el problema de investigación del trabajo en cuestión, que consiste en identificar molecularmente las Rickettsias presentes en garrapatas (Acari, Ixodidae) asociadas a la Herpetofauna de la hacienda San Juan de Carare, departamento de Santander, además de caracterizar la diversidad de rickettsias y compararla con la de los departamentos de Córdoba y el Magdalena descrita previamente.

2. Materiales y Métodos

2.1 Área de estudio

Las garrapatas utilizadas en esta investigación, se recolectaron en el marco del proyecto "Evaluation of Zika virus potential to establish a sylvatic transmission cycle in Colombia", liderado por la profesora Camila González de la Universidad de los Andes, proyecto en el que se llevó a cabo la recolección de garrapatas de reptiles y anfibios, eventualmente donadas al grupo de Investigación en Evolución, Sistemática y Ecología Molecular de la Universidad del Magdalena. La zona geográfica en la que se realizó la recolección de dichas muestras tuvo lugar en la hacienda San Juan de Carare, municipio de Cimitarra, departamento de Santander, Colombia; ubicado en los rangos geográficos latitudinales de 6°42 '58.20''N y longitudinales de 74°08 '02.71''W (figura 1), zona que exhibe valores de temperatura máxima de 32,9°C y temperatura mínima de 23,4°C, además, presenta una altitud aproximada de 92 m.s.n.m (Alfonso, 2009).

La hacienda San Juan de Carare, consta de un terreno aproximado de 65 hectáreas, es un área privada dedicada a la ganadería, integrada por humedales y parches de bosque (de Luna, 2017). El río San Juan circunda el área en mención, por dicho motivo en períodos de precipitación (régimen bimodal de lluvias, el inicial comprendido entre marzo y mayo; el último comprendido entre octubre y noviembre, con un promedio anual de 3496 mm), la acumulación de agua en la zona derivada de los afluentes del río conlleva a períodos de inundación (Urbina, 2010). No obstante, según la clasificación de zonas de vida de Holdridge, el sistema ecológico definido como área de estudio, corresponde a un bosque húmedo tropical (bh-T) (Holdridge, 1967).

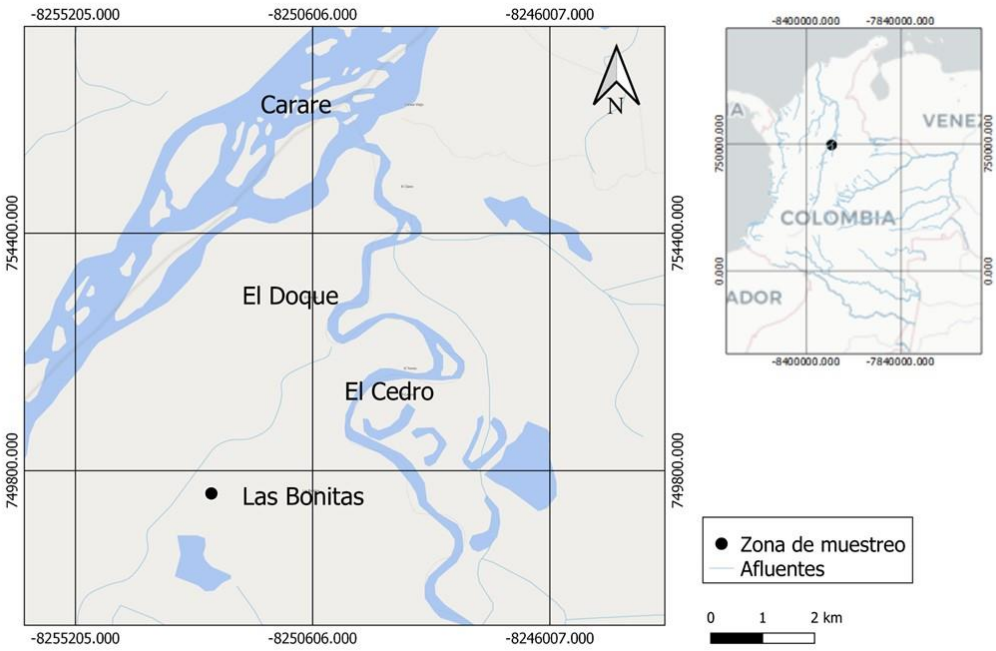

Figura 1. Ubicación geográfica del sitio de muestreo. Fuente: Autor.

2.2 Identificación taxonómica de garrapatas

Las garrapatas se identificaron a través del implemento de claves morfológicas, hasta el nivel de especie. Las claves de Osorno-Mesa (1940), se utilizaron para la identificación de larvas, Martins e*t* al (2010) para las ninfas y Jones *et* al (1972) para los individuos adultos. Las muestras se distinguieron y enumeraron a partir de la especie hospedera de la cual se colectaron los ectoparásitos, realizando una diferenciación conforme el código dispuesto en la muestra a partir de los hospederos (número de hospederos), basado en el estadio y sexo del individuo, además de exhibir la abundancia (individuos) por muestra colectada (Tabla 1).

Tabla 1. Muestras de garrapatas colectadas de la Herpetofauna (especies hospederas), de la Hacienda San Juan de Carare, Santander.

N° de individuos	Códigos de muestras	Estadios/Sexo	Especie hospedera	N° de individuos (ectoparásitos)
1	D3, E3, F3	Larva, ninfa y macho adulto	*Leptodeira septentrionalis*	21
2	D4, E4, F4, G4	Larva, ninfa, hembra adulta y macho adulto	*Iguana iguana*	62
3	E5	Ninfa	*Corallus ruschenbergerii*	1
4	F6	Macho	*Corallus ruschenbergerii*	2
5	F7	Macho	*Boa constrictor*	1
6	D9, E9, F9	Larva, ninfa y macho adulto	*Iguana iguana*	41
7	D10, E10, F10, G10	Larva, ninfa, hembra adulta y macho adulto	*Iguana iguana*	106
8	D11, E11, F11	Larva, ninfa y macho adulto	*Iguana iguana*	11
9	G12	Adulto hembra	*Rhinella horribilis*	2

2.3 Extracción de ADN

El ADN se extrajo siguiendo las indicaciones del fabricante del kit “ISOLATE II Genomic DNA” (BIOLINE, USA). En las garrapatas adultas se utilizó la mitad del espécimen para la extracción del ADN, mientras que en larvas y ninfas se utilizó el individuo completo. Eventualmente la extracción del ADN y su calidad se confirmaron a través de la realización de electroforesis en gel de agarosa al 2% y con tinción “GelRed” (Biotium).

Tabla 2. Secuencias y especificaciones de los primers del género *Rickettsia* implementados en la detección molecular de los patógenos.

Gen amplificado	Tamaño del amplicón (pb)	Nombre del primer	Secuencia del primer (5'- 3')	Temperatura de anillamiento	Referencia
gltA	401	CS-78/CS-323	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAATGCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT	48°C	Labruna *et* al, 2004
ompA	532	Rr190.70p/ Rr190.602n	ATGGCGAATATTTCTCCAAAAAGTGCAGCATTCGCTCCCCCT	54°C	Regnery, Spruill y Plikaytis, 1991
Sca1	488	SCA1-F2/SCA1-R2	GGTGATGAAGAAGAGTCTCCTCTTTAAAATTATGTTCTAC	50°C	Anstead y Chilton, 2013

2.4 Amplificación de gltA/ompA/ SCA1

La amplificación se realizó mediante PCR convencional en un termociclador "Eppendorf Mastercycler Pro", utilizando las secuencias y especificaciones planteadas en la Tabla 2. En el desarrollo de la PCR, el volumen de reacción final por muestra procesada (sin distinción de gen) correspondió a 25 µL, que contenía 1 µL de MgCl (50mM), 2.5 µL de buffer (10X, tampón de PCR), 1 µL de dNTPs (10 mM), 1 µL de cada primer (10 pmol, forward y reverse), 15 µL de agua, 0.5 µL de Taq polimerasa (5 U/µL, BIOLASE TM, Bioline) y 3 µL del ADN extraído. Las condiciones referentes a la amplificación de los genes gltA, ompA y SCA1 (Tabla 3) se realizaron con base en las condiciones estandarizadas por el grupo de investigación en Evolución, Sistemática y Ecología Molecular.

Tabla 3. Condiciones de temperatura y tiempo en el termociclador para la realización de la PCR de los genes gltA, ompA y SCA1.

