



Universitat
de les Illes Balears

TESIS DOCTORAL

2015

ESTUDIO DE LA FAUNA DE IXODIDAE
EN MALLORCA Y DETECCIÓN
MOLECULAR DE LOS PATÓGENOS
BACTERIANOS QUE TRANSMITEN.

Miriam Monerris Mascaró



Universitat
de les Illes Balears

TESIS DOCTORAL

2015

Programa de Doctorado de Biología

ESTUDIO DE LA FAUNA DE IXODIDAE EN
MALLORCA Y DETECCIÓN MOLECULAR DE
LOS PATÓGENOS BACTERIANOS QUE
TRANSMITEN.

ANEXO I, II, III

Miriam Monerris Mascaró

Director: Dr. Miguel Ángel Miranda Chueca

Doctora por la Universitat de les Illes Balears

A sa meva Família

Benvinguts al llarg viatge!

AGRADECIMIENTOS

En primer lloc, vull agrair al meu director de tesi, Miguel Ángel Miranda, per sa confiança que va tenir amb jo a s'hora d'oferir-me fer el doctorat quan vaig acabar sa carrera, després d'estar uns anys de col·laboradora del Laboratori de Zoologia. Moltes gràcies per deixar-me fer feina amb un animaló tant simpàtic.

Agrair també es recolzament de tot es Laboratori de Zoologia, en especial als meus companys i amics, Ricardo del Río, Marga Miquel, Ana González i Carlos Barceló, per haver-hi estat sempre, als bons moments i als dolents. A na Mercedes Nadal, companya i amiga de Bioquímica, per sa seva ajuda i paciència a s'hora de revelar ses membranes.

A sa gent de l'IBABSA que me va ajudar a realitzar es mostrejos, començant per en David Borràs per sa seva ajuda a s'hora d'immobilitzar ovelles, varem fer grans amics! Als veterinaris Tolo Palou, Toñi Espinosa i Núria Bosch per sa seva disposició a s'hora d'avisar-me per acompanyar-los.

A tot s'equip del COFIB per ajudar-me a l'hora de la recollida de mostres a animals silvestres i a Samuel Pinya per facilitar-me exemplars capturats a marts i genetes.

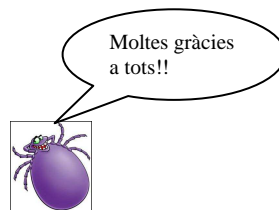
También mostrar mi agradecimiento, de todo corazón, a Jesse Barandika de Neiker, a Pedro Anda y a todo el equipo del Laboratorio de Espiroquetas y Patógenos Especiales del Centro de Microbiología del ISCIII por su gran ayuda, apoyo, ánimos y fuerza que me han mandado para realizar esta tesis, sin ellos esto no hubiera sido posible, muchísimas gracias a todos!

Al Dr. Agustín Estrada-Peña de la Universidad de Zaragoza por acogerme en su laboratorio y enseñarme a clasificar cuando estaba empezando en el tema.

Com no també donar ses gracies a ses meves dues grans amigues Marga i Paula, per ajudar-me a sa carrera, per donar-me s'empenteta es dia que vaig decidir començar aquest camí, per tot es vostre recolzament i ànim en aquells moments dolents que t'agradaria abandonar es barco, per ser com sou i per haver estat devora jo!

A tu Mar, per aquests dos anys tan difícils que m'has ajudat a remuntar i a que tornés a tenir ganes d'acabar aquest camí, moltes gràcies per ajudar-me a arribar!

Finalment, i no per açò els menys importants, sinó tot el contrari, sa meva família. Als meus pares Manuel i Nina i es meu estimat germà Manolo. Per ses seves paraules de recolzament, per els seus ànims, per ses seves xerrades, per tots els moments que hem passat junts xerrant del meu futur, per tot açò i més, gràcies. Sense voltros mai hagués pogut arribar onestic ara, vos estim molt!





ÍNDICE

ÍNDICE

<u>RESUMEN</u>	19
1.- <u>INTRODUCCIÓN</u>	29
1.1.- Posición taxonómica de los Ixodidae.....	31
1.2.- Morfología de Ixodidae.....	33
1.3.- Ciclo biológico.....	38
1.4.- Métodos de captura de Ixodidae.....	42
1.4.1.- Captura de garrapatas por contacto directo con la vegetación.....	42
1.4.2.- Recogida de garrapatas con dispositivos atrayentes.....	43
1.4.3.- Recogida de garrapatas de los hospedadores vertebrados...	44
1.5.- Especies de Ixodidae identificadas en España y Baleares.....	45
1.6.- Efectos en el hospedador.....	47
1.6.1.- Efectos directos.....	47
1.6.2.- Efectos indirectos.....	48
1.7.- Principales patógenos bacterianos transmitidos por ixódidos.....	49
1.7.1.- <i>Anaplasma/Ehrlichia</i> spp.....	49
1.7.2.- <i>Bartonella</i> spp.....	51
1.7.3.- <i>Borrelia</i> spp.....	53
1.7.4.- <i>Coxiella</i> spp.....	56
1.7.5.- <i>Francisella</i> spp.....	58
1.7.6.- <i>Rickettsia</i> spp.....	59
1.7.7.- Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos.....	62
1.8.- Prevención y control.....	63
2.- <u>OBJETIVOS</u>	71
3.- <u>MATERIAL Y MÉTODOS</u>	75
3.1.- Análisis de la carga parasitaria por garrapatas en ganado ovino.....	75
3.1.1.- Zonas de muestreo.....	75
3.1.2.- Recogida de muestras.....	79
3.1.3.- Análisis estadístico.....	83

3.2.- Análisis de la presencia y abundancia por garrapatas en vegetación....	84
3.2.1.- Zonas de muestreo.....	84
3.2.2.- Recogida de muestras.....	87
3.2.3.- Cálculo del índice de abundancia.....	88
3.2.4.- Cálculo del índice de Shannon-Weaver.....	89
3.3.- Análisis de la carga parasitaria por garrapatas en fauna silvestre.....	89
3.3.1.- Recogida de muestras.....	90
3.4.- Detección de patógenos bacterianos.....	91
3.4.1.- Selección de garrapatas del ganado ovino, animales silvestres y vegetación.....	91
3.4.2.- Técnicas empleadas para la identificación de patógenos.....	92
4.- <u>RESULTADOS</u>	97
4.1.- Especies de garrapatas identificadas	97
4.2.- Carga parasitaria por garrapatas en ganado ovino.....	98
4.2.1.- Zona 1 (montaña).....	99
4.2.2.- Zona 2 (central).....	104
4.3.- Garrapatas recolectadas en vegetación.....	107
4.4.- Carga parasitaria por garrapatas en fauna silvestre.....	109
4.5.- Patógenos bacterianos en garrapatas.....	111
5.- <u>DISCUSION</u>	125
5.1.- Carga parasitaria por garrapatas en ganado ovino.....	125
5.2.- Análisis de garrapatas en vegetación.....	129
5.3.- Carga parasitaria por garrapatas en fauna silvestre.....	131
5.4.- Detección e identificación molecular de patógenos bacterianos en garrapatas.....	132
5.5.- Especies de garrapatas identificadas.....	133
5.6.- Discusión general.....	155
6.- <u>CONCLUSIONES</u>	163
7.- <u>BIBLIOGRAFIA</u>	167

8.- ANEXO

-Anexo I: Fichas de las especies de garrapatas estudiadas.....	207
- Anexo II: Protocolo de las técnicas usadas para la identificación de patógenos...	223
- Anexo III: Artículo publicado: New records of tick fauna from the Balearic Islands (Spain) (Acari: Ixodidae).....	235

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Clasificación de los Arthropoda señalando la posición de los Acari dentro del Subfilo Chelicerata.....	31
Figura 2: Clasificación taxonómica de las garrapatas.....	33
Figura 3: Morfología general de un Ixodidae (vista dorsal).....	34
Figura 4: Vista ventral del gnathosoma de un Ixodidae: 1: quelíceros, 2: hipostoma, 3: palpos, 4: base del capítulo. Dcha. vista ventral del gnathosoma.....	35
Figura 5: Vista dorsal de una hembra (izq.) y de un macho (dcha.) en la que se muestra el escudo incompleto y completo respectivamente.....	36
Figura 6: Vista ventral de una hembra (izq.) y de un macho (dcha.).	37
Figura 7: Apéndice locomotor de un Ixodidae en el que observan las uñas (1) tarsales y el (2) pulvillus.....	38
Figura 8: Fases de desarrollo de un Ixodidae. De izq. a dcha.: larva, ninfa, macho y hembra.....	39
Figura 9: Ciclo trifásico de los Ixodidae.....	41
Figura 10: Trampa de CO ₂	44
Figura 11: Método correcto para la extracción de un Ixodidae.....	66
Figura 12: Localización de la zona 1 (montaña) y la zona 2 (central del muestreo en ganado ovino).....	75
Figura 13: Subtipos del clima mediterráneo en Mallorca.....	77
Figura 14: Distribución de <i>Capra ircus</i> en la isla de Mallorca.....	78
Figura 15: Ovejas agrupadas para la vacunación.....	79
Figura 16: Presencia de Ixodidae en orejas, cara y en la zona perianal de las ovejas.....	80

Figura 17: Poro genital de una hembra alimentada de <i>Rhipicephalus turanicus</i> y de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	81
Figura 18: Localización de las explotaciones muestreadas en la zona de la zona 1 para el presente estudio (fecha de muestreo): 1: Son Sales (17/05/2007); 2: Son Alzines (24/05/2007); 3: Sollerich (29/05/2007); 4: Es Pujol; 5: Es Clot (29/06/2007) y 6: Sòller (02/07/2007).....	82
Figura 19: Localización de las explotaciones muestreadas en la zona 2 para el presente estudio (fecha de muestreo): 1: Son Crespí Vell (15/05/09); 2: Massanella (14/05/09); 3: Es Cremat (07/07/09) 4: Sa Mortera Sitges (03/06/10); 5: Es Pou Colomer (23/06/10); 6: Son Ferrers Vells (23/06/10); 7: Sa Cova Vella (30/06/10).....	83
Figura 20: Localización de los puntos de muestreo de vegetación para el presente estudio (Población)(altitud): Zona de la Sierra; 1.- Comuna de Esporles (Esporles) (310m), 2.-Sa Bassa (Fornalutx) (554m), 3.- Menut (Escorca) (752m); Zona Central, 4.- Comuna de Lloret (Lloret) (125m), 5.- Moti-Sion (Porreres) (130m), 6.- Puig Son Salvador (Felanitx) (202m); Zona de Costa; 7.- S'amarador (Santanyi) (38m), 8.- Cala Agulla (Capdepera) (33m), 9.- Platges de Muro (Muro) (0m).....	85
Figura 21: Zonas de muestreo de vegetación: zona montañosa; zona central y zona de costera.....	87
Figura 22: Muestreo de la vegetación mediante el método de la manta y detalle de una garrapata en la manta.....	88

Figura 23: Localización de los puntos donde se recogieron los animales silvestres que han sido incluidos en este estudio. 1. Algaida; 2. Andratx; 3. Arta (P.N.Llevant); 4. Binissalem; 5. Bunyola; 6. Calvià; 7.Campos; 8. Esporles; 9. Felanitx; 10. Inca; 11. Llucmajor; 12. Manacor; 13. Marratxi; 14. Montuïri; 15. Muro; 16. Palma; 17. Pòrtol; 18. Sant Joan; 19. Santanyi (P.N.Mondragó); 20. Son Servera; 21. Sta. Eugènia; 22. Sta. Margalida.....	90
Figura 24: Porcentaje de <i>Ripicephalus turanicus</i> en las orejas y la zona perianal de las ovejas en las diferentes granjas muestreadas.....	103
Figura 25: Porcentaje de <i>Ripicephalus sanguineus</i> en las orejas y la zona perianal de las ovejas en las diferentes granjas muestreadas.....	103
Figura 26: Porcentaje de infección de los diferentes patógenos detectados por especie y muestreo en garrapatas.....	118
Figura 27: Clasificación sistemática de las especies de garrapatas estudiadas.....	207
Figura 28: Vista dorsal y ventral de una hembra y de un macho de <i>Dermacentor marginatus</i>	209
Figura 29: Vista dorsal y ventral de una hembra y de un macho de <i>Haemaphysalis punctata</i>	210
Figura 30: Vista dorsal y ventral de una hembra y de un macho de <i>Hyaloma lusitanicum</i>	211
Figura 31: Vista dorsal y ventral de una hembra de <i>Ixodes arboricola</i>	212

Figura 32: Vista dorsal y ventral de una hembra y de un macho de <i>Ixodes frontalis</i>	213
Figura 33: Vista dorsal y ventral de una hembra de <i>Ixodes ricinus</i> ...	214
Figura 34: Vista dorsal y ventral de una hembra de <i>Ixodes ventralloi</i>	215
Figura 35: Vista dorsal y ventral de una hembra y de un macho de <i>Rhipicephalus bursa</i>	216
Figura 36: Vista dorsal y ventral de una hembra y de un macho de <i>Rhipicephalus pusillus</i>	217
Figura 37: Vista dorsal y ventral de una hembra y de un macho de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	218
Figura 38: Vista dorsal y ventral de una hembra y de un macho de <i>Rhipicephalus turanicus</i>	219
Figura 39: Vista dorsal y ventral de una larva de <i>Ornithodoros</i> <i>maritimus</i>	220

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Especies de garrapatas citadas en Baleares.....	46
Tabla 2: Agentes patógenos y técnicas moleculares de detección.....	62
Tabla 3: Especies de garrapatas recolectadas, lugar de muestreo y citas en Baleares.....	98
Tabla 4: Número de animales muestreados, número de garrapatas obtenidas y abundancia en % de <i>R. turanicus</i> y <i>R. sanguineus</i> en las diferentes granjas muestreadas de la zona 1	100
Tabla 5: Número de animales muestreados, prevalencia de infestaciones del total de animales, prevalencia de infestaciones totales y prevalencia de <i>R. turanicus</i> y <i>R. sanguineus</i> y prevalencia de la co-infestación (respecto al total de animales muestreados) expresada en % de las diferentes granjas muestreadas en la zona 1.....	101
Tabla 6: Número de animales muestreados, media total y por especies del número de garrapatas por animal en cada una de las granjas muestreadas en la zona 1.....	102
Tabla 7: Número de animales muestreados, número de garrapatas identificadas y abundancia en % de <i>H. lusitanicum</i> ; <i>R. turanicus</i> ; <i>R. sanguineus</i> ; <i>R. bursa</i> en cada una de las granjas muestreadas en la zona 2.....	104
Tabla 8: Número de animales muestreados, prevalencias del total de animales, prevalencias de <i>H. lusitanicum</i> ; <i>R. turanicus</i> ; <i>R. sanguineus</i> ; <i>R. bursa</i> y prevalencias de co-infestaciones (respecto al total de animales), en cada una de las granjas muestreadas en la zona 2.....	106

Tabla 9: Número de animales muestreados, media total y por especies del número de garrapatas por animal en cada una de las granjas muestreadas en la zona 2.....	107
Tabla 10: Área muestreada, número de garrapatas e índice de abundancia (IA) para las diferentes zonas.....	108
Tabla 11: Índice de abundancia (garrapatas/m ² ; ga/m ²) por zonas muestreadas y especies de garrapatas identificadas.....	108
Tabla 12: Identificación, número, estadio vital y hospedador de las especies de garrapatas recogidas en animales silvestres....	110
Taula 13: Número de garrapatas adultas analizadas de cada especie..	111
Tabla 14: Porcentajes de los resultados positivos y negativos de las especies muestreadas respecto a la detección de patógenos.....	112
Tabla 15: Positivos y negativos a la detección de patógenos por especie de garrapata.....	113
Tabla 16: Porcentajes de positivos y negativos de garrapatas infectadas por especie y muestreo. O: ganado ovino; V: vegetación; A: animales silvestres.....	114
Tabla 17: Tasa de infección de los diferentes patógenos detectados por zona de muestreo (expresada en %)......	116
Tabla 18: Especies de garrapatas positivas a diferentes patógenos y los hospedadores.....	117
Tabla 19: Concentraciones de DNA utilizadas para la PCR.....	225
Tabla 20: Patógenos, indicadores, secuencias y gen de los indicadores utilizados para la amplificación.....	225
Tabla 21: Temperatura, tiempos y número de ciclos empleados en la reacción de PCR.....	226

Tabla 22: Sondas de los diferentes patógenos fijados en la membrana.....	228
---	-----

Índice de abreviaturas:

a	Área
A	Animales silvestres
ADN	Ácido desoxiribonucleico
ADS	Agrupación de Defensa Sanitaria
AGH	Anaplasmosis granulocítica humana
C+	Control positivo
CANOVI	<i>Anaplasma canis/ Anaplasma ovis</i>
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
COFIB	Consortio para la Recuperación de la Fauna de las Islas Baleares
EDAC	Clohidrato de 3-dimetilaminopropil
EDTA	Ethylenediaminetetra-acetic acid
EEUU	Estados Unidos
EFL	Endosimbionte <i>Francisella-like</i>
FAO	Food and Agriculture Organization
FEM	Fiebre Exantemática Mediterránea
ga/a	Garrapatas por animal
ga/m²	Garrapata por metro cuadrado
GFM	Grupo de las fiebres manchadas
H	Hembras
H.l.	<i>Hyalomma lusitanicum</i>
HPLC	High-performance Liquid Chromatography
IA	Índice de Abundancia
L	Larvas
M	Machos
MCO	<i>Anaplasma marginale/ Anaplasma centrale/ Anaplasma ovis</i>
MLST	Multilocus Sequence Typing
MLVA	Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeats Analysis
MST	Multispacer Sequence Typing
N	Número total de individuos
N	Ninfas
n₁	Número de hospedadores silvestres positivos a la presencia de garrapatas

n₂	Número de garrapatas encontradas sobre el hospedador
NG	Número de Garrapatas
n_i	Número de individuos en el sistema de la especie determinada i
O	Ganado ovino
PCR	Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed-field Gel Electrophoresis
PVC	Polyvinyl Chloride
<i>R.b.</i>	<i>Rhipicephalus bursa</i>
<i>R.s.</i>	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>
<i>R.t.</i>	<i>Rhipicephalus turanicus</i>
RAPD	Random Amplified Polymorphic DNA
RFLP	Restriction Fragments Length Polymorphism
RLB	Reverse line blotting.
RNA	Ribonucleic Acid
rtPCR	Real time Polymerase Chain Reaction
sd	Standard Desviation
SDS	Dodecilsulfato sódico
SSPE	Sodium Chloridre, Sodium Hydrogen Phosphate, EDTA
Subfam.	Subfamilia
Subfil.	Subfilo
subsp	Subespecie
Supcl.	Superclase
Superord.	Superorden
UIB	Universidad de las Islas Baleares
UV	Ultravioleta
V	Vegetación
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana

RESUMEN

RESUMEN

Las garrapatas son responsables de la transmisión de una amplia gama de agentes patógenos. Su particular fisiología y biología favorecen la transmisión de virus, bacterias y protozoos, causando grandes pérdidas económicas en la ganadería, así como problemas en la salud pública. El Mediterráneo, debido a su clima suave combinado con una vegetación adecuada, ofrece un hábitat y unas condiciones bióticas óptimas para varias especies de garrapatas.

Los objetivos principales del presente estudio fueron conocer la fauna de ixódidos en ganado ovino, vegetación y fauna silvestre e identificar y detectar los patógenos bacterianos que pueden transmitir en las Baleares.

En este trabajo, se han identificado doce especies diferentes de garrapatas, cuatro de las cuales (*Ixodes arboricola*, *Ixodes frontalis*, *Rhipicephalus pusillus* y *Ornithodoros maritimum*) son primeras citas para las Islas Baleares.

Para realizar el estudio en ganado ovino, se llevaron a cabo muestreos en dos zonas de Mallorca, como son: zona montañosa (muestreada en 2007) y zona Llevant (muestreada en 2009). En ambos casos se analizaron diferentes partes de los animales, como orejas, patas, ubres y zona perianal. En la zona montañosa se identificaron 3 especies de garrapatas: *Haemaphysalis punctata*, *Rhipicephalus sanguineus* y *Rhipicephalus turanicus*, mientras que en la zona central se registraron 5 especies: *Hyalomma lusitanicum*, *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus pusillus*, *Rhipicephalus sanguineus* y *Rhipicephalus turanicus*.

En las dos zonas la especie más abundante fue *Rhipicephalus turanicus*. En cuanto a la prevalencia de infestación (porcentaje de animales parasitados por garrapatas) en las dos zonas se obtuvieron valores elevados (83,7% en la zona de montaña y un 66% en la zona central), situados dentro de los rangos de prevalencia en ovino descritos en otras zonas del Mediterráneo. Los valores de infestación de ixódidos por animal en la zona 1 ($5,1 \pm 2,7$) y en la zona ($2,7 \pm 2,7$) fueron moderados.

El muestreo sobre vegetación se realizó entre los meses de abril a octubre de 2010 en tres zonas diferentes de Mallorca: costera, montañosa y central. En cada zona se eligieron tres puntos que se muestreaban mensualmente mediante arrastre de manta.

La zona en la que se encontró un índice de abundancia (número de garrapatas por metro cuadrado) más elevado de garrapatas fue en la central ($1,6 \text{ ga/m}^2$), seguido de la costera ($0,6 \text{ ga/m}^2$) y finalmente la montañosa ($0,3 \text{ ga/m}^2$). Se identificaron 8 especies diferentes: *Dermacentor marginatus*, *Hyalomma lusitanicum*, *Haemaphysalis punctata*, *Ixodes frontalis*, *Ixodes ventalloi*, *Rhipicephalus pusillus*, *Rhipicephalus sanguineus* y *Rhipicephalus turanicus*. De todas ellas, la que presentó mayor índice de abundancia fue *Hyalomma lusitanicum* ($0,9 \text{ ga/m}^2$), seguida de *Rhipicephalus turanicus* ($0,7 \text{ ga/m}^2$), *Ixodes ventalloi* ($0,3 \text{ ga/m}^2$) y *Rhipicephalus pusillus* ($0,2 \text{ ga/m}^2$), el resto presentaron valores notablemente inferiores.

En relación a la diversidad, calculada a través del índice de Shannon-Weaver, la zona con mayor índice fue la central (3,12), seguida de la montañosa (0,94) y de la zona costera (0,01).

El muestreo realizado sobre fauna silvestre se llevó a cabo en colaboración con el Centro de Recuperación de Fauna Silvestre (COFIB) de les Illes Balears.

Se analizaron 38 animales de 10 especies diferentes (aves y mamíferos), encontrando nueve especies de garrapatas, ocho de la familia Ixodidae (*Hyalomma lusitanicum*, *Ixodes arboricola*, *Ixodes frontalis*, *Ixodes ricinus*, *Ixodes ventalloi*, *Rhipicephalus pusillus*, *Rhipicephalus sanguineus* y *Rhipicephalus turanicus* y una novena de la familia Argasidae, *Ornithodoros maritimus*.

La identificación y detección de patógenos se realizó a través de la técnica de *Reverse Line Blotting* (RLB) en colaboración con el Instituto de Salud Carlos III. Se analizaron siete géneros de agentes patógenos: *Anaplasma/Ehrlichia* spp., *Bartonella* spp., *Borrelia* spp., *Coxiella* spp., *Francisella* spp. y *Rickettsia* spp.

Del total de las garrapatas analizadas, la tasa de infección fue del 29%, obteniendo positivos para *Anaplasma/Ehrlichia* spp., *Borrelia* spp., *Francisella* spp. y *Rickettsia* spp. En cuanto a *Anaplasma/Ehrlichia* spp., la mayoría de las muestras hibridaron con la sonda específica MCO (específica de *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale*, *Anaplasma ovis*) y otras de ellas con la sonda del grupo de ehrlichia muris. Se llevaron a cabo secuenciaciones de las muestras positivas identificando *Anaplasma ovis* y *Ehrlichia canis*. En el caso de los positivos de *Borrelia* spp. y *Francisella* spp. se realizó una secuenciación para llegar a nivel de especie obteniendo, para *Borrelia* especies cercanas al grupo de espiroquetas causantes de la enfermedad de Lyme y del grupo R57. En relación a *Francisella* los positivos se identificaron como *Endosymbiontes Francisella-like*. En el caso de los resultados positivos para *Rickettsia* spp. se llevó a cabo un RLB con sondas específicas. Se identificaron

Rickettsia conorii y rickettsias cercanas a *Rickettsia massiliae* y *Rickettsia aeschlimanii*.

Se observaron también casos de coinfecciones entre *Anaplasma/Ehrlichia* spp.+*Rickettsia* spp., *Anaplasma/Ehrlichia* spp.+ *Borrelia* spp. e incluso triples coinfecciones de *Anaplasma/Ehrlichia* spp. + *Borrelia* spp.+ *Rickettsia* spp.

El presente estudio ha servido para conocer la fauna de ixódidos de Mallorca, encontrando once especies de garrapatas de la familia Ixodidae y una de la familia Argasidae de las 25 que están citadas en España (www.fauna-iberica.mncn.csic.es). Se trata también del primer estudio sobre la diversidad de patógenos transmitidos por garrapatas en Mallorca. Esta información resulta de interés para futuros estudios sobre la epidemiología de las enfermedades transmitidas por ixódidos en Baleares, así como para la evaluación de los riesgos de transmisión a humanos y animales.

ABSTRACT

Ticks are responsible for transmitting a wide range of pathogens. Their particular physiology and biology enhances their capability to transmit virus, bacteria and protozoa with a subsequent devastating effect on cattle and rural economies, as well as being a serious threat to public health. To some tick species, due to its temperate climate and adequate vegetation, the Mediterranean area offers an ideal habitat with optimal biotic conditions.

The aim of the present work is to determine the prevalence of ixodid tick fauna in sheep, vegetation and wild fauna in the Balearic Islands and detect and identify the bacterial pathogens hosted by the sampled ticks.

From twelve different tick species identified during the course of this study, four (*Ixodes arboricola*, *Ixodes frontalis*, *Rhipicephalus pusillus* and *Ornithodoros maritimum*) have never been cited in previous studies carried out in the Balearic Islands.

In order to determine the prevalence of tick fauna in sheep, tick collection was conducted in two major areas of Majorca. The first one was located in a mountainous area (sampled in 2007) and the second one in the “Llevant” area (sampled in 2009). The animals were extensively checked all around the body e.g. ears, legs, udders and perianal area. In the mountainous area three tick species were identified: *Haemaphysalis punctata*, *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus turanicus*. In the central area 5 tick species were registered: *Hyalomma lusitanicum*, *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus pusillus*, *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus turanicus*.

In both areas, the most abundant specie was *Rhipicephalus turanicus* and the prevalence of infestation (percentage of animals parasitized by ticks)

showed a high ratio in both cases (83.7 % in the mountainous area and 66 % in the central area). These figures are in accordance with other figures reported on sheep prevalence of infestation in other Mediterranean areas. The Ixodid infestation per animal in zone 1 (5.1 ± 2.7) and zone 2 (2.7 ± 2.7) was found to be moderate.

Sampling on vegetation was carried out between April and October 2010. Tick collection was carried out monthly in three key regions in Majorca: Coastal, mountainous and central areas using dragging methods.

The central zone had a higher tick abundance (number of ticks per square metre) (1.6 ticks/m^2), followed by the coastal area (0.6 ticks/m^2) and finally the mountainous area (0.3 ticks/m^2) being the less populated. Eight species were identified: *Dermacentor marginatus*, *Hyalomma lusitanicum*, *Haemaphysalis punctata*, *Ixodes frontalis*, *Ixodes ventalloi*, *Rhipicephalus pusillus*, *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus turanicus*. *Hyalomma lusitanicum* had the highest tick abundance rate (0.9 ticks/m^2), followed by *Rhipicephalus turanicus* (0.7 ticks/m^2), *Ixodes ventalloi* (0.3 ticks/m^2) and *Rhipicephalus pusillus* (0.2 ticks/m^2). The other species presented a much lower tick abundance ratio.

Based on the Shannon-Weaver index, the zone with a higher diversity was the central area (3.12), followed by the mountainous (0.94) and coastal area (0.01).

The wild fauna sampling work was carried out in collaboration with a recovery center wildlife of the Balearic Islands (COFIB).

Thirty eight animals from ten different species (birds and mammals) were analysed. Nine tick species were found and identified: eight belonging to the Ixodidae family (*Hyalomma lusitanicum*, *Ixodes arboricola*, *Ixodes frontalis*, *Ixodes ricinus*, *Ixodes ventalloi*, *Rhipicephalus pusillus*, *Rhipicephalus sanguineus* y *Rhipicephalus turanicus* and the ninth one belonging to Argasidae family: *Ornithodoros maritimus*.

The identification and detection of pathogens was performed using a Reverse Line Blotting (RLB) technique in collaboration with Instituto de Salud Carlos III. Seven pathogens genres were scrutinised: *Anaplasma/Ehrlichia spp.*, *Bartonella spp.*, *Borrelia spp.*, *Coxiella spp.*, *Francisella spp.* and *Rickettsia spp.*

The analysis of the ticks showed a 29 % infection rate. Results for *Anaplasma/Ehrlichia spp.*, *Borrelia spp.*, *Francisella spp.* y *Rickettsia spp* were positive. In the case of *Anaplasma/Ehrlichia spp*, the majority of the samples showed hybridization with the specific MCO probe (specific detection for *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale*, *Anaplasma ovis*) and others with the ehrlichia muris probe. On the other hand, a sequentation was performed on *Borrelia spp.* y *Francisella spp.* for confirmation and species identification. The sequencing results for *Borrelia spp.* showed the species to be close to the spiroquetas group, a Lyme disease related to *Borrelia* and R57 group. *Francisella* positives were identified as *Endosymbiontes Francisella-like*. For *Rickettsia spp* a RLB technique with specific probe was used to identify *Rickettsia conorii* and rickettsias near *Rickettsia aeschlimannii* and *Rickettsia massiliae*.

Co-infected hosts were also found, e.g. *Anaplasma/Ehrlichia spp.*+ *Rickettsia spp.*, *Anaplasma/Ehrlichia spp.*+ *Borrelia spp.* Even, triple co-

infections were also observed. *Anaplasma/Ehrlichia* spp. + *Borrelia* spp.+ *Rickettsia* spp.

This study provides crucial data on the prevalence of ixodid fauna in Majorca. Of the 25 different tick species reported to be found in Spain (www.fauna-iberica.mncn.csic.es), this work cites eleven of those species, nine belonging to Ixodid family and one belonging to Argasidae family. It represents the first ever study regarding the pathogen diversity transmitted by ticks in the island of Majorca. This information could be of interest in future studies related to disease epidemiology transmitted by Ixodid in the Balearic Islands, as well as to evaluate the potential risks in case of transmission to humans and animals.

A thick purple L-shaped border is positioned in the bottom-left corner of the page, consisting of a vertical line extending upwards and a horizontal line extending to the right.

INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

Las garrapatas (Ixodidae) son artrópodos hematófagos obligados que parasitan toda clase de mamíferos, aves, reptiles y anfibios, con una amplia distribución a nivel mundial. En la actualidad, están consideradas como un grupo de artrópodos de gran importancia en la transmisión de agentes patógenos, siendo superadas a nivel mundial únicamente por los mosquitos (PAROLA *et al.*, 2001). Esta situación ha supuesto que en los últimos años, se haya incrementado el interés por las enfermedades transmitidas por garrapatas (TOLEDO *et al.*, 2009b).

Los ixódidos son responsables de la transmisión de una amplia gama de agentes infecciosos, como virus, bacterias y protozoos, causando pérdidas económicas a nivel de producción animal y un impacto sobre la salud humana.

De hecho, las garrapatas han sido descritas como vectores de enfermedades humanas desde principios del siglo XX. El descubrimiento del agente etiológico de la enfermedad de Lyme en 1982 (BURGDORFER *et al.*, 1982) fue un gran impacto en salud pública en los Estados Unidos y Europa. Desde entonces han sido descritas nuevas especies o subespecies de patógenos de *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma* y *Borrelia* (PAROLA *et al.*, 2005; PAROLA *et al.*, 2001a).

La fauna de garrapatas en Baleares ha sido escasamente estudiada y no se considera una zona donde estos vectores provoquen serios problemas a nivel médico. Según datos de los boletines epidemiológicos de la *Conselleria de Salut del Govern de les Illes Balears*, se han diagnosticado diversos casos de fiebres recurrentes transmitidas por garrapatas. Estos

datos alertan y confirman que se trata de un tema interesante que va aumentando poco a poco debido a los nuevos hábitos adquiridos por la sociedad actual, provocando un incremento de la prevalencia. A nivel veterinario se han realizado estudios (ALMERIA *et al.*, 2001; ALMERIA *et al.*, 2009; ROS-GRACÍA *et al.*, 2012) sobre *Babesia* y *Theileria* (protozoos patógenos responsables de las piroplasmosis), encontrándose prevalencias elevadas para estos patógenos.

Debido a la poca información tanto de la fauna de ixodidae presente en Baleares y los posibles agentes patógenos bacterianos que circulan, la presente tesis tiene como objetivo estudiar dicha fauna en tres ámbitos importantes, el ganado ovino, los animales silvestres y la vegetación, así como detectar e identificar los patógenos bacterianos circulantes.

La decisión de estudiar las garrapatas presentes en ganado ovino, fue debida a que se trata de una de las explotaciones ganaderas más comunes en la isla, con un total de 463.692 cabezas de ganado en el 2014 (*Servei de Ramaderia de la Conselleria de Agricultura, Medi Ambient i Territori del Govern de les Illes Balears*). Así pues es importante conocer las garrapatas presentes en este tipo de ganado y los posibles agentes bacterianos que puedan provocar enfermedades a los animales y en consecuencia pérdidas económicas en el sector.

En cuanto al estudio en animales silvestres, se planteó este objetivo debido a que estos tienen un papel importante como posible reservorio de agentes patógenos que producen enfermedades, además de facilitar la dispersión de diferentes especies de garrapatas. En Mallorca las especies de mamíferos silvestres más abundantes son el erizo moruno (*Atelerix algirus*) y el conejo común (*Oryctolagus cuniculus*) (BIOATLES, 2014). Existe un escaso

conocimiento de las especies de garrapatas que parasitan a las especies de mamíferos silvestres en Mallorca, así como su papel como posibles reservorios de agentes patógenos.

Finalmente el objetivo de estudiar las especies de garrapatas presentes en la vegetación de zonas recreativas de la isla, fue planteado debido al aumento de actividades de ocio al aire libre por parte de la población humana. Este hecho aumenta la posibilidad de picaduras de garrapatas y por consiguiente la posible infección con algún agente patógeno.

1.1.- POSICIÓN TAXONÓMICA DE LOS IXODIDAE

La familia de los Ixodidae son artrópodos terrestres, comúnmente conocidos como garrapatas, siendo parásitos obligados de cualquier vertebrado, incluyendo mamíferos, aves, reptiles e incluso anfibios. Los Ixodidae se incluyen en la clase Acari (Figura 1), que junto con las clases Scorpionida y Aranea constituyen la superclase Arachnida (subfilum Chelicerata, filum Arthropoda).

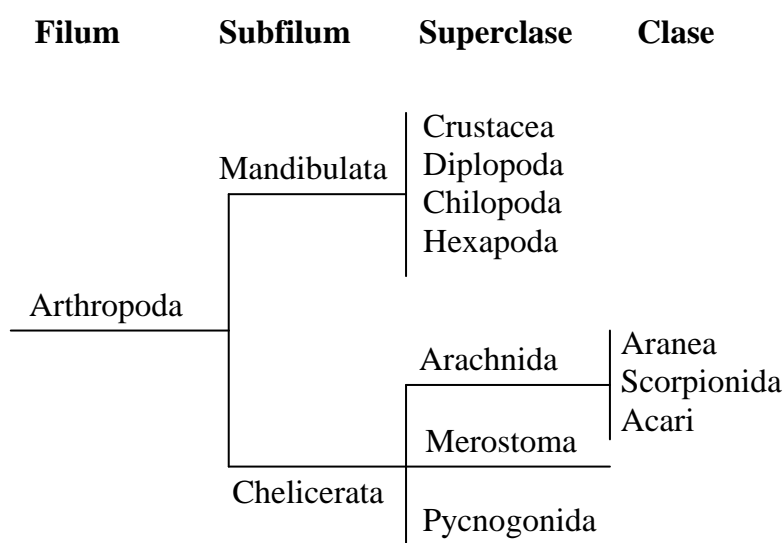


Figura 1: Clasificación de los Arthropoda señalando la posición de los Acari dentro del Subfilo Chelicerata (modificado de Parola *et al.*, 2001).

La clase Acari (Figura 2) se subdivide en los superórdenes Acariformes, Opiliacariformes y Parasitiformes. Dentro de este último se diferencian dos órdenes importantes, Gamasida e Ixodida. El primero incluye entre otras a la familia Phytoseiidae, que comprende a los ácaros que se alimentan de otros ácaros y/o insectos, siendo un ejemplo *Phytoseiulus persimilis* que se alimenta de *Tetranychus urticae* (araña roja), mientras que el segundo comprende las familias Argasidae o garrapatas blandas, Ixodidae o garrapatas duras y Nuttalliellidae.

A nivel mundial la familia Ixodidae esta representada por 692 especies incluidas en 12 géneros agrupados en dos grupos principales, Prostriata y Metastriata. La familia Argasidae incluye 186 especies pertenecientes a 5 géneros agrupados en dos subfamilias, Argasinae y Ornithodorinae. Finalmente Nuttalliellidae esta representada por una única especie, *Nuttalliella namaqua* Bedford, 1931 (GUGLIELMONE *et al.*, 2009).

Dentro de todos los géneros conocidos, los géneros *Amblyomma*, *Boophilus*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma* y *Rhipicephalus* de la familia Ixodidae y el género *Ornithodoros* de la familia Argasidae, tienen una gran importancia médico-veterinaria. Todos ellos han sido citados en Baleares, exceptuando el género *Amblyomma* (CORDERO DEL CAMPILLO, 1994).

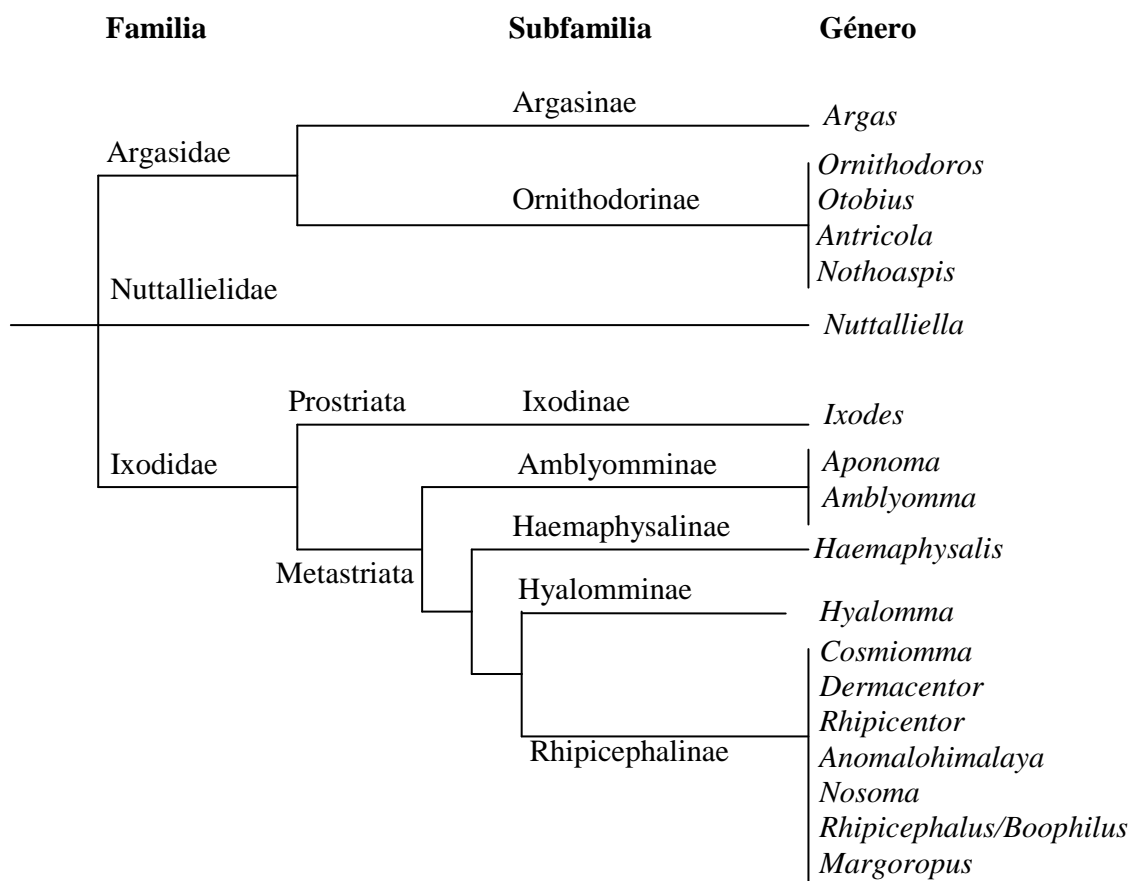


Figura 2: Clasificación taxonómica de las garrapatas (modificado de: Parola *et al.*,2001).

1.2.- MORFOLOGÍA DE LOS IXODIDAE

Los Ixodidae presentan la morfología típica de un ácaro, es decir, un cuerpo globoso, sin separación evidente entre cabeza, tórax y abdomen. La estructura apendicular es la misma que los Arachnida, ésta es, un par de apéndices preorales o **quelíceros**, un par de apéndices postorales o **pedipalpos**, y cuatro pares de patas locomotoras. Los Ixodidae pueden medir entre 2 y 20 mm, dependiendo de la fase de su ciclo biológico y el estado fisiológico en el que se encuentren (alimentados o en ayunas) (ENCINAS GRANDES *et al.*, 1999).

En cuanto a su estructura morfológica, el cuerpo de un Ixodidae se divide en dos partes, la parte anterior o **gnathosoma** y la parte posterior o **idiosoma** (Figura 3).

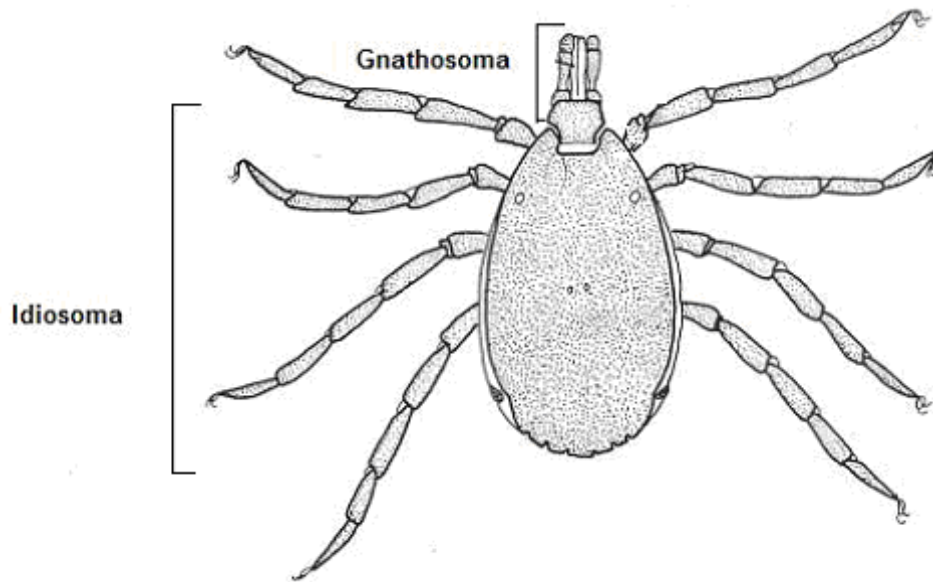


Figura 3: Arriba: morfología general de un Ixodidae (vista dorsal). Fuente: Estrada-Peña *et al.* 2004a Abajo: morfología general de un Ixodidae (vista dorsal) (fotografía de microscopía electrónica de barrido; fuente: Sra. Miriam Monerris).

