



Facultad de Veterinaria

Trabajo de
Fin de Grado

Identificación de garrapatas
exófilas en el noroeste de
España

Javier Peña López

Grado en Veterinaria
Año 2019

Modalidad del Trabajo: Experimental

Licencia

Esta obra pertenece a Javier Peña López, y está sujeta a la licencia Reconocimiento-Compartir Igual 4.0 Internacional de Creative Commons. Para ver una copia de esta licencia, visite <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>



RESUMEN

Identificación de garrapatas exófilas en el noroeste de España

Las garrapatas son artrópodos parásitos obligados con una destacable importancia en la salud animal y pública debido a su papel como vectores de múltiples agentes infecciosos y parasitarios. Estas implicaciones sanitarias conllevan un gran coste económico derivado del diagnóstico y tratamiento de las enfermedades, así como del control de los vectores. Los patógenos transmitidos están asociados con determinados vectores, por lo que el conocimiento de las especies de garrapatas presentes y los factores que determinan la abundancia de sus poblaciones en un territorio es de gran ayuda para comprender la epidemiología de las enfermedades relacionadas, permitiendo optimizar las medidas de prevención. Por todo ello, el principal objetivo de este trabajo fue determinar la diversidad de las poblaciones de garrapatas exófilas presentes en la comunidad autónoma de Galicia. Para ello, y utilizando el método de la bandera, se recogieron 711 garrapatas en 26 puntos de muestreo localizados por la geografía gallega intentando abarcar los principales termotipos (relacionado con el bioclima y la cubierta vegetal) existentes. Los ejemplares recogidos se identificaron morfológicamente y los resultados se compararon con los obtenidos con técnicas moleculares. Además, se valoró la posible influencia del termotipo sobre la presencia de las distintas especies. Se identificaron 8 especies distintas de ixódidos en la vegetación de Galicia, aunque sólo 6 especies se reconocieron de forma fiable mediante sus características morfológicas; el análisis de la secuencia del gen que codifica para la subunidad ribosómica 16S resultó muy útil para confirmar las dos restantes. La especie más frecuente fue *Ixodes ricinus* (70,60%); en menor proporción se detectaron *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.; 14,63%), *Dermacentor marginatus* (8,44%) y *Dermacentor reticulatus* (3,94%). Finalmente, *Ixodes frontalis* (1,69%), *Haemaphysalis punctata* (0,28%), *Rhipicephalus bursa* (0,28%) e *Ixodes ventalloi* (0,14%) se encontraron de forma esporádica. Este estudio supone la primera cita en Galicia de las dos últimas especies. *Ixodes ricinus* y *D. marginatus* están ampliamente diseminadas en esta región, pues se encontraron en los 4 termotipos. *Ixodes ricinus* fue especialmente frecuente en la zona supratemplada debido a su elevada exigencia higrométrica, así como *Dermacentor reticulatus*, pero ésta no se halló en el termotipo mesomediterráneo. *D. marginatus* no es tan dependiente de la humedad ambiental como las anteriores, y por ello fue más común en la zona mesomediterránea. *Rhipicephalus sanguineus* s.l., que presenta un ciclo peridoméstico, coincidió con las zonas periurbanas independientemente del termotipo. El resto, la mayoría con carácter endófilo, se hallaron de forma ocasional, por lo que no se pudo estudiar su relación con el termotipo.

Palabras clave: Garrapatas exófilas, noroeste de España, identificación morfológica, identificación molecular, termotipos.

RESUMO

Identificación de carrachas exófilas no noroeste de España

As carrachas son artrópodos parasitos obrigados cunha notable importancia na saúde animal e pública debido ao seu papel como vectores de múltiples axentes infecciosos e parasitarios. Estas consecuencias para a saúde implican un gran custo económico derivado do diagnóstico e tratamento de enfermidades, así como do control dos vectores. Os patóxenos transmitidos están asociados con certos vectores, polo que o coñecemento das especies de carrachas presentes e os factores que determinan a abundancia das súas poboacións nun territorio é de gran axuda para comprender a epidemioloxía das enfermidades relacionadas, permitindo optimizar as medidas de prevención. Por todo isto, o obxectivo principal deste traballo foi determinar a diversidade das poboacións de carrachas exófilas presentes na comunidade autónoma de Galicia. Para iso, e utilizando o método da bandeira, recolléronse 711 carrachas en 26 puntos de mostraxe situados pola xeografía galega intentando cubrir os principais termotipos (relacionados co bioclima e a cobertura vexetal) existentes. Os espécimes recollidos identificáronse morfolóxicamente e comparáronse cos resultados obtidos con técnicas moleculares. Ademais, evaluouse a posible influencia do termotipo sobre a presenza das distintas especies. Na vexetación de Galicia identificáronse 8 especies diferentes de Ixódidos, aínda que só 6 especies foron recoñecidas de xeito fiable polas súas características morfolóxicas; a análise da secuencia do xene que codifica a subunidade ribosómica 16S foi moi útil para confirmar as dúas restantes. A especie máis frecuente foi *Ixodes ricinus* (70,60%); tamén atopáronse *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.; 14,63%), *Dermacentor marginatus* (8,44%) e *Dermacentor reticulatus* (3,94%) en menor proporción. Finalmente, *Ixodes frontalis* (1,69%), *Haemaphysalis punctata* (0,28%), *Rhipicephalus bursa* (0,28%) e *Ixodes ventraloi* (0,14%) atopáronse de forma esporádica. Este estudo é a primeira cita en Galicia das dúas últimas especies. *Ixodes ricinus* e *D. marginatus* están amplamente difundidas na nosa comunidade, xa que se atoparon nos 4 termotipos. *Ixodes ricinus* foi especialmente frecuente na zona supratemplada debido á súa alta esixencia higrométrica, así como *Dermacentor reticulatus*, pero este non se atopou no termotipo mesomediterráneo. *Dermacentor marginatus* non é tan dependente da humidade ambiental como os anteriores e, polo tanto, era máis común na zona mesomediterránea. *Rhipicephalus sanguineus* s.l., que presenta un ciclo peridoméstico, atopouse preferentemente nas zonas periurbanas, independentemente do termotipo. O resto, a maioría con carácter endófilo, atopáronse ocasionalmente, polo que a súa relación co termotipo non se puido estudar.

Palabras chave: Carrachas exófilas, noroeste de España, identificación morfolóxica, identificación molecular, termotipos.

ABSTRACT

Identification of exophilic ticks in northwestern Spain

Ticks are obligate parasitic arthropods with a significant importance in animal and public health due to their role as vectors of multiple infectious and parasitic agents. These health implications entail a great economic cost derived from diagnosis and treatment of diseases, as well as vector control. Transmitted pathogens are associated with certain vectors; thus, studies on both the presence of tick species and the factors determining their abundance in a territory are useful for unravelling the epidemiology of related diseases. In addition, they allow optimizing preventive measures. Therefore, the main objective of this work was to determine the diversity of exophilic ticks present in the autonomous community of Galicia. To this end, 711 ticks were collected in 26 sampling points located in that region trying to cover the main existing thermotypes (related to the bioclimate and vegetation cover). Parasitic specimens were morphologically identified and these results were compared with those obtained using molecular techniques. In addition, the possible influence of the thermotype on the presence of the different species was assessed. Eight different species of ixodids were found in the vegetation of Galicia, although only six species were reliably identified morphologically; sequence analysis at the 16S rRNA gene was very useful for a correct identification. The most frequent species was *Ixodes ricinus* (70.60%); *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.; 14.63%), *Dermacentor marginatus* (8.44%) and *Dermacentor reticulatus* (3.94%) were less common. Finally, *Ixodes frontalis* (1.69%), *Haemaphysalis punctata* (0.28%), *Rhipicephalus bursa* (0.28%) and *Ixodes ventralloi* (0.14%) were sporadically found. This is the first citation of the last two species in Galicia. *Ixodes ricinus* and *D. marginatus* were widely disseminated in our community, since they were found in the 4 thermotypes. *Ixodes ricinus* was especially frequent in the supratemperate zone due to its high hygrometric requirements; *Dermacentor reticulatus* was also common in that thermotype but it was not found in the mesomediterranean thermotype. *Dermacentor marginatus* was not as dependent on environmental humidity as the previous ones, and therefore was more common in the mesomediterranean zone. *Rhipicephalus sanguineus* s.l., presenting a peridomestic behaviour, was linked to peri-urban zones independently of the thermotype. The rest, mainly with an endophilic behaviour, were found occasionally, so their relationship with the thermotype could not be studied.

Keywords: Exophilic ticks, northwestern Spain, morphological identification, molecular identification, thermotypes.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	7
1.1. GARRAPATAS	7
1.1.1. Clasificación, descripción y ciclo biológico	7
1.1.2. Importancia sanitaria y económica	10
1.2. ESPECIES DE GARRAPATAS PRESENTES EN ESPAÑA	13
1.2.1. Especies del género <i>Ixodes</i>	14
1.2.2. Especies del género <i>Haemaphysalis</i>	16
1.2.3. Especies del género <i>Rhipicephalus</i>	16
1.2.4. Especies del género <i>Dermacentor</i>	17
1.2.5. Especies del género <i>Hyalomma</i>	18
1.2.6. Especies de garrapatas presentes en Galicia	19
1.3. MÉTODOS DE CAPTURA DE GARRAPATAS	19
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1. ZONAS MUESTREADAS	22
3.2. TOMA DE MUESTRAS.....	26
3.3 IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA	27
3.4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR	27
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
5. CONCLUSIONES	42
6. REFERENCIAS	43

1. INTRODUCCIÓN

1.1 GARRAPATAS

1.1.1 Clasificación, descripción y ciclo biológico

Las garrapatas son artrópodos parásitos obligados con una destacable importancia sanitaria tanto para el ser humano como para los animales debido a su papel como vectores de múltiples agentes infecciosos y parasitarios (Díaz *et al.*, 2019). Con la denominación común de garrapatas se identifica a un conjunto de especies del orden Ixodida, que se incluye en la clase Arachnida (Tabla 1), la segunda más numerosa del reino animal. Así, las garrapatas están taxonómicamente muy relacionadas con arañas y escorpiones (Estrada-Peña, 2015a).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de las garrapatas (modificado de Nava *et al.*, 2017)

Reino	Animalia
Filo	Arthropoda
Clase	Arachnida
Subclase	Acari
Superorden	Parasitiformes
Orden	Ixodida
Superfamilia	Ixodoidea

Morfológicamente, presentan un cuerpo fusionado en una misma pieza redondeada que puede subdividirse en dos regiones, el gnatosoma y el idiosoma (Sonenshine y Roe, 1993). El primero, también denominado *capitulum*, se encuentra en la región anterior y está compuesto por la base del capítulo y el *rostrum* (Figura 1a); este último engloba dos palpos formados por cuatro palpoartículos, dos quelíceros y el hipostoma, que en ocasiones puede presentar dentículos en la zona ventral según la especie (Walker *et al.*, 2003). El idiosoma abarca desde la unión entre la base del capítulo y el escudo, hasta la parte más caudal de la garrapata, e incluye varias estructuras anatómicas: dorsalmente se pueden identificar los ojos, los festones, los surcos cervical y marginal y el escudo o los mamelones, dependiendo de la familia a la que pertenezca la garrapata (Estrada-Peña, 2015a). Lateralmente presentan las placas espiraculares, que permiten el intercambio gaseoso en el proceso de respiración de la garrapata, y cuatro apéndices articulados insertados a través de la coxa (Figura 1b). Por último, ventralmente se aprecian la apertura genital, el surco anal y el ano (Walker *et al.*, 2003). Además, en los tres planos se observan estructuras filiformes con función sensorial denominadas setas (Bowman, 2014).

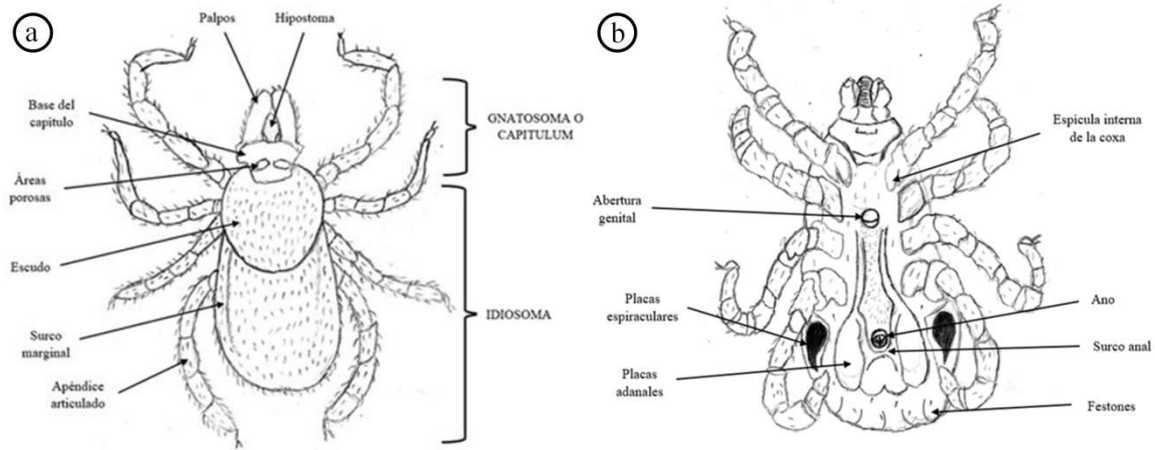


Figura 1. Vistas dorsal (a) y ventral (b) de una garrapata, donde se señalan las estructuras anatómicas más destacables

Aunque todas las garrapatas presentan de forma general estas estructuras, existen notables diferencias según el estadio y el sexo del individuo (Sonenshine y Roe, 1993). Así, las larvas solo poseen tres pares de apéndices articulados y carecen de placas espiraculares mientras que las ninfas no presentan abertura genital (Latif y Walker, 2004). Los adultos muestran dimorfismo sexual, siendo especialmente evidente la diferencia de tamaño del escudo, que en las hembras únicamente alcanza la mitad del cuerpo mientras que en los machos abarca la práctica totalidad del mismo (Estrada-Peña *et al.*, 2017). Esta diferencia responde a la necesidad de las hembras de ingerir cantidades notables de sangre para la puesta de los huevos, expandiendo su cuerpo para almacenarla, mientras que en los machos, que no requieren alimentaciones tan copiosas, el escudo limita dicha expansión (Estrada-Peña, 2015b). No obstante, existen otras diferencias morfológicas menos manifiestas como la existencia de áreas porosas, dos zonas presentes en la base del capítulo de las hembras y cuya función es la síntesis y secreción de sustancias antioxidantes sobre los huevos para evitar la degradación de los lípidos e incrementar su resistencia y viabilidad (Walker *et al.*, 2003). También es destacable la presencia en machos de extensiones o prolongaciones quitinosas en la zona ventral cercana al ano conocidas como placas ventrales, que no aparecen en hembras (Bowman, 2014).

Al margen de estas diferencias, hay que tener en cuenta que cada garrapata presenta unas características anatómicas propias en función de la familia, género y especie a la que pertenece (Latif y Walker, 2004). Así, dentro de la superfamilia Ixodoidea se incluyen tres familias: Argasidae, Ixodidae y Nuttalliellidae (Estrada-Peña, 2015a). A las componentes de la primera familia se les denomina vulgarmente como garrapatas blandas y se caracterizan generalmente por la ausencia de escudo, festones, placas ventrales en machos y áreas porosas en hembras; también presentan un gnatosoma oculto en la zona ventral, coxas sin espuela, ausencia de dimorfismo

sexual y aspecto reticulado (Bowman, 2014). En la actualidad se han descrito 208 especies incluidas en 5 géneros (Nava *et al.*, 2017). La familia Nuttalliellidae, compuesta por una única especie, *Nuttalliella namaqua*, posee características propias queriendo representar un punto de encuentro evolutivo situado entre las otras dos familias (Walker *et al.*, 2003). Por último, la familia Ixodidae integra las denominadas garrapatas duras y es la única que incluye especies exófilas (Estrada-Peña, 2015b). Está formada por 722 especies repartidas en 14 géneros (Nava *et al.*, 2017) y todas ellas poseen unas características propias que las distinguen de las otras familias como son la presencia de escudo, áreas porosas, placas ventrales y festones, posición anterior del capítulo, dimorfismo sexual y el aspecto coriáceo y resistente (Bowman, 2014). Esta familia se puede dividir en dos grupos en base a caracteres morfológicos y biológicos (Walker *et al.*, 2003):

- Prostriata contiene todas las especies del género *Ixodes*, que se caracterizan morfológicamente por un surco anal anterior al ano y por la presencia de placas ventrales en los machos; éstos producen espermátidas sin alimentarse previamente y la cópula puede realizarse al margen del hospedador.
- Metastriata agrupa el resto de géneros (*Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Amblyomma*, etc.), cuyas especies presentan un surco anal posterior al ano. Además, los machos no suelen mostrar placas ventrales y producen espermátidas después de la alimentación, copulando sobre el hospedador.