Condiciones PCR			
Pasos	**Temperatura**	**Tiempo**	**Ciclos**
Desnaturalización inicial	95°C	3 minutos	1
Desnaturalización	95°C	15 segundos	40
Alineamiento	48°C (gltA), 54°C (ompA), 46°C (SCA1)	30 segundos	
Extensión	72°C	2 minutos	
Extensión final	72°C	7 minutos	1

2.5 Purificación y secuenciación

Los productos de amplificación positivos, se purificaron siguiendo las indicaciones del kit "E.Z.N.A Cycle Pure Kit" (Omega Bio-tek), siendo eventualmente enviados al servicio de Secuenciación y análisis Molecular (SSIGmol) de la Universidad Nacional de Colombia, para la secuenciación en ambas direcciones.

2.6 Edición y alineamiento de las secuencias

La verificación de las secuencias se llevó a cabo con base en el uso de la herramienta BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) posteriormente editadas con el software ProSeq V3 (Filatov, 2009). Eventualmente, se utilizó el programa MEGA 7.0 (Kumar *et* al, 2016) e implementó el uso del algoritmo ClustalW (Thompson, Higgins, y Gibson, 1994), para el alineamiento de las secuencias obtenidas en el presente estudio y otras disponibles en GenBank. Lo anterior teniendo en cuenta la similitud de las secuencias con otras obtenidas en las investigaciones realizadas en los departamentos de Córdoba y Magdalena (Miranda *et* al, 2012; Cotes *et* al, 2018; Santodomingo *et* al, 2018).

2.7 Análisis filogenéticos

La reconstrucción filogenética por inferencia Bayesiana y máxima verosimilitud se desarrolló a partir del uso de los programas MrBayes 3.2.2 (Ronquist *et* al, 2012) y RAxML

8.0.24 (Stamatakis, 2006) respectivamente. Los mejores esquemas de partición y los modelos de sustitución más adecuados para los diferentes conjuntos de datos se eligieron a partir del implemento del programa Partition Finder (Lanfear *et* al, 2012), según el Criterio Bayesiano de Información (Schwarz, 1978). El modelo GTR + G se utilizó para la posición 2 del codón correspondiente al gen gltA, para las posiciones de codón 1, 2 y 3 del gen ompA y para las posiciones de codón 1 y 2 del gen SCA1, mientras que, el modelo GTR + I + G se implementó en la posición de codón 1 y 3 de gltA, además, de la posición de codón 3 de SCA1.

Los análisis de inferencia Bayesiana se ejecutaron a partir de una corrida independiente de 10.000.000 generaciones, muestreando los árboles cada 100 generaciones, descartando el 25% de los árboles. Se implementó la desviación estándar de las secuencias independientes (<0.01) para la validar lo correspondiente a la convergencia, siendo agrupados los valores de probabilidad a través del tiempo, además de emplear el uso del comando sumP en MrBayes. El porcentaje de árboles que recuperó un clado en específico, correspondió a la medida de probabilidad posterior con base en la medición de cada clado (Huelsenbeck y Ronquist, 2001).

Los análisis de máxima verosimilitud se llevaron a cabo por medio del uso del algoritmo de escala rápida con pseudoréplicas de 1000 Bootstrap, tomando como base que los valores de Bootstrap superiores al 70% (>70%) indican un considerable soporte estadístico (Hillis y Bull, 1993).

3. Resultados

3.1 Identificación taxonómica de las garrapatas

En la revisión taxonómica de las garrapatas del presente estudio, se determinó que en los diferentes estadios (larva, ninfa y adulto), *Amblyomma dissimile* (Figura 2 y 3) es el único ectoparásito presente en la totalidad de muestras colectadas (Tabla 1).

Figura 2. Vista dorsal de garrapata macho, *Amblyomma dissimile*. 1. Base del capítulo, 2. Coxa 1, 3. Coxa 2, 4. Coxa 3, 5. Coxa 4, 6. Festones, 7. Hipostoma, 8. Ojos, 9. Palpo, 10. Scutum. Fuente: Autor.

Figura 3. Vista ventral de garrapata macho, *Amblyomma dissimile*. 1. Base del capítulo, 2. Coxa 1, 3. Coxa 2, 4. Coxa 3, 5. Coxa 4, 6. Espolón, 7. Festones, 8. Garra, 9. Hipostoma, 10. Palpo, 11. Poro anal, 12. Poro genital. Fuente: Autor.

3.2 Identificación molecular y reconstrucción filogenética de rickettsias detectadas en garrapatas

Las garrapatas utilizadas (244 individuos, divididos en 39 adultos, 11 ninfas y 197 larvas) para la detección molecular de rickettsias, correspondieron a un total de 9 hospederos, de los cuales se identificaron cinco especies (Tabla 1). Así mismo, los fragmentos amplificados por gen, son de 1 para gltA, 7 para ompA y 8 para SCA1 (haciendo alusión a que el restante de genotipificaciones se encontrará consignado en el artículo que será publicado eventualmente a partir del presente manuscrito). No obstante, la secuencia de gltA exhibió un 99.58% de similitud con *Rickettsia* sp. Además, las secuencias de ompA evidenciaron un 100% de similitud con Candidatus *Rickettsia colombianensi* (a excepción del organismo con código E3, que exhibió un 99.72% de identidad). Las secuencias de SCA1 exhibieron un 100% de identidad (excepto el organismo D11 que presentó un 99.62% de identidad) con los organismos nombrados en GenBank como Uncultured *Rickettsia* sp. Los cuáles se definen como Candidatus *Rickettsia colombianensi* (Tabla 5) a partir del porcentaje de identidad de las muestras secuenciadas en el presente estudio con respecto a las últimas en mención; estando dichas secuencias disponibles en GenBank (Tabla 4). Además, la reconstrucción filogenética de las secuencias obtenidas en el presente estudio, se complementó con secuencias de rickettsias descargadas de genBank (Tabla 5).

Las garrapatas analizadas en esta investigación fueron un total de 72 (Tabla 6), de los cuales 49 individuos (29/43 larvas, 6/9 ninfas, 5/7 adultos hembra y 9/13 adultos macho) resultaron positivos para *Rickettsia* (lo que equivale a un 68%), haciendo alusión a que el mayor número de individuos corresponden a larvas, razón por la cual estas se procesaron en pooles y debido al escaso número de muestras en ninfas y adultos, estos se procesaron individualmente (Tabla 6). No obstante, los análisis de inferencia bayesiana y máxima verosimilitud agruparon 11/11 de las muestras secuenciadas en el presente estudio con Candidatus *Rickettsia colombianensi*, *Rickettsia* sp strain c*olombianensi* y *Rickettsia* endosymbiont *Amblyomma dissimile* (Figura 4), el clado formado entre estos organismos tiene un soporte filogenético de 0,69 (probabilidades posteriores). Haciendo alusión a que los organismos plasmados como Candidatus *Rickettsia colombianensi* (3, 4 y 5), en GenBank se encuentran disponibles con el nombre de Uncultured *Rickettsia* (Tabla 5), siendo estos, endosimbiontes de *Amblyomma* sp. Además, el organismo al que se le

otorgó el nombre de uncultured *Rickettsia* sp. (Tabla 5) se agrupó en otro clado, como organismo hermano de *Rickettsia bellii*.

Tabla 4. Datos de rickettsias secuenciadas e identificación a través de la herramienta BLAST.

Código garrapata	Gen	Especie identificada	Código de acceso, GenBank	Identidad
F10	gltA	*Rickettsia* sp.	MH158234	99.58%
F10	ompA	Candidatus *Rickettsia colombianensi*	MN058024	100%
F10	SCA1	Uncultured *Rickettsia* sp.	MG020421	100%
D3	ompA	Candidatus *Rickettsia colombianensi*	MN058024	100%
D9	ompA	Candidatus *Rickettsia colombianensi*	MN058024	100%
D11	SCA1	Uncultured *Rickettsia* sp.	MG020421	99.62%
E3	ompA	Candidatus *Rickettsia colombianensi*	MN058024	99.72%
E4	ompA	Candidatus *Rickettsia colombianensi*	MN058024	100%
E4	SCA1	Uncultured *Rickettsia* sp.	MG020421	100%
F3	ompA	Candidatus *Rickettsia colombianensi*	MN058024	100%
F3	SCA1	Uncultured *Rickettsia* sp.	MG020421	100%
F7	SCA1	Uncultured *Rickettsia* sp.	MG020421	100%
F9	SCA1	Uncultured *Rickettsia* sp.	MG020421	100%
F11	ompA	Candidatus *Rickettsia colombianensi*	MN058024	100%
F11	SCA1	Uncultured *Rickettsia* sp.	MG020421	100%
G4	SCA1	Uncultured *Rickettsia* sp.	MG020421	100%

Tabla 5. Secuencias de rickettsias descargadas de GenBank, incluyendo la de los departamentos de Córdoba y Magdalena.