En el **gnathosoma**, también denominado capítulo, pueden diferenciarse los palpos, los quelíceros, el hipostoma y la base del capítulo (Figura 4). Los palpos son apéndices con capacidad sensorial, mientras que los quelíceros y el hipostoma son sistemas de penetración y de sujeción a la piel del hospedador respectivamente. Los quelíceros son apéndices cortantes, que desgarran la piel en el momento de la picadura. El hipostoma es un apéndice formado por una serie de ganchos especializados en la sujeción al hospedador. En aquellas especies en las que los quelíceros y el hipostoma son largos, su acción es suficiente para mantenerlas fijadas al hospedador; sin embargo, en aquellas que presentan quelíceros e hipostoma cortos, existe la contribución de sustancias cementantes que son liberadas con la saliva. Entre el hipostoma y los quelíceros se encuentra la boca, por la que el ixódido ingiere la sangre. La base del gnathosoma es la parte que se une al idiosoma y resulta muy útil para la diferenciación taxonómica entre géneros, además, a nivel dorsal se encuentran las áreas porosas (en las hembras exclusivamente), relacionadas con la puesta de huevos y la secreción de feromonas.

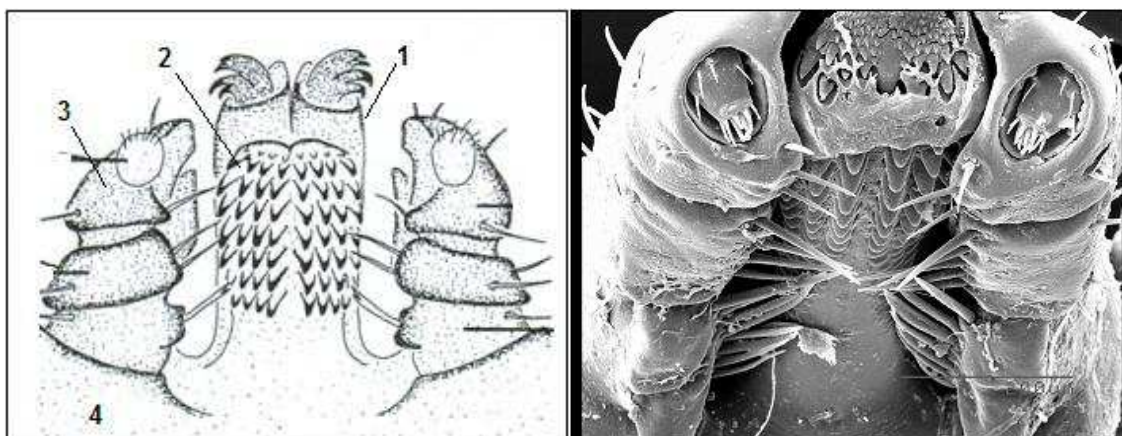


Figura 4: Izq. vista ventral del gnathosoma de un Ixodidae (modificado: Estrada-Peña *et al.*, 2004a): 1: quelíceros, 2: hipostoma, 3: palpos, 4: base del capítulo. Dcha. vista ventral del gnathosoma (fotografía de microscopía electrónica de barrido; fuente: Sra. Miriam Moneris).

El **idiosoma** (Figura 5) está recubierto dorsalmente por una placa quitinosa denominada **escudo**, siendo completa en el caso de los machos, mientras que en las hembras y las fases inmaduras, sólo recubre la parte anterior del idiosoma. La parte del idiosoma que no queda cubierta por el escudo se denomina **aloescudo**. En el escudo se observan una serie de surcos y perforaciones, importantes en la taxonomía a nivel específico. En la parte lateral anterior del escudo y a la altura del 2º par de patas, se sitúan los ojos, que son de tipo simple.

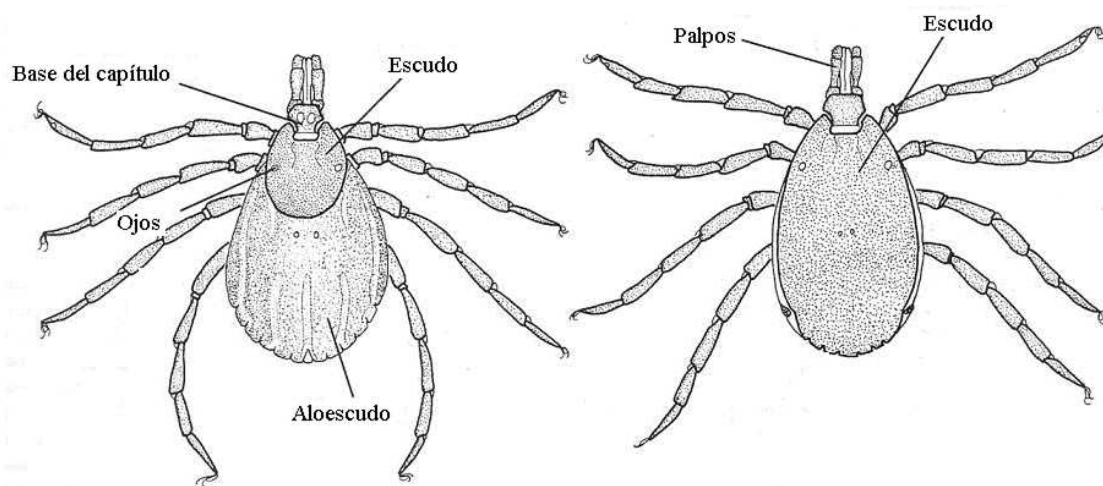


Figura 5: Vista dorsal de una hembra (izq.) y de un macho (dcha.) en la que se muestra el escudo incompleto y completo respectivamente. Modificado: Estrada-Peña *et al.*, 2004a.

En la parte ventral del idiosoma se localizan el **poro anal**, el **poro genital** (Figura 6) y los **espiráculos** respiratorios. Además, aparecen una serie de placas quitinosas del exoesqueleto, como son las **placas anales** y las **adanales**, presentes sólo en los machos y muy útiles a la hora de diferenciar algunas especies.

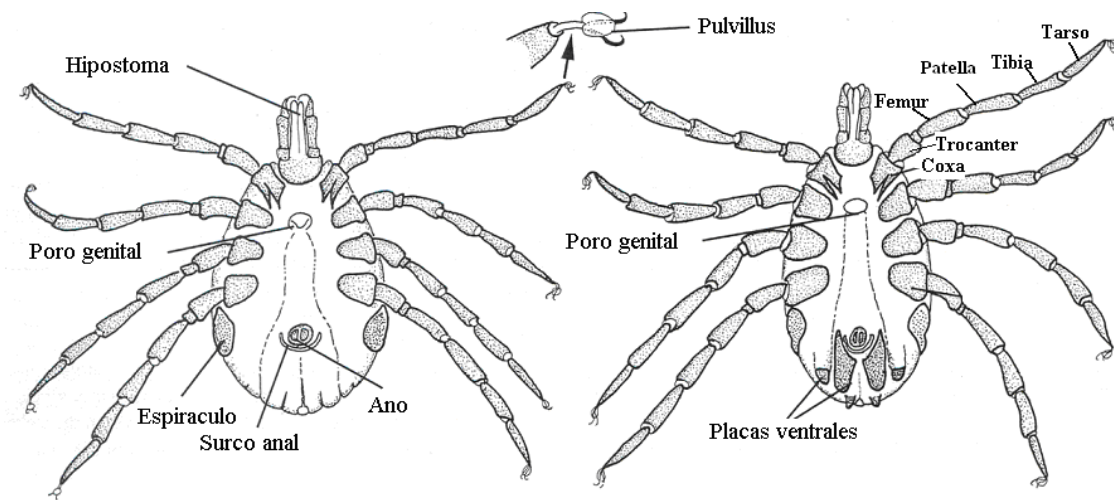


Figura 6: Vista ventral de una hembra (izq.) y de un macho (dcha.). Modificado: Estrada-Peña *et al.* 2004a.

En cuanto a los apéndices locomotores, los Ixodidae adultos y las ninfas presentan cuatro pares de patas, en cambio las larvas presentan únicamente tres. El apéndice locomotor es el típico de un Arachnida (Figura 6 y 7), formado desde la parte proximal a la distal por la coxa, trocánter, fémur, patella, tibia y tarso. En este último se diferencia el **pulvillus**, que junto a las **uña tarsales** permiten la sujeción de los individuos a los hospedadores o trepar por superficies rugosas. El **órgano de Haller** se encuentra en el tarso del primer par de patas y permite detectar a los hospedadores por cambios de humedad, temperatura y CO₂.



Figura 7: Apéndice locomotor de un Ixodidae en el que se observan las (1) uñas tarsales y el (2) pulvillus (fotografía de microscopía electrónica de barrido. Fuente: Sra. Miriam Moneris).

1.3.- CICLO BIOLÓGICO

Los Ixodidae presentan un desarrollo hemimetábolo con cuatro fases de desarrollo: **huevo, larva, ninfa y adulto**. Como se observa en la figura 8, las larvas y las ninfas son de menor tamaño que los adultos.



Figura 8: Fases de desarrollo de un Ixodidae. De izq. a dcha.: larva, ninfa, macho y hembra. Fuente: CDC (Public Health Image Library).

En el caso de las hembras, el paso de una fase a otra del ciclo implica una ingesta de un gran volumen de sangre del hospedador en un tiempo determinado. Las larvas normalmente se alimentan de 3 a 5 días, las ninfas de 4 a 8 días y las hembras de 5 a 20 días (WALL *et al.*, 1997). Los machos, por lo contrario, no necesitan ingerir la misma cantidad de sangre que las hembras, ya que una vez han copulado mueren. Las fases inmaduras de todos los Ixodidae se alimentan normalmente sobre pequeños mamíferos, como los roedores o sobre aves, mientras que los adultos tienden a ingerir sangre de mamíferos de tamaño medio y grande.

Las larvas y las ninfas una vez han completado la ingesta de sangre abandonan el hospedador y buscan un hábitat adecuado para mudar, generalmente una zona con una humedad relativa elevada y una radiación solar baja. En las especies no nidícolas este hábitat puede ser entre la arena, en el mantillo de las hojas, etc. Las especies nidícolas, mudan en las grietas

de madrigueras o entre el material del nido, donde encuentran unas condiciones adecuadas.

La mayoría de los Ixodidae son relativamente inmóviles y esperan en la vegetación el paso de algún hospedador para engancharse y poderse alimentar. En algún caso, como en el género *Hyalomma*, se desplazan activamente hacia el hospedador potencial. Los Ixodidae han desarrollado una serie de sistemas sensoriales para poder detectar la presencia del hospedador, como por ejemplo el ya mencionado órgano de Haller, que detecta diferencias en las presiones parciales de anhídrido carbónico, olores característicos emitidos por los hospedadores, vibraciones y cambios de temperatura y humedad.

El ciclo vital de los Ixodidae es similar en toda la familia, excepto en la mayoría de especies del género *Ixodes*. Tras la cópula, realizada sobre el hospedador, las hembras se alimentan ingiriendo una cantidad de sangre con la que aumentan hasta cien veces su volumen. Una vez alimentadas, abandonan el hospedador para realizar una puesta de entre 5.000 y 20.000 huevos, dependiendo de las condiciones climáticas (ESTRADA-PEÑA, 1994). La eclosión de las larvas hexápodas, se produce al cabo de unos días (dependiendo siempre de las condiciones climáticas), dispersándose por la vegetación a la espera de un hospedador. Una vez lo han encontrado, se alimentan durante 3-5 días, hasta el momento en el que lo abandonan para mudar a ninfa en un hábitat adecuado. Las ninfas vuelven a buscar un hospedador apropiado del que se alimentarán otra serie de días (entre 4 y 8), volviendo a abandonar el hospedador para realizar la muda a adulto, completándose así el ciclo. Este tipo de ciclo, en el cual cada fase se alimenta y muda en tres hospedadores diferentes recibe el nombre de **ciclo trifásico** (Figura 9).

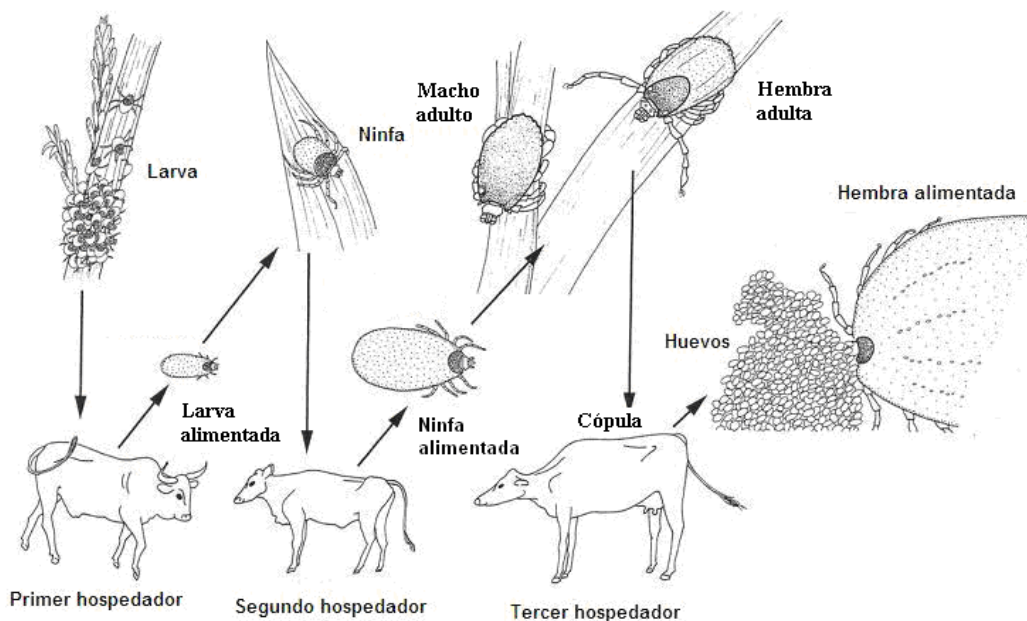


Figura 9: Ciclo trifásico de los Ixodidae. Modificado de Estrada-Peña *et al.*, 2004a.

El ciclo **difásico** y el ciclo **monofásico** son variaciones del ciclo mencionado con anterioridad. En el ciclo difásico la larva permanece sujeta al hospedador mientras lleva a cabo la muda larva-ninfa. Una vez se ha alimentado la ninfa, se suelta del hospedador y muda a adulto completando el ciclo. Por último, en el ciclo monofásico todas las fases permanecen y se alimentan fijadas al hospedador.

Los factores más importantes que regulan el ciclo de los Ixodidae son la **temperatura** y la **humedad relativa**, si bien presentan estrategias adaptativas que les permiten cierta independencia del medio, como son la capacidad de absorber humedad mediante una sustancia higroscópica segregada junto a la saliva (RUDOLPH *et al.*, 1974) y el fenómeno de la diapausa. En zonas de clima templado, el ciclo suele durar un año mientras que en áreas más septentrionales, puede durar hasta tres y cuatro años, debido a la termodependencia de algunas de las fases del ciclo vital. El **fotoperiodo** es otro factor determinante que marca el inicio de una determinada fase. Mientras no exista una determinada cantidad de horas-

luz diarias, un Ixodidae no estará activo ni buscará un hospedador aunque la temperatura y humedad sean apropiadas. El fotoperiodo también determina que haya especies con un ciclo localizado en invierno o en verano, o que sean activas a primeras o a últimas horas del día.

1.4.- MÉTODOS DE CAPTURA DE IXODIDAE

Cuando se piensa en realizar un estudio sobre la ecología, presencia o ausencia, o epidemiología de Ixodidae, es necesario hacer una recogida de individuos en la zona o sobre los hospedadores de interés. Para el muestreo de garrapatas se pueden utilizar tres métodos diferentes: métodos por contacto directo, métodos de atracción a distancia y métodos de recogida de Ixodidae fijados a los animales.

1.4.1.- Captura de garrapatas por contacto directo con la vegetación.

Existen varios métodos de captura por contacto directo: el de la bandera, el arrastre de la manta y captura directa sobre personas o animales. Los métodos más utilizados son el de la bandera y el de arrastre, el tercero está prácticamente en desuso.

El método de la bandera consiste en fijar una pieza de tela (1m x 1m) a un mango a modo de bandera que se arrastra por la vegetación. Este método es adecuado cuando se realiza sobre áreas de matorral. En cambio, si el área de muestreo es sobre una cubierta vegetal relativamente baja y uniforme se usa el método de la manta. Éste es muy similar al anterior, la única diferencia es que la tela o manta se arrastra sobre la vegetación tirada por una cuerda atada a los extremos por una barra (SONESHINE, 1993). En ambos se revisa periódicamente la tela y se determina el número de

ejemplares recogidos por unidad de tiempo o superficie muestreada. Es aconsejable realizar el muestreo cuando la vegetación este seca, ya que la manta mojada pierde eficacia.

Estos métodos presentan una serie de ventajas e inconvenientes. En cuanto a las ventajas, permiten calcular la abundancia de garrapatas por unidad de tiempo y superficie, además se trata de un método fácil a la hora de fabricar, de transportar, etc. En cambio, la principal desventaja es la dificultad y el bajo rendimiento para capturar especies activas como *Hyalomma* spp. y para las garrapatas que durante el muestreo han bajado de la vegetación al suelo (GINSBERG Y EWIN 1989, SCHULZE *et al.*, 1997).

1.4.2.- Recogida de garrapatas con dispositivos atrayentes.

El dispositivo más utilizado es la trampa de CO₂ (Figura 10). Este tipo de trampa está especialmente indicada para garrapatas activas que buscan a su hospedador (GINSBERG Y EWING 1989, SCHULZE *et al.*, 1997, SOLBERG *et al.*, 1992), capaces de realizar desplazamientos rápidos, o para especies que responden adecuadamente al estímulo de CO₂.

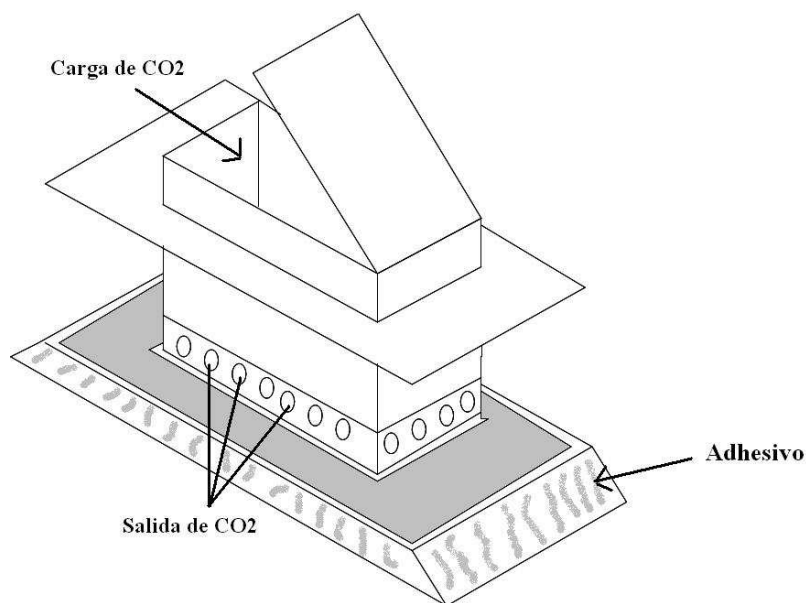


Figura 10: Trampa de CO₂ (Modificado: Barandika, 2010)

Este método se considera más eficaz que los métodos de arrastre en especies como *Hyalomma* spp., en cambio se ha demostrado que otras especies como *Dermacentor* spp. o *Ixodes* spp. no responden adecuadamente al estímulo del CO₂ (SONESHINE 1993).

1.4.3.- Recogida de garrapatas de los hospedadores vertebrados.

Las garrapatas pueden ser recogidas directamente del animal cuando están alimentándose. La retirada debe realizarse de manera cuidadosa para evitar la rotura de la garrapata, ya que a la hora de la identificación el ejemplar debe estar en perfectas condiciones.

Para llevar a cabo el muestreo de garrapatas de animales salvajes se siguen diferentes metodologías dependiendo del tamaño del animal. En grandes ungulados se suele realizar cuando son abatidos en cacerías o descartes. En cambio para mamíferos de pequeño o mediano tamaño se emplean trampas que permiten la captura del animal en vivo (asegurando que las garrapatas no se han desprendido) siendo posteriormente anestesiados para su

inspección (BARANDIKA, 2010). La colaboración con centros de animales salvajes en los que se desparasita a todo animal que accede a ellos (ya sea vivo o muerto) es otro sistema útil para la realización del muestreo. Se guardan los ectoparásitos que puedan hallarse para una posterior identificación.

Para capturar especies nidícolas, se pueden buscar y recoger las garrapatas directamente o bien recoger fragmentos de nidos, madrigueras y colocarlos en un embudo Berlesse. Cuando se quieren muestrear madrigueras o pequeñas cavidades se pueden utilizar pequeños dispositivos succionadores, que recogen y separan las garrapatas del resto de materiales (BARANDIKA, 2010).

1.5.- ESPECIES DE IXODIDAE IDENTIFICADAS EN ESPAÑA Y BALEARES

En España, según CORDERO DEL CAMPILLO (1994), están citadas 35 especies de Ixodidae: 3 del género *Dermacentor*, 5 del género *Haemaphysalis*, 10 del género *Hyalomma*, 12 del género *Ixodes* y 5 del género *Rhipicephalus*; 8 de la Familia Argasidae: 5 del género *Argas* y 3 del género *Ornithodoros*.

En cuanto a las Islas Baleares, si bien son pocos los estudios realizados, en el Índice-Catálogo de Zooparásitos Ibéricos, CORDERO-CAMPILLO describe la presencia de 8 especies de Ixodidae: 2 del género *Dermacentor*, 1 del género *Haemaphysalis*, 1 del género *Hyalomma*, 2 del género *Ixodes* y 2 del género *Rhipicephalus* (Tabla 1).

En Baleares sólo encontramos tres trabajos publicados; el primero es un listado de especies de GIL COLLADO de 1936 donde cita la presencia de *Dermacentor marginatus* (Sulzer, 1776), *Hyalomma lusitanicum* Koch, 1844 y *Hyalomma marginatum* Koch, 1844 en Menorca. Un estudio de JOLIVET en 1951 donde describe la presencia de *Haemaphysalis cinnabarina* var. *punctata* Canestrini et Fanzago 1877 y *Dermacentor niveus*, Neuman 1960 en Mallorca. El tercer estudio fue realizado en Menorca por CASTELLÀ *et al.* (2001), consistió en un análisis de la fauna de Ixodidae en ganado vacuno. En dicho estudio se citó la presencia de 6 especies perteneciente a la familia Ixodidae: 1 del género *Haemaphysalis*, 2 del género *Hyalomma* y 3 del género *Rhipicephalus* (Tabla 1).

Tabla 1: Especies de garrapatas citadas en Baleares.

Espece de garrapata	Distribución	Referencia
<i>Dermacentor marginatus</i>	Menorca	Gil-Collado, 1936
<i>Dermacentor niveus</i>	Mallorca y Menorca	Cordero-Campillo, 1994 Jolivet, 1951
<i>Dermacentor reticulatus</i>	Menorca	Cordero-Campillo, 1994
<i>Haemaphysalis punctata</i>	Mallorca y Menorca	Jolivet, 1951 Cordero-Campillo, 1994 Castellà <i>et al.</i> , 2001
<i>Hyalomma anatolicum excavatum</i>	Menorca	Cordero-Campillo, 1994
<i>Hyalomma lusitanicum</i>	Menorca	Gil-Collado, 1936 Castellà <i>et al.</i> , 2001
<i>Hyalomma marginatum</i>	Menorca	Gil-Collado, 1936 Castellà <i>et al.</i> , 2001
<i>Ixodes ventalloi</i>	Baleares	Cordero-Campillo, 1994
<i>Ixodes ricinus</i>	General	Cordero-Campillo, 1994
<i>Rhipicephalus (Boophilus) anulatus</i>	Menorca	Castellà <i>et al.</i> , 2001
<i>Rhipicephalus bursa</i>	General	Cordero-Campillo, 1994 Castellà <i>et al.</i> , 2001
<i>Rhipicephalus turanicus</i>	Menorca	Castellà <i>et al.</i> , 2001
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	General	Cordero-Campillo, 1994

1.6. EFECTOS SOBRE EL HOSPEDADOR

A consecuencia de sus hábitos hematófagos, los Ixodidae producen efectos patológicos bien de tipo directo o indirecto. Los efectos directos corresponden a aquellos que son provocados por la propia acción hematófaga de cualquiera de las fases de desarrollo de los Ixodidae. Los efectos indirectos incluyen aquellos producidos por los patógenos (virus, bacterias y protozoos) que son transmitidos por las picaduras hematófagas de los Ixodidae, que actúan de este modo como vectores biológicos de enfermedades.

A continuación se detallan los efectos patológicos tanto directos como indirectos más frecuentes debido a las picaduras por Ixodidae.

- 1.6.1. Efectos directos:

1. Pérdida de sangre, ocasionando anemias que pueden provocar la muerte del animal y/o hacerlo susceptible a otras enfermedades a causa del debilitamiento originado (SONESHINE *et al.*, 2002). Se ha calculado que una hembra de gran tamaño puede expoliar más de 8 g de sangre por ingesta (SONESHINE 1991).
2. Desarrollo de miasis debido a la picadura producida por la garrapata.
3. Respuestas tóxicas y alérgicas provocadas por los antígenos y sustancias anticoagulantes presentes en la saliva de los Ixodidae que es inoculada durante el proceso de alimentación.
4. Destrucción tisular, provocando inflamaciones de los tejidos de alrededor de la zona de fijación. Las consecuencias de la inflamación dependen de la zona afectada. Dolor localizado que puede derivar en cojera, trastornos visuales y auditivos, etc.

- 1.6.2 Efectos indirectos:

Los Ixodidae son importantes vectores de agentes patógenos. Su particular fisiología y biología favorecen la transmisión de virus, bacterias y protozoos, causando elevadas pérdidas económicas en la ganadería, así como graves problemas de salud en las personas afectadas por alguno de los citados patógenos. De las 692 especies de Ixodidae descritas a nivel mundial se han identificado un total de 38 especies como vectores de enfermedades. El potencial vectorial de los Ixodidae se justifica en razón de:

1. Lo prolongado de su período de alimentación, que permite la transmisión bidireccional de los agentes patógenos.
2. La presencia de transmisión transtadial (larva-ninfa-adulto) y transovárica (transmisión de la hembra a la siguiente generación) de los agentes patógenos.
3. La coincidencia durante la alimentación de distintas fases de una misma especie, lo que favorece la transmisión horizontal de diferentes especies de agentes patógenos.
4. Su capacidad para alimentarse sobre distintos hospedadores, que permite la transmisión de los agentes patógenos de unos a otros.
5. Una elevada dispersión relacionada siempre con la del hospedador, ya que los Ixodidae se sujetan firmemente a la piel de éste.
6. El elevado potencial reproductor de las hembras, capaces de depositar cientos o miles de huevos.
7. Su capacidad de sobrevivir a largos periodos de inanición.

1.7. PRINCIPALES PATÓGENOS BACTERIANOS TRANSMITIDOS POR IXÓDIDOS

Los principales géneros de bacterias patógenas transmitidas por garrapatas son: *Anaplasma/Ehrlichia*, *Bartonella*, *Borrelia*, *Coxiella*, *Francisella* y *Rickettsia*. Seguidamente se explicarán los aspectos más importantes de cada uno de estos géneros.

1.7.1.- *Anaplasma/Ehrlichia* spp.:

Las anaplasmosis y ehrlichiosis humanas se han convertido en importantes enfermedades transmitidas por garrapatas por su elevada incidencia y morbilidad (BAKKEN *et al.*, 2000; DUMLER *et al.*, 2005). Las especies bacterianas que afectan más a los humanos son *E. chaffeensis*, causante de la ehrlichiosis monocítica humana, *E. ewingii*, causante de la ehrlichiosis granulocítica (BULLER *et al.*, 1999; DAWSON *et al.*, 1991; TELFORD *et al.*, 2004) y *A. phagocytophilum* (DUMLER *et al.*, 2001) causante de la anaplasmosis granulocítica humana (AGH).

Existen otras especies de *Anaplasma* y *Ehrlichia* que tienen alto interés veterinario. Algunos ejemplos son: *A. ovis* y *A. marginale* que tienen especial importancia por ser los agentes de la anaplasmosis del ganado ovino y vacuno, respectivamente (BEDELL *et al.*, 1963; KRIER *et al.*, 1963; KOCAN *et al.*, 2004). *Anaplasma centrale* también puede infectar ganado vacuno, aunque el cuadro clínico es leve o asintomático (CARSON *et al.*, 1974).

- Epidemiología:

La distribución geográfica de *A. phagocytophilum* es amplia, extendiéndose por todo el hemisferio norte, desde Canadá hasta China (BAKKEN *et al.*, 2000; CAO *et al.*, 2000). En cambio, la distribución de casos de anaplasmosis granulocítica humana, parece estar más restringida, confirmándose en Estados Unidos y esporádicamente en Europa (DUMLER *et al.*, 2005).

Los vectores descritos para *A. phagocytophilum* son *Ixodes ricinus*, *I. scapularis* e *I. pacificus* en Estados Unidos, así como *I. persulcatus* en Asia (DUMLER *et al.*, 2001) e *I. ricinus* e *I. trianguliceps* en Europa (OGDEN *et al.*, 1998). En el caso de España, se ha detectado la presencia de *A. phagocytophilum* en *I. ricinus*, *Haemaphysalis punctata*, *Rhipicephalus bursa* y *Dermacentor reticulatus* (BARRAL, 1998).

Los principales reservorios de *A. phagocytophilum* son los roedores, équidos y los rumiantes, tanto silvestres como domésticos (TOLEDO, 2007).

Anaplasma ovis, tiene una amplia distribución a nivel mundial. Infecta los eritrocitos de ganado ovino y caprino, siendo más importante en ovino (FRIEDHOFF, 1997). Sus vectores en Europa son *D. marginatum*, *Hae. sulcata*, *R. bursa*, *R. turanicus*, (las cuatro, presentes en la Península Ibérica) y el argásido *Ornithodoros lahorensis* (CORDERO CAMPILLO *et al.*, 1994).

En el caso de *A. marginale*, presenta una distribución en zonas tropicales y subtropicales (SEVILLA *et al.*, 2002). Afecta a gran número de especies de rumiantes, provocando cuadros más graves en grandes rumiantes (KUTTLER, 1984). En España, se han descrito unas veinte especies de Ixodidae que pueden actuar como vectores (STILLER *et al.*, 1995; ZAUGG *et al.*, 1996), aunque la más competente es *R. bursa* (SEVILLA *et al.*, 2002).

- Situación en España:

El primer caso de Anaplasmosis Granulocítica Humana en España fue referido en el año 2000 en La Rioja (OTEO *et al.*, 2000). En un estudio serológico realizado en esta misma región con 197 sueros obtenidos de trabajadores forestales, pacientes con la enfermedad de Lyme y personas con historial de picadas por garrapatas, encontraron un 14% de seropositividad (OTEO *et al.*, 2001).

Existen otros estudios sobre *A. phagocytophilum*, siendo la mayoría del Norte de España donde *I. ricinus* está ampliamente distribuida. Se ha detectado la presencia de *A. phagocytophilum* en ganado vacuno (JUSTE *et al.*, 1989), ovino (BARRAL *et al.*, 1998), ciervos, aves, (DE LA FUENTE *et al.*, 2005), gatos y perros (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2006), aunque previsiblemente los principales reservorios de este agente sean los hospedadores de *Ixodes ricinus*.

1.7.2.- Bartonella spp.:

Las bacterias del género *Bartonella* son responsables de un amplio grupo de enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes.

Hasta 1993 sólo se había reconocido una especie de *Bartonella* (*B. bacilliformis*) implicada en patología humana, provocando la enfermedad de Carrión. Gracias a las técnicas de biología molecular y de cultivo, se describieron nuevas especies de *Bartonella*, que en algunos casos han sido implicadas en patología humana. Algunos ejemplos de ello son *B. henselae*, causante de la enfermedad por arañazo de gato; *B. quintana*, causante de la enfermedad de las trincheras o *B. vinsonii*, causante de endocarditis (BLANCO *et al.*, 2005).

- Epidemiología:

Los diferentes géneros de *Bartonella* están ampliamente distribuidos por la geografía terrestre, a excepción de *B. bacilliformis* que está reducida a ciertas regiones de la cordillera de los Andes (BLANCO *et al.*, 2005).

Los principales vectores de la mayoría de los géneros de *Bartonella* son las pulgas. En el caso de *B. bacilliformis* y *B. grahamii* se ha descrito como vector a *Lutzomyia verrucarum* (Diptera, Psycodidade) (BILLETER *et al.*, 2008).

Recientemente, se han considerado a las garrapatas como vectores potenciales de especies de *Bartonella*. Se ha demostrado que numerosas especies de garrapatas han sido positivas a *Bartonella* spp. con estudios basados principalmente en PCR y raramente por cultivo (BILLETER *et al.*, 2008). Se ha detectado ADN de *B. henselae* en ejemplares de *I. ricinus*, *I. scapularis*, *I. pacificus*, *I. persulcatus* y en *R. sanguineus* (SANOGO *et al.*, 2003; BOULOUIS *et al.*, 2005, WIKSWO *et al.*, 2007)).

Los principales reservorios son los félidos, roedores y los humanos (BLANCO *et al.*, 2005). Los félidos y roedores, debido a su amplia distribución mundial y el frecuente contacto con los humanos, tienen una gran relevancia epidemiológica como reservorios de *Bartonella*.

- Situación en España:

En Cataluña en 2005, se analizaron sueros de gatos por inmunofluorescencia, detectando una prevalencia del 29,6% frente a *Bartonella henselae* (PONS *et al.*, 2005). Otro estudio realizado en Cataluña y Mallorca en el 2006 se detectó un 71,4% de positivos frente a *B. henselae* (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2006).

En el caso de estudios realizados en personas, en 2002 se analizaron sueros de individuos con VIH e individuos no portadores, encontrando prevalencias del 13% y del 15% de *B. henselae*, respectivamente (RAMOS VARGAS *et al.*, 2002).

1.7.3.- *Borrelia* spp.:

Las especies del género *Borrelia* que son patógenas para el hombre se clasifican dentro de dos grandes grupos: las que causan la Enfermedad de Lyme (*B. burgdorferi* s.l.; hasta la fecha se han descrito 12 genoespecies de *B. burgdorferi* s.l. (TOLEDO, 2007)) y las que producen fiebres recurrentes (causadas por 21 especies distintas de *Borrelia*). Otro grupo interesante, lo forman las especies de *Borrelia* que, por sus características microbiológicas y genéticas, están más cercanas al grupo de especies causantes de fiebre recurrente. Dichas fiebres están transmitidas por

garrapatas de la familia Argasidae, sin embargo este grupo de *Borrelias* son transmitidas por ixódidos (GIL *et al.*, 2005).

Las principales especies patógenas para los animales son *B. anserina*, *B. theileri* y *B. coriaceae* (LANE *et al.*, 1985; ZINGG *et al.*, 1994; SCHWAN *et al.*, 2002).

- Epidemiología:

Borrelia burgdorferi s.l. se trata de un agente de distribución mundial (SCHMIND, 1985; BENNETT, 1995), que afecta especialmente a países del hemisferio norte (SCHMID, 1985; NADELMAN *et al.*, 1998).

En Europa existe abundante información sobre 5 genoespecies de *B. burgdorferi* s.l. En el caso de *B. garinii*, *B. afzelii* y *B. valaisiana* se ha cultivado y detectado en gran parte de Europa, a diferencia de *Borrelia burgdorferi* s.s. que se localiza más en el oeste del continente (WANG *et al.*, 1999). Finalmente *B. lusitaniae* se ha detectado en menos países: Portugal (NUNCIO *et al.*, 1993), España (ESCUADERO *et al.*, 2000), República Checa, Moldavia y Ucrania (POSTIC *et al.*, 1997).

En el caso de España, el primer aislado de *B. burgdorferi* s.l. se realizó en 1992 (GARCÍA-MONCÓ *et al.*, 1992). Se ha descrito la presencia de las mismas genoespecies que en el resto de Europa, salvo *B. bissetti* (ESCUADERO *et al.*, 2000). Además, en España se detectó recientemente una nueva especie de *Borrelia* que no pertenecía ni al grupo de Lyme ni al grupo de las enfermedades recurrentes (GIL *et al.*, 2005).

Los vectores competentes para *B. burgdorferi* s.l. son los ixódidos. Este patógeno es transmitido al menos por cinco especies del género *Ixodes* a nivel mundial. En Europa se sabe que es transmitida por *I. ricinus* e *I. persulcatus*. En España además se ha aislado en *I. trianguliceps*, *I. frontalis* y *Hae. punctata*, si bien se considera que no son capaces de transmitir la infección a un nuevo hospedador (ESTRADA-PEÑA, 1994; ESTRADA-PEÑA *et al.*, 1995; BARRAL *et al.*, 2002). En Norteamérica y en Eurasia hasta 12 especies de ixódidos han sido implicadas en el mantenimiento de los ciclos de *B. burgdorferi* s.l. en la naturaleza, a pesar de que no existen pruebas experimentales de su competencia vectorial (HUBBARD *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 1999; FUKUNAGA *et al.*, 2000; PAROLA *et al.*, 2001).

Otras especies de *Borrelia* transmitidas por ixódidos son *B. miyamotoi*, aislada en *I. persulcatus* (FUKUNAGA *et al.*, 1995) y *B. lonestari*, aislada en *A. americanum* (ARMSTRONG *et al.*, 1996; BARBOUR *et al.*, 1996).

Aparte de las especies de *Borrelia* mencionadas, existen las causantes de las fiebres recurrentes. Estas bacterias son transmitidas por garrapatas de la familia Argasidae. Por ejemplo, *B. anserina* es transmitida por garrapatas del género *Argas*; *B. theileri*, y *B. coriaceae* son transmitidas por *O. coriaceus* (LANE *et al.*, 1985; ZINGG *et al.*, 1994).

Existen numerosas especies de animales (fundamentalmente aves y mamíferos) que pueden actuar como reservorios de *B. burgdorferi* s.l. Debido a que existe una alta especificidad entre geno especie y hospedador, no todos son capaces de actuar como tal en todas las geno especies descritas (KURTENBACH *et al.*, 2002).

- Situación en España:

En España, hasta la década de los 90 no se llevó a cabo un estudio continuado de la enfermedad de Lyme, a pesar de que el primer caso se detectó en 1977 (URUÑUELA *et al.*, 1977).

La distribución que presenta la enfermedad de Lyme en España coincide con la de su vector y se trata de una distribución heterogénea. La mayoría de los casos aparecen en el Norte de España (TOLEDO, 2007).

En el caso de Baleares, en el Boletín Epidemiológico (*Govern de les Illes Balears; Conselleria de Salut i Consum*) de los últimos años, aparecen citados diferentes casos de fiebres recurrentes.

1.7.4.- *Coxiella* spp.:

Dentro del género *Coxiella*, la especie más importante es *C. burnetti*, responsable de la enfermedad conocida como Fiebre Q.

Las garrapatas juegan un papel muy importante en la transmisión de la enfermedad en animales silvestres, sobretodo en lagomorfos, roedores y aves (LANG *et al.*, 1990). En cambio, no son tan esenciales en ganado, ya que la transmisión de la enfermedad se realiza sobretodo por vía aérea (BABUDIARI *et al.*, 1959) y no influyen en la transmisión al hombre (ALARCON, 2006).

- Epidemiología:

La Fiebre Q presenta una distribución mundial, excepto en la Antártida y en Nueva Zelanda (HILBINK, 1993).

Se trata de una enfermedad endémica del área mediterránea, representando problemas en la salud pública, como en Francia donde en 1996 se encontró una seroprevalencia del 71% para anticuerpos de *C. burnetii* (THIBON *et al.*, 1996).

Los Ixodidae son los principales vectores y reservorios naturales de la Fiebre Q y se ha comprobado la transmisión por *I. ricinus*, *D. marginatus*, *R. bursa*, *R. turanicus* y el argásido *A. persicus* (ESTRADA-PEÑA 1994). En cuanto a los reservorios de la enfermedad, los más importantes son los ungulados domésticos como el ganado ovino, vacuno y caprino (RAOUL *et al.*, 1995).

- Situación en España:

En el caso de España, después de un brote en 1981 (RUIZ-TELLEZ *et al.*, 1985), se reconoció la Fiebre Q como un problema de salud pública. La enfermedad es más predominante en el norte de España, sobretodo en el País Vasco y Navarra (TELLEZ *et al.*, 1988). Durante los años 1984 y 2004, sólo en la provincia de Guipuzcoa se detectaron por serología 1261 casos de Fiebre Q (MONTES *et al.*, 2006). En el sur y centro de España, la enfermedad no es tan importante. Por ejemplo, un estudio realizado en Huelva detectaron un 5 % de prevalencia (LEPE *et al.*, 1999).

Existen pocos estudios donde se demuestre la importancia de las garrapatas en los ciclos naturales de la fiebre Q. En el 2009, TOLEDO *et al.*, detectó por primera vez, la presencia de *C. burnetti* en cuatro especies de garrapatas sobre vegetación y animales silvestres, presentando valores de prevalencia del 7,7% y 3,4% respectivamente.

1.7.5.- *Francisella* spp.:

Las zoonosis provocadas por *Francisella* sp. son poco frecuentes pero muy graves. De las diferentes especies de *Francisella* que se conocen, la más virulenta es *F. tulariensis* subsp. *tularensis*, adoptando un nivel de seguridad 3 (CROSS *et al.*, 1993).

La Tularemia, además de transmitirse por artrópodos, puede hacerlo por contacto directo con material infectado, ingestión o inhalación de aerosoles infectados (ANDA *et al.*, 2001). Las garrapatas son responsables de alrededor del 50% de los casos de Tularemia (ROHRBACH *et al.*, 1991).

Existen otras especies de *Francisella* que pueden ser patógenas para humanos. Se trata de las endosimbiontes *Francisella-like*.

- Epidemiología:

La Tularemia es endémica en muchos países del hemisferio norte, como por ejemplo en México, EEUU y Canadá (TARNVIK *et al.*, 2003). En el caso de Europa, la enfermedad esta ampliamente distribuida con alta incidencia en los países escandinavos (HUBALEK *et al.*, 1997).

Esta bacteria afecta a una gran cantidad de animales silvestres como lagomorfos, roedores, insectívoros, carnívoros, ungulados, marsupiales, aves y anfibios. Las garrapatas actúan como vector y como reservorio (ELIASSON *et al.*, 2002). Las especies que actúan como vector en humanos a nivel mundial son *I. dentatus*, *A. americanum*, *D. variabilis* y *D. andersoni* (PAROLA *et al.*, 2001). En Europa encontramos *I. ricinus*, *D. marginatus* y *D. reticulatus* (HIGGINS *et al.*, 2000).

En cuanto a *Francisella-like* se han descritas especies en: *O. moubata* y *O. porcinus* (NODA *et al.*, 1997; SUN *et al.*, 2000), *D. andersoni*, *D. variabilis*, *D. hunteri*, *D. nitens*, *D. occidentalis*, y *D. albipictus* (NIEBYLSKI *et al.*, 1997; SUN *et al.*, 2000; SCOLES *et al.*, 2004) y *A. maculatum* (SCOLES *et al.*, 2004), lo que sugiere que los endosimbiontes *Francisella-like* están ampliamente distribuidos entre las garrapatas.

- Situación en España:

El primer caso de transmisión de la enfermedad por una picadura de garrapata fue en octubre en Valladolid en 1998 (ALKORTA *et al.*, 2000). El resto de casos se ha atribuido siempre al contacto con animales (GARCÍA-PEÑA *et al.*, 1998; CAMPOS *et al.*, 1999; ALKORTA *et al.*, 2000; ANDA *et al.*, 2001; PÉREZ-CASTRILLÓN *et al.*, 2001).

1.7.6.- *Rickettsia* spp.:

Las rickettsiosis transmitidas por garrapatas son causadas por especies de *Rickettsia* que pertenecen al grupo de las fiebres manchadas (GFM), y se consideran un modelo de enfermedades emergentes (PAROLA *et al.*, 2005).

