



UNIVERSIDAD DE LEÓN
FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Sanidad Animal

TESIS DOCTORAL

**LAS GARRAPATAS EXÓFILAS COMO VECTORES DE
AGENTES ZONÓTICOS: ESTUDIO SOBRE LA
ABUNDANCIA Y ACTIVIDAD DE LAS GARRAPATAS EN LA
VEGETACIÓN, E INVESTIGACIÓN DE LA PRESENCIA DE
AGENTES PATÓGENOS EN GARRAPATAS Y
MICROMAMÍFEROS**



Memoria presentada por el Licenciado
Jesús Félix Barandika Iza para optar al
grado de Doctor en Veterinaria por la
Universidad de León

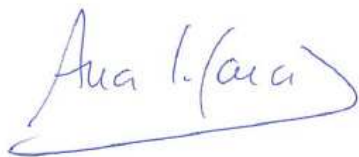
Mayo 2010

ANA L. GARCÍA-PÉREZ y ANA HURTADO ESGUEVA investigadoras del Departamento de Sanidad Animal de NEIKER- Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario,

INFORMAN:

Que el trabajo de tesis por artículos bajo el título: "LAS GARRAPATAS EXÓFILAS COMO VECTORES DE AGENTES ZONÓTICOS: ESTUDIO SOBRE LA ABUNDANCIA Y ACTIVIDAD DE LAS GARRAPATAS EN LA VEGETACIÓN, E INVESTIGACIÓN DE LA PRESENCIA DE AGENTES PATÓGENOS EN GARRAPATAS Y MICROMAMÍFEROS" presentado por D. JESUS FELIX BARANDIKA IZA para optar al grado de Doctor en Veterinaria, ha sido realizado bajo su dirección.

Para que conste, firmamos la presente a diecinueve de mayo de dos mil diez.



Fdo. Ana L. García-Pérez



Fdo. Ana Hurtado Esgueva

ESTE TRABAJO DE TESIS HA PODIDO LLEVARSE A CABO GRACIAS A LA FINANCIACIÓN DE:

Red Temática de Investigación Cooperativa del Fondo de Investigación Sanitaria (RETICS G03/057 y PI051873) (EBATRAG) 2003-2007



Proyecto UE GOCE-2003-010284 EDEN (www.eden-fp6project.net) 2004-2010



Departamento de Agricultura, Pesca y Alimentación del Gobierno Vasco



A mi familia

¡A todos aquellos para los que este trabajo represente algo importante!

Y para que nunca olvidemos a las Garrapatas.

¡Ellas nunca lo harían!

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a la directora de este trabajo, Ana L. García-Pérez, por haber confiado en mí para su realización, y por los numerosos “empujones” que ha necesitado darme para que al fin salga a la luz, por dirigir este trabajo, y sobre todo por darme la oportunidad de incorporarme a NEIKER, en aquel lejano mes de diciembre de 1999, y así poder introducirme en el mundo de la investigación. Quisiera agradecer también a Ana Hurtado, por su magnífica labor de codirección, por su espíritu crítico y sus valiosas aportaciones, siempre acertadas.

A Elías F. Rodríguez Ferri, tutor de esta tesis, por su labor desde la Universidad de León.

A Ramón Juste, por dar en su momento el visto bueno a mi incorporación a NEIKER, por la supervisión de este trabajo, y por su ardua defensa del Departamento de Sanidad Animal a lo largo de estos años.

A las dos personas que iniciaron parte de la andadura laboratorial de este trabajo, por un lado, Beatriz Oporto, por su ayuda en la puesta a punto de los protocolos de PCR y RLB empleados en este trabajo, y por otro, Inés Povedano por su colaboración en el procesado de las muestras. A Josune García, por la ayuda prestada y las dudas resueltas, y a Ianire Astobiza, que participó en los últimos coletazos del proyecto EBATRAG así como en los comienzos del proyecto EDEN.

A Marta Barral por mostrarme “sus” mejores puntos de muestreo de garrapatas y que luego permitieron la captura de los numerosos ejemplares que forman parte de este trabajo, y por la transmisión de su “sabiduría” del mundo de las garrapatas.

A mis ex compañeros, Horacio Gil, tanto por ser mi maestro en el arte de la captura de micromamíferos, como por introducirme en el mundo de las bases de datos Access, y Eduardo Berriatua, que me inició en el mundo de la estadística.

También me gustaría expresar mi agradecimiento a tod@s l@s becari@s, auxiliares, analistas, técnic@s e investigador@s, con l@s que he coincidido todos estos años, que han sido much@s, por el agradable ambiente de trabajo creado y por estar siempre dispuest@s a compartir de buen grado el espacio, los equipos, medios, fungibles, etc., a enseñar al que no sabe, y a echar un cable al necesitado. De igual forma, al resto de personal de NEIKER,

que en muchas ocasiones desde la “sombra”, posibilitan y facilitan la labor de tod@s I@s que nos dedicamos a la ciencia.

A Pedro Anda, del Instituto de Salud Carlos III, tanto por su “es-tu-pen-da” labor de coordinación del proyecto EBATRAG, como por la labor de transferencia de conocimientos laboratoriales y de todo tipo de material, de la que también han sido partícipes Raquel Escudero e Isa Jado. También a Sarah Randolph, de la Universidad de Oxford, por su gran labor de coordinación del sub-proyecto *Tick-Borne diseases* de EDEN.

A I@s responsables de los Servicios de Conservación de la Naturaleza de las Diputaciones Forales de Araba y Gipuzkoa, y del Servicio de Conservación de los Espacios Naturales de la Diputación Foral de Bizkaia, por concedernos las autorizaciones de acceso y de captura de micromamíferos, haciendo posible que estudios como éste puedan realizarse. No quisiera olvidarme de Rafa y Edmundo, guardas forestales del Ayuntamiento de Bilbao, y de J.A. Irastorza, guarda forestal de la Mancomunidad de Aralar, por facilitarme el acceso al Monte Pagasarri y a Aralar.

También tengo presente en mi agradecimiento a todos I@s colegas “ex-combatientes de León” que contribuyeron con su amistad y apoyo, a que un día me licenciara como Veterinario, y a I@s “ex-OVIS” por los duros años de clínica ovina compartidos, cuyo fruto me permitió ocupar la plaza del proyecto Sheeprion con el que me incorporé a NEIKER.

Por último, especial mención a mi familia, a mis padres y hermanos por el esfuerzo que tuvieron que hacer para que pudiera estudiar en León, a Nieves y a mis dos “txikis” por su apoyo, cariño y comprensión mostrados, y por sufrir mi “no disponibilidad” a lo largo de este tiempo. Eskerrik asko.

¡MUCHAS GRACIAS A TODOS!

ÍNDICE

ÍNDICE DE CONTENIDOS

ÍNDICE	11
ABREVIATURAS	17
INTRODUCCIÓN GENERAL	21
Introducción y objetivos	23
I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	29
I.1 LAS GARRAPATAS	31
I.1.1 Clasificación taxonómica de las garrapatas	32
I.1.2 Características generales de las garrapatas.....	33
I.1.3 Ciclo biológico de las garrapatas	38
I.1.4 Ecología de las garrapatas exófilas.	41
I.1.5 Ecología de las garrapatas endófilas	42
I.2 MÉTODOS DE CAPTURA DE GARRAPATAS.....	43
I.2.1 Captura de garrapatas por contacto directo con la vegetación	43
I.2.2 Recogida de garrapatas con dispositivos atrayentes	45
I.2.3 Recogida de garrapatas de los hospedadores vertebrados	46
I.3 ESPECIES DE GARRAPATAS IDENTIFICADAS EN ESPAÑA.....	47
I.4 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR GARRAPATAS.....	53
I.4.1 Zoonosis transmitidas por garrapatas.....	55
I.4.2 Bacterias detectadas sólo en las garrapatas. “Endosimbiontes”.....	57
I.5 ENCEFALITIS VIRICA TRANSMITIDA POR GARRAPATAS	58
I.5.1 Virología	58
I.5.2 Epidemiología.....	59
I.5.3 Manifestaciones clínicas.....	60
I.5.4 Diagnóstico.....	61
I.5.5 Situación en España.....	61
I.6 RICKETTSIOSIS DEL GRUPO DE LAS FIEBRES MANCHADAS	63
I.6.1 Bacteriología	64
I.6.2 Epidemiología.....	64
I.6.3 Manifestaciones clínicas.....	67
I.6.4 Diagnóstico.....	67
I.6.5 Situación en España.....	68
I.7 ANAPLASMOSIS GRANULOCITICA HUMANA	74
I.7.1 Bacteriología	75
I.7.2 Epidemiología.....	75
I.7.3 Manifestaciones clínicas.....	77

I.7.4 Diagnóstico.....	78
I.7.5 Situación en España.....	79
I.8 FIEBRE Q.....	80
I.8.1 Bacteriología.....	80
I.8.2 Epidemiología.....	81
I.8.3 Manifestaciones clínicas.....	82
I.8.4 Diagnóstico.....	83
I.8.5 Situación en España.....	84
I.9 ENFERMEDAD DE LYME.....	85
I.9.1 Bacteriología.....	85
I.9.2 Epidemiología.....	87
I.9.3 Manifestaciones clínicas.....	90
I.9.4 Diagnóstico.....	90
I.9.5 Situación en España.....	91
II. MATERIAL Y MÉTODOS.....	95
II.1. CAPTURA DE GARRAPATAS DE LA VEGETACIÓN.....	97
II.1.1 Selección de los puntos de muestreo.....	97
II.1.2. Recogida de las garrapatas de vegetación.....	98
II. 2. CAPTURA DE MICROMAMÍFEROS.....	99
II. 3 PROCESADO Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS.....	101
II.3.1 Procesado de las garrapatas.....	101
II.3.2 Procesado de los micromamíferos.....	101
II.3.3 Extracción de ADN.....	102
II.3.4 Extracción de ARN.....	103
II.3.5 RT-PCR a tiempo real para la detección del virus TBE (<i>Tick-borne encephalitis virus</i>).....	104
II.3.6 PCR multiplex para la detección de bacterias zoonóticas transmitidas por garrapatas.....	104
II.3.7 Reverse Line Blotting (RLB).....	107
II.3.8 Identificación de las rickettsias del grupo de las fiebres manchadas.....	108
II.3.9 Análisis estadísticos generales.....	109
III. ARTÍCULOS / ESTUDIOS.....	111
ARTÍCULO / ESTUDIO 1.....	113
Differences in Questing Tick Species Distribution between Atlantic and Continental Climate Areas in Spain.....	113
ARTÍCULO / ESTUDIO 2.....	129

Risk factors associated with ixodid tick species distributions in the Basque region in Spain.....	129
ARTÍCULO / ESTUDIO 3.....	149
Seasonal Dynamics of <i>Ixodes Ricinus</i> in a 3-Year period in Northern Spain: First Survey on the Presence of Tick-Borne Encephalitis Virus	149
ARTÍCULO / ESTUDIO 4.....	165
Prevalence of Tick-Borne Zoonotic Bacteria in Questing Adult Ticks from Northern Spain	165
ARTÍCULO / ESTUDIO 5.....	177
Tick-Borne Zoonotic Bacteria in Wild and Domestic Small Mammals in Northern Spain	177
IV. RESUMEN DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	193
V. CONCLUSIONES.....	219
VI. RESUMEN, ABSTRACT.....	225
VII. ANEXOS	237
ANEXO I: FICHA DE CAMPO – MUESTREO DE GARRAPATAS DE VEGETACIÓN.....	239
ANEXO II: FICHA DE LABORATORIO - GARRAPATAS DE VEGETACIÓN.....	241
ANEXO III: ENVIO DEL ARTÍCULO 1 A LA REVISTA “JOURNAL OF MEDICAL ENTOMOLOGY” (13/09/2009).....	243
ANEXO IV: ACEPTACIÓN DEL ARTÍCULO 3 ENVIADO A LA REVISTA “VECTOR-BORNE AND ZOONOTIC DISEASES” (13/09/2009).....	245
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	247

ABREVIATURAS

A	Adulto
ADN	Ácido dexosiribonucleico
AGH	Anaplasmosis granulocítica humana
AI	<i>I. ricinus</i> abundance index
AIA	Adult abundance index
AIL	Larvae abundance index
AIN	Nymphs abundance index
ARN	Ácido ribonucleico
BSK	Barbour-Stoener-Kelly
CACL	Comunidad Autónoma de Castilla La Mancha
CAM	Comunidad Autónoma de Madrid
CAPV	Comunidad Autónoma del País Vasco
CAR	Comunidad Autónoma de La Rioja
CI	Coincidence index
CS	Central Spain
DEBONEL	Dermacentor-borne necrosis-erithema-Lymphadenopathy
EDTA	Ethylenediaminetetra-acetic acid
EE UU	Estados Unidos de América
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FEM	Fiebre exantemática mediterránea
GFM	Grupo de las fiebres manchadas
HGA	Human granulocytic anaplasmosis
HI	Hemagglutination inhibition Inhibición de la hemaglutinación
HR	Humedad relativa
IRS-PCR	Sitios de restricción infrecuentes-PCR
L	Larva
LCV	Variante de células grandes
LIV	Virus Louping-ill
LPS	Lipopolisacaridos
N / N₁ / N₂	Ninfa / Primer estadio de ninfa / Segundo estadio de ninfa
NS	Northern Spain
MIF	Microinmunofluorescencia
MLSA	Multilocus Sequence Anlysis

MLST	Multilocus Sequence Typing
MLVA	Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeats Analysis
MST	Multispacer Sequence Typing
NCBI	Nacional Center for Biotechnology Information
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase chain reaction Reacción en cadena de la polimerasa
r	Correlation
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphisms Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción
RH	Relative humidity
RLB	Reverse line blotting Hibridación inversa en línea
RNA	Ribonucleic acid
rRNA	Ribosomal ribonucleic acid Ácido ribonucleico ribosómico
RT-PCR	Retro-transcription-PCR Transcripción inverse-PCR
SAI	Small-mammals Abundance Index
SCV	Variante de células pequeñas
SD	Saturation deficit
SDC	Células pequeñas y densas
SDS	Dodecil sulfato sódico
SFG	Spotted fever group
SSAD	Servicio de Secuenciación Automática de DNA
SSEV	Spanish sheep encephalitis virus Virus de la encefalitis ovina española
SSPE	Sodium chloride, sodium hydrogen phosphate, EDTA
T / T^a	Temperatura
TAI	Tick Abundance Index
TAIA	Adult abundance index
TAIL	Larvae abundance index
TAIN	Nymph abundance index
TBD	Tick-borne disease
TBE	Tick-borne encephalitis Encefalitis vírica transmitida por garrapatas

TBEV	Tick-borne encephalitis virus Virus de la encefalitis transmitidas por garrapatas
TBF	Tick-borne fever
TE	Tris EDTA
TIBOLA	Tick-borne Lymphadenopathy
TR	Ticks recorded
U.S.A.	United States of America
VNRT	Variable Number Tandem Repeats

INTRODUCCIÓN GENERAL

Introducción y objetivos

Las garrapatas pueden transmitir numerosos protozoos, virus, bacterias y hongos, lo que les confiere gran importancia como vectores de agentes patógenos para las personas y animales. En Europa, están considerados como el grupo de artrópodos hematófagos de mayor importancia en la transmisión de agentes transmitidos por vectores, siendo superados a nivel mundial, únicamente por los mosquitos (Parola y Raoult 2001b).

La presencia de garrapatas en el medio natural de la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV) representa un problema importante desde el punto de vista de la salud humana y animal. Las características climatológicas, con precipitaciones abundantes y temperaturas moderadas tanto en invierno como en verano, y la existencia de una vegetación arbustiva abundante junto a la variedad de fauna silvestre (grandes y pequeños mamíferos, aves y reptiles) presente en la zona, hacen que la CAPV reúna unas condiciones muy favorables para el desarrollo de las poblaciones de garrapatas. Por otro lado, las condiciones de explotación de diferentes especies animales domésticas (vacuno y equino de aptitud cárnica, y ovino), con estancias más o menos prolongadas en zonas de monte, favorecen la supervivencia y mantenimiento de las fases libres de las garrapatas, de forma que pueden dar lugar a infestaciones de importancia en los animales. Este hecho junto a la tradición de realizar actividades recreativas en la naturaleza, origina un elevado riesgo de picadura de garrapata en las personas, y, por consiguiente, de transmisión de agentes patógenos. A principios de los años 90, en NEIKER (antes SIMA) se comenzaron a estudiar las especies de garrapatas presentes en la vegetación y en los animales, y a la fecha de comenzar esta tesis se tenía conocimiento de la presencia de 12 especies diferentes en la vegetación, siendo las más frecuentes *Haemaphysalis punctata* e *Ixodes ricinus* (Barral y cols. 1993, Gil y cols. 2005). La técnica de arrastre de una pieza de tejido por la vegetación es un método económico y sencillo para estudiar las especies de garrapatas exófilas presentes en una zona (Sonenshine 1993), y los momentos de actividad de los diferentes estadios (larvas, ninfas y adultos). Las garrapatas exófilas están en la vegetación esperando el paso de animales y personas sobre las que alimentarse, y son las que suponen el principal riesgo de picadura y de transmisión de enfermedades. Una de las hipótesis al comienzo de esta tesis era que las especies presentes en el País Vasco podían ser diferentes a las encontradas en otras zonas de España, donde las condiciones climáticas, que condicionan la presencia de determinadas especies (Estrada-Pena 2001, Gilot y cols. 1975, Sonenshine 1993), son distintas. Esto es importante desde el punto de vista sanitario porque determinadas enfermedades son transmitidas exclusivamente por una especie de garrapata, por lo que el conocimiento de su presencia es decisivo para establecer medidas

de control en una zona, región o país. La ventaja de la realización de estudios de vigilancia de las garrapatas en la vegetación es que permite comprobar también cambios en la abundancia de garrapatas (Sonenshine 1993, Talleklint-Eisen y Lane 2000, Tsunoda y cols. 2004) y/o en la aparición de nuevas especies en una zona (Barral y cols. 1993, Bullova y cols. 2009). La compra de animales (Burrige y Simmons 2003, Kenny y cols. 2004) o el paso de aves migratorias (Hoogstraal y cols. 1961, Miyamoto y cols. 1993, Ogden y cols. 2008), pueden ser factores determinantes para la introducción de nuevas especies de ixódidos, con el consiguiente riesgo de aparición de nuevas enfermedades transmitidas por garrapatas. Los cambios socioeconómicos también pueden ser decisivos. Así, los cambios en la gestión del territorio pueden conducir al incremento o disminución de la carga ganadera, lo que conlleva alteraciones en la cubierta vegetal, influyendo ambos aspectos directamente en la abundancia de ixódidos en la vegetación (Gray y cols. 2009, Rand y cols. 2003, Randolph 2001). Por este motivo, en el momento de comenzar esta tesis se planteó la hipótesis de que en la última década en la CAPV se habían podido producir este tipo de cambios, con consecuencias en la abundancia de las poblaciones de garrapatas, y también en la ampliación del abanico de especies de garrapatas presentes.

Aun cuando las repercusiones económicas ocasionadas por las garrapatas en el sector ganadero son importantes, estos ectoparásitos adquieren su máxima relevancia como vectores de agentes infecciosos para el ser humano. Así, *I. ricinus*, una de las especies de garrapata predominante en la CAPV, es el vector de importantes enfermedades tales como la enfermedad de Lyme, la anaplasmosis granulocítica, la encefalitis vírica transmitida por garrapatas (TBE), y diferentes tipos de rickettsias, entre otras (Beati y cols. 1993, Danielova y cols. 2002, Koci y cols. 2007, Richter y Matuschka 2006, Rijpkema y cols. 1995, Skotarczak y cols. 2003, Skotarczak y Cichocka 2001). También es una especie que se ha asociado recientemente a la transmisión de un buen número de especies de piroplasmas (García-Sanmartín y cols. 2008). Algunas de estas importantes enfermedades han sido diagnosticadas en la CAPV, tanto en la especie humana (fiebre Q, rickettsiosis, enfermedad de Lyme) (Arteaga y García-Monco 1998, Jado y cols. 2007, Montes y cols. 2006, Sobradillo y cols. 1989) como en animales (babesiosis, theileriosis, encefalitis vírica ovina, fiebre por garrapatas, fiebre Q) (Fernández de Luco 1991, García-Pérez y cols. 2003, García-Sanmartín y cols. 2006, Juste y cols. 1989, Nagore y cols. 2004a, Nagore y cols. 2004b). El desarrollo de las técnicas de biología molecular, y en concreto la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) constituyó un gran avance en el estudio de agentes patógenos en los vectores. La mayor parte de estos agentes bacterianos, víricos o protozoarios son difíciles de cultivar, por lo que estas técnicas han facilitado tanto el diagnóstico laboratorial de los casos clínicos, como la realización de estudios epidemiológicos a gran escala. Así, en

NEIKER ya se habían llevado a cabo estudios de detección por PCR de algunas bacterias como *Borrelia burgdorferi* y *Anaplasma* spp. (Barral y cols. 1999, Barral y cols. 2002), pero no se había investigado nunca la presencia de *Rickettsia* spp. del grupo de las fiebres manchadas, ni tampoco la presencia de *Coxiella burnetii* (agente causal de la fiebre Q). Nuestra hipótesis en el momento de comenzar este estudio era que estos dos últimos agentes también podían estar presentes en las garrapatas de la CAPV, por lo que en esta tesis se ha pretendido desarrollar nuevas técnicas de PCR multiplex y de hibridación *reverse line blot* (RLB) para el estudio de los cuatro agentes bacterianos zoonóticos mencionados, con el fin de aumentar la sensibilidad y procesabilidad respecto a las técnicas de PCR convencional (Rijpkema y cols. 1995, Wielinga y cols. 2006). Además de conocer la presencia de estos patógenos, también otro de los objetivos fue actualizar los datos de prevalencia de *Borrelia* y/o *Anaplasma* en las garrapatas de vegetación obtenidos con anterioridad a esta tesis (Barral y cols. 1999, Barral y cols. 2002, Gil y cols. 2005). Las alteraciones en el hábitat, en el clima, así como los cambios de los censos de las poblaciones de hospedadores reservorios dan lugar a cambios en la prevalencia de los agentes patógenos transmitidos por garrapatas (Gray y cols. 2009, Lindgren y Gustafson 2001, Ogden y cols. 2006, Rand y cols. 2003, Randolph 2004).

Entre las zoonosis transmitidas por garrapatas citadas anteriormente, únicamente la encefalitis transmitida por garrapatas no se ha descrito en humanos ni en la CAPV ni en otras zonas de España, no habiendo sospechas clínicas hasta la fecha. Esta enfermedad está considerada endémica en numerosas regiones del centro y este de Europa donde se hallan distribuidos sus principales vectores transmisores, *I. ricinus* y/o *Ixodes persulcatus*. A lo largo de las tres últimas décadas, la incidencia de la enfermedad ha aumentado de manera importante en estos países (Suss 2008). Recientemente también se ha documentado la aparición de casos en nuevas regiones, lo cual indicaría que la enfermedad se halla en expansión (Broker y Gniel 2003). Las garrapatas pueden permanecer infectadas de forma crónica a lo largo de toda su vida, pudiendo transmitir el virus de un estadio al siguiente. El ciclo del virus se mantiene por la transmisión entre las ninfas infectadas y las larvas mientras se alimentan juntas (co-alimentación) en el mismo roedor. Para que el virus pueda mantenerse en la naturaleza, debe de producirse un alto nivel de co-alimentación. Esto dependerá de las condiciones medioambientales, precisando unas condiciones climáticas que aseguren la sincronía estacional de ambos estadios (Randolph 2000). Los hábitos y costumbres humanos tienen también gran influencia en la estacionalidad de la incidencia de la enfermedad (Randolph 2001); frecuentemente la infección es adquirida en los meses en los que las condiciones climatológicas favorecen el desarrollo de actividades al aire libre (Randolph y cols. 2008). Una de las hipótesis al comienzo de esta tesis era que,

siendo su vector (*I. ricinus*) tan abundante en la CAPV, el virus TBE podría estar presente aunque fuera a bajos niveles. Para ello, se planteó como objetivo no solo comprobar la existencia del virus en las garrapatas de nuestro entorno, por primera vez en España, sino además analizar la posibilidad de que la estacionalidad de las larvas y ninfas de *I. ricinus* fuera adecuada para darse las condiciones ideales de co-alimentación entre ambos estadios, y así facilitar la posible persistencia del virus.