Todas las características anatómicas de las garrapatas son el resultado de un proceso evolutivo que les confiere una complejidad idónea para el desarrollo de su actividad parasitaria, puesto que son ácaros hematófagos que requieren de una ingesta adecuada de sangre para completar su ciclo biológico, desde larva hasta adulto (Estrada-Peña *et al.*, 2004b). Las especies exófilas se desarrollan en la vegetación y desde allí buscan un hospedador adecuado del que alimentarse. Por el contrario, las garrapatas endófilas viven principalmente en el interior de nidos de aves y madrigueras de pequeños mamíferos, donde se alimentan subrepticamente de sus hospedadores (Walker *et al.*, 2003). Por ello, los animales domésticos y las personas tienen un mayor riesgo de exposición a las garrapatas exófilas, sobre las que trata este trabajo.

El ciclo biológico de la familia Ixodidae incluye varias fases: huevo, larva, ninfa y adulto (macho o hembra) (Nava *et al.*, 2017) Esto conlleva la necesidad de realizar dos mudas: una de larva a ninfa y otra de ninfa a adulto. Todas las fases de desarrollo, exceptuando el huevo, se encaraman a la vegetación hasta alcanzar un hospedador del que se alimentan durante varios días antes de mudar a la siguiente etapa; las hembras ponen cientos o miles de huevos antes de morir (Estrada-Peña, 2015a). Algunas especies tienen un hospedador único, permaneciendo en él durante todas las fases parasitarias, separándose de él como hembras ingurgitadas. Otras especies tienen un ciclo de dos hospedadores, caracterizado por larvas que mudan a ninfas en el mismo hospedador;

las ninfas ingurgitadas mudan en el ambiente y los adultos resultantes buscan otro hospedador para completar el ciclo. Sin embargo, la gran mayoría de las especies de Ixodidae tienen un ciclo de tres hospedadores, donde las larvas ingurgitadas se desprenden de un hospedador para mudar en el ambiente. A continuación, las ninfas resultantes buscan otro hospedador para alimentarse y después mudan a adultos en el medio, completando el ciclo en otro hospedador (Bowman, 2014). De esta forma, las garrapatas de tres hospedadores pueden alimentarse de animales de diferentes especies durante su vida, desde pequeños roedores a grandes mamíferos, por lo que constituyen vectores perfectos, pudiendo transmitir agentes entre distintos animales e incluso a las personas si presentan carácter zoonótico (Sonenshine y Roe, 1993).

1.1.2. Importancia sanitaria y económica

El ciclo biológico de las garrapatas implica importantes consideraciones económicas y sanitarias a nivel veterinario y médico, que son el resultado de su actividad hematófaga y de su capacidad de transmisión de agentes parasitarios e infecciosos (Jongejan y Uilenberg, 2004).

Desde el punto de vista sanitario, las garrapatas causan lesiones con sus piezas bucales al alimentarse, lo cual puede provocar dermatosis e inflamación de la zona (Estrada-Peña, 2015a). A este respecto, la herida es mayor en el caso de géneros que disponen de largos hipostomas, como *Ixodes* o *Amblyomma*, que al penetrar profundamente en la piel causan dolor e inflamación intensos. Por el contrario, los géneros como *Rhipicephalus* o *Dermacentor* producen heridas menores pues presentan hipostomas cortos, compensando la menor fijación con la secreción de una sustancia cementosa (Moorhouse, 1973). Entre las consecuencias de estas lesiones se encuentra la posible infección bacteriana secundaria, que puede devenir en la formación de abscesos, o la aparición de miasis. Otro efecto directo es la aparición de anemia en caso de infestaciones masivas, pues cada garrapata puede sustraer del hospedador entre 0,5 y 2 ml de sangre, según la especie (Koch y Sauer, 1984). Más grave resulta el desarrollo de parálisis flácida ascendente, que puede ser fatal, a consecuencia de la inoculación de sustancias neurotóxicas secretadas con la saliva de la garrapata. No obstante, no todas las garrapatas pueden causar esta toxicosis; así, mientras que en España no se han denunciado episodios de parálisis, en Australia son muy frecuentes por la presencia de *Ixodes holocyclus*, la garrapata más virulenta conocida (Bowman, 2014).

Sin embargo, la verdadera importancia sanitaria de las garrapatas radica en su capacidad de transmitir un amplio número de patógenos con la saliva, que pueden provocar enfermedades graves. De hecho, las garrapatas son los artrópodos vectores que transmiten una mayor variedad de agentes infecciosos (Venzal, 2008), y se considera que son los responsables de un mayor número de infecciones en personas y animales en regiones templadas (Estrada-Peña *et al.*, 2017). A continuación, se resumen las principales enfermedades transmitidas por garrapatas de interés veterinario y médico que se han documentado en España o países cercanos:

- Encefalitis transmitida por garrapatas (TBE): el virus de la encefalitis (TBEV) es el causante de esta enfermedad neurológica potencialmente fatal descrita tanto en Europa como en Asia. Es una enfermedad emergente en Europa debido al cambio climático y cambios en el uso del suelo, como el aumento de la superficie forestal y la disminución del uso de pesticidas, que favorecen la diseminación geográfica de las garrapatas y el incremento de las poblaciones de hospedadores; ciertos cambios sociales, especialmente el aumento de actividades al aire libre y menor caza de grandes mamíferos que actúan como hospedadores también podrían explicar el incremento del número de casos de TBE en este continente (Estrada-Peña, 2015a). No obstante, las cepas presentes en el oeste de Europa son menos virulentas que las del este, donde uno de los subtipos presenta una letalidad del 40%. Asimismo, aunque no se han detectado casos en España, se debe tener en cuenta que en el occidente europeo el principal vector es *Ixodes ricinus* (Bowman, 2014), muy prevalente en la cornisa cantábrica; consecuentemente, se debe extremar la vigilancia para conocer la expansión de la enfermedad en el continente europeo. Recientemente se han observado casos clínicos en perros, aunque no revisten tanta gravedad como en el ser humano (Pfeffer y Dobler, 2011).
- Babesiosis: es una enfermedad emergente en múltiples regiones del mundo originada por un protozoo intraeritrocitario que puede conducir a graves episodios anémicos e ictericos. En Europa destaca por su importancia veterinaria, especialmente en carnívoros y herbívoros domésticos; aunque es una enfermedad zoonótica, desde 1957 únicamente se han descrito 40 casos en personas (Estrada-Peña, 2015a). Un aspecto fundamental en la distribución y diseminación de la enfermedad es la transmisión transtadial y transovárica del parásito en el vector (Uilenberg, 2006). Existen múltiples especies de *Babesia*, con cierta especificidad por vector y animal. Por ejemplo, mientras que los vectores de las dos especies principales en vacuno (*Babesia bigemina* y *Babesia bovis*) son especies del género *Rhipicephalus* y, en menor medida, *Ixodes*, las principales especies que transmite *Babesia canis* al perro son *Dermacentor reticulatus* y *Dermacentor marginatus* (Bowman, 2014).
- Theileriosis: enfermedad especialmente importante en rumiantes y équidos causada por un protozoo con una primera fase intralinfocitaria y una segunda intrahemática. Las especies de *Theileria* presentan distintas garrapatas vectoras; por ejemplo, las que afectan al ganado vacuno en Europa (*Theileria annulata* y *Theileria buffeli*) se vehiculan por garrapatas del género *Hyalomma* y *Haemaphysalis*, respectivamente (Estrada-Peña, 2015a). Por ello, conocer las especies de garrapatas presentes en una región permite estimar las enfermedades presentes o que pueden introducirse (Díaz *et al.*, 2019).
- Anaplasmosis: *Anaplasma* spp. destruye los eritrocitos de los hospedadores vertebrados, generando anemia hemolítica, disminución de peso, abortos y, ocasionalmente, la muerte del animal. Afecta principalmente a rumiantes, aunque otras especies infectan a perros, gatos e

incluso el hombre (Carrade *et al.*, 2009). Además, se ha aislado en numerosos animales silvestres, incluyendo roedores o ungulados que actúan como reservorios de la enfermedad. Se transmite a los rumiantes principalmente por garrapatas del género *Rhipicephalus* y *Dermacentor*, aunque otros artrópodos como mosquitos y tábanos también pueden actuar como vectores (Estrada-Peña, 2015a). Los animales que superan la enfermedad permanecen como portadores asintomáticos permanentes, esencial en la epidemiología de la enfermedad.

- **Rickettsiosis**: está causada por bacterias intracelulares que se transmiten por garrapatas, piojos, ácaros o pulgas (Oteo y Portillo, 2012). Las garrapatas suelen infectarse al alimentarse de roedores infectados y presentan transmisión transtadial y transovárica. Existen al menos 12 especies patógenas para los vertebrados domésticos y el ser humano, produciendo enfermedades emergentes como la fiebre manchada de las Montañas Rocosas (*Rickettsia rickettsii*) en EE.UU. o el tifus siberiano (*Rickettsia sibirica*). Sin embargo, la principal enfermedad producida por estas bacterias en España es la fiebre botonosa mediterránea causada por *Rickettsia conorii* y cuyo vector principal son garrapatas del grupo *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.) que incluye varias especies de garrapatas similares difíciles de identificar (Rovero y Raoult, 2008). En esta enfermedad el perro actúa como reservorio transitorio al sufrir una bacteremia temporal, mostrando fiebre, aletargamiento y hemorragias nasales y oculares, facilitando la expansión del agente. Aunque menos de un 1% de los *Rhipicephalus sanguineus* s.l. está infectado, cada vez se describen más casos en España, donde no hay vigilancia específica frente a esta enfermedad (Estrada-Peña, 2015a). Todos los episodios aparecen estacionalmente, especialmente en las épocas de mayor actividad de las garrapatas. En personas, esta enfermedad es ocasional.
- **Ehrlichiosis**: causada por *Ehrlichia canis*, se transmite únicamente por *Rhipicephalus sanguineus* s.l., que infecta los monocitos produciendo ehrlichiosis canina monocítica que cursa con fiebre y anemia (Estrada-Peña, 2015a). Existen otras especies (*Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ruminantium*, etc.) que afectan a otros animales, incluyendo rumiantes domésticos.
- **Enfermedad de Lyme o borreliosis**: está originada por 10 especies de espiroquetas del grupo *Borrelia burgdorferi*, transmitidas exclusivamente por especies del género *Ixodes*, principalmente *I. Ricinus* (Díaz *et al.*, 2017). Afecta principalmente a personas, que muestran un cuadro dérmico, articular o nervioso, aunque también puede afectar a los animales domésticos. En Europa es uno de los procesos transmitidos por garrapatas con mayor importancia en salud pública, describiéndose anualmente 200.000 casos (Estrada-Peña, 2015a). Ello se debe a la existencia de un profuso número de reservorios y a la amplia distribución de *Ixodes ricinus*, especialmente en zonas frescas y húmedas como bosques septentrionales europeos (Schulz *et al.*, 2014), incluyendo el norte español.

- **Fiebre hemorrágica Crimea-Congo:** es una enfermedad grave, pues su letalidad es cercana al 100%, causada por un virus transmitido por garrapatas del género *Hyalomma*. Los rumiantes actúan como reservorios y diseminadores de las garrapatas infectadas, pero ningún animal doméstico sufre la enfermedad o presenta un cuadro leve. A pesar de haberse detectado recientemente algunos casos en España, no es probable contraer la enfermedad debido a la baja prevalencia del agente en las garrapatas del género *Hyalomma* (Palomar *et al.*, 2017).
- **Hepatozoonosis:** causada por 300 especies de protozoos del género *Hepatozoon* cuyo hospedador definitivo son las garrapatas. Los hospedadores intermediarios pueden ser tanto animales domésticos como silvestres (mamíferos, aves, reptiles y anfibios) y el contagio se produce tras la ingestión de partes de la garrapata que contengan formas infectantes de *Hepatozoon* (Estrada-Peña, 2015a). Es una enfermedad importante en perros que viven en el entorno mediterráneo y están en contacto con especies del grupo *Rhipicephalus sanguineus* s.l. En estas garrapatas existe transmisión transtadial del patógeno, pero no transovárica. El cuadro clínico por lo general es leve excepto en individuos sensibles o inmunodeprimidos.

Todas estas implicaciones sanitarias suponen un coste económico derivado del tratamiento de casos clínicos y de la prevención de estas enfermedades mediante el control del vector. En personas, a nivel global, se ha estimado que el impacto económico que supone el control de garrapatas asciende a 7 billones de dólares americanos, aunque no son del todo precisas ya que extrapolan resultados locales a la población mundial (Venzal, 2008).

1.2. ESPECIES DE GARRAPATAS PRESENTES EN ESPAÑA

Las especies de garrapatas presentes en un país o región y la densidad de sus poblaciones dependen de múltiples factores como las características climatológicas (temperatura, humedad, etc.), la vegetación, presencia de hospedadores adecuados, las actividades humanas desarrolladas, el transporte de ganado, etc. (Estrada-Peña *et al.*, 2017). Las manifiestas diferencias climáticas de España, junto con variaciones de otra índole (fauna, actividades sociales, etc.) conllevan la existencia de distintas especies de garrapatas según el área geográfica. De manera resumida, el país se puede subdividir en tres regiones claramente diferenciadas: el sur con un clima mediterráneo, el centro peninsular con un clima continental y el norte con un clima atlántico determinado por temperaturas suaves y abundantes lluvias durante todo el año (Rodríguez y Ramil-Rego, 2007). A continuación, se resumen las principales especies de garrapatas presentes en España, junto a algunos datos de interés; como el ámbito de este estudio es Galicia, al final de este epígrafe se dedica un apartado a las especies de garrapatas más probables en esta región, que serán las que se encuentren con mayor frecuencia durante los muestreos.

1.2.1. Especies del género *Ixodes*

Se han descrito alrededor de 660 especies de *Ixodes* y todas son prostriata, presentando un capitulo eminentemente alargado, cuyos palpos son más anchos en los palpoartículos dos y tres; también se caracterizan por no poseer ojos, festones, ni ornamentación del escudo (Bowman, 2014). Presentan una amplia distribución geográfica, aunque las especies exófilas son especialmente frecuentes en regiones templadas con elevada humedad y preferentemente en zonas de bosque caducifolio o coníferas. En la Tabla 2 se resumen las especies descritas en España:

Tabla 2. Especies del género *Ixodes* presentes en España (modificado de Estrada-Peña *et al.*, 2017)

Especie	Distribución	Ciclo biológico	Hospedadores	Patógenos vectorizados
<i>Ixodes ricinus</i>	Europa y norte de África	Exófila. 3 hospedadores	Adultos en rumiantes domésticos y silvestres. Larvas y ninfas en micromamíferos, aves, lagartijas ...	TBEV, <i>Borrelia burgdorferi</i> s.l., <i>B. miyamotoi</i> , <i>Babesia</i> spp., <i>Rickettsia slovacica</i> , <i>R. helvetica</i> , <i>Francisella tularensis</i> , ...
<i>Ixodes frontalis</i>	Europa, Asia occidental y el norte de África	Exófila. 3 hospedadores	Paseriformes y en menor medida otras aves, mamíferos o personas	TBEV, <i>Borrelia</i> spp., <i>Anaplasma phagocytophilum</i> , <i>Coxiella burnetii</i> , ...
<i>Ixodes arboricola</i>	Europa, Asia central y norte de África	Endófila. 3 hospedadores	Paseriformes	<i>Borrelia burgdorferi</i> , TBEV, <i>Rickettsia</i> spp.
<i>Ixodes canisuga</i>	Europa y amplias regiones de Asia	Endófila. 3 hospedadores	Principalmente perros y carnívoros silvestres, aunque también otros mamíferos y aves	<i>Theileria annae</i> , <i>Babesia microti</i> , <i>Ehrlichia canis</i> , <i>Borrelia burgdorferi</i>
<i>Ixodes hexagonus</i>	Europa	Endófila. 3 hospedadores	Mayoritariamente erizos. Otros mamíferos carnívoros	<i>Borrelia burgdorferi</i> , <i>Theileria annae</i> , TBEV, ...
<i>Ixodes trianguliceps</i>	Europa y occidente asiático	Endófila, larvas exófilas	Pequeños mamíferos, principalmente roedores	<i>Babesia microti</i> , <i>Borrelia afzelii</i> , <i>B. garinii</i> , <i>Francisella tularensis</i>
<i>Ixodes acuminatus</i>	Europa meridional	Endófila. 3 hospedadores	Prefiere pequeños mamíferos, pero también medianos y el ser humano	<i>Borrelia</i> spp., <i>Coxiella burnetii</i> , <i>Francisella tularensis</i> , ...
<i>Ixodes ventraloi</i>	Europa meridional y norte de África	Endófila. 3 hospedadores	Lagomorfos, carnívoros y roedores	<i>Anaplasma phagocytophilum</i> , <i>Rickettsia</i> spp.,...
<i>Ixodes inopinatus</i>	Europa (S) y África (N)	Exófila	Larvas y ninfas en lagartos, adultos en zorros	Se desconoce