Hasta 1984 sólo se conocían 4 *Rickettsia* patógenas: *R. rickettsii* en América; *R. conorii* en Europa, África y suroeste de Asia; *R. sibirica* en Siberia y oeste de Rusia; *R. australis* en Australia. Desde 1984 a 2005 se identificaron 11 nuevas especies o subespecies del GFM, *R. japonica* en Japón; *R. conorii* subsp. *caspia* en Europa y África; *R. africae* en África y América; *R. honey* en Australia, Asia y América; *R. slovacica* en Europa; *R. sibirica* subespecie *mongolitimonae* en Asia, Europa y África; *R.*

heilongjianghensis en Asia; *R. helvetica* en Europa y Asia; *R. marmionii* en Australia; *R. aeschlimannii* en Europa y África y, finalmente, *R. parkeri* en Estados Unidos (PAROLA *et al.*, 2005). Recientemente, se ha demostrado la patogenicidad de *R. massiliae* (VITALE *et al.*, 2006) y *R. monacensis* (JADO *et al.*, 2007).

- Epidemiología:

Los ixódidos pueden actuar como vectores y reservorios de las rickettsias del GFM. Algunos de los vectores más importantes son *R. sanguineus*, *R. turanicus*, *D. marginatus*, *D. sylvarum*, *Hyalomma marginatum*, , *Hae. concina*, *D. variabilis* (RENVOISÉ *et al.*, 2009).

- Situación en España:

Seguidamente se detallaran las principales enfermedades y los vectores de las principales especies de *Rickettsia* spp. que pueden encontrarse en España.

Rickettsia conorii: es el agente causal de la fiebre exantemática mediterránea (FEM), endémica de los países de la cuenca mediterránea. El vector principal es la garrapata del perro *R. sanguineus* (FERNANDEZ-SOTO *et al.*, 2006a; BROUQUI *et al.*, 2007). Los hospedadores habituales son pequeños mamíferos y perros; el humano (ANTON *et al.*, 2008; ESPEJO-ARENAS *et al.*, 1989) es un hospedador accidental.

Rickettsia slovaca: provoca la enfermedad de DEBONEL (*Dermacentor-borne necrosis-erithema-Lymphadenopathy*) (OTEO *et al.*, 2002). Hasta la fecha se ha detectado en todos los países europeos en *D. marginatus* y *D.*

reticulatus (FERNÁNDEZ-SOTO *et al.*, 2006b; MÁRQUEZ, 2008; ORTUNO *et al.*, 2007; OTEO *et al.*, 2006; TOLEDO *et al.*, 2009b) y en humanos (IBARRA *et al.*, 2006; PORTA *et al.*, 2008).

Rickettsia aeschlimannii: provoca un cuadro muy parecido a las Fiebre Exantemática Mediterránea. Se ha detectado en *H. marginatum* recogida sobre ganado y equino (TOLEDO *et al.*, 2009b) y sobre humanos (FERNÁNDEZ-SOTO *et al.*, 2009). También se ha detectado ADN de *R. aeschlimannii* en otras cinco especies de garrapata (*I. ricinus*, *Hae. punctata*, *R. bursa*, *R. sanguineus* y *R. turanicus*) y en personas (FERNÁNDEZ-SOTO *et al.*, 2006a).

Rickettsia massiliae: provoca un cuadro muy parecido a las Fiebre Exantemática Mediterránea. Se ha detectado en *I. ricinus* (FERNÁNDEZ-SOTO *et al.*, 2004), *R. bursa* (TOLEDO *et al.*, 2009b), *R. pusillus* (MÁRQUEZ, 2008; TOLEDO *et al.*, 2009b), *R. turanicus* (MÁRQUEZ, 2008; ORTUNO *et al.*, 2008) y *R. sanguineus* (MÁRQUEZ, 2008; OTEO *et al.*, 2006; TOLEDO *et al.*, 2009b) en animales y en humanos (BERNABEU-WITEL *et al.*, 2006; FERNÁNDEZ-DE-MERA *et al.*, 2009).

Rickettsia monacensis: provoca un cuadro similar a las Fiebre Exantemática Mediterránea. Ha sido detectada en *Hae. punctata* (MÁRQUEZ, 2008), en *I. ricinus* en animales (FERNÁNDEZ-SOTO *et al.*, 2004; MÁRQUEZ, 2008; TOLEDO *et al.*, 2009b) y en humanos (JADO *et al.*, 2007).

Rickettsia sibirica subsp. mongolitimonae: descrita en España en 2008, en un paciente del País Vasco (AGUIRREBERGOA *et al.*, 2008). Un año más

tarde tuvo lugar la primera detección en la zona centro de España en *R. bursa* sobre vacuno y ovino y *R. pusillus* sobre conejos (TOLEDO *et al.*, 2009b).

1.7.7.- Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos.

Existen multitud de técnicas moleculares para la detección e identificación de los diferentes patógenos bacterianos explicados anteriormente (tabla 2).

Estos métodos nos ayudan a detectar los patógenos tanto en los posibles vectores como en los hospedadores. De este modo, podemos conocer las enfermedades circulantes en una zona, además de la capacidad de transmisión y mantenimiento de la enfermedad en los reservorios.

Tabla 2: Agentes patógenos y técnicas moleculares de detección.

Patógeno	Técnica molecular	Referencias
<i>Anaplasma/Ehrlichia</i> spp.	PCR, PRC-RFLP, PCRrt, RLB	Pusterla <i>et al.</i> , 1999 Inokuma <i>et al.</i> , 2001 Bekker <i>et al.</i> , 2002
<i>Bartonella</i> spp.	PCR, MLST, MST	Iredel <i>et al.</i> , 2003 Fenollar <i>et al.</i> , 2004
<i>Borrelia</i> spp.	Ribotipado, PFGE, RAPDs, PCRrt, RLB	Van Der Heijden <i>et al.</i> , 1999
<i>Coxiella</i> spp.	PCR, PCR anidada, PCRrt, RLB	
<i>Francisella</i> spp.	PCR combinada, gen <i>lpnA</i> , microrrays, MLST, MLVA	Ibrahim <i>et al.</i> , 1996 Sjostedt <i>et al.</i> , 1997 Enright <i>et al.</i> , 1999 Farlow <i>et al.</i> , 2001 Broekhuijsen <i>et al.</i> , 2003
<i>Rickettsia</i> spp.	PCR, PCR anidada, RFLP, PCR-RLB	Fournier <i>et al.</i> , 2003 Jado <i>et al.</i> , 2006

PCR: Polymerase Chain Reaction; PCR-RFLP: Polymerase Chain Reaction of Restriction Fragments Length Polymorphism; rtPCR: real time Polymerase Chain Reaction; RLB: Reverse Line Blotting; MLST: Multilocus Sequence Typing; MST: Multisapcer Sequence Typing; PFGE: Pulsed-field Gel Electrophoresis; RAPDs: Random Amplified Polymorphic DNA; MLVA: Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeats Analysis

1.8.- PREVENCIÓN Y CONTROL

Los Ixodidae provocan pérdidas económicas a nivel de ganadería por su acción hematófaga y transmiten una serie de enfermedades graves tanto a los animales como a los humanos. Afectan aproximadamente a 800 millones de cabezas de ganado vacuno y un número similar de ovejas en todo el mundo y se estima que el impacto mundial de enfermedades transmitidas por Ixodidae puede llegar a ser de 7 millones de dólares anuales (SONENSHINE, 1993). Suponen por tanto un grupo importante sobre el que se aplican medidas de control para reducir sus poblaciones, tanto en el medio ambiente como sobre los animales. Sin embargo, su control tiene una serie de limitaciones, como son: (1) su gran dispersión en la vegetación, lo que dificulta una aplicación eficaz de los acaricidas sin afectar al medio ambiente; (2) la posición fija que adopta a la hora de alimentarse, que obliga a tratar íntegramente al animal para llegar hasta las zonas más protegidas; (3) su gran capacidad reproductiva, que requiere frecuentes tratamientos de los animales y de los hábitats para evitar las reinfestaciones; (4) la extraordinaria longevidad de la mayoría de especies, que les permite persistir ocultas durante meses e incluso años después de los intentos de control.

En cuanto a los tipos de control que se pueden aplicar frente a las especies de Ixodidae, se distingue, como es habitual en el control de plagas y vectores, el control químico, cultural, biotecnológico y biológico. Por otra parte, la protección personal frente a las picaduras de Ixodidae si bien no constituye un sistema de control en sí, supone un elemento indispensable para la prevención de sus picaduras.

El **control químico** consiste en la aplicación de acaricidas tanto en vegetación como en animales.

En cuanto a los métodos de aplicación, diferenciamos principalmente cuatro tipos: (1) tratamiento directo cubriendo al animal, mediante líquidos o polvos; (2) tratamientos sistémicos por inyección directa al animal; (3) tratamiento sobre la vegetación por impregnación (4) automedicación o impregnación pasiva (SONENSHINE Y HAINES, 1985; SONENSHINE, 1993).

En la actualidad, la clasificación de las principales familias de acaricidas es la siguiente: organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretrinas y piretroides (ESTRADA-PEÑA, 1994).

El uso de acaricidas, como el de insecticidas en agricultura, también puede dar lugar a una serie de problemáticas, como por ejemplo los fenómenos de resistencia. Se han demostrado resistencias a acaricidas organoclorados como cyclodiene, lindano y ocasionalmente, a organofosforados (SONENSHINE, 1993). La contaminación del medio ambiente y los problemas de salud que puede causar tanto en animales como en personas es otro problema asociado a este tipo de control. Debido a todo ello, en la actualidad se promueve el uso de métodos alternativos que minimicen la cantidad de acaricidas utilizados para el control de los Ixodidae. Dichos métodos pueden ser de tipo cultural, biológico o biotecnológico.

El **control cultural**, consiste en la utilización de las prácticas agrícolas y ganaderas con el propósito de prevenir la incidencia de plagas y vectores al modificar el ambiente e interferir así en su ciclo de desarrollo. Un ejemplo de estos métodos es la modificación del hábitat que consiste en realizar una serie de acciones como el manejo de la vegetación, como es el caso de la quema controlada de la vegetación. En un estudio realizado por FERNÁNDEZ Y GARCÍA (1994), se observó que la densidad de larvas de

Boophilus microplus se redujo de un 50 a un 80% utilizando la quema controlada.

Otro tipo es el **control biológico**; este consiste en la introducción o aumento deliberado de depredadores, parásitos o patógenos que controlan la población de especies vectores. Un ejemplo de ello es el uso de hongos entomopatógenos como *Metarhizium anisopliae*. Se ha demostrado mediante estudios *in vitro* sobre *R. microplus* una efectividad del 56.3% (WEBSTER *et al.* 2015).

En cuanto al **control biotecnológico** existen diferentes sistemas: **plaguicidas de origen biológico**: por ejemplo *Bacillus thuringiensis*, en el estudio de ZHIOUA *et al.* (1999) sobre *I. scapularis* observó un 96% de la mortalidad de la población; **plaguicidas bioracionales** (feromonas y hormonas) como en el trabajo de STREY *et al.* (2001) donde demostraron que una exposición de pyriproxyfen inhibía la muda en ninfas de *Amblyomma americanum*, provocando la muerte de una cuarta parte de los individuos tratados antes o durante la ecdisis y la **lucha autocida** donde HAYES & OLIVER (1981) demostraron que el tratamiento de huevos de *D. variabilis* con productos químicos lleva a la parcial o completa esterilización en hembras adultas emergidas de los huevos tratados.

Actualmente, el tipo de control más utilizado es el **control integrado** o lucha integrada. La FAO en 1965 definió la lucha integrada como un sistema de regulación de las poblaciones de plagas, que teniendo en cuenta el medio y la dinámica poblacional, utiliza todas las técnicas adecuadas de forma compatible con el propósito de mantener las plagas por debajo de niveles de daño económico.

Así pues, se trata de una metodología en la que se combina varias estrategias compatibles simultáneamente para maximizar el control teniendo en cuenta el bajo impacto sobre el medio ambiente. Un ejemplo sería la combinación de la aplicación de acaricidas, la modificación de hábitats con limpieza de vegetación y el control de hospedadores. El trabajo realizado por WEBSTER *et al.*, (2015) ha demostrado que una combinación de *Metarhizium anisopliae* con deltametrina tiene una eficacia del 97,9% sobre el control de *Boophilus microplus*.

Finalmente existe la **protección personal**, se basa principalmente en evitar el contacto directo con las garrapatas. Para ello se recomienda no frecuentar zonas marcadas como infestadas, así como evitar el contacto con la vegetación y tratar de no descansar sobre terreno en el que pueda haber Ixodidae activos. En el caso de visitar zonas donde se sospeche su presencia, es aconsejable no dejar ninguna parte del cuerpo expuesta. También se puede rociar la ropa con algún tipo de acaricida de baja toxicidad, como los piretroides. Si se produce la picadura y fijación de un Ixodidae en cualquier parte del cuerpo, es preferible realizar la extracción sujetando al parásito por el hipostoma, como muestra la Figura 11, y no por el idiosoma, ya que de este modo se asegura la separación íntegra del parásito.

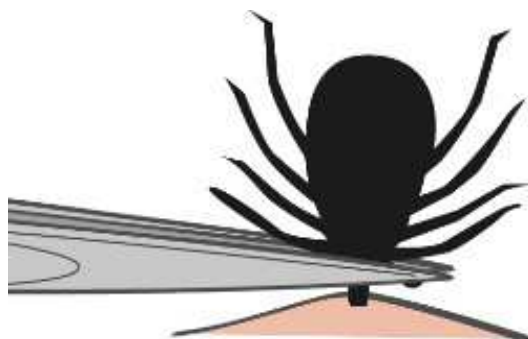


Figura 11: Método correcto para la extracción de un Ixodidae.

Fuente: www.lymediseaseaction.org

Otros métodos no aconsejables utilizados popularmente para la extracción de los Ixodidae son el uso de cigarrillos, la aplicación de aceites o de vaselinas, etc. Dichos métodos pueden producir efectos como irritación de la piel, infecciones, ruptura del cuerpo del parásito o incremento del riesgo de transmisión de patógenos debido al aumento de producción de saliva por parte de la garrapata.



OBJETIVOS

2.- OBJETIVOS

- 1.- Conocer la fauna de Ixodidae presentes en el ganado ovino en diferentes zonas ganaderas de Mallorca y determinar la prevalencia y la carga parasitaria de garrapatas.
- 2.- Conocer la fauna de Ixodidae presentes en la vegetación de tres zonas diferenciadas de la isla: costera, montañosa y central.
- 3.- Conocer la fauna de Ixodidae presentes en animales silvestres en Mallorca.
- 4.- Identificar los patógenos bacterianos que pueden transmitir los Ixodidae en Mallorca.

A thick purple L-shaped border is positioned in the bottom-left corner of the page, consisting of a vertical line extending upwards and a horizontal line extending to the right.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1- ANÁLISIS DE LA CARGA PARASITARIA POR GARRAPATAS EN GANADO OVINO.

3.1.1- Zonas de muestreo

El muestreo en ganado ovino se realizó en granjas de dos zonas (zonas 1 y 2) diferentes de la isla de Mallorca (Fig. 12). Las explotaciones elegidas en la zona 1, se sitúan en la ADS de la Sierra de Tramontana (gestionada por la veterinaria Sra. Núria Bosch) y las de la zona 2 en las ADS de ovino del campo mallorquín (gestionada por el veterinario Sr. Tolo Palou) y la ADS de la comarca de Levante (gestionada por la veterinaria Sra. Antonia Espinosa).

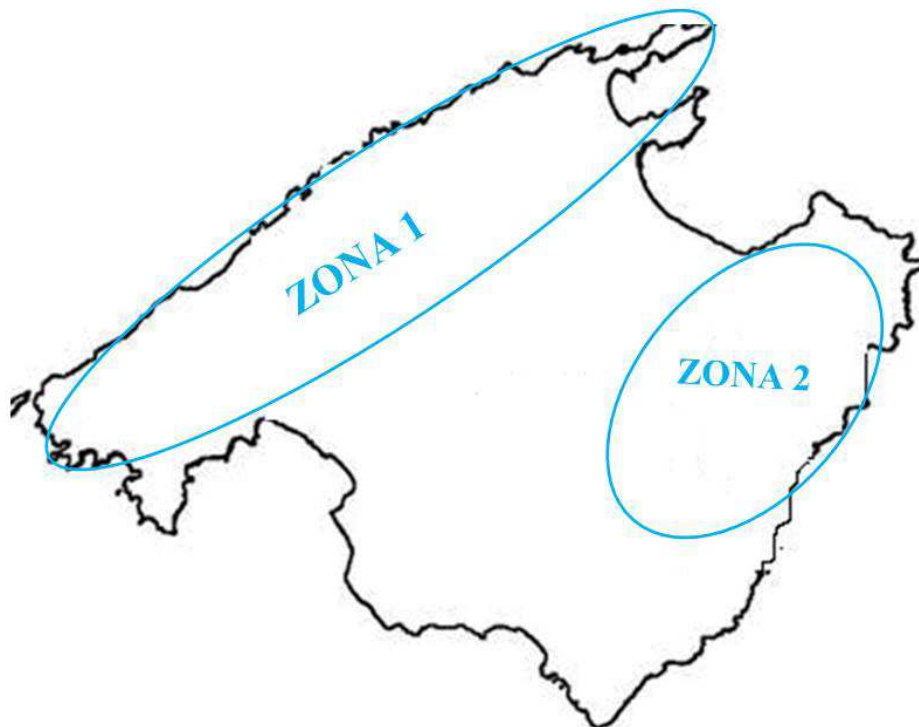


Figura 12: Localización de la zona 1 y la zona 2 del muestreo en ganado ovino.

La zona 1, se sitúa en la principal zona montañosa de la isla, la Sierra de Tramontana, localizada en parte noroeste de la isla. La vegetación está representada principalmente por pinos (*Pinus halepensis*) y encinas (*Quercus ilex*). En general el estrato arbóreo es muy compacto con las copas de los árboles formando coberturas. Por lo contrario, es sotobosque es denso con una composición florística pobre. La alianza que define la comunidad vegetal de la zona es la *Hypericum balearica*, que incluye las siguientes especies: *Hypericum balearicum*, *Teucrium asiaticum*, *Pastinaca lucida*, *Santolina chamaecyparissus*, *Paeonia cambessedessi* y *Scutellaria balearica*. Otras especies comunes que se encuentran en este hábitat son *Ampelodesmus mauritanica*, *Astragalus balearicus* y *Pistacia lentiscus* (LLORENS, LL. *et al.*, 2007).

La zona 2, se sitúa en la zona de Levante de Mallorca, localizada al noreste de la isla. En esta zona la vegetación es la típica de cultivo con pinar y garriga alrededor. Predominan especies oportunistas de zonas humanizadas como *Rubus ulmifolis*, *Sinapsis arvensis*, *Daucus carota* o *Calendula arvensis* sobre un lecho de cereal segado. Con gran abundancia de sustrato arbustivo y herbáceo (GRIMALT GELABERT *et al.*, 1991).

En cuanto a las condiciones climáticas, en la zona 1, la temperatura media puede llegar a descender 4 grados en comparación a la temperatura a nivel del mar. Además, se registra un promedio de 1400 mm de precipitación anual, mientras que en la parte meridional solo se registran unos 350 mm. Debido a ello, esta zona se caracteriza por tener un clima entre superhúmedo fresco y superhúmedo templado (Figura 13) que corresponde a ambientes con altas saturaciones de humedad y temperaturas relativamente frías. Sin embargo, en la zona 2 encontramos las condiciones típicas del clima mediterráneo, altas temperaturas en verano (por encima de

30° C) y temperaturas suaves en invierno (raramente por debajo de 5° C). Esta zona se caracteriza por tener un clima subhúmedo templado (Figura 13).

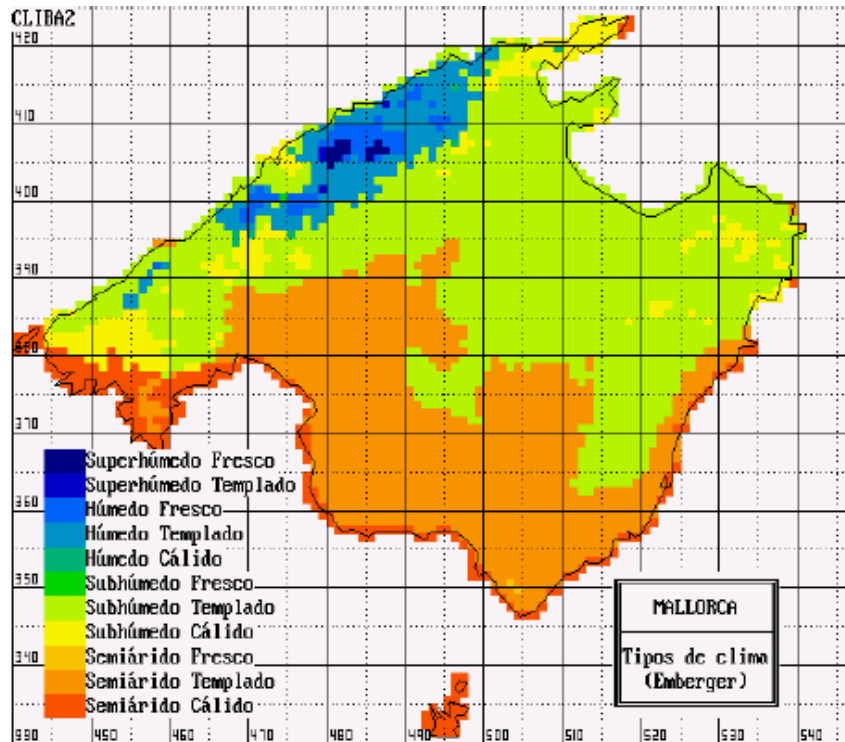


Figura 13: Subtipos del clima mediterráneo en Mallorca según la clasificación de Emberger. Fuente: Guijarro Pastor, 2001.

Las prácticas ganaderas en las zonas elegidas son totalmente diferentes. En la zona 1 las ovejas suelen estar alejadas de las explotaciones, permaneciendo en la montaña durante el día y la noche. En este caso, los animales son agrupados por los ganaderos dos veces al año para la vacunación, los tratamientos de desparasitación y el esquila. En cambio en la zona 2 las ovejas permanecen durante el día cerca de las granjas, y al llegar la noche se refugian en los establos.

Las razas más comunes son dos razas locales: "ovella Rotja mallorquina" y "ovella mallorquina"; y una ibérica: "Churra". Según datos del *Servei de*

Ramaderia de la Conselleria de Agricultura, Medi Ambient i Territori del Govern de les Illes Balears, en el año 2014 se registraron un total de 517.459 cabezas de ovino en las Islas Baleares.

Otro aspecto interesante que diferencia estas dos zonas es la presencia de *Capra hircus* (cabra asilvestrada). En la zona 1 esta especie es muy abundante y está distribuida por toda la zona montañosa. En la zona 2 su presencia es menos abundante, limitándose su distribución mayoritariamente en la zona montañosa, en la cual no está localizada ninguna de las fincas muestreadas (Figura 14)(BIOATLES. CAIB).

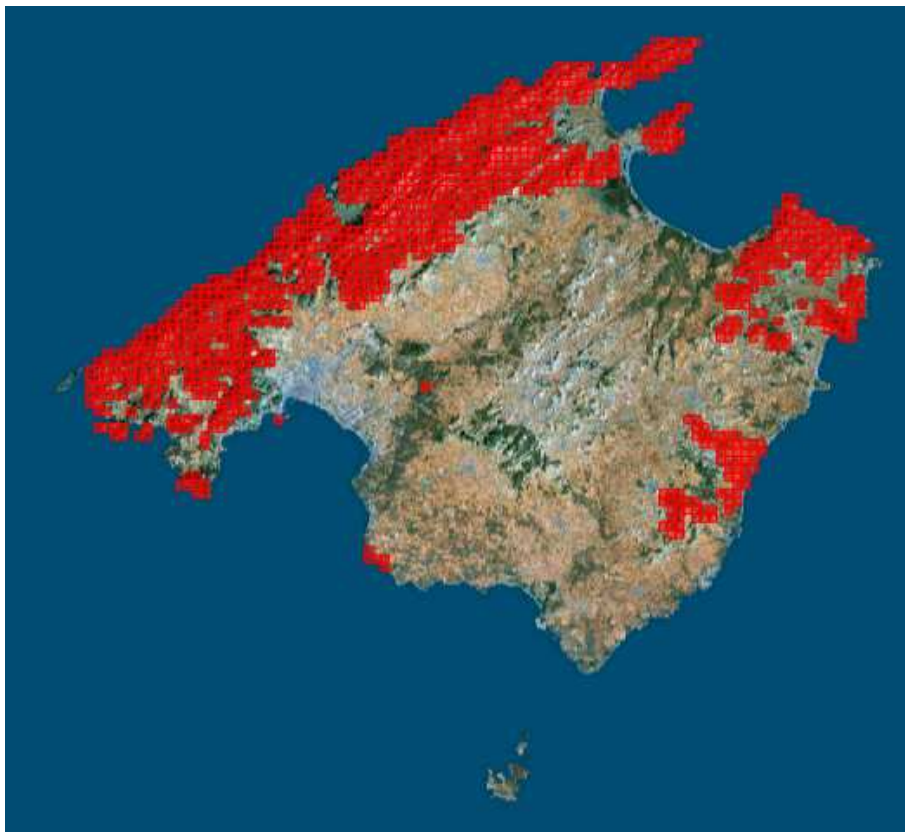


Figura 14: Distribución de *Capra hircus* en la isla de Mallorca. (Fuente. BioAltes. CAIB).

3.1.2.- Recogida de muestras

La recogida de muestras se realizó durante la época de primavera-verano, debido al tipo de manejo del ganado ovino en Mallorca. En la isla, la ganadería de ovino es de tipo extensivo y los animales sólo son agrupados durante las épocas de desparasitación y esquila. Así pues el muestreo se realizó durante la época en que los veterinarios de diferentes ADS agrupaban a los animales para llevar a cabo estas actuaciones (Figura 15). Este manejo hace que la recogida de las garrapatas sea más sencilla al tener a los animales confinados.



Figura 15: Ovejas agrupadas para la vacunación (Fuente: Miriam Monerris)

Cada uno de los animales seleccionados fue explorado en las orejas, la cara, los ojos, la zona perianal (Figura 16), las ubres y las patas. Los Ixodidae detectados se extrajeron utilizando pinzas y se transportaron vivos al laboratorio.



Figura 16: Presencia de Ixodidae en las orejas, cara y en la zona perianal de las ovejas. (Fuente: Miriam Monerri).

Una vez en el laboratorio, la mitad de los ejemplares recogidos se congelaron a -80°C para posteriores análisis moleculares de los patógenos. El resto de muestras de campo se preservaron en etanol 70% hasta su posterior determinación. Todas las identificaciones se realizaron de acuerdo con las claves de ESTRADA PEÑA *et al.*, 2004; ESTRADA PEÑA *et al.*, 1988; GIL COLLADO *et al.*, 1979 y WALKER *et al.*, 2000.

Debido a la dificultad para la diferenciación de las hembras alimentadas correspondientes al género *Rhipicephalus*, y en base a la metodología descrita por Feldman-Muhsam en 1956, se llevó a cabo una disección, desecación y posterior observación al microscopio de los poros genitales (Figura 17).

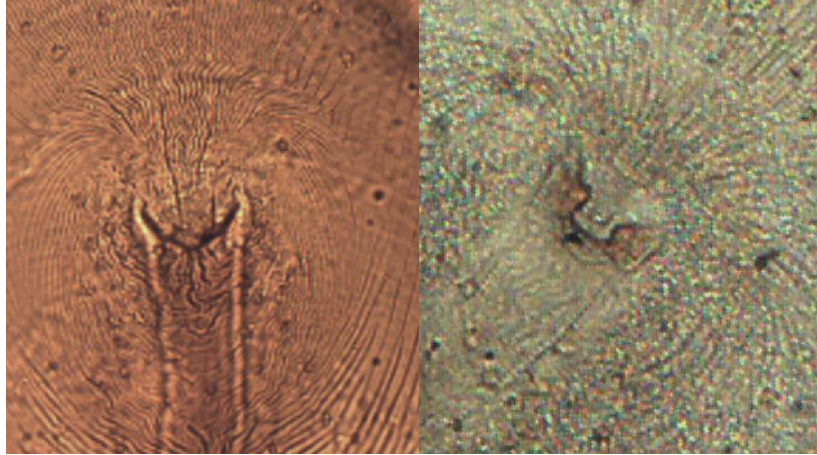


Figura 17: Poro genital de una hembra alimentada de *Rhipicephalus turanicus* (izq.) y de *Rhipicephalus sanguineus* (drcha.)(Fuente: Miriam Monerri).

En la zona 1, la toma de muestras se llevó a cabo en seis explotaciones de ovino de mayo a julio del 2007 (Figura 18). En cada uno de los rebaños, se muestrearon de 18 a 32 animales, aproximadamente un 10% del total de animales de la explotación. Se eligieron siempre adultos y que no presentaran ninguna patología aparente.

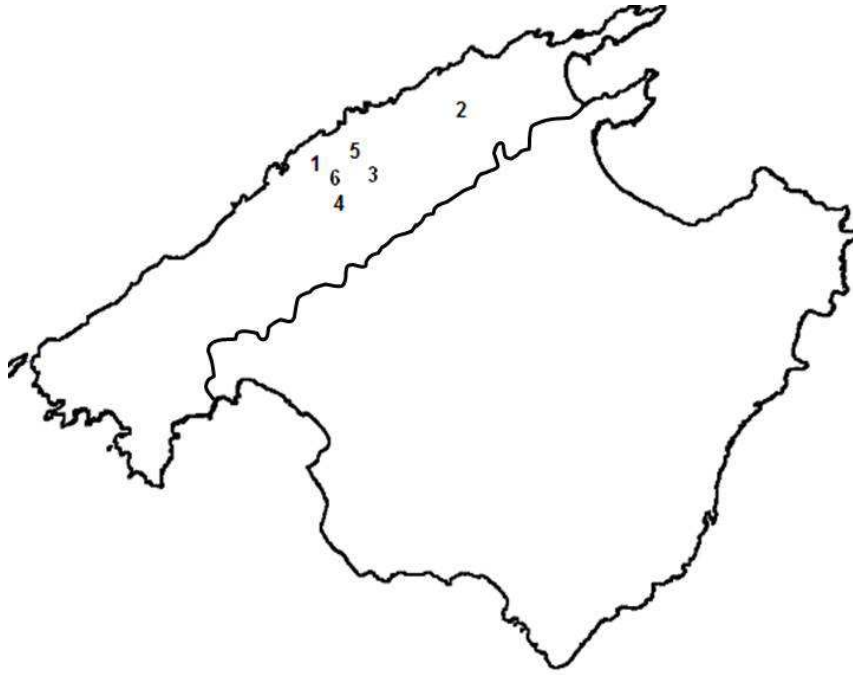


Figura 18: Localización de las explotaciones muestreadas en a zona 1 para el presente estudio (entre paréntesis se indica la fecha de muestreo): 1: Son Sales (17/05/2007); 2: Son Alzines (24/05/2007); 3: Sollerich (29/05/2007); 4: Es Pujol (04/06/2007); 5: Es Clot (29/06/2007) y 6: Sóller (02/07/2007).

En la zona 2, el muestreo se llevó a cabo de mayo a julio del 2009, en dos granjas (Son Crespí Vell y Es Cremat) y durante el mes de junio del 2010 en cuatro fincas más (Sa Mortera Sitges, Es Pou Colomer, Son Ferrers Vells y Sa Cova Vella) (Figura 19).



Figura 19: Localización de las explotaciones muestreadas en la zona 2 para el presente estudio (entre paréntesis se indica la fecha de muestreo): 1: Son Crespí Vell (15/05/09); 2: Es Cremat(07/07/09) 3: Sa Mortera Sitges (03/06/10); 4: Es Pou Colomer (23/06/10); 5: Son Ferrers Vells (23/06/10); 6: Sa Cova Vella (30/06/10).

En las fincas seleccionadas se analizaron entre 40 y 60 animales, dependiendo de las actividades llevadas a cabo por veterinarios y ganaderos.

3.1.3.- Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico aplicado a los datos obtenidos en las granjas de ovino, se utilizó el programa SWING (1997). En el caso de que las muestras siguieran una distribución normal se aplicó una t-student con un nivel de confianza del 95%. Cuando las muestras no seguían una distribución normal se aplicó el test de Kolmogorov-Smirnov, con un valor de confianza del 95%, para la comparación de dos variables y el test “Multiple Range” para comparar más de dos variables dos a dos.

Las variables comparadas fueron la abundancia, la prevalencia de infestación, el número de garrapatas por animal y la distribución en el cuerpo de las ovejas de las especies identificadas en el ganado ovino. En cuanto a la distribución de las garrapatas en el cuerpo de las ovejas también se llevó a cabo una comparación de la distribución en el cuerpo de las garrapatas totales, sin diferenciar especies.

3.2.- ANÁLISIS DE LA PRESENCIA Y ABUNDANCIA DE GARRAPATAS EN VEGETACIÓN.

3.2.1.- Zonas de muestreo

Los muestreos sobre vegetación se realizaron en nueve puntos entre abril y octubre de 2010, con el objetivo de conocer las especies de garrapatas presentes en vegetación durante la época de primavera-verano, período en el que la población humana frecuenta más las zonas de recreo en Mallorca. Para el muestreo se seleccionaron diferentes hábitats de Mallorca con la intención de comprobar si la composición de especies identificadas variaba entre las zonas. Se estudiaron tres hábitats: la zona montañosa (puntos 1, 2 y 3), la zona central de la isla (puntos 4, 5 y 6) y la zona costera (puntos 7, 8 y 9) (Figura 20).

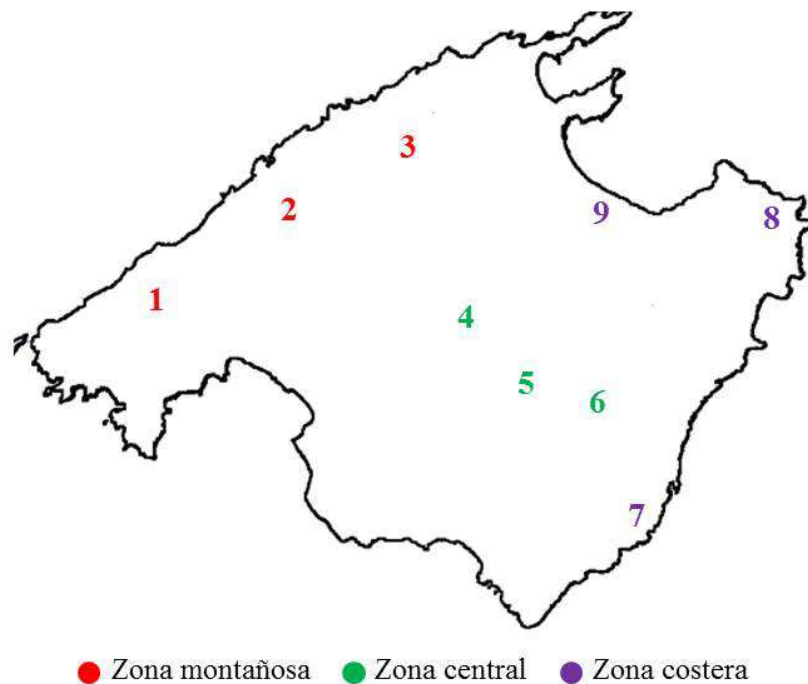


Figura 20: Localización de los puntos de muestreo de vegetación para el presente estudio (Población) (altitud): Zona montañosa; 1.- Comuna de Esporles (Esporles)(310m), 2.- Sa Bassa (Fornalutx)(554m), 3.- Menut (Escorca)(752m); Zona central; 4.- Comuna de Loret (Lloret)(125m), 5.- Monti-Sion (Porreres)(130m), 6.- Puig Sant Salvador (Felanitx)(202m); Zona costera; 7.- S’Amarador (Santanyí)(38m), 8.- Cala Agulla (Capdepera)(33m), 9.- Platges de Muro (Muro)(0m).

Los diferentes puntos de muestreos se escogieron por criterio de accesibilidad al tratarse de zonas de uso público. En las cercanías de los puntos muestreados se sitúan zonas de recreo en las cuales los visitantes o excursionistas aprovechan para descansar. Este hecho es interesante, ya que son zonas donde las personas pueden estar en contacto con las garrapatas.

Cada zona se caracteriza por tener una vegetación (Figura 21) y unas condiciones climáticas distintas. Las características de la zona montañosa coinciden con las descritas previamente para la zona 1 en el apartado 3.1.1.

Las condiciones climáticas de la zona central y de la costera son muy similares a las descritas para la zona 2 del muestreo de ganado ovino.

En cuanto a la vegetación de la zona central, encontramos una zona de garriga de acebuche (*Oleo-Ceratonion*). En estas zonas de bosque podemos encontrar especies como *Cistus monspeliensis*, *Cistus scoparius*, *Erica multiflora* y *Pistacia lentiscus* (GRIMALT GELABERT *et al.*, 1991).

En el caso de la zona costera podemos distinguir dos zonas. Una zona litoral, sobre dunas recientes y móviles y otra más alejada sobre dunas ya fijas. En el presente estudio se ha muestreado sobre dunas fijas. En esta zona encontramos la asociación *Crucianelletum maritimae* donde debido a la poca movilidad de las dunas se hace posible la colonización por parte de especies leñosas. A medida que el sustrato se estabiliza aparecen comunidades de garriga postduna con *Cneoro-Ceratonietum* con cobertura de *Pinus halepensis*. Estos pinares son abiertos y crean un sotobosque poco sombrío en que solo llegan a prosperar arbustos esclerófilos. Las especies que se caracterizan son *Teucrium dunense*, *Helichrysum stoechas* o *Teucrium polium* v. *maritimum* (GRIMALT GELABERT *et al.*, 1991, LLEONARD *et al.*, 2007).



Figura 21: Zonas de muestreo de vegetación: zona montañosa (arriba), zona central (izq.), zona costera (drcha.).

3.2.2.- Recogida de muestras

Una vez elegidas las zonas de muestreo se llevó a cabo el muestreo de las garrapatas presentes en la vegetación usando la técnica del arrastre de manta, con una periodicidad mensual (SONENSHINE, 1993).

El procedimiento consistió en arrastrar una manta de felpa blanca de dimensiones 1 m x 1.5 m (1.5 m²) (Figura 22). Así pues, según la superficie que cubre la manta y los metros recorridos se pueden calcular los metros cuadrados muestreados. Cada 20 pasos (10 m aproximadamente) se procedía a la recolección las garrapatas adultas para evitar su desprendimiento, repitiendo el proceso 10 veces. Una vez acabado el muestreo, se introducía la manta en una bolsa blanca cerrada, y posteriormente en el laboratorio, se revisaban las mantas y se recogían las ninfas y las larvas. En todos los muestreos se llevaba un registro de la

hora de inicio y de finalización, la temperatura, la humedad relativa y observaciones sobre la climatología del momento.



Figura 22: Muestreo de la vegetación mediante el método de la manta (dcha.) y detalle de una garrapata en la manta (izq.)

La identificación de las garrapatas se llevó a cabo con las mismas claves de determinación que figuran en el apartado 3.1.2.

3.2.3.- Cálculo del índice de abundancia

Para conocer la densidad de ixódidos y compararlo con las diferentes zonas de muestreo se utilizó el índice de abundancia de garrapatas (IA), expresado en número de garrapatas por metro cuadrado de superficie muestreada.

$$IA = NG \times 100/a$$

Siendo NG: núm. de garrapatas capturadas; a: superficie de muestreo en m²

En dicho apartado no pudo realizar ningún análisis estadístico debido al bajo número de individuos muestreado.

3.2.4.- Cálculo del Índice de Shannon-Weaver

Para conocer la diversidad que presentan las diferentes zonas muestreadas se calculó el Índice de Shannon-Weaver. Dicho índice se basa en la teoría de la información y por tanto en la probabilidad de encontrar un determinado individuo en un ecosistema. Refleja la heterogeneidad de una comunidad sobre la base de dos factores: el número de especies presentes y su abundancia relativa. Se calcula de la siguiente forma:

$$H = - \sum_{i=1}^s pi \cdot \log_2(pi)$$

$$pi = n_i/N$$

Siendo n_i = número de individuos en el sistema de la especie determinada i ;
 N = número total de individuos.

3.3.- ANALISIS DE LA CARGA PARASITARIA POR GARRAPATAS EN FAUNA SILVESTRE.

Para el muestreo de fauna silvestre se colaboró con el Centro de Recuperación de Fauna Silvestre de las Islas Baleares (COFIB).

En el COFIB se recogen animales procedentes de toda la geografía insular. Con las garrapatas recolectadas en la fauna silvestre del Centro de Recuperación obtenemos datos sobre la parasitación por ixodidae de la fauna local, que pueden resultar de especial interés para el estudio de la bioecología hospedador-parásito y la epidemiología de los agentes patógenos transmitidos por las garrapatas. En el siguiente mapa (Figura 23) se localizan todos los municipios donde se encontraron animales silvestres y fueron trasladados al centro.

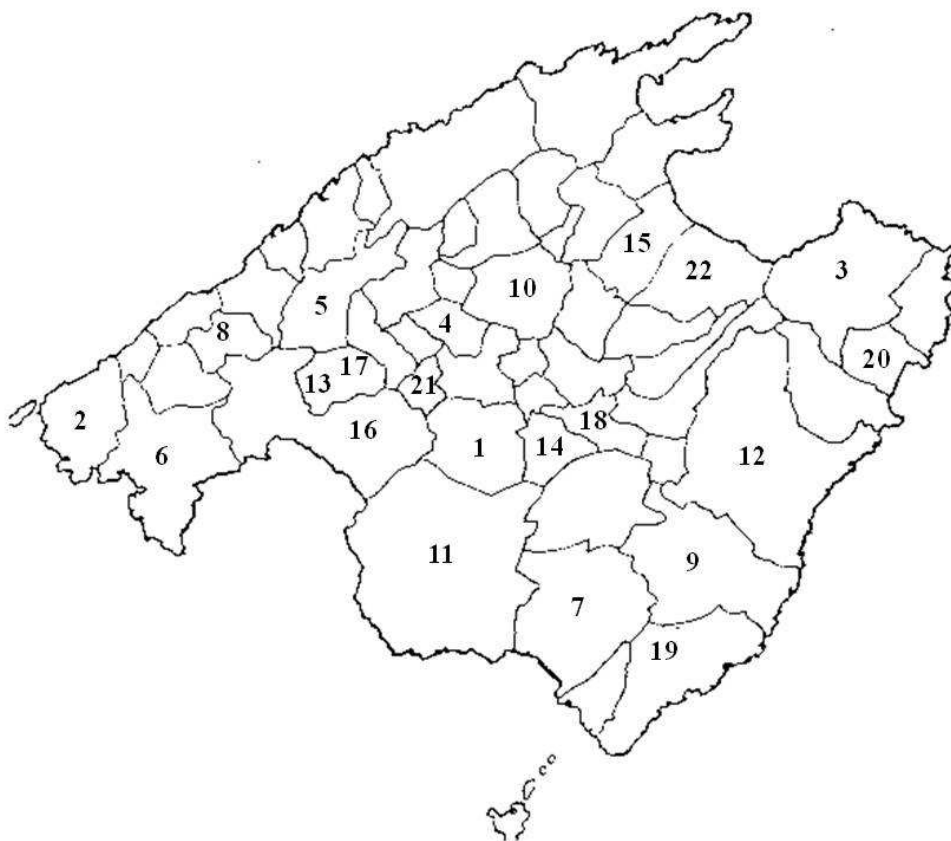


Figura 23: Localización de los puntos donde se recogieron los animales silvestres que han sido incluidos en este estudio. 1. Algaida; 2. Andratx; 3. Artà (P.N.Llevant); 4. Binissalem; 5. Bunyola; 6. Calvià; 7. Campos; 8. Esporles; 9. Felanitx; 10. Inca; 11. Lluçmajor; 12. Manacor; 13. Marratxi; 14. Montuïri; 15. Muro; 16. Palma; 17. Pòrtol; 18. Sant Joan; 19. Santanyi (P.N. Mondragó); 20. Son Servera; 21. Sta. Eugènia; 22. Sta. Margalida.

3.3.1.- Recogida de muestras.

La recogida de muestras se llevó a cabo por el servicio veterinario del COFIB. Los animales que recibía el centro eran desparasitados, guardando las garrapatas obtenidas a -20°C en viales debidamente rotulados. Periódicamente las muestras eran trasladadas al laboratorio de Zoología de la UIB para su identificación, usando las claves descritas en el apartado 3.1.2.