Los micromamíferos pueden desempeñar un importante papel en la naturaleza como reservorios de los agentes que producen todas las enfermedades citadas, causadas por bacterias y virus. Además, se da la circunstancia de que las larvas de *I. ricinus* tienen gran afinidad por parasitar a los roedores (Humair y cols. 1993, Matuschka y cols. 1990). Sin embargo, si bien en varios países europeos y en Estados Unidos son numerosos los estudios realizados con el objetivo de identificar las especies de micromamíferos que son reservorios potenciales de estas enfermedades, en España los estudios realizados son muy limitados. De hecho, el único estudio existente para investigar el papel de los micromamíferos como reservorio de *Borrelia burgdorferi*, agente causante de la Enfermedad de Lyme, está realizado en la CAPV (Gil y cols. 2005). En este estudio se encontró una baja incidencia de infección por *B. burgdorferi* sensu lato, pero sorprendentemente se identificó una nueva especie de *Borrelia* que se situaba filogenéticamente entre el grupo de las espiroquetas causantes de la borreliosis de Lyme y el grupo de las borrelias causantes de la fiebre recurrente. De momento se desconoce su importancia patógena para estas especies animales, aunque su amplia distribución puede estar relacionada con la elevada seroprevalencia frente a la enfermedad de Lyme que se encuentra en la población humana de la zona estudiada (Arteaga y Garcia-Monco 1998). Si bien el trabajo de Gil y cols. (2005) aportó nuevos conocimientos sobre la epidemiología de *B. burgdorferi* en nuestra zona, hasta el momento del inicio de esta tesis no se disponía de datos sobre el papel de estas especies como posibles portadores de *Rickettsia* spp. o *C. burnetii*, y de *Anaplasma phagocytophilum* solo existía un estudio con un número reducido de animales, que fueron PCR negativos (Oporto y cols. 2003). Por ello, una de las hipótesis de partida a la hora de plantear este trabajo de tesis fue que los roedores e insectívoros más abundantes de la CAPV podían ser importantes reservorios de otros agentes bacterianos distintos a *Borrelia* spp., por lo que su captura y estudio mediante métodos moleculares constituyó otro de los objetivos de la tesis.

En resumen, con el fin de actualizar los conocimientos disponibles hasta el comienzo de esta tesis, y para contrastar una serie de hipótesis que se han ido detallando en los párrafos anteriores, se plantearon los siguientes objetivos específicos que constituyen el trabajo de tesis:

1. Estudiar las especies exófilas presentes en la vegetación mediante la técnica del arrastre de la manta, y comparar la abundancia y variedad de especies de garrapatas presentes en la CAPV con otras zonas climáticas del centro de España.
2. Estudiar la evolución en el tiempo de la distribución, abundancia y variedad de las especies de garrapatas ixódidas presentes en la vegetación de la CAPV.
3. Estudiar la dinámica estacional de la especie de garrapata ixódida más abundante en la vegetación de la CAPV, *I. ricinus*, y analizar si se dan las circunstancias óptimas para que el virus TBE pueda estar presente en el Norte de España.
4. Investigar la presencia del virus TBE en adultos y ninfas de *I. ricinus*.
5. Estudiar la presencia de algunos agentes zoonóticos bacterianos transmitidos por garrapatas (*Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *A. phagocytophilum*, *C. burnetii*) en las garrapatas presentes en la vegetación de la CAPV.
6. Estudiar el papel de los micromamíferos silvestres y domésticos como posibles reservorios de algunas bacterias transmitidas por garrapatas.

Con los resultados obtenidos se han elaborado 5 artículos científicos, que constituyen el cuerpo de este trabajo de tesis, y que se corresponden con los Estudios 1, 2, 3, 4 y 5. De esta forma, en el Estudio 1 se muestran los resultados logrados en el desarrollo del objetivo 1, en el Estudio 2 los del objetivo 2, en el Estudio 3 se engloban los obtenidos en los objetivos 3 y 4, en el Estudio 4 los del objetivo 5, y en el Estudio 6 los del objetivo 6.

Estos artículos se realizaron en el transcurso del desarrollo de dos proyectos de investigación. Así, durante el periodo 2003-2006 se desarrolló la Red Temática de Investigación Cooperativa del Fondo de Investigación Sanitaria “Enfermedades Bacterianas Transmitidas por Garrapatas en 4 zonas de España” (RETICS G03/057 y PI051873) (EBATRAG), y de 2004 hasta 2010 el proyecto europeo “Emerging Diseases in a Changing European Environment” (UE GOCE-2003-010284 EDEN, www.eden-fp6project.net).

I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I.1 LAS GARRAPATAS

Las garrapatas son artrópodos hematófagos obligados que parasitan toda clase de mamíferos, aves, reptiles e incluso anfibios, distribuidos por casi todas las regiones del mundo. Son conocidas aproximadamente 879 especies (Guglielmone y cols. 2009), pertenecientes a 2 familias principales, las “garrapatas duras” o *Ixodidae*, denominadas así por poseer un escudo dorsal esclerotizado, y las “garrapatas blandas” o *Argasidae*, denominadas así por la presencia de una cutícula externa flexible. Existe una tercera familia, *Nuttalliellidae*, en la que se incluye una sola especie, distribuida únicamente en el sur de África (Parola y Raoult 2001b). La familia *Ixodidae*, es la más numerosa y la de mayor importancia médica y veterinaria.

Las garrapatas presentan tres estadios: larva, ninfa y adulto (macho o hembra). Las garrapatas *Ixodidae* y *Argasidae* se diferencian tanto por su anatomía como por sus ciclos biológicos. Los ixódidos reúnen una serie de características que les confiere un potencial como vectores de agentes patógenos, se alimentan durante largos periodos de tiempo (varios días), su picadura es generalmente indolora, y permanecen fuertemente fijados sobre el hospedador. Cada estadio se alimenta una sola vez, pudiendo parasitar a una gran variedad de especies animales en diferentes tipos de hábitats. Los argásidos, por el contrario, se alimentan durante breves periodos de tiempo (minutos u horas), y frecuentemente sobre una sola especie hospedadora (Anderson y Magnarelli 2008, Sonenshine 1991).

Las garrapatas aun siendo reconocidas como importantes parásitos de los animales (domésticos y silvestres), y de los humanos, tienen más relevancia por las numerosas enfermedades que pueden transmitir (Sonenshine 1991). Muchos de los agentes transmitidos por garrapatas tienen una alta prevalencia, y en otros casos se consideran como re-emergentes, aun cuando los avances de la medicina han permitido reducir otras enfermedades transmitidas por artrópodos en diferentes lugares del mundo (Parola y Raoult 2001b, Sonenshine 1991, Telford, III y Goethert 2004). Entre las enfermedades transmitidas por garrapatas a las personas destaca la enfermedad de Lyme, causada por una espiroqueta (*Borrelia burgdorferi*), que es, desde su identificación en 1982, la principal enfermedad transmitida por garrapatas en Europa y Estados Unidos. Así mismo, la encefalitis vírica transmitida por garrapatas (TBE) es una enfermedad vírica grave, distribuida ampliamente por Europa y Asia que afecta principalmente a personas que están en contacto con la naturaleza (granjeros, montañeros, campistas, etc.), habiéndose observado un incremento de su incidencia en la última década (Lindquist y Vapalahti 2008,

Randolph 2001, Suss 2003). Otras enfermedades transmitidas por garrapatas afectan también a los animales domésticos y/o silvestres como el louping ill, la fiebre por garrapatas, la babesiosis y theileriosis, etc. (Jongejan y Uilenberg 2004, Sonenshine y cols. 2002).

Además de la capacidad de transmitir agentes patógenos, las garrapatas pueden ocasionar parálisis letal y severas toxemias como resultado de las picaduras. La pérdida de sangre (anemia) es consecuencia directa de parasitaciones masivas, ya que las garrapatas son parásitos hematófagos estrictos, y en concreto las garrapatas de la familia *Ixodidae* tienen una gran capacidad de consumo de sangre. Por ejemplo, las hembras de la especie *Hyalomma asiaticum* pueden consumir más de 8 ml (Sonenshine 1991). En ocasiones la infestación por garrapatas puede adquirir tal magnitud que la anemia provoca la muerte del animal, o le hace susceptible a otras enfermedades a causa del debilitamiento originado (Sonenshine y cols. 2002).

I.1.1 Clasificación taxonómica de las garrapatas

Taxonómicamente, las garrapatas están incluidas en la clase Arachnida, subclase Acari, (taxón que incluye también a los ácaros), orden Parasitiformes, suborden Ixodida (Figura I.1) (Parola y Raoult 2001b).

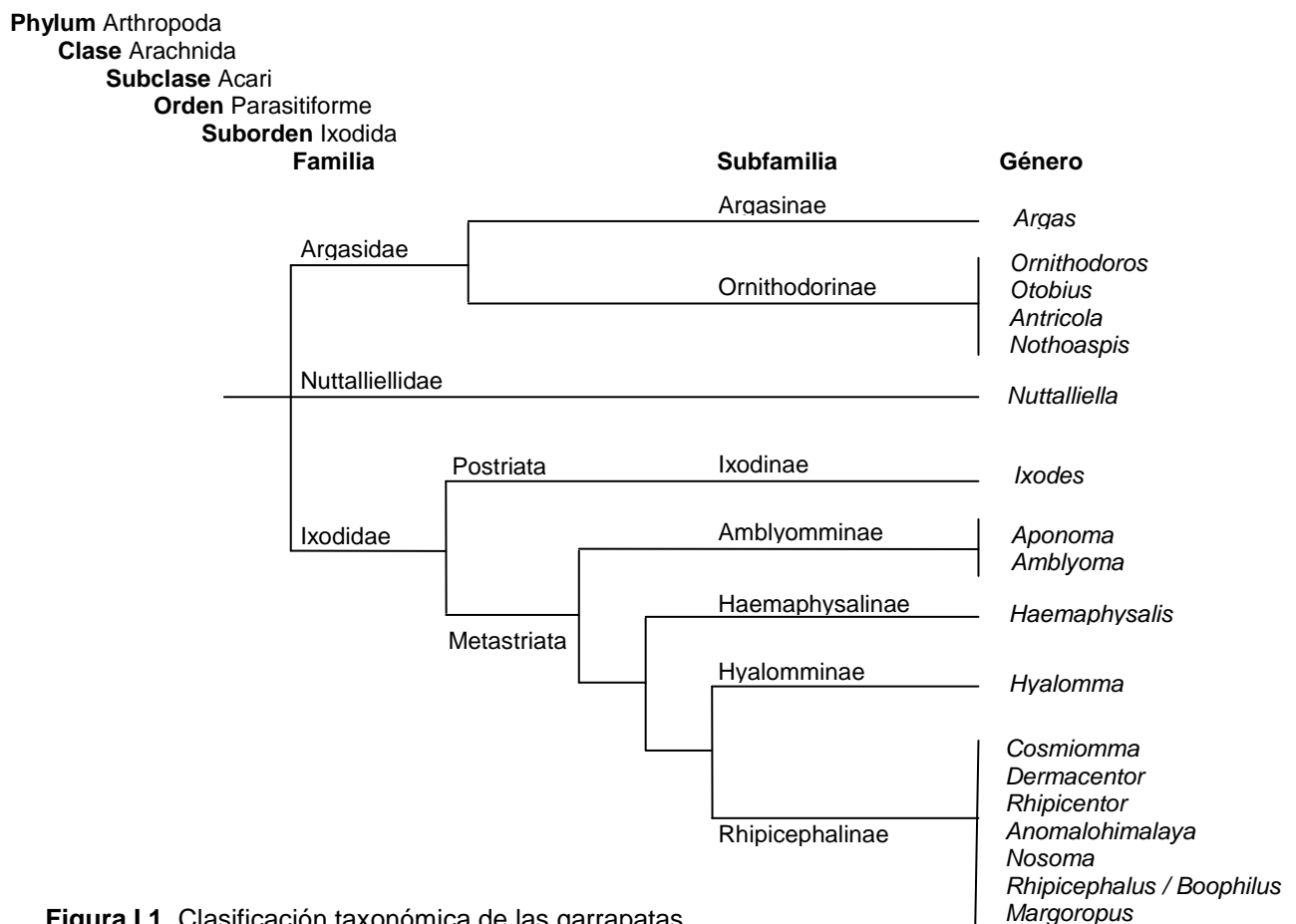


Figura I.1. Clasificación taxonómica de las garrapatas.

Se conocen tres familias de garrapatas, la *Ixodidae*, o “garrapatas duras”, con 692 especies incluidas en 13 géneros agrupados en dos grupos principales, Prostriata y Metastriata. La segunda familia es la *Argasidae*, a la cual pertenecen 186 especies pertenecientes a 5 géneros agrupados en dos subfamilias, *Argasinae* y *Ornithodorinae*. La tercera familia es *Nuttalliellidae*, representada por una única especie, *Nuttalliella namaqua* (Guglielmone y cols. 2009).

I.1.2 Características generales de las garrapatas

El cuerpo de las garrapatas tiene la estructura característica de los arácnidos, clase a la que pertenecen. En general, el cuerpo de las garrapatas es alargado, más largo que ancho, en los adultos no alimentados el tamaño del cuerpo, incluido el capítulo, puede medir desde poco más de 2 mm, hasta casi 30 mm (Anderson y Magnarelli 2008).

El cuerpo de las garrapatas está formado por el capítulo o gnatosoma y el idiosoma. El capítulo sostiene las partes bucales, incluidos los quelíceros (utilizados para cortar y rasgar la piel), los palpos y el hipostoma con el que se fijan al hospedador. El idiosoma se subdivide en el podosoma, el cual soporta las patas y el poro genital, y en el opistosoma, región posterior donde se encuentran las placas espiraculares y la apertura anal. La cobertura externa del cuerpo y de sus apéndices, similar al de otros artrópodos, se denomina tegumento, está constituida por la epidermis y por la cutícula, parte externa que actúa como protección primaria frente a la pérdida de agua. El tegumento sirve también como exoesqueleto, proporcionando protección frente a agresiones de tipo mecánico o físico (Sonenshine 1991).

Diferentes estructuras, como los pelos sensoriales y cerdas, las glándulas dérmicas y las sensilas, forman parte de la cutícula. Los pelos sensoriales y cerdas están distribuidas por el cuerpo, el capítulo y las patas, siendo abundantes en las garrapatas adultas y en las ninfas, pero escasa en las larvas. Estas estructuras tienen una función mecanosensorial, y más raramente termosensorial; en los órganos sensoriales, como el órgano de Haller, las sensilas adquieren forma de poros, y tienen principalmente actividad quimiosensorial, aunque también pueden actuar como mecanosensores (Sonenshine 1991). Las glándulas dérmicas se hallan dispersas por todo el cuerpo, las del tipo I, son más numerosas y de un tamaño de 80-100 μm en ninfas y hembras repletas, y las del tipo II, similares a las anteriores, pero que adquieren un enorme tamaño durante la repleción, llegando a las 400 μm en las hembras repletas. Estas glándulas segregan una sustancia oleosa que se distribuye por toda la superficie corporal y que se solidifica al contactar con la atmósfera. La excitación a causa de la luz intensa, calor o por irritación de tipo mecánico puede inducir la secreción por parte de las glándulas dérmicas. Esta secreción tiene características impermeabilizantes y protege a las garrapatas de la desecación. Las sensilas en forma

porosa son numerosas en el cuerpo de las garrapatas ixódidas, y parecen actuar, respondiendo a la distensión o alargamiento de la cutícula, si bien, otras tienen actividad mecanosensorial e incluso termoreceptora (Sonenshine 1991).

Las larvas de los ixódidos carecen de sistema respiratorio traqueal, que se encuentra, sin embargo, presente en las ninfas y en los adultos. Junto al sistema de tráqueas ramificadas, se diferencia un par de estigmas respiratorios que se encuentran situados lateralmente en el extremo terminal del idiosoma, tras las coxas del cuarto par de patas. El sistema nervioso central está concentrado en una única masa o agrupación de nervios, el singanglio, en lugar del cerebro y del cordón nervioso ventral característico de los insectos, crustáceos y de otros artrópodos (Sonenshine 1991).

Las garrapatas duras poseen en su superficie dorsal un escudo esclerotizado, al cual se unen importantes grupos de músculos. En los machos ixódidos, el escudo recubre todo el dorso, y en numerosas especies presentan también unas láminas esclerotizadas que cubren total o parcialmente la superficie ventral. Esta característica de los machos, hace que durante su alimentación experimenten solo un ligero aumento de tamaño, sin embargo, el resto de estadios, al poseer una cutícula expansible, pueden sufrir un gran incremento por la síntesis de nueva cutícula durante la alimentación. Las garrapatas ixódidas deben permanecer fijadas durante el periodo de crecimiento de la cutícula, por lo que obligatoriamente tendrán que alimentarse lentamente, necesitando varios días para completar el proceso. Por el contrario, los argásidos, al tener una cutícula dura tienen limitada su expansión, motivo por el cual estas garrapatas se han adaptado a una rápida alimentación, desde unos minutos hasta un máximo de 1-2 horas (Sonenshine 1991). En los géneros de garrapatas que presentan ojos, éstos se sitúan en los márgenes laterales del escudo, siendo probablemente su función la de distinguir la luz y a lo sumo el movimiento, por lo que posiblemente no tengan una detallada percepción del medio que le rodea (Parola y Raoult 2001b).

Las larvas y las ninfas no presentan diferenciación sexual. Los machos y las hembras presentan una abertura genital o gonoporo, que se sitúa ventralmente en el idiosoma, aproximadamente a la altura del segundo par de patas. El ano también se sitúa ventralmente en el extremo posterior del cuerpo, por detrás del cuarto par de patas, estando rodeado por el surco anal.

Las garrapatas duras tienen tres estadios, larva, ninfa y adulto. A diferencia de éstas, las garrapatas blandas presentan 2 o más estadios de ninfa, dependiendo de las especies, del éxito de la alimentación y de otras variables, que darán lugar a un desarrollo del ciclo más lento (Sonenshine 1991).

Las garrapatas poseen varias características que contribuyen a su éxito como potenciales vectores de agentes patógenos, características que las distinguen de los arácnidos y de los insectos. Una de ellas es su longevidad, a la cual se hace referencia en término de años en vez de días o semanas (Anderson y Magnarelli 2008, Sonenshine 1991). Los adultos en algunas especies, las ninfas o las larvas en otras, pueden sobrevivir de un año a otro. En latitudes más hacia el norte, con clima subártico, las garrapatas a menudo requieren de 2, 3 o incluso 4 años para completar su ciclo biológico. Los argásidos refugiados en grietas, a menudo sobreviven varios años a la espera de encontrar un hospedador adecuado sobre el que alimentarse. Esta excepcional longevidad no solo permite a las garrapatas perpetuarse, sino también a los agentes patógenos que éstas portan, haciendo más difícil su control. Otra importante característica de las garrapatas es su proceso digestivo, en gran parte intracelular y, excepto para las hembras que están poniendo huevos, lento. La sangre ingerida permanece en el intestino durante largos periodos de tiempo sin ser digerida, por lo que los patógenos adquiridos durante la ingesta tampoco estarán expuestos al proceso digestivo y podrán penetrar en los tejidos de la garrapata. La sangre sin digerir sirve de reserva de alimento, y excepto durante los periodos de oviposición o ecdisis, es consumida gradualmente durante varios meses e incluso años. Otro aspecto remarcable de las garrapatas es la capacidad de producir un número muy elevado de huevos. Las hembras de la mayoría de las especies de ixódidos producen miles de huevos (Figura I.2), mientras que las hembras pertenecientes a las garrapatas blandas ponen solo unos cientos de huevos tras la alimentación, si bien son capaces de realizar varios ciclos de alimentación y reproducción (Anderson y Magnarelli 2008, Sonenshine 1991, Sonenshine y cols. 2002).



Figura I.2. Hembra de *D. reticulatus* realizando la puesta de huevos.

Las garrapatas se alimentan en grupo, rasgan las paredes de los vasos sanguíneos de la dermis y succionan los fluidos (Figura 1.3). Los argásidos se alimentan rápidamente, consumiendo entre 5 y 10 veces su peso, en minutos o en pocas horas (Sonenshine 1991), posteriormente, la sangre ingerida es concentrada mediante la excreción del agua a través de un poro situado entre las coxas de los dos primeros pares de patas (Anderson y Magnarelli 2008, Sonenshine 1991). En contraste, los ixódidos se alimentan durante periodos de tiempo más prolongados, varios días o semanas, por lo que la mayoría de las especies segregan con la saliva sustancias cementantes, que les permitirá una fijación más dura a la piel del hospedador. Para concentrar la sangre ingerida, los ixódidos emplean las glándulas salivares para eliminar periódicamente el exceso de agua de la hemolinfa (Anderson y Magnarelli 2008, Sonenshine 1991). Otra forma de eliminar agua es a través de la cutícula, por transpiración, y en las heces. Estos mecanismos de concentración de la sangre hacen que el peso de las garrapatas engordadas no represente la cantidad de sangre consumida. Los ixódidos ingieren una cantidad de sangre 2-3 veces superior a su peso tras la repleción (Anderson y Magnarelli 2008, Sonenshine 1991). Esta voraz alimentación puede ocasionar un gran daño al hospedador, daño suficiente para producir la muerte cuando un elevado número de garrapatas parasitan a un hospedador. El éxito en la alimentación de las garrapatas está fuertemente relacionado con la capacidad de suprimir los mecanismos hemostáticos del hospedador, manteniendo el flujo de la sangre a lo largo de todo este periodo, y de suprimir la respuesta inmune del hospedador, lo cual les permite utilizar a un mismo hospedador durante todo el periodo de alimentación. Para ello, las garrapatas introducen en la saliva secretada distintas moléculas que presentan actividad farmacológica o inmunomoduladora local en el lugar de fijación de la garrapata, facilitando de forma indirecta la transmisión bilateral con éxito de distintos patógenos (Ribeiro 1989, Ribeiro y Francischetti 2003).

Las garrapatas han desarrollado estrategias que les facilitan la supervivencia en el medio ambiente mientras permanecen a la espera de los hospedadores. Por ejemplo, las glándulas salivares pueden segregarse con la saliva una sustancia higroscópica capaz de absorber humedad del medioambiente incluso en condiciones de subsaturación (Rudolph y Knulle 1974). Esta capacidad permite a las garrapatas cuando comienzan a desecarse, mientras se encuentran encaramadas en la vegetación, descender en busca de un microambiente más húmedo y absorber agua de la atmósfera para restaurar las pérdidas sufridas, pudiendo a continuación volver a ascender en la vegetación a la espera del hospedador (Randolph y Storey 1999, Sonenshine 1991). Muchas especies de garrapatas son capaces también de conservar el agua corporal bajo condiciones ambientales adversas; ello se debe a una capa lipídica bajo la cutícula superficial, así como al descenso en la frecuencia de apertura de las placas espiraculares, y a la producción de guanina, desecho

fecal altamente nitrogenado que precisa de una escasa cantidad de agua para ser eliminada. Otros factores ligados al comportamiento también permiten a las garrapatas evitar la desecación; así, las garrapatas nidícolas producen feromonas que facilitan el agrupamiento de los individuos en los lugares más favorables para su supervivencia, mientras que las garrapatas no nidícolas se esconden en el suelo o en zonas de vegetación densa donde la humedad es elevada para poder reponer el agua perdida (Anderson y Magnarelli 2008, Sonenshine 1991).



Figura I.3. Larvas de ixódidos alimentándose en un micromamífero.

Otra importante característica desarrollada por las garrapatas es la diapausa, que se define como un estado de baja actividad metabólica, mediado de forma neurohormonal, el cual confiere a la garrapata la capacidad de ahorro de energía mientras permanecen a la espera de un hospedador. Las garrapatas han desarrollado un sistema sensorial que les permite detectar la presencia de hospedadores, o de ciertas condiciones medioambientales que les indican la llegada de un periodo desfavorable para su supervivencia. Estos mecanismos hacen que en las garrapatas nidícolas, que habitan en la proximidad de aves migratorias o de murciélagos, la oviposición se retrase hasta el regreso de los animales (diapausa morfogenética). Las garrapatas no nidícolas, se refugiarán en el suelo o en la vegetación en respuesta a los cambios en la duración de los días (diapausa fotoperiódica), permaneciendo inactivas, a la espera de condiciones más favorables (Sonenshine 1991).

La capacidad de las garrapatas para detectar a los hospedadores se debe a que poseen un sistema sensorial de gran eficacia para la detección de olores, vibraciones, cambios de temperatura, etc. Las garrapatas usan el primer par de patas de manera similar a las antenas de los insectos, exponiendo el órgano de Haller a las corrientes de aire para la

detección del hospedador. Las sensilas de este órgano sensorial son de tipo olfativo, gustatorio, mecanoreceptor, y probablemente también termoreceptor. Cuando las garrapatas se encuentran al acecho del hospedador, las sensilas responden al CO₂, NH₃, ácido láctico y a otras sustancias olorosas de los animales, al igual que a las vibraciones y la temperatura corporal de los animales de sangre caliente. Otras sensilas permiten a las garrapatas reconocer cuándo se encuentran en grietas, bajo el manto de hojas del suelo o en una zona de vegetación densa donde poder resguardarse de condiciones ambientales desfavorables.

I.1.3 Ciclo biológico de las garrapatas

En este apartado se pretende resumir como son los ciclos biológicos de las dos principales familias de garrapatas. En general las garrapatas tienen 4 estadios, el huevo embrionado, la larva, la ninfa y el adulto. El dimorfismo sexual es evidente únicamente en el estadio adulto, por lo tanto cuando se habla de un macho o de una hembra se está haciendo referencia a un individuo adulto. En la mayoría de las especies, cada uno de los estadios activos buscará a un hospedador, se alimentará y se desprenderá para desarrollarse en el medio natural (ciclo biológico de 3 hospedadores). En los argásidos, el desarrollo es gradual, con múltiples estadios de ninfa previos a convertirse en adulto (ciclo biológico de múltiples hospedadores), mientras que en los ixódidos pasan por un único estadio de ninfa (Anderson y Magnarelli 2008, Sonenshine 1991). En algunas especies los estadios juveniles, una vez alimentados, permanecen y se desarrollan en el hospedador, teniendo incluso un desarrollo más breve. Estas garrapatas se denominan garrapatas de “2 hospedadores” o de “1 hospedador”, dependiendo si uno o más estadios juveniles se desarrollan de esta manera. Todas las especies son ovíparas, pero existen numerosas variaciones en los ciclos biológicos de las distintas garrapatas.