Mención especial en este género requiere *Ixodes ricinus* puesto que presenta una distribución mundial y es la garrapata más común en regiones húmedas y templadas, incluyendo la mayor parte de Europa. Como la temperatura y la humedad relativa son los principales factores que limitan su desarrollo y supervivencia y, por tanto, su diseminación (Alonso-Carné *et al.*, 2014), el calentamiento global ha conducido a un incremento de su expansión y a una alteración de su actividad estacional, lo que supone cambios importantes en la epidemiología de las enfermedades que transmite (Gray, 2007). En España, las mayores poblaciones de esta especie se encuentran en los Pirineos, algunas sierras centrales y en toda la cornisa Cantábrica, siendo la especie más relevante en el norte del país, junto a *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (Estada-Peña, 2015b). Aunque presenta un amplio rango de hospedadores, en España destacan varios ungulados silvestres como el ciervo (*Cervus elaphus*) y el corzo (*Capreolus capreolus*), ambos muy abundantes. Además, es uno de los vectores más importantes a nivel veterinario y en salud pública por el amplio número de patógenos que vehicula; en Europa es el principal vector de *Borrelia burgdorferi* s.l., que causa la enfermedad de Lyme, *Anaplasma phagocytophilum* y del TBEV (Alonso-Carné *et al.*, 2014)

El hábitat preferido por esta especie es el bosque caducifolio que está ampliamente distribuido por toda la geografía norte española, aunque se puede encontrar también en vegetación abierta con alta humedad (James *et al.*, 2014). Parece tener especial predilección por aquellos lugares en los que existe un crecimiento secundario sustancial de plantas, como las riberas fluviales, los bosques heterogéneos de *Pinus uncinata*, los bosques mixtos y los deciduos (Estrada-Peña, 2001). Sin embargo, no suele habitar en bosques de eucaliptos ni en bosques jóvenes y homogéneos de coníferas por la acidificación y desecación del suelo que generan las hojas de estos árboles. Tampoco suele habitar zonas abiertas, laderas ni áreas de alta montaña (Estrada-Peña *et al.*, 2006). Estas diferencias se atribuyen a la mayor profundidad y cobertura de vegetación que crean condiciones favorables para la supervivencia de la garrapata. Dichas condiciones serían principalmente temperaturas estables y humedad alta, superior al 80% (Gray *et al.*, 2016). Así, el aumento de las temperaturas puede llevar a un aumento en la densidad de la garrapata a través de un inicio más temprano de la actividad de la garrapata en la primavera y una menor duración del desarrollo de una etapa a la siguiente, siempre que las garrapatas puedan buscar durante el tiempo suficiente a un hospedador para alcanzarlo antes de morir por desecación o agotamiento energético (Alonso-Carné *et al.*, 2014). También la orientación interfiere en la abundancia de la especie, de forma que las zonas dispuestas hacia el norte y el oeste predisponen a una mayor recogida de ejemplares, explicable por ser zonas más frescas y húmedas. Por último, hay que tener en cuenta que no sólo influyen los factores abióticos como el clima (temperatura, humedad, lluvias, radiación solar, etc.) o bióticos como la vegetación, sino que la existencia y afluencia de hospedadores adecuados (ungulados domésticos y silvestres) juega un papel crucial en la presencia, abundancia, actividad y longevidad de *I. ricinus* (Estrada-Peña, 2001).

1.2.2. Especies del género *Haemaphysalis*

En estas especies los dos aspectos morfológicos diferenciadores son el surco anal que forma un arco posterior al ano y el segundo segmento de los palpos que se ensancha lateralmente. Como en el caso de *Ixodes*, estas garrapatas no tienen ojos ni ornamentación del escudo, pero difieren en poseer festones (Bowman, 2014). Se han descrito 167 especies dentro de este género, de las cuales se tiene constancia en España de las incluidas en la Tabla 3.

Tabla 3. Especies del género *Haemaphysalis* presentes en España (modificado de Estrada-Peña *et al.*, 2017)

Especie	Distribución	Ciclo biológico	Hospedadores	Patógenos vectorizados
<i>Haemaphysalis inermis</i>	Europa y parte de Asia	Exófila. 3 hospedadores	Adultos en ungulados domésticos y silvestres. Inmaduros en lagartos y aves	TBEV, <i>Rickettsia</i> spp.
<i>Haemaphysalis punctata</i>	Europa, Asia (E) y África (N)	Exófila. 3 hospedadores	Adultos en grandes mamíferos, inmaduros en pequeños y aves	TBEV, <i>Rickettsia</i> spp., <i>Babesia</i> spp., <i>Coxiella brunetii</i> , ...
<i>Haemaphysalis sulcata</i>	Europa, Asia central y norte de África	Exófila. 3 hospedadores	Adultos en ungulados, inmaduros en reptiles	<i>Brucella abortus</i> , <i>Anaplasma ovis</i> , <i>Coxiella brunetii</i>
<i>Haemaphysalis concinna</i>	Europa y Asia	3 hospedadores	Adultos en grandes mamíferos, inmaduros en pequeños	<i>Rickettsia</i> spp., <i>A. phagocytophilum</i> , <i>A. bovis</i> , ...
<i>Haemaphysalis hispanica</i>	Sudeste del mediterráneo	Endófila. 3 hospedadores	Lagomorfos	Se desconoce

Las especies de *Haemaphysalis* presentan una marcada preferencia por determinados hábitats; así, *H. inermis*, *H. punctata* y *H. concinna* suelen ser especialmente frecuentes en zonas templadas de bosques caducifolios, mientras que *H. hispanica* prefiere áreas frías, subhúmedas o secas. Por el contrario, *H. sulcata* es especialmente común en regiones semidesérticas.

1.2.3. Especies del género *Rhipicephalus*

Al pertenecer al grupo Metastriata, el surco anal es posterior al ano. Asimismo, la base del capitulo es hexagonal, con ojos y festones presentes. El escudo no está ornamentado. Los machos muestran placas adanales y accesorias sobresalientes a ambos lados del ano (Bowman, 2014). El género está conformado únicamente por 8 especies. Sin embargo, esta situación no parece estable debido al intenso debate sobre la identidad de ciertas especies incluidas en *R. sanguineus* s.l. y el rango actual de *R. turanicus*. Los primeros estudios moleculares destacaron estos problemas al mostrar que los mismos taxones se habían diagnosticado erróneamente como especies diferentes.

En particular, existe mucha confusión entre diferentes poblaciones de *R. sanguineus* s.l. y *R. turanicus*, con estudios moleculares iniciales que muestran que muchos especímenes identificados como *R. turanicus* eran de hecho *R. sanguineus* s.l. (Santos-Silva *et al.*, 2011). Obviando dichas dificultades, las especies recogidas en este género que aparecen en España se recogen en la Tabla 4.

Tabla 4. Especies del género *Rhipicephalus* presentes en España (modificado de Estrada-Peña *et al.*, 2017)

Especie	Hábitat	Ciclo biológico	Hospedadores	Patógenos vectorizados
<i>Rhipicephalus bursa</i>	Zonas con inviernos húmedos y veranos secos	2 hospedadores	Grandes mamíferos. Suele asociarse a zonas donde existen rebaños de ovino	<i>Babesia ovis</i> , <i>Anaplasma</i> spp., <i>Rickettsia</i> spp., ...
<i>Rhipicephalus pusillus</i>	Bosques de coníferas, esclerófilos y mixtos	Endófila. 3 hospedadores	Principalmente lagomorfos. Otros mamíferos	<i>Rickettsia sibirica</i> , <i>Rickettsia massiliae</i>
<i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l.	Áreas periurbanas y rurales	Endófila. 3 hospedadores	Principalmente perros. Otros mamíferos o aves	<i>Babesia vogeli</i> , <i>Ehrlichia canis</i> , <i>Hepatozoon canis</i> , <i>Rickettsia</i> spp., ...
<i>Rhipicephalus turanicus</i>	Desiertos y semidesiertos, estepas y bosques abiertos	Exófila. 3 hospedadores	Mamíferos (ungulados), aves y reptiles	<i>Rickettsia</i> spp.
<i>Rhipicephalus annulatus</i>	Bosques mediterráneos, sabana y estepa	1 hospedador	Bovinos preferentemente. Otros ungulados	<i>Babesia</i> spp., <i>Anaplasma marginale</i> , <i>Rickettsia</i> spp.

La mayoría de las especies de *Rhipicephalus* se encuentran principalmente en la región mediterránea, aunque *R. sanguineus* s.l. y *R. annulatus* tienen una distribución más amplia, pudiéndose encontrar en otros continentes. En el caso de *R. sanguineus* s.l. se ha demostrado que su presencia en América es consecuencia del proceso de colonización del continente (Szabo *et al.*, 2005).

1.2.4. Especies del género *Dermacentor*

También el surco anal dibuja un arco posteriormente al ano. *Dermacentor* es similar a *Rhipicephalus* tanto en cuanto tiene ojos y 11 festones, pero se diferencia perfectamente porque el escudo está ornamentado y dorsalmente la base del capítulo es rectangular. Además, los machos carecen de placas adanales y sus coxas aumentan de tamaño progresivamente desde la primera a la cuarta (Bowman, 2014). A pesar de la existencia de 14 especies dentro del género, en España sólo se han descrito las 2 siguientes, recogidas en la Tabla 5.

Tabla 5. Especies del género *Dermacentor* presentes en España (modificado de Estrada-Peña *et al.*, 2017)

Especie	Distribución	Ciclo biológico	Hospedadores	Patógenos vectorizados
<i>Dermacentor marginatus</i>	Europa y norte de África	Exófila. 3 hospedadores	Adultos en grandes mamíferos (ungulados), inmaduros en pequeños	TBEV, <i>Coxiella burnetii</i> , <i>Rickettsia raoultii</i> , <i>Ehrlichia canis</i> , <i>Borrelia afzelii</i>
<i>Dermacentor reticulatus</i>	Europa	Exófila. 3 hospedadores	Adultos en grandes mamíferos (carnívoros), inmaduros en pequeños	TBEV, <i>Rickettsia</i> spp., <i>Francisella tularensis</i> , <i>A. marginale</i> , <i>Babesia canis</i>

Ambas especies tienen una distribución semejante, siendo especialmente frecuentes en zonas de praderas y pastos, aunque *D. marginatus* es más común en regiones templadas y *D. reticulatus* en zonas más frías y húmedas (Kolonin, 2009).

1.2.5. Especies del género *Hyalomma*

El surco anal también rodea posteriormente al ano. Asimismo, *Hyalomma* tiene el rostrum mucho más grande que la base del capítulo, siendo el segundo y el tercer segmento palpal aproximadamente de la misma longitud. Presentan ojos y los festones aparecen irregularmente. Como en el caso de *Rhipicephalus*, el macho posee placas adanales accesorias (Bowman, 2014). No existe unanimidad conforme al número de especies que integran este género entre los investigadores a causa de las dificultades encontradas a la hora de la clasificación. No obstante, en España se han descrito únicamente las 4 incluidas en la Tabla 6.

Tabla 6. Especies del género *Hyalomma* presentes en España (modificado de Estrada-Peña *et al.*, 2017)

Especie	Distribución	Ciclo biológico	Hospedadores	Patógenos vectorizados
<i>Hyalomma marginatum</i>	Sur de Europa, norte de África y zonas de Asia	Exófila. 2 hospedadores	Adultos en ungulados, inmaduros en micromamíferos y aves	Fiebre hemorrágica Crimeana-Congo, <i>Babesia</i> spp., <i>Anaplasma</i> spp.,...
<i>Hyalomma rufipes</i>	África subsahariana, principalmente	Exófila. 2 hospedadores	Adultos en ganado, inmaduros en pequeños mamíferos y aves	Fiebre hemorrágica Crimeana-Congo, <i>Ehrlichia</i> spp.,...
<i>Hyalomma scupense</i>	Europa, Asia y norte de África	Endófila. 1-2 hospedadores	Grandes ungulados	<i>Theileria</i> spp., <i>Coxiella burnetii</i> , <i>Rickettsia aeschlimannii</i> ,...
<i>Hyalomma lusitanicum</i>	Región mediterránea	Exófila. 3 hospedadores	Adultos en grandes mamíferos, inmaduros en lagomorfos	<i>Theileria</i> spp., <i>Coxiella burnetii</i> , <i>Francisella tularensis</i> ,...

Las especies exófilas de *Hyalomma* prefieren hábitats con clima mediterráneo, así como zonas más secas como estepas.

1.2.6. Especies de garrapatas presentes en Galicia

La comunidad autónoma gallega presenta notables diferencias climáticas y orográficas que pueden condicionar la presencia de unas especies u otras de garrapatas a lo largo de su geografía. No obstante, existe poca literatura científica respecto a cuáles se asocian a cada zona, e incluso a la totalidad de la comunidad. Una revisión reciente señala únicamente la presencia de cinco especies en la comunidad: *Dermacentor reticulatus*, *Dermacentor marginatus*, *Haemaphysalis punctata*, *Ixodes ricinus* y *Rhipicephalus sanguineus* s.l., sin descartar la presencia de otras (Estrada-Peña *et al.*, 2017). Otro más reciente, llevado a cabo sobre tres zonas diferenciadas climáticamente de Galicia determinó la presencia también de 5 especies, incluyendo *Ixodes ricinus*, *I. acuminatus*, *I. frontalis*, *Dermacentor marginatus* y *D. reticulatus* (Remesar *et al.*, 2019). No obstante, la inmensa mayoría de individuos recolectados en ambos estudios (hasta un 99,25%) pertenecían a *I. ricinus*, siendo el resto de especies halladas esporádicamente. De hecho, se tiene constancia de la abundancia de la especie *Ixodes ricinus*, relacionada con la elevada y creciente presencia de corzos en Galicia, que constituyen el hospedador principal en la región. Así, hasta el 83,1% de los corzos están parasitados (mayor porcentaje en primavera y menor en verano), con una media de 43±50 *I. ricinus*, principalmente adultos, aunque también fases inmaduras (Vázquez *et al.*, 2011). En efecto, el incremento de esta especie ha provocado elevaciones significativas durante los últimos años en la prevalencia de la enfermedad de Lyme en la zona, lo que ha desembocado en la elaboración de estudios para la identificación de especies de *Borrelia* en *I. ricinus* extraídas de corzos cazados. Los resultados obtenidos indican que el 6% de los *I. ricinus* están infectadas por diferentes especies de *Borrelia burgdorferi* s.l., contribuyendo a la expansión de la enfermedad de Lyme. No obstante, no se tiene claro aún el papel que juega el corzo en la epidemiología de la enfermedad, aunque la favorece indirectamente al permitir un mayor desarrollo de la garrapata vectora (Díaz *et al.*, 2019).

1.3. MÉTODOS DE CAPTURA DE GARRAPATAS

La mayoría de las garrapatas pasan aproximadamente un 97% de su tiempo al margen del hospedador (Needham y Teel, 1991). Por ello, para valorar la población de garrapatas presente en un área determinada es necesario llevar a cabo muestreos donde se capturen un número considerable para su posterior identificación. Los métodos en los que se basan dichos muestreos varían en función del comportamiento exófilo o endófilo de las especies de garrapatas que se pretenden estudiar. Los más empleados son:

- **Bandera:** método eficaz únicamente en el caso de garrapatas exófilas. Se basa en extender y arrastrar un paño de lino de extensión variable sobre la vegetación de la zona, simulando el paso de un hospedador y permitiendo que las garrapatas se adhieran a él. El paño está fijado a una vara de madera que se sujeta por uno de los extremos. De esta forma, en las áreas presumiblemente infestadas, las especies exófilas que están encaramadas a la hierba detectan

el paso del “hospedador” y se fijan a la tela gracias al órgano de Haller, que se sitúa en el extremo dorsal del primer par de patas y contiene una serie de setas especializadas que detectan minúsculas concentraciones de anhídrido carbónico, ácido láctico y ácido pelargónico, componentes de la respiración de los vertebrados o de sus secreciones cutáneas. Esto, permite al parásito orientarse en el ángulo adecuado (Figura 2) y prepararse para alcanzar al “hospedador” (Estrada-Peña, 2015b).