Las garrapatas fueron recolectadas de 39 animales (14 aves y 25 mamíferos) pertenecientes a 10 especies diferentes entre el 2008 y el 2010. Las especies de animales silvestres inspeccionados fueron las siguientes; aves: águila calzada (*Hieraaetus pennatus*; Falconiformes; Accipitridae) (n=6), autillo (*Asio otus*; Stringiformes; Stringidae) (n=1), alcaraván (*Burhinus oedicephalus*; Charadriiformes; Burhinidae) (n=4), cernícalo (*Falco tinnunculus*; Falconiformes; Falconidae) (n=1), gaviota patiamarilla (*Larus michahellis*; Charadriiformes; Laridae) (n=1), pardela (*Puffinus* sp., Procelariiformes; Procelariidae) (n=1) y mamíferos: conejo común (*Oryctolagus cuniculus*; Lagomorpha; Leporidae) (n=1), erizo moruno (*Atelerix algirus*; Erinaceomorpha; Erinaceidae) (n=18), gineta (*Genetta genetta*; Carnivora; Viverridae) (n=2), marta (*Martes martes*; Carnivora; Mustelidae) (n=4).

3.4.- DETECCION DE PATÓGENOS BACTERIANOS.

3.4.1.- Selección de garrapatas del ganado ovino, animales silvestres y vegetación.

Del total de garrapatas identificadas (2017 individuos) se analizó un 13% de las mismas, siendo un 53% de las muestras de ovino, un 24% de las muestras de vegetación y un 23% de las muestras de animales silvestres. En las garrapatas recolectadas sobre animales se analizaron aquellas que no presentaban signos aparentes de haberse alimentado.

De todas las muestras analizadas, un 40% de las mismas fueron analizadas en el Instituto de Salud Carlos III (Madrid, España), en el centro de Microbiología, en el curso de una estancia doctoral de abril a mayo de 2008. Durante la estancia se aprendieron las técnicas necesarias para la

detección de patógenos bacterianos en garrapatas. El resto de muestras se analizaron en el Laboratorio de Zoología de la Universidad de las Islas Baleares, donde se puso a punto la técnica.

El criterio de selección del número de individuos analizados por especie, en el caso de ovino se hizo según la abundancia de las especies recolectadas. Para los ejemplares de animales silvestres se tuvo en cuenta tanto el hospedador como las especies de ixódidos. Se escogieron ejemplares recogidos en todos los hospedadores de todas las especies presentes, dependiendo de la abundancia. En el caso de vegetación, al recolectarse pocos individuos, se analizaron todos.

3.4.2.- Técnicas empleadas para la identificación de patógenos

Con el fin de poder detectar todos los patógenos de interés en este estudio (*Anaplasma/Ehrlichia*, *Bartonella*, *Borrelia*, *Coxiella*, *Francisella* y *Rickettsia*), se llevaron a cabo los siguientes procedimientos (protocolos en anexo III):

1.- Extracción de ADN a partir del Kit de extracción QIAamp Viral RNA de QIAGEN con pequeñas modificaciones del procedimiento recomendado por el fabricante realizadas en ISCIH. Se utilizó este Kit debido a que la idea inicial era la detección de bacterias y virus y con las modificaciones realizadas se podían extraer los ácidos nucleicos de ambos patógenos.

2.- Una amplificación del ADN a través de una PCR multiplex (ANDA *et al.*, 2005).

3.- Hibridación en fase sólida por *Reverse Line Blotting* (RLB) (ANDA *et al.*, 2005). En dicha técnica se utilizaron membranas con sondas genéricas y específicas.

Las muestras positivas para *Anaplasma/Ehrlichia*, *Borrelia*, *Francisella* y *Rickettsia*, se mandaron al Laboratorio de Espiroquetas y Patógenos especiales del Centro de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III.

Para los positivos de *Rickettsia* se llevó a cabo un RLB con sondas específicas. En el caso de los positivos de *Anaplasma/Ehrlichia*, *Borrelia* y *Francisella* se realizó secuenciación, en los dos primeros casos del fragmento 16S y en el tercero de TUL4 (lpnA).

Para *Borrelia*, además se realizó un árbol filogenético basado en secuencias parciales de 16S rRNA. Las secuencias se alinearon con otras disponibles en la base de datos GenBank mediante el programa informático ClustalX (HIGGINS *et al.*, 1988). Las matrices de distancias por pares (*pairwise distance matrices*) se determinaron mediante el método Kimura-2-parámetros utilizando el programa MEGA5 (TAMURA *et al.*, 2011) y los árboles filogenéticos se construyeron aplicando el algoritmo de Neighbour-Joining con análisis mediante el método bootstrap para evaluación de la topología.

A thick purple L-shaped border is positioned on the left and bottom edges of the page. The vertical line starts at the top left and goes down to the bottom left. The horizontal line starts at the bottom left and goes right across the bottom of the page.

RESULTADOS

4.- RESULTADOS

4.1.- ESPECIES DE GARRAPATAS IDENTIFICADAS

En el presente estudio se han identificado un total de 2017 garrapatas, de las cuales 1674 se obtuvieron de ganado ovino (83%), 61 de vegetación (3%) y 282 de animales silvestres (14%).

De los ejemplares procedentes del ganado ovino, 1073 se recolectaron en la zona 1 (64%) y 601 en la zona 2 (36%). En el caso de la vegetación, 16 garrapatas se recogieron en la zona costera (26,2%); 38 en la zona central (63,3%) y 7 en la zona montañosa (11,5%).

Se han identificado 12 especies a partir del total de ejemplares de garrapatas recolectadas que se muestran en la tabla 3. Once de las especies identificadas pertenecen a la familia de los Ixodidae: *Dermacentor marginatus* (Sulzer, 1776); *Haemaphysalis punctata* Canestrini & Fanzago, 1878; *Hyalomma lusitanicum* Koch, 1844; *Ixodes arboricola* Schulze & Schlottke, 1930; *Ixodes frontalis* Panzer, 1795; *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758); *Ixodes ventalloi* Gil Collado, 1936; *Rhipicephalus bursa* (Canestrini & Fanzago, 1878), *Rhipicephalus pusillus* Gil Collado, 1938; *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1805) y *Rhipicephalus turanicus* Pomerantsev, 1936. La doceava especie pertenece a la familia de los Argasidae: *Ornithodoros maritimus* Vermeil & Marguet, 1967.

Tabla 3: Especies de garrapatas recolectadas, procedencia del muestreo y citas en Baleares.

Especie	Procedencia del muestreo	Cita en Baleares
<i>D. marginatus</i>	Vegetación	Gil-Collado 1936
<i>H. punctata</i>	Ovino	Cordero-Campillo, 1994
<i>H. lusitanicum</i>	Ovino, vegetación y animales silvestres	Gil-Collado 1936 Castellà, 2001
<i>I. arboricola</i>	Animales silvestres	Primera cita: Monerris <i>et al.</i> , 2011
<i>I. frontalis</i>	Vegetación y animales silvestres	Primera cita: Monerris <i>et al.</i> , 2011
<i>I. ricinus</i>	Animales silvestres	Cordero-Campillo, 1994
<i>I. ventalloi</i>	Vegetación y animales silvestres	Cordero-Campillo, 1994
<i>R. bursa</i>	Ovino	Cordero-Campillo, 1994 Castellà, 2001
<i>R. pusillus</i>	Vegetación y animales silvestres	Primera cita: Monerris <i>et al.</i> , 2011
<i>R. sanguineus</i>	Ovino, vegetación y animales silvestres	Cordero-Campillo, 1994
<i>R. turanicus</i>	Ovino, vegetación y animales silvestres	Castellà, 2001
<i>O. maritimus</i>	Animales silvestres	Primera cita: Monerris <i>et al.</i> , 2011

4.2.- CARGA PARASITARIA POR GARRAPATAS EN GANADO OVINO.

En el muestreo realizado sobre el ganado ovino, se identificaron cinco especies diferentes de garrapatas: *Hae. punctata*; *H. lusitanicum*; *R. bursa*; *R. sanguineus* y *R. turanicus*.

Como se ha comentado en la metodología, se muestrearon fincas de dos zonas diferenciadas de Mallorca: la zona 1 y la zona 2. A continuación se presentan los resultados para cada una éstas.

4.2.1.- Zona 1:

En la zona 1 se analizaron un total de 160 ovejas, obteniéndose un 83,7 % de ovejas parasitadas por garrapatas.

Se registraron un total de 1073 garrapatas, de las cuales se identificaron tres especies: *Hae. punctata*, *R. sanguineus* y *R. turanicus*. De *Hae. punctata* sólo se encontró un ejemplar y no se ha tenido en cuenta en los porcentajes de parasitismo.

De las otras dos especies, la más abundante fue *R. turanicus* con un 67%, seguida de *R. sanguineus* con un 33%, observándose diferencias significativas ($p < 0,05$) en la abundancia entre ambas especies. El porcentaje de abundancia de garrapatas en las fincas muestreadas fue diferente entre ellas (Tabla 4). En cinco de ellas *R. turanicus* fue la especie más abundante, con un rango de abundancia comprendido entre el 41% y el 96,3%. Sólo en el caso de la finca de Sollerich la especie más abundante fue *R. sanguineus* con un 59%.

Tabla 4: Número de animales muestreados, número de garrapatas obtenidas y abundancia en % de *R. turanicus* y *R. sanguineus* en las diferentes granjas muestreadas en la zona 1.

Granja	Nº animales	Nº garrapatas	Abundancia (%)	
			<i>R. turanicus</i>	<i>R.sanguineus</i>
Son Sales	29	269	96,3	3,7
Son Alzines	23	92	93,5	6,5
Sollerich	27	420	41	59
Es Pujol	31	59	67,8	32,2
Es Clot	18	54	83,3	16,7
Sòller	32	179	65,4	34,6
Total	160	1073	67	33

En la tabla 5 se observan los resultados de la prevalencia, expresado como el porcentaje de animales parasitados por garrapatas. En el caso de *R. turanicus* se registró en un 47% de los animales positivos del estudio y *R. sanguineus* en un 11,9%; un 41%, presentaron una co-infestación de las dos especies, observándose diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las prevalencias de *R. turanicus* vs. *R. sanguineus* y *R. sanguineus* vs. *R. turanicus*+ *R. sanguineus*. Analizando por fincas, se aprecia que cuatro de las seis fincas muestreadas presentaron los mayores valores de prevalencia para *R. turanicus*, en cambio, en el caso de Sollerich y Sòller los valores de co-infestación son los más altos, con un 69,2% y 60% respectivamente. No se observó ninguna granja donde *R. sanguineus* fuera la especie más prevalente.

Tabla 5: Número de animales muestreados, prevalencia de infestaciones del total de animales, prevalencia de *R. turanicus*, *R. sanguineus* y prevalencia de la co-infestación (respecto al total de animales positivos), expresadas en %, de las diferentes granjas muestreadas en la zona 1.

Granjas	Número animales	Prevalencia (%)			
		Animales parasitados	<i>R. turanicus</i>	<i>R. sanguineus</i>	<i>R. turanicus</i> + <i>R. sanguineus</i>
Son Sales	29	100	69	3,4	27,6
Son Alzines	23	91,3	85,7	0	14,3
Sollerich	27	96,3	7,7	23	69,2
Es Pujol	31	54,8	41,2	23,5	35,3
Es Clot	18	61,1	72,7	9,1	18,2
Sòller	32	93,8	26,7	13,5	60
Total	160	82,8	47	11,9	41

En cuanto al número de garrapatas por animal (Tabla 6). Se encontró una media total de $5,1 \pm 2,7$ garrapatas por animal (ga/a) con un mínimo de $2,3 \pm 1,8$ ga/a y un máximo de $8,7 \pm 7,1$ ga/a. Los resultados obtenidos por especies de garrapatas fueron $3,7 \pm 4$ ga/a en caso de *R. turanicus* y $1,4 \pm 1,9$ ga/a en el caso de *R. sanguineus*, observándose diferencias significativas ($p < 0,05$) entre las dos especies. El número de garrapatas por animal fue superior en el caso de *R. turanicus*, menos en Sollerich, donde los valores obtenidos de *R. sanguineus* fueron mayores ($5,1 \pm 6$ ga/a).

Tabla 6: Número de animales muestreados, media total y por especies del número de garrapatas por animal en cada una de las granjas muestreadas en la zona 1.

Granjas	Número animales	$\bar{x} \pm sd$		
		Total	<i>R.turanicus</i>	<i>R.sanguineus</i>
Son Sales	29	8,7 ± 7,1	8,4 ± 6,9	0,6 ± 0,5
Son Alzines	23	4,2 ± 4,1	3,9 ± 4,2	0,3 ± 0,8
Sollerich	27	8,6 ± 8,7	3,5 ± 5,2	5,1 ± 6
Es Pujol	31	2,3 ± 1,8	1,5 ± 2	0,7 ± 1,1
Es Clot	18	3,2 ± 2,9	2,6 ± 2,8	0,5 ± 1,3
Sòller	32	3,6 ± 2,8	2,3 ± 2,8	1,2 ± 1,5
Total	160	5,1 ± 2,7	3,7 ± 4	1,4 ± 1,9

En cuanto a la distribución de las garrapatas en el cuerpo del hospedador, hubo diferencias en el caso de la zona 1. Del total de las garrapatas registradas un 71,9 % estaban situadas en la zona de las orejas, mientras que sólo un 28,1 % se registró en la zona perianal, habiendo una diferencia significativa ($p < 0,05$) entre la presencia de garrapatas en ambas zonas del animal.

Del mismo modo, también hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) en la distribución de *R. turanicus* (Figura 24) y *R. sanguineus* (Figura 25) en el cuerpo del hospedador. *Rhipicephalus turanicus* presentó mayor preferencia por la zona de las orejas, con un 89,5 % de los individuos registrados, frente a un 10,5 % de la zona perianal. Por el contrario *R. sanguineus* presentó un 90,7 % de los individuos en la zona perianal frente a un 9,3 % en las orejas.

Se registró el mismo patrón de distribución en el cuerpo del hospedador tanto para *R. turanicus* como para *R. sanguineus* en todas las fincas, menos

en el caso de Son Salas y Son Alzines, donde el predominio de ambas especies fue en la zona de las orejas.

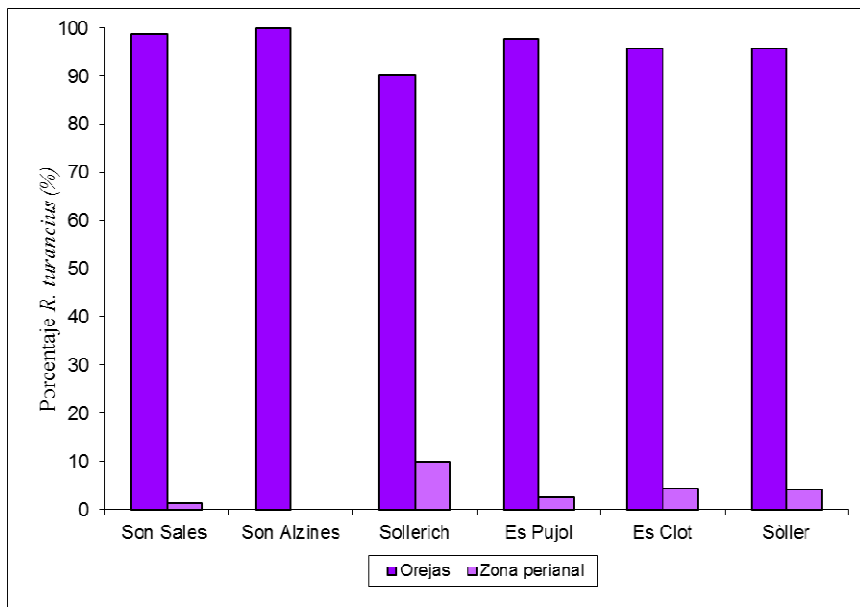


Figura 24: Porcentaje de *R. turanicus* en las orejas y la zona perianal de las ovejas en las diferentes granjas muestreadas.

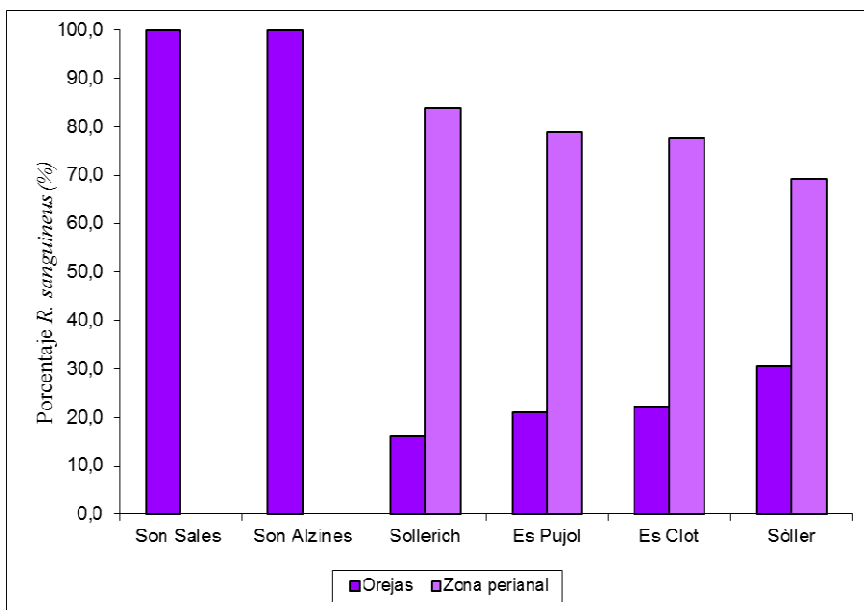


Figura 25: Porcentaje de *R. sanguineus* en las orejas y la zona perianal de las ovejas en las diferentes granjas muestreadas.

4.2.2.- Zona 2:

En la zona 2 se analizaron 311 ovejas, de las cuales un 66 % estaban parasitadas.

Se registraron un total de 601 garrapatas, diferenciando cuatro especies: *H. lusitanicum*, *R. bursa*, *R. sanguineus* y *R. turanicus*.

Las especies más abundantes en la zona 2 fueron *R. turanicus* con una media del 88,2 % seguida de *R. bursa* (11,8 %), *H. lusitanicum* (4,5 %) y finalmente *R. sanguineus* (1,5 %) (Tabla 7), observándose diferencias significativas ($p < 0,05$) solamente entre *R. turanicus* y el resto de especies.

En cinco granjas de las seis muestreadas, la abundancia de *R. turanicus* fue mayor respecto al resto de especies, con valores del 76 al 98%. Sólo en el caso de Es Pou Colomer la especie más abundante fue *R. bursa* con un 80%. Para *R. sanguineus* y *H. lusitanicum* se obtuvieron valores relativamente más bajos que para el resto de las especies.

Tabla 7: Número de animales muestreados, número de garrapatas identificadas y abundancia en % de *H. lusitanicum*, *R. turanicus*, *R. sanguineus* y *R. bursa* en cada una de las granjas muestreadas en la zona 2.

Granja	Nº animales	Nº garrapatas	Abundancia (%)			
			<i>H. lusitanicum</i>	<i>R. turanicus</i>	<i>R. sanguineus</i>	<i>R. bursa</i>
Son Crespí Vell	40	74	1,4	98,6	0	0
Es Cremat	68	21	19,0	76,2	4,8	0
Sa Mortera Sitges	53	246	1,2	97,6	0,8	0,4
Es Pou Colomer	37	70	12,9	4,3	2,9	80,0
Son Ferreres Vell	47	65	0	87,7	0	12,3
Sa Cova Vella	66	125	8,0	84,0	3,2	4,8
Total	311	601	4,5	88,2	1,5	11,8

En la tabla 8 se muestran las prevalencias (expresadas por el porcentaje de animales parasitados por garrapatas) de cada especie y las co-infestaciones. La mayor prevalencia la presentó *R. turanicus*, con una prevalencia del 76,5% de los animales parasitados, el resto de prevalencias se sitúan entre un 14,2% (*R. bursa*) i un 0,5% (*R. bursa* + *H. lusitanicum*). No se observó ninguna oveja parasitada únicamente por *R. sanguineus*. Se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) entre *R. turanicus* con el resto de especies y las co-infecciones.

Para las diferentes granjas muestreadas la prevalencia máxima fue de *R. turanicus*, menos en el caso de Es Pou Colomer donde la mayor prevalencia fue de *R. bursa* con un 85,2 %.

La especie *R. turanicus* fue la única que se registró en todas las granjas muestreadas, mientras que *H. lusitanicum* se detectó en cinco de ellas y finalmente *R. bursa* y *R. sanguineus* se registraron únicamente en cuatro de las granjas estudiadas.

Tabla 8: Número de animales muestreados, prevalencias del total de animales, prevalencias de *H. lusitanicum* (*H.l.*), *R. turanicus* (*R.t.*), *R. sanguineus* (*R.s.*) y *R. bursa* (*R.b.*) y prevalencias de co-infestaciones (respecto al total de animales), en cada una de las granjas muestreadas en la zona 2.

Granja	Número de animales	Prevalencia (%)								
		Animales parasitados	<i>H.l</i>	<i>R.t</i>	<i>R.b</i>	<i>R.t+H.l</i>	<i>R.t+R.s</i>	<i>R.t+R.b</i>	<i>R.b+H.l</i>	<i>R.t+R.b+R.s</i>
Son Crespí Vell	40	82,5	0	97	0	3	0	0	0	0
Es Cremat	68	26,5	11,1	88,9	0	0	0	0	0	0
Sa Mortera Sitges	53	100	0	94,3	0	1,9	1,9	1,9	0	0
Es Pou Colomer	37	73	3,7	3,7	85,2	0	0	0	3,7	3,7
Son Ferrers Vell	47	46,8	0	72,7	22,7	0	0	4,5	0	0
Sa Cova Vella	66	77,3	2	80,4	2	5,9	3,9	5,9	0	0
	311	66	2	76,5	14,2	2,5	1,5	2,5	0,5	0,5

En cuanto al número de garrapatas por animal (Tabla 9), en total se obtuvieron $2,7 \pm 2,7$ (ga/a) con un rango de $1,3 \pm 0,5$ ga/a a $4,7 \pm 5,1$ ga/a.

Por especies, los valores más elevados correspondieron a *R. turanicus* con $2,2 \pm 2,5$ ga/a, seguido de *R. bursa* con $0,4 \pm 0,4$ ga/a, *H. lusitanicum* con $0,2 \pm 0,3$ ga/a y *R. sanguineus* con $0,03 \pm 0,1$ ga/a, observándose diferencias significativas ($p < 0,05$) entre *R. turanicus* y el resto de las especies. En las diferentes granjas muestreadas el número de garrapatas por animal fue superior para *R. turanicus*, menos en el caso de Es Pou Colomer donde los valores de *R. bursa* fueron mayores ($1,7 \pm 1,5$ ga/a).

Tabla 9: Número de animales muestreados, media total y por especies del número de garrapatas por animal en cada una de las granjas muestreadas en la zona 2.

Granja	Número animales	$\bar{x} \pm sd$				
		Total	<i>H. lusitanicum</i>	<i>R. bursa</i>	<i>R. sanguineus</i>	<i>R. turanicus</i>
Son Crespí Vell	40	$2,2 \pm 1,6$	0	0	0	$2,2 \pm 1,5$
Es Cremat	68	$1,3 \pm 0,5$	$0,3 \pm 0,7$	0	0	$1 \pm 0,6$
Sa Mortera Sitges	53	$4,7 \pm 5,1$	0	0	0	$4,6 \pm 5,2$
Es Pou Colomer	37	$2,6 \pm 1,5$	$0,6 \pm 1,2$	$1,7 \pm 1,5$	$0,1 \pm 0,4$	$0,2 \pm 0,4$
Son Ferreres Vell	47	$3 \pm 5,3$	0	$0,4 \pm 0,7$	0	$2,6 \pm 5,5$
Sa Cova Vella	66	$2,6 \pm 1,9$	$0,2 \pm 0,1$	$0,1 \pm 0,4$	$0,1 \pm 0,3$	$2,2 \pm 1,6$
	311	$2,7 \pm 2,7$	$0,2 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,4$	$0,03 \pm 0,1$	$2,2 \pm 2,5$

4.3.- GARRAPATAS RECOLECTADAS EN VEGETACIÓN.

En el estudio sobre vegetación se muestrearon tres zonas: zona central, zona montañosa y zona costera. Para conocer la densidad de las garrapatas y poder comparar los diferentes hábitats elegidos, se calculó el índice de

abundancia ($IA=NGX100/a$) (explicado en el apartado 3.1.2.3 del capítulo de material y métodos).

La zona con mayor índice (ga/m^2) (Tabla 10) fue la zona central, seguida de la costera y finalmente la montañosa, con unos índices de $1,6 ga/m^2$, $0,6 ga/m^2$ y $0,3 ga/m^2$ respectivamente.

Tabla 10: Área muestreada, número de garrapatas e índice de abundancia (IA) para las diferentes zonas.

Zona	Área (m^2)	Nº Garrapatas	IA
Central	2700	42	1,6
Montañosa	2700	7	0,3
Costa	2700	16	0,6

Se registraron un total de 65 garrapatas adultas de las cuales se identificaron ocho especies diferentes: *D. marginatus*, *H. lusitanicum*, *Hae. punctata*, *I. frontalis*, *I. ventalloi*, *R. pusillus*, *R. sanguineus* y *R. turanicus*.

Tabla 11: Índice de abundancia (garrapatas/ m^2 [ga/m^2]) por zonas muestreadas y especies de garrapatas identificadas.

Especie	Central	Montañosa	Costera
<i>D. marginatum</i>	0,07	0,04	0
<i>H. lusitanicum</i>	0,37	0	0,56
<i>H. punctata</i>	0	0,07	0
<i>I. frontalis</i>	0,04	0	0
<i>I. ventalloi</i>	0,26	0	0
<i>R. pusillus</i>	0,22	0	0
<i>R. sanguineus</i>	0,07	0	0
<i>R. turanicus</i>	0,52	0,15	0,04

Observando las diferentes especies por zonas, vemos que la única que se recolectó en las tres zonas fue *R. turanicus* presentando un mayor índice de abundancia en la zona de central (0,52 ga/m²). En el caso de *D. marginatum* y *H. lusitanicum* se recogieron ejemplares en dos zonas. En la zona central (0,07 ga/m²) y la montañosa (0,04 ga/m²) para *D. marginatum* y en la zona central (0,37 ga/m²) y costera (0,56 ga/m²) para *H. lusitanicum*. Finalmente el resto de especies solamente se recolectaron en la zona central.

En cuanto a la diversidad de especies por zonas, según el índice de Shannon-Weaver, la que presentó mayor diversidad fue la zona central, con un índice de 3,12; seguido de la zona de la Sierra con un índice de 0,94 y finalmente la zona de Costa con un índice de 0,01.

4.4.- CARGA PARASITARIA POR GARRAPATAS EN FAUNA SILVESTRE.

Se analizaron 39 animales silvestres de 10 especies diferentes (citadas en el apartado 3.1.3.2), en los que se identificaron 282 ejemplares de garrapatas de nueve especies distintas (Tabla 12).

Ocho de las especies identificadas pertenecen a la familia Ixodidae: *Hyalomma lusitanicum*, *Ixodes arboricola*, *Ixodes frontalis*, *Ixodes ricinus*, *Ixodes ventalloi*, *Rhipicephalus pusillus*, *Rhipicephalus sanguineus* y *Rhipicephalus turanicus*. Una novena especie, *Ornithodoros maritimus*, se incluye dentro de la familia Argasidae.

Tabla 12: Identificación, número, estadio vital y hospedador de las especies de garrapatas recogidas en animales silvestres. M: machos; H: hembras; N: ninfas; L: larvas; (n₁): número de hospedadores silvestres positivos a la presencia de garrapatas; (n₂): número de ejemplares de garrapatas encontradas sobre el hospedador.

	FASE VITAL				HOSPEDADOR SILVESTRES (n)
	M	H	N	L	
<i>H. lusitanicum</i>	24	18	-	-	<i>A. algirus</i> (8)(42)
<i>I. arboricola</i>	-	73	-	-	<i>A. otus</i> (1)(23), <i>B. oedicnemus</i> (4)(38), <i>F. tinnunculus</i> (1)(12)
<i>I. frontalis</i>	-	-	4	-	<i>H. pennatus</i> (1)(4)
<i>I. ricinus</i>	-	3	3	-	<i>M. martes</i> (1)(6)
<i>I. ventalloi</i>	2	12	-	-	<i>A. algirus</i> (1)(5), <i>G. genetta</i> (1)(5), <i>M. martes</i> (1)(4)
<i>R. pusillus</i>	22	10	-	-	<i>G. genetta</i> (1)(9), <i>M. martes</i> (1)(1), <i>O. cuniculus</i> (1)(22)
<i>R. sanguineus</i>	1	2	-	-	<i>A. algirus</i> (1)(2), <i>M. martes</i> (1)(1)
<i>R. turanicus</i>	43	40	-	-	<i>A. algirus</i> (18)(67), <i>M. martes</i> (1)(16)
<i>O. maritimus</i>	-	-	-	25	<i>L. michahellis</i> (1)(12), <i>Puffinus</i> sp. (1)(13)

Especies como *I. arboricola* y *O. maritimus* fueron encontradas sólo en aves. Por otro lado, *H. lusitanicum*, *I. ricinus*, *I. ventalloi*, *R. pusillus*, *R. sanguineus* y *R. turanicus* fueron encontrados sólo sobre hospedadores mamíferos.

De las nueve especies identificadas, seis parasitaban a diferentes hospedadores, por ejemplo *I. arboricola* a tres especies de aves, e *I. ventalloi* y *R. pusillus* a tres especies de mamíferos. Sólo tres especies de garrapatas fueron encontradas en una sola especie de hospedador, estas fueron: *H. lusitanicum* en *Atelerix algirus*, *I. frontalis* en *Hieraaetus pennatus* e *I. ricinus* en *Martes martes*.

En cuanto a los estadios de los individuos, en los casos que se observaron adultos no se presenciaban fases inmaduras y a la inversa. De la única especie que hubo fases adultas e inmaduras en los hospedadores fue *I. ricinus*. En el caso de *I. frontalis* y *O. maritimus*, sólo se identificaron

ejemplares en fases inmaduras. En el resto de especies de garrapatas identificadas solamente se encontraron fases adultas; tanto machos como hembras, a excepción de *I. arboricola*, que únicamente presentó hembras.

Observando los hospedadores, en el caso de *A. algirus* y *M. martes* se identificaron cinco especies de garrapatas sobre ellos, en cambio, en el resto de hospedadores sólo se identificaron una o dos especies de garrapatas.

4.5.- PATÓGENOS BACTERIANOS EN GARRAPATAS.

Se analizaron un total de 255 ejemplares (Tabla 13) de los cuales 74 de ellos dieron positivo a algún patógeno, por lo tanto, la tasa media total de infección fue del 29%.

Tabla 13: Número de garrapatas adultas analizadas de cada especie.

Especie de Ixódido	Ejemplares en ganado ovino	Ejemplares de vegetación	Ejemplares en animales silvestres	Total
<i>D. marginatus</i>	-	2	-	2
<i>H. lusitanicum</i>	10	26	14	50
<i>H. punctata</i>	-	2	-	2
<i>I. arboricola</i>	-	-	11	11
<i>I. ventalloi</i>	-	4	8	12
<i>R. bursa</i>	11	-	-	11
<i>R. pusillus</i>	-	6	8	14
<i>R. sanguineus</i>	36	2	2	40
<i>R. turanicus</i>	78	19	15	112
<i>O. maritimum</i>	-	-	1	1
Total	135	61	59	255

En la tabla 14, se representan los porcentajes de los positivos y negativos de todas las especies analizadas. En cuatro de ellas no se detectó ningún positivo. De las especies que dieron positivo las que presentaron mayor porcentaje fueron *R. sanguineus* (42,5%), seguida de *I. arboricola* (36,4%), *R. turanicus* (33,4%), *R. pusillus* (21,4%), *H. lusitanicum* (20%) y finalmente *R. bursa* (18,2%).

Tabla 14: Porcentaje de los resultados positivos y negativos de las especies muestreadas respecto a la detección de patógenos.

Especie	Positivos (%)	Negativos (%)
<i>D. marginatus</i>	0	100
<i>H. lusitanicum</i>	20	80
<i>H. punctata</i>	0	100
<i>I. arboricola</i>	36,4	63,6
<i>I. ventalloi</i>	0	100
<i>R. bursa</i>	18,2	81,8
<i>R. pusillus</i>	21,4	78,6
<i>R. sanguineus</i>	42,5	57,5
<i>R. turanicus</i>	33,4	66,1
<i>O. maritimus</i>	0	100
Total	29	71

Los resultados de la detección de patógenos en el total de garrapatas positivas (ovino, vegetación y animales) se muestra en la tabla 15. Se observa que las especies con mayor carga patogénica fueron *H. lusitanicum*, *R. sanguineus* y *R. turanicus* siendo positivos a tres de los patógenos analizados. Les sigue *I. arboricola*, siendo positiva a dos agentes y finalmente *R. bursa* y *R. pusillus* presentando positivos sólo a un patógeno.

Tabla 15: Positivos y negativos a la detección de patógenos por especie de garrapata.

	<i>Anaplasma/Ehrlichia</i> spp.	<i>Bartonella</i> spp.	<i>Borrelia</i> spp.	<i>Coxiella</i> spp.	<i>Francisella</i> spp.	<i>Rickettsia</i> spp.
<i>H. lusitanicum</i>	+	-	-	-	+	+
<i>I. arboricola</i>	+	-	-	-	-	+
<i>R. bursa</i>	+	-	-	-	-	-
<i>R. pusillus</i>	+	-	-	-	-	-
<i>R. sanguineus</i>	+	-	+	-	-	+
<i>R. turanicus</i>	+	-	+	-	-	+

El patógeno con la tasa de infección global más elevada fue *Anaplasma/Ehrlichia* spp. con un valor del 58,1%, detectándose en todas las especies de garrapatas que dieron positivo para algún patógeno. Ya con valores menores le siguen *Rickettsia* spp. (9,4%) (detectado en *H. lusitanicum*, *I. arboricola*, *R. sanguineus* y *R. turanicus*), *Borrelia* spp. (8,1%) (detectado en *R. sanguineus* y *R. turanicus*) y *Francisella* spp. (6,7%) (detectado en *H. lusitanicum*). Para los patógenos *Bartonella* spp. y *Coxiella* spp. no se encontraron ejemplares positivos.

Se detectaron también infecciones mixtas, siendo la más elevada *Anaplasma/Ehrlichia* spp.+ *Rickettsia* spp. (10,8%), seguida de *Anaplasma/Ehrlichia* spp. + *Borrelia* spp. (5,4%) y finalmente *Anaplasma/Ehrlichia* spp. + *Borrelia* spp. + *Rickettsia* spp. (1,3%).

Analizando la detección de patógenos bacterianos en los diferentes muestreos realizados, en el caso de ganado ovino se encontró una tasa media global de infección del 42,2% (de 135 garrapatas analizadas), en vegetación una media de 13,1 % (de 61 garrapatas analizadas) y finalmente en fauna silvestre de 15,2 % (de 59 garrapatas analizadas).

En la tabla 16, se representan los porcentajes de positivos y negativos de las especies en las cuales se detectó algún patógeno por especie y zona de muestreo. Las dos únicas especies de las que se analizaron ejemplares de los tres tipos de muestreos fueron *H. lusitanicum* y *R. turanicus*, dando positivo en ganado ovino y vegetación para *H. lusitanicum* y sólo en ovino para *R. turanicus*. En el caso de *R. pusillus*, se analizaron ejemplares de vegetación y de animales silvestres, dando positivos en ambos casos. Finalmente para *I. arboricola* y *R. bursa*, sólo se analizaron ejemplares de un tipo de muestreo, en animales silvestres y ganado ovino respectivamente. En ambos casos se detectaron positivos en los ejemplares analizados.

Tabla 16: Porcentajes de positivos y negativos de garrapatas infectadas por especie y muestreo. O: ganado ovino; V: vegetación; A: animales silvestres.

Especie	Positivos (%)			Negativos (%)		
	O	V	A	O	V	A
<i>H. lusitanicum</i>	40	23,1	0	60	76,9	100
<i>I. arboricola</i>	-	-	36,4	-	-	63,6
<i>R. bursa</i>	18,2	-	-	81,2	-	-
<i>R. pusillus</i>	-	16,7	25	-	83,3	75
<i>R. sanguineus</i>	47,2	0	0	52,8	100	100
<i>R. turancius</i>	42,2	5,3	15,2	57,8	94,7	84,8

En cuanto a la presencia de los diferentes patógenos por zona de muestreo (Tabla 17), se observa que la zona de ovino se detectaron positivos para todos los patógenos incluso para todas las co-infecciones, siendo *Anaplasma/Ehrlichia* spp. el patógeno que presentó mayor tasa de infección. En el caso del muestreo en vegetación se encontraron positivos para *Anaplasma/Ehrlichia* spp., *Francisella* spp., *Rickettsia* spp., siendo en este caso también *Anaplasma/Ehrlichia* spp. el que presentó mayor tasa de infección. Finalmente en fauna silvestre se detectaron positivos para todos los patógenos menos *Francisella* spp. y la co-infección *Anaplasma/Ehrlichia* spp.+ *Borrelia* spp.

Tabla 17: Tasa de infección de los diferentes patógenos detectados por zona de muestreo (expresada en %).

	<i>Anaplasma/Ehrlichia</i>	<i>Borrelia</i>	<i>Francisella</i>	<i>Rickettsia</i>	<i>Anaplasma/Ehrlichia</i> + <i>Borrelia</i>	<i>Anaplasma/Ehrlichia</i> + <i>Rickettsia</i>	<i>Anaplasma/Ehrlichia</i> + <i>Borrelia</i> + <i>Rickettsia</i>
Ovino	58,9	8,9	5,3	7,1	10,7	7,1	1,8
Vegetación	62,5	0	25	12,5	0	0	0
Animales silvestres	44,4	11,1	0	22,2	0	22,2	0

Resultados

En el caso del muestreo en animales silvestres, se pueden observar las especies de garrapatas positivas en relación con los hospedadores donde se encontraron (Tabla 18). En el caso de *I. arboricola* se detectaron positivos de *Rickettsia* spp. en *Asio otus*, *F. tinnunculus* y *Anaplasma/Erhlichia* en *B. oedicornemus*, *F. tinnunculus*. Para *R. pusillus* se detectaron positivos de *E. muris* en los ejemplares recogidos sobre *G. genetta* y *Anaplasma/Erhlichia* en las garrapatas de *O. cuniculus*. Finalmente para *R. turanicus* se detectaron positivos para *Anaplasma/Erhlichia* y *Borrelia* spp. en las garrapatas identificadas sobre *M. martes* y una infección mixta *E. muris* con *Rickettsia* spp. en los ejemplares recogidos sobre *A. algirus*.

Tabla 18: Especie de garrapatas positivas a diferentes patógenos y sus hospedadores.

	<i>I. arboricola</i>	<i>R. pusillus</i>	<i>R. turanicus</i>
<i>A. algirus</i>	-	-	<i>E. muris</i> + <i>Rickettsia</i>
<i>A. otus</i>	<i>Rickettsia</i>	-	-
<i>B. oedicornemus</i>	<i>Anaplasma/Erhlichia</i>	-	-
<i>F. tinnunculus</i>	<i>Anaplasma/Erhlichia</i>	-	-
	<i>Rickettsia</i>	-	-
<i>G. genetta</i>	-	<i>E. muris</i>	-
<i>M. martes</i>	-	-	<i>Anaplasma/Erhlichia</i>
	-	-	<i>Borrelia</i>
<i>O. cuniculus</i>	-	<i>Anaplasma/Erhlichia</i>	

En la figura 26 podemos observar la tasa de infección de los diferentes patógenos analizados por especies y muestreos realizados en la presente tesis.

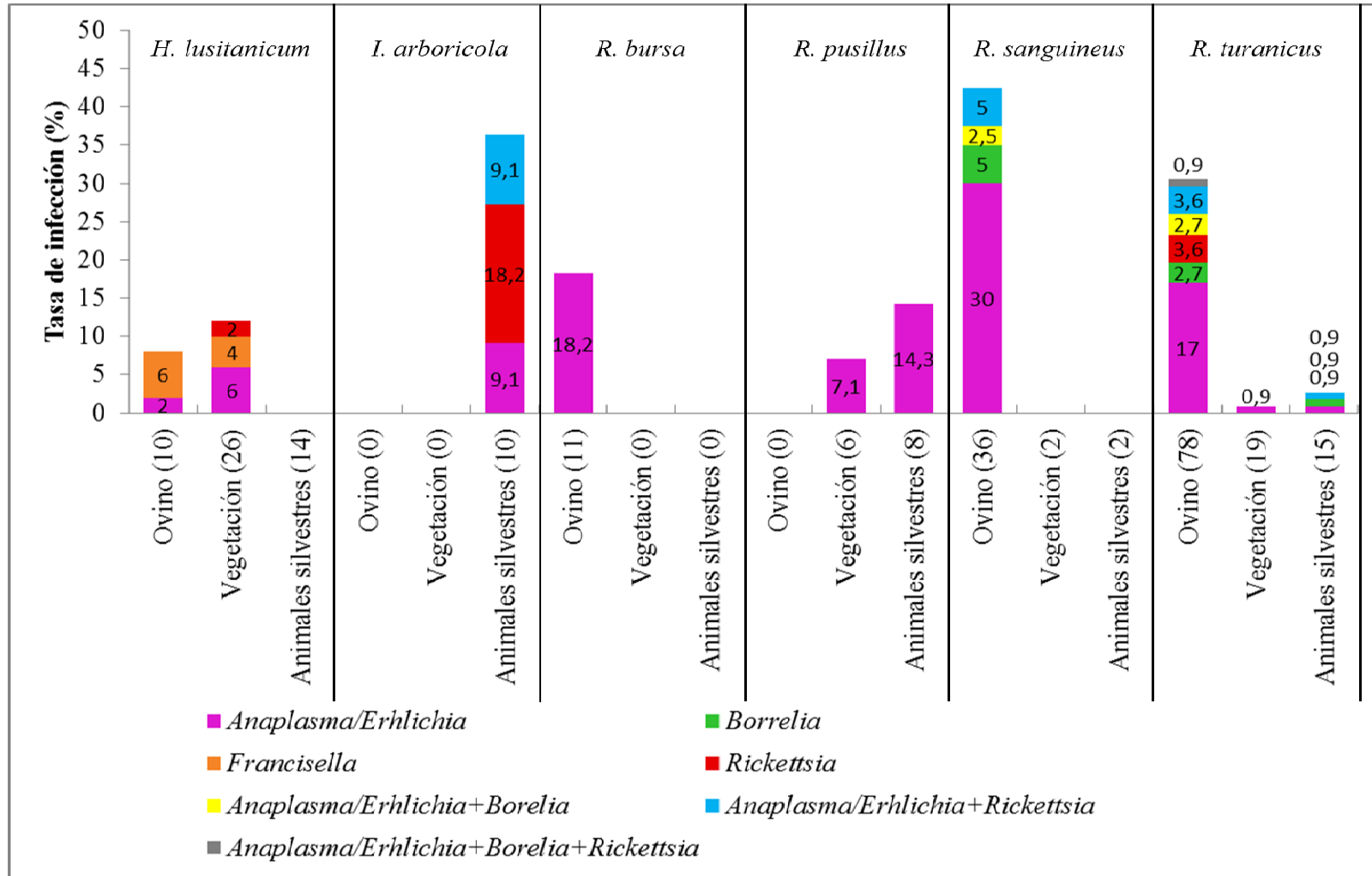


Figura 26: Porcentaje de infección de los diferentes agentes patógenos detectados por especie y tipo de muestreo de garrapatas.
(n): número de ejemplares analizados.

Resultados

En cuanto a los resultados por especies de garrapatas, *R. turanicus* fue la única especie con positivos en los tres tipos de muestreo, observándose una tasa de infección mayor en el caso de ovino, seguido de animales silvestres y finalmente en vegetación.