I.1.3.1 Ixodidae

El ciclo biológico de las diferentes especies de garrapatas ixodidas es bastante similar entre sí, todas tienen un único estadio de ninfa, las hembras aumentan de tamaño durante la alimentación (ocasionalmente hasta 100 veces el tamaño original) y la fecundación tiene lugar mientras se alimentan en el hospedador (Anderson y Magnarelli 2008, Sonenshine 1991). Tras la fecundación, las hembras ingieren sangre hasta su repleción, una vez saciadas se desprenden del hospedador y comienzan la oviposición. Tras un periodo preovipositor, excepto en aquellas hembras con diapausa morfogénica, las hembras depositan varios miles de huevos en un ciclo continuo de oviposición. La puesta de huevos es rápida, alcanzándose el pico de producción entre el tercer y el quinto día tras el comienzo de la puesta, para ir descendiendo gradualmente. En general, la gran mayoría de los huevos son depositados en los primeros 10 días, en los 5-10 días posteriores continua la puesta de

un número menor de huevos, tras la cual las exhaustas hembras morirán (Sonenshine 1991). Aun cuando las proporciones son diferentes entre las diferentes especies, más de la mitad del peso corporal de las hembras repletas fecundadas se convierte en huevos durante este proceso. Esta capacidad ovipositora de las garrapatas ixódidas las sitúan entre las más prolíficas de todos los artrópodos.

Diferentes modelos de desarrollo y de comportamiento reproductivo tienen lugar dentro del género *Ixodes*. En estas garrapatas, la gametogénesis comienza en el momento de la transformación de la ninfa en adulta, siendo los jóvenes adultos sexualmente activos tras finalizar la muda. Este hecho hace que la cópula entre los machos y las hembras pueda tener lugar antes de la alimentación, cuando se hallan en la vegetación, o cuando se encuentran en el hospedador (Sonenshine y cols. 2002).

Ciclo biológico de tres hospedadores (trifásico).

Es el ciclo biológico más característico de las garrapatas ixódidas. Tras la oviposición comienza la incubación, y después de la eclosión, las larvas emergentes se dispersarán en la vegetación cercana a la espera del hospedador. Aquellas que tengan éxito en la búsqueda, se fijarán e ingerirán sangre lentamente durante varios días hasta completar su alimentación. La larva repleta se soltará del hospedador y buscará un hábitat protegido donde tendrá lugar la muda. La nueva ninfa buscará de nuevo un hospedador, repitiéndose el proceso de fijación, repleción, descenso del hospedador y búsqueda de un lugar adecuado donde completar la muda hacia el estadio adulto. Tras su emergencia los adultos buscarán un nuevo hospedador, se alimentarán, se fecundarán, y las hembras repletas realizarán la oviposición, completando el ciclo biológico. Bajo condiciones del medio ambiente natural favorables, el ciclo biológico de tres hospedadores puede completarse en menos de un año, sin embargo, las condiciones climatológicas y la diapausa pueden alterar el comportamiento de la búsqueda del hospedador o el desarrollo de la oviposición, por lo que solo un estadio biológico podrá ser completado cada uno o dos años. Estas limitaciones ambientales pueden prolongar la duración del ciclo biológico entre 3 y 6 años (Anderson y Magnarelli 2008, Sonenshine 1991).

Ciclo biológico de dos y un hospedador (difásico o monofásico).

Existen diferentes variantes respecto al modelo general del desarrollo de los ixódidos. En algunas especies, las larvas alimentadas permanecen en el hospedador, donde tendrá lugar la muda al estadio de ninfa y la posterior fijación y repleción de este estadio juvenil. Solo tras completar su repleción las ninfas abandonarán al hospedador para completar la muda. Las nuevas garrapatas adultas volverán a buscar un nuevo hospedador y completarán el ciclo biológico. Estas garrapatas son conocidas como garrapatas de 2

hospedadores. En otras garrapatas, las denominadas como garrapatas de 1 hospedador, el desarrollo desde larva hasta adulto tiene lugar en el mismo hospedador, y únicamente las hembras fecundadas y repletas descenderán para realizar la puesta de los huevos en el medio ambiente.

I.1.3.2 Argasidae

Los argásidos muestran una remarcable diversidad en sus modelos de desarrollo y en el comportamiento alimenticio en comparación con los ixódidos. Su alimentación es rápida, excepto en las larvas de ciertas especies de *Argas* y *Ornithodoros*, y las hembras se alimentan y oviposicionan frecuentemente y tras la fecundación depositan una pequeña cantidad de huevos (menos de 500 huevos por ciclo) (Sonenshine 1993). En la mayoría de las especies, aquellas que parasitan a mamíferos y aves, las larvas se alimentan rápidamente (15-30 minutos), y tras descender mudarán, refugiadas en la arena o en grietas de su hábitat natural, al primer estadio de ninfa (N_1). Estas ninfas son semejantes a los adultos, pero carecen del poro genital, y tampoco se observará en ellas ninguna evidencia de dimorfismo sexual. Las N_1 buscarán un nuevo hospedador en el que alimentarse rápidamente, de forma similar a las larvas, para mudar a un segundo estadio de ninfa (N_2) en un lugar protegido. A continuación se volverán a repetir las transformaciones en los nuevos estadios ninfales, 5, 6 o incluso 7 mudas, hasta alcanzar el estadio adulto. El número de estadios ninfales que pueden producirse es variable, incluso en una misma especie, y depende de factores nutricionales, especialmente de la cantidad de sangre que ingieren en los estadios previos. En los argásidos, el paso por los diferentes estadios de ninfa contribuye a que el ciclo biológico sea más largo que en los ixódidos, además muchos de los argásidos pueden permanecer durante su desarrollo largos periodos en estado latente, por lo que su ciclo biológico puede prolongarse durante varios años.

En las garrapatas adultas *Argasidae*, la actividad sexual comienza tras emerger el último estadio de ninfa, y no necesitan ingerir sangre para que comience la gametogénesis, la cópula puede realizarse bien antes o bien después de la alimentación, si bien, es raro que se produzca mientras permanecen en el hospedador (Sonenshine y cols. 2002). Al igual que en el género *Ixodes*, las hembras no alimentadas no realizarán la puesta de huevos aunque la cópula haya tenido lugar, será tras la ingestión de sangre cuando comience la puesta de varios cientos de pequeños huevos. Tras finalizar la oviposición, las hembras hambrientas, buscarán un nuevo hospedador en el que alimentarse, volviendo a realizar una nueva puesta de huevos. El número de puestas varía considerablemente entre individuos de diferentes especies e incluso dentro de la misma especie, aunque es raro que sea superior a 6 (Sonenshine y cols. 2002). Este modelo de ciclos de oviposición, a menudo interrumpidos por la espera al nuevo hospedador, permite a los argásidos dispersar a su prole

gradualmente a lo largo del tiempo, pudiendo prolongarse durante varios años (Sonenshine 1991). La estrategia de los argásidos es muy diferente a la de los ixódidos, en los cuales toda la progenie de una hembra fecunda es producida en una masiva oviposición única.

En muchas de las especies de *Ornithodoros* que parasitan a los murciélagos, y en algunas especies de argásidos que lo hacen a las aves, las larvas permanecen fijadas al hospedador durante varios días, alimentándose de manera similar a las garrapatas ixódidas (Sonenshine 1991). Esta característica hace que estas especies de garrapatas tengan la oportunidad de ser dispersadas por los hospedadores a lugares lejanos. Como consecuencia de la gran ingesta de sangre realizada, las larvas repletas tendrán una reserva nutricional que permitirá a las ninfas N₁ convertirse en ninfas N₂ sin necesidad de alimentarse. El resto del ciclo biológico es similar al modelo general de la familia, descrito con anterioridad.

I.1.4 Ecología de las garrapatas exófilas.

Las garrapatas exófilas (no-nidícolas) son las especies de garrapatas que ocupan hábitats expuestos, como la vegetación por ejemplo; la mayoría se encuentran en bosques, sabanas, matorrales o praderas, otras permanecen enterradas en la arena o en suelos arenosos, debajo de piedras, en grietas, o en cualquier otro lugar al aire libre. La mayoría de las garrapatas *Ixodidae* son exófilas, al menos en algún estadio de su ciclo biológico. Por el contrario las garrapatas endófilas (o nidícolas) viven en espacios protegidos como las madrigueras y nidos de los hospedadores, o en refugios próximos a los mismos. Entre las garrapatas nidícolas se incluyen la mayoría de los argásidos y algunos de los ixódidos, especialmente especies pertenecientes al género *Ixodes* (Anderson y Magnarelli 2008, Sonenshine y cols. 2002). Las diferencias en la estrategia de búsqueda del hospedador, de comportamiento en la alimentación, de los parámetros de supervivencia, de los periodos de actividad y de otras adaptaciones necesarias para cada uno de estos dos tipos de existencia son enormes.

Las garrapatas exófilas deben ser capaces de protegerse por si mismas de los ambientes extremos, de interpretar las adecuadas señales externas para iniciar la búsqueda de los hospedadores, y de reconocer los periodos óptimos para iniciar las actividades de ecdisis y de oviposición. Deben ser también capaces de entrar en fases de diapausa como estrategia de supervivencia en periodos de condiciones ambientales adversas, y de protegerse frente a la desecación y de recuperar el agua perdida en los periodos en los que permanecen a la espera de los hospedadores. Estas y otras adaptaciones permiten a las garrapatas exófilas sobrevivir durante semanas e incluso meses mientras esperan a los hospedadores (Sonenshine 1991).

La mayoría de las garrapatas exófilas, especialmente aquellas que habitan en regiones templadas o subpolares, tienen un periodo de actividad bien definido para la búsqueda del hospedador. Durante estas fases algunas especies de garrapatas exhiben un comportamiento que les hace encaramarse a localizaciones favorables, como por ejemplo en las plantas herbáceas, donde poder engancharse al hospedador; otras sin embargo, caminarán o correrán por el suelo en busca del hospedador que ha invadido su zona (garrapatas cazadoras) como por ejemplo las del género *Hyalomma*. Las garrapatas que permanecen a la espera del hospedador son muy sensibles a los estímulos de los animales, especialmente al CO₂, NH₃ y al calor corporal. La duración del periodo de búsqueda del hospedador puede variar dependiendo del rango zoogeográfico de las especies, incluso los diferentes estadios de una especie de garrapata pueden buscar al hospedador a lo largo de diferentes periodos del año. Estos periodos de actividad están controlados por la respuesta de las garrapatas a los cambios de las condiciones ambientales. En las regiones templadas y subárticas, los cambios del fotoperiodo, la incidencia de la energía solar y la temperatura ambiental proporcionan las claves específicas que van a alterar el comportamiento de la garrapata e inducirla a iniciar la búsqueda del hospedador. En las regiones tropicales, donde las variaciones de la duración del día y de temperatura son menos pronunciadas, la alternancia entre la estación seca y lluviosa puede influir en la actividad de las garrapatas (Sonenshine y cols. 2002). Una vez iniciada la actividad de búsqueda del hospedador las garrapatas pueden permanecer en este estado durante días o semanas, hasta que la deshidratación corporal les obliga a abandonar la búsqueda y descender en busca de un microambiente más protegido y húmedo. El comportamiento de las garrapatas que se desplazan activamente hacia un hospedador es totalmente diferente, éstas permanecen escondidas en un microhábitat protegido que solo abandonarán en respuesta al estímulo del hospedador (Anderson y Magnarelli 2008, Sonenshine 1991).

1.1.5 Ecología de las garrapatas endófilas

Las garrapatas endófilas (nidícolas) viven en los nidos, madrigueras o cuevas utilizados por animales vertebrados o en sus proximidades, refugiados en grietas, cavidades, bajo rocas, o enterrados en los suelos polvorientos, arenosos o pedregosos (Anderson y Magnarelli 2008, Sonenshine 1991). Estas garrapatas requieren unas condiciones de temperatura y humedad muy precisas para poder sobrevivir y desarrollarse, las cuales serán un reflejo de las que presenten los nidos o madrigueras de sus hospedadores. A menudo la temperatura y humedad óptima es distinta para especies estrechamente relacionadas, pudiendo ser tan específicas como para poder ser incluidas en la definición de la especie (Sonenshine 1991). Las garrapatas endófilas exhiben un patrón de comportamiento inflexible que contribuye a mantenerlas en el hábitat elegido; estos tipos

de comportamiento incluyen típicamente el fototropismo negativo, el evitar condiciones atmosféricas que favorezcan la desecación, y un fuerte desarrollo del tigmotropismo. Las garrapatas nidícolas generalmente, son más longevas y más resistentes a la falta de ingestión de alimento, pudiendo sobrevivir durante varios años hasta la llegada de un hospedador adecuado (Sonenshine 1991).

Las garrapatas endófilas que parasitan a aves o murciélagos migratorios muestran una clara diapausa morfogénica en el desarrollo de su ciclo biológico, afectando especialmente a la oviposición, pudiendo retrasar la puesta de los huevos hasta el momento en que regresen los hospedadores (Gray 1991, Sonenshine y cols. 2002); sin embargo, las garrapatas que habitan en las madrigueras o nidos de animales no migratorios no muestran ningún patrón de actividad estacional.

En general, las garrapatas nidícolas responden a los mismos estímulos generados por el hospedador que las garrapatas exófilas, como por ejemplo al CO₂, al calor corporal y a varios olores, sin embargo, la percepción de estos estímulos es inferior a la de las garrapatas exófilas.

I.2 MÉTODOS DE CAPTURA DE GARRAPATAS

La recogida de garrapatas se plantea cuando se pretende realizar estudios de vigilancia epidemiológica sobre su presencia o ausencia en una zona o en un animal hospedador concreto. También cuando se quiere conocer la distribución de las diferentes especies en una localidad o área en particular, así como la actividad estacional, su abundancia relativa, etc. Para la captura de garrapatas se suelen emplear diferentes métodos, los cuales se suelen incluir en tres grupos: a) métodos de captura pasivos o por contacto directo, b) métodos de atracción a distancia, y c) métodos de recogida de garrapatas fijadas de los animales.

I.2.1 Captura de garrapatas por contacto directo con la vegetación

Los métodos más ampliamente empleados para la recogida de garrapatas no-alimentadas que permanecen al acecho del hospedador en la vegetación, son el de la bandera y el del arrastre de la manta. La bandera consiste en una gran pieza de sábana o tela, fijada sobre un largo mango a modo de bandera, que se arrastra sobre la vegetación. El tipo de tejido utilizado puede ser cualquiera, sin embargo es recomendable emplear material como la tela de mahón o similar. Este método es especialmente adecuado para el muestreo en áreas de matorral o arbolado muy denso, donde el arrastre de la manta presenta

dificultad. Este último método es similar al anterior, pero en este caso, la manta se arrastra por encima de la vegetación tirada por una cuerda atada en los dos extremos de la barra sobre la que se fija uno de los lados de la manta (Figura I.4). Este sistema es el ideal para superficies con una cubierta vegetal relativamente baja y uniforme. En la práctica, la diferencia entre ambos métodos es escasa, siendo a menudo empleados los términos “bandera” y “arrastre” indistintamente. Existen algunas variantes de estos métodos, una de ellas sería una sábana o manta cortada en tiras rectangulares, siendo adecuado su uso para el muestreo del interior de la vegetación cuando ésta es muy densa. Otra modificación consistiría en el arrastre de una tela de cuero fijada a una barra de 100 cm, unida en ángulo a un mango de 155 cm. Este sistema se utiliza también para la captura de garrapatas en áreas de denso matorral y de arbustos (Sonenshine 1993). En los diferentes sistemas, la manta o tela se revisa periódicamente y se determina el número de ejemplares capturados por unidad de tiempo o de superficie muestreada. Los métodos de arrastre o de bandera tradicionales tienen la ventaja de que permiten calcular de forma precisa la superficie en la que se han recogido las garrapatas.



Figura I.4. Método del arrastre de la manta para la captura de garrapatas activas en la vegetación.

Los sistemas de recogida de garrapatas anteriormente descritos deben llevarse a cabo en los periodos en los que la vegetación está seca, evitando los días de lluvia y el rocío de la mañana, puesto que la manta o la sábana para que sea eficaz debe estar seca. Se considera que estos métodos tienen una eficiencia de captura del 8% de la población de garrapatas presentes en el área de muestreo (Sonenshine 1993), variando este porcentaje de forma notable dependiendo de las especies presentes y también de la persona que

realiza el muestreo. La eficacia de estos métodos es considerada inferior a los métodos de atracción (Gray 1985b, Solberg y cols. 1992), sin embargo, se ha constatado que algunas especies de garrapatas como *Dermacentor variabilis* (Sonenshine 1993) o ciertos estadios de otras especies como los individuos adultos de *Ixodes dammini* (Ginsberg y Ewing 1989) no responden adecuadamente al estímulo del CO₂.

Entre las principales ventajas que presenta estos métodos de captura cabe citar la simplicidad (fácil de fabricar, de transportar, etc.) del método y la posibilidad de calcular la abundancia de garrapatas por unidad de tiempo o superficie. Por otro lado, como principal desventaja se debe mencionar la dificultad o bajo rendimiento en la captura de especies de garrapatas cazadoras como *Hyalomma* spp. o *Amblyomma* spp., y para garrapatas de especies que se encaraman a la vegetación para la búsqueda del hospedador pero que en el momento del muestreo han descendido al suelo (Ginsberg y Ewing 1989, Schulze y cols. 1997). Un problema adicional se presenta cuando se trata de capturar las larvas de las especies de garrapatas exófilas, puesto que al ocupar éstas las partes más bajas de la vegetación se ve dificultado el contacto con la manta (Gray 1985a).

Otro sistema pasivo, diferente a los anteriormente mencionados, de captura de garrapatas por contacto con la vegetación es la captura de garrapatas directamente sobre personas o animales (principalmente perros) tras haber transitado por la vegetación de una determinada zona. Consiste en realizar inspecciones frecuentes para recoger las garrapatas adheridas por contacto sobre la ropa de la persona o sobre el pelo del animal.

I.2.2 Recogida de garrapatas con dispositivos atrayentes

Entre los dispositivos atrayentes, el más ampliamente utilizado es la trampa de CO₂. Estas trampas atraen a las garrapatas que se encuentran a distancias de varios metros, desde 1 m para las ninfas hasta 3,5 m para los adultos de la especie *I. ricinus* (Gray 1985b). Este tipo de trampas está especialmente indicado para garrapatas “cazadoras” (Ginsberg y Ewing 1989, Schulze y cols. 1997, Solberg y cols. 1992), capaces de realizar desplazamientos rápidos de varios metros para alcanzar al hospedador, o para especies que responden adecuadamente al estímulo del CO₂, pudiendo reducir considerablemente el esfuerzo de recogida. En Irlanda, en áreas de elevada densidad de garrapatas, con los dispositivos de CO₂ se obtuvieron mejores resultados de captura de *I. ricinus* que empleando los métodos de la bandera y del arrastre de la manta (Gray 1985b). La trampa de CO₂ consiste en un contenedor térmico para nieve carbónica, con unas aperturas en la parte inferior para la difusión del CO₂, y de una plataforma con una cinta adhesiva en su parte superior, donde son atrapadas las garrapatas atraídas por el CO₂ (Figura I.5).

Entre los principales inconvenientes del empleo de las trampas de CO₂ cabría destacar como anteriormente se ha citado, que no todas las especies o algunos estadios de ciertas

especies de garrapatas responden activamente al estímulo del CO_2 , junto con las dificultades de tipo logístico (fabricación de las trampas, transporte hasta el lugar de muestreo y disponibilidad de la nieve carbónica) que conlleva su uso.

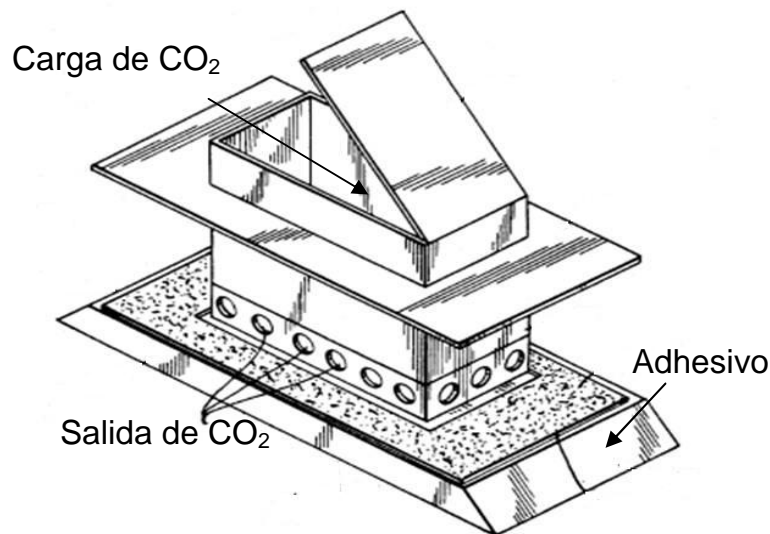


Figura I.5: Trampa de CO_2 .

I.2.3 Recogida de garrapatas de los hospedadores vertebrados

Las garrapatas pueden ser recogidas directamente de los animales (mascotas, animales silvestres y ganado doméstico) cuando están en pleno proceso de alimentación.

Las mascotas, generalmente, permiten una fácil manipulación por lo que las garrapatas pueden ser recogidas fácilmente del hospedador, debiéndose prestar especial atención a las orejas, cabeza y cuello. La retirada de la garrapata debe ser firme pero cuidadosa, evitando su rotura; con unas pinzas fuertes y de punta roma, para recoger ejemplares adultos, o con unas pinzas finas y de punta curvada en el caso de larvas o ninfas, se sujeta a la garrapata por el aparato bucal, lo más próximo posible a la piel del animal, y se tracciona hasta la retirada de la garrapata.

El examen de grandes ungulados salvajes suele realizarse cuando son abatidos en cacerías. Como norma, para el estudio de mamíferos de pequeño (micromamíferos) o mediano tamaño (carnívoros), se emplean trampas que permiten la captura del animal vivo (si el hospedador muere, las garrapatas se desprenden rápidamente del cadáver cuando se enfría). Los animales capturados deben ser anestesiados para facilitar la inspección y recogida de los ectoparásitos.

El ganado doméstico, generalmente, debe ser sujetado e incluso tranquilizado, para facilitar la recogida de las garrapatas (Figura I.6). A menudo, cuando el hospedador está extremadamente infestado y se procede a la recogida manual de larvas y ninfas, el tiempo de inspección necesario es muy grande y se corre el riesgo de que algunas garrapatas no

sean observadas. Algunos investigadores solucionan este problema dedicando un tiempo fijo a la inspección de cada animal y asegurando que las personas que lo realicen sean siempre las mismas. Otros, limitan la inspección a ciertas partes del cuerpo del animal, por ejemplo, la cabeza, el cuello y las orejas. Finalmente, muchos investigadores prefieren colocar a los animales (de mediano o pequeño tamaño) en una jaula de malla metálica sobre un recipiente con agua, donde se recogerán las garrapatas según se vayan desprendiendo del hospedador.



Figura I.6: Recogida de garrapatas sobre ganado doméstico (vacuno).

Para capturar garrapatas nidícolas, se puede proceder a su búsqueda y recogida directa de los lugares donde se hallan escondidas (grietas, bajo piedras, etc.) o se pueden recoger fragmentos de los refugios, nidos, madrigueras o cuevas donde se encuentran y posteriormente colocarlos en un embudo tipo *Berlese*. Por efecto del calor y la deshidratación, originados por la fuente incandescente del dispositivo, las garrapatas tenderán a escapar y podrán ser recogidas. Cuando se quiere muestrear madrigueras de animales y/o pequeñas cavidades se pueden utilizar dispositivos succionadores, los cuales recogen y separan las garrapatas del resto de materiales.

I.3 ESPECIES DE GARRAPATAS IDENTIFICADAS EN ESPAÑA

Como se mencionaba anteriormente, a nivel mundial se conocen 692 especies de garrapatas ixódidas, 186 especies de argásidos y una única especie perteneciente a la

familia *Nuttalliellidae* presente en África (Guglielmone y cols. 2009, Sonenshine 1991). En España, actualmente no se sabe cuáles son todas las especies existentes, pues todavía faltan bastantes zonas por muestrear. Podemos suponer que especies de garrapatas que han sido identificadas en países con características geoclimáticas y fitozoológicas similares a las de España, como Portugal o Francia, puedan estar también presentes aquí. Por otro lado, también se debe ser cauto con los nuevos descubrimientos, ya que podrían representar un hallazgo accidental (generalmente importadas por aves migratorias) y que no se encuentran establecidas en España (Estrada-Pena 1994). Un ejemplo de un posible error en la presencia de una determinada especie en España podría considerarse la descripción, por Neumann en 1989, de un único ejemplar (hembra alimentada) de *Amblyomma dubitatum* en el sur de España (Estrada-Peña y cols. 2002). Con posterioridad, han sido varios los intentos de volver a encontrar esta especie, sin embargo, no han tenido éxito. Este error de descripción se ha reproducido posteriormente en publicaciones acerca de las garrapatas presentes en España (Estrada-Peña y cols. 2002).