Especies	Genes	Número de acceso en GenBank	Localidad de origen
Candidatus *Rickettsia* colombianensi 1	ompA	MN058024	Brasil
Candidatus *Rickettsia* colombianensi 2	ompA	MH521293	México
Candidatus *Rickettsia colombinanensi* 3 (Uncultured *Rickettsia)*	SCA1	MG020421	Colombia: Magdalena
Candidatus *Rickettsia colombinanensi* 4 (Uncultured *Rickettsia)*	gltA	KY996383	Colombia: Magdalena
Candidatus *Rickettsia colombinanensi* 5 (Uncultured *Rickettsia)*	SCA1	MG020416	Colombia: Magdalena
Orientia tsutsugamushi	gltA/ompA/SCA1	AP008981	
Rickettsia aeschlimannii	gltA/ompA/SCA1	DQ235776/KX063617/DQ306900	Rusia[1]/Etiopía[2]
Rickettsia africae	gltA/ompA/SCA1	MG515012/MT009355/DQ306901	Brasil[1]/Sudáfrica[2]
Rickettsia australis	gltA/SCA1	U59718/DQ306903	
Rickettsia bellii	gltA/SCA1	U59716/DQ306904	
Rickettsia conorii	gltA/ompA/SCA1	AE006914/EU716649/DQ306906	
Rickettsia endosymbiont *Amblyomma dissimile* 1	gltA/ompA	MH196484/MH196499	Colombia: Magdalena[1,2]
Rickettsia endosymbiont *Amblyomma dissimile* 2	gltA/ompA	MH196496/MH196500	Colombia: Magdalena[1,2]
Rickettsia endosymbiont *Amblyomma dissimile* 3	ompA	MH196501	Colombia: Magdalena
Rickettsia endosymbiont *Amblyomma dubitatum*	gltA/ompA	JN676158/JN676159	Brasil[1,2]
Rickettsia felis	gltA/SCA1	JQ674484/DQ306907	
Rickettsia heilongjiangensis	gltA/ompA	AY285776/DQ494553	Rusia[1]/China[2]
Rickettsia honei	gltA/ompA/SCA1	AF018074/AF018075/DQ306909	
Rickettsia massiliae	gltA/ompA/SCA1	MK294042/U43799/DQ306911	China[1]
Rickettsia monacensis	gltA/ompA/SCA1	LN794217/MK608661/LN794217	
Rickettsia mongolotimonae	gltA/ompA	DQ097081/DQ423367	
Rickettsia parkeri	gltA/ompA/SCA1	KY113109/U43802/DQ306913	Brasil[1]
Rickettsia prowazekii	gltA/SCA1	U59715/DQ306914	
Rickettsia raoultii	gltA/ompA/SCA1	MT185671/JX885458/KR608788	China[1,2,3]
Rickettsia rickettsii	gltA/ompA/SCA1	MT958041/DQ150693/DQ306916	Brasil[1]
Rickettsia sibirica	gltA/ompA/SCA1	HM050279/JF700255/DQ306918	Senegal[1]/Israel[2]
Rickettsia slovaca	gltA/ompA/SCA1	U59725/EU622810/DQ306917	
Rickettsia sp	gltA	MH158234	Brasil
Rickettsia sp strain *colombianensi*	gltA/ompA	JF905456/JF905458	Colombia: Córdoba
Rickettsia tamurae	gltA/ompA	AB812551/AB812552	Japón[1,2]
Rickettsia typhi	gltA/SCA1	U59714/DQ306919	
Uncultured *Rickettsia* sp.	gltA	KY996396	Colombia: Magdalena
D3	**ompA**	**Anexos**	**Colombia: Santander**
D9	**ompA**	**Anexos**	**Colombia: Santander**
D11	**SCA1**	**Anexos**	**Colombia: Santander**
E3	**ompA**	**Anexos**	**Colombia: Santander**
E4	**ompA/SCA1**	**Anexos**	**Colombia: Santander[1,2]**
F3	**ompA/SCA1**	**Anexos**	**Colombia: Santander[1,2]**
F7	**SCA1**	**Anexos**	**Colombia: Santander**
F9	**SCA1**	**Anexos**	**Colombia: Santander**
F10	**gltA/ompA/SCA1**	**Anexos**	**Colombia: Santander[1,2,3]**
F11	**ompA/SCA1**	**Anexos**	**Colombia: Santander[1,2]**
G4	**SCA1**	**Anexos**	**Colombia: Santander**

Las secuencias de Córdoba y magdalena se encuentran en rojo y las generadas en este estudio en negrita, además de otras incluidas en los análisis filogenéticos (Figura 4).

Tabla 6. Patógenos presentes en garrapatas obtenidas de la herpetofauna de la Hacienda San Juan de Carare.

Especie hospedera	Código de muestra	Larva	Ninfa	Adulto hembra	Adulto macho
Leptoderia septentrionalis	**D3**	**11/12 (92%)**			
Leptoderia septentrionalis	**E3**		**2/2 (100%)**		
Leptoderia septentrionalis	**F3**				**1/1 (100%)**
Iguana iguana	D4	1/4 (25%)			
Iguana iguana	**E4**		1/1 (100%)		
Iguana iguana	F4				1/4 (33%)
Iguana iguana	**G4**			**3/3 (100%)**	
Corallus ruschenbergerii	E5		0/1 (0%)		
Corallus ruschenbergerii	F6				1/2 (50%)
Boa constrictor	**F7**				**1/1 (100%)**
Iguana iguana	**D9**	**9/15 (60%)**			
Iguana iguana	E9		1/1 (100%)		
Iguana iguana	**F9**				**2/2 (100%)**
Iguana iguana	D10	2/4 (50%)			
Iguana iguana	E10		1/2 (50%)		
Iguana iguana	**F10**				**2/2 (100%)**
Iguana iguana	G10			1/2 (50%)	
Iguana iguana	**D11**	**6/8 (75%)**			
Iguana iguana	E11		1/2 (50%)		
Iguana iguana	**F11**				**1/1 (100%)**
Rhinella horribilis	G12			1/2 (50%)	

Los códigos de muestra y estadios correspondientes en negrilla, hacen alusión a las muestras secuenciadas. El valor porcentual indica la positividad de *Rickettsia* en las muestras procesadas.