En los positivos en ovino se detectó la presencia *Anaplasma/Erlichia* spp. (presentando el mayor porcentaje de infección), *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., y las infecciones mixtas de *Anaplasma/Erlichia* spp. con *Borrelia* spp., *Anaplasma/Erlichia* spp. con *Rickettsia* spp. y *Anaplasma/Erlichia* spp. con *Borrelia* spp. con *Rickettsia* spp. Del total de positivos detectados para *Anaplasma/Erlichia* spp. (29 ejemplares), 22 hibridaron con la sonda MCO de los cuales 9 se identificaron como *A. ovis* y siete con la sonda CANOVI. En el caso de *Borrelia* spp. (siete ejemplares positivos), uno se identificó dentro del grupo de las responsables de la enfermedad de Lyme y dos cercanas al grupo R57. Finalmente los positivos de *Rickettsia* spp. (nueve ejemplares), dos se identificaron como *R. massiliae* y uno como *R. conorii*.

En el muestreo de vegetación sólo se detectó un positivo para *Anaplasma/Erlichia* spp. que hibrido con la sonda MCO.

Finalmente en el muestreo de animales silvestres se detectaron los patógenos *Anaplasma/Erlichia* spp., *Borrelia* spp. y la infección mixta de *Anaplasma/Erlichia* spp. con *Rickettsia* spp. De los positivos a *Anaplasma/Erlichia* spp. (dos ejemplares), uno hibridó con la sonda MCO (recolectado sobre *M. martes*) y el otro con la sonda de *E. muris* (recolectado sobre *A. algirus*). En el caso de *Borrellia* spp. y *Rickettsia* spp. no se pudo llegar a nivel de especie.

En el caso de *H. lusitanicum* se detectaron positivos en ganado ovino y vegetación. En ambos muestreos se detectó la presencia de *Anaplasma/Ehrlichia* spp. (presentando el mayor porcentaje de infección en vegetación) spp. y *Francisella* spp. (presentando el mayor porcentaje de infección en ganado ovino), en el muestreo de vegetación también se detectó *Rickettsia* spp.

Del muestreo realizado en ganado ovino, sólo se detectó un positivo para *Anaplasma/Ehrlichia* spp., el cual hibridó con la sonda MCO. En el caso de los tres positivos de *Francisella* spp., todos se identificaron como Endosimbionte *Francisella-like*. Finalmente en vegetación los positivos detectados de *Anaplasma/Ehrlichia* spp. (tres ejemplares) hibridaron con la sonda MCO, los de *Francisella* spp. (dos ejemplares) se identificaron como Endosimbionte *Francisella-like* y en el caso de *Rickettsia* spp. no se pudo llegar a nivel de especie.

Otra especie en la que se detectaron patógenos en dos muestreos fue *R. pusillus*, en este caso se observó solamente el patógeno *Anaplasma/Ehrlichia* spp., tanto de vegetación como en animales silvestres. En vegetación se detectó sólo un positivo, el cual hibridó con la sonda MCO. Para los positivos (dos ejemplares) en animales silvestres, uno hibridó con la sonda MCO (recolectado sobre *O. cuniculus*) y el otro con la sonda de *E. muris* (recolectado sobre *G. genneta*).

Para *I. arborícola*, se detectó la presencia de *Anaplasma/Ehrlichia* spp., *Rickettsia* spp (presentando el mayor porcentaje de infección) y la infección mixta de *Anaplasma/Ehrlichia* spp. con *Rickettsia* spp. en animales silvestres. Los positivos para *Anaplasma/Ehrlichia* spp. (dos

Resultados

ejemplares) hibridaron con la sonda MCO recolectados sobre *B. oedicornis* y *F. tinnunculus*, en el caso de *Rickettsia* spp (tres ejemplares) todos fueron identificados como *R. aeschlimanii* (recolectados sobre *A. otus*, *B. oedicornis* y *F. tinnunculus*)

Para *R. bursa* se detectaron dos positivos en el muestreo de ganado ovino para *Anaplasma/Erlichia* spp. hibridando con la sonda MCO. Uno de ellos se identificó como *A. ovis*.

Finalmente *R. sanguineus* presentó positivos en ganado ovino. Detectando la presencia de *Anaplasma/Erlichia* spp. (presentando el mayor porcentaje de infección), *Borrelia* spp. y las infecciones mixtas de *Anaplasma/Erlichia* spp. con *Borrelia* y *Anaplasma/Erlichia* spp. con *Rickettsia* spp. Para los positivos de *Anaplasma/Erlichia* spp. (15 ejemplares), ocho hibridaron con la sonda MCO identificando a uno como *A. ovis* y seis con la sonda CANOVI siendo en tres casos *E. canis*. En el caso de *Borrelia* spp. se detectaron tres positivos de los cuales uno detectó como una *Borrelia* cercana a las R57. Finalmente los positivos de *Rickettsia* spp. (dos ejemplares), uno de ellos se identificó como *R. massiliae*.



DISCUSIÓN

5.- DISCUSIÓN

La fauna de Ixodidae de Mallorca ha sido escasamente estudiada, de hecho, el presente estudio es el primero realizado en la isla sobre garrapatas presentes en ganado ovino, vegetación y fauna silvestre. Hasta la fecha sólo existe una referencia del año 1951 en la que Jolivet citó en la revista *Vie et milieu*, la presencia de *Dermacentor niveus* y *Haemaphysalis punctata*.

En este trabajo se han identificado un total de doce especies diferentes de garrapatas, de las cuales once pertenecen a la familia Ixodidae y una a la familia Argasidae. Analizando el Índice-Catálogo de Zooparásitos Ibéricos de Cordero-Campillo *et al.*, 1994, nombra un total de 32 especies de Ixodidae en España, así pues en Mallorca tenemos aproximadamente una tercera parte de la fauna de ixódidos presentes en España. De estas doce especies identificadas en la presente tesis, cuatro han supuesto primeras citas para las Islas Baleares (*I. arboricola*, *I. frontalis*, *R. pusillus* y *O. maritimus*).

5.1.- CARGA PARASITARIA POR GARRAPATAS EN GANADO OVINO.

El muestreo sobre ganado ovino se llevó a cabo durante la época de primavera-verano, debido al tipo manejo de los animales realizado en la isla. Como se ha comentado en el apartado de material y métodos, los veterinarios de las ADS agrupan los animales para el esquila y desparasitación en dicha época. Nuestro estudio se ha centrado precisamente en el momento en el que se puede obtener una mayor información en el menor tiempo posible de muestreo. Por tanto, debe

tenerse en cuenta en la interpretación de los resultados que el estudio de las variaciones anuales poblacionales o en la composición específica de la fauna de garrapatas que parasitan al ganado ovino no era uno de los objetivos del presente estudio.

En el muestreo sobre ganado ovino se identificaron seis especies de Ixodidae: *Hae. punctata*, *H. lusitanicum*, *R. bursa*, *R. pusillus*, *R. sanguineus* y *R. turanicus*.

Un resultado interesante que se presenta en este estudio es la coinfección de diferentes especies de garrapatas sobre las ovejas. En el caso de la zona 1, un 32,3% de las ovejas estaban infestadas por las dos especies presentes en la zona (*R. sanguineus* y *R. turanicus*). En la zona 2 los valores de coinfección fueron menores (entre 0,4%-3,3%), aún así presentaron diferentes combinaciones de las especies encontradas dos a dos (*R. turanicus* + *H. lusitanicum*, *R. turanicus* + *R. bursa*; *R. turanicus* + *R. sanguineus*; *R. bursa* + *H. lusitanicum*) incluso coinfección de tres especies (*R. turanicus* + *R. bursa* + *R. sanguineus*). Este hecho supone un aumento de la complejidad a nivel epidemiológico. Si en un mismo hospedador se encuentran diferentes especies de garrapatas alimentándose a la vez, puede haber coalimentación y coinfección entre ellas, aumentando la diversidad de especies de garrapatas que han sido expuestas a un patógeno y potencialmente podrían transmitirlo.

De acuerdo con los valores mostrados por PAPADOPOLUS *et al.*, (1996) en su estudio llevado a cabo en Grecia, en las dos zonas de muestreo del presente trabajo se obtuvieron valores elevados de prevalencia de infestación por Ixodidae (zona 1: 83,7%; zona 2: 66%). Los resultados

obtenidos se sitúan dentro de los rangos de prevalencia en ovino descritos para otras zonas del Mediterráneo, como por ejemplo en Sicilia (TORINA *et al.*, 2006), donde se observó un 98,4% de prevalencia y en Macedonia (PAPADOPOLUS *et al.*, 1996) donde se cita un intervalo de prevalencia de infestación del 77% al 100% de mayo a julio. Estos valores elevados de infestación podrían ser debidos a que la época de muestreo coincide con el máximo de actividad de los adultos del género *Rhipicephalus* que se localiza generalmente en primavera y principios de verano (WALKER *et al.*, 2000). Otro aspecto importante es la gran carga ganadera que se concentra en Mallorca, siendo el censo en el año 2014 de 469.488 cabezas de ovino según el Servicio de Ganadería del *Govern de les Illes Balears*. Así pues la disposición de hospedadores juntamente con unas condiciones ambientales adecuadas para la proliferación de las especies de ixódidos encontrados (ESTRADA-PEÑA *et al.*, 1994), hacen que en la isla se presenten valores elevados de prevalencia.

La tasa de infestación por garrapatas (garrapatas/animal) obtenida en la zona 1 y en la zona 2 fue de 5,1 ga/a y 2,7 ga/a, respectivamente. Estos resultados, de acuerdo con PAPADOPOLUS *et al.* (1996), corresponde a una infestación moderada (2-10 ga/a). Que la infestación a nivel general sea moderada puede ser debido al tipo de vegetación de las zonas. Las dos zonas presentan una vegetación de tipo arbustiva (GRIMALT *et al.*, 1991) con formaciones esteparias, que hace que las condiciones de humedad y de temperatura sean idóneas para la proliferación del género *Rhipicephalus* (ESTRADA-PEÑA *et al.*, 1994).

Respecto a la distribución de los Ixodidae en el cuerpo de los hospedadores, en este estudio se han observado diferencias significativas

entre dos zonas, mostrando preferencia por la zona de las orejas con un 71,9% con respecto a la zona perianal, donde se encontró un 28% de los ejemplares muestreados. En el resto de partes del cuerpo examinadas, como la cara o las ubres o la zona entre las patas se encontraron ejemplares de forma esporádica. Estos resultados coinciden con los estudios de OMER *et al.*, (2007) en Iraq, en los que señaló que el 85% de las garrapatas se encontraban en las orejas, el 9,8% en las ubres y el 5,1% entre las patas y alrededor de los ojos. La preferencia de los Ixodidae por las orejas podría tener relación con los crotales con los que marcan a los animales. Cuando se examinaban las ovejas, una gran cantidad de los ejemplares encontrados estaban situados justo debajo de dichos crotales, de modo que los Ixodidae podrían aprovechar las heridas producidas por éstos para engancharse al hospedador. Las dos especies, presentes en las orejas de forma mayoritaria, presentan un hipostoma corto; lo que hace que no puedan atravesar epidermis gruesas, así pues el hecho de aprovechar las heridas producidas les facilita la inserción del hipostoma.

En cuanto a la distribución en el cuerpo de los hospedadores por especies, *R. turanicus* mostró una mayor preferencia por las orejas, mientras que *R. sanguineus* se encontró con mayor frecuencia en la zona perianal, coincidiendo con la descripción de HABELA *et al.*, 2002. Si bien se trata de resultados preliminares, los resultados sugieren que *R. turanicus* y *R. sanguineus* evitan la competencia por el espacio en el animal, colonizando diferentes partes del cuerpo de las ovejas. Las causas de esta posible distribución no se conocen, ya que hasta la fecha no hay trabajos en los que se haya contrastado este hecho, si bien autores como OUHELLI *et al.*, (1982); PAPADOPOLUS *et al.*, (1996); YERUHAM (2000) y OMER *et al.*, (2007) también coinciden en citar a *R. turanicus* como especie más

frecuente en la zona de las orejas. Otros estudios sin embargo, no coinciden con los resultados obtenidos, por una parte, HABELA *et al.*, (2002), señala que *R. sanguineus* es predominante en las orejas, mientras que *R. turanicus* prefiere la cabeza o la zona perianal, mientras que TRAVASSOS SANTOS DIAS, (1999), mostró como *R. sanguineus* es frecuente encontrarla en la zona ventral de cualquier animal doméstico. Para comprobar dicha hipótesis y valorar la importancia que puede tener, por ejemplo a nivel de competencia, sería necesario realizar más estudios sobre la distribución de las especies en el hospedador.

5.2.- ANÁLISIS DE GARRAPATAS EN VEGETACIÓN.

El presente estudio ofrece una prospección de la variedad de especies de garrapatas presentes en la vegetación de 3 zonas diferentes de la isla de Mallorca (central, montañosa y costera), durante la época en la cual la población humana frecuenta más las zonas recreativas.

Entre las tres zonas muestreadas, se identificaron ocho especies de garrapatas: *D. marginatum*, *H. lusitanicum*, *Hae. punctata*, *I. frontalis*, *I. ventalloi*, *R. pusillus*, *R. sanguineus* y *R. turanicus*.

Para analizar y comparar la diversidad de las diferentes zonas se ha calculado el índice de Shannon-Weaver. La zona con el índice más elevado y por tanto mayor diversidad fue la zona central con un valor de 3,12; seguido de la montañosa (0,94) y finalmente la costera (0,01). Este resultado lo podemos relacionar con la presencia de animales domésticos y salvajes presentes en las diferentes zonas, ya que es un factor clave que influye en la distribución y la densidad de las especies de ixódidos (GRAY *et al.*, 1995, RUÍZ-FONS & GILBERT, 2010; PLÄFFLE, M. *et al.*, 2014).

Según el Biotlas 2.0 de la *Conselleria de Agricultura, Medi Ambient i territori del Govern de les Illes Balears* (BIOATLES, CAIB), en la zona central es donde se encuentra una mayor presencia de pequeños mamíferos y bóvidos, seguido de la zona montañosa y finalmente la zona costera.

El método de elección para el muestreo en vegetación fue la técnica de arrastre de manta. Fue seleccionado por su sencillez de uso, lo que permite realizar comparaciones entre los resultados de las diferentes zonas. Sin embargo, se ha constatado una baja efectividad en el uso de este método en nuestros muestreos. Comparando con otros estudios realizados, la cantidad total de ejemplares de garrapatas recolectados (61 ejemplares) ha sido escasa (BARANDIKA *et al.*, 2011; TACK *et al.*, 2011). Posiblemente este método no sea el idóneo para estudiar las especies de ixódidos presentes en la isla. Podría ser debido a varios motivos; el primero sería el tipo de vegetación de la zona mediterránea, ya que al tratarse de una vegetación de matorral esclerófilo supone una limitación al aplicar el muestreo mediante arrastre, ya que no es igual de eficiente en todos los tipos de vegetación (TACK *et al.*, 2011). Otro motivo podría ser que la mayoría de especies muestreadas en vegetación tienen un comportamiento endófilo, dificultando su captura por este método.

En cuanto a la densidad de garrapatas, la zona central es la que presentó un índice de abundancia (IA) más elevado ($1,6 \text{ ga/m}^2$). La vegetación presente en esta primera zona es poco frondosa y densa, lo que proporciona cierta facilidad a la hora de realizar el muestreo por arrastre capturando así más número de ejemplares.

En la zona costera se encontró un IA menor ($0,6 \text{ ga/m}^2$). Si bien es una zona de fácil acceso para el muestreo con manta, se trata de una zona árida con abundancia de plantas leñosas y poca presencia de vegetación de baja y

media altura, lo que dificulta que los animales silvestres encuentren refugio y que las garrapatas encuentren un hábitat adecuado para su supervivencia.

Finalmente, para la zona montañosa se calculó un IA de 0,3 ga/m². En esta zona encontramos una vegetación muy espesa y heterogénea. Además de un relieve rocoso con una cobertura vegetal espinosa, lo que dificulta de nuevo el muestreo por arrastre.

5.3.- CARGA PARASITARIA POR GARRAPATAS EN FAUNA SILVESTRE.

Este es el primer estudio que se ha realizado hasta la fecha sobre las especies de garrapatas que parasitan la fauna silvestre de Baleares. Se identificaron nueve especies de Ixodidae (*H. lusitanicum*, *I. arboricola*, *I. frontalis*, *I. ricinus*, *I. ventalloi*, *R. pusillus*, *R. sanguineus* y *R. turanicus*) y una de Argasidae (*O. maritimum*).

De las especies de garrapatas encontradas, tanto sobre aves como sobre mamíferos, algunas se observaron en hospedadores intermediarios como es el caso de *I. frontalis*, *I. ricinus* y *O. maritimus*. Esto sugiere que dichos hospedadores podrían actuar como reservorio de agentes patógenos, contribuyendo en muchos casos a la introducción y dispersión de nuevos agentes que podrían ser transmitidas por garrapatas (PALOMAR *et al.*, 2012).

Los dos hospedadores más relevantes fueron *Atelerix algirus* y *Martes martes*, ya que se encontraban parasitados por cinco especies de garrapatas. Estos datos coinciden con estudios realizados en el Sur de Italia (LORUSSO *et al.*, 2011), donde una especie de erizo y una de marta eran

los hospedadores con más abundancia de garrapatas. Este hecho sugiere que estas especies silvestres podrían actuar como reservorios de una gran variedad de patógenos, ya que al estar parasitados por diferentes especies de garrapatas, la probabilidad de infectarse por algún patógeno es más elevada.

5.4.- DETECCIÓN E IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE PATÓGENOS BACTERIANOS EN GARRAPATAS.

Esta tesis es el primer estudio que se ha realizado sobre la detección molecular de patógenos bacterianos en garrapatas en las Islas Baleares.

El presente estudio nos permite obtener una visión preliminar de la situación epidemiológica de las enfermedades transmitidas por garrapatas en Mallorca, de modo que en un futuro permitiría evaluar el riesgo asociado a los patógenos que podrían ser transmitidos a animales y a personas.

Observando los diferentes patógenos analizados, el que presentó una mayor tasa de infección fue *Anaplasma/Ehrlichia* spp. (58,1%), seguida de *Rickettsia* spp. (9,4%), *Borrelia* spp. (8,1%) i finalmente *Francisella* spp. (6,7%). Estos valores nos indicarían que *Anaplasma/Ehrlichia* spp. está ampliamente distribuida en la isla, ya que presenta un porcentaje elevado, se detectó en todas las especies de garrapatas que dieron positivo a algún patógeno y en los tres tipos de muestreos realizados (ganado ovino, vegetación y fauna silvestre).

En cuanto a la tasa media global de infección por patógenos, se observó el valor más elevado en las garrapatas analizadas sobre ganado ovino

(42,2%), respecto a las de vegetación (13,1%) y las de animales silvestres (15,2%). Este resultado era de esperar, teniendo en cuenta el ganado ovino presentaba mayor abundancia de garrapatas, lo que aumenta la probabilidad de infección por parte de dichos patógenos. La media global de infección por patógenos en vegetación obtenidos en nuestro estudio son similares a los obtenidos por TOLEDO *et al.*, 2009b y BARANDIKA *et al.*, 2008, presentado valores del 15,9 % y 11,1%, respectivamente.

En el presente estudio se detectaron trece ejemplares coinfectados por diferentes patógenos, once garrapatas en ganado ovino y dos en animales silvestres. Algunos estudios citan la presencia de infecciones mixtas, tanto en Europa (HOFMANN-LEHMANN *et al.*, 2004; MILUTINOVIC *et al.*, 2008; TORINA *et al.*, 2010), como en España (TOLEDO *et al.*, 2009a y b), aunque no coinciden con a las identificadas en nuestro estudio.

Existe la posibilidad de que el mismo vector pueda transmitir diversos agentes patógenos, por lo que el hecho de detectar infecciones mixtas puede darse con frecuencia y por diversas causas. Algunos patógenos son transmitidos transováricamente, así pues una larva ya infectada de esta forma, puede adquirir otro patógeno al alimentarse. Otra de las causas se daría cuando el ixódido se alimenta de la sangre de un animal ya coinfectado.

5.5.- ESPECIES DE GARRAPATAS IDENTIFICADAS.

Como se ha comentado anteriormente, en la presente tesis han sido identificadas 12 especies de garrapatas, recolectadas en los diferentes muestreos realizados.

A continuación se discute sobre cada una de las especies identificadas en este estudio, tanto a nivel de su bioecología como de los patógenos detectados en ellas.

*** *Dermacentor marginatus***

Es una especie que se encuentra en Marruecos, Italia, Suecia, Alemania, Polonia, España y al este de Asia (HILLYARD, 1996). En el caso de España, *D. marginatus* presenta una distribución general por todo el país (CORDERO-CAMPILLO *et al.*, 1994), citándose en Menorca en 1936 (GIL-COLLADO, 1936).

En el presente estudio esta especie sólo se ha recolectado en vegetación, en concreto en las zonas central y montañosa, presentando valores de IA muy bajos en ambas zonas. Estos bajos valores podrían ser debidos a que sus picos poblacionales (marzo-abril y octubre) no coinciden con nuestra época de muestreo (ESTRADA-PEÑA *et al.*, 2004).

Aunque en el presente estudio no se han detectado positivos para patógenos en esta especie de garrapata, existen trabajos tanto en España como en Europa en los que se describe la presencia del género *Rickettsia*, *Borrelia* y *Anaplasma* en *Dermacentor marginatus* (MASALA *et al.*, 2012; DIMOSTHENIS *et al.*, 2012; MARQUEZ, 2008; OTEO *et al.*, 2006).

*** *Haemaphysalis punctata***

Se distribuye en toda Europa, aunque no ha sido citada en Irlanda. Se encuentra desde España al sur de Escandinavia y hacia el este de Asia central; también se encuentra en el Norte de África (HILLYARD, 1996).

En España CORDERO DEL CAMPILLO *et al.*, (1994) la cita en Álava, Barcelona, Burgos, Cádiz, Córdoba, Cuenca, Galicia, Guipúzcoa, Jaén, Mallorca, Navarra, Salamanca, Segovia, Teruel, Vizcaya y Zaragoza.

Hemos detectado dicha especie en ganado ovino y en el muestreo de vegetación en zona montañosa. Su abundancia en ambos muestreos fue muy baja, en ovino sólo se capturó un ejemplar en fase de ninfa y en vegetación presentó un IA de 0,07. Los resultados de ovino coinciden con los observados por CASTELLÀ *et al.* (2001) en Menorca. La escasa abundancia de esta especie se podría atribuir a diferentes factores, como por ejemplo su mejor adaptación a climas Mesomediterráneos (CASTELLÀ *et al.* 2001). Otro factor podría ser su dinámica estacional; *Hae. punctata* presenta una mayor abundancia de adultos entre enero-abril y octubre-noviembre (TRAVASSOS SANTOS DIAS, 1994; BARANDIKA *et al.*, 2011), por lo tanto nuestras épocas de muestreo en ambos estudios no coinciden con los picos poblacionales de *Hae. punctata*.

En el caso del muestreo en vegetación habría otro condicionante, ya que al tratarse de una especie endófila, hace que el método de captura no fuera el más indicado para esta especie.

En esta tesis no se ha detectado ningún positivo de patógeno bacteriano en *Hae. Punctata*, sin embargo, en estudios realizados en España y Europa se han identificado garrapatas positivas para patógenos del género *Rickettsia* y *Borrelia* (DIMOSTHENIS *et al.*, 2012; BRANDIKA *et al.*, 2008; MARQUEZ, 2008; FERNÁNDEZ-SOTO *et al.*, 2003).

*** *Hyalomma lusitanicum***

Es una especie que tiene una distribución mediterráneo-ibérica, se presenta de Canarias a Portugal, España, Marruecos, Algeria y la región meridional de Francia e Italia (MANILA, 1998). En España la encontramos en Menorca, Burgos, Cáceres, Ciudad Real, Córdoba, Extremadura, Granada, Huelva, Madrid, Málaga, Navarra, Salamanca, Segovia y Sevilla (GIL-COLLADO, 1936; CORDERO DEL CAMPILLO *et al.*, 1994).

En la presente tesis se ha detectado *H. lusitanicum* en ganado ovino, vegetación (zona central y la costera) y animales silvestres (en *A. algirus*). Para el muestreo en ovino, *H. lusitanicum*, se obtuvieron valores de prevalencia menores (2,5%) que los observados por OMER *et al.* (2007), TORINA *et al.*, (2006) y CASTELLÀ *et al.*, (2001), trabajos en los que se describe como una especie poco frecuente en el ganado ovino con valores de 5%, 18% y 9,8%, respectivamente, siendo su principal hospedador el ganado vacuno (ESTRADA-PEÑA *et al.*, 2004a y WALKER *et al.*, 2000), coincidiendo por tanto con los resultados obtenidos.

En vegetación es la especie en la que se ha detectado mayor IA en la zona costera y la central. Se trata de una especie bien adaptada al clima y a la vegetación mesomediterráneos, es decir zonas con inviernos fríos y veranos cálidos donde la vegetación más abundante es de pinar y encinar (ESTRADA-PEÑA *et al.*, 2004a). Esto nos indica que las condiciones ambientales y de vegetación en la época en la que se realizó el muestro son las idóneas para esta especie, que presenta los picos poblacionales de adultos en abril, mayo, junio y julio, (APANASKEVISH *et al.*, 2008) coincidiendo con los meses en los que realizamos nuestros muestreos. Al

ser una especie que busca activamente a sus hospedadores, el método de arrastre de manta no es el más adecuado. Así pues, el hecho de capturar un elevado número de ejemplares indica que la densidad en vegetación de esta especie de garrapata en Mallorca es probablemente elevada, tal y como ya fue anteriormente descrito en la zona de la Península (BARANDIKA *et al.*, 2011). Otro factor que puede afectar a la abundancia es la presencia de sus hospedadores, siendo en este caso uno de los más comunes el conejo (*O. cuniculus*) (APANASKEVICH *et al.*, 2008), el cual se encuentra ampliamente distribuido en la zona central y la costera de la isla (BIOATLES, CAIB).

Finalmente en el muestreo sobre animales silvestres, *H. lusitanicum* fue recolectada sobre ejemplares de *A. algirus*. Estos resultados se pueden comparar con los obtenidos por TRAVASSOS-SANTOS DIAS, (2004); LORUSSO *et al.* (2011) y MARQUEZ, (2008), en los que está citada la presencia de esta especie de garrapata sobre el erizo común (*Erinaceus europaeus*). A pesar de que la especie del hospedador no es exactamente la misma, podemos decir que el erizo es uno de los hospedadores más comunes de *H. lusitanicum*, como citan APANASKEVISH *et al.*, 2008 y WALKER *et al.*, 2000. En el caso de Mallorca, la especie *A. algirus*, endémica de la región mediterránea y muy abundante en la isla (BIOATLES, CAIB), supone un hospedador silvestre frecuente de los estados adultos de *H. lusitanicum*.

En cuanto a la detección de patógenos bacterianos, en *H. lusitanicum* se detectaron positivos en ganado ovino y vegetación. En ambos muestreos se identificó *Anaplasma/Ehrlichia* spp. y *Francisella* spp., en las garrapatas recolectadas en vegetación también se detectó *Rickettsia* spp.

En el caso de *Anaplasma/Ehrlichia* spp., en los dos muestreos hubo hibridación con la sonda específica MCO; los resultados de ovino coinciden con los obtenidos por TORINA *et al.* (2010) donde también se detectó la presencia de este patógeno en *H. lusitanicum*. Existen una serie de estudios que demuestran experimentalmente que *H. lusitanicum* puede transmitir patógenos del género *Anaplasma* (STILLER *et al.*, 1995; ZAGG *et al.*, 1996; FRIEDHOFF *et al.*, 1997).

Como se ha comentado anteriormente esta sonda es específica para *A. marginale*, *A. centrale* y *A. ovis*. Estudios realizados por SEVILLA *et al.* (2002) y DE LA FUENTE *et al.* (2004) detectaron la presencia de *A. marginale* en *H. lusitanicum*. En nuestro estudio no se ha podido llegar a nivel de especie, pero podríamos pensar que se trata de dicho patógeno, ya que es el responsable de la anaplasmosis en ganado ovino y vacuno (BEDELL *et al.*, 1963; KRIER *et al.*, 1963; DE LA FUENTE *et al.*, 2004) y nuestros positivos se detectaron en ovino y zonas de vegetación donde estos animales están presentes.

Para los positivos de *Francisella* spp., los cuales se detectaron en ganado ovino y vegetación, al secuenciarse se comprobó que se trataba de *Endosimbionte Francisella-like* (EFL); coincidiendo con los datos de TOLEDO, (2007) y LOPES de CARVALHO *et al.*, (2015). Hasta 2007 se había detectado la presencia de EFL en *Ornithodoros moubata* y *O. porcinus* (NODA *et al.* 1997; SUN *et al.* 2000), *Dermacentor andersoni*, *D. variabilis*, *D. hunteri*, *D. nitens*, *D. occidentalis* y *D. albipictus* (NIEBYLSKI *et al.*, 1997; SUN *et al.*, 2000; SCOLES, 2004) y *Amblyomma maculatum* (SCOLES, 2004). En la tesis de TOLEDO, (2007), se aumentó el rango de especies portadoras del agente con 5 nuevas citas: *Hyalomma lusitanicum*, *Dermacentor marginatus*, *Rhipicephalus bursa*, *R. pusillus* y *R. sanguineus*, así pues nuestro estudio refuerza los resultados

para *H. lusitanicum* como especie portadora de este patógeno.

Finalmente, en el caso del positivo de *Rickettsia* spp. en vegetación, no se pudo llegar a nivel de especie. Existe escasa bibliografía donde citen a *H. lusitanicum* infectado con algún tipo de *Rickettsia*. No obstante, en el estudio de TOLEDO, (2007) se detectó *Rickettsia* sp. en dicha especie de garrapata en vegetación presentando valores de infección muy similares a los de nuestro estudio.

*** *Ixodes arboricola***

Se distribuye en Alemania, Bélgica, Dinamarca, España, Francia, Gran Bretaña, Holanda, Noruega, Polonia, Suecia y del este de Europa al Cáucaso (MANILA, 1998). En España se ha citado en Granada sobre *Parus major* (CORDERO DEL CAMPILLO *et al.*, 1994) y en el norte de España (PALOMAR *et al.*, 2012).

El presente estudio constituye la primera cita en Baleares, registrándose sobre animales silvestres (*A. otus*, *B. oediconemus* y *F. tinnunculus*) (MONERRIS *et al.*, 2011). Existen estudios que citan a *I. arboricola* como una especie endofílica especializada en parasitar aves (NORTE, *et al.*, 2012; VAN OOSTER *et al.*, 2014), así pues, al haber encontrado esta especie de garrapata en aves se corroboran dichos trabajos. Además está descrita como una garrapata que parasita a aves que descansan o anidan en huecos de árboles y cuevas (HILLYARD, 1996). Las dos aves con más abundancia de este ixódido en el presente estudio (*A. otus* con 23 ejemplares y *B. oediconemus* con 28 ejemplares), presentan este tipo de comportamiento.

En el análisis de patógenos bacterianos, en los ejemplares analizados de *I. arboricola* se identificaron positivos para *Anaplasma/Ehrlichia* spp., *Rickettsia* spp. y una infección mixta de *Anaplasma/Ehrlichia* spp. con *Rickettsia* spp. En relación a *Anaplasma/Ehrlichia* spp., es la primera detección de este patógeno en esta especie de ixódido, por lo que no habría que descartar su papel como posible vector de este patógeno.

En cuanto al patógeno *Rickettsia* spp., se detectaron positivos de *I. arboricola* en ejemplares recogidos sobre *Asio otus* y *Falco tinnunculus*. En España, PALOMAR *et al.*, (2012) ya cita la presencia de este patógeno en esta especie de garrapata. Además en la Republica Checa, SPITALSKA, *et al.*, (2011), describe a *I. arboricola*, como una especie importante en la transmisión de *Rickettsia* spp. Así pues es interesante haber detectado esta especie de garrapata junto a su agente patógeno, ya que al ser específica de aves y teniendo en cuenta los movimientos migratorios, puede ser relevante en cuanto a la circulación de parásitos y enfermedades.

En el presente estudio se ha detectado un positivo de *Rickettsia aeschlimannii* a partir de un RLB específico. Para confirmar que se trata de esta especie se deberían realizar pruebas de secuenciación con el fragmento TUL4, ya que se ha observado que pueden aparecer cruces entre especies relacionadas como pueden ser *R. massiliae* y Bar 29 (TOLEDO *et al.*, 2009). Las especies que forman este grupo de rickettsias se han descrito como patógenos que pueden afectar a los humanos, en el caso de *R. aeschlimanii*, podría causar un cuadro similar a la Fiebre Exantemática Mediterránea (RAOULT *et al.*, 2002). Aunque el principal vector de este patógeno es *H. marginatum* (TOLEDO *et al.*, 2009; MERINO *et al.*, 2005; MATSUMOTO *et al.*, 2004), se ha detectado en muchas otras especies de garrapatas como en *I. ricinus*, *R. sanguineus*, *R. bursa*, *Hae. punctata* y

Hae. inermis (FERNANDEZ-SOTO *et al.*, 2003; FERNANDEZ-SOTO *et al.*, 2004; PORTILLO *et al.*, 2008).

*** *Ixodes frontalis***

Ixodes frontalis se distribuye en Europa desde el Este hasta las montañas del Cáucaso. Se encuentra en Alemania, Bélgica, Dinamarca, Francia, Holanda, Italia, Noruega, Polonia y España (MANILA, 1998). En el caso de España esta citada en Álava, Aragón, Canarias, Granada, Salamanca y Zaragoza (CORDERO DEL CAMPILLO *et al.*, 1994).

En la presente tesis se ha detectado en vegetación (zona central) y animales silvestres (sobre *H. pennatus*), siendo una primera cita en Baleares (MONERRIS *et al.*, 2011).

En el muestreo en vegetación, presentó un IA del 0,04 ga/m². En estudios realizados en Italia por AURELIS en 2015, también se detecta una escasa presencia de esta especie en vegetación. Al tratarse de una especie endófila (CORDERO DEL CAMPILLO *et al.*, 1994), el muestreo de arrastre por manta no es el más adecuado para este tipo de garrapatas, ya que se encuentran escondidas en madrigueras o pequeñas grietas. De nuevo, su pico poblacional no coincide con nuestra época de muestreo (entre octubre y febrero) (HILLYARD, 1996).

En cuanto a los animales silvestres, *I. frontalis*, se trata de una especie monotrófica, ya que todos sus estadios parasitan aves. Suelen encontrarse en nidos de bosques caducifolios (MANILA, 1998; OSACAR-JIMENEZ *et al.*, 1998). Existen una serie de trabajos, tanto en España, Inglaterra y Portugal, que citan dicha especie de garrapata sobre diferentes tipos de aves (OSACAR-JIMENEZ *et al.*, 1998; JAMESON *et al.*, 2011 y LITERAK *et*

al., 2015), sobretudo sobre passeriformes o columbiformes. Así pues podemos pensar que la presencia de *I. frontalis* sobre *H. pennatus* se trata de un hallazgo accidental, tanto por lo citado anteriormente como por la poca abundancia de esta especie de garrapata (4 ejemplares) en el hospedador.

*** *Ixodes ricinus***

Esta especie se distribuye por todo el norte de Europa (HILLYARD, 1996) y en España, donde se encuentra distribuida por todo el país (CORDERO DEL CAMPILLO *et al.*, 1994).

En esta tesis solamente se ha detectado en animales silvestres sobre *M. martes*. Era de esperar que esta especie no fuera muy abundante (6 ejemplares) en nuestro estudio, ya que está adaptada a climas más fríos, con elevada humedad y elevadas precipitaciones. Además, el hábitat de esta especie es de bosques caducifolios y coníferos con una cobertura arbórea baja de helechos (HILLYARD, 1996; ESTRADA-PEÑA *et al.*, 2004a TACK *et al.*, 2011). En cuanto a sus hospedadores, se trata de una especie que parasita a mamíferos de medio y pequeño tamaño, como es el caso de *M. martes* (HILLYARD, 1996; MANILA, 1998). Existen una serie de estudios donde se citan la presencia de *I. ricinus* sobre especies de mustélidos del mismo género como son *Martes foina* y *Martes niveus* (CAEIRO *et al.*, 1991; MANILLA, 1991; PAGE *et al.*, 1996; MARQUEZ, 2008; LORUSSO *et al.*, 2011). Así pues en el caso de Mallorca *M. martes* podría actuar como posible hospedador de los ixódidos citados, al ser el mustélido más distribuido en la isla.

*** *Ixodes ventalloi***

Esta especie está limitada al suroeste de Inglaterra, las islas Caimán, Alemania occidental, Francia, España, Portugal y el norte de África (HILLYARD, 1996). En España se describe en Barcelona, Baleares, Ciudad Real, Granada, Huelva, Huesca, Madrid y Zaragoza (CORDERO DEL CAMPILLO *et al.*, 1994). En este trabajo se ha detectado en vegetación (zona central) y en animales silvestres (sobre *A. algirus*, *M. mates* y *G. genneta*).

Pese a que se trata de una especie nidícola fue una de las especies con mayor IA (0,26 ga/m²). Esto podría ser debido a que sus principales hospedadores son el conejo, erizo y marta (HILLYARD, 1996), mamíferos ampliamente distribuidos por la zona donde se recolectó (BIOATLES DE LES ILLES BALEARS).

En cuanto al muestreo sobre animales silvestres, al tratarse de una especie politropa (MANILA, 1991), no es de extrañar haber detectado esta especie en diferentes especies de hospedadores. En cuanto a *A. algirus*, se obtuvieron solamente cinco ejemplares de garrapatas sobre este hospedador, lo cual era de esperar puesto que este mamífero no está considerado como su hospedador principal. El principal hospedador de *I. ventalloi* es el conejo común (MANILA, 1991). Sin embargo, en las descripciones de MANILA, (1991); ESTRADA-PEÑA *et al.*, (1992); HILLYARD, 1996 y WALKER *et al.*, (2000), citan a *Erinaceus europaeus* como hospedador de *I. ventalloi*, pudiendo actuar como hospedador secundario.

En el caso de los ejemplares recolectados sobre *M. martes*, fueron 5 individuos. Como en el caso de *I. ricinus* y basándonos en los estudios de CAEIRO *et al.*, 1991; MANILLA, 1991; PAGE *et al.*, 1996; MARQUEZ, 2008 y LORUSSO *et al.*, 2011, podríamos describir a *M. martes* como posible hospedador de *I. ventalloi*.

El siguiente mamífero donde se detectó *I. ricinus* fue *Genetta genetta*, sobre el cual se observó la presencia de cuatro ejemplares. Existen estudios (CAEIRO *et al.*, 1991; HILLYARD, 1996; WALKER *et al.*, 2000) en los que se ha citado esta especie de garrapata sobre *Genetta genetta*, coincidiendo con nuestros resultados.

No se ha detectado ningún positivo para patógenos en esta especie de garrapatas, pero en estudios realizados por MARQUEZ *et al.*, 2009; MARQUEZ, 2008 y SANTOS-SILVA *et al.*, 2006, se detectó la presencia de *Rickettsia* en ejemplares de *I. ventalloi*.

*** *Rhipicephalus bursa***

Es una especie que se distribuye en el Mediterráneo, el Adriático y en la cuenca del Mar Egeo. También está presente en Portugal, Suiza, Bulgaria, Rumania, Irán e Irak (WALKER *et al.*, 2000). En España tiene una distribución general por todo el país (CORDERO DEL CAMPILLO *et al.*, 1994).

En la presente tesis se ha detectado esta especie solamente en ganado ovino en la zona 2. Los valores de nuestro estudio (7,1 %) han sido inferiores a los observados en Iran (LOUI, *et al.*, 2015), Grecia (PAVLIUO *et al.*,

2008), en Iraq (OMER *et al.*, 2007), en Italia (TORINA *et al.*, 2006) y en Menorca (CASTELLÀ *et al.*, 2001), donde *R. bursa* es de las especies más abundantes en ganado ovino. Esto podría ser debido a la estacionalidad de *R. bursa*, ya que el muestreo en la zona 2 se realizó entre los meses de mayo-julio y según ESTRADA-PEÑA *et al.* 1990, los adultos de dicha especie están presentes en ganado ovino desde julio a septiembre.

Para esta especie se detectaron positivos de *Anaplasma/Ehrlichia* spp. en ganado ovino, de modo que estos resultados coinciden con los encontrados en Italia por TORINA *et al.* (2010). Dichos positivos hibridaron con la sonda específica de MCO, existiendo estudios en los que se ha citado a *R. bursa* como vector de *A. marginale* (FRIEDHOFF, 1997; SEVILLA *et al.*, 2002; DE LA FUENTE *et al.* 2004; KOCAN *et al.*, 2004; BEDELL *et al.*, 1963; KRIER *et al.* 1963).

* *Rhipicephalus pusillus*

Esta especie se distribuye en Francia, España, Italia, Marruecos, Portugal y Túnez (WALKER *et al.*, 2000). En España se ha citado en Andalucía, Barcelona, Ciudad Real, Huelva, Huesca, Madrid, Salamanca, Segovia, Teruel y Zaragoza (CORDERO DEL CAMPILLO *et al.*, 1994).

En el presente estudio se ha detectado en vegetación (zona central) y en animales silvestres (*G. genneta*, *M. martes* y *O. cuniculus*), siendo una primera cita en Baleares (MONERRIS *et al.*, 2011).

En cuanto al muestreo sobre vegetación, *Rhipicephalus pusillus* sólo se recolectó en la zona central, en la cual hay gran abundancia de *O. cuniculus*

(BIOTLES, CAIB), hospedador principal de esta especie de garrapata (WALKER *et al.*, 2000).

En relación al muestreo sobre animales silvestres, en el caso de *M. martes*, coincidiría con lo comentado en *I. ricinus* e *I. ventalloi*, de modo que se encuentra en esta especie de mamífero aunque no sea su hospedador principal (CAEIRO *et al.*, 1991; MANILLA, 1991; PAGE *et al.*, 1996; MARQUEZ, 2008; LORUSSO *et al.*, 2011).

El mamífero donde se recolectaron individuos de *R. pusillus* (9 ejemplares) fue *Genetta genetta*. En este caso ocurriría como lo comentado para *I. ventalloi*, de modo que estas especies de garrapatas también han sido citadas sobre *Genetta genetta* si bien no es su hospedador principal (CAEIRO *et al.*, 1991; HILLYARD, 1996; WALKER *et al.*, 2000). En el caso de *Oryctolagus cuniculus*, se observaron 22 ejemplares de *R. pusillus*. Según las descripciones y estudios realizados sobre esta especie, citan al conejo como su principal hospedador (ESTRADA-PEÑA *et al.*, 1992, WALKER *et al.*, 2000 y MARQUEZ, 2008). Así pues nuestros resultados refuerzan estos estudios.

En el análisis de patógenos bacterianos, se detectaron positivos a patógenos en vegetación y en animales silvestres, en ambos muestreos se identificó *Anaplasma/Ehrlichia* spp. En vegetación se detectó un solo positivo que hibridó con la sonda MCO. Lo mismo sucedió en uno de los positivos en animales silvestres, detectando MCO en *R. pusillus* sobre *O. cuniculus*. La detección de estos patógenos nos indicaría que esta especie de garrapata es un posible vector de *Anaplasma*. Nuestros datos se corroboran con los encontrados por DE LA FUENTE *et al.* (2005) en el centro de España.

En las garrapatas recolectadas sobre *G. genneta* se detectó *E. muris*. La detección se ha realizado a través de RLB. Para confirmar que se trata de esta especie se tendría que realizar una secuenciación, ya que forma parte de un grupo de ehrlichias en el que también podemos encontrar *E. canis* y *E. chaffensis*. En el caso de *E. muris*, podría tener importancia a nivel sanitario, ya que produce cuadros similares a la anaplasmosis granulocítica en humanos.

*** *Rhipicephalus sanguineus***

Es originaria de África y en la región del Mediterráneo, sin embargo esta especie se ha extendido a muchas otras partes del mundo. Se ha citado en Gran Bretaña, Francia, Alemania, Bélgica, Noruega, Holanda, Polonia y Suiza (WALKER *et al.*, 2000). En cuanto a su presencia tanto en la Península Ibérica como en las Baleares tiene una distribución general (CORDERO DEL CAMPILLO *et al.*, 1994).