Tomando como base el Índice-Catálogo de Zooparásitos Ibéricos (Cordero del Campillo y cols. 1994), en la tabla I.1 se muestran las diferentes especies de garrapatas ixódidas y argásidas identificadas en España, obviando las descripciones de tipo puntual de algunas especies cuya distribución geográfica natural no se corresponde con España o países limítrofes. También se hace mención al lugar en que han sido encontradas y algunas de sus principales características biológicas (hospedadores habituales y tipo de ciclo biológico) y ecológicas (exófilas o endófilas).

De entre todas las garrapatas halladas en España haremos mención especial a *I. ricinus* (Figura I.7). Esta especie se encuentra distribuida por toda Europa, fue una de las primeras en ser descrita y ha sido estudiada intensamente por su papel como vector transmisor de numerosos patógenos para el ser humano y para sus animales domésticos. Como principales agentes zoonóticos podríamos citar al virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV), *B. burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia divergens*, *Babesia microti* o *Rickettsia helvetica* (Beati y cols. 1993, Danielova y cols. 2002, Koci y cols. 2007, Richter y Matuschka 2006, Rijpkema y cols. 1995, Skotarczak y cols. 2003, Skotarczak y Cichocka 2001).

I. ricinus parasita a un gran espectro de vertebrados (más de 300 especies) (Gern y Humair 2002), entre los que se encuentran mamíferos de pequeño y gran tamaño, aves y algunos reptiles (Estrada-Pena y cols. 2005, Matuschka y cols. 1991, Moran y cols. 2007, Moreno 1995). *I. ricinus* es una garrapata exófila de tres hospedadores, todos los estadios ascienden en la vegetación para poder transferirse al hospedador. Los estadios inmaduros (larvas y ninfas) se alimentan generalmente sobre micromamíferos, aves, reptiles,

mamíferos de tamaño medio e incluso de gran talla, mientras que los adultos tienen preferencia por animales de tamaño medio y grande (Gern y Humair 2002).

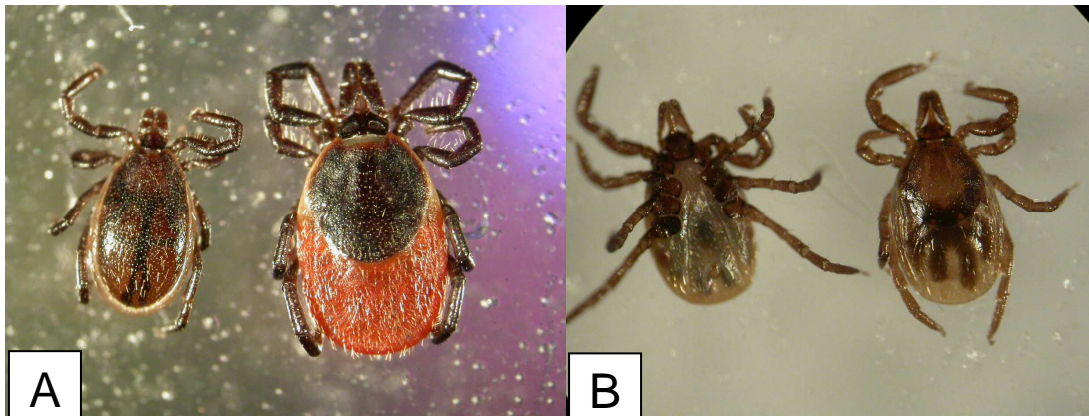


Figura I.7. Garrapatas de la especie *I. ricinus*.

A: Macho (izquierda) y hembra (derecha).

B: Ninfas, vista ventral (izquierda) y dorsal (derecha).

La distribución geográfica de *I. ricinus* está limitada por la vegetación, por la temperatura y especialmente por la humedad del ambiente, no pudiendo sobrevivir con una humedad relativa ambiental inferior al 80% (Anderson y Magnarelli 2008, Gray y cols. 2009). En los países del centro y norte de Europa, *I. ricinus* presenta una amplia distribución, siendo las condiciones de temperatura y humedad ambiental las que marcan el periodo de actividad, generalmente comprendido desde febrero-marzo hasta noviembre (Anderson y Magnarelli 2008, Gray y cols. 2009). Sin embargo, en los países de la cuenca mediterránea, como Francia, España, Italia, Grecia, Portugal y el norte de África presenta una distribución más restringida (Gilot y cols. 1975). En estos países, esta garrapata ocupará determinadas áreas que presenten una humedad relativa ambiental que permita la supervivencia y desarrollo de su población (Estrada-Pena y cols. 2004b).

El estudio de la actividad estacional de las poblaciones de *I. ricinus* tiene una gran importancia, ya que permitirá conocer mejor cuales son las épocas del año de mayor riesgo de exposición a los numerosos patógenos que puede transmitir esta especie de garrapata. Por otro lado, se ha observado también que los periodos de actividad de los diferentes estadios de estas garrapatas pueden determinar la existencia de una enfermedad en una zona. Un claro ejemplo lo encontramos en la TBE, zoonosis emergente en numerosos países del centro y del norte de Europa (Broker y Gniel 2003), que sin embargo no está distribuida de forma uniforme en todas las zonas donde esta garrapata está presente. *I. ricinus* es considerado el principal vector y reservorio del TBEV, el cual se mantiene en la naturaleza mediante la transmisión de las ninfas infectadas a las larvas no infectadas mientras se hallan alimentándose sobre un mismo roedor (Labuda y cols. 1996). Solamente cuando un elevado número de larvas se alimentan junto con las ninfas es posible la

transmisión y persistencia del virus (Randolph y cols. 1999), siendo por lo tanto necesario que ambos estadios desarrollen su actividad en sincronía.

El momento del inicio de la actividad de las ninfas y de los adultos de *I. ricinus* en primavera tiene lugar cuando la media semanal de la temperatura máxima diaria del aire se aproxima a 7°C (Gray 1984, Perret y cols. 2000), mientras que las larvas necesitan que se alcancen los 10° C (Randolph 2004).

Esta sincronía de actividad de larvas y ninfas está determinada por las condiciones climatológicas, siendo necesario que tras el periodo de inactividad invernal, se produzca un incremento rápido de la temperatura durante la primavera siguiente, que permita el inicio conjunto de la actividad a ambos estadios. En aquellas regiones en las que por sus características climáticas, las temperaturas invernales no descienden por debajo de los umbrales de actividad anteriormente mencionados, la actividad de las garrapatas no estará inhibida. Esto hace que la probabilidad de que el periodo de actividad de un número elevado de larvas coincida con las ninfas sea menor (Randolph 2004), y por lo tanto la supervivencia del TBEV no será posible.

Entre las 32 especies de garrapatas ixódidos documentadas en España (Tabla I.1), además de *I. ricinus*, se han encontrado otras 9 especies pertenecientes al género *Ixodes*, todas ellas de carácter endófilo y con ciclos biológicos de tres hospedadores. Incluidas en el género *Dermacentor* se han identificado dos especies, *Dermacentor reticulatus* y *Dermacentor marginatus*, distribuidas por todo el país y con un marcado carácter estacional, siendo su abundancia mayor en otoño-invierno. Dentro de este último género, en el Índice-Catálogo de Zooparásitos Ibéricos (Cordero del Campillo y cols. 1994) se describe una tercera especie, *Dermacentor niveus*, la cual no ha sido incluida en la tabla puesto que algunos autores consideran que se trataría de la misma especie que *D. marginatus* (Estrada-Peña, A. y Estrada-Peña, R. 1991). Los ixódidos del género *Haemaphysalis* también se hallan ampliamente distribuidos, sin embargo, *H. punctata*, *Haemaphysalis inermis* y *Haemaphysalis concinna*, son más abundantes en las regiones más húmedas y templadas, mientras que *Haemaphysalis sulcata* y *Haemaphysalis hispanica* ocupan regiones más cálidas y secas. De forma similar, las 10 especies de *Hyalomma* presentes en España se hallan distribuidas en las regiones de clima mediterráneo. Finalmente, pertenecientes al género *Rhipicephalus* se han identificado 5 especies, de las cuales tres (*Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus sanguineus*, y *Rhipicephalus turanicus*) se hallan distribuidas por todo el país, mientras que las dos restantes se encuentran principalmente en regiones de clima mediterráneo.

Tabla I.1: Especies de garrapatas identificadas en España, distribución geográfica y principales características biológicas (hospedadores habituales y tipo de ciclo biológico) y ecológicas.

Garrapata	Distribución	Hospedador	Ciclo biológico	Ecología
<i>Dermacentor</i> spp.				
<i>D. marginatus</i>	General	Lagomorfos, ungulados, micromamíferos, perro	Trifásico	Endófila (L, N) Exófila (A)
<i>D. reticulatus</i>	Burgos, Córdoba, Galicia, La Rioja, Huesca, Menorca, Navarra, País Vasco, Salamanca	Carnívoros, ungulados	Trifásico	Endófila (L, N) Exófila (A)
<i>Haemaphysalis</i> spp.				
<i>H. concinna</i>	Asturias, País Vasco	Pequeños mamíferos, aves, ungulados	Trifásico	Exófila
<i>H. hispanica</i>	Ciudad Real, Córdoba, Huesca, Jaén, Madrid, País Vasco, Zaragoza	Lagomorfos, aves, ungulados, erizo, perro, murciélago, lagartija	Trifásico	Endófila-Exófila
<i>H. inermis</i>	Barcelona, Burgos, Cantabria, Gerona, La Rioja, Navarra, País Vasco, Soria	Ungulados	Trifásico	Endófila (L, N) Endófila-Exófila (A)
<i>H. punctata</i>	Albacete, Andalucía, Aragón, Baleares, Canarias, Cantabria, Castilla-León, Cataluña, Cuenca, Extremadura, Galicia, La Rioja, País Vasco	Ungulados, carnívoros, liebre, ardilla roja, erizo, urraca	Trifásico	Exófila
<i>H. sulcata</i>	Andalucía, Burgos, Canarias, Castellón, Guipúzcoa, Huesca, Madrid, Navarra	Ungulados	Trifásico	Endófila (L, N) Endófila-Exófila (A)
<i>Hyalomma</i> spp.				
<i>H. aegyptium</i>	Córdoba, Málaga	Vaca, oveja, cerdo	Trifásico	Exófila
<i>H. anatolicum</i>	Jaén	Jabalí	Trifásico	Exófila
<i>H. excavatum</i>	Andalucía, León, Menorca, Pirineos Orientales	Ratón de campo, aves, cerdo	Trifásico	Exófila
<i>H. detritum</i>	Barcelona, Córdoba, Gran Canaria, Huesca, Madrid, Salamanca	Vaca, cerdo	Difásico	Exófila
<i>H. dromedarii</i>	Canarias	Dromedario	Difásico- Trifásico	Exófila
<i>H. impresum</i>	Salamanca, Sevilla	Vaca	Trifásico	Exófila
<i>H. lusitanicum</i>	Albacete, Andalucía, Asturias, Baleares, Burgos, Canarias, Ciudad Real, Extremadura, Madrid, Navarra, Toledo, Salamanca, Segovia, Zamora	Ungulados, lagomorfos, perro, lirón careto	Trifásico	Endófila-Exófila
<i>H. marginatum</i>	Andalucía, Baleares, Ciudad Real, Extremadura, León, Madrid, Navarra, Salamanca, Zamora, Zaragoza	Ungulados, carnívoros, aves	Difásico- Trifásico	Endófila-Exófila
<i>H. rufipes</i>	Córdoba	Vaca	Difásico	Endófila-Exófila
<i>H. truncatum</i>	Canarias	Perro	Difásico- Trifásico	Endófila (L, N) Endófila-Exófila (A)

Tabla I.1. (Continuación).

Garrapata	Distribución	Hospedador	Ciclo biológico	Ecología
<i>Ixodes</i> spp.				
<i>I. acuminatus</i>	Asturias, Cantabria, Córdoba, Granada, Madrid, Zamora	Roedores, insectívoros	Trifásico	Endófila
<i>I. bivari</i>	Extremadura	Conejo silvestre	Trifásico	Endófila
<i>I. canisuga</i>	Aragón, Barcelona, Burgos, Cáceres, Huelva, La Coruña, Navarra, Salamanca, Toledo	Carnívoros, jabalí, ardilla roja	Trifásico	Endófila
<i>I. frontalis</i>	Aragón, Canarias, Granada, País Vasco, Salamanca, Zamora	Aves	Trifásico	Endófila
<i>I. hexagonus</i>	Aragón, Burgos, Cantabria, Cataluña, Córdoba, Galicia, Granada, Huelva, La Rioja, Madrid, País Vasco	Carnívoros, oveja, perdiz, erizo, quirópteros	Trifásico	Endófila
<i>I. ricinus</i>	General	Ungulados, carnívoros, lagomorfos, roedores, insectívoros, aves, quirópteros	Trifásico	Exófila
<i>I. simplex</i>	Aragón, Barcelona, Cantabria, La Rioja, Tarragona, Valencia	Micromamíferos, quirópteros	Trifásico	Endófila
<i>I. trianguliceps</i>	Aragón, Asturias, Burgos, Cantabria, León, La Rioja, País Vasco	Roedores, insectívoros	Trifásico	Endófila
<i>I. ventraloi</i>	Barcelona, Baleares, Burgos, Ciudad Real, Granada, Huelva, Huesca, Jaén, Madrid, País Vasco, Zaragoza	Roedores, insectívoros, lagomorfos, aves, carnívoros	Trifásico	Endófila
<i>I. vespertilionis</i>	Alicante, Aragón, Asturias, Barcelona, Cádiz, Cantabria, Castilla-La Mancha, Córdoba, Madrid, Navarra, País Vasco	Quirópteros	Trifásico	Endófila
<i>Rhipicephalus</i> spp.				
<i>R. sanguineus</i>	General	Carnívoros, ungulados, roedores, lagomorfos, erizo, avutarda, hombre	Trifásico	Endófila (L, N) Endófila-Exófila (A)
<i>R. turanicus</i>	Aragón, Ávila, Burgos, Cataluña, Extremadura, Granada, Guadalajara, Huelva, Jaén, León, Madrid, Menorca, País Vasco, Salamanca	Ungulados, lagomorfos, carnívoros, roedores, erizo	Trifásico	Endófila (L, N) Exófila (A)
<i>R. bursa</i>	General	Lagomorfos, ungulados, carnívoros, erizo, hombre	Difásico	Endófila (L, N) Endófila-Exófila (A)
<i>R. pusillus</i>	Álava, Alicante, Andalucía, Aragón, Barcelona, Burgos, Ciudad Real, Madrid, Salamanca, Segovia	Ungulados, carnívoros, lagomorfos, rata gris	Trifásico	Endófila
<i>R. (B.) annulatus</i>	Andalucía, Badajoz, Cataluña, Menorca	Ungulados, carnívoros, hombre	Monofásico	Exófila

Tabla I.1. (Continuación).

Garrapata	Distribución	Hospedador	Ciclo biológico	Ecología
Argas spp.				
<i>A. gilcolladoi</i>	Zaragoza	Buitre leonado	Desconocido	Desconocido
<i>A. reflexus</i>	Andalucía, Barcelona, Burgos, Madrid, Salamanca, Toledo, Zaragoza	Paloma, vencejo	Polifásico	Endófila
<i>A. vesperilionis</i>	Alicante, Aragón, Barcelona, Cádiz, Canarias, Ciudad Real, Cuenca, Granada, La Rioja, Madrid, Mallorca, Soria, Tarragona, Valencia	Quirópteros	Polifásico	Endófila
<i>A. persicus</i>	Andalucía, Badajoz, Barcelona, Madrid, Salamanca, Toledo	Gallina, rata gris	Trifásico	Exófila
<i>A. transgaripepinus</i>	Cataluña, Granada, Teruel	Quirópteros	Desconocido	Desconocido
Ornithodoros spp.				
<i>O. coniceps</i>	Burgós, Madrid	Paloma	Polifásico	Exófila
<i>O. erraticus</i>	Andalucía, Ávila, Extremadura, Salamanca, Toledo	Cerdo, hombre (accidental)	Polifásico	Endófila-Exófila
<i>O. salahi</i>	Barcelona	Murciélago	Polifásico	Exófila

I.4 ENFERMEDADES TRANSMITIDAS POR GARRAPATAS

Aun cuando las garrapatas habían sido estudiadas desde la antigüedad, no fue hasta el siglo XIX cuando se demostró por primera vez su capacidad de transmisión de enfermedades infecciosas, ya que fueron Smith y Kilbourne quienes demostraron que *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* transmitía el protozoo *Babesia bigemina* (Smith y Kilbourne 1893). A comienzos del siglo XX, las garrapatas fueron implicadas como vectores de varias enfermedades bacterianas humanas. Así, en 1906, Ricketts demostró que la garrapata *Dermacentor andersoni* estaba involucrada en la transmisión de *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico de la fiebre manchada de las Montañas Rocosas (Ricketts 1991). En 1910 fueron descritos los primeros casos de fiebre botonosa mediterránea en Túnez (Conor y Bruch 1910), y posteriormente en 1930, fue establecido el papel de *R. sanguineus* en la transmisión de la enfermedad (Brump 1932). Después de la segunda guerra mundial, fueron descritas numerosas enfermedades víricas, protozoarias y bacterianas transmitidas por garrapatas a los animales y a las personas (Sonenshine 1993). Más recientemente, en la década de 1980 fue descrita la enfermedad de Lyme, causada por la espiroqueta *B. burgdorferi* sensu lato (Burgdorfer y cols. 1982), y considerada como la principal enfermedad transmitida por garrapatas en Europa y Estados Unidos. Más recientemente, han sido descritas numerosas rickettsiosis transmitidas por garrapatas en todo el mundo (Raoult y

Roux 1997), y además, otras bacterias del género *Ehrlichia* y *Anaplasma* han sido reconocidas como agentes patógenos para las personas tanto en Estados Unidos como en Europa (Walker y Dumler 1996), si bien se conocían sus efectos patógenos en animales domésticos desde 1932 (Dumler y cols. 2005).

Las garrapatas además de transmisoras de patógenos, pueden ser también reservorios de éstos. Éste es el caso de las rickettsias del grupo de las fiebres manchadas, de la bacteria causante de la fiebre Q (*Coxiella burnetii*), o de las borrelias causantes de la fiebre recurrente. En estos casos la bacteria se transmite transestadialmente (de larvas a ninfas y de ninfas a adultos) y transováricamente (de una generación a la siguiente a través de los ovarios de la hembra, de forma que la larva eclosiona ya infectada). Cada especie de garrapata requiere de unas condiciones ambientales y biotopos óptimos, lo que determinará la distribución geográfica de las garrapatas, y por lo tanto, las áreas de riesgo para las diferentes enfermedades transmitidas.

Tres aspectos son esenciales para la comprensión del modo en el cual un agente patógeno es transmitido por las garrapatas, así como sus consecuencias epidemiológicas:

- Algunos agentes, como por ejemplo las rickettsias, se multiplican en casi todos los órganos y fluidos de las garrapatas, en particular en las glándulas salivares y en los ovarios, lo cual permitirá la transmisión de los organismos durante la alimentación y transováricamente, respectivamente. Otras bacterias, como los simbiosomas de las garrapatas, pueden transmitirse transováricamente pero no invaden las glándulas salivares de la garrapata hospedadora, por lo que no serán transmitidas a los vertebrados hospedadores susceptibles ni producirán la enfermedad (Niebylski y cols. 1997).
- Cada estadio de las garrapatas ixódidas se alimenta una sola vez, por lo que un agente patógeno adquirido durante este periodo de alimentación solo podrá ser vehiculado a un nuevo hospedador después de producirse la muda al siguiente estadio. No todas las especies pertenecientes a un mismo género son capaces de transmitir los agentes transestadialmente; por ejemplo, no todas las garrapatas del género *Ixodes* infectadas con *B. burgdorferi* transmiten la bacteria de un estadio al siguiente (Parola y Raoult 2001b).
- Si un agente es transmitido transestadial y transováricamente en una especie de garrapata, ésta será también su reservorio, y la distribución de la enfermedad originada por el agente será similar a la de la garrapata hospedadora.

Las garrapatas pueden, ocasionalmente, adquirir una bacteria por co-alimentación (del inglés *co-feeding*) es decir, cuando varias garrapatas se alimentan en el hospedador en estrecha proximidad puede producirse el paso directo de la bacteria de una garrapata

infectada a otra no infectada (Randolph y cols. 1996). La transmisión sexual de la bacteria de un macho infectado a una hembra solo ha sido descrita en algunas rickettsias y en algunas especies de borrelias del grupo de las fiebres recurrentes (Raoult y Roux 1997).

Para cada enfermedad pueden existir una o varias garrapatas vectora y uno o varios reservorios. Los animales hospedadores para actuar como reservorios eficaces de la enfermedad, deben ser susceptibles al microorganismo, y además éste, debe permanecer durante un periodo prolongado de tiempo en la sangre del animal. La infectividad del hospedador reservorio, la tasa de infección de las garrapatas, y la densidad de hospedadores son las principales variables que determinan la epidemiología de las enfermedades transmitidas por garrapatas. Este grupo de enfermedades están influenciadas por diversos factores fisiológicos y ambientales, que incluyen la preferencia que muestran los diferentes estadios de las garrapatas por un determinado hospedador, el grado de contacto garrapata-hospedador, la actividad estacional de ambos, la susceptibilidad del hospedador al microorganismo, las condiciones ambientales y el estado inmunitario del hospedador. La proporción de garrapatas que adquieran la infección aumentará con la duración del tiempo que permanezca fijada al hospedador reservorio mientras se alimenta, como es el caso de las infecciones por *B. burgdorferi* (Piesman y cols. 1987).

I.4.1 Zoonosis transmitidas por garrapatas

Tal y como se menciona con anterioridad, las garrapatas han sido descritas como vectores de enfermedades bacterianas humanas desde principios del siglo XX. El mayor impacto sobre la Salud Pública en Estados Unidos y Europa fue a raíz de la descripción de un nuevo agente, *B. burgdorferi*, agente etiológico de la enfermedad de Lyme en 1982 (Burgdorfer y cols. 1982). Desde entonces, han sido descritas nuevas especies o subespecies patógenas de rickettsias, ehrlichias, anaplasmas y del complejo *B. burgdorferi* (Parola y cols. 2005a, Parola y Raoult 2001b).

Las garrapatas pueden fijarse en el hombre en numerosas partes del cuerpo, pero es más frecuente encontrarlas alrededor de la cabeza y el cuello y en la ingle; se ha observado también que las diferentes especies de garrapatas tienen preferencia por fijarse en determinadas partes del cuerpo (Parola y Raoult 2001b). Es destacable también, el hecho de que generalmente los ixódidos no causan dolor cuando se fijan o mientras se alimentan, y que los estadios inmaduros frecuentemente no son detectados en las personas por su pequeño tamaño. El incremento del riesgo de transmisión de enfermedad con el aumento del tiempo de fijación ha sido demostrado para las rickettsias del grupo de las fiebres manchadas y para *B. burgdorferi* (Raoult y Roux 1997, Sonenshine 1993).

Entre los factores que influyen en la tasa de infección humana por enfermedades transmitidas por garrapatas, se incluye la abundancia de las garrapatas vectoras y su tasa de infección, su predisposición para alimentarse en las personas (Estrada-Peña y Jongejan 1999), y la abundancia de sus hospedadores habituales. Factores humanos, como la probabilidad de que las personas entren en contacto con los biotopos en los que se hallan las garrapatas, y la susceptibilidad a la bacteria también tienen importancia (Jongejan y Uilenberg 2004, Parola y Raoult 2001b).

Entre los factores que influyen en la emergencia de las enfermedades transmitidas por garrapatas en los últimos años (Jongejan y Uilenberg 2004, Parola y Raoult 2001b), se puede citar en primer lugar, la mayor implicación de los médicos de la asistencia primaria, con exploraciones físicas y analíticas laboratoriales más completas, acompañadas de una historia clínica muy minuciosa. Segundo, el avance de las técnicas de biología molecular ha permitido la descripción, con mayor facilidad, de nuevos agentes patógenos emergentes e investigar su epidemiología por todo el mundo. Tercero, la mejora de los sistemas de cultivo laboratorial han permitido descubrir nuevas especies de bacterias implicadas en enfermedades humanas. Finalmente, los posibles cambios socioeconómicos acontecidos en los últimos años han podido dar lugar a un aumento de las actividades al aire libre en la naturaleza, y favorecer el auge del turismo rural o a zonas remotas, resultando en un incremento del contacto con las garrapatas y con los patógenos transmitidos, algunos de ellos exóticos (Jongejan y Uilenberg 2004, Parola y Raoult 2001a, Telford, III y Goethert 2004).