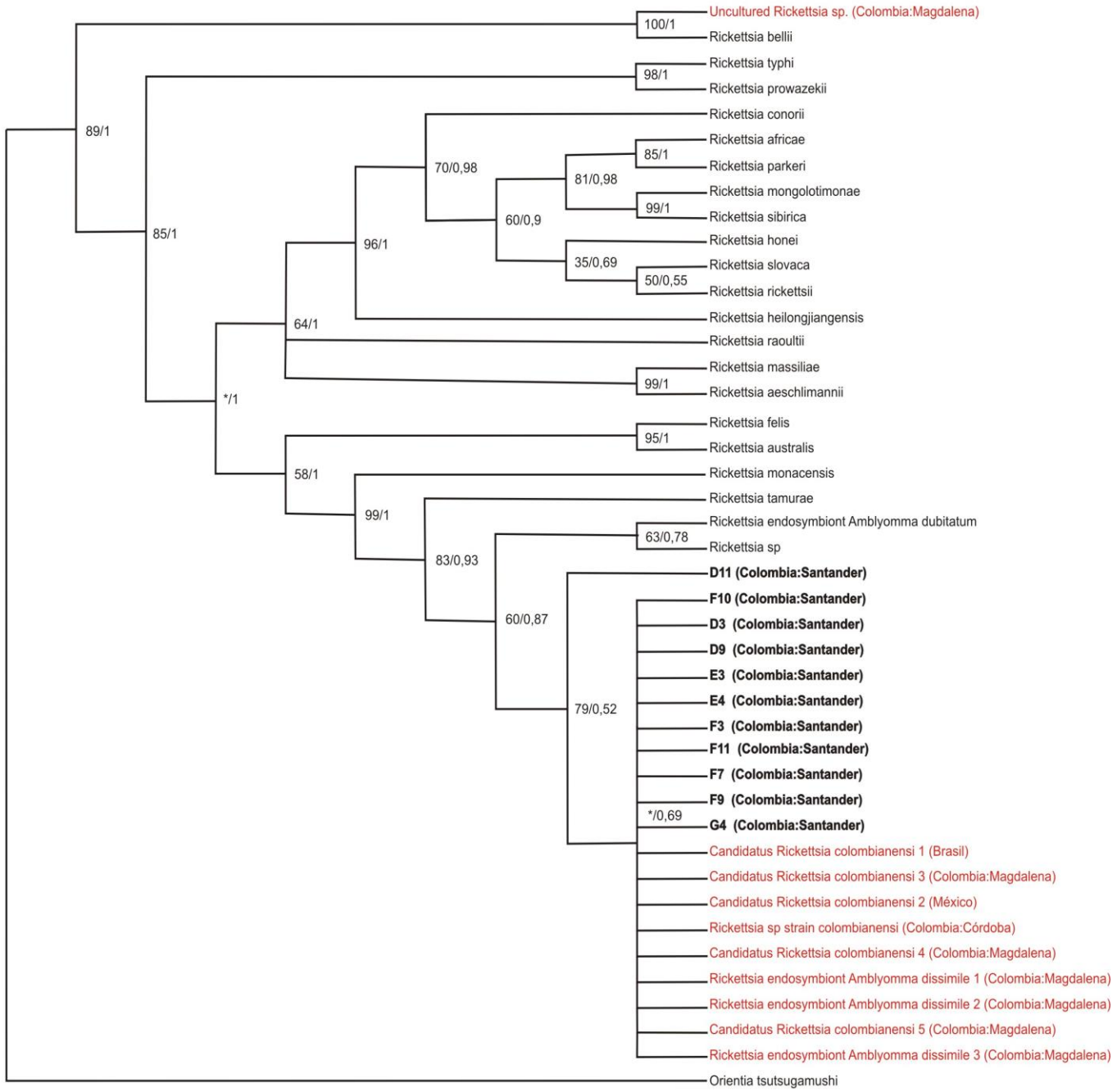

Figura 4. Topología de arbol filogenético por Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana de secuencias concatenadas de los genes gltA, ompA y SCA1.

4. Discusión

Este es el primer estudio relacionado con la Detección Molecular de *Rickettsia* en garrapatas asociadas a herpetofauna en esta zona de Colombia, los otros registros corresponden a los departamentos del Cesar, La Guajira, Magdalena y Córdoba (Miranda *et* al, 2012; Cotes *et* al., 2018; Santodomingo *et* al, 2018, 2019). Sin embargo, en el departamento del Cesar no se registró ninguna especie positiva para *Rickettsia* (Santodomingo *et* al, 2018). No obstante, el ectoparásito encontrado en las muestras recolectadas en el presente estudio, correspondió exclusivamente a *Amblyomma dissimile*, especie que se identificó como hospedera de *Boa constrictor*, *Corallus ruschenbergerii*, *Iguana iguana*, *Leptodeira septentrionalis* (no se encontró información en la bibliografía que registre la presencia de *A*. *dissimile* como ectoparásito de *Leptodeira septentrionalis)* y *Rhinella horribilis*, especies las cuales en otros estudios, a excepción de *L*. *septentrionalis* también fueron identificados como hospederos de *A*. *dissimile* (Álvarez, Hernández y Hernández, 2005; Santodomingo *et* al, 2018; Robayo, Ríos y Soler, 2020).

La especie *A*. *dissimile*, es habitual en distintos escenarios con variables ambientales que difieren entre sí, aunque el clima cálido incide en su abundancia, siendo este un organismo del que se tienen numerosos registros de parasitismo en anfibios y reptiles, estableciéndose debido a sus condiciones y requerimientos fisiológicos como un organismo común en Colombia, que además es vector de Candidatus *Rickettsia colombianensi* (López, 2017). Lo anteriormente mencionado presenta concordancia con el clado formado entre las muestras secuenciadas en el presente estudio con respecto a las muestras de los departamentos de Córdoba y el Magdalena, que se identificaron como Candidatus *Rickettsia colombianensi*, dado que las diferencias ambientales entre estas áreas geográficas no es limitante para la distribución de la garrapata en mención y esta al ser hospedera del microorganismo Candidatus *Rickettsia colombianensi*, es causal de la cercana relación filogenética entre las secuencias originarias de estos tres departamentos (Miranda *et* al, 2012; Cotes *et* al., 2018; Santodomingo *et* al, 2018). Además, el organismo denominado “Uncultured *Rickettsia* sp.” (tabla 5), presente en el estudio de Cotes e*t* al

(2018), se agrupó como especie hermana de *Rickettsia bellii*, lo cual presenta relación con lo obtenido en esta investigación (Figura 4).

Los valores de Bootstrap en el clado formado por las secuencias generadas en este estudio, presentan un soporte del 69%. Según, Hillis y Bull (1993), corresponde a la probabilidad de que el clado formado, sea real, aunque, la exactitud (término que hace referencia a las probabilidades respecto a que un grupo contenga una filogenia real) en los análisis filogenéticos con muestras que incluyen una mayor cantidad de genes respecto a otras muestras, puede conllevar a la disminución del soporte filogenético. Así mismo, los números en los nodos corresponden a los valores de Bootstrap/probabilidades posteriores, mientras que los * hacen referencia a los clados que se agruparon de manera diferente en el árbol filogenético por Máxima Verosimilitud con respecto al de Inferencia Bayesiana (Figura 4).

El grupo externo seleccionado para el análisis filogenético correspondió a *Orientia tsutsugamushi*, debido a que originalmente era considerado una especie perteneciente al género *Rickettsia*, sin embargo, los diversos análisis moleculares conllevaron a la reclasificación de la especie y al nombramiento de un nuevo género en la familia Rickettsiaceae, denominado *Orientia*, siendo este un grupo filogenéticamente cercano a *Rickettsia* y útil debido a dicha cercanía, conforme el desarrollo del análisis filogenético propuesto en este estudio (Tamura *et* al, 1995).

La especie *A. dissimile*, se ha registrado en estudios desarrollados en el país como organismo parásito de anfibios y reptiles (Acevedo e*t* al, 2020). Teniendo en cuenta, que es común la interacción biológica entre bacterias y garrapatas, dicha simbiosis puede repercutir en el estado de salud de organismos que son parasitados por estos artrópodos (Barandika, 2010). Haciendo alusión, a que las rickettsias en hospederos artrópodos establecen una interacción biológica de comensalismo en la mayoría de los casos y a pesar del breve período de la presencia de las bacterias en el torrente sanguíneo, estas alcanzan a completar su ciclo de vida en el artrópodo (Santamaría e*t* al, 2018). No obstante, en los casos en los que las rickettsias hospedan vertebrados, la interacción biológica que establecen es de parasitismo, debido a que, estos microorganismos irrumpen en los vasos sanguíneos, afectando las células endoteliales y produciendo edemas e incremento en la permeabilidad vascular del vertebrado (Venzal y Nava, 2011). Por otra parte, Oteo e*t* al

(2014), propone que cualquier nueva especie de *Rickettsia* descrita en garrapatas, pese al desconocimiento referente a su ecología, debe considerarse un potencial patógeno para los humanos. Por consiguiente, Candidatus *Rickettsia colombianensi*, descrita por Miranda *et* al (2012) debe considerarse un grupo de relevancia en el área de la salud, motivo por el que, seguir ampliando las zonas de estudio referentes a la ecología y distribución de este organismo, es fundamental conforme la obtención de información teórico-científica, que posibilite el establecimiento de políticas definidas acerca de esta temática respecto al ámbito de la salud pública en el país.

La investigación desarrollada por Quintero *et* al (2017), hace mención a la detección de Candidatus *R*. c*olombianensi* en garrapatas que son potenciales ectoparásitos en humanos. Además, a partir de las relaciones filogenéticas obtenidas en la presente investigación (Figura 4) se comprobó la cercanía entre la diversidad de rickettsias de los departamentos de Córdoba y Magdalena (Miranda *et* al, 2012; Cotes *et* al, 2018; Santodomingo *et* al, 2018) con las de este estudio (Santander), lo que demuestra la importante área de distribución de la especie Candidatus *Rickettsia colombianensi* en el país. Teniendo en cuenta, que en el ciclo de vida de *A*. *dissimile* (vector de candidatus *Rickettsia colombianensi*), este organismo tiene la capacidad de parasitar un número importante de grupos biológicos aparte de herpetos, tales como aves y mamíferos (incluyendo humanos), lo que le otorga mayores posibilidades de supervivencia y distribución en nuevos medios naturales (Guglielmone y Nava, 2010), además de haber sido identificada fuera del país, en Brasil, México y Honduras (Sánchez *et* al, 2019).