Figura 2. Hembra de *Dermacentor* spp. antes de pasar la bandera (a). Postura adoptada tras detectar a un posible hospedador con el órgano de Haller (b)

Después, las garrapatas se recogen de la bandera a intervalos de menos de 10 minutos para evitar que se desprendan cuando detecten que no se trata de un verdadero hospedador. Es un método sencillo, pero presenta algunos inconvenientes como la escasa cobertura vegetal abarcada dentro de un determinado sitio de estudio, el bajo rendimiento en la captura de especies de garrapatas cazadoras como *Hyalomma* spp. o *Amblyomma* spp. o la imposibilidad de utilizarlo los días de lluvia pues la vegetación húmeda moja la bandera y dificulta la captura de las garrapatas (Ginsberg y Ewing, 1989). Además, este método está fuertemente influenciado por la habilidad y velocidad en la marcha del operador, el tipo de vegetación (la tela se queda atrapada en la vegetación espinosa), la temperatura o el clima (Estrada-Peña *et al.*, 2017). De hecho, un aspecto fundamental a tener en cuenta al usar este método es la estación del año por la capacidad de muchas especies de entrar en invierno en un proceso conocido como diapausa, periodo de quiescencia hasta la existencia de condiciones ambientales favorables que eviten la deshidratación y el agotamiento energético (Estrada-Peña, 2015b). Asimismo, cabe destacar que las garrapatas no se distribuyen al azar incluso en hábitats adecuados, sino que tienden a agregarse, especialmente las larvas que nacen de lotes de huevos individuales lo cual puede alterar los resultados según la zona exacta de muestreo. Por último, una ventaja del método es que la recogida directa desde la

vegetación permite obtener garrapatas no ingurgitadas que son más fácilmente identificables por sus características morfológicas al no estar distorsionadas (Estrada-Peña *et al.*, 2017).

- Arrastre: método similar al anterior que consiste en caminar sobre la vegetación sujetando una manta permitiendo que las garrapatas se fijen para después recogerlas. La manta en este caso va fijada en los extremos de la barra sobre los que se atan unas cuerdas que va a sujetar y arrastrar el operador caminando delante. Es un método muy similar por lo que presenta las mismas ventajas e inconvenientes que el método anterior, aunque existe mayor riesgo de picadura para el operador. De hecho, muchas veces se utilizan ambos términos, bandera y arrastre, indistintamente. Se estima que tanto el arrastre como la bandera tienen una eficiencia de captura del 8% de la población de garrapatas existente en la zona muestreada (Sonenshine y Roe, 1993).
- Trampas con anhídrido carbónico CO_2 : se utiliza tanto para garrapatas exófilas como endófilas. Se basa en la detección, como se mencionó anteriormente, del anhídrido carbónico por parte del órgano de Haller de la garrapata y la posterior captura. Generalmente se utiliza hielo seco como fuente del CO_2 , aunque también se puede emplear una combinación de gaseosa caliente y ácido láctico diluido, a la que se puede adicionar feromonas (Estrada-Peña *et al.*, 2017). Estas fuentes se colocan en un contenedor perforado que contiene un metro cuadrado de tela blanca en su fondo para poder recoger las garrapatas. También se puede utilizar una tira adhesiva alrededor del hielo seco para que las garrapatas queden fijadas. Por cada trampa se puede llegar a muestrear 25 metros cuadrados de superficie vegetal o nidos y madrigueras en el caso de garrapatas endófilas. Además, si se recogen tras un tiempo específico se pueden obtener estimaciones de la abundancia. Utilizando este método se obtiene un número significativamente mayor de garrapatas y menos variable que empleando la bandera (Wilson *et al.*, 1972). No obstante, existen diferencias en función de las especies capturadas, siendo manifiestamente mejor la captura de garrapatas cazadoras (*Amblyomma* spp. o *Hyalomma* spp.) por el método del CO_2 (Ginsberg y Ewing, 1989). Otra ventaja frente al método de la bandera es que se pueden muestrear zonas con vegetación espinosa (Bryson *et al.*, 2000). Asimismo, mediante este método se capturan más ninfas que mediante el método de la bandera si bien se recolectan menos larvas debido al diferente potencial de movilidad de ambos estadios (Petry *et al.*, 2010).

Una vez capturadas las garrapatas se deben llevar al laboratorio para su correcta identificación tanto morfológica como molecular. Por ello, una correcta conservación de los especímenes parasitarios es esencial ya que así se evitan deformaciones que puedan alterar ciertos aspectos morfológicos claves; además, también permite preservar el ADN en caso de realizar técnicas moleculares. En este sentido, se ha comparado el efecto de ocho métodos de almacenamiento en la

preservación del ADN y se ha concluido que todos los tratamientos basados en etanol muestran muy buenas habilidades de recuperación de ADN, mientras que el almacenamiento en seco es menos exitoso (Corriveau *et al.*, 2010).

2. OBJETIVOS

1. Determinar la diversidad de las poblaciones de garrapatas exófilas presentes en la comunidad autónoma de Galicia.
2. Comparar la identificación morfológica de las garrapatas con los resultados obtenidos con técnicas moleculares.
3. Valorar la influencia de la zona bioclimática sobre la presencia de las distintas especies.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

En este apartado se señala el número y procedencia de las muestras recogidas, así como las técnicas utilizadas para la identificación de las diferentes especies de garrapatas recogidas.

3.1. ZONAS MUESTREADAS

Este estudio se realizó en Galicia, región que presenta un clima atlántico caracterizado por precipitaciones abundantes y temperaturas suaves, lo que conforma una flora característica similar a otras regiones septentrionales españolas donde predominan bosques caducifolios de robles, castaños, etc. Sin embargo, este tipo de catalogación es muy simplista y no recoge las distintas regiones bioclimáticas en que se subdivide internamente esta comunidad autónoma, pues Galicia exhibe una orografía compleja con variaciones climatológicas propias de la altura, pendiente, etc., así como una importante influencia marítima, con un efecto atenuante de las temperaturas según se recorta la distancia al mar. Todo ello va a condicionar la presencia de varias microzonas climáticas con diferentes características pluviales y termométricas que derivan en un tipo de capa vegetal concreta. Esta asociación entre características climáticas y vegetación resultante genera tramos

altitudinales específicos denominados termotipos (Rodríguez y Ramil-Rego, 2007). En Galicia se han descrito 5 termotipos diferentes, algunos con subtipos:

- **Termotemplado:** se caracteriza por bosques caducifolios con elementos mediterráneos esclerofilos y laurifolios. Algunas especies que pueden estar presentes son el algarrobo (*Ceratonia siliqua*), los cítricos, algunos helechos (*Davallia canariensis*), el laurel (*Laurus nobilis*), el olivo (*Olea europaea*), etc. En Galicia es especialmente frecuente en zonas costeras, penetrando a través de los valles fluviales.



Figura 3. Termotipo termotemplado. Zonas de muestreo en Sada (a) y Fragas do Eume (b)

- **Supratemplado:** contiene bosques caducifolios, a veces mixtos, con alguna conífera. Se pueden encontrar abedules (*Betula celtiberica*), avellanos (*Corylus avellana*), hayas (*Fagus sylvatica*), sabinas (*Juniperus thurifera*), etc. En Galicia se restringe únicamente a cotas altas, a partir de 900-1000 metros.



Figuras 4. Termotipo supratemplado; zona de muestreo de Viana do Bolo (a) y A Mezquita (b)

- **Mesotemplado:** presenta bosques caducifolios de robles (*Quercus robur*) y fresnos (*Fraxinus excelsior*). Además, es frecuente encontrar avellanos (*Corylus hispanica*), helechos (*Polystichum setiferum*), encinas (*Quercus ilex*), etc. Es el más ampliamente distribuido por

Galicia y se puede subdividir en inferior y superior. El primero se sitúa inmediatamente por encima del termotemplado hasta los 700 metros, mientras el segundo comienza en 700 metros hasta cerca de 1000.



Figura 5. Termotipo mesotemplado inferior; zona de muestreo de O Xurés (a y b). Termotipo mesotemplado superior; zona de muestreo de Chandoiro (c)

- Mesomediterráneo: generalmente maquias de coscoja y lentisco, encinares, alcornoques y bosques caducifolios en zonas húmedas o de vaguadas. En Galicia se ciñe al valle del río Sil.

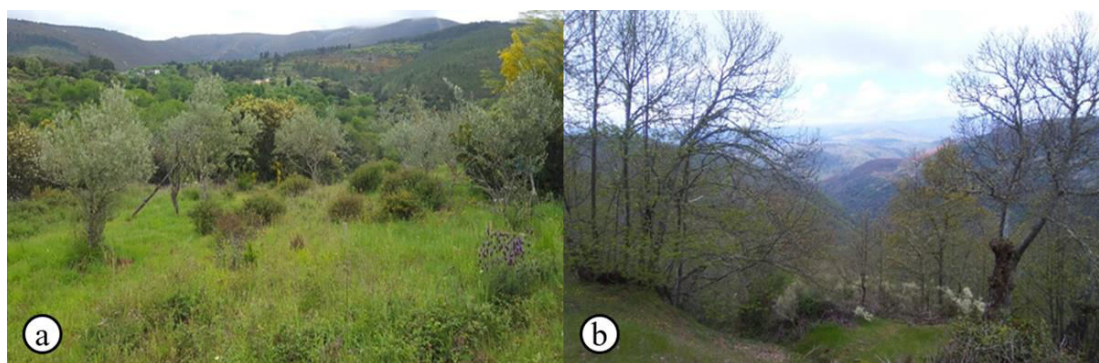


Figura 6. Termotipo mesomediterráneo.; zona de muestreo de Quiroga (a) y O Bolo (b)

- Orotemplado: se caracteriza por bosques de coníferas y formaciones arbustivas de coníferas. Se pueden encontrar abetos (*Abies alba*), heno (*Deschampsia flexuosa*), enebros (*Juniperus*

nana), pinos negros (*Pinus uncinata*), etc. Ocupa escasa superficie al estar presente exclusivamente en las zonas más elevadas de la comunidad gallega restringiéndose a los macizos montañosos de mayor altitud.

No obstante, existen amplias zonas geográficas en Galicia, englobadas dentro de dichos termotipos, en las que se ha sustituido la vegetación autóctona por plantaciones, principalmente de eucalipto blanco (*Eucalyptus globulus*), lo que provoca una alteración del medio que puede afectar a la flora y fauna que se desarrolla.

Como se mencionó anteriormente, la distribución geográfica de las distintas especies de garrapatas está condicionada por diversos factores como son las características climatológicas, la cubierta vegetal o la presencia de hospedadores adecuados. Por ello, con objeto de valorar tanto la diversidad de especies de garrapatas presentes, como la influencia de algunos factores como la vegetación sobre ellas, durante los meses de abril y mayo de 2019 se realizaron 26 muestreos en las cuatro provincias gallegas (Tabla 7), tratando de incluir localizaciones en los cuatro principales termotipos señalados en Galicia (Figura 7). Las zonas se geolocalizaron mediante el sistema GPS, recogiendo, en cada punto de muestreo, datos de longitud, latitud y altitud.

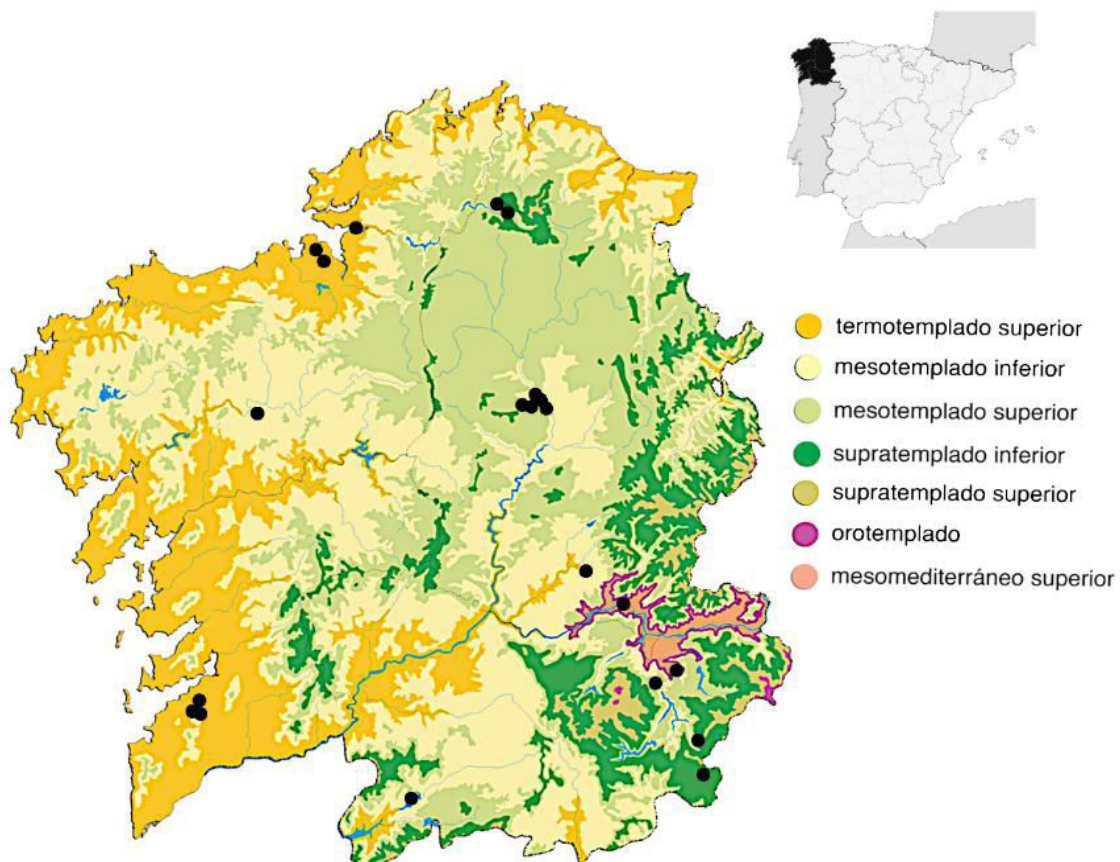


Figura 7. Mapa de termotipos en Galicia, donde se representan las zonas muestreadas (puntos negros) (modificado de Rodríguez y Ramil-Rego, 2007)

Tabla 7. Características de las zonas donde se recogieron especímenes de garrapatas

Termotipo	Municipio	Altitud (m)	Zona
Mesotemplado inferior	Lugo	465	Canil
	Lugo	465	Carballeira
	Lugo	465	Periurbano
	Lugo	460	Periurbano
	Lugo	453	Ribera río Rato
	Santiago	570	Periurbano
	Santiago	570	Periurbano
	Pobra de Brollón	385	Camino rural
	Lobios	588	Ruta senderista O Xurés
O Bolo	651	Camino rural Chandoiro	
Termotemplado superior	Vigo	310	Periurbano
	Vigo	310	Periurbano
	Vigo	310	Periurbano
	Vigo	285	Monte Beade
	Vigo	430	CUVI
	Vigo	437	Eucaliptal
	Vigo	433	Pinar
	Sada	87	Eucaliptal
	Sada	65	Ribera carretera
	Cabanas	92	Fragas do Eume
Mesomediterráneo superior	Quiroga	374	Camino rural
	O Bolo	883	Camino rural
Supratemplado inferior	Viana do Bolo	918	Camino rural
	Muras	853	Parque eólico
	Muras	832	Ribera Carretera
	A Mezquita	1023	Camino rural

Se eligieron los meses de abril y mayo por ser la época del año con mayores poblaciones de garrapatas activas evitando la diapausa, lo que facilita recoger un mayor número de ellas, tal y como se había señalado previamente en Galicia (Remesar *et al.*, 2019).

3.2. TOMA DE MUESTRAS

Para recoger las garrapatas exófilas presentes en la vegetación, se empleó el método de la bandera, extendiendo un paño de lino de 1x1 metros sobre la vegetación de la zona, simulando el paso de un hospedador y permitiendo la fijación de las garrapatas (figura 8a). Se evitaron los días de lluvia pues la vegetación húmeda moja la bandera y dificulta la captura de las garrapatas. Los muestreos tuvieron una duración de 50 minutos y se realizaron siempre por las mismas dos personas; las garrapatas se recogieron de la bandera a intervalos de 2-3 minutos (figura 8b) y se

depositaron en un bote hermético con etanol al 70% para evitar su deshidratación. Posteriormente, las garrapatas se llevaron al laboratorio, donde se identificaron en las 24 horas posteriores a su recogida.