El origen y la diseminación de las zoonosis bacterianas transmitidas por garrapatas ha sido objeto de numerosas hipótesis entre las que se incluye el concepto de coevolución de los microorganismos, las garrapatas y los animales hospedadores (Korch 1994). Las zoonosis transmitidas por garrapatas están localizadas geográficamente, y tienen lugar únicamente en lugares que reúnen unas condiciones óptimas para las garrapatas y para los animales involucrados en la circulación de las bacterias patógenas. En este marco específico, los vectores y los hospedadores están sujetos a una presión selectiva que les lleva a la coevolución. Esto estaría avalado por la distribución continental de muchas zoonosis transmitidas por garrapatas, un ejemplo serían las enfermedades rickettsiales causadas por *R. rickettsii* en América y por *Rickettsia conorii* desde el sur de Europa hasta el suroeste de Asia (Raoult y Roux 1997). Numerosas causas pueden alterar estas asociaciones, incluidos los cambios macroclimáticos, la urbanización y la deforestación (Lindgren y cols. 2000, Telford, III y Goethert 2004). La diseminación de las zoonosis transmitidas por garrapatas requiere de la dispersión del vector y/o del hospedador reservorio (Korch 1994). Para que un proceso infeccioso pueda mantenerse en una nueva área, la garrapata vectora o el hospedador reservorio deben encontrar nuevos

hospedadores o garrapatas, respectivamente, que sean susceptibles a las infecciones y que puedan mantener el organismo patógeno. Las garrapatas pueden moverse por la vegetación, pero sólo pequeñas distancias que raramente superarán los 50 metros; sin embargo, pueden ser diseminadas a largas distancias por el vertebrado hospedador mientras permanecen fijadas en él, especialmente en el caso de aves o mamíferos migratorios (Ogden y cols. 2008, Sonenshine 1991, Sonenshine 1993). El hombre puede también influir en la dispersión de las garrapatas a través de prácticas agrícolas o modificando el hábitat de las garrapatas o mediante el transporte de ganado a grandes distancias (Jongejan y Uilenberg 2004). Todavía están por determinar las razones de la distribución de algunas enfermedades transmitidas por garrapatas. Por ejemplo, la garrapata de la especie *R. sanguineus* es vector y potencial reservorio de *R. conorii*, el agente etiológico de la fiebre botonosa mediterránea en Europa y África; sin embargo, aun cuando esta especie de garrapata está distribuida por todo el mundo, incluido Estados Unidos, la infección por *R. conorii* nunca ha sido descrita allí (Parola y Raoult 2001b).

Algunas garrapatas son capaces de transmitir varias bacterias patógenas, es el caso de *Ixodes scapularis* en Estados Unidos e *I. ricinus* en Europa, donde actúan como vectores de *B. burgdorferi* sensu stricto y del agente de la anaplasmosis granulocítica humana (AGH), y pueden también transmitir el TBEV o la babesiosis. Por lo tanto, la posibilidad de que estas garrapatas puedan estar infectadas por los múltiples agentes existe (Halos y cols. 2006, Holman y cols. 2004, Wielinga y cols. 2006), y las personas podrán adquirir varios de estos microorganismos (Krause y cols. 2002, Mitchell y cols. 1996, Rolain y cols. 2005) si son picadas por estas garrapatas.

I.4.2 Bacterias detectadas sólo en las garrapatas. “Endosimbiontes”.

Numerosas bacterias han sido encontradas asociadas regularmente con los artrópodos, incluidas las garrapatas, y han sido denominadas simbiontes (literalmente “viviendo juntos”), microsimbiontes, o endosimbiontes (viviendo en simbiosis endocelular). Estas bacterias pueden tener un efecto negativo o positivo, o no tener ningún efecto en el artrópodo hospedador. Los géneros *Wolbachia*, *Rickettsia* y *Francisella* incluyen, entre sus miembros, simbiontes que se mantienen en las garrapatas transmitiéndose transestadial y transováricamente. Aun no ha sido posible determinar si muchos de estos simbiontes son patógenos para el ser humano. El hecho de que estos organismos estén localizados únicamente en los ovarios de los artrópodos hospedadores, hace que difícilmente puedan ser transmitidos a las personas durante la alimentación (Raoult y Roux 1997).

Todas las bacterias endosimbiontes que han sido aisladas hasta el momento únicamente en garrapatas, particularmente de especies antropofílicas, deberían ser consideradas como potenciales patógenos humanos. Cabe recordar, que bacterias como *C.*

burnetii, *Rickettsia slovaca* y *Rickettsia africae* fueron primero aisladas de garrapatas y consideradas como rickettsias no patógenas hasta que fueron aisladas de casos clínicos humanos (Raoult y Roux 1997).

I.5 ENCEFALITIS VIRICA TRANSMITIDA POR GARRAPATAS

La encefalitis vírica transmitida por garrapatas (o TBE “*Tick-Borne Encephalitis*”) es una zoonosis de gran importancia sanitaria en el norte, centro y este de Europa y en diferentes países de Asia. Es transmitida al hombre, principalmente, por la picadura de garrapatas del género *Ixodes* (*I. ricinus* e *I. persulcatus*), aunque ocasionalmente la infección también puede tener lugar a través de la ingestión de leche de animales infectados (Charrel y cols. 2004, Dumpis y cols. 1999). La primera alusión histórica de una enfermedad similar a una TBE aparece en las islas Aland (Finlandia) en el siglo XVIII. La descripción médica de la enfermedad no tiene lugar hasta el año 1931 en Austria, cuando Schneider observó en una región del sur de Viena la incidencia estacional de una enfermedad que cursaba con una meningitis aguda, que denominó “*Epidedemische akute Meningitis serosa*” (Schneider 1931); sin embargo, el agente causal no se aisló hasta 1937, en una región del este de Rusia. En Europa el primer aislamiento del virus se produce en 1948 en Checoslovaquia, posteriormente la enfermedad y/o el virus aparece en numerosos países europeos y más tarde en el norte de China y de Japón (Kunz y Heinz 2003). Debido al reconocimiento gradual de TBE en las diferentes regiones, la enfermedad ha recibido diferentes denominaciones:

- Encefalitis rusa de primavera-verano
- Encefalitis del lejano Oriente
- Encefalitis de la Taiga
- Fiebre láctea bifásica
- Encefalitis centroeuropea
- Enfermedad de Kumlinge
- Frühsommer-Meningoenzephalitis

I.5.1 Virología

El virus de TBE (TBEV “*tick-borne encephalitis virus*”) es un arbovirus perteneciente a la familia *Flaviviridae*, la cual comprende tres géneros: *Flavivirus*, *Pestivirus* y *Hepacivirus*. El género *Flavivirus* puede ser reagrupado en virus transmitidos por garrapatas, virus

transmitidos por mosquitos y virus transmitidos por vectores artrópodos desconocidos. Como su propio nombre indica el TBEV se encuentra dentro del grupo de virus transmitidos por garrapatas, el cual se halla genéticamente subdividido en tres subtipos: el Europeo (TBEV-Eu), el del Extremo Oriente (TBEV-FE) y el Siberiano (TBEV-S).

Los flavivirus presentan una forma esférica con un diámetro aproximado de 50 nm que contiene solamente tres proteínas estructurales asociadas respectivamente a la envoltura, a la membrana y a la cápside. Su genoma está constituido por una molécula monocatenaria lineal de ARN de polaridad positiva de alrededor de 10,5 kb, y se halla flanqueado en los extremos por dos cortas regiones 5' y 3' no codificantes (Heinz y Mandl 1993, Wallner y cols. 1995, Wallner y cols. 1996).

I.5.2 Epidemiología

La TBE está considerada como una enfermedad endémica en numerosas regiones del centro y este de Europa donde se hallan distribuidos sus principales vectores transmisores, *I. ricinus* e *I. persulcatus*. A lo largo de las tres últimas décadas, la incidencia de la enfermedad ha aumentado de manera importante en estos países (Suss 2008). Más recientemente se ha documentado la aparición de casos entre la población de nuevas regiones (Ergunay y cols. 2007, Herpe y cols. 2007, Skarpaas y cols. 2004), lo cual indicaría que la enfermedad se halla en expansión.

El TBEV ocupa zonas endémicas bien delimitadas, denominados focos naturales. En Europa y los países bálticos, la prevalencia de infección detectada en *I. ricinus* dentro de estos focos naturales es del orden del 0,1-5% (Lindquist y Vapalahti 2008). Para que exista un foco natural es necesaria por una parte una elevada densidad de garrapatas *Ixodes*, y por otra parte una gran densidad de hospedadores vertebrados como los roedores para mantener la circulación del virus, y de grandes mamíferos que sustenten la población de garrapatas (Labuda y cols. 1996). Los ratones del género *Apodemus* son considerados como los principales hospedadores amplificadores del virus (Labuda y cols. 1997). Se denominan "hospedadores amplificadores" más que hospedadores reservorios por la corta duración, generalmente 2-3 días, de la fase virémica.

Las garrapatas pueden permanecer infectadas a lo largo de toda su vida, pudiendo transmitirse el virus de un estadio al siguiente. La transmisión transovárica, de hembras infectadas a los huevos, y posteriormente a las larvas, aunque puede producirse, tiene una baja eficiencia, este hecho junto a la elevada tasa de mortalidad de las garrapatas hace imposible la supervivencia del virus en la naturaleza a través de esta ruta (Randolph 2004). El ciclo del TBEV se mantiene por la transmisión del virus entre las ninfas infectadas y las larvas sin infectar mientras se están alimentando juntas en el mismo roedor (co-

alimentación). En este caso, la infección local en las células de Langerhans de la piel del hospedador, más que la vía sistémica, sirve como fuente de entrada del virus en las larvas que se encuentran alimentándose en ese momento (Labuda y cols. 1996). Para que el TBEV pueda mantenerse en la naturaleza, debe de tener lugar un alto grado de co-alimentación entre las larvas y las ninfas en el mismo hospedador, esto dependerá de las condiciones medioambientales que aseguren la sincronía estacional de ambos estadios (Randolph 2000). Estas condiciones tienen lugar cuando se produce una subida rápida de la temperatura durante la primavera (Randolph y cols. 2000). Este hecho no se ha observado que ocurra en todos los lugares en los que se halla distribuido *I. ricinus*, lo cual explicaría en parte que la distribución del TBEV sea más focal que la distribución de su vector (Randolph y Rogers 2000).

La estacionalidad de la aparición de la enfermedad entre la población humana no depende principalmente de la abundancia de garrapatas. Los factores más importantes que afectan al riesgo de adquirir la infección, son la prevalencia del TBEV en las garrapatas y por otro lado las actividades humanas que facilitan el contacto con las garrapatas infectadas (Randolph y cols. 2008). Así, los hábitos y costumbres humanos tienen gran influencia en la distribución estacional de la enfermedad (Randolph 2001), ya que frecuentemente la infección es adquirida en los meses en los que las condiciones climatológicas favorecen el desarrollo de actividades al aire libre (Randolph y cols. 2008).

El consumo de leche no pasteurizada o de sus derivados procedentes de rebaños caprinos, ovinos o bovinos infectados por el virus (Charrel y cols. 2004) también puede suponer un riesgo de infección para las personas.

1.5.3 Manifestaciones clínicas

Tras la picadura, el virus comienza a replicarse en el punto de inoculación, y posteriormente tiene lugar su propagación a través del sistema linfático. La diseminación del virus por el cuerpo (fase virémica) constituye la primera fase de la enfermedad. La segunda fase se caracteriza por la propagación del virus por el sistema nervioso central (SNC), donde su replicación origina inflamación, lisis y alteración del funcionamiento de las células nerviosas (Dumpis y cols. 1999).

En el 70-90% de las personas infectadas la infección cursa de forma asintomática. En los casos de enfermedad y durante la fase virémica, tras 3-14 días del comienzo de la infección, aparecen síntomas pseudo-gripales (fatiga, cefalea, dolores músculo-esqueléticos y fiebre) que duran entre 1 y 8 días. La enfermedad evoluciona generalmente hacia su resolución total; sin embargo, en un 10% de los pacientes, tras un intervalo de aproximadamente 8 días, se inicia la segunda fase que afecta al SNC, pudiendo producir meningitis, meningoencefalitis o meningoencefalomielitis. La recuperación del paciente

puede tardar varios meses, siendo el pronóstico generalmente bueno, aunque un número importante de personas afectadas puede sufrir secuelas durante un periodo prolongado, tales como parálisis, vértigos, problemas sensoriales, etc. (Dumpis y cols. 1999).

No existe un tratamiento específico para la TBE, por lo que la inmunoprofilaxis mediante la vacunación constituye el mejor método preventivo. El protocolo de vacunación comprende tres inyecciones iniciales y una dosis de recuerdo cada 3-5 años, confiriendo una protección adecuada al menos en el 95% de los casos (Dumpis y cols. 1999, Lindquist y Vapalahti 2008, Rendi-Wagner 2004).

I.5.4 Diagnóstico

Las manifestaciones clínicas de la TBE no son específicas, por lo que su diagnóstico debe ser establecido en el laboratorio. El diagnóstico laboratorial se basa en la demostración de la presencia de anticuerpos específicos, los cuales no serán detectables hasta el inicio de la segunda fase clínica de la enfermedad, en la que se produce un rápido incremento del título de anticuerpos. Actualmente la técnica serológica de elección para la detección de IgM específicas frente a TBE y de los anticuerpos IgG en muestras de sangre y líquido cerebroespinal es el ELISA. Esta técnica presenta una limitación en su uso debido a la reacción cruzada que se produce con los anticuerpos originados por la infección de otros flavivirus o por los producidos por la vacunación frente a estos (Dumpis y cols. 1999, Saksida y cols. 2005, Schwaiger y Cassinotti 2003).

El virus puede ser aislado mediante cultivos celulares, o detectado por métodos moleculares mediante la transcripción inversa seguida de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), a partir de muestras de sangre o de líquido cerebroespinal tomadas durante la fase virémica de la enfermedad, o directamente a partir de muestras de encéfalo de pacientes ya fallecidos (Saksida y cols. 2005, Schwaiger y Cassinotti 2003). También es el método de elección para la detección del TBEV en las garrapatas.

I.5.5 Situación en España

Hasta el momento no se ha descrito ningún caso autóctono de TBE entre la población española (Donoso y cols. 2008, Suss 2008). El primer estudio epidemiológico realizado para detectar la enfermedad en España fue realizado por Garea y Filipe en 1977 entre habitantes del noroeste del país, no encontrando ninguna reacción positiva en el test de la inhibición de la hemaglutinación (HI) para TBE. Es en 1980 cuando se describe por primera vez en España la posible presencia de encefalitis por flavivirus entre la población del sur del país, encontrando un 6% de reacciones positivas en el test HI para el virus Louping-ill (LIV) (Lozano 1980). Al mismo tiempo, en un estudio realizado con 386 micromamíferos capturados en nueve localizaciones diferentes, se encontró un ejemplar (0,3%) que mostró

reacción positiva (título 1/40) en el test HI para TBE (Chastel y cols. 1980). Sin embargo, este resultado debe ser considerado con cautela, puesto que el animal positivo reaccionó también frente a otros flavivirus, por lo que podría tratarse de una reacción cruzada.

El estudio serológico más reciente realizado en España data de 1991 en el cual se analizaron con un test de ELISA para TBE (EnzyQuick FSME, Inmuno, Austria), 700 sueros humanos procedentes del País Vasco (Juste y cols. 1997a). Solamente uno (0,1%) de los sueros cumplió los requisitos especificados por el fabricante del test para ser considerado como positivo. Esta baja seroprevalencia sugiere que el contacto de las personas con el TBEV es poco frecuente en esta región. Sin embargo, si se tiene en cuenta que los sueros estudiados procedían de la población general, principalmente urbana, es posible que entre la población con mayor riesgo de ser picada por *I. ricinus*, la seroprevalencia frente al TBEV sea más importante (Juste y cols. 1997a).

Respecto a la infección por flavivirus entre los animales, fue en los años 1984 y 1986 (González y cols. 1987b) cuando se observaron los primeros casos de encefalitis en ovejas que se hallaban en una sierra alavesa y que presentaban una afección de tipo neurológico. El análisis histopatológico de los encéfalos de los animales afectados mostró unas lesiones microscópicas compatibles con el LIV. Posteriormente se secuenció el gen de la envoltura del virus, y se pudo confirmar que la enfermedad era producida por un flavivirus considerado como un nuevo miembro dentro del grupo TBE, y denominado virus de la encefalitis ovina española (SSEV) (Marin y cols. 1995). Mas tarde, fue incluido entre las variantes del LIV junto con los subtipos británico e irlandés (Grard y cols. 2007).

El LIV, al igual que el TBEV, es también transmitido principalmente por *I. ricinus*, no obstante su presencia y transmisión en la naturaleza requiere unos factores epidemiológicos diferentes al TBEV. Como factor más importante podríamos citar que la transmisión del LIV tiene lugar cuando las garrapatas se están alimentando en grandes ungulados, los cuales desarrollan unas tasas virémicas elevadas y duraderas, por lo tanto no va a depender de la existencia de sincronía entre las larvas y las ninfas alimentándose en los roedores (Gilbert y cols. 2000, Reid y cols. 1986).

En cuanto al estudio del papel de las garrapatas en España, hasta la fecha no se ha realizado ningún trabajo encaminado a identificar la presencia del TBEV en estos artrópodos; no obstante, sí que se realizaron varios trabajos para estudiar la presencia del SSEV. El primero de ellos data de 1991 (Fernández de Luco 1991), no mostrando resultado positivo alguno el cultivo de 1630 garrapatas (*H. punctata* e *I. ricinus*). Posteriormente se desarrollaron otros dos estudios con *I. ricinus* recogidos de la vegetación, que también fueron negativos en cultivo (Juste y cols. 1997a). Los únicos ejemplares positivos (mediante RT-PCR en nido) fueron garrapatas *I. ricinus* alimentadas sobre ovejas (Juste y cols. 1997a).

En cuanto a la situación de los países vecinos de España, Portugal y Francia, en el primero de ellos tampoco ha sido diagnosticado ningún caso de TBE hasta la fecha, al contrario que en Francia, donde todos los años se diagnostican 5-10 casos en la región de Alsacia-Lorraine (Hansmann y cols. 2004). De hecho, esta zona situada en el nordeste de Francia es considerada como el límite occidental de la zona endémica del TBE (Hansmann y cols. 2004). No obstante, recientemente se diagnosticó, por métodos serológicos, la enfermedad a un granjero residente en la zona de Burdeos (suroeste de Francia) que no había viajado al exterior durante el último año ni había consumido leche sin pasteurizar, pero sin embargo, sí que se le retiró una garrapata enganchada la semana anterior (Herpe y cols. 2007). Dada la distancia a la que se encuentra esta zona de la región de Alsacia (unos 700 km), los autores plantean la posibilidad de que el virus hubiera llegado a Burdeos a través de garrapatas infectadas con la compra de animales o mediante aves migratorias. Aun cuando hay autores que consideran que este caso pudiera ser debido a una infección por el SSEV (Randolph 2008) y no por el TBEV, la aparición de este caso en una región muy próxima al norte de España otorga una mayor importancia al estudio de la posible presencia de estos virus en las poblaciones de *I. ricinus* de esta parte del país.

I.6 RICKETTSIOSIS DEL GRUPO DE LAS FIEBRES MANCHADAS

Las rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas (GFM), son las enfermedades transmitidas por artrópodos más antiguamente conocidas, y se consideran un modelo de enfermedad emergente (Parola y cols. 2005b, Raoult y Roux 1997). Además, en los últimos años se han aislado o detectado nuevas rickettsias en garrapatas, de patogenicidad aun desconocida para el hombre (Raoult y cols. 2002b, Raoult y Roux 1997).

Hasta 1984 solo se conocían 4 rickettsias patógenas, *R. rickettsii* en América; *R. conorii* en Europa, África y suroeste de Asia; *Rickettsia sibirica* en Siberia y oeste de Rusia; *Rickettsia australis* en Australia. Desde 1984 hasta 2005 se identificaron 11 nuevas especies o subespecies de rickettsias del GFM, *Rickettsia japonica* en Japón; *R. conorii* subsp. *caspi*a en Europa y África; *R. africae* en África y América; *Rickettsia honei* en Australia, Asia y América; *R. slovac*a en Europa; *R. sibirica* subsp. *mongolitimonae* en Asia, Europa y África; *Rickettsia heilongjiangensis* en África y Europa; *R. helvetica* en Europa y Asia; *Rickettsia marmionii* en Australia; *Rickettsia aeschlimannii* en Europa y África y, finalmente, *Rickettsia parkeri* en Estados Unidos (Parola y cols. 2005b). De éstas, 6 fueron primero aisladas de garrapatas, y posteriormente se reconocieron como patógenas para el hombre; algunos de estos organismos fueron hallados en áreas geográficas donde este grupo de enfermedades

eran desconocidas, como por ejemplo Japón, Tasmania o Astrakhan. Recientemente, se ha demostrado la patogenicidad de *Rickettsia massiliae* (Vitale y cols. 2006) y *Rickettsia monacensis* (Jado y cols. 2007), especies que habían sido aisladas con anterioridad en garrapatas.

El empleo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y los métodos de secuenciación ha permitido detectar e identificar con mayor facilidad nuevas especies de rickettsias del GFM en garrapatas o en pacientes con un diagnóstico de rickettsiosis. Este sería el caso de las rickettsias conocidas durante la última década como *Rickettsia* sp. "genotipo DnS14" o "genotipo RpA4" o "genotipo DnS28", y posteriormente incluidas en una única especie denominada *Rickettsia raoultii* (Mediannikov y cols. 2008).

I.6.1 Bacteriología

Las rickettsias pertenecientes al GFM están clasificadas dentro del género *Rickettsia*, perteneciente a la familia *Rickettsiaceae* dentro del orden *Rickettsiales* (en la que se incluye la familia *Anaplasmataceae*) (Parola y cols. 2005b).

Las rickettsias son bacterias pequeñas, cocobacilares, gram-negativas, aerobias e intracelulares obligadas. Se tiñen bien con los métodos de Giemsa, Castañeda y Giménez, y débilmente con la tinción de Gram.

Las rickettsias infectan las células endoteliales y del sistema inmune; se adhieren a la célula y son fagocitadas, antes de la formación del fagolisosoma destruyen el fagosoma y se multiplican por fisión binaria en el citoplasma y núcleo de la célula hospedadora. En el interior del hospedador invertebrado, las rickettsias invaden y se multiplican en la mayoría de sus órganos, entre ellos las glándulas salivares, por lo que podrán ser transmitidas al hospedador vertebrado durante el proceso de alimentación.

I.6.2 Epidemiología

Las rickettsias del GFM están asociadas a los ixódidos, los cuales pueden actuar como vectores, reservorios, y/o amplificadores en el ciclo biológico de las bacterias (Raoult y Roux 1997). El típico ciclo biológico de una rickettsia del GFM sería el siguiente, la rickettsia presente en la garrapata se multiplica en la mayoría de los órganos, entre ellos los ovarios y oocitos de las hembras, por lo tanto puede ser transmitido a toda o a parte de la progenie. Una vez infectado el huevo, los posteriores estadios del ixódido también permanecerán infectados puesto que el porcentaje de transmisión transestadial es prácticamente del 100% (Raoult y Roux 1997). Por lo tanto, la distribución geográfica de las rickettsiosis estará determinada por la distribución del artrópodo, y su estacionalidad será paralela a la actividad de la garrapata. En la tabla I.2 se muestran las rickettsias patógenas para el hombre

asociadas a las diferentes especies de garrapatas y la denominación de la enfermedad que provocan.

Tabla I.2. Rickettsias de interés clínico transmitidas por garrapatas

Rickettsia sp.	Vectores conocidos y/o potenciales	Enfermedad
<i>R. aeschlimannii</i>	<i>H. marginatum</i> , <i>H. rufipes</i> , <i>R. appendiculatus</i>	Fiebre exantemática
<i>R. africae</i>	<i>A. hebraeum</i> , <i>A. variegatum</i> , <i>R. (B.) decoloratus</i>	Fiebre africana transmitida por picadura de garrapatas
<i>R. amblyommii</i> *	<i>A. americanum</i> , <i>A. cajennense</i> , <i>A. ceolebs</i>	Fiebre exantemática
<i>R. australis</i>	<i>I. holocyclus</i> , <i>I. tasmani</i> , <i>I. cornuatus</i>	Tifus de Queensland transmitido por garrapatas
<i>R. canadensis</i>	<i>H. leporispalustris</i>	Sin denominar
<i>R. conorii</i> subsp. <i>caspia</i>	<i>R. sanguineus</i> , <i>R. pumilio</i>	Fiebre de Astrakhan
<i>R. conorii</i> subsp. <i>conorii</i>	<i>R. sanguineus</i>	Fiebre exantemática mediterránea
<i>R. conori</i> subsp. <i>indica</i>	<i>R. sanguineus</i>	Tifus transmitido por garrapatas de la India
<i>R. conorii</i> subsp. <i>israelensis</i>	<i>R. sanguineus</i>	Tifus exantemático israelí
<i>R. heilongjiangensis</i>	<i>D. silvarum</i> , <i>H. concinna</i> , <i>H. japonica douglasi</i>	Fiebre exantemática del lejano oriente
<i>R. helvetica</i>	<i>I. ricinus</i>	"Aneruptive fever"
<i>R. honei</i>	<i>Ap. hydrosauri</i> , <i>A. cajennense</i> , <i>I. granulatus</i> , <i>I. granulatus</i>	Fiebre exantemática de las islas Flinders
<i>R. japonica</i>	<i>I. ovatus</i> , <i>D. taiwanensis</i> , <i>H. longicornis</i> , <i>H. flava</i>	Fiebre exantemática oriental y japonesa
<i>R. marmionii</i>	<i>H. novaeguineae</i>	Fiebre exantemática australiana
<i>R. massiliae</i>	<i>R. sanguineus</i> , <i>R. turanicus</i> , <i>R. sulcatus</i> , <i>R. muhsamae</i> , <i>R. lunulatus</i> ,	Sin denominar
<i>R. monacensis</i>	<i>I. ricinus</i>	Sin denominar
<i>R. parkeri</i>	<i>A. maculatum</i> , <i>A. americanum</i> , <i>A. triste</i>	Sin denominar
<i>R. rickettsii</i>	<i>D. andersoni</i> , <i>D. variabilis</i> , <i>R. sanguineus</i> , <i>A. cajennense</i> , <i>A. aureolatum</i>	Fiebre manchada de las Montañas Rocosas
<i>R. raoultii</i>	<i>D. marginatus</i> , <i>D. reticulatus</i>	TIBOLA, DEBONEL
<i>R. sibirica</i> subsp. <i>mongolitimona</i>	<i>H. asiaticum</i> , <i>H. truncatum</i> , <i>H. excavatum</i>	Rickettsiosis asociada a linfangitis
<i>R. sibirica</i> subsp. <i>sibirica</i>	<i>D. nuttalli</i> , <i>D. marginatus</i> , <i>D. sylvarum</i> , <i>D. pictus</i> , <i>D. sinicus</i> , <i>D. auratus</i> , <i>Hy. yeni</i> , <i>Hy. wellingtoni</i> , <i>H. concinna</i> , <i>D. sinicus</i>	Tifus siberiano transmitido por garrapatas Tifus del Norte de Asia transmitido por garrapatas
<i>R. slovac</i>	<i>D. marginatus</i> , <i>D. reticulatus</i>	TIBOLA, DEBONEL
<i>R. texina</i>	<i>A. americanum</i>	Fiebre de Bullis

Datos tomados de Parola y cols. (2005a), Renvoisé y cols. (2009).