En el árbol filogenético (Figura 4), se evidencia la cercanía entre las especies *Rickettsia monacensis* y *Rickettsia tamurae* con Candidatus *Rickettsia colombianensi*, lo cual coincide con los hallazgos realizados por Miranda *et* al (2012). Por lo tanto, se plantea que Candidatus *R*. *colombianensi*, pertenece al mismo linaje de *R*. *monacensis* y *R*. *tamurae*.

El clado intermedio entre *R*. *monacensis*, *R*. *tamurae*, y el clado definido como especies de Candidatus *R*. *colombianensi* en el árbol filogenético de este estudio, presenta concordancia con la investigación de Miranda e*t* al (2019), quienes realizaron la primera secuencia del genoma completo de la especie Candidatus *R*. *colombianensi*, obteniendo en dicha investigación, porcentajes de similitud importantes, entre el organismo en

mención, *R*. *monacensis* y *R*. *tamurae*, lo que se interpreta como cercanía filogenética entre estas especies.

En la investigación desarrollada por Sumrandee *et* al (2014), *R*. *monacensis*, *R*. *tamurae* y *Rickettsia* endosimbionte de *Amblyomma dubitatum*, se encuentran cercanamente relacionadas entre sí. No obstante, en el presente estudio la especie denominada en la Tabla 5 como *Rickettsia* sp. (nombrada de este modo en GenBank), es un endosimbionte de *Amblyomma sculptum* y se agrupó en un mismo clado con *Rickettsia* endosimbionte de *Amblyomma dubitatum*, formando estos un clado intermedio entre *R*. *monacensis*, *R*. *tamurae* y el clado definido como especies de Candidatus *R*. *colombianensi* (Figura 4), lo que podría sugerir que existen relaciones filogenéticas cercanas entre las especies de *Rickettsia* endosimbiontes de *Amblyomma* y que *R*. *monacensis* y *R*. *tamurae*, al presentar porcentajes de similitud cercanos con Candidatus *R*. *colombianensi* comprenden por esa razón un clado próximo a estos organismos.

5. Conclusión

Las garrapatas recolectadas en la Hacienda San Juan de Carare en el departamento de Santander, corresponden en su totalidad a la especie *Amblyomma dissimile*. Así mismo, la detección molecular de *Rickettsia* desarrollada a partir de los individuos de *A*. *dissimile*, tuvo como resultado la identificación de Candidatus *Rickettsia colombianensi* en todas las muestras secuenciadas.

La comparativa entre la diversidad de rickettsias de los departamentos de Córdoba, el Magdalena y el producto de este estudio (Santander), sustenta la cercanía entre las rickettsias de los departamentos en mención y sirve como argumento, para sugerir que podría encontrarse presente en más departamentos del país. Sin embargo, será necesario desarrollar investigaciones para corroborar lo sugerido, dado que la información disponible permite establecer una idea parcial a partir de esto.

Los hallazgos obtenidos representan un tema de relevancia en el área de la salud pública, motivo por el que con el conocimiento previo y el adquirido a partir del presente estudio,

resulta pertinente desarrollar políticas y estrategias de manejo en zonas urbanas y rurales del país, en función de esto.

En este estudio se registra por primera vez A. *dissimile* como ectoparásito de *Leptodeira septentrionalis*. Sin embargo, esto se debe a la falta de investigación en el país respecto la ecología de garrapatas en fauna silvestre o temas que en general involucren a dicho grupo biológico. A pesar de que en los últimos años ha aumentado la investigación relacionada con estos organismos en el país, es fundamental seguir fortaleciendo la parasitología como línea de investigación, siendo un valor agregado el uso de herramientas moleculares, puesto que posibilita la detección de agentes patógenos, generando conocimiento en pro de la sociedad en un campo con vacíos de investigación considerables.

6. Referencias Bibliográficas

Acevedo, L., Paternina, L., Pérez, J., Londoño, A., López, G., y Rodas, J. (2020). Garrapatas duras (Acari: Ixodidae) de Colombia, una revisión a su conocimiento en el país. *Acta Biológica Colombiana*, *25(1)*, 126-139.

Aguillón, D., Lazcano, D., Ramírez, R., Aguirre, A., Zárate, J., y Wong, A. (2007). Bacterias cloacales y evaluación física de la herpetofauna del Parque Ecológico Chipinque. *Ciencia UANL*, *10(2)*, 168-174.

Alfonso, F. (2009). Densidad poblacional y ecología de *Ateles hybridus* (I. Geoffroyi-St. Hilaire, 1829) en un fragmento de bosque húmedo tropical en la Hacienda San Juan de Carare, Municipio de Cimitarra, Departamento de Santander, Colombia (tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Alvarez, V., Hernández, V., y Hernández, J. (2005). Catálogo de garrapatas suaves (Acari: Argasidae) y duras (Acari: Ixodidae) de Costa Rica. *Brenesia*, *63(64)*, 81-88.

Anstead, C., y Chilton, N. (2013). A novel *Rickettsia* species detected in vole ticks (Ixodes angustus) from Western Canada. *Applied and environmental microbiology*, *79(24)*, 7583-7589.

Azad, A., y Beard, C. (1998). Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. *Emerging infectious diseases*, *4(2)*, 179.

Barandika, J. (2010). Las garrapatas exófilas como vectores de agentes zoonóticos: estudio sobre la abundancia y actividad de las garrapatas en la vegetación, e investigación de la presencia de agentes patógenos en garrapatas y micromamíferos (tesis de doctorado). Universidad de León, León, España.

Bernabeu, M., y Segura, F. (2005). Enfermedades producidas por *Rickettsia*. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica*, *23(3)*, 163-172.

Cabagna, M., Lajmanovich, R., Attademo, A., Peltzer, P., Junges, C., Fiorenza, G., y Basso, A. (2014). Generalidades sobre la Hematología de anfibios anuros. *Museo Provincial de Ciencias Naturales" Florentino Ameghino"*, *18(1)*, 1-18.

Cotes, A., Santodomingo, A., y Castro, L. (2018). Hemogregarine and Rickettsial infection in ticks of toads from northeastern Colombia. International Journal for Parasitology: *Parasites and Wildlife*, *7(2)*, 237-242.

de Luna, A., Link, A., Montes, A., Alfonso, F., Mendieta, L., y Di Fiore, A. (2017). Increased folivory in brown spider monkeys Ateles hybridus living in a fragmented forest in Colombia. *Endangered Species Research*, *32*, 123-134.

Filatov, D. (2009). Processing and population genetic analysis of multigenic datasets with ProSeq3 software. *Bioinformatics*, *25(23)*, 3189–3190.

Gubler, D. (2009). Vector-borne diseases. *Revue scientifique et technique*, *28(2)*, 583-588.

Guglielmone, A., y Nava, S. (2010). Hosts of *Amblyomma dissimile* Koch, 1844 and *Amblyomma rotundatum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Zootaxa*, *2541(1)*, 27-49.

Heras, C., y Sierra, M. (2016). Enfermedades transmitidas por vectores: un nuevo reto para los sistemas de vigilancia y la salud pública. *Gaceta Sanitaria*, *30(3)*, 167-169.

Hidalgo, M. (2011). Panorama de las enfermedades ocasionadas por rickettsias en Colombia. *Biomédica*, *31*, 12-14.

Hidalgo, M., Faccini, Á., y Valbuena, G. (2013). Rickettsiosis transmitidas por garrapatas en las Américas: avances clínicos y epidemiológicos, y retos en el diagnóstico. *Biomédica*, *33(1)*, 161-178.

Hillis, D., y Bull, J. (1993). An empirical test of bootstrapping as a method for assessing confidence in phylogenetic analysis. *Systematic biology*, *42(2)*, 182-192.

Holdridge, L. (1967). Life zone ecology. *Tropical Science Center*, San José, Costa Rica.

Huelsenbeck, J., y Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, *17(8)*, 754–755.

Jado, I., Oteo J., Aldámiz, M., Gil, H., Escudero, R., Ibarra, V., Portu, J., Portillo, A., Lezaun, M., García, C., Rodríguez, I., y Anda, P. (2007). *Rickettsia monacensis* and human disease, Spain. *Emerging Infectious Diseases*, *13(9)*, 1405- 1407.