Figura 8. La técnica del bandereo consiste en pasar una tela de lino sobre la vegetación, donde se adhieren las garrapatas (a); la bandera se comprobó cada 2-3 minutos y las garrapatas adheridas se recogieron manualmente (b)

3.3. IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA

En el laboratorio, las garrapatas se identificaron hasta nivel de especie y estadio de desarrollo mediante la observación de diferentes características morfológicas distintivas. Inicialmente, se estableció el género de la garrapata y el estadio de desarrollo en función de los aspectos anatómicos propuestos por Bowman (2014) anteriormente señalados (apartado 1.2.). Posteriormente, se llevó a cabo la identificación específica dentro del género empleando las claves anatómicas descritas por Estrada-Peña *et al.* (2017), intentando encontrar características diferenciables destacables.

3.4. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR

Cuando se realiza la identificación en función de las características morfológicas, se observa que existen especies muy similares, distinguiéndose exclusivamente por aspectos anatómicos menores subjetivos o variables, que pueden llevar a confusión e impiden determinar la especie de garrapata de forma fiable. Por ejemplo, algunas especies se distinguen por el número y longitud de las setas o por la forma de la abertura genital (en forma de “U” o “V”). Sin embargo, la reciente aplicación de técnicas moleculares ha permitido una identificación específica más fiable mediante el estudio de la secuencia de diferentes genes de las garrapatas, como el que codifica para la subunidad ribosómica 16S (16S ARNr). Por ello, se seleccionaron un máximo de 2 especímenes de cada especie y estadio para su caracterización molecular de forma individual; en el caso de las larvas de *I. ricinus*, debido a su pequeño tamaño, se procesó una mezcla de 5 ejemplares para garantizar suficiente material genético. Inicialmente se extrajo el ADN de las garrapatas mediante

un kit comercial (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostics GmbH®, Mannheim, Alemania) usando el protocolo descrito por el fabricante:

1. Se depositó cada espécimen parasitario en un microtubo de 1,5 ml al que se añadió tampón fosfato salino (PBS) para eliminar el alcohol utilizado para la conservación de las garrapatas.
2. Transcurridas 24 horas, se eliminó el PBS y se seccionó la garrapata en dos mitades con una hoja de bisturí estéril; a continuación, el ejemplar se introdujo en un nuevo microtubo de 1,5 ml con 200 μ l de tampón de lisis de tejidos y se homogeneizó con la ayuda de un micromortero, para exponer todos los tejidos de la garrapata y facilitar su digestión. Seguidamente, se añadieron 40 μ l de proteinasa K para romper las proteínas que están unidas al ADN (histonas) y se incubó a 55 °C durante 1 hora en un termobloque (Eppendorf Thermomixer C, Eppendorf, Alemania).
3. Al acabar la incubación se añadieron 200 μ l de tampón de unión, para permitir la adhesión de los ácidos nucleicos a las fibras de vidrio del filtro de alta pureza del tubo de filtración, y se incubó durante 10 min a 70 °C.
4. Se añadieron 100 μ l de isopropanol para provocar la precipitación del ADN, y tras homogenizar con vórtex, se pasó la muestra a través del tubo de filtración centrifugando a 7970 x g durante 1 minuto.
5. Se llevaron a cabo tres lavados con 500 μ l de tampón, el primero para eliminar inhibidores y los dos siguientes con tampón de lavado, centrifugando (7970 x g) sendas veces y cambiando el tubo colector para eliminar posibles restos de componentes celulares. Al terminar el último lavado se centrifugó a máxima velocidad durante 10 segundos.
6. Por último, se colocó el tubo de filtración en un nuevo microtubo de 1,5 ml y se añadieron 100 μ l de tampón de elución (debidamente precalentado a 70 °C antes de comenzar la reacción de purificación) para liberar los ácidos nucleicos de la fibra de vidrio. Se centrifugó a 7970 x g durante 1 minuto, se eliminó el filtro, y el ADN eluído se conservó a -20 °C hasta su análisis.

Una vez extraído el material genético se realizó la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación del ADN. En la reacción se amplificó un fragmento de aproximadamente 460 pares de bases del gen que codifica para la subunidad ribosómica 16S, empleando los cebadores y protocolos descritos por Norris, Klompen y Black en 1996. Para ello se emplearon 2 μ l de ADN junto con 2 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de dNTPs, 200 nM de cada uno de los cebadores y 2,5 unidades de Taq polimerasa en un volumen total de reacción de 50 μ l. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador (MyCycler, BioRad, Hercules, California, EE.UU.) sometiendo a la mezcla a una desnaturalización inicial de 1 min a 94 °C, seguida de 35

ciclos de 30 s a 94 °C (desnaturalización), 30 s a 47 °C (hibridación) y 35 s a 72 °C (hibridación) y una extensión final de 7 min a 72 °C.

Los fragmentos obtenidos tras la realización de la reacción de amplificación se sometieron a una electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1% en tampón TAE. Con este fin se depositaron 10 µl del producto de la PCR, junto con 2 µl de tampón de carga, y posteriormente se aplicó un voltaje de 100 V durante 40-60 min. El gel se visualizó en un analizador de imagen Fluor-S Multimager (BioRad, Hercules, California, EE.UU.). Las bandas de ADN se evidenciaron mediante tinción con un sustituto del bromuro de etidio (Red Safe®, REAL, Valencia, España).

La purificación de las muestras positivas y la determinación de la secuencia nucleotídica se realizó en la Unidad de Secuenciación y Análisis de fragmentos de la Universidad de Santiago de Compostela. Los productos de amplificación se secuenciaron en ambos sentidos utilizando el BigDye Terminator v3.1 kit (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.) y se leyeron en un secuenciador automático ABI-prism 3730xl (Applied Biosystems, Foster City, California, EE.UU.). Las secuencias obtenidas se examinaron y solaparon con el programa Chromas Pro v2.1.4. (Technelysium Pty Ltd., Tewantin, Australia). Finalmente, la identificación de las especies presentes se realizó mediante la comparación de las secuencias de ADN obtenidas con aquellas de especies de garrapatas depositadas en la base de datos del GenBank (National Center for Biotechnology Information, NCBI), usando la aplicación BLAST (Basic Local Alignment Search Tool; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Durante los 26 muestreos realizados se recogieron un total de 711 garrapatas de la vegetación pertenecientes a los géneros *Ixodes* (72,43%), *Rhipicephalus* (14,91%), *Dermacentor* (12,38%) y *Haemaphysalis* (0,28%). Siguiendo las claves de Estrada-Peña *et al.* (2017), se identificaron de forma fiable 6 especies. Sin embargo, en algunos ejemplares la identificación morfológica no resultó concluyente.

Ixodes ricinus fue una de las especies más comunes y de fácil identificación, pues presenta un capítulo alargado, así como un escudo tan largo como ancho. Además, muestran cornuas, aurículas y una espuela interna exclusivamente en la coxa 1 (Figura 9); esta espuela y la externa se visualizan con facilidad. En las ninfas y larvas las setas marginodorsales son más largas que las marginoventrales. En los machos, la existencia de una aurícula marcada formando un ángulo recto, una espuela interna de la coxa 1 de gran longitud y un surco anal entre placa anal y adanales

confirma la especie. Por último, en las hembras el palpoartículo 1 no dispone de espuela ventral y presentan setas por todo el cuerpo.

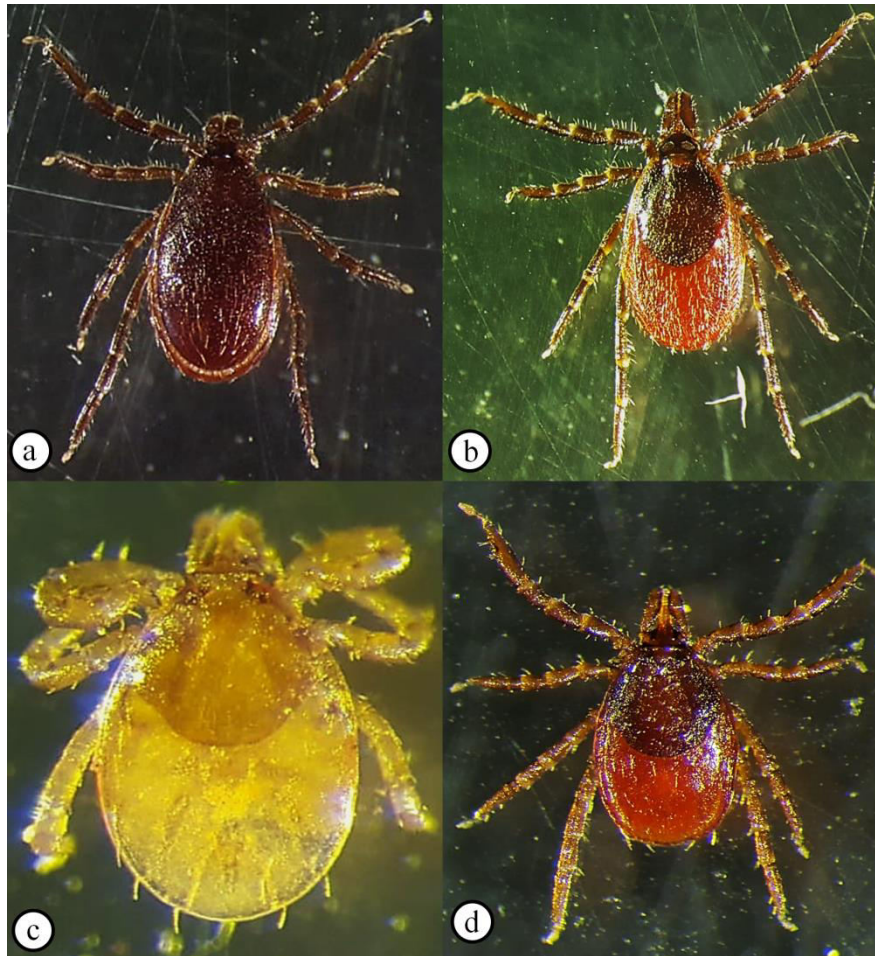


Figura 9. Macho (a), hembra (b), larva (c) y ninfa (d) de *Ixodes ricinus*. Se caracteriza por su capítulo alargado y su escudo casi esférico

Dentro del género *Ixodes* también se identificó un pequeño número de ninfas y hembras de *Ixodes frontalis*, anteriormente considerada endófila pero más recientemente reclasificada como exófila (Estrada *et al.*, 2017). Las ninfas se diferencian fácilmente por mostrar unas pequeñas proyecciones quitinosas en el capítulo, mientras que las hembras presentan una gran espuela externa y una interna de tamaño moderado, además de profusión de largas setas (Figura 10).



Figura 10. Ninfa (a) y hembra (b) de *Ixodes frontalis*. En comparación con *Ixodes ricinus* presentan un escudo más alargado y mayor cantidad de setas.

También se recogieron numerosos ejemplares adultos de *Dermacentor marginatus* (Figura 11), pues solo los machos y hembras tienen carácter exófilo. La identificación es sencilla, puesto que son de gran tamaño y presentan un capítulo corto y escudo ornamentado. Tanto machos como hembras presentan un capítulo más alargado que el de *Dermacentor reticulatus*, así como una primera coxa bífida con espuela externa corta y el palpoartículo 2 sin proyecciones ni espuela; además, las hembras muestran áreas porosas ovaladas y apertura genital toma forma de “ala”.

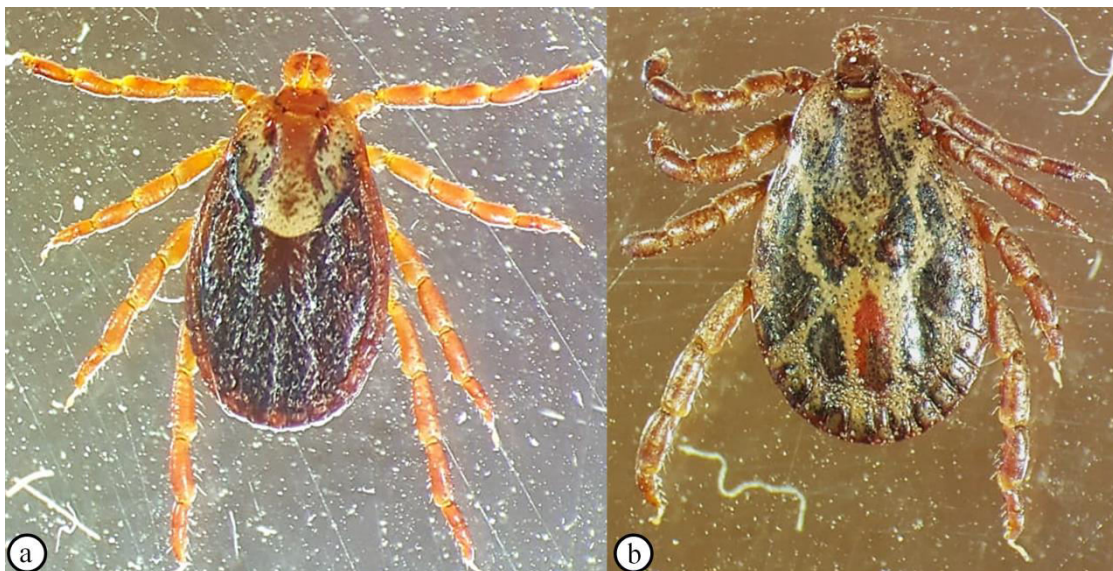


Figura 11. Hembra (a) y macho (b) de *Dermacentor marginatus* con su característico escudo ornamentado.

También se capturaron ejemplares de la otra especie de *Dermacentor* localizada en España, *Dermacentor reticulatus* (Figura 12). Se fijaron a la bandera solamente hembras y machos por ser también los únicos estadios exófilos, como en el caso anterior. Ambos estadios se diferencian de *D. marginatus* en la presencia de la primera coxa bífida con espuela externa larga y del segundo artículo con espuela. Las hembras de esta especie poseen áreas porosas redondeadas y apertura genital toma forma de “U”.



Figura 12. Hembra (a) y macho (b) de *Dermacentor reticulatus*, cuyo capitulum es más ancho que el de *D. marginatus*

También se hallaron dos ejemplares machos de *Haemaphysalis punctata* (Figura 13), que se caracterizan por la presencia de una expansión lateral pequeña y ausencia de espuela dorsal en el segundo palpoartículo y una punta no ganchuda en el tercer palpoartículo. Además, las cornuas son redondeadas y cortas, tiene 11 festones y la coxa 4 presenta una larga espuela interna. Por último, cabe resaltar su densa puntuación.



Figura 13. Macho de *Haemaphysalis punctata* con una base de capitulum rectangular

La última especie que se identificó de forma fiable fueron 2 hembras de *Rhipicephalus bursa* (Figura 14) procedentes del sur de Galicia y que se caracterizaron por áreas porosas separadas entre sí, escudo oscuro con parte posterior sinuosa y puntuaciones uniformes y profundas, ojos convexos y apertura genital en “V”. Además, los ángulos laterales de la base del capítulo están muy afilados.



Figura 14. Hembra de *Rhipicephalus bursa* con base del capítulo hexagonal

Sin embargo, se recogieron varios ejemplares cuya identificación morfológica hasta el taxón de especie supuso dificultades. Así, las características morfológicas de una hembra adulta de *Ixodes* no permitieron identificar de forma fiable la especie (Figura 15), dudando entre *Ixodes ventalloi* o *Ixodes festai*, ambas especies endófilas estrechamente relacionadas (Estrada-Peña *et al.*, 2017). Según las claves utilizadas, ambas especies presentan una espuela en la aurícula y en la parte ventral del primer palpoartículo 1, aunque en *I. ventalloi* es más sobresaliente que en *I. festai*. Esta característica es visiblemente insuficiente para concretar con fiabilidad la especie, por lo que la identificación de este ejemplar se completó con el empleo de técnicas moleculares.



Figura 15. Hembra de *Ixodes ventalloi/festai*, especie más pequeña que las anteriores del mismo género

Otros ejemplares mostraron características morfológicas compatibles con *Rhipicephalus sanguineus* s.l. y *Rhipicephalus turanicus* (Figura 16); de hecho, actualmente se debate su estrecha relación genética (Estrada-Peña, 2015a). La hembra de *Rhipicephalus sanguineus* s.l. presenta áreas porosas muy separadas, escudo pálido con parte posterior sinuosa, apertura genital en “U” y placas espiraculares compactas con cola corta, características similares a las que muestra el mismo estadio de *Rhipicephalus turanicus*. Además, el macho presenta fisuras laterales visibles, placas espiraculares con cola estrecha y placas adanales posteriores largas, mientras que la ninfa muestra palpos dirigidos levemente hacia el hipostoma y los quelíceros parecen más largos que el hipostoma, características que no son completamente diferenciales. En este sentido, Santos *et al.* (2011) han señalado que muchos de los especímenes identificados hasta el momento como *Rhipicephalus turanicus* son en realidad *Rhipicephalus sanguineus* s.l., concluyendo que la identificación morfológica de las especies incluidas en este género requiere de una revisión profunda.