Numerosas cuestiones concernientes al ciclo natural y a la epidemiología de varias rickettsiosis transmitidas por garrapatas permanecen sin resolver, por ejemplo, aun no se ha demostrado la transmisión transovárica en todas las especies del GFM (Parola y cols. 2005a). Otro hallazgo interesante ha sido la observación de que algunas de estas rickettsias, como por ejemplo *R. rickettsii*, pueden tener un efecto negativo sobre sus vectores, pudiendo producir la muerte de la garrapata infectada durante la muda en el paso de un estadio a otro, o disminuyendo el éxito en la alimentación de las hembras (Labruna y cols. 2008, Niebylski y cols. 1999).

La identificación de los reservorios vertebrados permanece aun sin determinar. En un vertebrado hospedador natural, la infección puede resultar en una rickettsiemia, la cual permitiría a nuevas líneas de garrapatas no infectadas adquirir la bacteria y perpetuar el ciclo natural; sin embargo, la rickettsiemia observada en los vertebrados suele ser de corta duración. No obstante, en el sur de Zimbabwe, región endémica para la infección por *R. africae*, se ha detectado la presencia de la bacteria en la sangre de vacas infectadas, al menos 32 días post-infección, lo cual sugiere que el ganado vacuno pueda actuar como reservorio del agente (Parola y cols. 2005a).

Los humanos actúan como hospedadores accidentales de las rickettsias al ser picados por las garrapatas; la picadura de la mayoría de los ixódidos es indolora, y generalmente la garrapata no es observada por los pacientes, especialmente si los estadios implicados son larvas o ninfas. En ocasiones las garrapatas son encontradas aún fijadas en pacientes que se mostraban enfermos durante varios días; simplemente, el enfermo no se había percatado de la presencia de la garrapata, la cual debía de llevar fijada más de 10 días, puesto que el periodo de incubación de la enfermedad es habitualmente de 7 días (Brouqui y cols. 2007, Raoult y Roux 1997).

El riesgo de transmisión de las rickettsias por las garrapatas y consecuentemente la prevalencia de una determinada rickettsiosis dependerá de varios parámetros (Raoult y Roux 1997):

- i) La prevalencia de garrapatas infectadas por rickettsias.
- ii) El grado de afinidad de las diversas especies de garrapatas hacia el hombre. Por ejemplo en la países Mediterráneos, gran parte de la población está en contacto con la garrapata del perro, *R. sanguineus*, siendo la prevalencia del GFM solo de 50 por cada 100.000 habitantes. La razón es la poca afinidad de esta garrapata hacia hospedadores distintos al perro.
- iii) La propia abundancia de garrapatas.

I.6.3 Manifestaciones clínicas

Cuando la rickettsia es transmitida al hombre, se multiplica en las células endoteliales originando vasculitis, la cual será responsable de las alteraciones clínicas de la enfermedad (Parola y cols. 2005a, Raoult y Roux 1997). Las rickettsias, al contactar con las células endoteliales, inducen su propia fagocitosis y, una vez dentro del citoplasma escapan del fagosoma y se multiplican por fisión binaria simple, siendo finalmente expulsadas por exocitosis para seguir infectando células contiguas. La infección se inicia en la zona de inoculación y posteriormente se extiende por la circulación venosa.

La sintomatología clínica, típicamente, comienza 6-10 días después de producirse la picadura de la garrapata, e incluye fiebre, dolor de cabeza, dolor muscular, sarpullidos, linfadenopatía local y la característica escara en el lugar de la picadura de la garrapata. Estos signos clínicos principales varían dependiendo de la especie de rickettsia implicada. Entre los hallazgos hematológicos y bioquímicos no específicos se incluye trombocitopenia, recuentos leucocitarios anormales y elevación de los niveles de las enzimas hepáticas (Brouqui y cols. 2004). La enfermedad puede ser leve o severa, prolongándose habitualmente de 2 a 3 semanas.

I.6.4 Diagnóstico

Los métodos de diagnóstico habitualmente empleados incluyen: serología, cultivo y técnicas moleculares.

Los ensayos serológicos son los métodos más sencillos para el diagnóstico de las rickettsiosis, siendo la microinmunofluorescencia (MIF) el método de referencia (Parola y cols. 2005b). Esta técnica es altamente sensible y reproducible, y permite detectar IgM e IgG en el suero de fases agudas y convalecientes respectivamente. Sin embargo, la interpretación de los resultados serológicos pueden ser errónea debido a la reacción cruzada que tiene lugar entre las rickettsias del GFM, por lo que es necesario realizar ensayos con varios antígenos y comparar los diferentes niveles de anticuerpos para identificar el agente causal.

El cultivo y aislamiento de las rickettsias son de gran importancia para el diagnóstico definitivo del agente, bien a partir de muestras de garrapatas o del paciente. Las rickettsias del GFM son bacilos cortos, gram-negativos, estrictamente intracelulares que retienen la fuchsina básica cuando se tiñen por el método de Giménez. Las rickettsias se aíslan más frecuentemente de la sangre, de biopsia de piel o de las propias garrapatas.

El desarrollo de métodos moleculares basados en la PCR y en la secuenciación, han permitido el desarrollo de técnicas de diagnóstico sensibles, específicas y rápidas para la detección e identificación de las rickettsias en sangre, en biopsia de piel e incluso de las

garrapatas. Las dianas más comunes en la PCR son los genes *ompA*, *ompB*, *gltA* y el gen D (Parola y cols. 2005b).

Recientemente, se ha desarrollado un procedimiento que combina una PCR, que utiliza como gen diana el espacio intergénico 23S-5S rRNA, y la posterior RLB (*Reverse Line Blotting* o hibridación inversa en línea) del amplificado obtenido, permitiendo la detección e identificación de las rickettsias a nivel de especie (Jado y cols. 2006).

Existen otros métodos moleculares que combinan la PCR y la RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms* o polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción) que permiten también detectar e identificar estos agentes. También se emplean métodos de genotipado, como el MLST (*Multilocus Sequence Typing*) (Zhu y cols. 2005a) en base a la comparación de secuencias de genes constitutivos o “housekeeping” asociados a funciones metabólicas básicas, o el MST (*Multispacer Sequence Typing*) (Fournier y Raoult 2007, Zhu y cols. 2005b), basado en el análisis de espaciadores intergénicos, que permiten diferenciar distintos genotipos. Recientemente, se ha desarrollado un método automatizado basado en el análisis de un número variable de secuencias repetidas en tandem (VNTR, *Variable Number Tandem Repeats*) (Vitorino y cols. 2005).

1.6.5 Situación en España

Las fiebres manchadas constituyen un grupo de zoonosis transmitidas por garrapatas de distribución universal, siendo el prototipo en nuestra área geográfica la fiebre exantemática mediterránea (FEM). En la tabla I.3 se muestran las diferentes rickettsias del GFM detectadas en España en garrapatas y personas.

- *Rickettsia conorii* subsp. *conorii*

R. conorii subsp. *conorii* es el agente causal de la FEM, la rickettsiosis exantemática más frecuente en los países de la cuenca mediterránea, donde la enfermedad es endémica. El vector principal de esta especie es la garrapata del perro *R. sanguineus* (Brouqui y cols. 2007), aunque en otras zonas geográficas puede ser transmitida por otros ixódidos. Los hospedadores habituales son pequeños mamíferos y perros, el hombre es un hospedador accidental. Si bien la mayoría de los pacientes refieren contacto con perros, en ocasiones la enfermedad aparece por picadura de garrapatas que se hallan en el suelo. La FEM aparece fundamentalmente en verano, coincidiendo con el ciclo biológico de la garrapata. La aparición de los síntomas tiene lugar tras un periodo de incubación de 6 días. En los casos típicos los pacientes presentan fiebre alta, erupción cutánea y una escara en el punto de inoculación. En los casos más severos se observa también una erupción petequiral, además de problemas neurológicos, renales y cardíacos.

Tabla I.3. Especies de rickettsias del GFM detectadas en España en garrapatas y personas.

<i>Rickettsia</i> sp.	Garrapatas			Personas
	Especie	Prevalencia (%)	Referencias	Referencias
<i>R. conorii</i>	<i>R. sanguineus</i>		(Fernández-Soto y cols. 2006a)	(Anton y cols. 2008, Cardenosa y cols. 2000, Espejo-Arenas y Raoult 1989)
<i>R. slovaca</i>	<i>D. marginatus</i>	10,6-40,7	(Fernández-Soto y cols. 2006b, Marquez 2008, Ortuno y cols. 2007, Oteo y cols. 2006, Toledo y cols. 2009b)	(Ibarra y cols. 2006, Porta y cols. 2008)
<i>R. aeschlimanni</i>	<i>H. marginatum</i>	1,8-61,5	(Fernández-Soto y cols. 2009, Oteo y cols. 2006, Toledo y cols. 2009b)	
	<i>I. ricinus</i>	0,2	(Fernández-Soto y cols. 2004)	
	<i>H. inermis</i>	16,7	(Portillo y cols. 2008)	
<i>R. massiliae</i>	<i>R. sanguineus</i>	2,5-24,6	(Marquez 2008, Oteo y cols. 2006, Toledo y cols. 2009b)	(Bernabeu-Wittel y cols. 2006b, Fernandez-de-Mera y cols. 2009)
	<i>R. turanicus</i>	20,7-50	(Marquez 2008, Ortuno y cols. 2007)	
	<i>R. pusillus</i>	1,8-20	(Marquez 2008, Toledo y cols. 2009b)	
	<i>R. bursa</i>	3,6	(Toledo y cols. 2009b)	
	<i>I. ricinus</i>	0,3	(Fernández-Soto y cols. 2004)	
<i>R. helvetica</i>	<i>I. ricinus</i>	0,6-12,5	(Fernández-Soto y cols. 2004, Marquez 2008, Toledo y cols. 2009b)	
	<i>I. ventalloi</i>	12,5	(Marquez 2008)	
<i>R. monacensis</i>	<i>I. ricinus</i>	2,4-27	(Fernández-Soto y cols. 2004, Marquez 2008)	(Jado y cols. 2007)
	<i>H. punctata</i>	1	(Marquez 2008)	
<i>R. raoultii</i> *	<i>D. marginatus</i>	2,6-59,9	(Fernández-Soto y cols. 2006b, Marquez 2008, Ortuno y cols. 2007, Oteo y cols. 2006, Toledo y cols. 2009b)	(Ibarra y cols. 2006)
	<i>H. punctata</i>	9,3	(Marquez 2008)	
	<i>R. bursa</i>	3,6	(Toledo y cols. 2009b)	
	<i>I. ricinus</i>	0,1	(Fernández-Soto y cols. 2004)	
<i>R. sibirica</i>	<i>R. pusillus</i>	3,7	(Toledo y cols. 2009b)	(Aguirrebengoa y cols. 2008)
	<i>R. bursa</i>	3,6	(Toledo y cols. 2009b)	

* Denominada por algunos autores como *Rickettsia rioja*

Durante estos últimos años el número de casos de FEM diagnosticados en algunas regiones españolas ha sido bastante elevado, por ejemplo, desde 1996 hasta 2006 en tres provincias de Castilla y León se diagnosticó la enfermedad en 200 personas (Fernández-Soto y cols. 2009). Estudios de seroprevalencia realizados en población humana sana en zonas endémicas, muestran una elevada positividad que oscila entre el 9% y el 73 % (Anton y cols. 2008, Bernabeu-Wittel y cols. 2006a, Herrero y cols. 1992). De forma similar las seroprevalencias encontradas por diversos autores (Anton y cols. 2008, Bernabeu-Wittel y cols. 2006a, Herrero y cols. 1992, Solano-Gallego y cols. 2006) en perros también son altas (25-93%). Estos datos contrastan con las prevalencias (nulas o muy bajas) de infección de *R. conorii* encontradas recientemente en garrapatas capturadas en la vegetación o sobre los hospedadores (humanos o animales) en diversas regiones españolas (Fernández-Soto y cols. 2006a, Marquez y cols. 2006, Oteo y cols. 2006, Toledo y cols. 2009b). Esta disparidad de resultados podría deberse a que en España, hasta hace pocos años, la única rickettsiosis del GFM conocida fue la FEM (Segura 2004). Además, es conocido el elevado número de casos de reacciones cruzadas, entre los diferentes tipos de rickettsias, que tienen lugar con la técnica serológica, por lo que probablemente las seroprevalencias asociadas a esta rickettsia estén sobreestimadas.

- *Rickettsia slovaca*

En 1997 fue descrito el primer caso de infección por *R. slovaca* en Francia, en una mujer que presentaba una única escara en el cuero cabelludo y un aumento del tamaño de los ganglios linfáticos cervicales tras haber sido picada por una garrapata del género *Dermacentor* (Raoult y Roux 1997). Hasta la fecha se ha detectado o aislado en todos los países europeos donde se ha investigado la presencia de rickettsias en *D. marginatus* y *D. reticulatus*. Estas garrapatas son comunes en Europa y Asia, excepto en el norte de Europa donde no se ha identificado la presencia de *D. marginatus*. Su periodo de actividad tiene lugar básicamente al principio de la primavera y en el otoño, y durante el invierno en países del sur de Europa. El síntoma más característico de la enfermedad producida por *R. slovaca* es la infartación ganglionar. Otro síntoma principal es la presencia de una escara necrótica en el punto de inoculación rodeado de un halo eritematoso, localizada, generalmente, en el cuero cabelludo, lugar en el que *Dermacentor* pica más frecuentemente a las personas. Esta enfermedad ha sido denominada "TIBOLA" (*Tick-borne Lymphadenopathy*) por los húngaros (Raoult y cols. 2002b) o "DEBONEL" (*Dermacentor-borne necrosis-erythema-Lymphadenopathy*) en España (Oteo y Ibarra 2002). Actualmente existe la duda de que *R. slovaca* sea el único agente causante del TIBOLA/DEBONEL, puesto que otra rickettsia del genogrupo *R. massiliae* ha sido detectada en *D. marginatus* (Marquez y cols. 2003), por lo

que se hace necesario estudiar el posible papel que puedan tener otras rickettsias transmitidas por *Dermacentor* en las rickettsiosis humanas.

Estudios serológicos recientes realizados a lo largo de la geografía española, muestran unos valores de seroprevalencia del 3-5% para la población sana (Anton y cols. 2008, Lledo y cols. 2006) y del 17% entre personas que habían sido picadas por garrapatas (Lledo y cols. 2006).

Respecto al conocimiento actual de la prevalencia de infección por *R. slovacae* detectada en garrapatas de la especie *D. marginatus* en España, durante los últimos años son varios los trabajos publicados (Fernández-Soto y cols. 2006b, Marquez y cols. 2003, Ortuno y cols. 2007, Toledo y cols. 2009b), en los cuales se han hallado unos porcentajes de infección entre el 11% y el 33%. En cuanto a las garrapatas de la especie *D. reticulatus*, la presencia del agente parece ser bastante inferior, puesto que la prevalencia encontrada por Fernández-Soto y cols (2006b) fue del 1%.

- *Rickettsia aeschlimannii*

R. aeschlimannii fue caracterizada por primera vez como una nueva rickettsiosis perteneciente al grupo de las fiebres manchadas en 1997, tras su aislamiento en una garrapata de la especie *Hyalomma marginatum* procedente de Marruecos. En el año 2002 se detectó el primer caso de infección humana por *R. aeschlimannii* en un paciente que viajó de Marruecos a Francia, y que presentaba un cuadro clínico parecido a la FEM. De hecho, se piensa que muchos casos diagnosticados como FEM pueden haber sido causados por este agente, ya que, como hemos citado anteriormente, el vector de *R. conorii* es *R. sanguineus*, especie que tiene poca afinidad por las personas, mientras que *H. marginatum* sí es encontrada alimentándose en personas con bastante frecuencia (Fernandez-Soto y cols. 2003, Merino y cols. 2005, Oteo y cols. 2006).

En España, *R. aeschlimannii* ha sido encontrada principalmente en *H. marginatum* recogidas sobre ganado vacuno y equino (Toledo y cols. 2009b) y sobre personas (Fernández-Soto y cols. 2009), con unas prevalencias de infección del 66,7% y 14% respectivamente, si bien solo se analizaron 12 ejemplares recogidos de ganado vacuno y equino. Fernández-Soto y cols (2006a) también detectaron la presencia de ADN de *R. aeschlimannii* en otras cinco especies de garrapatas (*I. ricinus*, *H. punctata*, *R. bursa*, *R. sanguineus* y *R. turanicus*) que habían picado a personas en España, aunque la prevalencia fue muy inferior (0,2-2%). Recientemente, esta rickettsia ha sido detectada en garrapatas pertenecientes a la especie *H. inermis* capturadas en la vegetación, en el 17% de los individuos analizados (Portillo y cols. 2008).

- *Rickettsia massiliae*

En 1992, se aisló una rickettsia de una garrapata de la especie *R. sanguineus* recogida en Marsella (Francia), que fue caracterizada como una especie diferente dentro de las enfermedades del GFM y se denominó *R. massiliae* (Beati y Raoult 1993). Anteriormente, en 1985 la bacteria había sido aislada de un paciente en Sicilia, sin embargo, no fue identificada hasta 2005 (Vitale y cols. 2006), considerándose desde ese momento como patógena para el ser humano. En Europa se ha descubierto su presencia en garrapatas de las especies *R. sanguineus* y *R. turanicus*. En 1996 se detectó una variante de *R. massiliae* (Bar29) en Cataluña (Beati y cols. 1996); en estudios recientes se ha detectado la presencia de esta variante en diferentes especies de garrapatas (Fernández-Soto y cols. 2006a, Oteo y cols. 2006, Toledo y cols. 2009b). De hecho, la baja prevalencia de *R. conorii* encontrada en *R. sanguineus* en relación a otras rickettsias del GFM en Castilla y León, zona considerada endémica para la FEM, sugiere la posibilidad de que algunos casos diagnosticados como FEM puedan ser en realidad producidos por otras rickettsias del GFM (Fernández-Soto y cols. 2006a), como *R. massiliae*.

- *Rickettsia helvetica*

R. helvetica fue aislada por primera vez en 1979 en garrapatas de la especie *I. ricinus* recogidas en Suiza (Burgdorfer y cols. 1979), 20 años más tarde esta rickettsia fue implicada en varios casos de perimiocarditis mortales en Suecia (Nilsson y cols. 1999); sin embargo aun no se considera demostrada su patogenicidad en personas. *R. helvetica* ha sido detectada en varios países europeos e incluso en Asia. En España fue identificada por primera vez en ejemplares de *I. ricinus* que habían sido recogidos alimentándose sobre personas en Castilla y León (Fernández-Soto y cols. 2004). Recientemente, en Andalucía se ha identificado la presencia de esta bacteria en un 27% de los *I. ricinus* analizados (Marquez 2008). Probablemente la distribución geográfica de *R. helvetica* sea más amplia de la que se conoce actualmente, estando asociada, principalmente, a garrapatas de las especies *Ixodes*. Hasta la fecha los casos en los que se sospecha la presencia de esta rickettsia en los pacientes se basan en diagnósticos serológicos, por lo que se hacen necesarias evaluaciones adicionales y el aislamiento de la bacteria de las muestras clínicas para confirmar su patogenicidad.

- *Rickettsia monacensis*

Fue en 2002 cuando esta nueva especie de rickettsia se aisló y caracterizó a partir de una garrapata hembra de la especie *I. ricinus*, recogida en un parque urbano en Alemania (Simser y cols. 2002). Recientemente *R. monacensis* fue identificada por primera vez como agente causal de una rickettsiosis aguda en dos pacientes procedentes de La Rioja y del

País Vasco, que presentaban un cuadro similar al de la FEM (Jado y cols. 2007). Estos casos no pudieron ser relacionados con ningún agente vector; sin embargo, rickettsias próximas a *R. monacensis* (*Rickettsia* sp. IRS3 y *Rickettsia* sp. IRS4) fueron detectadas con anterioridad en *I. ricinus* que habían picado a personas en la vecina Comunidad de Castilla y León (Fernández-Soto y cols. 2004). Recientemente, Marquez (2008) ha identificado su presencia en garrapatas de esta especie recogidas en Jaén.

- *Rickettsia raoultii*

Desde 1999, han sido identificados en garrapatas del género *Dermacentor* procedentes de diferentes países europeos, varios genotipos de rickettsias (DnS14, DnS28 y RpA4) (Parola y cols. 2009). El aislamiento y posterior identificación de estos genotipos ha permitido redefinirlos como pertenecientes a una única especie de *Rickettsia* del GFM, que se ha denominado *R. raoultii* (Mediannikov y cols. 2008). En 2002, Mediannikov y cols. (2008) detectaron la presencia de ADN de este agente en una garrapata de la especie *D. marginatus* recogida de un paciente francés al cual le fue diagnosticado una rickettsiosis (TIBOLA/DEBONEL). Posteriormente, Parola y cols. (2009) realizaron un estudio retrospectivo con muestras de 86 pacientes a los que se había diagnosticado TIBOLA/DEBONEL en Francia desde enero de 2002 hasta diciembre de 2007, encontrando que en el 8% de los casos el agente infeccioso implicado en el proceso fue probablemente *R. raoultii*.

En España, en un suero de un enfermo de La Rioja con TIBOLA/DEBONEL, se logró detectar el ADN de una *Rickettsia* sp. con una similitud del 98% a las cepas DnS14, DnS28 y RpA4 (Ibarra y cols. 2006), denominada inicialmente por los autores como *R. rioja*. Posteriormente pudo comprobarse su gran similitud con *R. raoultii*. En *D. marginatus* y *D. reticulatus* recogidas de la vegetación es frecuente la identificación de ADN similar al de esta especie de rickettsia, obteniéndose incluso unas prevalencias superiores a las encontradas para *R. slovaca*. En el sureste de España, Marquez y cols (2006) detectaron en *D. marginatus* una positividad del 73% para esta especie frente a un 27% para *R. slovaca*, así como Oteo y cols (2006) en garrapatas de la misma especie capturadas en La Rioja (59% y 41%), y Toledo y cols (2009b) en la zona centro (53% y 11%). Similar hallazgo obtuvieron Fernández-Soto y cols (2006b) en *D. reticulatus* recogidas en Castilla y León sobre personas (10% versus 1%). Estos datos parecen indicar que la exposición a *R. raoultii* a través de la picadura de garrapatas del género *Dermacentor* es más frecuente que la exposición a *R. slovaca*. Sin embargo, el hecho de que se detecte un mayor número de casos de infección por *R. slovaca* que por *R. raoultii* en pacientes con TIBOLA / DEBONEL, sugiere que esta última sea menos patógena (Parola y cols. 2009).

A diferencia de lo observado para *R. slovacae*, el ADN de *R. raoultii* ha sido también encontrado en otras especies de ixódidos, como por ejemplo *R. bursa* (Toledo y cols. 2009b) o *H. punctata* (Marquez 2008).

- *Rickettsia sibirica* subsp. *mongolitimonae*

R. sibirica subsp. *mongolitimonae* fue aislada por primera vez en 1991, en una garrapata de la especie *Hyalomma asiaticum* procedente de Mongolia. Posteriormente, este patógeno emergente ha sido detectado en otras especies de *Hyalomma* en diferentes regiones del mundo, como por ejemplo *Hyalomma truncatum* en África (Parola y cols. 2001) o *Hyalomma excavatum* en Grecia (Psaroulaki y cols. 2005). En 1996, fue descrito en Francia el primer caso humano de infección por esta rickettsia, probablemente a consecuencia de la picadura por un ejemplar de *Hyalomma* introducido por aves migratorias (Raoult y cols. 1996). Diez años más tarde fue aislada de la sangre de un paciente en Portugal, donde también detectaron la presencia del ADN de esta rickettsia en una garrapata de la especie *Rhipicephalus pusillus* recogida del cadáver de una mangosta (*Herpestes ichneumon*) (De Sousa y cols. 2006).