Jones, E., Clifford, C., Keirans, J., y Kohls, G. (1972). Ticks of Venezuela (Acarina: Ixodoidea) with a key to the species of *Amblyomma* in the Western Hemisphere. *Brigham Young University Science Bulletin*, *Biological Series*, *17(4)*, 1-40.

Kumar, S., Stecher, G., y Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, *33(7)*, 1870–1874.

Labruna, M., Whitworth, T., Horta, M., Bouyer, D., McBride, J., Pinter, A., Popov, V., Gennari, S., y Walker, D. (2004). *Rickettsia* species infecting Amblyomma cooperi ticks from an area in the state of Sao Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *Journal of clinical microbiology*, *42(1)*, 90-98.

Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S., y Guindon, S. (2012). PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular biology and evolution*, *29(6)*, 1695-1701.

Londoño, A., Acevedo, L., Marín, D., Contreras, V., Díaz, F., Valbuena, G., Labruna, M., Hidalgo, M., Arboleda, M., Mattar, S., Solari, S., y Rodas, J. (2017). Human prevalence of the spotted fever group (SFG) rickettsiae in endemic zones of Northwestern Colombia. *Ticks and tick-borne diseases*, *8(4)*, 477-482.

López, G. (2017). Garrapatas (Acari: Ixodidae y Argasidae) de importancia médica y veterinaria procedentes de Norte, Centro y Suramérica. *Universidad de Antioquia*, 1-110.

Martins, T., Onofrio, V., Barros, D., y Labruna, M. (2010). Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescriptions, and identification key. *Ticks and Tick-borne Diseases*, *1(2)*, 75-99.

Medina, G. (2010). Ecología de enfermedades infecciosas emergentes y conservación de especies silvestres. *Archivos de medicina veterinaria*, *42(1)*, 11-24.

Miranda, J., Portillo, A., Oteo, J., y Mattar, S. (2012). *Rickettsia* sp. Strain Colombianensi (Rickettsiales: Rickettsiaceae): A New Proposed Rickettsia Detected in *Amblyomma dissimile* (Acari: Ixodidae) from Iguanas and Free-Living Larvae Ticks from Vegetation. *Journal of Medical Entomology*, *49(4)*, 960-965.

Miranda, J., Mattar, S., y Gonzalez, M. (2017). Rickettsiosis. *Revista MVZ Córdoba*, *22*, 6118-6133.

Miranda, J., Mattar, S., Puerta, A., Muskus, C., y Oteo, J. (2019). Genome Sequence of "Candidatus *Rickettsia colombianensi*," A Novel Tick-Associated Bacterium Distributed in Colombia. *Microbiology Resource Announcements*, *8(14)*, 1-2.

Monsalve, S., Mattar, S., y Gonzalez, M. (2009). Zoonosis transmitidas por animales silvestres y su impacto en las enfermedades emergentes y reemergentes. *Revista MVZ Córdoba*, *14(2)*, 1762-1773.

Novakova, M., Literak, I., Chevez, L., Martins, T., Ogrzewalska, M., y Labruna, M. B. (2015). Rickettsial infections in ticks from reptiles, birds and humans in Honduras. *Ticks and tick-borne diseases*, *6(6)*, 737-742.

Ortiz, J., Miranda, J., Ortiz, L., Navarro, Y., y Mattar, S. (2015). Seroprevalence of *Rickettsia* sp. in indigenous Wayuü of la Guajira and Kankuamos of Cesar, Colombia. *Infectio*, *19(1)*, 18-23.

Osorno-mesa, E. (1940). Las garrapatas de la República de Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas*, *Fisicas y Naturales*, *4(13)*, 6-24.

Oteo, J. A., Nava, S., Sousa, R., Mattar, S., Venzal, J., Abarca, K., Labruna, M., y Zavala, J. (2014). Guías Latinoamericanas de la RIICER para el diagnóstico de las rickettsiosis transmitidas por garrapatas. *Revista chilena de infectología*, *31(1)*, 54-65.

Parola, P., Davoust, B., y Raoult, D. (2005). Tick and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Veterinary Research*, *36(3)*, 469–492.

Patiño, F., Uribe, L., Mendoza, J., Guerrero, J., y Newcomb, K. (1989). Levantamiento de la frecuencia del parásito del corazón (Dirofilaria immitis) en la población canina colombiana. *MSD AGVET Merial*, 1-5.

Quintero, J., Paternina, L., Uribe, A., Muskus, C., Hidalgo, M., Gil, J., Cienfuegos, A., Osorio, L., y Rojas, C. (2017). Eco-epidemiological analysis of rickettsial seropositivity in rural areas of Colombia: A multilevel approach. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *11(9)*, 1-19.

Regnery, R., Spruill, C., y Plikaytis, B. (1991). Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *Journal of bacteriology*, *173(5)*, 1576-1589.

Robayo, C., Ríos, M y Soler, D. (2020). 7. Conocimiento de la distribución geográfica y ciclo de vida del género *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) en Colombia. En S. Posada., A. Cabrera y Monsalve, S. (Eds.), Enfermedades Rickettsiales en Latinoamérica (pp. 123-150). Medellín, Colombia: Fondo Editorial Biogénesis.

Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M., y Huelsenbeck, J. (2012). MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology*, *61(3)*, 539-542.

Sánchez, S., Isaak, A., Guzmán, C., Rendón, E., Muñoz, C., Bermúdez, S., Morales, J., Cruz, A., Romero, D., Dzul, K., Lugo, C., Colunga, P., y Becker, I. (2019). *Rickettsia* species in ticks that parasitize amphibians and reptiles: Novel report from Mexico and review of the worldwide record. *Ticks and tick-borne diseases*, *10(5)*, 987-994.

Santamaría, C., Reyes, U., Reyes, K., López, G., López, A., Quero, A., Reyes, D., Santos, A., Lara, J., y Matos, L. (2018). Rickettsiosis conceptos básicos. *Revista Médico-Científica de la Secretaría de Salud Jalisco*, 5(2), 113-121.

Santodomingo, A., Cotes, A., Foley, J., y Castro, L. (2018). Rickettsial infection in ticks (Acari: Ixodidae) from reptiles in the Colombian Caribbean. *Ticks and tick-borne diseases*, *9(3)*, 623-628.

Santodomingo, A., Sierra, K., Cotes, A., y Castro, L. (2019). Molecular detection of *Rickettsia* spp., *Anaplasma platys* and *Theileria equi* in ticks collected from horses in Tayrona National Park, Colombia. *Experimental and Applied Acarology*, *77(3)*, 411-423.

Schwarz, G. (1978). Estimating the dimension of a model. *The annals of statistics*, *6(2)*, 461-464.

Stamatakis, A. (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, *22(21)*, 2688-2690.

Sumrandee, C., Hirunkanokpun, S., Doornbos, K., Kitthawee, S., Baimai, V., Grubhoffer, L., Trinachartvanit, W., y Ahantarig, A. (2014). Molecular detection of *Rickettsia* species in *Amblyomma* ticks collected from snakes in Thailand. *Ticks and tick-borne diseases*, *5(6)*, 632-640.

Susser, E. (2004). Eco-epidemiology: thinking outside the black box. *Epidemiology*, *15(5)*, 519-520.

Tamura, A., Ohashi, N., Urakami, H., y Miyamura, S. (1995). Classification of *Rickettsia tsutsugamushi* in a New Genus, *Orientia* gen. nov., as *Orientia tsutsugamushi* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *45(3)*, 589-591.

Thompson, J., Higgins, D., y Gibson, T. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, *22(22)*, 4673-4680.

Urbina, N. (2010). Patrón de actividad, dieta y dispersión de semillas por tres especies de primates en un fragmento de bosque en San Juan de Carare, Santander (Colombia) (tesis de pregrado). Pontifica Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.

Vélez, J., Hidalgo, M., y González, J. (2012). Rickettsiosis, una enfermedad letal emergente y re-emergente en Colombia. *Universitas Scientiarum*, *17(1)*, 82-99.

Venzal, J., y Nava, S. (2011). El género *Rickettsia* como agente de zoonosis en el Cono Sur de Sudamérica. *Revista Médica del Uruguay*, *27(2)*, 98-106.

Zamudio, A., y Soler, D. (2020). Factores asociados a la ocurrencia en humanos de infección por *R*. *rickettsii* transmitida por garrapatas en Colombia. *Fondo Editorial Biogénesis*, 167-185.

7. ANEXOS

Las secuencias de *Rickettsia* generadas en el presente estudio, serán cargadas en GenBank previo a la publicación del artículo científico producto de este. Sin embargo, como soporte a las secuencias mencionadas a lo largo del texto, será plasmada la genotipificación de cada muestra a continuación.