En este estudio se ha detectado en ganado ovino, vegetación (zona central) y animales silvestres (*A. algirus* y *M. martes*).

En el caso de muestreo en ovino, se obtuvieron valores de prevalencia (34,7% en la zona 1 y 2,2% en la zona 2) y de tasa de infestación bajos (1,4 ga/a en la zona 1 y 0,03 en la zona 2). Esto podría ser debido a que se trata de una especie monotropa, donde el principal hospedador en su ciclo doméstico es el perro (TORINA *et al.*, 2006; PAPADOPOULUS *et al.*, 1996). En cuanto a su ciclo selvático sus hospedadores son los carnívoros de vida libre y rumiantes, por tanto es normal encontrar esta especie en ovino (HABELA *et al.*, 2002). En cuanto a la diferencia entre las dos

zonas, cabe destacar que en la zona 1 son más frecuentes animales de vida libre como la cabra salvaje o los mustélidos, lo que justifica que la presencia de esta especie sea más elevada que en la zona 2, en la que la abundancia de estos animales es menor. (BIOATLES, CAIB)

En el muestreo de vegetación presentó un índice de abundancia bajo ($0,07 \text{ ga/m}^2$) pese a que el pico poblacional de adultos es de marzo a octubre (HILLYARD, 1996). Se trata de una especie con un comportamiento tanto endófilo como exófilo (HABELA *et al.*, 2002), así pues esta podría ser una de las causas de que presentara un IA con valores bajos. El hecho de que se trate de una especie con una distribución en entornos urbanos sobre animales domésticos, como el perro (WALKER *et al.*, 2000) también podría tener relación con los resultados obtenidos.

Finalmente en el muestreo sobre animales silvestres, se recolectó sobre *A. algirus* y *M. martes*. De la garrapatas recolectadas sobre *A. algirus*, solo se obtuvieron 2 ejemplares. Era de esperar, como en el caso de *I. ventalloi*, ya que no está considerado como hospedador principal de *R. sanguineus*. Sin embargo, en las descripciones de MANILA, (1991); ESTRADA-PEÑA *et al.*, (1992) y WALKER *et al.*, (2000), se cita a *Erinaceus europaeus* como hospedador de *R. sanguineus*, pudiendo actuar como hospedador secundario.

En el caso de *M. martes*, solamente se recolectó 1 ejemplar. Como se ha comentado en el caso de *I. ricinus*, *I. ventalloi* y *R. pusillus*, no se trata de su hospedador principal, pero en Mallorca, al ser el mustélido más distribuido en la isla, podría actuar como posible hospedador.

De los tres muestreos realizados, sólo se han detectado positivos de esta especie sobre ganado ovino para *Anaplasma/Ehrlichia* spp., *Borrelia* spp. y de las infecciones mixtas de *Anaplasma/Ehrlichia* spp. con *Borrelia* spp. y *Anaplasma/Ehrlichia* spp. con *Rickettsia* spp.

En cuanto a los resultados obtenidos de *Anaplasma/Ehrlichia* spp., estos coinciden con el estudio de TORINA *et al.* (2010), en el que también fue detectado este patógeno en *R. sanguineus* sobre ganado. El 50% de las muestras de *Anaplasma/Ehrlichia* spp. hibridaron con la sonda específica MCO, llegando en un caso a nivel de especie identificándola como *A. ovis*. Este resultado nos indica que esta especie actúa como vector de este patógeno coincidiendo con los trabajos de CORDERO DEL CAMPILLO *et al.* (1994); FRIEDHOFF, (1997) y WALKER, (2000).

El resto de ejemplares positivos para *Anaplasma/Ehrlichia* spp., hibridaron con la sonda CANOVI, llegando a nivel de especie en la mitad de las muestras, siendo identificadas como *E. canis*. En España no hay estudios que describan esta especie como principal vector de este patógeno. En cambio, sí existen trabajos realizados en perros en los que se detecta la presencia de *E. canis*, demostrando que el perro es un reservorio de este patógeno (SAINZ, *et al.*, 1996; AMUSATEGUI *et al.*, 2008; MIRÓ *et al.*, 2013). En el caso de Mallorca, GALLEGO *et al.* (2006), detectó también la presencia de *E. canis* en perros. En el resto de Europa, *R. sanguineus* está descrito como principal vector de este patógeno (SATTA *et al.*, 2011; AKTAS, 2014; FOURNIER *et al.*, 2014; LATROFA *et al.*, 2014; SHAW *et al.*, 2011), así pues con nuestros resultados podríamos deducir que en Mallorca *R. sanguineus* puede actuar como vector de *E. canis*. Dicho patógeno es el causante de la ehrlichiosis canina. También podría tener

importancia a nivel sanitario, ya que en España se detectó una infección de *E. canis* en humanos (GUERRERO *et al.*, 1991).

En el caso del patógeno *Borrelia* spp. se detectaron dos positivos, en uno de ellos se llegó a nivel de especie identificado como una *Borrelia* cercana a la *Borrelia* R57, siendo la primera detección de este patógeno en España sobre *Rhipicephalus*. *Borrelia* sp. R57 fue descubierta en 2005 (GIL *et al.*, 2005) en pequeños mamíferos del País Vasco, y en 2007 también fue detectada en micromamíferos de la misma región por BARANDIKA *et al.*, (2007). Sin embargo, en ninguno de los dos estudios se detectó su presencia en las garrapatas recogidas en la vegetación de la zona, por lo que no habría que descartar la posibilidad de que *R. sanguineus* sea el vector de dicha espiroqueta. Es posible que los estadios inmaduros de esta especie de ixódidos adquieran el agente al alimentarse sobre el micromamífero infectado, y posteriormente al transmitirse la espiroqueta de forma transestadial, es posible su detección en los ejemplares adultos.

Finalmente se detectó un positivo de *Rickettsia* spp. en *R. sanguineus*, identificándolo como *R. conorii*. Esta especie de garrapata está descrita como principal vector de este patógeno. En España encontramos estudios que corroboran nuestros resultados (FERNÁNDEZ-SOTO *et al.*, 2006).

* *Rhipicephalus turanicus*

Se encuentra distribuida en África noroccidental (Túnez, Algeria y Marruecos), parte de Europa (Portugal, España, Grecia, Rumania y Bulgaria) y parte del continente asiático, como por ejemplo en Nepal o la India septentrional (WALKER *et al.*, 2000). Está presente en toda la

Península Ibérica sobre todo en zonas de clima mediterráneo. En el caso de las Baleares esta citada en la Isla de Menorca (CORDERO DEL CAMPILLO *et al.*, 1994).

En este trabajo se ha detectado en ganado ovino, vegetación (en las 3 zonas) y animales silvestres (*A. algirus* y *M. martes*).

En el muestreo en ganado ovino, presentó valores elevados en ambas zonas (67% en la zona 1 y un 88,2% en la zona 2). Nuestros resultados coinciden con los estudios llevados a cabo en Aragón (ESTRADA-PEÑA *et al.*, 2004b), en Chipre (LE RICHE *et al.*, 1974) y en Sicilia (TORINA *et al.*, 2006), en los que la abundancia de *R. turanicus* fue mayor en ovino con respecto a otros hospedadores, como ganado vacuno (MANILA, 1998; TRAVASSOS SANTOS DIAS, 1994; PAPADOPOLUS *et al.*, 1996) y carnívoros silvestres (NASSER *et al.*, 1990). Los resultados son los esperados ya que se trata de una especie que se encuentra en zonas agrícolas parasitando ovejas y vacas (MANILA, 1991; WALKER *et al.*, 2000).

En cuanto a las tasas de infestación, se observaron valores moderados en ambas zonas (3,7 ga/a en la zona 1 y 2,2 ga/a en la zona 2). Estos resultados coinciden con los trabajos realizado en Italia (TORINA *et al.*, 2006) y Grecia (PAPADOPOLUS *et al.* 1996), donde se citaron infestaciones moderadas. Estas en el caso de *R. turanicus* podrían ser debidas a que presenta su periodo de mayor actividad dentro de la época del muestreo del presente trabajo.

Rhipicephalus turanicus es la única especie de garrapata que se ha recolectado en las tres zonas muestreadas en vegetación. Podría ser debido

a diferentes factores. El primero es que se trata de una especie muy bien adaptada al clima mediterráneo y es frecuente en zonas de matorral (CORDERO DEL CAMPILLO *et al.*, 1994; ESTRADA-PEÑA *et al.*, 2004a); el segundo es que su principal hospedador es la oveja (WALKER *et al.*, 2000) y en el caso de Mallorca, es el mamífero más abundante y se presenta en todo el territorio; finalmente sus picos poblacionales (entre marzo y julio) (TRAVASOS SANTOS DIAS, 1994), coinciden con los meses incluidos en nuestra época de muestreo. Así pues es una especie que se puede muestrear fácilmente con la técnica del arrastre de la manta.

En el muestreo de animales silvestres se recolectaron ejemplares de *R. turanicus* sobre *A. algirus* y *M. martes*; estos mamíferos podrían ser descritos como hospedadores de dichas especies de garrapatas, debido su elevada abundancia en Mallorca.

En cuanto a los patógenos, en esta especie fue en la única que se detectaron positivos en las tres zonas muestreadas y la que presentó mayor tasa de infección. Se identificaron positivos para *Anaplasma/Erhlichia* spp., *Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., además de las infecciones mixtas de *Anaplasma/Erhlichia* spp. con *Borrelia* spp., *Anaplasma/Erhlichia* spp. con *Rickettsia* spp. y *Anaplasma/Erhlichia* spp. con *Borrelia* spp. y *Rickettsia* spp.

Para *Anaplasma/Erhlichia* spp. de los 34 positivos, 28 hibridaron con la sonda MCO (22 de ovino, 1 de vegetación y 5 de animales), 5 con CANOVI (todos en ovino) y 1 con *E. muris*. En el caso de las hibridaciones con MCO, se llegó en nueve casos de ovino a nivel de especie detectando *A. ovis*, lo que sigue confirmándolo como un patógeno de ovejas como se

ha citado en el apartado de *R. sanguineus*. Como se ha comentado anteriormente, en el caso de *E. muris*, se debería realizarse una secuenciación para confirmar que se trata de dicho patógeno.

El género *Borrelia* spp. se ha detectado tanto en ovino, como en animales silvestres. De las 4 muestras de *Borrelia* obtenidas de *R. turanicus* se pudieron secuenciar y elaborar el árbol filogenético en 3 de ellas (todas en ganado ovino). Una está más cercana a las borrelias causantes de Lyme y las otras 2 al grupo de las R57. Como se ha comentado en *R. sanguineus*, es la primera vez que se detecta *Borrelia* spp. en el género *Rhipicephalus*, tanto las causantes de la enfermedad de Lyme como las R57. En este caso, tampoco habría que descartar la posibilidad de que *R. turanicus* actúe como vector.

Los principales vectores de las enfermedades del grupo Lyme son garrapatas del género *Ixodes*. En España el principal vector es *I. ricinus*, aunque en las zonas donde esta especie no está presente, otras como *I. canisuga* e *I. hexagonus* mantienen la espiroqueta en los ciclos enzoóticos (ESTRADA-PEÑA *et al.*, 1995). También se ha detectado en *I. frontalis* en aves (ESTRADA-PEÑA *et al.*, 1995), en *Hae. punctata* (BARRAL *et al.*, 2002) y en *D. marginatum*, *H. lusitanicum* y *R. pusillus* (TOLEDO, 2007). Existen otras especies de garrapatas en las que se ha detectado *Borrelia*, aunque no hay pruebas experimentales de su competencia vectorial en Eurasia. (HUBBARD *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 1999; KURTENBAG *et al.* 2002; FUKUNAGA *et al.*, 2000; PAROLA Y RAOULT, 2001).

Finalmente para el patógeno *Rickettsia* spp., se detectaron positivos en ganado ovino y en animales silvestres. Encontramos varios estudios en los que se ha citado el género *Rickettsia* en *R. turanicus*, tanto en Europa

(TORINA *et al.*, 2010; IOANNOU *et al.*, 2011; SATTA *et al.*, 2011; OTEO *et al.*, 2012) como en España (MARQUEZ *et al.* 2008, MARQUEZ *et al.*, 2009). Del total de ejemplares positivos en ganado ovino, se pudo llegar a nivel de especie en tres casos, identificando uno como *R. conorii* y los otros dos como *R. massiliae*. En el caso de *R. massiliae*, ocurriría lo mismo que con *R. aeschlimanii*, ya que al ser detectada por RLB específico se debería realizar una secuenciación para confirmar la especie. Si se llegara a confirmar su presencia en la isla, sería relevante a nivel sanitario, ya que VITALE *et al.*, (2006) la describió como patógeno humano, provocando la llamada Enfermedad Manchada de las Montañas Rocosas. En el caso de *R. conorii* y aunque su principal vector es *R. sanguineus* (WALKER, 2000), existen estudios en los que se ha detectado su presencia en *R. turanicus* (ESTRADA-PEÑA *et al.*, 2004; GUBERMAN *et al.*, 1996), apoyando así los resultados obtenidos en nuestro estudio.

*** *Ornithodoros maritimus***

Es una especie que se distribuye por Cerdeña, España, Francia, Gran Bretaña, Irlanda, Portugal y Túnez (HILLYARD, 1996). En España, la primera cita de esta garrapata fue en 1996 en las Islas Medes (ESTRADA-PEÑA *et al.*, 1996, en las Islas Medes. También se ha descrito en “l’Escala“, Delta del Ebro, Columbretes, Dragonera y Isla Grossa (ARNAL *et al.*, 2014).

Así pues, el presente estudio constituye la primera cita en Baleares, registrándose en animales silvestres sobre *L. michahellis* y *Puffinus* (MONERRIS *et al.*, 2011). No es de extrañar haber encontrado esta especie de garrapata en dichas aves, ya que es habitual en colonias de aves marinas,

en islas o arrecifes frecuentados para anidar (HILLYARD, 1996). En España, ESTRADA-PEÑA *et al.* (1996), citó *O. maritimus* sobre *Larus michahellis*, coincidiendo con los resultados de nuestro estudio.

5.6.- DISCUSIÓN GENERAL

En la actualidad las garrapatas son consideradas uno de los principales grupos de transmisores de enfermedades a nivel mundial, después de los mosquitos. En algunas zonas de Europa, las enfermedades transmitidas por garrapatas provocan grandes pérdidas a nivel veterinario, incluso tienen una gran incidencia a nivel sanitario. Por este motivo es importante conocer tanto la fauna de ixódidos presentes en una zona, como los patógenos que circulan para evitar posibles problemas tanto a nivel médico como veterinario.

Se trata de un problema potencial a nivel de salud pública y veterinaria que en la actualidad está considerado emergente debido al creciente número de casos reportados tanto en personas como en animales. Un ejemplo de ello es el caso de la fiebre hemorrágica Crimea Congo, considerándose endémica de la zona de los Balcanes. Según el *Annual Epidemiological Report* del 2013 realizado por el ECDC, entre 2011 y 2012 fueron reportados varios casos en humanos en Bulgaria y Reino Unido.

Este hecho demuestra que los vectores y patógenos endémicos de algunas regiones han sido capaces de adaptarse y establecerse en nuevas zonas implicando un creciente riesgo a nivel epidemiológico. Las causas de este problema podrían estar relacionadas con la globalización y el cambio climático (EFSA, 2010).

Tanto en España como en Europa se llevan a cabo estudios para conocer mejor el sistema dinámico de interacciones biológicas que existe entre vectores, hospedadores y agentes patógenos (RANDOLPH *et al.*, 2010; BANETH, 2014). Estudiar estos sistemas de gran complejidad se hace imprescindible, pero también es necesario el análisis paralelo de los factores humanos que pueden ser determinantes para el riesgo de entrar en contacto con garrapatas infectadas.

Con la realización de este trabajo hemos obtenido datos relevantes sobre la presencia de garrapatas vectores de patógenos bacterianos detectados en Mallorca.

En base a los resultados obtenidos y observando las diferentes especies descritas, podríamos apuntar que las especies más importantes, tanto por su abundancia, distribución y carga patogénica han sido *R. turanicus*, *R. sanguineus* y *H. lusitanicum*.

De las tres especies, la que obtendría más relevancia sería *R. turanicus*, ya que ha sido identificada en todos los muestreos realizados, siendo siempre la más abundante, lo que nos lleva a concluir que es la especie mejor distribuida y adaptada a las condiciones de la isla. Además es la que presenta mayor carga de patógenos, siendo positiva a agentes responsables de enfermedades importantes tanto a nivel médico (*R. conorii*, *Borrelia* R57 y *Borrelias* cercanas a Lyme), como a nivel veterinario (*A. ovis*).

De todos los agentes patógenos identificados, los que pueden provocar problemas a nivel sanitario son: *Rickettsia conorii* (FEM) y *EFL*, detectados en garrapatas recolectadas durante los muestreos en ganado ovino. En los muestreos sobre vegetación llevados a cabo siempre en zonas recreativas,

se detectó también la presencia de *EFL*.

El hecho de haber identificado el vector y los patógenos que transmite, además de comprobar que se encuentran distribuidos en los diferentes hábitats estudiados (con gran proximidad a zonas frecuentadas por humanos), supone un aumento de las probabilidades de infección y de dispersión de patologías que podrían llegar a provocar problemas importantes para la población de la isla. Sin embargo, por el momento no existen estudios sistemáticos sobre la prevalencia de estos patógenos en la población humana que permitan confirmar nuestros resultados.

Este trabajo podría servir de punto de partida para nuevos proyectos dirigidos al conocimiento y posible control de infecciones relevantes a nivel de salud pública, como se ha venido realizando en algunos países de la Unión Europea. Con la creciente preocupación por las enfermedades transmitidas por garrapatas, se han elaborado numerosos documentos dirigidos tanto a profesionales como a población general (ECDC, 2015).

En los ejemplares analizados de ganado ovino se detectó la presencia de *A. ovis*, responsable de la anaplasmosis ovina, lo que podría suponer problemas a nivel veterinario. Esta infección provoca un cuadro clínico que va desde debilidad, pérdida de peso, anemia progresiva y disminución de la producción de leche hasta la muerte del animal infectado. En el caso de que el animal supere la enfermedad, pasará a ser portador del agente patógeno ya que éste permanecerá en su organismo sin manifestarse clínicamente, sirviendo así de reservorio. No está reportada la incidencia de estos patógenos en el ganado de la isla, pero su presencia podría provocar pérdidas económicas para la explotación ganadera, además de ser un

peligro potencial en la dispersión de la infección. Debido a ello, y al haberse detectado niveles elevados de infestación, sería recomendable establecer protocolos de actuación y tratamiento sobre estas las garrapatas.

El estudio realizado sobre animales silvestres es también de gran interés para seguir profundizando en el conocimiento del sistema de transmisión de agentes patógenos y dispersión de los vectores. Debido a su morfología, estos parásitos precisan la presencia de sus hospedadores para su dispersión (BANETH, 2014). Así pues, la fauna silvestre actúa como mecanismo de distribución, tanto del vector como del patógeno y tiene un papel fundamental como reservorio. Se debe por tanto, prestar especial atención a la posible actuación de la fauna silvestre de Mallorca, ya que se ha detectado la presencia de patógenos importantes a nivel médico, como por ejemplo rickettsias cercanas a *R. aeschlimanii* en *I. arboricola* sobre *A. otus*.

El panel de expertos de la EFSA en el 2010, cita que la globalización y el cambio climático son dos de las posibles causas que provocan el aumento de la dispersión de enfermedades transmitidas por garrapatas. El cambio climático puede actuar de manera directa e indirecta en la proliferación de garrapatas, tanto en el aumento de la supervivencia y actividad de éstas como en la densidad de la vegetación de sus hábitats (EFSA, 2010).

La globalización y el cambio climático afectan también a la actividad humana, estimulando un cambio en los últimos años sobre los hábitos de la población, que tiende a desplazarse hacia zonas rurales y recreativas al aire libre. Asociado a estos cambios también podemos encontrar un aumento del abandono de las zonas agrícolas facilitando la proliferación de

animales silvestres, posibles hospedadores de garrapatas (MIERZEJEWSKA *et al.*, 2015).

Por todo ello es importante conocer la faunística de ixódidos presentes en la vegetación cercana a zonas recreativas, ya que la proliferación de las garrapatas y los nuevos hábitos de la sociedad aumenta la probabilidad de infección.

A thick purple L-shaped border is positioned in the bottom-left corner of the page, consisting of a vertical line extending upwards and a horizontal line extending to the right.

CONCLUSIONES

6.- CONCLUSIONES

1. En este estudio, llevado a cabo en Mallorca, se han identificado doce especies de garrapatas: *Dermacentor marginatus*, *Haemaphysalis punctata*, *Hyalomma lusitanicum*, *Ixodes arboricola*, *Ixodes frontalis*, *Ixodes ricinus*, *Ixodes ventalloi*, *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus pusillus*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus turanicus* y *Ornithodoros maritimum*.
2. De las doce especies identificadas, *Ixodes arboricola*, *Ixodes frontalis*, *Rhipicephalus pusillus* y *Ornithodoros maritimum* son primeras citas en las Islas Baleares.
3. Las tres especies predominantes en el periodo de estudio (primavera-verano), tanto por su distribución, su abundancia y su carga patogénica, han sido *Rhipicephalus turanicus*, *Rhipicephalus sanguineus* y *Hyalomma lusitanicum*.
4. Se ha detectado un nivel moderado de infestación por garrapatas en el ganado ovino de las dos zonas estudiadas en la isla de Mallorca.
5. En ganado ovino, las especies más relevantes durante el período de primavera-verano han sido *Rhipicephalus turanicus* y *R. sanguineus*, tanto por su prevalencia como por el porcentaje de infección de patógenos.
- 6.- *Rhipicephalus turanicus* fue la especie más abundante en las tres zonas de vegetación (montañosa, central y costera) muestreadas. La zona central fue la que presentó mayor diversidad de especies de garrapatas.

7. Los hospedadores más importantes de fauna silvestre han sido *Atelerix algirus* y *Martes martes*, tanto por la diversidad de garrapatas como por la carga patogénica que hospedan.

8. En las garrapatas analizadas se han identificado ehrlichias cercanas a *E. muris*, *Borrelia* del grupo Lyme y del grupo R57 y *Rickettsia conorii*, además de rickettsias cercanas a *R. aeschlimanii*, patógenos importantes a nivel médico; así como *Anaplasma ovis* y *Erhlichia canis*, patógenos importantes a nivel veterinario.



BIBLIOGRAFÍA

7. – BIBLIOGRAFÍA

- Aguirrebengoa, K.; Portillo, A.; Santibañez, S.; Marin, J.J.; Montejo, M.; Oteo, J.A. (2008) Human *Rickettsia sibirica mongolitimonae* infection, Spain. **Emerg Infect Dis**; 14:528-529.
- Aktas, M. (2014) A survey of ixodid tick species and molecular identification of tick-borne pathogens. **Vet Parasit**; 200:276-283.
- Alarcón, A. (2007) Fiebre Q: todavía muchas preguntas por resolver. **Enferm Infecc Microbiol Clin**;25(3):165-7.
- Alekseev, A.N.; Dubinina, H.V.; Jaaskelainen, E.; Vapalahti, O.; Vaheri, A. (2007). First report on tick-borne pathogens and exoskeleton anomalies in *Ixodes persulcatus* Schulze (Acari:Ixodidae) collected in Kokkala Coastal Region Finland. **Int Journal of Acarolog**, 33(3): 253-258.
- Alkorta, N., Aguirrebengoa, K. (2000) Tularemia acquired by tick bites in Castilla-León region. **Rev Clin Esp**; 200(9): 528-9.
- Almeria, S.; Castellà. J.; Ferrer, D.; Ortuño, A.; Estrada-Peña, A.; Guitiérrez, J.F (2001). Bovine piroplasms in Minorca (Balearic Islands, Spain): a comparison of PCR-based and light microscopy detection. **Vet Parasitol** ; 99(3): 249-259.

- Almería, S.; Delgado-Neira, Y.; Adelantado, C.; Huguet, M.; Vinent, J.; Nicolàs, A. (2009) Mediterranean Theileriosis and Other Tick Transmitted Piropasmoses in Cattle in Minorca (Balearic Islands, Spain): the Effect of Tick Control on Prevalence Levels Analyzed by Reverse Line Blot (Rlb) Macroarrays. **J Parasitol**; 95 (3): 598-603.
- Amusatogui, I.; Tesouro, M.A.; Kakoma, I.; Sainz, A. (2008) Serological Reactivity to *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Neorickettsia risticii*, *Borrelia burgdorferi* and *Rickettsia conorii* in Dogs from Northwestern Spain. **Vec Bor Zoon Dis**, 8(6): 797-804.
- Anda, P.; Segura del Pozo, J.; Díaz, J.M.; Escudero, R.; García, F.J.; López, M.C.; Sellek, R.E.; Jiménez, M.R.; Sánchez, L.P.; Martínez, J.F. (2001) Waterborne outbreak of tularemia associated with crayfish fishing. **Emerg Infect Dis**; 7(3 Suppl): 575-82.
- Anda, P.; Escudero, R; Jado, I.; Rodriguez, I.; Jimenez, M.I.. (2005) "Método y kit de detección de especies bacterianas mediante análisis de ADN". **Patente PCT/ES2006/070082**.
- Antón, E.; Nogueras, M.M.; Pons, I.; Font, B.; Muñoz, T.; Sanfeliu, I.; Segura, F. (2008) *Rickettsia slovaca* infection in humans in the northeast of Spain: seroprevalence study. **Vec Bor Zoon Dis**; 8:689-694.

- Apanaskevich, D.A.; Santos-Silva, M.M.; Horak, I.G. (2008) The genus *Hyalomma* Koch, 1844. IV. Redescription of all parasitic stages of *H. (Euhyalomma) lusitanicum* Koch, 1844 and the adults of *H. (E.) franchinii* Tonelli Rondelli, 1932 (acari: ixodidae) with a first description of its immature stages. **Folia Parasitol (Praha)**; 55:61-74.
- Armstrong, P.M.; Rich, S.M.; Smith, R.; Hartl, D.; Spielman, A.; Telford, S. (1996) A new *Borrelia* infecting Lone Star ticks. **Lancet**; 347(8993): 67-8.
- Arnal, A.; Gomez-Diaz, E.; Cerda-Cuellar, M.; Lecollinet, S.; Pearce-Duvet, J.; Busquets, N.; Garcia-Bocanegra, I.; Pages, N.; Vittecoq, M.; Hammouda, A.; Samraoui, B.; Garnier, R.; Ramos, R.; Selmi, S.; Gonzalez-Solis, J.; Jourdain, E.; Boulinier, T. (2014) Circulation of a Meaban-Like Virus in Yellow-Legged Gulls and Seabird Ticks in the Western Mediterranean Basin. **PLOS ONE**; 9 (3).
- Aurelis, S.; Rocchi, G.; Ostanello, F.; Foley, J.E.; Borolo, C.; Reymanek, D.; Rocchi, G.; Orlandi, E.; Tampici, M.P. (2015) Abundance of questing ticks and molecular evidence for pathogens in ticks in three parks of Emilia-Romagna region of Northern Italy. **Ann Agric Zoo Med**; 22(3): 459-466.
- Babudieri B. (1959) Q fever a zoonosis. **Adv Vet Sci**; 5: 81-182.
- Bakken, J. S.; Dumler, J.S. (2000) Human granulocytic ehrlichiosis. **Clin Infect Dis**; 31(2): 554-60.

- Baneth, G. (2014) Tick-borne infections of animals and humans: a common ground. **I J Parasitol**;44: 591-596.
- Barandika, J.F.; Hurtado, A.; Garcia-Esteban, C.; Gil, H.; Escudero, R.; Barral, M.; Jado, I.; Juste, R.A.; Anda, P.; García-Pérez, A.L. (2007) Tick-borne zoonotic bacteria in wild and domestic small mammals in northern Spain. **Appl Environ Microb**; 73(19): 6166-6171.
- Barandika, J.F.; Hurtado, A.; García-Sanmartín, R.A.; Anda, P.; García-Pérez, A.L (2008) Prevalence of tick-borne zoonotic bacteria in questing adults ticks from Northern Spain. **Vect Bor Zoon Dis**; 8(6): 829-835.
- Barandika, J.F. (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 doctoral. Universidad de León, Facultad de Veterinaria, Dept. de Sanidad Animal.
- Barandika, J.F.; Olmeda, S.A.; Casado-Nistral, A.; Huratdo, A.; Juste, R.A.; Valcárcel, F.; Anda, P.; García-pérez, A.L. (2011) Differences in questing tick species distribution between Atlantic and Continental climate areas in Spain. **J Med Entomol**; 48 (1): 13-19.
- Barbour, A.G., Maupin, G.O.; Teltow, G.; Carter, J.; Piesman, J. (1996) Identification of an uncultivable *Borrelia* species in the hard tick *Amblyomma americanum*: possible agent of a Lyme disease-like illness. **J Infect Dis**; 173(2): 403-9.

- Barral-Hidalga, M. (1998) Estudio de la infección por *Borrelia burgdorferi*, grupo *Ehrlichia phagocytophila* y virus de la encefalitis ovina en las poblaciones de ixódidos de la comunidad autónoma vasca. Tesis doctoral. Universidad de Zaragoza. España.
- Barral, M.; García-Pérez, A.L.; Juste, R.; Hurtado, A.; Escudero, R.; Sellek, R.; Anda, P. (2002) Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) ticks from the Basque Country, Spain. **J Med Entomol** ; 39(1): 177-84.
- Beati, L.; Finidori, J.P.; Gilot, B.; Raoult, D. (1992) Comparison of serologic typing, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis protein analysis, and genetic restriction fragment length polymorphism analysis for identification of rickettsiae: characterization of two new rickettsial strains. **J Clin Microbiol**; 30(8): 1922-30.
- Bedell, D.M.; Dimopoulos, G.T. (1963) Biologic properties and characteristics of *Anaplasma marginale*. II. The effects of sonic energy on the infectivity of whole blood preparations. **Am J Vet Res**; 24: 278-82.
- Bekker, C.P.; de Vos, S.; Taufik, A.; Sparagano, O.A.E.; Jongejan, F. (2002) Simultaneous detection of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in ruminants and detection of *Ehrlichia ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks by reverse line blot hybridization. **Vet Microbiol**; 89(2-3): 223-38.

- Bennett, C. E. (1995). Ticks and Lyme disease. **Adv Parasitol**; 36: 343-405.
- Bernabeu-Witel, M.; Del Toro, M.D.; Noguerras, M.M.; Muniain, M.A.; Cardenosa, N.; Segura, F.; Pachon, J. (2006) Presence of human past infections due to Bar29 rickettsial strain in Southern Spain. **J Infect**; 52: 117-119.
- Billeter, S.A.; Levy, M.G.; Chomel, B.B.; Breitschwerdt, E.B. (2008) Vector transmission of *Bartonella* species with emphasis on the potencial for tick transmission. **Med Vet Entomol**; 22: 1-15.
- Bioatlas de les Illes Balears 2.0. (sf) Conselleria d'Agricultura, Medi Ambient i Territori. Direcció General de Medi natural, Educació Ambiental i Canvi Climàtic. Govern Balear. www.bioatles.caib.es
- Blanco, J.R.; Raoult, D. (2005) Enfermedades producidas por *Bartonella* spp. **Enferm Infecc Microbiol Clin**; 23 (5): 313-320.
- Boulouis, H.J. ; Chang, C.C. ; Henn, J.B. ; Kasten, R.W.; Chomel, B.B. (2005) Factors associated with the rapid emergence of zoonotic *Bartonella* infections. **Vet Res**; 36(3): 383-410.
- Broekhuijsen, M., Larsson, P. (2003) Genome-wide DNA microarray analysis of *Francisella tularensis* strains demonstrates extensive genetic conservation within the species but identifies regions that are unique to the highly virulent *F. tularensis* subsp. *tularensis*. **J Clin Microbiol**; 41(7): 2924-31.

- Brouqui, P; Parola, P.; Fournier, P.E.; Raoult, D. (2007) Spotted fever rickettsioses in southern and eastern Europe. **FEMS Immunol Med Microbiol**; 49:2-12.
- Buller, R. S., M. Arens, y cols. (1999) *Ehrlichia ewingii*, a newly recognized agent of human ehrlichiosis. **N Engl J Med**; 341(3): 148-55.
- Burgdorfer, W.; Barbour, A.G; Hays, S.F.; Benack, J.L.; Grunwaldt, E.; Davis, J.P (1982) Lyme disease-a tick-borne spirochetosis? **Science**; 216(4552): 1317-9.
- Caeiro, V.M.P.; Simoes, A.L. (1991) Ixodoidea da fauna silvestre em Portugal continental. Interesse do seu conhecimento. **Revista Portuguesa de Ciencias Veterinarias**; 86: 20-30.
- Campos, A., Merino, F.J. (1999) Retrospective diagnosis of the first case of tularemia associated with hare contact in Spain. **Enferm Infecc Microbiol Clin**; 17(8): 417-8.
- Cao, W.C., Zhao, Q.M; Zhang, P.H.; Dumler, S.; Zhang, X.T.; Yang, H. (2002) Granulocytic Ehrlichiae in *Ixodes persulcatus* ticks from an area in China where Lyme disease is endemic. **J Clin Microbiol**; 38(11): 4208-10.

- Carson, C.A., Weisiger, R.M.; Ristic, M.; Thurmon, J.C. (1974) Nelson, R. Appendage-related antigen production by *Paranaplasma caudatum* in deer erythrocytes. **Am J Vet Res**; 35(12): 1529-31.
- Castellà, J.; Estrada-Peña, A.; Almeria, S.; Ferrer, D.; Gutiérrez, J.F.; Ortuño, A. (2001) A survey of ticks (Acari:Ixodidae) on dairy cattle on the island of Menorca in Spain. **Exp Appl Acarol**; 25: 899-908.
- Cordero del Campillo, M.; Castañon Ordóñez, L.; Reguera Feo, A. (1994) Índice-catálogo de Zooparásitos Ibéricos. Universidad de León.
- Cross, J. T.; Jacobs, R.F. (1993) Tularemia: treatment failures with outpatient use of ceftriaxone. **Clin Infect Dis**; 17(6): 976-80.
- 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. **Parasite Vec**; 6:213
- Dantas-Torres, F. (2008) The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. **Vet Parasit**; 152:173-185.

- Dawson, J.E., Rikihisa, Y.; Ewing, S.A., Fishbein, D.B. (1991) Serologic diagnosis of human ehrlichiosis using two *Ehrlichia canis* isolates. **J Infect Dis**; 163(3): 564-7.
- De la Fuente, J.; Naranjo, V.; Ruiz-Fons, F.; Vicente, J.; Estrada-Peña, A.; Almazan, C.; Kocan, K.M.; Martín, M.P.; Cortazar, C. (2004) Prevalence of tick-borne pathogens in ixodid ticks (Acari: Ixodiadae) collected from European wild boar (*Sus scrofa*) and Iberian red deer (*Cervus elephus hispanicus*) in central Spain. **Eur J Wildlife Res**; 50(4): 187-196.
- De la Fuente, J.; Vicente, J.; Höfles, U.; Ruiz-Fons, F.; Fernández de Mera, I.G.; Van Den Bussches, R.A.; Kocan, K.M.; Gortazar, C. (2004b) *Anaplasma* infection in free-ranging Iberian red deer in tre region of Castilla-La Mancha, Spain. **Vet Microbiol**; 100(3-4): 163-173.
- De la Fuente, J.; Naranjo, V.; Ruiz_Fons, F.; Höfles, U.; Fernández de Mera, I.G.; Villanúa, D.; Almazán, C.; Torina, A.; Carapacca, S.; Kocan, K.M.; Gortázar, C. (2005) Potencial vertebrate reservoir hosts and invertebrate vectors od *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophyllum* in central Spain. **Vec Bor Zoon Dis**; 5(4): 390-401.
- Dimosthenis, C.; Ioannis, I.; Vassilios, S.; Theodoros, D.; Nikolaos, K.; Byron, P.; Yannis, T.; Anna, P. (2012) Spotted Fever Group *Rickettsiae* in Ticks in Cyprus. **Mic Ecol**; 63 (2): 314-323.

- Dumler J.S; Walker, D.H. (2001) Tick-borne ehrlichiosis. **Lancet Infect Dis**; 4: 21-8.
- Dumler, J.S.; Choi, K.S ; Garcia-Garcia, J.C. ; Barat, N.S. ; Scorpio, D.G. ; Garyo, J.W. ; Grab, D.J. ; Bakken, J.J. (2005) Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. **Emerg Infect Dis**; 11(12): 1828-34.
- ECDC (2013). Reporting on 2011 surveillance data and 2012 epidemic intelligence data. **Annual epidemiological report**.
- ECDC (2015) Guidance: ECDC communication Toolkit on Tick-borne diseases.
- EFSA (2010) Scientific Opinion on Geographic Distribution of Tick-borne Infections and their Vectors in Europe and the other Regions of the Mediterranean Basin. Parma, Italy.
- Eliasson, H.; Lindback, J. (2002) The 2000 tularemia outbreak: a case-control study of risk factors in disease-endemic and emergent areas, Sweden. **Emerg Infect Dis**; 8(9): 956-60.
- Encinas Grandes, A.; Oleaga Pérez, A.; Pérez Sánchez, R. (1999) Garrapatas Duras. McGraw-Hill Interamericana ed. Madrid. 420-29.
- Enright, M.C.; Spratt, B.G. (1999) Multilocus sequence typing. **Trends Microbiol**; 7: 482-7.

- Escudero, R., Barral, M. (2000). Molecular and pathogenic characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates from Spain. **J Clin Microbiol**; 38(11): 4026-33.
- Espejo-Arenas, E.; Raoult, D. (1989) First isolates of *Rickettsia conorii* in Spain using a centrifugation-shell vial assay **J Infect Dis**; 159:1158-1159.
- Estrada Peña A., Sánchez Acebo C., 1988. Morfología comparada de *Rhipicephalus sanguineus* y *R. turanicus* (Acarina: Ixodidae). **Rev Ibér Parasitol**; 48: 51-62.
- Estrada-Peña, A.; Dehesa, V.; Sanchez, C. (1990) The seasonal dynamics of *Haemaphysalis punctata*, *Rhipicephalus bursa* and *Dermacentor marginatus* (Acari:Ixodidae) on sheep of Pais Vasco (Spain). **Acarologia**; 31:17-24.
- Estrada-Peña, A.; Osacar, J.J.; Gortazar, C.; Calvete, C.; Lucientes, J. (1992) An account of the ticks of the northeastern of Spain (acarina, ixodidae). **Ann Parasitol Hum Comp.**; 67(2):42-9.
- Estrada-Peña, A. (1994) Las Garrapatas En España: Introducción. Castilla y León: Consejería de Sanidad y Bienestar social.
- Estrada-Peña, A.; Oteo, J.A.; Estrada-Peña, R.; Gortázar, G.; Osácar, J.J.; Moreno, J.A.; Castellà, J. (1995) *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks (Acari: Ixodidae) from two different foci in Spain. **Exp Appl Acarol**; 19(3): 173-80.

- Estrada-Peña, A.; Bosch, M.; Perochi, V. (1996) First record of *Ornithodoros (Alectorobius) maritimus* Vermeil and Marguet (Acari: Argasidae) in Spain. **Acarologia**; 37(1): 19-21.
- Estrada-Peña, A.; Bouattour, A.; Camicas, J.L.; Walker, A.R. (2004a) Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region. Zaragoza: University of Zaragoza.
- Estrada Peña, A.; Quílez, J.; Sánchez Acebo, C. (2004b) Species composition, distribution, and ecological preferences of the ticks of grazing sheep in north-central Spain. **Med Vet Entomol**; 18: 123-33.
- Farlow, J.; Smith, K.L. (2001) *Francisella tularensis* strain typing using multiple-locus, variable-number tandem repeat analysis. **J Clin Microbiol**; 39(9): 3186-92.
- Fauna Ibérica. El Reino Animal de la Península Ibérica y las Islas Baleares. (sf). National Museum of Natural History. <http://www.fauna-iberica.mncn.csic.es>.
- Feldman-Muhsam B (1956) The value of the female genital aperture and the perstigmatal hairs for specific diagnosis in the genus *Rhipicephalus*. **Bull Res Council of Israel**; 5B:300-306.
- Fenollar, F.; Raoult, D. (2004) Molecular genetic methods for the diagnosis of fastidious microorganisms. **acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**; 112(11-12): 785-807.

- Fernández, R.M.; García, V.Z. (1994) Control ecológico de la garrapata *Boophilus* spp. del ganado bovino. Folleto informático N°4. INIFAP. Pág. 13.
- Fernández-de-Mera, I.G.; Zivkovic, Z.; Bolaños, M.; Carranza, C.; Pérez-Arellano, J.L.; Gutierrez, C.; De la Fuente, J. (2009) *Rickettsia massiliae* in the Canary Islands. **Emerg Infect Dis**; 15:1869-1870.
- Fernández-Soto, P.; Encinas-Grandes, A.; Pérez-Sánchez, R. (2003) *Rickettsia aeschlimannii* in Spain: molecular evidence in *Hyalomma marginatum* and five other tick species that feed on humans. **Emerg Infect Dis**; 9: 889-890.
- Fernández-Soto, P.; Pérez-Sánchez, R.; Encinas-Grande, A.; Sanz, A. (2004) Detection and identification of *Rickettsia helvetica* and *Rickettsia* sp. IRS3/IRS4 in *Ixodes ricinus* ticks found on humans in Spain. **Eur J Clin Microbiol**; 23(8): 648-649.
- Fernández-Soto, P.; Pérez-Sánchez, R.; Díaz, V. ; Encinas-Grandes, A. ; Álamo, R. (2006) *Rickettsia massiliae* in ticks removed from humans in Castilla y León, Spain. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** ; 25:811–813.
- Fernández-Soto, P.; Pérez-Sánchez, R.; Alamo-Sanz, R.; Encinas-Grandes, A. (2006a) Spotted fever group rickettsiae in ticks feeding on humans in northwestern Spain: is *Rickettsia conorii* vanishing? **Ann N Y Acad Sci**; 1078: 331-3.

- Fernández-Soto, P., R. Pérez-Sánchez ; Encinas-Grandes, A. ; Alamo-Sanz, R. (2006b) *Rickettsia slovaca* in *Dermacentor* ticks found on humans in Spain. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**; 25:129-131.
- Fernández-Soto, P.; Diaz, M.; Pérez-Sánchez, R. (2009) Increased prevalence of *Rickettsia aeschlimannii* in Castilla Leon, Spain. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**; 28:693-695.
- Fournier, P.E. ; Dumler, J.J. (2003) Gene sequence-based criteria for identification of new rickettsia isolates and description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. nov. **J Clin Microbiol**; 41(12): 5456-65.
- Friedhoff, K.T. (1997) Tick-borne diseases of sheep and goats caused by *Babesia*, *Theileria* or *Anaplasma* spp. **Parassitologia**; 39(2): 99-109.
- Fukunaga, M., Takahashi, Y.; Tsuruta, Y.; Matsushita, O.; Ralph, D.; McClelland, M.; Nakao, M. (1995) Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia miyamotoi* sp. nov., isolated from the ixodid tick *Ixodes persulcatus*, the vector for Lyme disease in Japan. **Int J Syst Bacteriol**;45(4): 804-10.
- Fukunaga, M.; Yabuki, M.; Hamase, A.; Oliver, J.H.; Nakao, M. (2000) Molecular phylogenetic analysis of ixodid ticks based on the ribosomal DNA spacer, internal transcribed spacer 2, sequences. **J Parasitol**;86(1): 38-43.

- Fournier, J.J.; Stanneck, D.; Luus, H.G.; Beugnet, F.; Wijnveld, M.; Jongejan, F. (2013) Transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* ticks feeding on dogs and on artificial membranes. **Vet Parasit**; 197(3-4): 595-603.
- García-García, J.C.; Portillo, A.; Núñez, M.J.; Santibañez, S.; Castro, B.; Oteo, J.A. (2010) A patient from Argentina infected with *Rickettsia massiliae*. **Am J Trop Med Hyg**; 82: 691-692.
- García-Moncó, J.C., Benach, J.L. (1992) The characterization of a Spanish strain of *Borrelia burgdorferi*. **Med Clin (Barc)**; 98(3): 89-93.
- García-Peña, F.J.; Suárez Mayoral, P. (1998) Brote de tularemia en la comunidad autónoma de Castilla-León. Primer aislamiento en España de *Francisella tularensis*. **Med Vet**; 15: 418-23.
- Gil, H.; Barral, M.; Escudero, R.; García-Pérez, A.L; Anda, P. (2005) Identification of new *Borrelia* Species among Small Mammals in Area of Northern Spain Where Lyme Disease is Endemic. **Appl Environ Microbiol**; 71: 1336-1345.
- Gil-Collado, J. (1936) Ácaros Ixodoideos de Cataluña y Baleares. Treball del Museu de Ciències Naturals de Barcelona, Vol XI. Serie entomològica. Publicacions de la Junta de Ciències Naturals de Catalunya.