En 2008 se describió por primera vez la enfermedad en España (Aguirrebengoa y cols. 2008), en un paciente del País Vasco; el diagnóstico se confirmó mediante la detección por PCR del ADN de la rickettsia y posterior secuenciación del producto de amplificación. El propio paciente se había retirado 20 días antes de acudir al hospital una garrapata alimentada de su pierna derecha, y varias más de su cuerpo cuatro días antes del comienzo de los síntomas de la enfermedad; garrapatas adquiridas probablemente mientras trabajaba como topógrafo en los montes de Balmaseda (Vizcaya), y que no fueron identificadas. Un año más tarde tuvo lugar la primera detección de ADN de *R. sibirica* subsp. *mongolitimonae* en garrapatas en España, en seis ejemplares capturados sobre animales en la zona centro, dos *R. bursa* recogidos sobre vacuno y ovino, y cuatro *R. pusillus* recogidos en conejos (Toledo y cols. 2009b).

I.7 ANAPLASMOSIS GRANULOCITICA HUMANA

La anaplasmosis granulocítica humana se ha convertido durante las dos últimas décadas, por su importancia y morbilidad en una enfermedad emergente transmitida por garrapatas (Bakken y Dumler 2000, Dumler y cols. 2005). El agente etiológico es una bacteria perteneciente a la familia *Anaplasmataceae*, conocida desde hace mucho tiempo en medicina veterinaria. La primera descripción de *A. phagocytophilum* como enfermedad en el

ganado ovino data de 1932 y fue realizada en Escocia (Gordon y cols. 1932). Los autores comprobaron que se trataba de un síndrome febril que afectada a las ovejas, demostraron que era transmitido por la garrapata *I. ricinus* y la denominaron “tick-borne fever”.

El primer caso clínico de AGH fue reconocido en Estados Unidos en 1994 (Chen y cols. 1994a), posteriormente, en 1997 la enfermedad fue descrita en Europa, en una zona de Eslovenia endémica de la enfermedad de Lyme (Petrovec y cols. 1997).

Otras bacterias transmitidas por garrapatas y filogenéticamente próximas, han sido también reconocidas como patógenos emergentes en el hombre: *Ehrlichia chaffeensis* agente etiológico de la ehrlichiosis monocítica humana, y *Ehrlichia ewingii*, causante de la ehrlichiosis granulocítica (Buller y cols. 1999, Dawson y cols. 1991, Telford, III y Goethert 2004).

A. phagocytophilum junto a los organismos en su momento denominados *Ehrlichia equi*, agente etiológico de la ehrlichiosis granulocítica equina, y *Ehrlichia phagocytophila*, agente de la fiebre transmitida por garrapatas del ganado vacuno, ovino y caprino, se consideran hoy día como un único agente causante de la AGH, anteriormente denominada ehrlichiosis granulocítica humana (Dumler y cols. 2005). Así, la anaplasmosis granulocítica se considera una zoonosis transmitida por garrapatas del complejo *I. ricinus*, distribuida por Europa, Asia y Norteamérica. El agente etiológico es mantenido en los ciclos enzoóticos de las garrapatas y los animales; por lo que se conoce actualmente, la transmisión transovárica de la bacteria en la garrapata parece bastante ineficiente, por lo que presumiblemente los mamíferos desempeñan un papel importante en el mantenimiento y propagación del agente en la naturaleza.

I.7.1 Bacteriología

A. phagocytophilum es un coco gram-negativo, normalmente redondeada, aunque puede ser bastante pleomórfica y presentar un tamaño variable entre 0,2 y 1,5 μm . Son parásitos intracelulares, aerobios estrictos que infectan a los neutrófilos del hospedador, donde se dividen originando unas agrupaciones denominadas mórulas (microcolonias de organismos en el interior de una vacuola recubierta por la membrana celular).

Hay descritas 5 variantes de *A. phagocytophilum* en base a las diferencias que presentan en la secuencia del gen 16S rRNA (Massung y cols. 2002). No todas las variantes son patógenas para el hombre, hasta la fecha, únicamente la variante Ap-Variant 1 ha sido detectada en casos humanos.

I.7.2 Epidemiología

Los principales vectores de *A. phagocytophilum* son las garrapatas del complejo *I. ricinus*: *I. scapularis* e *Ixodes pacificus* en Estados Unidos, *I. ricinus* en Europa e *Ixodes*

persulcatus en Asia. Todos los autores parecen estar de acuerdo en que estas garrapatas constituyen el principal vector de *A. phagocytophilum* actualmente, aunque hasta el momento el ciclo natural de esta bacteria no es totalmente conocido.

En Estados Unidos, *I. scapularis* es el principal vector en los estados del noreste, del centro y del sureste, mientras que en los estados de la costa del Pacífico el principal vector es *I. pacificus*. Los hospedadores de los estadios inmaduros lo constituyen los pequeños mamíferos, reptiles y aves, mientras que los adultos se alimentan sobre grandes mamíferos; tanto las ninfas como los adultos presentan afinidad por picar a las personas (Bakken y Dumler 2000). En otras especies y géneros de garrapatas se ha identificado la presencia de *A. phagocytophilum*, sin embargo, su implicación como vectores del agente no ha sido aun demostrada (Courtney y cols. 2003).

En Europa, *I. ricinus* es reconocido como el vector de la AGH (Blanco y Oteo 2002); su distribución abarca desde el oeste de Europa hasta Asia central (excepto en el área mediterránea). Las larvas y ninfas se alimentan sobre micromamíferos, reptiles y aves, y ocasionalmente en medianos y grandes mamíferos, hospedadores habituales de los estadios adultos; la afinidad de *I. ricinus* hacia el hombre es alta.

En Europa también se ha detectado su presencia en *Ixodes trianguliceps* (Ogden y cols. 1998) garrapata específica de roedores, aunque no se han realizado experimentos de competencia vectorial. Hasta el momento actual, no se ha identificado la presencia de *A. phagocytophilum* en garrapatas que no pertenecieran al género *Ixodes*. La excepción la encontramos en España, donde se ha detectado su presencia, mediante métodos moleculares, en garrapatas recogidas en la vegetación. Así, fue detectada en el País Vasco en las especies *H. punctata*, *R. bursa*, y *D. reticulatus* (Barral 1998), y más recientemente, en la zona centro peninsular en *Hyalomma lusitanicum*, *R. bursa*, *D. marginatus* y *R. pusillus* (Toledo y cols. 2009b). Estas garrapatas fueron recogidas sobre la vegetación por lo que la presencia de la bacteria en ellas probablemente sea debida al paso del agente de un estadio a otro, vía transestadial, si bien no se han llevado a cabo experimentos que demuestren la competencia de estas garrapatas en la transmisión y mantenimiento del agente.

En Europa, además de en grandes mamíferos (caballos, vacas, ovejas, cabras, perros y gatos), también se ha detectado la presencia de *A. phagocytophilum* en diferentes especies de pequeños mamíferos capturados en Suiza, como el ratón de campo (*Apodemus sylvaticus*), el ratón leonado (*Apodemus flavicollis*), el topillo rojo (*Myodes [Clethrionomys] glareolus*) y la musaraña común (*Sorex araneus*), habiéndose sugerido su papel como potenciales reservorios del agente (Liz y cols. 2000). Recientemente, mediante técnicas moleculares, en Gran Bretaña se ha evidenciado que *A. phagocytophilum* puede ser mantenida en un sistema en el cual los roedores de áreas boscosas constituyen las

principales especies hospedadoras (Bown y cols. 2003). El corzo (*Capreolus capreolus*), el ciervo (*Cervus elaphus*), el jabalí (*Sus scrofa*) y el zorro (*Vulpes vulpes*) (De La Fuente y cols. 2005, De La Fuente y cols. 2008, Liz y cols. 2000, Liz y cols. 2002, Oporto y cols. 2003, Petrovec y cols. 2002, Polin y cols. 2004, Smetanova y cols. 2006), son algunas de las especies de animales de vida libre en las que se ha detectado, mediante el empleo de técnicas moleculares, la presencia de esta bacteria. El papel de las aves en la circulación de *A. phagocytophilum* también ha sido sugerido tanto en Estados Unidos como en Europa (Bjoersdorff y cols. 2001, Daniels y cols. 2002).

I.7.3 Manifestaciones clínicas

La anaplasmosis humana se muestra frecuentemente como un proceso febril inespecífico, el periodo de incubación tras la picadura de la garrapata es de 5-21 días (11 de media). Los síntomas incluyen fiebre elevada (>38,5°C) que dura entre 2-11 días (10 de media), escalofríos, mialgias generalizadas, dolor de cabeza severo y malestar; anorexia, artralgia, náuseas y tos improductiva aparecen a menudo. Es frecuente también observar leucopenia y trombocitopenia, acompañadas habitualmente por una alteración de la función hepática, manifestándose en un aumento moderado en la concentración sérica de las enzimas aspartato aminotransferasa, alanina aminotransferasa y, más frecuentemente, de la lactato deshidrogenasa. El incremento de la proteína C-reactiva es un hallazgo normal en los casos agudos de AGH, menos habitual es la presencia de anemia y de niveles elevados en suero de creatina y de urea en sangre. En general, todas las alteraciones laboratoriales observadas en los pacientes europeos desaparecen en el transcurso de dos semanas de iniciarse el proceso (Brouqui y cols. 2004). La hospitalización del enfermo es requerida en aproximadamente la mitad de las ocasiones, los casos más graves tienen lugar entre la población de mayor edad, sobre todo cuando son concomitantes con otros procesos crónicos (Bakken y Dumler 2000). En Europa el número de afectados es bajo, y la enfermedad parece tener un curso menos severo que en Estados Unidos, donde han sido descritos casos con un desenlace fatal.

La anaplasmosis humana aguda tiene una presentación clínica y laboratorial similar a la fase inicial de la infección producida por el TBEV, enfermedad endémica en el norte, centro y este de Europa. La posibilidad de que se trate de una anaplasmosis humana debe de tenerse en cuenta cada vez que un paciente de una región endémica, presente, tras ser picado por una garrapata o haber estado expuesto a las garrapatas, una enfermedad febril indiferenciada.

I.7.4 Diagnóstico

La confirmación laboratorial de la AGH se basa en diferentes pruebas. La inmunofluorescencia indirecta es la técnica serológica más ampliamente utilizada, sin embargo, presenta limitaciones como la tardanza en la aparición de anticuerpos (el suero obtenido al comienzo de los síntomas generalmente resulta negativo), o la detección de posibles falsos positivos debido a reacciones cruzadas con otras bacterias (Parola y cols. 2005a).

Durante la fase aguda de la enfermedad, *A. phagocytophilum* puede detectarse por microscopía, cultivo o por amplificación de determinadas secuencias de ácidos nucleicos mediante la PCR.

El examen de extensiones sanguíneas teñidas con tinciones del tipo Romanowsky (Giemsa, Wright) permite la observación de las mórulas de *A. phagocytophilum* en el interior de los granulocitos. Este método de diagnóstico es el más rápido y económico, sin embargo, es también el menos sensible (Aguero-Rosenfeld 2003, Bakken y Dumler 2000, Blanco y Oteo 2002).

Al ser este agente una bacteria intracelular obligada con tropismo por los leucocitos granulocíticos, puede ser cultivada satisfactoriamente en células HL-60 (líneas celulares de la leucemia promielocítica). El cultivo de *A. phagocytophilum* es el método más sensible para confirmar el diagnóstico de la AGH durante la fase aguda; sin embargo, es una herramienta de diagnóstico laboriosa y lenta (Aguero-Rosenfeld 2003). La PCR es, por las múltiples ventajas que presenta (sensibilidad, especificidad, rapidez y sencillez) la técnica idónea para la detección de *A. phagocytophilum* para todo tipo de muestras en general y garrapatas en particular. Se han diseñado numerosos procedimientos basados en la amplificación de secuencias específicas de ácidos nucleicos de *A. phagocytophilum*, entre ellas estarían el gen 16S rRNA, el operón *groESL*, el gen *epank1* y el gen *msp2* (Chen y cols. 1994b, Murphy y cols. 1998, Sumner y cols. 1997, Walls y cols. 2000).

También se han puesto a punto otros métodos de detección e identificación molecular para ehrlichias y anaplasmas transmitidas por garrapatas. Uno es el de PCR-RFLP, basado en la amplificación del gen *gltA* y posterior digestión con enzimas de restricción (Inokuma y cols. 2001). Otro método es la PCR a tiempo real basada en la amplificación del gen 16S rRNA, que permite además de detectar e identificar la bacteria, cuantificar la carga bacteriana presente en la muestra (Pusterla y cols. 1999). También se ha utilizado la RLB para la detección e identificación simultánea de varios agentes (Bekker y cols. 2002).

Recientemente en Europa han sido definidos por el grupo de estudio de *Coxiella*, *Anaplasma*, *Rickettsia* y *Bartonella* de la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y

Enfermedades Infecciosas, los criterios para el diagnóstico de la enfermedad (Brouqui y cols. 2004). Así, la confirmación de un caso de AGH requiere:

- La presencia de un proceso febril, acompañado de un historial de picadura por garrapata o haber estado expuesto al ectoparásito.
- Demostrar la infección por *A. phagocytophilum* por la presencia de seroconversión, o un incremento igual o superior a 4 veces del título de anticuerpos, o por un resultado positivo en PCR y la posterior secuenciación de los amplicones que demuestre la existencia del DNA específico de *Anaplasma* en la sangre, o el aislamiento de *A. phagocytophilum* en un cultivo de sangre.

Un caso de AGH es considerado como probable cuando:

- Existe un proceso febril, acompañado de un historial de picadura por garrapata o haber estado expuesto al ectoparásito.
- Los títulos de anticuerpos frente a *A. phagocytophilum* se mantienen estables en la fase aguda y de convalecencia, y son al menos 4 veces superiores al punto de corte, o la PCR resulta positiva y no hay una posterior secuenciación, o se observa la presencia de mórulas intracitoplasmáticas en una extensión sanguínea.

1.7.5 Situación en España

En España se ha detectado la presencia de *A. phagocytophilum* en diversas especies animales tanto domésticas como silvestres (De La Fuente y cols. 2005, García-Pérez y cols. 2003, Oporto y cols. 2003), siendo considerado en la zona norte peninsular como un agente etiológico importante entre las causas que provocan problemas reproductivos en el ganado ovino (García-Pérez y cols. 2003).

El primer caso humano de AGH fue referido en el año 2000 en La Rioja (Oteo y cols. 2000), y en un estudio serológico realizado en esta misma región con 147 sueros obtenidos de trabajadores forestales, pacientes con la enfermedad de Lyme, y personas con historial de picadura por garrapata, encontraron un 1,4% de seropositividad (Oteo y cols. 2001).

Los estudios realizados en España para conocer la situación de *A. phagocytophilum* en las garrapatas no son muy numerosos. Sin embargo, como se cita con anterioridad se ha detectado su presencia, además de en *I. ricinus*, en otras seis especies de garrapatas ixódidas recogidas en la vegetación y sobre personas, mostrando una prevalencia de infección para las primeras del 1,5-6% en la zona centro de España (Toledo y cols. 2009b) y del 10,8% en el norte (Barral 1998), y del 4-5% en las que picaron a las personas (Fernández-Soto 2003). En cuanto a los datos disponibles para *I. ricinus*, el porcentaje de garrapatas positivas encontradas se sitúa entre el 5-8% para los individuos adultos y el 2-24% para las ninfas (Barral 1998, Oteo y cols. 2001).

I.8 FIEBRE Q

La fiebre Q es una zoonosis producida por *C. burnetii*, esta enfermedad es conocida desde 1930 y tiene distribución mundial, siendo actualmente considerada como una zoonosis re-emergente en muchos países (Arricau-Bouvery y Rodolakis 2005). Esto puede deberse a cambios epidemiológicos, cambios en la virulencia del agente, a modificaciones en el cuadro clínico, a mejoras en los métodos de diagnóstico, etc. (Arricau-Bouvery y Rodolakis 2005).

En pocos países la fiebre Q es una enfermedad de declaración obligatoria, por lo que no es posible conocer con exactitud la incidencia real de esta enfermedad; sin embargo, es considerada como un problema de salud pública en numerosos países europeos como Francia, Reino Unido, Italia, Alemania y Grecia, además de España (Maurin y Raoult 1999).

Inicialmente la fiebre Q se consideraba como una enfermedad ocupacional, que afectaba a personas que estaban en contacto con animales domésticos como las vacas, las ovejas y, menos frecuentemente, con las cabras. Así, se incluía dentro del grupo de personas de riesgo a granjeros, veterinarios, trabajadores de matadero y de industrias lácteas, y personal de laboratorio que trabaja con cultivos de *C. burnetii* o con animales infectados con la bacteria. Sin embargo, posteriormente se ha observado un aumento de casos esporádicos en áreas urbanas, en personas que habían tenido un contacto ocasional con animales de granja o que habían estado en contacto con perros o gatos infectados (Maurin y Raoult 1999).

I.8.1 Bacteriología

C. burnetii es una bacteria gram-negativa, de pequeño tamaño y pleomórfica, e intracelular estricta que se multiplica en gran número en el interior de los fagolisosomas celulares. Aunque posee una membrana similar a las bacterias gram-negativas, el resultado de esta técnica de tinción, generalmente, no es concluyente; sin embargo, sí que es susceptible de teñirse por los métodos Giemsa, Machiavello, Giménez y Stamp.

Históricamente ha sido considerada como una Rickettsia, sin embargo el análisis de su secuencia genética ha permitido clasificar al género *Coxiella* en el orden Legionellales, familia *Coxiellaceae* (Seshadri y cols. 2003). Esta bacteria puede presentarse en tres diferentes variantes: células grandes o LCV, células pequeñas o SCV, y células pequeñas y densas o SDC. Las diferentes formas están relacionadas con el ciclo biológico de la bacteria y con su supervivencia. Las SCV y las SDC están consideradas como formas de resistencia extracelular en el medio ambiente, mostrando una gran resistencia a las radiaciones ultravioleta, al calor, a la desecación, a la sonicación y a la presión (Arricau-Bouvery y Rodolakis 2005).

En *C. burnetii* tienen lugar unas variaciones antigénicas en los lipopolisacáridos (LPS) de la membrana denominadas “variación de fase”. La fase I, altamente infectiva, es la fase de la bacteria que se encuentra en los animales, artrópodos, o humanos infectados (Fournier y cols. 1998). En contraste, la fase II es menos infectiva y es la que se obtiene en el laboratorio tras varios pases seriados en cultivos celulares o en huevos embrionados. Durante la variación de fase se producen delecciones cromosómicas que provocan cambios irreversibles en la composición del LPS (Fournier y cols. 1998).

I.8.2 Epidemiología

La fiebre Q es principalmente una enfermedad de transmisión aerógena, la infección se produce tras la inhalación de polvo o aerosoles contaminados por placentas, fluidos corporales o materia fecal infectados (Arricau-Bouvery y Rodolakis 2005). No siempre es necesario el contacto directo con animales que hayan abortado para que las personas adquieran la bacteria, ya que en ocasiones, la manipulación del material contaminado con heces, como el estiércol (Berri y cols. 2003), puede ser fuente de infección. Se sabe también que el viento juega un papel importante en la diseminación de la bacteria (Tissot-Dupont y cols. 1999, Tissot-Dupont y cols. 2004), por lo que los residentes en áreas rurales están expuestos con mayor frecuencia al agente.

C. burnetii es capaz de infectar numerosas especies animales incluidos grandes y pequeños mamíferos, aves y artrópodos como las garrapatas, los cuales pueden ser también reservorios del agente (Komiya y cols. 2003, Marrie y cols. 1986, Maurin y Raoult 1999, Webster y cols. 1995). En los animales la infección es generalmente asintomática, pero en los mamíferos gestantes pueden producirse abortos o la aparición de mortinatos. En la mayoría de las ocasiones, el aborto ocurre al final de la gestación sin que se observe una sintomatología previa (Arricau-Bouvery y Rodolakis 2005). Los mamíferos infectados (rumiantes, perros, gatos, conejos, pequeños roedores silvestres) eliminan la bacteria en los productos del parto, en la leche, en la orina y en las heces (Arricau-Bouvery y Rodolakis 2005).

En muchos animales, tras la infección por *C. burnetii*, se produce una bacteriemia transitoria, la cual, permitiría a las garrapatas que se están alimentando en ese momento adquirir la bacteria. Son numerosos los estudios que han detectado la presencia de *C. burnetii* en garrapatas recogidas de la vegetación (garrapatas sin alimentar) y en garrapatas capturadas cuando se estaban alimentando en los hospedadores (Rehacek y cols. 1994, Smetanova y cols. 2006, Spitalska y Kocianova 2003, Spyridaki y cols. 2002, Toledo y cols. 2009b), representando los ixódidos el reservorio natural evolutivamente más antiguo de *C. burnetii*. En las garrapatas infectadas ha sido demostrada la transmisión transestádica y

transovárica, aunque no en todas las especies, ni con la misma eficiencia; en la naturaleza existen más de 40 especies de garrapatas infectadas (Maurin y Raoult 1999).

C. burnetii se encuentra en las garrapatas, al igual que en los mamíferos, en fase I, siendo por lo tanto altamente infectiva. La bacteria se multiplica en el interior de las células intestinales de las garrapatas infectadas, eliminando grandes cantidades de bacterias en sus heces, pudiendo contaminar la piel del animal hospedador mientras se está alimentando (Maurin y Raoult 1999).

Las garrapatas no parecen tener un papel significativo en el mantenimiento del ciclo natural de la infección de *C. burnetii* para el ganado; sin embargo, si que podrían desempeñar un papel importante en la transmisión de la coxiella entre animales silvestres, especialmente en lagomorfos, roedores y aves (Marrie y cols. 1986). Tampoco parece probable la transmisión de la bacteria a las personas mediante la picadura de garrapatas, aunque hay descritos casos en Francia (Rolain y cols. 2005) de varios pacientes que padecieron una enfermedad transmitida por garrapatas y al mismo tiempo o posteriormente se les diagnosticó la infección por *C. burnetii*.

I.8.3 Manifestaciones clínicas

En el hombre *C. burnetii* causa manifestaciones clínicas muy variables, desde casos agudos hasta infecciones crónicas fatales, sin embargo, la mayoría de las infecciones (60%) cursan de forma asintomática, detectándose únicamente seroconversiones (Arricau-Bouvery y Rodolakis 2005, Maurin y Raoult 1999).

La fiebre Q en su forma aguda tiene un periodo de incubación que oscila entre 2 y 3 semanas, dependiendo de la dosis infectiva del agente. Es una enfermedad similar a una gripe, o a una neumonía atípica, o a una hepatitis (Maurin y Raoult 1999). Cuando es similar a una gripe, se caracteriza por una aparición repentina, fiebre elevada, dolor de cabeza severo, pérdida de peso, mialgia y tos (Maurin y Raoult 1999). En ocasiones se pueden observar sarpullidos en la piel, náuseas, incremento de los niveles de las enzimas hepáticas, artralgia, temblores, sudoración y fotofobia (Arricau-Bouvery y Rodolakis 2005). La neumonía atípica generalmente aparece asociada con fiebre, dolor de cabeza y mialgia (Maurin y Raoult 1999). La presencia de tos, no productiva, no siempre se observa, aun cuando exista la neumonía. La mayoría de las personas afectadas presentan mínimos cambios a la auscultación, sin embargo en ocasiones pueden producirse alteraciones respiratorias severas. En la práctica clínica, este cuadro clínico es indistinguible del producido por otros agentes causantes de neumonía atípica. La hepatitis puede ser asintomática, caracterizándose por un aumento en el nivel de las transaminasas, que en ocasiones se acompaña de una fiebre prolongada de origen desconocido o por una hepatitis infecciosa con hepatomegalia (Arricau-Bouvery y Rodolakis 2005).

Aproximadamente en el 5% de los casos, la enfermedad puede hacerse crónica, desembocando en una endocarditis fatal, en un síndrome de fatiga crónica, o en abortos repetidos (Arricau-Bouvery y Rodolakis 2005). La endocarditis es la más frecuente y la más grave manifestación de la fiebre Q crónica, y representa entre el 1,5 y el 2% de los casos de endocarditis diagnosticados en el hombre; suele aparecer varios meses o años después de padecer la infección aguda en personas que padecían alguna valvulopatía previa (Raoult y cols. 2005). El síndrome de la fatiga crónica puede surgir también, varios meses o años después de haber sufrido la forma aguda de la enfermedad, se caracteriza por la aparición de fatiga, mialgia, artralgia y sudoración nocturna (Arricau-Bouvery y Rodolakis 2005, Ayres y cols. 1998). En las mujeres embarazadas, *C. burnetii* puede producir una placentitis que origine el aborto, la muerte neonatal, nacimientos prematuros y reducción del peso al nacimiento (Arricau-Bouvery y Rodolakis 2005, Raoult y cols. 2002a).

I.8.4 Diagnóstico

El diagnóstico de la fiebre Q sigue siendo en la actualidad difícil. *C. burnetii* no crece en los medios usados de rutina en los laboratorios de microbiología y su aislamiento es largo, complicado y peligroso para los manipuladores, requiriendo condiciones de bioseguridad de nivel 3, por lo que rara vez se emplea el cultivo como método de diagnóstico (Klee y cols. 2006, Maurin y Raoult 1999).

El diagnóstico de la fiebre Q se ha basado tradicionalmente en el análisis serológico, siendo la inmunofluorescencia el método empleado más frecuentemente para la detección de anticuerpos frente a *C. burnetii* (Fournier y cols. 1998). Este método es simple, rápido y permite diferenciar entre la forma aguda y la crónica de la enfermedad, utilizando antígenos de fase I y fase II. La fiebre Q aguda se caracteriza por un nivel de anticuerpos frente a fase II superior que frente a fase I, mientras que la forma crónica se asocia a un nivel elevado de anticuerpos frente a fase I (Fournier y cols. 1998).