D3 (ompA):

GCCGGCAATAATAGTAACAGGCAACAAGTTACCCCCTGTAACAATAGAACCG
ACGCTGGTATCTTCAGTAATATTTAGACCTCCAGGATTAGTAGCCGCAACATT
TATAGCCGTAATAATACGACCGACTTTATCTGCAGTGATATTATGATTACCAC
CGTAAGTAAATGCCTTATTGTCTTGAGGACCGTCAGCAGGAATACCATTAGCT
ACTCCTTCAGCCATTATCTCATGCCAATTACCATCAGCAGCAAGATCACTAAA
TGCTGCATTATTATTAGAAATRACACCCGCAGCAACACCCAACACCCCACTAC
TACTCAGCATTAATGCTGCGGTTGAGGTGGTG

D9 (ompA):

GCCGGCAATAATAGTAACAGGCAACAAGTTACCCCCTGTAACAATAGAACCG
ACGCTGGTATCTTCAGTAATATTTAGACCTCCAGGATTAGTAGCCGCAACATT
TATAGCCGTAATAATACGACCGACTTTATCTGCAGTGATATTATGATTACCAC
CGTAAGTAAATGCCTTATTGTCTTGAGGACCGTCAGCAGGAATACCATTAGCT
ACTCCTTCAGCCATTATCTCATGCCAATTACCATCAGCAGCAAGATCACTAAA
TGCTGCATTATTATTAGAAATAACACCCGCAGCAACACCCAACACCCCACTAC
TACTCAGCATTAATGCTGCGGTTGAGGT

D11 (SCA1):

GGTACTTTGACTTTAGTACCGACAATTCCgSACAATATATTATTCTCTTTCATT
GTAAGAGCTATTTCTTGTACGTTAATACCGGTTTCATTATATACCCCGTCTCGT
GACTTCCCGTATCTTAAGCCAATATTTGGAGTAATAACGAGCTTGTTCTGCAA

AAGATAATTATAATTCAGTAATGCTTCTGCATTATAACTATGATTGCGATGTTT
TACATTACTTCTAATTTTAGTATCACCATATGAATAAGTTGTCTTATCTTTAATA
AAATTTTTAGAAGCAGATACTAAAGCTTGTAGTGCAAAATTCCTCTGTAATTCT
TTTTGTCCGTAAATAGAAACTACATGGCTATTAATAAGTTCTTTATCATTATTTT
TACTATTTTTAAATTTAAATACTGAATGAACATTACTATAAGCTATACCTAGAAT
ATTATTGTCGATTTCAACGTCAAACCCAATAGTAGCACCTTTGTTAGTACCTCT
ATAACCGGTCATATTGTCAACGCGTCCATGATTATTAGTGCCG

E3 (ompA):

TGCCGGCAATAATAGTAACAGGCAACAAGTTACCCCCTGTAACAATAGAACC
GACGCTGGTATCTTCAGTAATATTTAGACCTCCAGGATTAGTAGCCGCAACAT
TTATAGCCGTAATAATACGACCGACTTTATCTGCAGTGATATTATGATTACCAC
CGTAAGTAAATGCCTTATTGTCTTGAGGACCGTCAGCAGGAATACCATTAGCT
ACTCCTTCAGCCATTATCTCATGCCAATTACCATCAGCAGCAAGATCACTAAA
TGCTGCATTATTATTAGAAATAACACCCGCAGCAACACCCAACACCCCACTAC
TACTCAGCATTAATGCTGCGGTTGAGGTRGTGA

E4 (ompA):

TGCCGGCAAtAATAGTAACAGGCAACAAGTTACCCCCTGTAACAATAGAACCG
ACGCTGGTATCTTCAGTAATATTTAgACCTCCAGGATTAGTAGCCGCAACATT
TATAGCCGTAATAATACGACCGACTTTATCTGCAGTGATATTATGATTACCAC
CGTAAGTAAATGCCTTATTGTCTTGAGGACCGTCAGCAGGAATACCATTAGCT
ACTCCTTCAGCCATTATCTCATGCCAATTACCATCAGCAGCAAGATCACTAAA
TGCTGCATTATTATTAGAAATAACACCCGCAGCAACACCCAACACCCCACTAC
TACTCAGCATTAATGCTGCGGTTGA

E4 (SCA1):

TCTCTTTAAAATTATGTTCTACCGCTCCTTGGAATGTTAGACCTAAATTATTAA
ATTTTAGAGCATCTTTTAAAGGTACTTTGACTTTAGTACCGACAATTCCAGACA
ATATATTATTCTCTTTCATTGTAAGAGCTATTTCTTGTACGTTAATACCGGTTTC
ATTATATACCCCGTCTCGTGACTTCCCGTATCTTAAGCCAATATTTGGAGTAA

TAACGAGCTTGTTCTGCAAAAGATAATTATAATTCAGTAATGCTTCTGCATTAT
AACTATGATTGCGATGTTTTACATTACTTCTAATTTTAGTATCACCATATGAATA
AGTTGTCTTATCTTTAATAAAATTTTTAGAAGCAGATACTAAAGCTTGTAGTGC
AAAATTCCTCTGTAATTCTTTTTGTCCGTAAATAGAAACTACATGGCTATTAAT
AAGTTCTTTATCATTATTTTTACTATTTTTAAATTTAAATACTGAATGAACATTAC
TATAAGCTATACCTAGAATATTATTGTCGATTTCAACGTCAAACCCAATAGTAG
CACCTTTGTTAGTACCTCTATAACCGGTCATATTGTCAACGCGTCCATGATTA
TTAGTGCCGTACATACCACGCATCCACAAACCTCTTTTTATACGAGACTCTTC
TTCATCACC

F3 (ompA):

TGCCGGCAATAATAGTAACAGGCAACAAGTTACCCCCTGTAACAATAGAACC
GACGCTGGTATCTTCAGTAATATTTAGACCTCCAGGATTAGTAGCCGCAACAT
TTATAGCCGTAATAATACGACCGACTTTATCTGCAGTGATATTATGATTACCAC
CGTAAGTAAATGCCTTATTGTCTTGAGGACCGTCAGCAGGAATACCATTAGCT
ACTCCTTCAGCCATTATCTCATGCCAATTACCATCAGCAGCAAGATCACTAAA
TGCTGCATTATTATTAGAAATAACACCCGCAGCAACACCCAACACCCCACTAC
TACTCAGCATTAATGCTGCGGTTGAGGT

F3 (SCA1):

TCTCTTTAAAATTATGTTCTACCGCTCCTTGGAATGTTAGACCTAAATTATTAA
ATTTTAGAGCATCTTTTAAAGGTACTTTGACTTTAGTACCGACAATTCCAGACA
ATATATTATTCTCTTTCATTGTAAGAGCTATTTCTTGTACGTTAATACCGGTTTC
ATTATATACCCCGTCTCGTGACTTCCCGTATCTTAAGCCAATATTTGGAGTAA
TAACGAGCTTGTTCTGCAAAAGATAATTATAATTCAGTAATGCTTCTGCATTAT
AACTATGATTGCGATGTTTTACATTACTTCTAATTTTAGTATCACCATATGAATA
AGTTGTCTTATCTTTAATAAAATTTTTAGAAGCAGATACTAAAGCTTGTAGTGC
AAAATTCCTCTGTAATTCTTTTTGTCCGTAAATAGAAACTACATGGCTATTAAT
AAGTTCTTTATCATTATTTTTACTATTTTTAAATTTAAATACTGAATGAACATTAC
TATAAGCTATACCTAGAATATTATTGTCGATTTCAACGTCAAACCCAATAGTAG
CACCTTTGTTAGTACCTCTATAACCGGTCATATTGTCAACGCGTCCATGATTA
TTAGTGC

F7 (SCA1):

GCGTTGACAATATGACCGGTTATAGAAGGTACTAACAAAGGTGCTACTATTG
GGTTTGACGTTGAAATCGACAATAATATTCtAGGTATARCTTATAGTAATGTTC
ATTCAgTATTTAAATTTAAAAATAGTAAAAATAATGATAAAGAACTTATTAATAG
CCATGTAGTTTCTATTTACgGACAAAAAGAATTACAgAgGAATTTTGCACTACA
AGCTTTAGTATCTACTTCTAAAAATTTTATTAAGGATAArACAACTTATTAATAT
GGTGTACTAARATTAGAAGTAATGTAAAACATCgCAATCATAgT