Gil Collado J, Guillen Llera J, Zapatero Ramos LM (1979) Claves para la identificación de los ixodoidea españoles (adultos). **Rev Iber de Parasitol**; 39: 107-18.

Ginsberg, H.S.; Ewing, C.P. (1989) Comparison of flagging, walking, trapping, and collecting from hosts as samplimng methods for northern deer ticks, *Ixodes dammini*, and lone-star tiks, *Amblyomma americanum* (Acari:Ixodidae). **Exp Appl Acarol**; 7:313-322.

Guerrero, A.; Fishbein, D.B.; Mesa, E.; Escudero, R. (1991) Human infection by Erhlichia canis in Spain. **Medicina Clinica**, 96(6); 236-237.

Gray, J.S.; Kahl, O.; Janetzki, C. (1995) The spatial distribution of *Borrelia burgdorferi*-infected *Ixodes ricinus* in the Connemara region of County Galway, Ireland. **Exp Appl Acarol**; 19:717-729.

Grimalt Gelabert, M.; Rodriguez Perea, A.; Servera Nicolau, J.; Rodríguez Gomila, R. Libro-Guía de las Excursiones de las VII Jornadas de Campo de Geografía Física. Universitat de les Illes Balears. Departament de Ciències de la Terra. Mallorca, 20-22 de Marzo de 1991.

Guberman, D.; Mumcuougly, K.Y.; Keysary, A.; IoffeUpensky, I.; Miller, J.; Galun, R. (1996) Prevalence of spotted fever group rickettsiae in tiks from southern Israel. **J Med Ent**; 33(4): 979-982.

- Guglielmone, A.A; Robbins, R.G.; Apanaskevich, D.A.; Petney, T.N.; Estrada-Peña, A.; Horak, I.G. (2009) Comments on controversial tick (Acari: Ixodida) species names and species described or resurrected from 2003 to 2008. **Exp Appl Acarol**; 48:311–327.
- Guijarro Pastor, J.A. (1986) Contribución a la Bioclimatología de Baleares. Dto. Biología y ciencias de la Salud. Universidad de las Islas Baleares.
- Habela, M., Peña, J.; Corchero, E.; Sevilla, R.G. (2002) Manual práctico para la identificación de garrapatas y hemoparásitos de ellas transmitidos de interés veterinario en España. **Parasitología y enfermedades parasitarias. Facultad Veterinaria de Cáceres. UEX**. 2ª Edición.
- Hayes, M.J.; Oliver, J.H. (1981) Immediate and latent effects induced by the antiallatotropin precocene 2 (P2) on embryonic *Dermacentor variabilis* (Say)(Acari: Ixodidae). **J Parasitol**; 67 (6): 923-927.
- Higgins, J. A.; Hubalek, Z; Halouzca, J.; Elkins, K.L.; Sjostedt, A.; Shipley, M.; Ibrahim, M.S. (2000) Detection of *Francisella tularensis* in infected mammals and vectors using a probe-based polymerase chain reaction. **Am J Trop Med Hyg**; 62(2): 310-8.
- Hilbink, F.; Penrose, M.; Cova, E.K.; Kazar, J. (1993) Q fever is absent from New Zealand. **Int J Epidemiol**; 22(5): 945-9.
- Hillyard, PD. (1996) Ticks of North-West Europe. The Natural History Museum ed. London.

Hofmann-Lehmann, R.; Meli, M.L.; Dreher, U.M.; Gonczi, E.; Deplazes, P.; Braun, U.; Engels, M.; Schupbach, J.; Jorger, K.; Thoma, R. Concurrent infections with vector-borne pathogens associated with fatal hemolytic anemia in a cattle herd in Switzerland. **J Clin Microbiol**; 42(8): 3775-3780

Hoogstraal, H.; Valdez, R. Tick (Ixodoidea) from wild sheep and goat in Iran and medical and veterinary implications. **Fieldiana, Zoology**; 6: 16.

Hubalek, Z., Sixl, W. (1997) Prevalence of *Francisella tularensis* in *Dermacentor reticulatus* ticks collected in adjacent areas of the Czech and Austrian Republics. **Cent Eur J Public Health**; 5(4): 199-201.

Hubbard, M. J., Baker, A.S.; Cann, K. (1999) Distribution of *Borrelia burgdorferi* s.l. spirochaete DNA in British ticks (*Argasidae* and *Ixodidae*) since the 19th century, assessed by PCR. **Med Vet Entomol**; 12(1): 89-97.

Ibarra, V.; Oteo, J.A.; Portillo, A.; Blanco, J.R.; Metola, L.; Eiros, J.M.; Pérez-Martínez, L.; Sanz, M. (2006) *Rickettsia slovaca* infection: DEBONEL/TIBOLA. **Ann N Y Acad Sci**; 1078:206-214.

Ibrahim, A.; Gerner-Smidt, P. (1996) Amplification and restriction endonuclease digestion of a large fragment of genes coding for rRNA as a rapid method for discrimination of closely related pathogenic bacteria. **J Clin Microbiol**; 34(12): 2894-6.

- Inokuma, H., Brouqui, P.; Dancourt, M.; Raoult, D. (2001) Citrate synthase gene sequence: a new tool for phylogenetic analysis and identification of *Ehrlichia*. **J Clin Microbiol**; 39(9): 3031-9.
- Ioannou, I.; Sandalakis, V.; Kassinis, N.; Chochlakis, D.; Papadopoulos, B.; Loukaides, F.; Tselentis, Y.; Psaroulaki, A. (2011) Tick-borne bacteria in Mouflon and their ectoparasites in Cyprus. **J Wildlife Dis**; 47(2).
- Iredell, J., Blanckenberg, D.; Arvand, M.; Grauling, S.; Feil, E.J.; Birtles, R.J. (2003) Characterization of the natural population of *Bartonella henselae* by multilocus sequence typing. **J Clin Microbiol**; 41(11): 5071-9.
- Jado, I.; Escudero, R.; Gil, H.; Jiménez-Alonso, M.I.; Sousa, R.; García-Pérez, A.L.; Rodríguez-Vargas, M.; Lobol, B.; Anda, P. (2006) Molecular method for identification of *Rickettsia* species in clinical and environmental samples. **J Clin Microbiol**; 44(12): 4572-6.
- Jado, I.; Oteo, J.A.; Aldamiz, M.; Gil, H.; Escudero, R.; Ibarra, V.; Portu, J.; Portillo, A.; Lezaun, M.J.; García-Amil, C.; Rodríguez-Moreno, I.; Anda, P. (2007) *Rickettsia monacensis* and human disease, Spain. **Emerg Infect Dis**; 13:1405-1407.
- Jameson, L.J.; Medlock, J.M. (2011) Tick Surveillance in Great Britain. **Vec Bor Zoon Dis**; 11(4): 403-412.

- Juste, R.A., Scott, G.R; Paxton, E.A.; Gelabert, J.L.; Jimenez, S. (1989) Presence of *Cytoecetes phagocytophila* in an atypical disease of cattle in Spain. **Vet Rec**; 124(24): 636.
- Jolivet, O. (1951) Capture de tiques a Majorque. **Vie et milieu**; 2: 531.
- Kocan, K.M., de la Fuente, J.; Blouin, E.F.; Garcia-Garcia, J.L. (2004) *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. **Parasitology**; 129 Suppl: S285-300.
- Krier, J.P.; Ristic, M. (1963) Anaplasmosis. VII. Experimental *Anaplasma ovis* infection in white-tailed deer (*Dama virginiana*). **Am J Vet Res**; 24: 567-72.
- Kurtenbach, K. ; De Michelis, S. ; Etti, S. ; Schäfer, M. ; Sewell, H.S. ; Brade, V. ; Kraiczy, P. (2002) Host association of *Borrelia burgdorferi* sensu lato--the key role of host complement. **Trends Microbiol** ; 10(2): 74-9.
- Kuttler, K.L. (1984) *Anaplasma* infections in wild and domestic ruminants: a review. **J Wildl Dis**; 20(1): 12-20.
- Lane, R. S., Burgdorfer, W.; Hayes, S.F.; Barbour, A.G. (1985) Isolation of a spirochete from the soft tick, *Ornithodoros coriaceus*: a possible agent of epizootic bovine abortion. **Science**; 230(4721): 85-7.

- Latrofa, M.S.; Dantas-Torres, F.; Giannelli, A.; Otranto, D. (2014). Molecular detection of tick-borne pathogens in *Rhipicephalus sanguineus* group ticks. **Tick and Tick-borne Diseases**; 5(6): 943-946.
- Lepe, J.A.; Guerrero, F.J. (1999) The epidemiology of Q fever in the northern area of Huelva, Spain. **Enferm Infecc Microbiol Clin**; 17(2): 65-8.
- Le Riche, P.D.; Altan, Y.; Campbell, B.; Efstathiou, G.C. (1974) Ticks (Ixodoidea) of domestic animals in Cyprus. **Bull Ent Res**; 64: 53-63.
- Literak, I.; Norte, A.C.; Nuncio, M.S.; de Carvalho, I.L.; Ogrzewalska, M.; Novakova, M.; Martins, T.F.; Sychra, O.; Resender, R.; Rodrigues, P. (2015) Ticks on passerines from the Archipelago of the Azores as hosts of borreliae and rickettsiae. **Tick and Tick-Borne Disease**; 6(5): 607-610.
- Lopes de Carcalho, I.; Toledo, A.; Carcalho, C.I.; Barandika, J.F.; García-Pérez, A.L.; Olmeda, A.S.; Zé-Zé, L.; Petersen, J.M.; Anda, P.; Nuncio, M.S.; Escudero, R. (2015) *Francisella* species in ticks and animals, Iberian Peninsula. **Tick and Tick-Borne Disease**; (In Press).
- Lorusso, V.; Lia, R.P.; Dantas-Torres, F.; Mallia, E.; Ravagnan, S.; Capelli, G.; Otranto, D. (2011) Ixodid ticks of road-killed wildlife species in southern Italy: new tick-host associations and locality records. **Exp App Acarol**; 55: 293-300.

- Loui, M.; Mahnoodi, M.; Fattahi, R. (2015) Prevalence of ixodid ticks on cattle, sheep and goat in Ilam Country, Ilam Province Iran. **J Paras Disease**; 39(1): 37-40.
- Manilla, G. (1991) Specie nuove per l'ixodofauna italiana. IV. *Ixodes ventalloi*. **Riv Parassitol**; 52 : 197-205.
- Manilla, G. (1998) Fauna d'Italia. Acari Ixodida. Edizioni Calderini Bologna ed. Bologna.
- Márquez, F.J. (2008) Spotted fever group rickettsia in ticks from southeastern Spain natural parks. **Exp Appl Acarol**; 45(3-4):185-94.
- Márquez, F.J.; Millán, J. (2009) *Rickettsiae* in ticks from wild and domestic carnivores of Doñana National Park (Spain) and surrounding area. **Clin Microbiol Infect**; 15 (2): 224-226.
- Giovanna, M.; Valentina, C.; Giuseppe, S.; Christina, S.; Didier, R.; Philippe P. (2012) *Rickettsia slovaca* from *Dermacentor marginatus* ticks in Sardinia, Italy. **Ticks and Tick-borne Diseases**; 3 (5–6): 393–395.
- Matsumoto, K., Parola, P. (2004) *Rickettsia aeschlimannii* in *Hyalomma* ticks from Corsica. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**; 23(9): 732-4.
- Merino, F.J.; Nebreda, T.; Serrano, J.L.; Fernández-Soto, P.; Encinas, A.; Pérez-Sánchez R. (2005) Ticks species and tick-borne identified in population from a rural area of Spain. **Epidemiol Infect**; 133: 943-949.

- Mierzejewska, E.J; Alsarraf, M.; Behnke, J.M.; Bajer, A. (2015) The effect of changes in agricultural practices on the density of *Dermacentor reticulatus* ticks. **Vet Parasitol**; 211(3-4): 259-265.
- Milutonovic, M.; Masuzawa, T.; Tomanovic, S. (2008) *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum*, *Francisella tularensis* and co-infections in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks collected in Serbia. **Exp Appl Acarol**; 45:171-183.
- Monerris, M.; Paredes-Esquivel, C.; Miranda, M. (2011) Nuevos registros de la fauna de garrapatas (Acari: Ixodidae) en las Islas Baleares (España) (New record of tick fauna from the Balearic Islands (Spain) (Acari:Ixodidae)). **Bol Asoc Española de Entomol**; 35(3-4): 477-481.
- Montes, M.; Cilla, G. (2006) Gipuzkoa, Basque Country, Spain (1984-2004): a hyperendemic area of Q fever. **Ann N Y Acad Sci**; 1078: 129-32.
- Nadelman, R.B., Wormser, G.P. (1998) Lyme borreliosis. **Lancet**; 352(9127): 557-65.
- Nasser, A. (1990) Seasonal dynamics of *Rhipicephalus turanicus* (Acari: Ixodidae) on sheep and goats in the Al-Sarawat mountains of Makkah province, Saudi Arabia. **Bull Inst Zool Academia Sinica**; 29(2):113-120.

- Niebylski, M. L., M. G. Peacock, y cols. (1997) Characterization of an endosymbiont infecting wood ticks, *Dermacentor andersoni*, as a member of the genus *Francisella*. **Appl Environ Microbiol**; 63(10): 3933-40.
- Nuncio, M.S., Péter, O. (1993) Isolamento e caracterização de Borrélias de *Ixodes ricinus* L. em Portugal. **Rev Portuguesa Doenças Infecç**; 16: 175-9.
- Noda, H., U. G. Munderloh, y cols. (1997) Endosymbionts of ticks and their relationship to *Wolbachia* spp. and tick-borne pathogens of humans and animals. **Appl Environ Microbiol**; 63(10): 3926-32.
- Norte, A.C.; de Carvalho, I.L.; Ramos, J.A.; Goncalves, M.; Gern, L; Nuncio, M.S. (2012) Diversity and seasonal patterns of tick parasitizing wild birds in western Portugal. **Exp Appl Acarol**; 58(3), 327:339.
- Omer Taib, L.; Abdul-Aziz Kadir, M.; Seitzer, U.; Ahmed, J.S. (2007) A survey of ticks (Acari:Ixodidae) on cattle, sheep and goats in the Dohuk Governorate, Iraq. **Parasitol Res**; 101: 79-81.
- O'Neill, S. L., y J. H. Werren. (1997) The evolution of heritable symbionts. In: *Influential Passengers*. S. L. O'Neill, A. A. Hoffmann, and J. H. Werren, Eds., Oxford Univ. Press, London; 1–41.

- Ogden, N.H., Bown, K.; Morrocks, B.K.; Woldehiwet, Z.; Bennett, M. (1998) Granulocytic *Ehrlichia* infection in ixodid ticks and mammals in woodlands and uplands of the U.K. **Med Vet Entomol**; 12(4): 423-9.
- Ortuno, A.; Quesada, M.; Lopez-Claessens, S. (2007) The role of wild boar (*Sus scrofa*) in the eco-epidemiology of *R. slocava* in Northeastern Spain. **Vect Bor Zoon Dis**; 7:59-64.
- Osacar-Jimenez, J.J.; Estrada-Peña, A.; Lucientes-Curdi, J. (1998) Ticks (Acarina: Ixodidae) of wild birds in the Ebro Middle Basin (North-East Spain). **Acarologia**; 23-31.
- Oteo, J.A.; Blanco, J.R. (2000). First report of human granulocytic ehrlichiosis from southern Europe (Spain). **Emerg Infect Dis**; 6(4): 430-2.
- Oteo, J.A.; Gil, H. (2001) Presence of granulocytic ehrlichia in ticks and serological evidence of human infection in La Rioja, Spain. **Epidemiol Infect**; 127(2): 353-8.
- Oteo, J.A.; Ibarra, V. (2002) DEBONEL (Dermacentor-borne-necrosis erythemalymphadenopathy). A new tick-borne disease? **Enferm Infec Microbiol Clin**; 20(2): 51-2.
- Oteo, J. A.; Portillo, S.; Pérez-Martínez, L.; Blanco, J.R.; Ibarra, V.; Pérez-Palacios, A.; Sanz, M. (2006) Prevalence of spotted fever group *Rickettsia* species detected in ticks in La Rioja, Spain. **Ann N Y Acad Sci**; 1078: 320-3.

- Oteo, J.A.; Portillo, A. (2012) Tick-borne rickettsioses in Europe. **Tick and Tick-borne Diseases**, 3: 270-277.
- Ouhelli, H. ; Pandey, V.S. ; Benaoui, T. ; Belkasmi. (1982) Seasonal prevalence of *Rhipicephalus turanicus* on sheep in Morocco. **Trop Anim Hlth Prod**; 247-248.
- Page, R.J.C.; Langton, S.D. (1996) The occurrence of ixodid ticks on wild mink *Mustela vison* in England and Wales. **Med Vet Entomol**; 10: 359-364.
- Palomar, A.M.; Santibáñez, P.; Mazuelas, D.; Roncero, L.; Santibáñez, S.; Portillo, A.; Oteo, J.A (2012). Role of Birds in Dispersal of Etiologic Agents of Tick-borne Zoonoses, Spain, 2009. **Emerg Inf Dis**; 18(7): 1188-1191.
- Parola, P.; Raoult, D. (2001) Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe. **Clin Microbiol Infect**; 7(2): 80-3.
- Parola, P.; Inokuma, H.; Camicas, J.L.; Brouqui, P.; Raoult, D. (2001a) Detection and identification of spotted fever group *Rickettsiae* and *Ehrlichiae* in African ticks. **Emerg Infect Dis**; 7(6): 1014-7.
- Parola, P.; Paddock, C.D.; Raoult, D. (2005) Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. **Clin Microbiol Rev**; 18(4): 719-56.

- Papadopolus, B.; Claude Morel, B.P. ; Aeschlimann, A. (1996) Ticks of domestic animals on the Macedonia region of Greece. **Vet Parasitology**; 63 : 25-40.
- Pavlidou, V.; Gerou, S., Kahrmanidou, M; Papa, A. (2008) Ticks infesting domestic animals en northern Greece. **Exp Appl Acarol**; 45:195-198.
- Pegram RG, Clifford CM, Walker JB, Keirans JE (1987) Clarification of *Rhipicephalus sanguineus* group (Acari, Ixodoidea; ixodidae). I. *R. sulcatus* Neumann, 1908 and *R. turanicus* Pomerantsev, 1936 **System Parasitol**; 10: 3-26
- Pérez-Castrillón, J.L., Bachiller-Luque, P. (2001) Tularemia epidemic in northwestern Spain: clinical description and therapeutic response. **Clin Infect Dis**; 33(4): 573-6.
- Pläffle, M.; Littwin, N.; Muders, S.V.; Petney, T.N. (2014) The ecology of tick-borne diseases. **I J for Parasitol**; 43: 1059-1077.
- Pons, I.; Sanfeliu, I. (2005). Prevalence of *Bartonella henselae* in cats in Catalonia, Spain. **Am J Trop Med Hyg**; 72(4): 453-7.
- Portillo, A.; Santibáñez, P.; Santibáñez, S.; Pérez-Martínez, L.; Oteo, J.A. (2008) Detection of *Rickettsia* spp. in *Haemaphysalis* ticks collected in La Rioja, Spain. **Vect Bor Zoon Dis**; 8(5): 653-658.

- Porta, F.S.; Nieto, E.A.; Creus, B.F.; Espin, T.M.; Casasnova, F.J.; Sala, I.; García, S.; Aguilar, J.; Vilaseca, M. (2008) Tick-borne lymphadenopathy: a new infectious disease in children. **Pediatr Infect Dis J**; 27:618-622.
- Postic, D., Korenberg, E. (1997). *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Russia and neighbouring countries: high incidence of mixed isolates. **Res Microbiol**; 148(8): 691-702.
- Pusterla, N., Huder, J.B.; Leutenegger, C.; Braun, U.; Madigan, J.E.; Lutz, H. (1999) Quantitative real-time PCR for detection of members of the *Ehrlichia phagocytophila* genogroup in host animals and *Ixodes ricinus* ticks. **J Clin Microbiol**; 37(5): 1329-31.
- Ramos, A. J.; Vargas, J. (2002) Prevalence of *Bartonella* spp. seropositivity in human immunodeficiency virus-infected and non infected intravenous drug abusers. **Med Clin**; 119(15): 565-7.
- Randolph, S. (2010) Human activities predominate in determining changing incidence of tick-borne encephalitis in Europe. EDEN-TBD
- Raoult, D.; Fournier, P.E.; Ereemeeva, M.; Kelly, P.J.; Oteo, J.A.; Sekeyova, Z.; Tamura, A.; Tarasevich, R.; Zhang, L. (2005) Naming of *Rickettsiae* and rickettsial diseases." **Ann N Y Acad Sc**; 1063: 1-12.
- Renvoisé, A.; Raoult, D. (2009) L'actualité des rickettsioses. An update on rickettsiosis. **Med M Infect**; 39: 71-81.

- Rohrbach, B.W.; Westerman, E.; Istre, G.R. (1991) Epidemiology and clinical characteristics of tularemia in Oklahoma, 1979 to 1985. **South Med J**; 84(9): 1091-6.
- Ros-García, A.; García-Pérez, A.; Verdera, J.; Juste, R.A.; Hurtado, A. (2012) Monitoring piroplasms infection in three cattle farms in Minorca (Balearic Islands, Spain) with previous history of clinical piroplamosis. **Vet Parasitol**; 190(3-4): 318-325.
- Ruíz-Fons, F.; Gilbert, L. (2010) The role of deer as vehicles to move ticks, *Ixodes ricinus*, between contrasting habitats. **Int J Parasitol**; 40(9): 1013-1020.
- Ruíz-Tellez A; Muñiz Saitœa, J. (1985) Fiebre Q en Alava: estudio clínico de un brote epidémico. **An Med Intern**; 2: 104-108.
- Rudolph, D.; Knule, W. (1974) Site and mechanism of water vapour uptake from the atmosphere in ixodid ticks. **Nature**; 249:84-85.
- Sainz, A.; Delgado, S.; Amusatogui, I.; Tesouro, M.A.; Carmenes, P. (1996). Seroprevalence of canine ehrlichiosis in Castilla-Leon (north-west Spain). **Preventive Vet Med**, 29(1): 1-7.
- Sanogo, Y.O.; Zeaiter, Z.; Caruso, G.; Merola, F.; Shpynov, S.; Brouqui, P.; Raoult, D. (2003) *Bartonella henselae* in *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodida) removed from humans, Belluno province, Italy. **Emerg Infect Dis**; 9: 329-332.

- Satta, G.; Chisu, V.; Cabras, P. ; Fois, F.; Masala, G. (2011) Pathogens and symbionts in ticks : a survey on tick species distribution and presence of tick-transmitted micro-organisms in Sardinia, Italy. **J Med Microbiol**; 60: 63-68.
- Schmid, G. P. (1985). The global distribution of Lyme disease. **Rev Infect Dis**; 7(1): 41-50.
- Schulze, T.L.; Jordan, R.A.; Hung, R.W. (1997) Bases associated with several sampling methods used to estimate abundance of *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). **J Med Entomol**; 34:615-623.
- Schwan, T.G.; Piesman, J. (2002) Vector interactions and molecular adaptations of lyme disease and relapsing fever spirochetes associated with transmission by ticks. **Emerg Infect Dis**; 8(2): 115-21.
- Scoles, G. A. (2004) Phylogenetic analysis of the *Francisella*-like endosymbionts of *Dermacentor* ticks. **J Med Entomol**; 41(3): 277-86.
- Sevilla, R.G.; Corchero, E.; Peña, J.; Habela, M.A. (2002) Anaplasmosis. **Bovis**; 108: 77-84.
- Shaw, S.E.; Day, M.J.; Birtles, R.J.; Breitschwerdt, B. (2001) Tick-borne infectious diseases of dogs. **Trends in Parasitol**; 17(2):74-80.

- Sjostedt, A.; Eriksson, U. (1997) Detection of *Francisella tularensis* in ulcers of patients with tularemia by PCR. **J Clin Microbiol**; 35(5): 1045-8.
- Smith, C.N.; Gouch, H.K. (1946) Observations on tick repellents. **J Econ Entomol**; 39: 374-378.
- Solano-Gallego, L., Llull, J.; Osso, J.; Hegarty, B.; Breitschwerdt, E. (2006) A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. **Vet Res**; 37(2): 231-44.
- Solberg, V.B.; Neidhardt, K.; Sardelis, M.R. (1992) Quantitative evaluation of sampling methods for *Ixodes dammini* and *Amblyomma americanum* (Acari:Ixodidae). **J Med Entomol**; 29: 451-456.
- Sonshine, D.E.; Hanes, G. (1985) A convenient method for controlling populations of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae), in the natural environment. **J Med Entomol**; 22(5), 577-583.
- Sonshine, D.E. (1991) *Biology of Ticks I*. New York (USA): Oxford University Press, Inc.
- Sonshine, D.E. (1993) *Biology of Ticks II*. New York (USA): Oxford University Press. Ed.
- Sonshine, D.E.; Lane, R.S.; Nicholson, W.L. (2002) Ticks (Ixodida). In *Medical and Veterinary Entomology*. Mullen, G.R.; Durrer, L.A. San Diego, California: Academic Press; 517-518.

- Sonenshine, D.E. (2006) Ticks pheromones and their use in tick control. **Ann Rev Entomol**; 51: 557-580.
- Spitalska, E.; Literak, I.; Kocianova, E.; Tragel'ova, V. (2011) The importance of *Ixodes arboricola* in Transmission of *Rickettsia* spp. *Anaplasma phagocytophylum* and *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in Czech Republic, Centre Europe. **Vec Bor Zoon Dis**; 11(9): 1235-1241.
- Stiller, D.; Coan, M.E. (1995) Recent developments in elucidating tick vector relationships for anaplasmosis and equine piroplasmosis. **Vet Parasitol**; 57(1-3): 97-108.
- Strey, O. F.; Teel, P. D.; Longnecker, M. T. (2001). Effects of pyriproxyfen on off-host water-balance and survival of adult lone star ticks (Acari: Ixodidae). **J Med Entomol**; 38(4): 589-595.
- Subramanian, G.; Sekeyova, Z.; Raoult. D; Mediannilov, O. (2012) Multiple tick-associated bacteria in *Ixodes ricinus* from Slovakia. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, 3(5-6): 405-409.
- Suitor, E. C.; Weiss, E. (1961) Isolation of a rickettsialike microorganism (*Wolbachia persica* n. sp.) from *Argas persicus* (Oken). **J Infect Dis**; 108: 95–106.
- Sun, L.V.; Scoles, G.A. y cols. (2000) *Francisella*-like endosymbionts of ticks. **J Invertebr Pathol**; 76(4): 301-3.

- Tack W.; Madder M.; De Frenne P.; Vanhellefont M.; Gruwez R.; Verheyen K. (2011) The effects of sampling method and vegetation type on the estimated abundance of *Ixodes ricinus* ticks in forests. **Exp and Appl Acarol**; 54:285-292.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei, M.; Kumar, S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Mol Biol Evol**; 28(10):2731-9.
- Tarnvik, A.; Berglund, L. (2003) Tularemia. **Eur Respir J**; 21(2): 361-73.
- Telford, S.R.; Goethert, H.K. (2004) Emerging tick-borne infections: rediscovered and better characterized, or truly 'new'? **Parasitology**; 129 Supl: S301-S327.
- Telford, S.M; Goethert, H.K.; Cunningham, J.A. (2011) Prevalence of *Ehrlichia muris* in Wisconsin Deer ticks collected during the Mid 1990s. **Open Microb J.**; 5: 18-20.
- Téllez, A., C. Sainz, y cols. (1988). "Q fever in Spain: acute and chronic cases, 1981-1985." **Rev Infect Dis**; 10(1): 198-202.
- Thibon, M.; Villiers, V. (1996) High incidence of *Coxiella burnetii* markers in a rural population in France. **Eur J Epidemiol**; 12(5): 509-13.

- Toledo, A. (2007) Dinámica de la infección de garrapatas por agentes zoonóticos en la zona centro de la Península Ibérica. Universidad: Computense De Madrid. Facultad de Veterinaria. Tesis Doctoral.
- Toledo, A.; Jado, I.; Olmeda, A.S.; Casado-Nistal, M.A.; Gil, H.; Escudero, R.; Anda, P. (2009a) Detection of *Coxiella burnetti* in ticks collected from central Spain. **Vec Bor Zoon Dis**; 9(5):465-468
- Toledo, A.; Olmeda, A.S.; Casado-Nistal, M.A.; Escudero, R.; Jado, I.; Valcarcel, F.; Rodríguez-Vargas, M.; Gil, H.; Anda, P. (2009b) Tick-borne zoonotic bacteria in ticks collected from central Spain. **Am J Trop Med Hyg**; 81 (1):67-74
- Torina, A.; Khoury, C.; Caracappa, S.; Maroli, M. (2006) Ticks infesting on farms in Western Sicily, Italy. **Exp App Acarology**; 38 : 75-86.
- Torina, A.; Alongi, A.; Scimeca, S.; Vicente, J.; Caracappa, S.; de la Fuente, J. (2010) Prevalence of Tick-Borne Pathogens in Ticks in Sicily. **Transb Emer Dis**; 57: 46-48.
- Travassos Santos Dias, J. A. (1994) A Carraças (Acarina-Ixodoidea) Da Península Ibérica. Algumas Considerações Sobre a Sua Biogeografia e Relacionamento Com a Ixodofauna Afropaleártica e Afrotropical. Ed. ensaios e documentos Estudos. Lisboa.
- Tsunoda, T.; Kasuga, S., Amano, H. (2004) Estimation of the density of nymphs of the bush tick, *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae), by the cath effort method. **Exp Appl Acarol**; 32:69-78.

- Uruñuela, J.; Díaz, S.D. (1977). Eritema crónico migrans. **Actas Dermatológicas Sifilográficas**; 68: 109-10.
- Van Oosten, A.R.; Heylen, D.J.A., Matthgsen, E. (2014) Host specificity a bird-sècialised endophilic ectoparasite, the tree-hole tick *Ixodes arboricola*. **Parasit research**; 113(2): 4397:4405.
- van der Heijden, I.M.; Wilbrink, B.; Wilbrink, B.; Rijpkema, G.T.; Schouls, M.; eymans, P.H.M.; Van Embden, D.A.; Breedveld, F.C.; Tak; P.P. (1999) Detection of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto by reverse line blot in the joints of Dutch patients with Lyme arthritis. **Arthritis Rheum**; 42(7): 1473-80.
- Walker, J.B; Keirans, J.E.; Horak, I.G. (2000) The Genus *Rhipicephalus* (Acari, Ixodidae). A Guide to the Brown Ticks of the World. Ed. Cambridge University Press. United Kingdom.
- Wall, R.; Shearer, D. (1997) Veterinary Ectoparasites. Second ed. United Kigndom: Blackwell Science.
- Wang, G.; Van Dam, A.P.; Schwartz, I.; Dankert, J. (1999) Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. **Clin Microbiol Rev**; 12(4): 633-53.

- Webster, A.; Reck, J.; Santi, L.; Souza, U. A.; Dall'Agnol, B.; Klafke, G. M.; 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. **Vet Parasitol**; 207(3): 302-308.
- Wikswa, M.E.; Hu, R.; Metzger, M.E.; Eremeeva, M.E. (2007). Detection of *Rickettsia rickettsi* and *Bartonella henselae* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from California. **J Med Entomol**; 44: 158-162.
- Yeruham. I; Hadani, A.; Galker, F.; Rosen, S. (2000) Ticks on two flocks of shep in Israel: prevalence of infestation and corporeal distribution. **Ann Trop Med Parasitol**; 94: 735-738.
- Zaug, J.L.; Goff, W.L.; Foreyt, W.; Hunter, D.L. (1996) Susceptibility of elk (*Cervus elaphus*) to experimental infection with *Anaplasma marginale* and *A. ovis*. **J Wildl Dis**; 32(1): 62-6.
- Zhioua, E.; Heyer, K.; Browing, M.; Ginsberg, H.S.; LeBrun, R.A. (1999) Pathogenity of *Bacillus thuringiensis* Variety kurstaki to *Ixodes scapularis* (Acari:Ixodida). **J Med Entomol**; 36(6): 900-903.
- Zingg, B.C.; LeFebvre, R.B. (1994) Polymerase chain reaction for detection of *Borrelia coriaceae*, putative agent of epizootic bovine abortion. **Am J Vet Res**; 55(11): 1509-15.

Bibliografía



ANEXO

ANEXO I: FICHAS DE LAS ESPECIES DE GARRAPATAS ESTUDIADAS

Como se ha comentado anteriormente en la presente tesis se han identificado doce especies de garrapatas diferentes. Once de ellas pertenecientes a la familia Ixodidae y una a la familia Argasidae (Figura 27).

Subfil. Chelicerata

Supcl. Arachnida

Clase Aranea

Superord. Parasitiformes

Orden Ixodida

Familia Argasidae

Subfam. Ornithodorinae

Ornithodoros maritimus

Familia Ixodidae

Subfam. Ixodinae

Ixodes arborciola

Ixodes frontalis

Ixodes ricinus

Ixodes ventalloi

Subfam. Haemaphysalinae

Haemaphysalis punctata

Subfam. Hyalomminae

Hyalomma lusitanicum

Subfam. Rhipicephalinae

Dermacentor marginatus

Rhipicephalus bursa

Rhipicephalus pusillus

Rhipicephalus sanguineus

Rhipicephalus turanicus

Figura 27: Clasificación sistemática de las especies de garrapatas estudiadas

(fuente: <http://www.fauna-iberica.mncn.csic.es>).

De las especies de garrapatas identificadas en este estudio, tres de ellas pertenecen al llamado *Rhipicephalus sanguineus* group (*R. bursa*, *R. sanguineus* y *R. turanicus*). Este grupo incluye un número de especies morfológicamente muy similares, que hace que su identificación sea controvertida, sobre todo en el caso de *R. sanguineus* y *R. turanicus*.

Algunos autores han establecido caracteres morfológicos validos para diferenciar estas especies como las placas adales y espiraculares en el caso de los machos y las placas adales, la puntuación en el escudo y la apertura genital en hembras (Feldman-Muhsam 1956; Pegram *et al.*, 1987; Gil Collado *et al.*, 1979; Estrada-Peña *et al.* 1988; Estrada Peña *et al.*, 2004).

Un estudio reciente elaborado por DANTAS-TORRES *et al.*, 2013 llevó a cabo un análisis comparativo de este grupo a nivel morfológico y genético. Las conclusiones obtenidas fueron que los caracteres descritos anteriormente son suficientes para diferenciar morfológicamente a *R. sanguineus* de *R. turanicus*, aunque los futuros estudios deberían incorporar análisis morfométricos para la diferenciación de estados inmaduros y adultos.

En la presente tesis se han identificado los ejemplares de *R. sanguineus* y *R. turanicus*, en base a la observación de los caracteres morfológicos anteriormente citados, pudiendo diferenciar estas dos especies de garrapata. En otros estudios realizados en la región Mediterránea se ha seguido la misma metodología (Torina *et al.* 2006 and Papadopoulos *et al.* 1996).

Dermacentor marginatus (Sulzer, 1776)

Morfología: tanto las hembras como los machos son fácilmente distinguibles por presentar un escudo ornamentado.

En el caso de las hembras presentan la base del capítulo rectangular, más larga que ancha y unas córnua pequeñas. En la coxa I presenta una espina pequeña y divergente. La longitud total de una hembra no alimentada es de 4,6-5,4 mm y alimentada puede llegar a medir 1,5 cm.

Los machos presentan la base del capítulo rectangular, tan ancha como larga, con córnua largas y robustas. En la coxa I presentan una espina corta, ancha y divergente, en cambio en la coxa IV tienen una espina muy larga. La longitud total de los machos es de 4,8-5,8 mm.

Las ninfas presentan una base del capítulo casi rectangular, más larga que ancha con los márgenes laterales rectos y notablemente divergentes. La longitud total de las ninfas es de 1,4-1,8 mm.

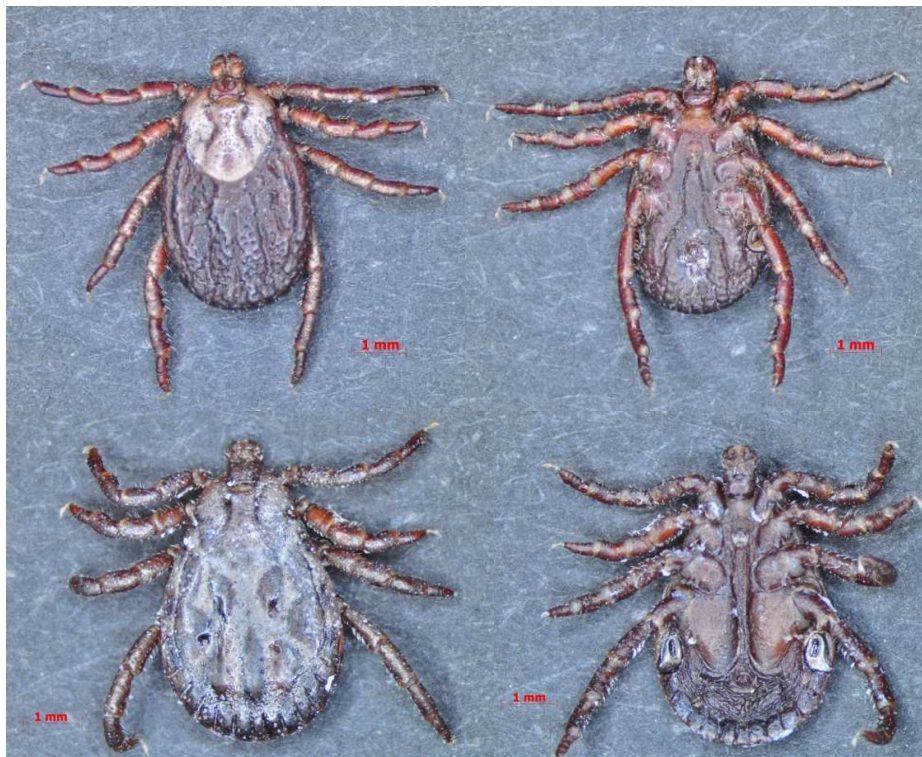


Figura 28: Vista dorsal y ventral de una hembra (arriba) y de un macho (abajo) de *Dermacentor marginatus*. Fotografía: Miriam Monerri.

Haemaphysalis punctata Canestrini & Fanzago, 1878

Morfología: las hembras presentan unos palpos cortos y anchos, y la base del capítulo es rectangular, aproximadamente dos veces más ancha que larga. El escudo es más largo que ancho, notablemente puntiforme. La coxa I presenta una espina interna corta y consistente. La espina de la coxa IV es aún más consistente. La longitud total de las hembras no alimentadas es de 3-3,5 mm, pudiendo llegar a medir hasta 10 mm una vez alimentadas.

En el caso de los machos también presentan los palpos cortos y anchos como las hembras, aunque la base del capítulo es una vez y media más ancha que larga. Presentan un escudo punteado. La coxa I tiene una espina interna pequeña, mientras en la coxa IV la espina es muy larga. La longitud del adulto es de 2,8- 3,5 mm.

La ninfa de *Haemaphysalis punctata* presenta un escudo tan ancho como largo, con puntuaciones. La longitud de la ninfa es de 1,4-1,8 mm.



Figura 29: Vista dorsal y ventral de una hembra (arriba) y de un macho (abajo) de *Haemaphysalis punctata*. Fotografía: Miriam Moneris.

Hyalomma lusitanicum Koch, 1844

Morfología: la hembra presenta una base del capítulo triangular con pequeñas córnulas y unas áreas porosas pequeñas, circulares y separadas entre si. En el escudo presenta surcos cervicales que se extienden a los márgenes post laterales. La apertura genital se encuentra a la altura de la coxa II y el estigma respiratorio es oval con una cola corta. La longitud total del cuerpo de la hembra es de unos 5 mm.

En el caso de los machos la base del capítulo es triangular, con los márgenes posteriores cóncavos. Ausencia de surcos laterales en la parte dorsal del escudo. En la parte ventral presenta la apertura genital entre la coxa II, escudo adal corto con margen posterior largo y escudo subanal grande y en forma cuboide. Presenta un estigma con una cola larga y ancha, ligeramente arqueada. La longitud total del cuerpo del macho es de unos 3,5 mm.



Figura 30: Vista dorsal y ventral de una hembra (arriba) y de un macho (abajo) de *Hyalomma lusitanicum*. Fotografía: Miriam Monerris.

Ixodes arboricola Schulze & Schlottke, 1930

Morfología: las hembras presentan unos palpos e hipostoma cortos. Tiene unas córnua y aurículas reducidas. En la coxa I carece de espinas internas y externas. La longitud total de una hembra sin alimentar es de 2,4-2,7 mm, en cambio alimentada puede llegar a medir 6,0 mm.

Los machos presentan un capítulo corto y un hipostoma débil. En cuanto a las córnua, aurículas y coxas son muy parecidas a las hembras. La longitud total de un macho es de 2,5 mm.

Las ninfas presentan unos palpos e hipostoma cortos y un escudo más largo que ancho. Carecen de córnua y presentan unas aurículas poco prominentes. Las coxas no presentan espinas internas ni externas. La longitud total es de 1,2-1,4 mm.



Figura 31: Vista dorsal y ventral de una hembra de *Ixodes arboricola*.

Fotografía: Miriam Monerris.

Ixodes frontalis Panzer, 1795

Morfología: las hembras presentan unos palpos largos y una córnua con aspecto de botón. El escudo tiene forma hexagonal, es más largo que ancho y posteriormente redondeado. Presenta aurículas contundentes con protuberancias en forma de botón. El hipostoma es estrecho y puntiagudo, fuertemente dentado. En la coxa I esta provista de espinas internas y externas. El tamaño total de una hembra no alimentada es de 2,8-3,2 mm y alimentada puede llegar a medir 8,0 mm.

En el caso del macho, presenta unos palpos relativamente cortos y un hipostoma de tamaño moderado. En la coxa I-IV no presenta espinas internas; presenta espinas externas, pero no muy fuertes. Las placas mediales son el doble de largas que las placas adales. El tamaño total del macho es de 2,1-2,3 mm.

Las ninfas presentan unos palpos ligeramente curvados hacia fuera y un hipostoma corto. Las espinas externas de las coxas I-IV están fuertemente marcadas y las internas ausentes en la coxa I. El tamaño total de las ninfas es de 1,5-1,7 mm.

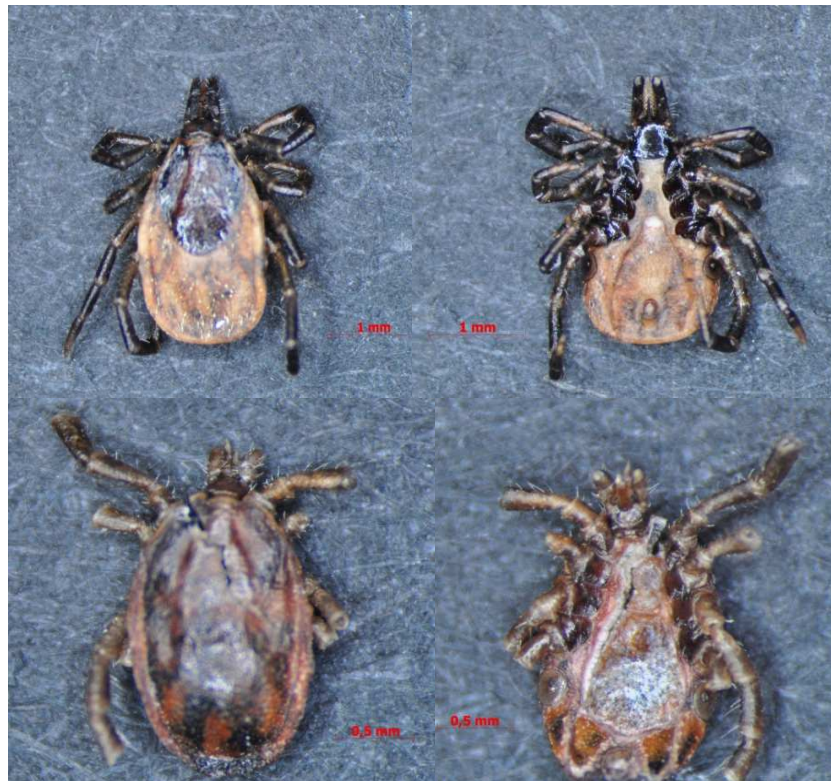


Figura 32: Vista dorsal y ventral de una hembra (arriba) y de un macho (abajo) de *Ixodes frontalis*. Fotografía: Miriam Monerri.