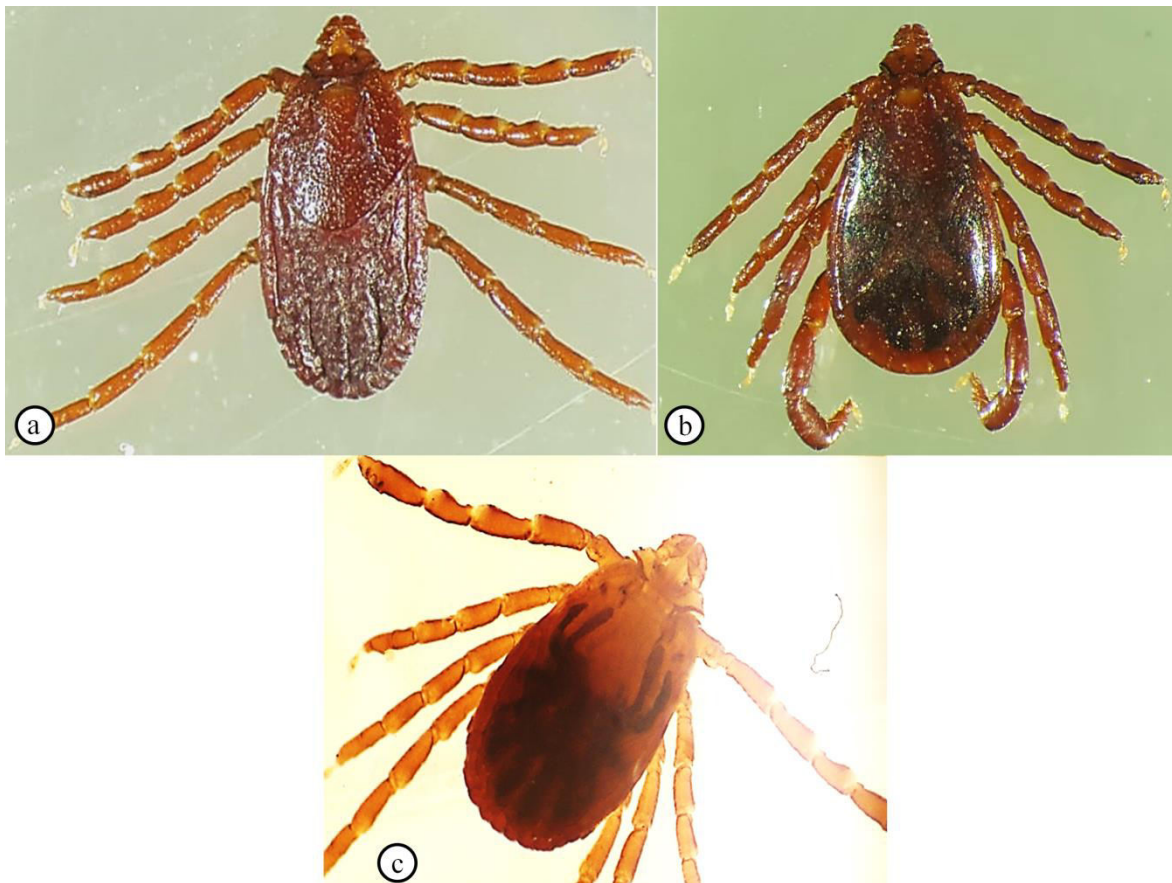


Figura 16. Hembra (a) macho (b) y ninfa (c) de *Rhipicephalus sanguineus* s.l.

Tras realizar la identificación morfológica y por los motivos anteriormente expuestos, se llevó a cabo la PCR de los especímenes seleccionados para su caracterización molecular, obteniéndose amplicones del tamaño esperado en todas las muestras (Figura 17). Las secuencias de los productos

de la PCR fueron legibles en todos los casos. El análisis de las secuencias permitió confirmar la identificación de 8 especies distintas de ixódidos en la vegetación de Galicia.

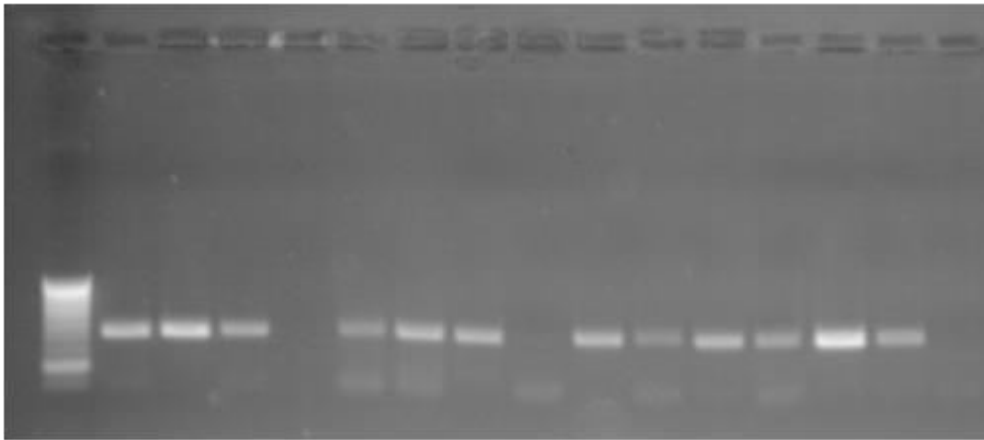


Figura 17. Lectura de la electroforesis horizontal en agarosa. Calle 1: marcador de pares de bases; calles 2-14: muestras; 15: control positivo; calle 16: control negativo

Tras comparar las secuencias obtenidas con las depositadas en la base de datos GenBank, se observó que sólo un 31,3% (5/16) de ellas fueron idénticas a las de referencia. El resto (68,8%; 11/16) fueron muy similares a las depositadas en el GenBank, observándose discrepancias de 1-4 nucleótidos, lo que se tradujo en una homología del 99% (Tabla 8).

En aquellos especímenes identificados morfológicamente como *I. ricinus*, las secuencias obtenidas a partir de una hembra adulta y de las larvas fueron idénticas a la MH645522 correspondiente a un macho de *I. ricinus* recogido de la vegetación en Galicia (Remesar *et al.*, 2019); además, la secuencia obtenida del macho mostró una transición (CxT) en la posición 407 con respecto a la MH645522. Por el contrario, la secuencia obtenida de la ninfa mostró dos transversiones TxA en las posiciones 187 y 188 (99% de homología) con la KR870982, procedente de un *I. ricinus* de Turquía (Orkun, 2018).

Con respecto a *I. frontalis*, la secuencia de la ninfa fue idéntica a la KJ414454, correspondiente a un *I. frontalis* recogido en Bélgica (Heylen *et al.*, 2014). Además, la secuencia de la hembra mostró una homología del 99% (inserción de una timina en la posición 64) respecto a la KP769862, procedente de una ninfa de *I. frontalis* recuperada de un mirlo común en las Azores (Literak *et al.*, 2015).

Todas las secuencias obtenidas de adultos identificados como *D. reticulatus* fueron idénticas a la obtenida (MH645514) a partir de garrapatas recogidas en Galicia por Remesar *et al.* (2019). Por el contrario, las obtenidas a partir de adultos de *D. marginatus* mostraron varias discrepancias con respecto a las de referencia; así, la secuencia de la hembra presentó una transición GxA en la posición 173 con respecto a la MH645513 obtenida de un *D. marginatus* recogido en Galicia

(Remesar *et al.*, 2019), mientras que el macho mostró una delección de una citosina en la posición 11 y una inserción de una adenina en la posición 200 con respecto a la secuencia KX555656 procedente de un ejemplar recogido de una oveja en China (Li *et al.*, no publicado).

Tabla 8. Comparación entre secuencias obtenidas y depositadas en GenBank).

Especie	Estadio	Secuencia comparativa	Identidad (%)	Coincidencias (pb)
<i>Dermacentor reticulatus</i>	hembra	MH645514.1	100	431/431
	macho	MH645514.1	100	431/431
<i>Dermacentor marginatus</i>	hembra	MH645513.1	99	437/438
	macho	KX555656.1	99	453/455
<i>Haemaphysalis punctata</i>	macho	MG021187.1	99	449/451
<i>Ixodes ricinus</i>	hembra	MH645522.1	100	445/445
	macho	MH645522.1	99	432/433
	ninfa	KR870982.1	99	443/445
	larva	MH645522.1	100	454/454
<i>Ixodes frontalis</i>	hembra	KP769862.1	99	435/436
	ninfa	KJ414454.1	100	456/456
<i>Rhipicephalus sanguineus s.l.</i>	hembra	JX997393.1	99	419/423
	macho	MG651945.1	99	437/439
	ninfa	MG651945.1	99	435/439
<i>Rhipicephalus bursa</i>	hembra	MG651932.1	99	435/437
<i>Ixodes ventalloi</i>	hembra	KY231931.1	99	441/442

La secuencia del macho de *Haemaphysalis punctata* presentó dos discrepancias con respecto a la depositada como MG021187 y correspondiente a un ejemplar de esa especie recogido de la vegetación en China (Song *et al.*, no publicado); así, se observó una transversión (CxA) en la posición 64 y una inserción de una adenina en la posición 443. Del mismo modo, una hembra identificada como *Rhipicephalus bursa* por sus características morfológicas mostró una homología del 99% con respecto a la secuencia MG651932 correspondiente a un ejemplar de esa especie recuperado de una oveja en China (Zhao y Liu, no publicado); las discrepancias se debieron a una transición TxC en la posición 47 y a una transversión AxT en la 345.

En aquellos ejemplares donde la identificación morfológica no resultó completamente fiable, el análisis de la secuencia de un fragmento del gen que codifica para la subunidad ribosómica 16S fue de gran utilidad. Así, la secuencia del ejemplar identificado como *I. ventalloi/festai* resultó casi idéntico al de un *I. ventalloi* procedente de España (KY231931; Estrada Peña *et al.*, 2018), pues se observó la inserción de una adenina en la posición 195 con respecto a la secuencia de referencia. Por el contrario, nuestra secuencia mostró una homología del 95% con la secuencia de *I. festai* (KU170522.1; Hornok *et al.*, 2016), mostrando 18 polimorfismos de nucleótidos. De todos modos, se debe considerar que la información disponible acerca de estas dos especies es muy limitada y

existen pocas secuencias depositadas, por lo que es de gran importancia alcanzar una correcta identificación morfológica antes de depositar las secuencias en la base de datos GenBank (Estrada-Peña *et al.*, 2017).

Por otro lado, el análisis de la secuencia de los ejemplares identificados como *Rhipicephalus sanguineus* s.l. / *Rhipicephalus turanicus* mostró que el macho y la ninfa presentaban 2 y 4 discrepancias con respecto a la secuencia MG651945 de *Rhipicephalus sanguineus* s.l. obtenida de una oveja en China (Zhao y Liu, no publicado). Además, la secuencia de una hembra mostró también 4 discrepancias con respecto a la secuencia JX997393 de un *Rhipicephalus sanguineus* s.l. procedente de España (Sanches *et al.*, no publicado). Sin embargo, las discrepancias fueron más numerosas (más de 25 SNP) cuando se comparó la secuencia con las depositadas como *Rhipicephalus turanicus*.

Por consiguiente, nuestros resultados indican que la identificación morfológica puede considerarse fiable para la mayor parte de las especies de garrapatas exófilas, si bien se debe realizar con prudencia en aquellas especies donde aún no se dispone de descripciones completas o cuyos aspectos anatómicos distintivos sean subjetivos o poco manifiestos. En estos casos es imprescindible la realización de técnicas moleculares que permitan una identificación de mayor fiabilidad aunque, como se comentó anteriormente, ésta depende de una adecuada identificación morfológica previa por parte del investigador que depositó la secuencia. Sin embargo, todas nuestras secuencias mostraron una coincidencia del 99-100% con las de una especie determinada, que coincidió con la identificada morfológicamente, mientras que se diferenciaban en decenas de pares de bases con las de otras especies, lo que aporta una mayor fiabilidad a nuestra identificación.

Considerando de forma conjunta los resultados de la identificación morfológica y molecular, se observó una notable diversidad en las poblaciones de garrapatas, pues se identificaron 8 especies diferentes (Tabla 9). Se apreció que la especie más frecuente fue *Ixodes ricinus* (70,60%), aunque también se halló un número considerable de ejemplares de *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (14,62%), *Dermacentor marginatus* (8,44%) y *Dermacentor reticulatus* (3,94%). Asimismo, las especies *Ixodes frontalis* (1,69%), *Rhipicephalus bursa* (0,28%), *Haemaphysalis punctata* (0,28%) e *Ixodes ventralloi* (0,14%) se encontraron de forma esporádica, hecho especialmente evidenciable en el caso de *Ixodes ventralloi* por tratarse de una garrapata endófila en todos sus estadios. Asimismo, en la mayoría de las especies identificadas, los adultos fueron el estadio más frecuente pues suelen ser los únicos que presentan comportamiento exófilo; *Ixodes ricinus* es la principal excepción, pues todos sus estadios son exófilos, lo que se tradujo en que el 80,5% de los ejemplares hallados fueron ninfas.

Tabla 9. Número de garrapatas recogidas de la vegetación en Galicia al considerar la especie y el estadio

Especie/Estadio	Larva	Ninfa	Hembra	Macho	TOTAL
<i>Ixodes ricinus</i>	20 (4,0%)	404 (80,5%)	41 (8,2%)	37 (7,4%)	502 (100%)
<i>Ixodes frontalis</i>	0	10 (83,3%)	2 (16,7%)	0	12 (100%)
<i>Ixodes ventalloi</i>	0	0	1 (100%)	0	1 (100%)
<i>Haemaphysalis punctata</i>	0	0	0	2 (100%)	2 (100%)
<i>Rhipicephalus bursa</i>	0	0	2 (100%)	0	2 (100%)
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	0	1 (0,9%)	57 (54,8%)	46 (44,2%)	104 (100%)
<i>Dermacentor marginatus</i>	0	0	41 (68,3%)	19 (31,7%)	60 (100%)
<i>Dermacentor reticulatus</i>	0	0	16 (57,1%)	12 (42,9%)	28 (100%)
TOTAL	20	415	160	116	711

Estos resultados están en consonancia con estudios previos realizados en Galicia en los que se señala la presencia de 7 especies, 6 de ellas (*Dermacentor marginatus*, *Dermacentor reticulatus*, *Ixodes ricinus*, *Ixodes frontalis*, *Rhipicephalus sanguineus* s.l., *Haemaphysalis punctata*) halladas en este trabajo, exceptuando así *Ixodes acuminatus*, especie endófila de la que sólo se ha capturado un único ejemplar (Estrada-Peña *et al.*, 2017 y Remesar *et al.*, 2019). Sin embargo, este estudio supone la primera cita en Galicia de dos especies de garrapatas: *Rhipicephalus bursa*, encontrada en la Sierra de O Xurés, la zona más meridional de la comunidad autónoma, e *Ixodes ventalloi*, garrapata endófila difícil de capturar por bandereo. Nuestros resultados coinciden con estudios previos realizados en Galicia que señalaban el predominio de la especie *Ixodes ricinus*, especialmente del estadio ninfal, tanto en la vegetación como en corzos (Vázquez *et al.*, 2011; Díaz *et al.*, 2017; Remesar *et al.*, 2019). La predominancia de esta especie en Galicia se relaciona con el clima húmedo y fresco de nuestra comunidad, pues *I. ricinus* necesita ambientes muy húmedos para poder sobrevivir (Estrada-Peña, 2001). Sin embargo, al comparar proporcionalmente, en dichos estudios se encontró mucha mayor cantidad de individuos de *Ixodes ricinus* respecto al resto de especies (99% frente a los 70,60% de este trabajo); no obstante, se debe señalar que estos estudios se llevaron a cabo en Lugo y no en el conjunto del territorio gallego por lo que la climatología y los factores condicionantes del desarrollo de la garrapata (hospedadores, vegetación,...) varían. De hecho, Lugo presenta, mayoritariamente, un termotipo mesotemplado caracterizado por bosques caducifolios con alta humedad y temperaturas suaves, condiciones favorables para el desarrollo de *Ixodes ricinus* (Estrada-Peña, 2001), que no están presentes de manera tan manifiesta en otros territorios de la comunidad. De esta forma, nuestros datos destacan la presencia de poblaciones más numerosas de otras especies (*Rhipicephalus sanguineus* s.l., *Dermacentor marginatus*, *Dermacentor reticulatus*) de lo que se había descrito hasta el momento, quizás por las características de las zonas de muestreo elegidas en el resto de estudios, que muchas

veces se corresponden con garrapatas extraídas de corzos o capturadas únicamente de bosques caducifolios húmedos y frescos, hábitat preferente de *Ixodes ricinus* (James *et al.*, 2014).