F9 (SCA1):

ATTATGTTCTACCGCTCCTTGGAATGTTAGACCTAAATTATTAAATTTTAGAGC
ATCTTTTAAAGGTACTTTGACTTTAGTACCGACAATTCCAGACAATATATTATT
CTCTTTCATTGTAAGAGCTATTTCTTGTACGTTAATACCGGTTTCATTATATAC
CCCGTCTCGTGACTTCCCGTATCTTAAGCCAATATTTGGAGTAATAACGAGCT
TGTTCTGCAAAAGATAATTATAATTCAGTAATGCTTCTGCATTATAACTATGAT
TGCGATGTTTTACATTACTTCTAATTTTAGTATCACCATATGAATAAGTTGTCTT
ATCTTTAATAAAATTTTTAGAAGCAGATACTAAAGCTTGTAGTGCAAAATTCCT
CTGTAATTCTTTTTGTCCGTAAATAGAAACTACATGGCTATTAATAAGTTCTTT
ATCATTATTTTTACTATTTTTAAATTTAAATACTGAATGAACATTACTATAAGCT
ATACCTAGAATATTATTGTCGAT

F10 (gltA):

ATGTCTACTGCTTCTTGTCAGTCTACTATCACCTATATAGACGGTGATAAAGG
AATCTTGCGGCATCGAGGATATGATATTAAAGATTTAGCTGAGAAAAGTGATT
TTTTAGAAGTAGCATATTTACTGATTTATGGGGAACTACCAAGTAGTGAGCAG
TATAATAATTTCACTAAACAGGTTGCTCATCATTCATTAGTGAATGAAAGATTA
CATTATTTATTTCAAACCTTTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTT
GCGGCTGTCGGTTCTCTTTCGGCATTTTATCCTGATTTATTGAATTTTAAGGA
AGCAGACTACGAACTTACCGCTATTAGAATGATTGCTAAGATACCTACTATCG
CCGCAATGTCTTATAAATATTCTAtAGGGCAACcGTTTATTTATCCTGATAATTC
GTTAGATTTTACCgAaAATTTTCTGCAtAtGATGTTTGCaACGCATTGTACGAAA
TATAAAGTAAATCCAATAATAAAAAATGCTCTTAATAAGATATTTATCCTACATG
CAGACCATGAGCAGAATGCTTCTACCTCAACAGTTCGAATTGCCGGCTCATC
CGGAGCTAACCCTTTTGCTTGTATTAGCACGGGTATTGCCTCACTTTGdgGAC

CTGCTCACGGCGGGGCTAATGAAGCGGTAATAAATATGCTTAAAGAAATCGG
TAGTTCTGAGAATATCCCTAAATATATAGCTAAAGCTAAGGATAAAAATGATCC
GTTTAGGTTAATGGGTTTCGGTCATCGTGTATATAAAAACTATGACCCGCGTG
CCGCAGTACTTAAAGAAACGTGCAAAGAAGTATTAAAGGAACTCGGACAGTtA
GAAAATAATCCACTGTTACAAATAGCAATAGAACTTGAAGCTATCGCTCTTAA
AGATGAATATTTTATTGAGAGAAAATTATATCCAAATG

F10 (ompA):

TGCCGGCAATAATAGTAACAGGCAACAAGTTACCCCCTGTAACAATAGAACC
GACGCTGGTATCTTCAGTAATATTTAGACCTCCAGGATTAGTAGCCGCAACAT
TTATAGCCGTAATAATACGACCGACTTTATCTGCAGTGATATTATGATTACCAC
CGTAAGTAAATGCCTTATTGTCTTGAGGACCGTCAGCAGGAATACCATTAGCT
ACTCCTTCAGCCATTATCTCATGCCAATTACCATCAGCAGCAAGATCACTAAA
TGCTGCATTATTATTAGAAATAACACCCGCAGCAACACCCAACACCCCACTAC
TACTCAGCATTAATGCTGCGGTTGAGGT

F10 (SCA1):

TACTTTGACTTTAGTACCGACAATTCCAGACAATATATTATTCTCTTTCATTGT
AAGAGCTATTTCTTGTACGTTAATACCGGTTTCATTATATACCCCGTCTCGTG
ACTTCCCGTATCTTAAGCCAATATTTGGAGTAATAACGAGCTTGTTCTGCAAA
AGATAATTATAATTCAGTAATGCTTCTGCATTATAACTATGATTGCGATGTTTT
ACATTACTTCTAATTTTAGTATCACCATATGAATAAGTTGTCTTATCTTTAATAA
AATTTTTAGAAGCAGATACTAAAGCTTGTAGTGCAAAATTCCTCTGTAATTCTT
TTTGTCCGTAAATAGAAACTACATGGCTATTAATAAGTTCTTTATCATTATTTTT
ACTATTTTTAAATTTAAATACTGAATGAACATTACTATAAGCTATACCTAGAATA
TTATTGTCGATTTCAACGTCAAACCCAATAGTAGCACCTTTGTTAGTACCTCTA
TAACCGGTCATATTGTCAACGCGTCCATGAT

F11 (ompA):

TGCCGGCAATAATAGTAACAGGCAACAAGTTACCCCCTGTAACAATAGAACC
GACGCTGGTATCTTCAGTAATATTTAGACCTCCAGGATTAGTAGCCGCAACAT
TTATAGCCGTAATAATACGACCGACTTTATCTGCAGTGATATTATGATTACCAC
CGTAAGTAAATGCCTTATTGTCTTGAGGACCGTCAGCAGGAATACCATTAGCT

ACTCCTTCAGCCATTATCTCATGCCAATTACCATCAGCAGCAAGATCACTAAA
TGCTGCATTATTATTAGAAATAACACCCGCAGCAACACCCAACACCCCACTAC
TACTCAGCATTAATGCTGCGGTTGAGGT

F11 (SCA1):

AGAGCATCTTTTAAAGGTACTTTGACTTTAGTACCGACAATTCCAGACAATATA
TTATTCTCTTTCATTGTAAGAGCTATTTCTTGTACGTTAATACCGGTTTCATTAT
ATACCCCGTCTCGTGACTTCCCGTATCTTAAGCCAATATTTGGAGTAATAACG
AGCTTGTTCTGCAAAAGATAATTATAATTCAGTAATGCTTCTGCATTATAACTA
TGATTGCGATGTTTTACATTACTTCTAATTTTAGTATCACCATATGAATAAGTT
GTCTTATCTTTAATAAAATTTTTAGAAGCAGATACTAAAGCTTGTAGTGCAAAA
TTCCTCTGTAATTCTTTTTGTCCGTAAATAGAAACTACATGGCTATTAATAAGT
TCTTTATCATTATTTTTACTATTTTTAAATTTAAATACTGAATGAACATTACTATA
AGCTATACCTAGAATATTATTGTCGATTTCAACGTCAAACCCAATAGTAGCAC
CTTTGTTAGTACCTCTATAACCGGTCATATTGTCAACGCGTCCATGATTATTA
GTGCCGTACATACCACGCATCCACAAACCT

G4 (SCA1):

TCTGTCTCTTTAAAAATTATGTTCTACCGCTCCTTGGAATGTTAGACCTAAATT
ATTAAATTTTAGAGCATCTTTTAAAGGTACTTTGACTTTAGTACCGACAATTCC
AGACAATATATTATTCTCTTTCATTGTAAGAGCTATTTCTTGTACGTTAATACC
GGTTTCATTATATACCCCGTCTCGTGACTTCCCGTATCTTAAGCCAATATTTG
GAGTAATAACGAGCTTGTTCTGCAAAAGATAATTATAATTCAGTAATGCTTCTG
CATTATAACTATGATTGCGATGTTTTACATTACTTCTAATTTTAGTATCACCATA
TGAATAAGTTGTCTTATCTTTAATAAAATTTTTAGAAGCAGATACTAAAGCTTG
TAGTGCAAAATTCCTCTGTAATTCTTTTTGTCCGTAAATAGAAACTACATGGCT
ATTAATAAGTTCTTTATCATTATTTTTACTATTTTTAAATTTAAATACTGAATGAA
CATTACTATAAGCTATACCTAGAATATTATTGTCGATTTCAACGTCAAACCCAA
TAGTAGCACCTTTGTTAGTACCTCTATAACCGGTCATATTGTCAACGCGTCCA
TGATTATTAGTGCCGTACATACCACGCATCCACAAACCTCTTTTTATAC