Ixodes ricinus (Linnaeus, 1745)

Morfología: Las hembras presentan unos palpos largos y anchos. Tienen un escudo un poco más largo que ancho con ausencia de córnua. Coxa I con espina interna larga y en forma de guadaña. La apertura genital esta situada a la altura de la coxa IV. El tamaño total de las hembras no alimentadas es de 3,0-3,6 mm y alimentada puede llegar a medir 1,1 cm.

Los machos presentan palpos cortos y anchos y un hipostoma con dientes prominentes. En la coxa I presenta una espina interna tres veces más grande que la espina interna, en cambio en las coxas II-IV son vestigiales. Las placas mediales son más largas que anchas. El tamaño total de un macho es de 2,4-2,8 mm.

En el caso de las ninfas presentan unos palpos cortos. El escudo tiene forma circular. Presenta tanto córnua como aurículas. Tiene espinas internas en las coxas I-IV y las espinas internas son las largas que las externas. El tamaño total de las ninfas es de 1,3-1,5 mm.

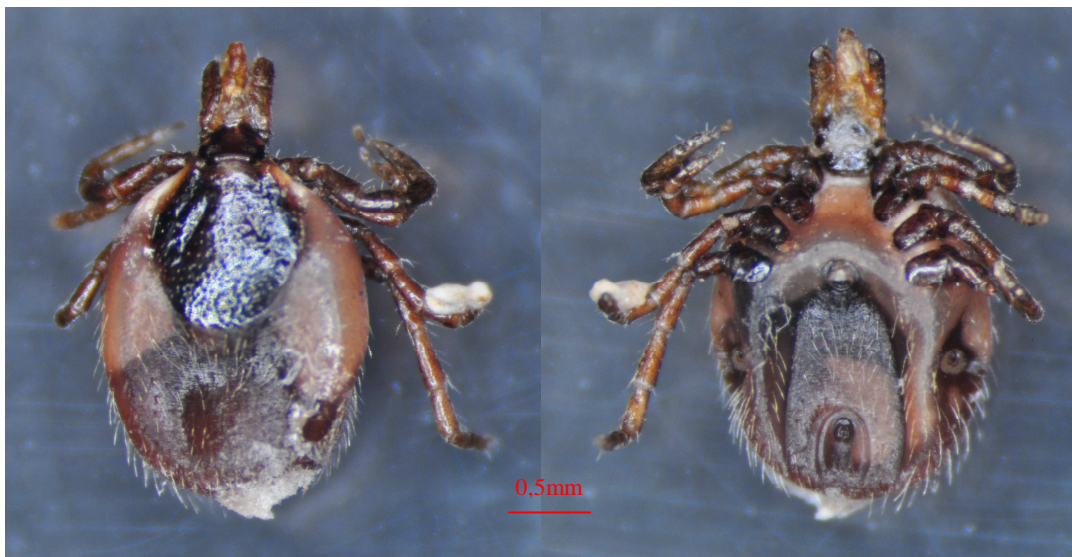


Figura 33: Vista dorsal y ventral de una hembra *Ixodes ricinus*.

Fotografía: Miriam Monerris.

Ixodes ventalloi Gil Collado, 1936

Morfología: las hembras presentan unos palpos anchos y largos, con un hipostoma robusto. Córnea prominente y dirigida hacia el exterior. Tienen el escudo ancho, casi tan estrecho como largo, casi con forma hexagonal. La apertura genital se sitúa a la altura de la coxa IV. En la coxa I presenta una espina interna larga y una externa más corta. El tamaño total de una hembra no alimentada es de 2,0-2,1 mm y una hembra alimentada puede llegar a medir 5,0 mm.

Los machos presentan un hipostoma fuertemente dentado, con unos palpos cortos y años. Encontramos córneas pero carecen de aurículas. Presentan una espina fuertemente desarrollada en la coxa I pero las externas son reducidas. El tamaño total de los machos es de 1,4-1,5 mm.

En el caso de las ninfas encontramos unos palpos largos y anchos en la base. Presenta córneas divergentes y puntiagudas, las aurículas prominentes y también puntiagudas. Las espinas internas y externas de la coxa I casi idénticas. El tamaño total de las ninfas es de 1,0-1,2 mm.



Figura 34: Vista dorsal y ventral de una hembra de *Ixodes ventalloi*.

Fotografía: Miriam Monerris.

Rhipicephalus bursa (Canestrini & Fanzago, 1878)

Morfología: las hembras presentan un capitulo más ancho que largo, con la base con un ángulo lateral aproximadamente en el tercio de su longitud. Presenta unos palpos largos y un escudo más ancho que largo. Los espiráculos ventrales con setas. La apertura genital estrecho en forma de V, con la base de la V en forma redondeada. El tamaño de total de una hembra puede ser de 1,4-1,8 mm.

En el caso del macho presenta un capitulo ligeramente más ancho que largo. La base del capitulo presenta ángulos agudos cortos en su tercio anterior. Palpos cortos y anchos. Presenta unas placas adales largas, ampliamente redondeadas posteriormente con cúspides o protuberancias en su margen interno. Placas adales accesorias ausente o muy pequeñas. El tamaño total de un macho puede ser de unos 1,5-3,3 mm

Las ninfas presentan un capitulo igual que los adultos, más ancho que largo. Palpos más largos que el hipostoma. En la coxa I presenta una espina larga y estrecha y una interna más corta. Las coxas II, III y IV con solo una espina externa. El tamaño total de las ninfas es de unos 0,5-0,6 mm.



Figura 35: Vista dorsal y ventral de una hembra (arriba) y de un macho (abajo) de *Rhipicephalus bursa*. Fotografía: Miriam Monerri.

Rhipicephalus pusillus Gil Collado, 1938

Morfología: las hembras presentan un capítulo más ancho que largo, con unos palpos ligeramente más largos que los machos. Áreas porosas pequeñas, separadas dos veces su diámetro. Tiene el poro genital pequeño en forma de U. El tamaño total de la hembra no alimentada es de unos 1-1,2 mm .

En el caso de los machos presentan un capítulo ligeramente más largo que ancho, la base tiene una amplia curva en la parte posterior. Los palpos de los machos son cortos, redondeados apicalmente. Presentan placas adales largas, hacia el interior se estrechan y son curvadas posteromedialmente, en el margen posterior son ligeramente cóncavas. El tamaño total de los machos es aproximadamente de 1,5-1,7mm .

Las ninfas también presentan un capítulo mas ancho que largo. Los palpos son anchos en la parte basal, estrechándose en el ápice. La coxa I presenta unas espinas internas y externas largas, de la coxa II a la IV presentan solo una espina externa pequeña. El tamaño total de las ninfas es de aproximadamente 0,4 mm.



Figura 36: Vista dorsal y ventral de una hembra (arriba) y de un macho (abajo) de *Rhipicephalus pusillus*. Fotografía: Miriam Monerri.

Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1805)

Morfología: la hembra tiene un color rojizo. Presenta unos palpos muy cortos, con la base alargada y en forma hexagonal en vista dorsal, en cambio en vista ventral presenta el margen posterior casi recto. Presenta las áreas porosas pequeñas y ampliamente separadas. En cuanto al escudo, es casi circular pero se estrecha en la parte posterior y anterior dando un aspecto ovalado. La longitud total de las hembras es de 3-3,8 mm y una vez alimentadas alcanzan tamaños de hasta 10 mm. Presentan unas placas espiraculares con una cola estrecha y un gonoporo en forma de U abierta.

Los machos tienen el cuerpo alargado, de un color rojizo a marrón oscuro. Sus palpos son cortos, siendo su longitud la mitad de la anchura de la base. Presenta una base del capítulo de forma hexagonal. Las placas adales están esclerotizadas y son prominentes. La longitud total de los machos varía entre 3-3,8 mm. Presentan unas placas espiraculares con una cola estrecha.

La ninfa es muy parecida a una hembra pero sus palpos son más delgados y tiene todo el capítulo en forma de hexágono. Tienen los ojos en los laterales del escudo, el margen posterior del cual en general no es redondeado, como en el caso de las hembras adultas. Carece de la espina prominente en la coxa I y el resto de coxas poseen una espina pequeña externa. La longitud total de las ninfas no alimentadas suele ser de entre 1,4 y 1,6 mm.

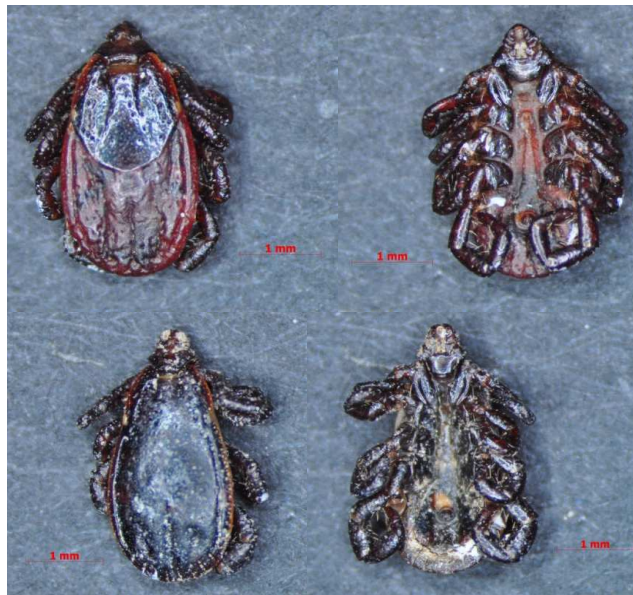


Figura 37: Vista dorsal y ventral de una hembra (arriba) y de un macho (abajo) de *Rhipicephalus sanguineus*. Fotografía: Miriam Monerris.

Rhipicephalus turanicus Pomerantsev, 1936

Morfología: la hembra tiene la base del capítulo en forma hexagonal, más ancha que larga. Dicha base presenta además unos ángulos agudos y unas áreas porosas pequeñas en la parte lateral anterior. El escudo presenta una amplia puntuación distribuida irregularmente. Los ápices de los palpos tienen forma redondeada. Presentan unas placas espiraculares con una cola ancha y un gonoporo en forma de U cerrada. La longitud total de la hembra en ayunas es aproximadamente de unos 3,5 mm.

Los machos también presentan la base del capítulo con forma hexagonal y más ancha que larga. Presentan una puntuación dispersa y de diferentes tamaños dispuesta por todo el escudo. Los ápices de los palpos también tienen forma redondeada. Presentan unas placas espiracules con una cola ancha. La longitud total del cuerpo es aproximadamente de unos 4 mm.

La ninfa presenta la base del capítulo tres veces más ancha que larga. Los palpos presentan los ápices redondeados. Tiene el escudo más largo que ancho con un margen posterior en forma de pequeñas curvas. En la coxa I presentan una espina interna estrecha y una espina externa más ancha. De la coxa II a la IV solo tienen una espina externa, que va disminuyendo de tamaño progresivamente. La longitud del cuerpo es aproximadamente de unos 0,8 mm.



Figura 38: Vista dorsal y ventral de una hembra (arriba) y de un macho (abajo) de *Rhipicephalus turanicus*. Fotografía: Miriam Moneris.

Ornithodoros maritimus Vermeil and Marguet, 1967

Morfología: las hembras presentan un cuerpo cilíndrico con una proyección anterior. Cuando no esta alimentada, el cuerpo presenta ondulaciones que al alimentarse se distienden. En la superficie dorsal presenta grandes discos dispersos y en la superficie ventral los discos son más pequeños y dispuestos en líneas. Las coxas son progresivamente más grandes en la parte anterior. El capítulo se encuentra hundido en el camerostoma flanqueado por las coxas; presenta unos palpos pequeños. El poro genital; situado a la altura de la coxa II; tiene una cresta fuerte, igual que los márgenes. El tamaño total de las hembras es de 4,5-7 mm.

En el caso de los machos, son ligeramente más pequeños y oscuros que las hembras. Se diferencian de las hembras por la forma del poro genital. El tamaño total de los machos es de 3,5-5,5 mm.

Las ninfas se asemejan a los adultos. El tamaño total de las ninfas es de unos 2-4 mm.



Figura 39: Vista dorsal y ventral de una larva de *Ornithodoros maritimus*.

Fotografía: Miriam Monerris.

Bibliografía

- Cordero del Campillo, M.; Castañon Ordóñez, L.; Reguera Feo, A. (1994) Índice-catálogo de Zooparásitos Ibéricos. Universidad de León.
- Estrada Peña, A. (1994) Las Garrapatas En España: Introducción. Castilla y León: Consejería de Sanidad y Bienestar social.
- Hillyard, PD. (1996) Ticks of North-West Europe. The Natural History Museum ed. London.
- Manilla, G. (1998) Fauna d'Italia. Acari Ixodida. Edizioni Calderini Bologna ed. Bologna.
- Travassos Santos Dias, J. A. (1994) A Carraças (Acarina-Ixodoidea) Da Península Ibérica. Algumas Considerações Sobre a Sua Biogeografia e Relacionamento Com a Ixodofauna Afropaleártica e Afrotropical. Ed. ensaios e documentos Estudos. Lisboa.
- Walker, J.B; Keirans, J.E.; Horak, I.G. (2000) The Genus *Rhipicephalus* (Acari, Ixodidae). A Guide to the Brown Ticks of the World. Ed. Cambridge University Press. United Kingdom.

ANEXO II: PROTOCOLOS DE LAS TÉCNICAS EMPLEADAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENOS.

1.- Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el Kit de extracción QIAamp Viral RNA de QIAGEN con pequeñas modificaciones del procedimiento recomendado por el fabricante. El protocolo seguido se detalla a continuación:

- El primer paso consiste en la ruptura y homogenización de las garrapatas. Para adultos se realiza individualmente. Para ello se introduce un individuo adulto en un vial de extremo redondeado al que se añade 700 µl de AVL+H₂O libre de Rnasas. Se homogeniza la garrapata con un pelet estéril hasta la ruptura de la misma. Una vez homogenizada se mezcla durante 3-5 segundos con el vórtex y se mantiene a temperatura ambiente durante 30 minutos para que la acción del tampón sea efectiva.
- Pasados los 30 minutos se centrifuga a 14000g durante 5 minutos en minifuga a 22°C. Se toman 500 µl de sobrenadante, se añaden 400 µl de Etanol absoluto. Se agita de arriba abajo para mezclar bien y se da un golpe de centrifuga.
- De la mezcla anterior se añaden 450 µl a la columna del kit y se centrifuga a 16000 g durante 1 minuto en minifuga a 22°C.
- Eliminar el filtrado, cambiando el tubo y añadir 500 µl de AW1. Seguidamente se centrifuga a 16000 g durante 1 minuto en minifuga a

22°C. Se repite el proceso pero esta vez añadiendo 500 µl de AW2 y el centrifugado es de 5 minutos a 16000. Finalmente se centrifuga durante 2 minutos a 16000.

- Después de todos los centrifugados pertinentes se comprueba que el filtro esta seco (si no es así volver a centrifugar). Se coloca la columna en un eppendorf de 1.5 ml, añadir 60 µl de AVE y dejar incubar a temperatura ambiente durante 1 minuto.

- Finalmente se centrifuga a 16000 g durante 2 minutos a 22°C y el resultado final es el extracto de la muestra.

2.- Amplificación de ADN

Antes de llevar a cabo la reacción de amplificación se mide la cantidad de ADN conseguida en la extracción. Se mide la concentración para evitar que un exceso o defecto en la cantidad de ADN adicionada a la mezcla de reacción pudiese afectar a la posterior amplificación. La concentración de ADN varía dependiendo de la especie, estadio y grado de alimentación.

Para ello se utilizó 2 µl de cada muestra para cuantificar la concentración en un espectrofotómetro (NanoDrop-1000). Como blanco para la medición se usó el tampón de elución (AVE).

Dependiendo la concentración de DNA se utilizó una cantidad u otra de muestra para evitar la saturación o falta de DNA (Tabla 1).

Tabla 19: Concentraciones de DNA usadas para la PCR.

Conc. DNA en la muestra	¿Hay que diluir la muestra?	µl de muestra a añadir	µl de H ₂ O a añadir	Volumen final
< 50 ng/µl	No	20 µl	0	50 µl
50-80 ng/µl	No	5 µl	15	50 µl
80-320 ng/µl	Si -1/2	5 µl	15	50 µl
320-640 ng/µl	Si -1/4	5 µl	15	50 µl
> 600 ng/µl	Si (conc. final 80 ng/µl)	5 µl	15	50 µl

Se llevó a cabo una PCR multiplex para la amplificación de *Anaplasma/Ehrlichia* spp., *Bartonella* spp., *Borrelia* spp., *Coxiella* spp., *Francisella* spp., *Rickettsia* spp. y *Cannabis sativa* como control interno. También se puso un control negativo de extracción, para asegurar que la extracción se había realizado bien.

En la Tabla 2 se describe la secuencia y el gen diana de los indicadores utilizados. Todos los indicadores fueron marcados con biotina en su extremo 5' para que los amplicones quedasen biotilados y pudieran ser detectados por quimioluminiscencia en el RLB.

Tabla 20: Patógenos, indicadores, secuencias y gen de los indicadores utilizados para la amplificación.

Patógeno	Indicadores	Secuencias (5'-3')	Gen	Posición 5'-3'
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> <i>Ehrlichia</i> sp	16S/AEFmod	CAGAACGAACGCTRGCGGYARG	16S	9-30 (U02521)
	16S/AE-Rmod	GCRRTACKCACCCGTGCCAC		109-86 (U02521)
<i>Bartonella</i> sp.	BAR/16-23F	CCTTCAGTTMGGCTGGATC	16S-23S	961-979 (DQ6454269)
	BAR/16-23R	GCCYCCTTGCGGTTAGCACAGCA		1397-1376 (DQ6454269)
<i>Borrelia</i> sp.	BOF-3	TAAGAATCTTCCGCAATGGGC	16S	336-356 (AJ224139)
	BOR	ATCCGCCTACTCACCCTTTAC		567-547 (AJ223139)
<i>Coxiella burnetii</i>	TRANS 1	TATGTATCCACCGTAGCCAGTC	Trasposasa	200-221 (M80806)
	TRANS 2	CCCAACAACACCTCCTTATT	IS1111	885-865 (M80806)
<i>Francisella</i> sp.	FT594	GYAGGTTTAGCKAGCTGTCTAC	Tul4	593-617 (M32059)
	FT827	GGAGCYTGCCATTGTAATCTTAC		825-804 (M32059)
<i>Rickettsia</i> sp.	RCK/23-5-F2	GGAAGCACAGTAATGTGTGTAG	23S-5S	1-22 (AY125012)
	RCK/23-5-R	TCGGGAYGGGATCGTGTGTTTC		388-367 (AY125012)
<i>Cannabis sativa</i>	CI-F	ATGATGCTGAGGGTATGTCCTAC	THC Sinthase	
	CI-R	GTTTTCTCCTCCACCACACG		

Las PCRs se llevaron a cabo en un volumen final de 50 μ l con tampón 1,8X, $MgCl_2$ 3mM, dNTPs 200 μ M, 2.5 U Taq DNA polimerasa y 0.8 μ gr/ μ l de BSA. La concentración final de los indicadores fue de 50 pmol/ μ l en todos excepto en *Anaplasma/Ehrlichia* spp. que se usó una concentración de 100 pmol/ μ l. En la Tabla 3 se describe el ciclo de PCR utilizado para la amplificación, se utilizó el mismo para todas las PCRs realizadas.

Tabla 21: Temperatura, tiempos y número de ciclos empleados en la reacción de PCR.

Temperatura	Tiempo	Nº Ciclos
90°	9'	40
94°	15''	
60°	1'	
65°	4'	
65°	7'	1
4°	∞	-

En cada reacción de PCR se incluía un control negativo y uno positivo. Como controles positivos en las PCR se utilizaron seis fragmentos de ADN nativo de *Anaplasma phagocytophilum*, *Coxiella burnetii*, *Borrelia burgdorferi*, *Bartonella henselae*, *Francisella tularensis*, *Rickettsia prowazekii*, cedidos por el Laboratorio de Microbiología de Instituto de Salud Carlos III.

Dichos controles contenían todos los reactivos excepto el ADN que en el caso del control negativo era sustituido por agua y en el control positivo por un clon de *Canabis sativa*.

3.- Reverse Line Blotting (RLB).

El RLB consta de diferentes pasos: activación de la membrana, fijación de las sondas a la membrana, hibridación, la reacción Biotina-Estreptavidina, fijación del sustrato revelador, revelado e inactivación (bloqueo) de la membrana. La desactivación de la membrana se realiza para poder ser utilizada en otro momento. A continuación se explicará cada paso.

Activación de la membrana:

- Recortar las membranas de un tamaño equivalente a la superficie del miniblotted y marcamos con una X una de las caras.
- Incubar la membrana en agitación y a temperatura ambiente durante 15 minutos en presencia de la solución activadora¹ (aprovecharla para una segunda membrana) en placa de vidrio. Transcurrido la mitad del tiempo dar la vuelta a la membrana.
- Lavar la membrana con agua Milli-Q y la dejamos secar en papel de filtro. Las membranas activadas se pueden conservar en papel de filtro a 4°C.

Fijación de la sonda en la membrana

- Encender el horno de hibridación a 56°C y colocamos dentro el tampón de muestra para que se atempere.
- Encender el baño a 100° C, y preparamos un litro de Virkon®.

- A partir de una solución stock de sondas a 40 pm/ μ L (almacenado a -20°C) preparamos la solución final de uso (3,2 pm/ μ L). Las diluciones de las sondas se realizan en tampón de sonda³.

- Montar la membrana en el miniblotted (previamente ha sido irradiado con UV durante 15 min) y vaciamos los restos de agua que hayan quedado en los canales conectando la salida del miniblotted a la bomba de vacío.

- Hacer un esquema donde se identifique a cada sonda con un número de canal, dejando libre los canales de los extremos, además del primer y último canal de uso para llenarlos de Azul de Evans.

- En primer lugar, cargamos los canales que corresponden al Azul de Evans, que nos va a indicar los límites del ensayo, y a continuación cargamos el tampón de sonda en los canales que no van a llevar sonda. Por último, cargamos los canales con la solución de la sonda.

- Incubar las sondas durante 10 minutos a temperatura ambiente.

- Vaciar los canales de salida del miniblotted con la bomba de vacío.

- Desmontar el miniblotted y colocar la membrana en una placa de Petri de vidrio.

- Sumergir el miniblotted en Virkon® durante media hora, aclaramos con agua de grifo, enjuagamos con agua destilada y secamos el aparato con cuidado, usando un pañuelo de papel en los canales para no rallarlos.

ANEXO II

Tabla 22: Sondas de los diferentes patógenos fijadas en la membrana.

ORGANISMOS	INDICADORES	SONDAS	SECUENCIAS 5'-3'	POSICIÓN
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> <i>Ehrlichia spp</i>	16S/AEFmod (HPLC)		CAGAACGAACGCTRGCGGYARG	9-30 (U02521)
	16S/AE-Rmod (HPLC)		GCRTTACKCACCCGTCTGCCAC	109-86 (U02521)
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> <i>A. bovis</i> <i>A. equi</i>	12C HPLC	S-PHA	GGMTTATTCTTTATAGCTTGCT	52-73 (U02521) 8-29 (AF470698)
				8-29 (AF172167)
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	12C	S-CHA	ATTGCTTATAACCTTTTGTT	51-71 (AF147752)
<i>E. ewingii</i>	12C	S-EWI	GAACAATTCTAAATAGTCTC	46-66 (U96436)
<i>A. marginale</i> <i>A. centrale</i> <i>A. ovis</i>	12C	S-MCO	CAGCTTGCTGCGTGTATGG	53-71 (AJ633048)
				72-90 (AF414869)
				72-90 (AF414870)
<i>E-ruminatum</i>	12C HPLC	S-RUM	GGACAGTATTTATAGCYTCGGC	23-45 (DQ640401)
<i>E-risticii/E.sennetsu</i>	12C	S-SEN/RIST	GGAATCAAAGCTGCTTGC	46-63 (M73225)
<i>E-risticii</i>	12C	S-RIS	GGAATCAGGGCTGCTGCAG	46-45 (AY005439)
<i>E-muris</i>	12C	S-MUR	CGAACGGATAGCTACCCATAGC	16-37 (AY587608)
<i>A-platys</i>	12C	S-PLA	GATTTTTGTGCTAGCTTGCTATG	53-75 (EF139459)
<i>E.canis/E.ovina</i>	12C	S-CANOVIN	GGACAATTATTTATAGCCTCTGG C	14-37 (EF011111)
<i>Bartonella spp.</i>		BartALL-2	CTCGCCCTTAGTTGCCAGCATT	-
		BartALL-2-MUT	GTGCGGGTTACTTCGGACGATT	-
<i>Borrelia spp.</i>		SG-BOR2	GAAGGTCGAAAGATTGTA	364-383 (AJ224139)
		SG-BOR2-MUT	GTTGGACGTTTGTAAAGATT	
<i>Coxiella burnetii</i>		S-Cox-IS1111	GCAAGAATACGGACTCACGA	520-539 (M80806)
		S-Cox-IS1111-MUT	CGAACAATAGCCAGTCAGCA	
		S-CoxIS1111-MUT2	GCTTGTTATCGGTCACCTCGT	
<i>F. tularensis</i>		S-FRAG	TAAAATAAAAAGCAACTGTATATA CARC	
		S-FRAG-MUT	AAATAAATAACGAAGTCTATATA GACG	
<i>F. tularensis tularensis</i> <i>F. tularensis holarctica</i> <i>F. tularensis novicida</i>	12C HPLC	S-TUL	AGATACTGCTGCTGCTCAGACAG	658-680 (M32059)
	12C HPLC	S-TUL-MUT	ACATAGTCGTCGTCGTGACAGAC	
Variante 3523	12C HPLC	S-TUL3523	GCATCAGATAAGGGCACC	169-188 (AY243029)
Endosimbiontes	12C HPLC	S-ENDOS2	CAGCTACACCAACRGCCTAG	533-553 (AY375423)
<i>Rickettsia</i> Genérica	HPLC	SG-RICK	TAGCTCGATTGRTTTACTTTG	51-71 (AY125012)
<i>Rickettsia</i> Genérica-Modificada		SGR-MUT	TAGCTCCCATTAGTTCGGGTG	" "
<i>Rickettsia</i> Grupo de las Fiebres Manchadas	HPLC	SG-SFG	ACTCACAARGTTATCAGGT	123-141 (AY125012)
<i>Rickettsia</i> Grupo Tifus	HPLC	SG-TG	GTTATTCTATCGTTTTATGTYACG	2804-2827 (U11018)
<i>R. aeschlimanii</i>		S-AESCH	ATATTATACTGTATGTAGCCCC	183-204 (AY125016)

ANEXO II

<i>R. akari</i>		S-AKA4	GATCATGCAGCAATACATTAGC	291.105- 291.126 (AAFE010000 01)
<i>R. australis</i>		S-AUS	GACAAGTTTAGTTATGCAAT	230-249 (D12)
<i>R. bar29</i>		S-B29	CCGCCACGATATCTAGAAAAATT A	
<i>R. bellii</i>		S-BELLII	GTGTTTATTCTATAATATGTCAG	2721-2743 (U11015)
<i>R. conorii</i>		S-CON	GTTATATACTGTAGCCCTG	186-204 (AY125012)
<i>R. felis</i>		S-FEL	TAATGTTATACCGTGGTCCCGC	186-207 (D12)
<i>R. helvética</i>		S-HELV	CATGGCTTGATCCACGGTA	360-342 (AY125017)
<i>R. honei</i>		S-HONEI	CTAATTTTATACTGTAGCCTTGCC AC	
<i>R. massiliae</i>		S-MASS2	CCGCCACGATATCTAGAAAAATT A	
<i>R. rickettsia</i>		S-RICKETT	GTTATACTGTAGTCCTGCAA	
<i>R. prowazekii</i>		S-PROW	TACGATTTGATAGTAAAGTTTGTG	2824-2846 (U11018)
<i>R. raoultii</i>		S-RpA4	CCGCCACGATATCTAGCAAAAAT TAT	
<i>R. sibirica mongolo.</i>		S-SIB	GTTATACTGTAGCCCTGCCAC	
<i>R. slovacca</i>		S-SLO	GTAGCCCCTGCCACGATA	194-211 (AY125009)
<i>R. typhi (R. mooserii)</i>		S-TYPHI	ATGTCACGATTTGACCGTAAGAT C	188-211 (AY125019)
<i>Control Interno (Cannabis sativa)</i>		S-CI2	GTGGACACTTTAGTGGAGGAGG	281-302 (AB183705)

Hibridación

- Antes de empezar poner el miniblatter en luz UVA durante 15 minutos, encender el horno de hibridación a 48°C y poner el baño a 100°C. Atemperar el tampón de lavado⁴ en el horno de hibridación.

- Montar la membrana en el miniblatter, girándola 90°C respecto a la posición de las sondas, para que éstas queden colocadas en posición horizontal y, por tanto, se enfrenten a todos los productos de PCR en posición vertical. La cara de la membrana donde se encuentran las sondas debe de estar hacia arriba, en contacto con los canales.

- Poner el miniblatter con la membrana montada en el horno a 48°C para que se atempere hasta el momento de su uso.

- Hacer un esquema de los productos de PCR que se van a testar, indicando en código de la muestra y el número de canal usado. No usar ni el primero ni el último de los canales del aparato y al final colocar los controles positivos (C+ de RLB: mezcla de controles positivos ya testados y controles de la PCR) que nos servirán de marcadores tanto de las técnicas (PCR y RLB) como del orden dado a los productos de PCR.

- Preparar las diluciones de los productos de PCR y de los controles positivos (1/15) en tampón de muestra. Usar tubos con tapón de rosca resistentes a altas temperaturas.

- Desnaturalizar las muestras mediante incubación durante 10 min a 100°C, enfriar rápidamente en hielo durante 1 minuto y dar un toque de centrifuga antes de ser cargadas al miniblotteder.

- Llenar los canales que se vayan a quedar libres con tampón de muestra². A continuación llenar los canales con los productos de PCR y por último los controles positivos.

- Se realiza la hibridación mediante incubación de 1h a 48°C en agitación suave. Colocar los canales en la misma dirección que el movimiento de agitación.

- Variar los canales de líquido y lavar con tampón de lavado⁴, previamente atemperado a 48°C.

- Desmontar el miniblotteder y colocar la membrana en una placa de petri o caja cuadrada. Poner el horno a 52°C y lavar dos veces, durante 10 minutos

en agitación en el horno de hibridación. Colocar el Miniblotter en Virkon para su limpieza.

Reacción Biotina-Estreptavidina.

- Preparar el conjugado (dilución dilución 1:32.000, Streptavidin-POD, Boehringer Mannheim) en tampón de lavado⁴.
- Incubar la membrana durante 45 minutos a 40°C.
- Lavar la membrana seis veces, las cinco primeras con tampón de lavado a 40°C durante 5 minutos, y el último con 2xSSPE durante 5 minutos a temperatura ambiente.

Sustrato.

- Preparar 10 ml de la solución reveladora⁵ (Super Signal West Dura Extended Duration Substrate, Pierce) en un frasco protegido de la luz.
- Incubar la membrana con la solución reveladora durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Meter la membrana en una funda translúcida y pasamos un rodillo para eliminar las burbujas.

Revelado.

El revelado de la membrana se realizó mediante un ChemiDoc™ XRS (Biorad).

Inactivación (bloqueo) de la membrana.

- Inactivar la membrana 10 minutos con la solución inactivadora⁶ a temperatura ambiente. Lavamos abundantemente con agua Milli-Q.
- Incubar 10 minutos con el tampón de muestra a 56°C y lavamos con 2xSSPE².
- Las membranas pueden conservarse a 4°C, sumergidas en 2xSSPE, hasta su uso.

REACTIVOS

1. Solución activadora: 9.51 gr. de EDAC (Clorhidrato de 3-dimetilaminopropil) en 60 ml de agua Milli-Q.
2. Tampón de muestra: 2xSSPE (2mM Na₂EDTA, 360mM NaCl, 20mM NaH₂PO₄.H₂O).
- 3.- Tampón de sonda: 500mM NaHCO₃, pH 8,4.
4. Tampón de lavado: 2XSSPE-0,1 SDS.
5. Solución reveladora: 5 ml luminol + 5 ml peroxidada.
6. Solución inactivadora (pH 8,4): 500mM NaOH.

New records of tick fauna from the Balearic Islands (Spain) (Acari: Ixodidae)

Nuevos registros de la fauna de garrapatas (Acari: Ixodidae) en las Islas Baleares (España)

Only few studies on tick fauna from the Balearic Islands have been carried out (Table I). JOLIVET (1951) described the presence of three species of ticks in the island of Majorca. Later, CORDERO CAMPILLO (1994) recorded up to twelve tick species of Ixodids in the Balearics. Finally, CASTELLÀ *et al.* (2001) recorded six different species of ticks associated to domestic animals in the island of Minorca (Table I).

Table I. Species recorded in the Balearic Island by different authors.

Tabla I. Especies registradas en las Islas Baleares por diferentes autores.

Species of tick	Author and date of record
<i>Dermacentor marginatus</i> Sulzer 1776	CORDERO CAMPILLO (1994)
<i>Dermacentor niveus</i> Neuman 1960	JOLIVET (1951); CORDERO CAMPILLO (1994)
<i>Dermacentor reticulatus</i> Fabricius 1794	CORDERO CAMPILLO (1994)
<i>Haemaphysalis cinnabarina</i> var. <i>punctata</i> Canestrini et Fanzago 1877	JOLIVET (1951)
<i>Haemaphysalis punctata</i> Canestrini et Fanzago 1877	CORDERO CAMPILLO (1994); CASTELLÀ <i>et al.</i> (2001)
<i>Hyalomma anatolicum excavatum</i> Koch 1841	CORDERO CAMPILLO (1994)
<i>Hyalomma lusitanicum</i> Koch 1844	CORDERO CAMPILLO (1994); CASTELLÀ <i>et al.</i> (2001)
<i>Hyalomma marginatum</i> Koch 1844	CORDERO CAMPILLO (1994); CASTELLÀ <i>et al.</i> (2001)
<i>Ixodes ricinus</i> Linnaeus 1746	CORDERO CAMPILLO (1994)
<i>Ixodes ventalloi</i> Gil Collado 1936	CORDERO CAMPILLO (1994)

Species of tick	Author and date of record
<i>Rhipicephalus (Boophilus) annulatus</i> Say 1821	CASTELLÀ <i>et al.</i> (2001)
<i>Rhipicephalus bursa</i> Canestrini et Fanzago 1877-78	CORDERO CAMPILLO (1994); CASTELLÀ <i>et al.</i> (2001)
<i>Rhipicephalus sanguineus</i> Latreille 1806	CORDERO CAMPILLO (1994)
<i>Rhipicephalus turanicus</i> Pomerantsev 1936	CASTELLÀ <i>et al.</i> (2001)

The aim of this study is to know the tick fauna in the Balearic Islands.

Ticks studied were removed from wild animals captured in different localities from the Balearic Islands by the Recovery Center Wildlife of the Balearic Islands (COFIB) and the Association for the Study of Nature (Table II). Specimens were either preserved in 70% ethanol or frozen at -20 °C and sent to the Laboratory of Zoology of the University of the Balearic Islands for further examination. Ticks were identified using taxonomic keys by ESTRADA-PEÑA (2004), MANILLA (1998) and WALKER *et al.* (2000).

We report new records of tick species for the Balearics (Table II). Three species belong to the family Ixodidae: *Ixodes arboricola* (Schulze & Schlottke, 1930), *Ixodes frontalis* (Panzer, 1795), and *Rhipicephalus pusillus* (Gil Collado, 1936). The fourth one belongs to the family Argasidae: *Ornithodoros maritimus* (Vermeil and Marguet, 1967).

Table II. Species of tick, wild host, locality from where the wild host was collected, date of collection of the ticks and number of males, females and life stages of the new records on Balearic Islands.

Tabla II. Especies de garrapatas, hospedador silvestre, localidad donde el hospedador fue capturado, fecha de recolección de las garrapatas y número de machos, hembras y de las etapas de vida de nuevos registros de las Islas Baleares.

	Host	Locality	Date	Males	Females	Nymphs	Larva
<i>I. arboricola</i>	<i>Asio otus</i>	Artà	16/09/2009	-	23	-	-
	<i>Burhinus oedicnemus</i>	Porreres	16/09/2010	-	1	-	-
		Ses Salines	01/10/2010	-	3	-	-
		Felanitx	20/07/2009	-	1	-	-
		Sta. Eugenia	31/07/2009	-	37	-	-

	Host	Locality	Date	Males	Females	Nymphs	Larva
	<i>Falco tinunculus</i>	Bunyola	18/08/2009	-	12	-	-
<i>I. frontalis</i>	<i>Hieraaetus pennatus</i>	Manacor	15/01/2010	-	-	4	-
<i>R. pusillus</i>	<i>Genetta genetta</i>	Maria de la Salut	10/04/2007	20	-	-	-
		Montuiri	16/04/2009	4	5	-	-
	<i>Martes martes</i>	Bunyola	28/02/2007	-	4	-	-
		Santanyi	23/08/2007	-	-	3	-
		Felanitx	20/12/2009	1	-	-	-
	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Llucmajor	07/01/2008	17	5	-	-
<i>O. maritimus</i>	<i>Larus michahellis</i>	Palma	14/05/2009	-	-	-	12
	<i>Puffinus</i> spp.	Manacor	24/08/2010	-	-	-	13

Ixodes arboricola (Schulze & Schlottke, 1929)

We found 77 females in three different hosts: *A. otus* (Graber, 1962), *B. oedicnemus* (Linnaeus, 1758) and *F. tinnunculus* (Linnaeus, 1758). In Spain, this species is commonly found on birds, having been recorded in Granada on *Parus major* (Linnaeus, 1758) (CORDERO DEL CAMPILLO, 1994). Parasitism by *I. arboricola* occurs throughout the year but females are most active from December to May. *Ixodes arboricola* is a known vector of the tick-borne encephalitis virus (TBEV) (HILLYARD, 1996).

Ixodes frontalis (Panzer, 1795)

We found four nymphs on *H. pennatus* (Gmelin, 1788). This species was recorded for the first time in the Iberian Peninsula by ENCINAS-GRANDES (1985) and has been also reported in the localities of Alava, Aragón, Canarias, Granada, Salamanca and Zaragoza (CORDERO DEL CAMPILLO *et al.* 1994). All feeding stages of *I. frontalis* parasitise birds. The adults are most commonly found in October and February and immature stages are more frequent from April to October (2-4). *Ixodes frontalis* is known to be a vector of *Coxiella burnetti* (Q-fever) and a number of viruses including

Bahig, Kemerovo, Matruh and TE (HILLYARD, 1996). OSACAR-JIMENEZ *et al.* (1998) also recorded *I. frontalis* as a vector of *Borrelia burgdorferi* (Lyme disease).

***Rhipicephalus pusillus* (Gil Collado, 1936)**

We found 42 males, 14 females and 3 nymphs of on three different hosts: *O. cuniculus* (Housse, 1953), *G. gennetta* (Linnaeus, 1758) and *M. martes* (Linné, 1758). This species was first recorded in the Iberian Peninsula by GIL COLLADO (1936). In Spain *R. pusillus* is present in Andalucía, Barcelona, Ciudad Real, Huesca, Madrid, Salamanca, Segovia, Teruel and Zaragoza (CORDERO DEL CAMPILLO, 1994). The European rabbit, *O. cuniculus*, is the primary host of *R. pusillus*, but the latter can also be found infesting other small mammals (WALKER *et al.* 2000). Immature stages are found from July to September; meanwhile adults have been found in vegetation from February to June (RODRIGUEZ-RODRIGUEZ *et al.*, 1981). *R. pusillus* is a vector of *Coxiella burnetti* and myxomatosis virus. Further, host antibodies against *Rickettsia* (1) spp. have also been found in this species (MANILA G., 1998).

***Ornithodoros maritimus* (Vermeil and Marguet, 1967)**

We found 25 larvae on *L. michahellis* (Naumann, 1840) and *Puffinus* spp. ESTRADA-PEÑA reported *O. maritimus* parasiting *Larus cachinnans* (Pallas, 1811) in 1996 for the first time in Spain. The main hosts are marine birds. The larvae, nymphs and adults may be found infesting nests, on adults or young specimens, or under the rocks nearby host's habitats. *Ornithodoros maritimus* are frequently found from April to July. Meaban virus, Soldado virus and West Nile virus have been isolated from this tick species (HILLYARD, 1996).

ACKNOWLEDGEMENT

We would like to thank to Lluís Parpal, Nieves (COFIB) and Samuel Piña (Association for the Study of Nature) for providing specimens.

REFERENCES

- CASTELLÀ, J., A. ESTRADA PEÑA, S. ALMERIA, D. FERRER, J.F. GUTIÉRREZ & A. ORTUÑO, 2001. A survey of ticks (Acari:Ixodidae) on dairy cattle on the island of Menorca in Spain. *Experimental and applied acarology*, 25: 899-908.
- CORDERO CAMPILLO, M., L. CASTAÑON ORDOÑEZ & A., REGUERO FEO, 1994. *Índice-Catálogo de Zooparásitos Ibéricos*. Universidad de León. 650pp.
- ENCINAS GRANDES, A., 1986. Ticks of the province of Salamanca (Central/NW Spain). Prevalence and parasitization intensity in dogs and domestic ungulates. *Annales de Parasitologie Humaines et Comparative*. 61: 95-107.
- ESTRADA PEÑA, A., A. BOUATTOR, J.L. CAMICAS & A.R. WALKER, 2004. *et al. Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region*. Zaragoza: University of Zaragoza.
- GIL COLLADO J., J. GUILLEN LLERA & L.M. ZAPATERO RAMOS, 1979. Claves para la identificación de los ixodoidea españoles (adultos). *Revista Ibérica de Parasitología*. 39: 107-18.
- HILLYARD, P.D., 1996. *Ticks of north-west europe*. The Natural History Museum. London. 179 pp.
- JOLIVET, O., 1951. Capture de tiques a Majorque. *Vie et milieu*. 2: 531.
- MANILLA, G., 1998. *Fauna d'Italia. Acari Ixodida*. Edizioni Calderini. Bologna. 279 pp.
- OSACAR-JIMENEZ, J.J., A.ESTRADA-PENA & J. LUCIENTES-CURDI, 1998. Ticks (Acarina: Ixodidae) of wild birds in the Ebro middle basin (north-east Spain). *Acarologia*. 39(1): 23-31.
- RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, J.A., J.L. GUILLEN-LLERA & A. SANCHEZ-COVISA, 1981. Variación estacional de Ixodidae y Siphonaptera de lepóridos en la Provincia de Ciudad Real. *Revista Ibérica de Parasitología*. 41 (4): 527-538.
- WALKER, J.B., J.E. KEIRANS & I.G. HORAK, 2000. The genus *Rhipicephalus* (acari, ixodidae). A guide to the brown ticks of the world. Cambridge University United Kingdom.643 pp.

Recibido: 15-6-2011. Aceptado: 20-7-2011

ISSN: 0210-8984

MIRIAM MONERRIS*, CLAUDIA PAREDES-ESQUIVEL AND MIGUEL ÁNGEL MIRANDA

Laboratory of Zoology, University of the Balearic Islands, Cra. Valldemossa, km 7.5, C.P. 07122, Spain.

* e-mail: miriam.monerris@uib.es