Con respecto al resto de territorios de España, se debe diferenciar entre el norte peninsular con un clima oceánico y el resto con un clima continental o mediterráneo. En el norte se han llevado a cabo diversos trabajos en los que se pone de manifiesto la sintonía existente con la región gallega, al primar *Ixodes ricinus* frente al resto de especies. Así, Barral *et al.* (2002) muestrearon por bandereo diferentes zonas del País Vasco y determinaron que de las 7835 garrapatas capturadas, 4399 (56,15%) pertenecían a la especie *Ixodes ricinus*, mientras que 3357 (42,85%) se correspondían con *Haemaphysalis punctata*; otras especies se encontraron de forma esporádica. Otros estudios realizados en la misma región por Barandika *et al.* (2008) y Gil *et al.* (2005) señalaron resultados similares, pues el porcentaje de *Ixodes ricinus* recogidas varió entre el 66,56% y prácticamente el 100%, respectivamente. Otros estudios realizados en Asturias apoyan las mismas conclusiones, llegando a suponer *Ixodes ricinus* el 73% de las garrapatas capturadas (Ruíz-Fons *et al.*, 2012; Asensi *et al.*, 1993).

Por el contrario, los resultados son muy diferentes en otras regiones del centro y sur de España, tanto al considerar las especies presentes como su importancia. Así, en Castilla-La Mancha Fernández *et al.* (2013) no encontraron *Ixodes ricinus* entre las 148 garrapatas recogidas de la vegetación, mientras que fueron abundantes las poblaciones de *Rhipicephalus sanguineus* (27,70%), *Hyalomma marginatum* (22,50%), *Rhipicephalus bursa* (17,57%), *Rhipicephalus turanicus* (10,14%), *Dermacentor marginatus* (8,11%), *Hyalomma lusitanicum* (7,43%), *Rhipicephalus pusillus* (5,41%) y *Haemaphysalis punctata* (1,35%). Igualmente, Ruíz-Fons *et al.* (2006) estudiaron las especies de garrapatas que parasitaban a 431 ciervos rojos (*Cervus elaphus*) en España y encontraron que, de las 4461 garrapatas recogidas, la mayoría pertenecían a *Hyalomma marginatum* (63.7%), *Rhipicephalus annulatus* (7.9%) y *R. bursa* (7.5%). En menor medida se recogieron también *Ixodes ricinus* (3.7%), *Hy. lusitanicum* (2.3%), *Haemaphysalis concinna* (1%), *R. pusillus* (0.8%), *H. punctata* (0.3%), *Dermacentor marginatus* (0.2%) y *H. sulcata* (0.02%). De la misma manera, Toledo *et al.* (2009) determinaron, tras recoger 1480 garrapatas, que *Ixodes ricinus* apenas aparecía en la zona centro de España y que *Hyalomma lusitanicum* era la especie más frecuente (54%), seguida de *Dermacentor marginatus* (23%) y *Rhipicephalus sanguineus* (10%).

Todos estos resultados demuestran que la diversidad de garrapatas y sus poblaciones difieren en función del clima predominante y su vegetación asociada, así como por la presencia de hospedadores adecuados. Así, las notables variaciones de las condiciones climáticas presentes en zonas del norte y centro-sur de España condicionan el desarrollo y supervivencia de las diferentes especies de garrapatas provocando que en el norte peninsular la especie más frecuente sea *Ixodes ricinus* por cumplir dicha zona con sus altos requerimientos higrométricos gracias a la densa

cubierta vegetal (James *et al.*, 2014), mientras que en el sur y centro aparecen otras distintas. De hecho, Barandika *et al.* (2011) llevaron a cabo muestreos que abarcaban zonas norte y sur y afirmaron que la especie más frecuente septentrionalmente era *Ixodes ricinus* (67%) seguida de *Haemaphysalis punctata*, mientras que meridionalmente destacaba por su frecuencia *Hyalomma lusitanicum* (86%) y *Dermacentor marginatus* (12%).

Por otro lado, teniendo en cuenta los cuatro termotipos principales presentes en el territorio gallego se pueden extraer algunos datos en cuanto a la distribución y abundancia de las especies. *Ixodes ricinus* fue la garrapata más abundante en todos los termotipos (superando en todos los casos el 60% de los especímenes recogidos), siendo menos abundante en la zona mesomediterránea y especialmente abundante en la zona supratemplada (Tabla 10). De hecho, como se ha resaltado anteriormente, está ampliamente demostrado que *Ixodes ricinus* es la especie de garrapata más importante en las zonas templadas de Europa (Estrada-Peña, 2001), mientras que en España su distribución se delimita a aquellas zonas donde la temperatura es menor y la humedad relativa es elevada siendo más abundantes en el norte peninsular, encontrándose también en algunas montañas del interior de la península (Estrada-Peña *et al.*, 2004a). Su hábitat principal son los bosques caducifolios del norte de España, aunque puede encontrarse en zonas de vegetación abierta si estas mantienen una humedad elevada a nivel de la vegetación (James *et al.*, 2014), lo cual explica su máxima abundancia en la zona supratemplada, que cumple con sus elevadas exigencias higrométricas. Por el mismo motivo, ciertos bosques como los bosques de eucalipto no son un hábitat adecuado para esta garrapata, ya que aunque la humedad ambiental pueda ser elevada, estos árboles producen sustancias que acidifican y desecan el suelo provocando elevadas tasas de mortalidad (Estrada-Peña, 2015b). Esto podría explicar porqué el clima mesomediterráneo caracterizado por la presencia de heladas en invierno y temperaturas elevadas en verano dificultaría la supervivencia de esta garrapata, aunque si la zona presenta una altitud elevada se podrían mantener los niveles de humedad requeridos por *I. ricinus* incluso durante el verano, situación que explicaría porque esta garrapata es abundante en zonas de muestreo como O Bolo. También explicaría porque en los eucaliptales y pinares muestreados no se encontraron prácticamente garrapatas de la especie *Ixodes ricinus*. Además, existen numerosos estudios que asocian la distribución de esta garrapata con la distribución de los cérvidos silvestres, sus principales hospedadores de mantenimiento (Hofmeister *et al.*, 2017). El corzo es el cérvido silvestre más abundante en el norte peninsular y aunque la distribución de este ungulado se ha extendido durante los últimos años, es más abundante en las zonas boscosas con estrato herbáceo del este y sur de Galicia especialmente en las provincias de Lugo y Ourense (Palomo *et al.*, 2007) distribución que coincide con las áreas muestreadas en las que se detectó esta especie de garrapata.

Tabla 10. Especies de garrapatas capturadas en la vegetación de Galicia en función del termotipo

	Mesotemplado	Termotemplado	Mesomediterráneo	Supratemplado
<i>Ixodes ricinus</i>	172 (61,21%)	97 (69,29%)	45 (67,16%)	188 (84,3%)
<i>Ixodes frontalis</i>	8 (2,85%)	2 (1,43%)	2 (2,99%)	0
<i>Ixodes ventalloi</i>	0	1 (0,71%)	0	0
<i>Haemaphysalis puctata</i>	0	2 (1,43%)	0	0
<i>Rhipicephalus bursa</i>	2 (0,71%)	0	0	0
<i>Rhipicephalus sanguineus s.l.</i>	71 (25,27%)	23 (16,43%)	10 (14,93%)	0
<i>Dermacentor marginatus</i>	15 (5,34%)	11 (7,86%)	10 (14,93%)	24 (10,76%)
<i>Dermacentor reticulatus</i>	13 (4,63%)	4 (2,86%)	0	11 (4,93%)

En el presente estudio, *D. reticulatus* comparte hábitat con *I. ricinus* en casi el 50% de las áreas de muestreo en las que se detectó esta última especie; esto no resulta llamativo ya que algunos autores han indicado que ambas garrapatas requieren condiciones climáticas similares, aunque, por lo general, *D. reticulatus* es menos sensible al frío y más sensible a la desecación que *I. ricinus* (Siuda, 1995). Esto explicaría la ausencia de esta garrapata en la zona mesomediterránea y en determinadas zonas donde sí se encontró *I. ricinus*. De hecho, el hábitat de *D. reticulatus* son los espacios abiertos como los pastizales y matorrales templados con elevadas humedades relativas cubiertos por arbustos y zonas boscosas (Estrada-Peña *et al.*, 2017) y, al contrario que *I. ricinus*, los principales hospedadores de los individuos adultos son los carnívoros silvestres (Nosek, 1972). En España, por el contrario, *D. marginatus* presenta una distribución más amplia que *D. reticulatus* siendo abundante en valles, zonas de arbustos y bosques de frondosas, no siendo tan dependiente de la humedad ambiental como lo son *I. ricinus* o *D. reticulatus* (Kolonin, 2009); esto explicaría su presencia en todos los termotipos analizados y especialmente en el clima mesomediterráneo en el que se observa la mayor cantidad porcentual de la especie al no ser desplazada por las otras con mayores requerimientos higrométricos, así como en zonas de muestreo como pinares o vegetación más seca. Esta garrapata parece presentar preferencia por altitudes de entre 800 y 1.000 metros (Darvishi *et al.*, 2014), aspecto reflejado en su mayor abundancia en las zonas supratempladas de Galicia. Además, sus hospedadores preferentes son los ungulados silvestres tanto cérvidos como suídos, estos últimos presentan una mayor distribución en el oeste de Galicia que los corzos (Palomo *et al.*, 2007) y dónde las poblaciones de *I. ricinus* son, por lo tanto, menos abundantes. Es importante tener en cuenta que solamente los adultos del género *Dermacentor* spp. presentan comportamiento exófilo por lo que son los únicos estadios susceptibles de recogerse empleando la técnica del bandereo. Esta podría ser la razón por la que ambas especies, aún cuando una de ellas presenta una distribución similar a *I. ricinus*, es mucho menos abundante que esta última garrapata.

Rhipicephalus sanguineus s.l. es una garrapata adaptada a vivir incluso en zonas de interior y en lugares cercanos a núcleos de población, por lo que se le atribuye un ciclo peridoméstico

pudiéndose alimentar ocasionalmente de humanos y otros animales como gatos y roedores (Dantas-Torres, 2010; Estrada-Peña, 2015a). De este modo, su distribución respondería más a la presencia de núcleos de población cercanos que a unas condiciones climáticas concretas, ya que todas las garrapatas de esta especie se capturaron en zonas periurbanas o en caminos rurales próximos a viviendas. Esta especie no se detectó en el termotipo supratemplado, sin embargo, ninguna de las áreas de muestreo englobadas en este termotipo se encontraba cerca de núcleos de población, lo que explicaría su ausencia.

Aunque tradicionalmente se consideraba una especie con comportamiento endófilo, *I. frontalis* es una garrapata exófila que se alimenta principalmente de pájaros y se suele encontrar en sus nidos o en zonas de vegetación próximas a éstos (Estrada-Peña *et al.*, 2017). Sin embargo es una especie que raramente se captura mediante bandereo (Heylen *et al.* 2014). Su hábitat preferente son las zonas boscosas templadas (Guglielmone *et al.*, 2014), aunque puede vehicularse de una zona a otra por aves migratorias (Poupon *et al.* 2006), lo que daría lugar a una distribución desigual.

Otras especies como *Ixodes ventalloi*, *Haemaphysalis punctata* y *Rhipicephalus bursa* se capturaron de manera ocasional, por lo que no es posible establecer relaciones asociativas con un termotipo concreto. *Haemaphysalis punctata* presenta un amplio rango de hospedadores y, en general, tiene bastante facilidad para adaptarse a zonas climáticas muy distintas, presentando una distribución muy amplia (Estrada-Peña *et al.*, 2017). Por este motivo, resulta sorprendente el reducido número de ejemplares capturados en este estudio, lo que podría explicarse si otras especies con más exigencias ambientales la hubieran desplazado de su hábitat. *Rhipicephalus bursa* es una garrapata asociada principalmente a granjas de ovejas y cabras, presentando un comportamiento entre endófilo y exófilo, por lo que solo se captura ocasionalmente mediante bandereo (Estrada-Peña, 2015b). Por el contrario *I. ventalloi* es una garrapata endófila asociada principalmente a conejos, aunque puede alimentarse de micromamíferos y pequeños carnívoros, por este motivo es difícil capturarla mediante bandereo (Estrada-Peña, 2017).

5. CONCLUSIONES

1. Aunque nuestros resultados indican que la identificación morfológica de garrapatas es fiable para la mayor parte de las especies exófilas, existen especies que se distinguen únicamente por caracteres anatómicos confusos o escasamente manifiestos.
2. Las técnicas moleculares permiten completar o confirmar la identificación morfológica, aunque se debe realizar un análisis cuidadoso con las secuencias depositadas en la base de datos GenBank.

3. La diversidad de especies de garrapatas en Galicia fue alta pues se identificaron 8 especies distintas.

4. *Ixodes ricinus* es la garrapata exófila predominante en la vegetación de Galicia. En menor proporción, se hallaron *Rhipicephalus sanguineus* s.l., *Dermacentor marginatus*, *Dermacentor reticulatus* e *Ixodes frontalis*. Otras especies como *Haemaphysalis punctata*, *Rhipicephalus bursa* e *Ixodes ventraloi* se hallaron de forma ocasional. Este estudio supone la primera cita de estas dos últimas especies en Galicia.

5. *Ixodes ricinus* y *Dermacentor marginatus* son las especies más ampliamente distribuidas al hallarse en los 4 principales termotipos estudiados. Por sus altos requerimientos higrométricos, *Ixodes ricinus* y *Dermacentor reticulatus* fueron especialmente frecuentes en la zona supratemplada; por su parte, *Dermacentor marginatus*, con una mayor resistencia a la desecación, se identificó con mayor frecuencia en el área mesomediterránea.

6. *Rhipicephalus sanguineus* s.l. se localizó preferentemente en zonas periurbanas independientemente de la climatología y vegetación. El resto de especies, mayoritariamente endófilas, se localizaron esporádicamente por lo que su presencia no se pudo asociar a un termotipo concreto.

6. REFERENCIAS

- Alonso-Carné, J., García-Martín, A. y Estrada-Peña, A. 2014. Modelling the phenological relationships of questing immature *Ixodes ricinus* (Ixodidae) using temperature and NDVI data. *Zoonoses and Public Health*, 63:40-52. DOI: 10.1111/zph.12203.
- Asensi, J. M., Martínez A. M. C., Guerrero, A., Asensi, V., Escudero, R., de la Iglesia, P. y Arribas, J. M. 1993. Estudio epidemiológico de la enfermedad de Lyme en Asturias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 11(8): 420-423.
- Barandika Iza, 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.

- Barandika Iza, J. F., Hurtado, A., García-Sanmartín, J., Juste, R. A., Anda, P. y García-Pérez, A. L. 2008. Prevalence of Tick-Borne zoonotic bacteria in questing adult ticks from northern Spain. *Vector borne and zoonotic diseases*, 8(6): 829-835. DOI: 10.1089/vbz.2008.0023.
- Barandika Iza, J. F., Olmeda, S. A., Casado-Nistal, M. A., Hurtado, A., Juste, R.A., Valcárcel, F., Anda, P. y García-Pérez, A. L. 2011. Differences in questing tick species distribution between atlantic and continental climate regions in Spain. *Journal of Medical Entomology*, 48(1): 13-19. DOI: 10.1603/ME10079.
- Barral, M., García-Pérez, A. L., Juste, R. A., Hurtado, A., Escudero, R., Sellek, R. E. y Anda, P. 2002. Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) ticks from de Basque Country, Spain. *Journal of Medical Entomology*, 39(1): 177-184. DOI: 10.1603/0022-2585-39.1.177.
- Bowman, D. D., 2014. *Georgis' Parasitology for Veterinaria*. Elsevier, ISBN 978-1-4557-4006-2, St. Louis (Missouri).
- Bryson, N.R., Horak, I.G., Venter, E.H. y Yunker, C.E. 2000. Collection of free-living nymphs and adults of *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae) with pheromone/carbon dioxide traps at 5 different ecological sites in heartwater endemic regions of South Africa. *Experimental and Applied Acarology*, 24(12): 971-982. DOI: 10.1023/A:1010639113793.
- Carrade, D. D., Foley, J. E., Borjesson, D. L. y Sykes, J. E. 2009. Canine granulocytic anaplasmosis: a review. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 23(6): 1129-1141. DOI: 10.1111/j.1939-1676.2009.0384.x.
- Rovero, C. y Raoult, D. 2008. Mediterranean spotted fever. *Infectious Disease Clinics of North America*, 22(3): 515-530. DOI: 10.1016/j.idc.2008.03.003.
- Corriveau, M., Uppstrom, K. y Klompen, H. 2010. Effect of eight storage modes on DNA preservation. *Trends in Acarology, Proceedings of the 12th International Congress*. Pp: 553-556. DOI: 10.1007/978-90-481-9837-5_95.
- Dantas-Torres, F. 2010. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & Vectors*, 3: 26. DOI: 10.1186/1756-3305-3-26.
- Darvishi, M. M., Reza Youssefi, M., Changizia, E., Shayan, P., Rostami Lima, R. y Taghi Rahimi. M. 2014. Biology of *Dermacentor marginatus* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4(1): 284-289.
- Díaz, P., Arnal, J. L., Remesar, S., Pérez-Creo, A., Venzal, J. M., Vázquez-López, M. E., Prieto, A., Fernández, G., López, C. M., Panadero, R., Benito, A., Díez-Baños, P. y Morrondo, P. 2017. Molecular identification of *Borrelia* spirochetes in questing *Ixodes ricinus* from northwestern Spain. *Parasites and Vectors*, 10: 615. DOI: 10.1186/s13071-017-2574-x.
- Díaz, P., Remesar, S., Venzal, J. M., Vázquez-López, E., Fernández, G., López, C., Díez-Baños, P., Morrondo, M. P. y Panadero, R. 2019. Occurrence of *Borrelia* and *Borrelia* species in

- Ixodes ricinus* collected from roe deer in northwestern Spain. Medical and Veterinary Entomology (en prensa). DOI: 10.1111/mve.12364.
- Estrada-Peña, A. 2001. Distribution, Abundance, and Habitat Preferences of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in Northern Spain. Journal of Medical Entomology, 38(3): 361-370.
- Estrada-Peña, A. 2015a. Garrapatas: Morfología, fisiología y ecología. Ed. Servet.
- Estrada-Peña, A. 2015b. Orden Ixodida: Las garrapatas. Revista Ibero Diversidad Entomológica, 13: 1-15. ISSN 2386-7183.
- Estrada-Peña, A., Martínez, J. M., Sanchez Acedo, C., Quilez, J. y Del Cacho, E. 2004a. Phenology of the tick, *Ixodes ricinus*, in its southern distribution range (central Spain). Medical Veterinary Entomology, 18(4): 387-97.
- Estrada-Peña, A., Bouattour, A., Camicas, J. L. y Walker, A. R. 2004b. Ticks of domestic animals in the Mediterranean Region: a guide to identification of species. Universidad de Zaragoza, ISBN: 84-96214-18-4, Zaragoza.
- Estrada-Peña, A., Venzal, J. M. y Sánchez Acedo, C. 2006. The tick *Ixodes ricinus*: distribution and climate preferences in the western Palaearctic. Medical and Veterinary Entomology, 20: 189-197.
- Estrada-Peña, A., Mihalca, A. D. y Petney, T. N. 2017. Ticks of Europe and North Africa: A Guide to Species Identification. Springer International Publishing AG, ISBN 978-3-319-63759-4, Cham (Switzerland). DOI: 10.1007/978-3-319-63760-0.
- Estrada-Peña, A., Venzal, J. y Nava, S. 2018. Redescription, molecular features, and neotype deposition of *Rhipicephalus pusillus* Gil Collado and *Ixodes ventalloi* Gil Collado (Acari, Ixodidae). Zootaxa. 4442(2):262-276. DOI: 10.11646/zootaxa.4442.2.4.
- Fernández de Mera, I.G., Ruíz-Fons, F., De la Fuente, G., Mangold, A.J., Gortázar, C. y De la Fuente, J. 2013. Spotted fever group Rickettsiae in questing ticks, central Spain. Emerging infectious diseases, 19(7):1163-1165. DOI: 10.3201/eid1907.130005.
- Gil-Collado, J., Guillén-Llera, J. L. y Zapatero-Ramos, L. M. 1979. Claves para la identificación de los Ixodoidea españoles (adultos). Revista Ibero Parasitología, 39:107-118.
- Gil, H., Barral, M., Escudero, R., García-Pérez, A. L. y Anda, P. 2005. Identification of a new *Borrelia* species among small mammals in areas of northern Spain where Lyme disease is endemic. Applied and Environmental Microbiology, 71(3): 1336-1345. DOI: 10.1128/AEM.71.3.1336-1345.2005.
- Ginsberg, H.S. y Ewing, C.P. 1989. Comparison of flagging, walking, trapping, and collecting from hosts as sampling methods for northern deer ticks, *Ixodes dammini*, and lone-star ticks, *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). Experimental Applied Acarology, 7: 313-322.

- Gray, J. S. 2007. *Ixodes ricinus* seasonal activity: Implications of global warming indicated by revising tick and weather data. *International Journal of Medical Microbiology*, 298: 19-24. DOI: 10.1016/j.ijmm.2007.09.005.
- Gray, J. S., Kahl, O., Lane, R. S., Levin, M. L. y Tsao, J. I. 2016. Diapause in ticks of the medically important *Ixodes ricinus* species complex. *Ticks Tick Borne Disease*, 7(5): 992-1003. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2016.05.006.
- Guglielmone, A. A., Robbins, R. G., Apanaskevich, D. A., Petney, T. N., Estrada-Peña, A. y Horak, I. G. 2014. *The hard ticks of the world*. Springer, Heidelberg.
- Heylen, D., De Coninck, E., Jansen, F. y Madder, M. 2014. Differential diagnosis of three common *Ixodes* spp. ticks infesting songbirds of Western Europe: *Ixodes arboricola*, *I. frontalis* and *I. ricinus*. *Ticks Tick-borne Disease*, 5: 693-700. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2014.05.006.
- Hofmeester, T.R., Sprong, H., Jansen, P.A., Prins, H.H.T. y van Wieren, S. 2017. Deer presence rather than abundance determines the population density of the sheep tick, *Ixodes ricinus*, in Dutch forests. *Parasit Vectors*, 19;10(1): 433. DOI: 10.1186/s13071-017-2370-7.
- Hornok, S., Flaisz, B., Takacs, N., Kontschán, J., Csorgo, T., Csipak, A., Jaksa, B. R. y Kovats, D. 2016. Bird ticks in Hungary reflect western, southern, eastern flyway connections and two genetic lineages of *Ixodes frontalis* and *Haemaphysalis concinna*. *Parasit Vectors*, 9(1): 101. DOI: 10.1186/s13071-016-1365-0.
- James, M. C., Gilbert, L., Bowman, A.S. y Forbes, K. J. 2014. The heterogeneity, distribution, and environmental associations of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the agent of lyme borreliosis, in Scotland. *Front Public Health*, 28(2): 129. DOI: 10.3389/fpubh.2014.00129.
- Jongejan, F. y Uilenberg, G. 2004. The global importance of ticks. *Veterinary Parasitology*, 129(S1): S3-S14. DOI: 10.1017/S0031182004005967.
- Jonsson, N. N. 2006. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Veterinary Parasitology*, 137(1-2): 1-10. DOI: 10.1016/j.vetpar.2006.01.010.
- Koch, H.G.; Sauer, J.R. 1984. Quantity of blood ingested by four species of hard ticks (Acari: Ixodidae) fed on domestic dogs *Annals of the Entomological Society of America*, 77(2): 142-146. DOI: 10.1093/aesa/77.2.142.
- Kolonin, G.V. 1995. Review of the Ixodid tick fauna (Acari: Ixodidae) of Vietnam. *Journal of Medical Entomology*, 32 (3): 276-282. DOI: 10.1093/jmedent/32.3.276.
- Latif, A. A. y Walker, A. R. 2004. An introduction to the biology and control of ticks in Africa. ICTTD-2 Project, 1-29.

- Li, H., Zhao, S., Wei, Q., Guo, L., Wang, Q., Liu, D., Wang, Y. y Chen, C. Potential risk of blood transfusion-transmitted *Brucella* and *Coxiella burnetii* among occupational population in highly prevalent edemic area. No publicado.
- Literak, I., Norte, A. C., Nuncio, M. S., Carvalho, I. L., Ogrzewalska, M., Martins, T. F., Sychra, O., Resendes, R. y Rodrigues, P. 2015. Ticks on passerines from Archipelago of the Azores and their role as reservoirs of borreliae and rickettsiae. *Ticks Tick Borne Diseases*, 6(5): 607-610. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2015.05.003.
- Moorhouse, D. E. 1973. On the morphogenesis of the attachment cement of some ixodid ticks. *Proceedings of the Third International of Acarology*, pp: 527-529. DOI: 10.1007/978-94-010-2709-0_100.
- Nava, S., Venzal, J. M., González-Acuña, D., Martins, T. F. y Guglielmone, A. A. 2017. *Ticks of the Southern Cone of America: Diagnosis, Distribution, and Hosts with Taxonomy, Ecology and Sanitary Importance*. Elsevier, ISBN 978-0-12-811075-1, London.
- Needham, G.R. y Teel, P.D. 1991. Off-host physiological ecology of ixodid ticks. *Annual Review of Entomology*, 36: 659-681. DOI: 10.1146/annurev.ento.36.1.659.
- Norval, R. A. 1990. The impact of pure infestations of *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma hebraeum* on the productivity of cattle and implications for tick control strategies in Africa. *Parassitologia*, 32(1): 155-163.
- Norris, D. E., Klompen, J. S., Keirans, J. E. y Black, W. C. 1996. Population genetics of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 16S and 12S genes. *Journal of Medical Entomology*, 33(1): 78-89.
- Nosek, J. 1972. The ecology and public health importance of *Dermacentor marginatus* and *D. reticulatus* ticks in Central Europe. *Folia Parasitology*, 19: 93-102.
- Orkun, O. 2018. Molecular characterization based on 16S rDNA phylogeny of some ixodid ticks in Turkey. *Journal Turkiye Parazitol Derg*, 42: 122-129.
- Oteo, J. A. y Portillo, A. 2012. Tick-borne rickettsioses in Europe. *Ticks and Tick-borne Disease*, 3(5-6): 271-278. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2012.10.035.
- Palomar, A. M., Portillo, A., Santibáñez, S., García-Álvarez, L., Muñoz-Sanz, A., Márquez, F. J., Romero, L., Eiros, J. M. y Oteo, J. A. 2017. Molecular (ticks) and serological (humans) study of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in the Iberian Peninsula, 2013-2015K. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 35(6):344-347. DOI: 10.1016/j.eimc.2017.01.009.
- Palomo, L.J., Gisbert, J. y Blanco, J.C. 2007. *Atlas y Libro Rojo de mamíferos terrestres de España*. Ministerio de medio ambiente, Dirección general para la biodiversidad Madrid.

- Petry, W.K., Foré, S.A., Fielden, L.J., Kim, H.J. 2010. A quantitative comparison of two sample methods for collecting *Amblyomma americanum* and *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) in Missouri. *Experimental and Applied Acarology*, 52: 427-438. DOI: 10.1007/s10493-010-9373-9.
- Pfeffer, M. y Dobler, G. 2011. Tick-borne encephalitis virus in dogs—is this an issue?. *Parasit vectors*, 4: 59. DOI: 10.1186/1756-3305-4-59.
- Poupon, M. A., Lommano, E., Humair, P. F., Douet, V., Rais, O., Schaad, M., Jenni, L. y Gern, L. 2006. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks collected from migratory birds in Switzerland. *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 976-979. DOI: 10.1128/AEM.72.1.976-979.2006.
- Remesar, S., Díaz Fernández, P., Venzal, J. M., Pérez-Creo, A., Prieto, A., Estrada-Peña, A., López, C. M., Panadero, R., Fernández, G., Díez-Baños, P. y Morrondo, P. 2019. Tick species diversity and population dynamics of *Ixodes ricinus* in Galicia (north-western Spain). *Ticks and Tick-borne Diseases*, 10(1): 132-137. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2018.09.006.
- Rodríguez Guitián, M. y Ramil-Rego, P. 2007. Clasificaciones climáticas aplicadas a Galicia: revisión desde una perspectiva biogeográfica. *Recursos Rurais, Instituto de Biodiversidade Agraria e Desenvolvimento Rural*, 1(3): 31-53. ISSN: 1885-5547.
- Ruíz-Fons, F., Fernández-de-Mera, I.G., Acevedo, P., Höfle, U., Vicente, J., De la Fuente, J. y Gortazar, C. 2006. Ixodid ticks parasitizing Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) and European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: Geographical and temporal distribution. *Veterinary parasitology*, 140(1-2): 133-142. DOI: 10.1016/j.vetpar.2006.03.033.
- Ruíz-Fons, F., Fernández de Mera, I. G., Acevedo, P., Gortazar, C. y de la Fuente, J. 2012. Factors driving the abundance of *Ixodes ricinus* ticks and the prevalence of zoonotic *I. Ricinus*-Borne pathogens in natural foci. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(8): 2669-2676. DOI: 10.1128/AEM.06564-11.
- Santos-Silva, M. M., Beati, L., Santos, A. S., De Sousa, R., Nuncio, M. S., Melo, P. y Bacellar, F. 2011. The hard-tick fauna of mainland Portugal (Acari: Ixodidae): an update on geographical distribution and known associations with hosts and pathogens. *Experimental and Applied Acarology*, 55(1): 85–121. DOI: 10.1007/s10493-011-9440-x.
- Schulz, M., Mahling, M. y Pfister, K. 2014. Abundance and seasonal activity of questing *Ixodes ricinus* ticks in their natural habitats in southern Germany in 2011. *Journal of Vector Ecology*, 39(1): 56-65.
- Sonenshine, D. E. y Roe, R. M. 2014. *Biology of ticks*. Volúmenes 1 y 2. Second Edition. Oxford University Press, ISBN 978-0-19-974405-3, ISBN 978-0-19-974406-0, New York.
- Song, J., Xiao, S., Wang, Y., Sheng, J., Wang, B., Yan, B., Xie, S., Wang, Q., Song, S., Jiang, M., Song, R. and Liu, X. 2017. Secuencia MG021187 de *Haemaphysalis punctata*, no publicado.

- Szabó, M. P. J., Mangold, A. J., João, C. F., Bechara, G. H. y Guglielmono, A. A. 2005. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. *Veterinary parasitology*, 130(1-2): 131-140. DOI: 10.1016/j.vetpar.2005.03.008.
- Toledo, A., Olmeda, A. S., Escudero, R., Jado, I., Valcárcel, F., Casado-Nistal, M. A., Rodríguez-Vargas, M., Gil, H. y Anda, P. 2009. Tick-borne zoonotic bacteria in ticks collected from central Spain. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 81(1): 67-74.
- Sanches, G. S., Mangold, A. J., Bechara, G. H. y Camargo-Mathias, M. I. 2012. Molecular phylogeny of *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus turanicus* strains. No publicado.
- Siuda, K. 1995. The review of data on the distribution of ixodida in Poland. In: Kropczynska, D., Boczek, J. y Tomczyk, A. (Eds.). *The Acari. Physiological aspects of Acari-host relationships*. 5a. Ed. European Association of Acarologist, pp: 698.
- Vázquez, L., Díaz, P., Panadero, R., Dacal, V., Pato, F. J., López, C., Arias, M. S., Fernández, G., Díez-Baños, P. y Morrondo, P. 2011. Tick infestation (Acari: Ixodidae) in roe deer (*Capreolus capreolus*) from northwestern Spain: population dynamics and risk stratification. *Experimental and Applied Acarology*, 53:399-409. DOI: 10.1007/s10493-010-9403-7.
- Uilenberg, G. 2006. *Babesia*- A historical overview. *Veterinary Parasitology*, 138(1-2): 3-10. DOI: 10.1016/j.vetpar.2006.01.035.
- Venzal Bianchi, J. M. 2008. Estudios sobre garrapatas y enfermedades transmitidas en Uruguay. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
- Walker, A. R., Bouattour, A., Camicas, J. L., Estrada-Peña, A., Horak, I. G., Latif, A. A., Pegram, R. G. y Preston, P. M. 2003. *Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species*. Bioscience Reports, ISBN 0-9545173-0-X, Edinburgh (Scotland).
- Wilson, J.G., Kinzer, D.R., Sauer, J.R. y Hair, J.A. 1972. Chemo-attraction in the lone star tick (Acarina: Ixodidae): I. Response of different developmental stages to carbon dioxide administered via traps. *Journal of Medical Entomology*, 9:245-252. DOI: 10.1093/jmedent/9.3.245
- Zhao, L. and Liu, Y. 2017. A survey of Ixodide ticks and tick-borne pathogens in Southern Xinjiang. No publicado.