En los últimos años, el desarrollo de herramientas moleculares ha cambiado totalmente el diagnóstico en la medicina humana y veterinaria, permitiendo la detección e identificación del agente presente en las muestras clínicas y ambientales.

Los métodos moleculares más habituales son la PCR convencional, PCR anidada y PCR en tiempo real. Se han empleado diversas dianas, como el gen 16S rRNA, secuencias repetidas a lo largo del genoma como la secuencia de inserción IS1111 del gen de la trasposasa (Willems y cols. 1994), y otros genes como *com1*, *icd* y *mucz*, (Klee y cols. 2006, Zhang y cols. 1998) entre otros.

Para diferenciar y caracterizar los aislados se emplean técnicas genotípicas específicas como la PCR-RFLP, método sencillo y barato pero su capacidad para diferenciar los distintos aislados de *C. burnetii* es limitada y dependen del gen amplificado (Spyridaki y

cols. 1998, Stein y Raoult 1992). Otro método empleado para caracterizar los aislados de *C. burnetii* es la IRS-PCR (sitios de restricción infrecuentes-PCR) (Arricau-Bouvery y cols. 2006), basado en la amplificación selectiva de secuencias de ADN con sitios de restricción infrecuente, mediante el uso de enzimas de restricción y ligasas que permiten incluir en el DNA de *C. burnetii* adaptadores complementarios a los cebadores que se van a emplear. La técnica MST basada en la secuenciación de 10 regiones intergénicas, permite separar los aislados según los diferentes tipos de secuencias que muestran en las diferentes regiones (Glazunova y cols. 2005). Finalmente, estaría el método MLVA (*Multiple Loci Variable Number of Tandem Repeats Analysis*), que permite la detección de los polimorfismos en las secuencias repetidas en tándem en el ADN. Este es un método con un elevado poder de discriminación, superior incluso al MST (Arricau-Bouvery y cols. 2006).

1.8.5 Situación en España

La fiebre Q es endémica en el área mediterránea, y representa un importante problema de Salud Pública, no constituyendo España una salvedad. No fue hasta la década de los ochenta, tras el brote epidémico que tuvo lugar en Álava en 1981, cuando cambió la percepción de la fiebre Q y se reconoció como un problema (Sanzo y cols. 1991).

El mayor número de casos en los que se diagnostica la fiebre Q tienen lugar en el Norte de España, especialmente en el País Vasco y Navarra. Sirven de ejemplo la casuística de la provincia de Guipuzcoa, entre 1984 y 2004 se diagnosticaron por serología 1261 casos (Montes y cols. 2006), o la de la comunidad de Cantabria, en la que entre 1994 y 1995 se analizaron 595 sueros obteniéndose una prevalencia del 48,6% (Pascual-Velasco y cols. 1998).

La sintomatología clínica de la enfermedad es distinta en la zona norte y sur de España, no conociéndose por el momento las causas de estas variaciones regionales. En la zona norte la mayoría de los casos de fiebre Q aguda presentan como principal manifestación clínica una neumonía atípica (Montejo y cols. 1985, Nebreda y cols. 2001), mientras que en la zona sur y en Canarias es la forma hepática la principal manifestación (Bolanos y cols. 2003, Romero-Jimenez y cols. 2003).

Desde el punto de vista veterinario apenas hay información en España, puesto que el número de estudios realizados es escaso, esto hace que realmente no se conozca la incidencia e importancia económica de la fiebre Q para el sector ganadero. En el País Vasco este patógeno es considerado un importante agente abortivo para el ganado ovino (Oporto y cols. 2006), además, estudios serológicos realizados muestran una amplia distribución entre los rebaños de esta especie (García-Perez y cols. 2009).

El papel que puedan desempeñar las garrapatas en los ciclos naturales de la fiebre Q en España apenas ha sido estudiado. Recientemente Toledo y cols. (2009) detectaron, por

primera vez, la presencia de *C. burnetii* en 4 especies de garrapatas capturadas en la vegetación y sobre animales en la zona centro de España, con una prevalencia del 7,7% y del 3,4% respectivamente. Estos datos parecen confirmar la amplia distribución de la bacteria entre las diferentes especies de ixódidos encontradas en numerosos países (Psaroulaki y cols. 2006, Rehacek y cols. 1994, Smetanova y cols. 2006, Spitalska y Kocianova 2003, Spyridaki y cols. 2002).

I.9 ENFERMEDAD DE LYME

La enfermedad de Lyme es una enfermedad multisistémica, con expresión clínica y repercusiones muy variables, causada por la bacteria *B. burgdorferi* sensu lato y transmitida por la picadura de las garrapatas, principalmente del género *Ixodes*. Su principal característica es una lesión cutánea denominada eritema migratorio.

Esta enfermedad adquirió un interés relevante a partir de 1975 tras la descripción en Lyme (Connecticut, Estados Unidos), de un brote de artritis de carácter epidémico entre la población de niños (Steere y cols. 1977). En Europa, se tenía conocimiento de la enfermedad desde principios del siglo XX, sin embargo es a partir de los años 80 cuando se desarrolla una investigación profunda y sistemática de los cuadros clínicos asociados a *Borrelia* spp.

La naturaleza y características del brote epidémico determinaron el interés por esta patología, al presentarse asociado a los diferentes cuadros referidos y otras manifestaciones que nunca antes habían sido claramente definidas. Permitió establecer diferentes referencias que sirvieron, y sirven en la actualidad, para el estudio de esta enfermedad, como son el predominio de artritis agudas monoarticulares y oligoarticulares de corta duración, el agrupamiento familiar de los casos o la incidencia similar en todas las edades, y especialmente la existencia de un antecedente de picadura por garrapatas con o sin aparición de lesiones cutáneas.

I.9.1 Bacteriología

B. burgdorferi es una bacteria gram negativa que pertenece al orden Espiroquetales. De modo general, se presentan como bacilos finos y largos (0,2 – 0,5 μm de ancho y 10 – 30 μm de largo) con forma de espiral. Son microorganismos móviles que presentan un número variable de flagelos periplásmicos (entre 7 y 11, aproximadamente).

Las borrelias presentan características individuales y una variable expresión de proteínas como resultado de modificaciones metabólicas asociadas al tipo de hospedador. Además, se han referido variaciones morfológicas, antigénicas y genómicas entre los distintos aislados de *B. burgdorferi* procedentes de Europa y Norteamérica (Baranton y cols. 1992, Dressler y cols. 1994). La característica más llamativa y que la hace única dentro del grupo de las espiroquetas, es el reducido tamaño (alrededor de 900 Mpb) y la estructura de su genoma. Este se dispone de forma linear distribuido a lo largo de toda la parte interna de la membrana citoplasmática, lo que determina un particular modo de replicación de su ADN durante la división celular. El cromosoma bacteriano está formado por 858 genes, muchos de los cuales son responsables de la formación flagelar, y de proteínas transportadoras y diversas lipoproteínas de función aún no determinada (Bergstrom y cols. 2002, Fraser y cols. 1997). Su pequeño tamaño ha sugerido un estado primitivo con relación a otras formas bacterianas.

En la estructura proteica externa de *B. burgdorferi*, destaca la presencia de dos lipoproteínas externas de superficie, denominadas OspA y OspB codificadas por genes localizados en el plásmido lineal (Barbour 1984). La lipoproteína OspA se expresa exclusivamente en aislados procedentes de garrapatas, antes de producirse la alimentación (Barbour y cols. 1983). Durante este proceso de alimentación de la garrapata en el hospedador, esta espiroqueta cambia su estructura externa mediante la producción de una tercera lipoproteína externa de superficie, denominada OspC (Fung y cols. 1994). Esta lipoproteína está presente en la mayoría de las cepas europeas y raramente en las cepas norteamericanas (Fung y cols. 1994).

La utilización de anticuerpos específicos frente a las variedades de lipoproteína OspA, ha permitido establecer diferentes serotipos, de gran utilidad con fines epidemiológicos, ya que se correlacionan con las distintas genoespecies definidas. Los aislados del serotipo 1 se corresponden con las cepas de *B. burgdorferi* sensu stricto procedentes de Europa y Norteamérica; los aislados del serotipo 2, se corresponden con las cepas de *Borrelia afzelii* aisladas en Europa y Japón; y los aislados de los serotipos 3 a 7, con las cepas de *Borrelia garinii* de Europa y Japón, aunque en este último país se han definido además otros serotipos (Marconi y cols. 1999, Masuzawa y cols. 2004, Ornstein y cols. 2001).

Hasta la fecha se han aislado un número elevado de cepas de *B. burgdorferi* procedentes de distintas áreas geográficas y diferentes fuentes biológicas, fenotípicamente y genéticamente diferentes, identificándose hasta la fecha 16 genoespecies de *B. burgdorferi* sensu lato (Tabla I.4), de las cuales cuatro (*B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. afzelii* y *Borrelia spielmanii*) han sido reconocidas como agentes etiológicos de la enfermedad de Lyme y han sido aisladas de *I. ricinus*.

Tabla I.4. Genoespecies de *B. burgdorferi* sensu lato.

Genoespecie	Patogenicidad	Localización	Referencia
<i>B. americana</i>	No	Estados Unidos	(Rudenko y cols. 2009b)
<i>B. andersonii</i>	No	Estados Unidos Europa	(Marconi y cols. 1995)
<i>B. afzelii</i>	Sí	Europa	(Baranton y cols. 1992)
<i>B. bavariensis</i>	Posible	Europa	(Margos y cols. 2009)
<i>B. bissettii</i>	No	Estados Unidos	(Postic y cols. 1998)
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	Sí	America del Norte Europa	(Johnson y cols. 1984) (Baranton y cols. 1992)
<i>B. californiensis</i>	No	Estados Unidos	(Postic y cols. 2007)
<i>B. carolinensis</i>	No	Estados Unidos Francia	(Rudenko y cols. 2009a) (Cotte y cols. 2009)
<i>B. garinii</i>	Sí	Europa	(Baranton y cols. 1992)
<i>B. japonica</i>	Posible	Japón	(Kawabata y cols. 1993)
<i>B. lusitaniae</i>	Posible	Europa Norte de África	(Le Fleche y cols. 1997) (Zhioua y cols. 1999)
<i>B. sinica</i>	No	China	(Masuzawa y cols. 2001)
<i>B. spielmanii</i>	Si	Europa	(Fingerle y cols. 2008)
<i>B. tanukii</i>	No	Japón	(Fukunaga y cols. 1996)
<i>B. turdi</i>	No	Japón	(Fukunaga y cols. 1996)
<i>B. valaisiana</i>	Posible	Europa y Asia	(Wang y cols. 1997)

I.9.2 Epidemiología

La enfermedad de Lyme es una enfermedad emergente, en progresión en Estados Unidos y en Europa (Ostfeld y cols. 2006, Parola y Raoult 2001b, Piesman y Gern 2004). La distribución de la borreliosis está condicionada por la distribución geográfica natural de sus vectores, principalmente *Ixodes*. Excepto en la Antártida, ha sido descrita en todos los continentes, presentándose con mayor frecuencia en el hemisferio norte (Nadelman y Wormser 1998, Schmid 1984). La incidencia de enfermedad depende del número de garrapatas infectadas y del nivel de actividad que presentan. En Europa, donde la enfermedad se declara tan sólo en algunos países, la prevalencia de garrapatas infectadas por *B. burgdorferi* y la incidencia de la enfermedad de Lyme es mayor en el centro y este de Europa e inferior en el oeste (Smith y Takkinen 2006). Así, la incidencia es más elevada en los países Centroeuropeos, 206 y 135 casos por 100.000 habitantes en Slovenia y Austria

respectivamente y claramente inferior en los países del sur de Europa, menor de 1 caso por 100.000 habitantes en Italia y Portugal (Smith y Takkinen 2006).

B. burgdorferi sensu lato se mantiene en la naturaleza a través de un amplio número de animales que actúan como reservorios, y que padecen la fase de espiroquetemia. El mecanismo de transmisión más importante de la garrapata al hospedador es la inoculación directa de las espiroquetas a través de la saliva durante la alimentación del vector, por las regurgitaciones que se producen desde su intestino medio. El periodo que permanece adherida la garrapata a la piel del animal es determinante para la transmisión, considerándose necesario un tiempo mínimo igual o superior a las 48 horas, siendo el riesgo aproximado al 100 % cuando permanece adherida 72 horas o más (Crippa y cols. 2002, Piesman y cols. 1987, Schwan y Piesman 2002).

Se ha observado que en garrapatas con un número muy elevado de espiroquetas, éstas pueden atravesar el intestino, alcanzar el hemocele, y desde allí colonizar distintos órganos como los ovarios, pudiéndose transmitir transováricamente a su descendencia (Burgdorfer y cols. 1982, Burgdorfer y cols. 1985, Magnarelli y Anderson 1988). También ha sido demostrada la infección de garrapatas infectadas a no infectadas al alimentarse simultáneamente (co-alimentación), incluso con una separación física de un centímetro en el hospedador y en ausencia de infección sistémica, gracias a que la borrelia permanece en el punto de inoculación durante un cierto tiempo antes de producirse la diseminación (Randolph y cols. 1996).

La relación de las genoespecies de *B. burgdorferi* sensu lato con sus vectores no es específica, ya que una misma especie de garrapata puede ser transmisora de varias genoespecies. De hecho es frecuente encontrar garrapatas infectadas con varias genoespecies que han podido ser adquiridas al alimentarse sobre hospedadores con infección múltiple o por intercambio de borrelias entre garrapatas portadoras de diferentes genoespecies por co-alimentación. Por otro lado, la transmisión transestadial de las espiroquetas permitirá a una misma garrapata adquirir una infección múltiple al alimentarse posteriormente en sus sucesivos estadios evolutivos (larva, ninfa, adulto) sobre hospedadores infectados (Tsao 2009).

Numerosas especies de animales vertebrados, fundamentalmente aves y micromamíferos (roedores e insectívoros), actúan como reservorios de *B. burgdorferi*. Se ha comprobado que los roedores son reservorios competentes para *B. afzelii*, *B. andersoni*, *B. bissetti*, *B. japonica*, algunos serotipos de *B. garinii* y probablemente de *B. californiensis*, *B. carolinensis* y *B. bavariensis* (Dennis y Hayes 2002, Gern 2008, Humair y cols. 1995, Kurtenbach y cols. 1998b, Margos y cols 2009, Masuzawa y cols. 1995, Piesman y Gern 2004, Postic y cols. 2007, Rudenko y cols. 2009a, Tsao 2009, Vredevoe y cols. 2004), mientras que las aves se consideran los reservorios de *B. valaisiana*, *B. turdi*, y algunos

serotipos de *B. garinii* (Hanincova y cols. 2003, Humair y cols. 1998, Kurtenbach y cols. 1998a, Michalik y cols. 2008, Wang y cols. 1999b). Tanto las aves como los roedores son reservorios competentes para *B. burgdorferi* sensu stricto y posiblemente de *B. americana* (Rudenko y cols. 2009b), por otro lado, los roedores junto con los reptiles se consideran reservorios específicos para *B. tanukii* y *B. sinica* (Masuzawa y cols. 2001, Wang y cols. 1999b). Finalmente, se ha observado que los lagartos son reservorios competentes de *B. lusitaniae* (Richter y Matuschka 2006).

En Estados Unidos, *Peromyscus leucopus* es considerado el principal reservorio de la enfermedad de Lyme, mientras que en Europa, *M. glareolus* en Rusia y diferentes especies de *Apodemus* en Centroeuropa son los reservorios más importantes (Dennis y Hayes 2002, Piesman y Gern 2004). Existen diferencias marcadas entre las especies de *Apodemus* y *M. glareolus* en su papel como reservorios. Los primeros desarrollan una fuerte respuesta inmune frente a *B. burgdorferi* sensu lato, lo que disminuye su capacidad de transmisión a las garrapatas que se alimentan sobre ellos, mientras que en el caso de *M. glareolus* ocurre lo contrario (Kurtenbach y cols. 1994). En *M. glareolus* se ha observado el desarrollo de una intensa respuesta inmune frente a *I. ricinus* tras sucesivas exposiciones a ésta, provocando una reducción en la eficacia de la alimentación de las garrapatas y en consecuencia, una disminución en el éxito de la muda (Dizij y Kurtenbach 1995), lo que modula su papel como reservorio eficaz (Humair y cols. 1999).

Con respecto a los insectívoros, *S. araneus*, *Sorex minutus* y *Neomys fodiens* en Suecia (Talleklint y cols. 1993, Talleklint y Jaenson 1993), *Blarina brevicauda* en Estados Unidos (Telford, III y cols. 1990) y *Sorex unguiculatus* en Japón están considerados como reservorios competentes (Nakao y Miyamoto 1993).

Otras especies de roedores consideradas de especial interés por su estrecho contacto con el ser humano y que presentan una alta capacidad de transmisión de las borrelias son la rata negra (*Rattus rattus*) y la rata gris (*Rattus norvegicus*) (Matuschka y cols. 1994). En cuanto al ratón casero (*Mus domesticus*), en Estados Unidos se han detectado individuos infectados en granjas (Burgess y cols. 1993), sin embargo, en Europa solo existen evidencias de serologías positivas en Dinamarca (Frandsen y cols. 1995).

En cuanto al papel de las aves en la enfermedad de Lyme, son numerosos los estudios en los que se han recogido garrapatas infectadas sobre estos animales tanto en Europa, Estados Unidos y Japón. Especies como los faisanes (*Phasianus colchicus*), el petirrojo (*Turdus migratorius*) y el mirlo (*Turdus merula*) son considerados reservorios competentes (Gern 2008, Humair y cols. 1998, Kurtenbach y cols. 1998a, Matuschka y cols. 1994, Michalik y cols. 2008, Richter y cols. 1998). Un papel a destacar en las aves migratorias, es su capacidad para transportar garrapatas infectadas a grandes distancias

creando nuevos focos de enfermedad, tal y como ha sido indicado en diferentes estudios (Ishiguro y cols. 2000, Ogden y cols. 2008, Olsén y cols. 1993).

I.9.3 Manifestaciones clínicas

La enfermedad de Lyme es una afección inflamatoria crónica, multisistémica que afecta principalmente a la piel, sistema nervioso central y periférico, articulaciones y corazón. Tras un periodo de incubación medio de 10 días, con un rango de entre 3 y 30 días (Hengge y cols. 2003, Nau y cols. 2009), aparece en el lugar de la picadura una lesión primaria denominada “*eritema migrans*” que es patognomónica y clave para el diagnóstico precoz de la enfermedad (Hengge y cols. 2003, Nau y cols. 2009, Wilske y cols. 2007). Desde esta lesión inicial, se produce una diseminación por vía hematogena al resto del organismo (fase de espiroquetemia) dando lugar según los órganos afectados, a una gran variedad de manifestaciones clínicas como eritemas anulares, anomalías neurológicas, artritis, alteraciones músculo-esqueléticas, alteraciones cardíacas, etc. (Hengge y cols. 2003, Nadelman y Wormser 1998, Nau y cols. 2009). En la fase tardía de la enfermedad entre las principales alteraciones destacan la acrodermatitis crónica atrófica, artritis crónica, encefalomielitis crónica, paraparesia espástica, polirradiculopatía, ataxia, desórdenes mentales subagudos, etc. (Hengge y cols. 2003, Nadelman y Wormser 1998, Nau y cols. 2009).

La enfermedad puede manifestarse con una gran variedad de síntomas y signos relacionados con la diversidad antigénica de las cepas. Dependiendo del paciente afectado y de la localización geográfica del caso, pueden existir claras diferencias entre las manifestaciones clínicas de los enfermos identificados en Estados Unidos o en Europa.

No todas las genoespecies tienen el mismo poder patógeno para el hombre, siendo *B. afzelii*, *B. burgdorferi* sensu stricto y *B. garinii* las consideradas como causantes de la enfermedad. Hay evidencias de que ciertas genoespecies en Europa, pueden estar asociadas a manifestaciones clínicas específicas, así *B. garinii* se ha implicado en las formas neurológicas, *B. burgdorferi* sensu stricto en las formas articulares y *B. afzelii* en las formas cutáneas tardías (Hengge y cols. 2003, van Dam y cols. 1993).

I.9.4 Diagnóstico

El diagnóstico de la enfermedad de Lyme se basa fundamentalmente en los hallazgos clínicos y epidemiológicos y en los resultados serológicos. Los anticuerpos específicos frente a *Borrelia* pueden detectarse mediante el empleo de los tests de ELISA o de inmunofluorescencia; sin embargo estos métodos son poco sensibles y específicos en las fases iniciales de la enfermedad, alcanzando su máxima eficacia en los estadios avanzados. Los resultados positivos e inconclusos obtenidos mediante estas pruebas deben confirmarse

mediante el método de inmunotransferencia o Western blott (Brown y cols. 1999, Nadelman y Wormser 1998, Wilske y cols. 2007), prueba considerada como de referencia entre los métodos de diagnóstico serológico.

En las fases iniciales de la enfermedad, la bacteria puede ser observada directamente en muestras de sangre o de líquido cefalorraquídeo por microscopía de campo oscuro o microscopía de contraste de fase, sin embargo, es una prueba poco sensible y específica (Parola y Raoult 2001b, Wang 2002). También se puede observar la bacteria en secciones histológicas de las lesiones mediante la tinción de Warthin-Starry.

B. burgdorferi puede aislarse mediante el empleo de medios de cultivo sólidos (agar BSK y derivados) y líquidos (BSK II modificado) (Barbour 1984). El aislamiento en cultivo está considerado como la prueba diagnóstica de referencia pero no se realiza de manera rutinaria en los laboratorios clínicos, ya que es un proceso muy laborioso, llevándose a cabo su cultivo únicamente en los laboratorios de referencia (Brouqui y cols. 2004).

Respecto a los métodos de diagnóstico molecular, se han desarrollado procedimientos muy diferentes, con amplificación de secuencias génicas que codifican distintas lipoproteínas de la membrana externa como OspA, OspB y OspC, genes de las proteínas de grupo como la flagelina, el gen 16S rRNA, o el espacio de la región intergénica 5S-23S del ADN ribosómico (Malloy y cols. 1990, Picken 1992, Rijpkema y cols. 1995, Wang y cols. 1999a). El método de amplificación más empleado es la PCR anidada (*nested* o *semi-nested*), utilizada también para la identificación de *Borrelia* spp. en garrapatas, donde se realizan dos amplificaciones consecutivas mediante el uso del producto de la primera amplificación como diana para la segunda (Bauerfeind y cols. 1998, Picken y cols. 1996). El procedimiento de RLB también ayuda a mejorar la sensibilidad y permite, mediante el uso de sondas específicas, la identificación de las diferentes genopecies (Rijpkema y cols. 1995, Wielinga y cols. 2006). Recientemente, el empleo del método MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*), similar al MLST, basado en genes "housekeeping" cromosómicos, ha permitido identificar nuevas especies de *B. burgdorferi* (Margos y cols. 2009, Postic y cols. 2007)

I.9.5 Situación en España

En España, el primer caso de enfermedad de Lyme se diagnosticó en 1977, sin embargo, el primer caso bien documentado data de 1987, cuando se describe un eritema migratorio acompañado de manifestaciones neurológicas en un paciente asturiano (Uria y cols. 1987). La divulgación de este caso hace que esta enfermedad sea objeto de estudios clínicos y epidemiológicos, que han aportado un conocimiento que hasta ese momento no se tenía.

Sabemos que la seroprevalencia frente a *B. burgdorferi* entre la población española se sitúa por debajo del 10% (Beceiro y cols. 2001, Guerrero y cols. 1996, Segura y cols. 2004),

valores en general inferiores a los registrados en los países del centro y norte de Europa, donde se han descrito valores del 14% en Alemania y Polonia (Cisak y cols. 2008, Kaiser y cols. 1997) o entre el 7% y el 29% en Noruega (Gustafson y cols. 1993). Sin embargo, si tenemos en cuenta los datos encontrados entre los grupos de población con mayor riesgo de exposición a las garrapatas, como por ejemplo los trabajadores forestales, vemos que la seroprevalencia encontrada en España, 38% en La Rioja y 25% en el País Vasco (Arteaga y cols. 1998, Oteo y cols. 1990), es similar a la de otros países europeos (Cinco y cols. 2004, Cisak y cols. 2005, Thorin y cols. 2008).

La casuística de la enfermedad de Lyme en España es baja, aunque podría ser superior a la registrada, especialmente en aquellos lugares donde la seroprevalencia es elevada debido a que en ocasiones la enfermedad cursa de forma subclínica o asintomática (Beceiro y cols. 2001, Guerrero y cols. 1996). Por el contrario, valores altos de seroprevalencia en ausencia de enfermedad podrían deberse a la existencia de reacciones cruzadas con otras borrelias no patógenas (Anda y cols. 1996, Guerrero y cols. 1996).

Entre la genoespecies identificadas en España, la primera fue *B. burgdorferi* sensu stricto, aislada a partir de un ejemplar de *I. ricinus* recogido en Cantabria (García-Moncó y cols. 1992). Posteriormente, se identificaron a partir de muestras de pacientes y/o de garrapatas (Barral y cols. 2002, Escudero y cols. 2000, Gil y cols. 2005, Oteo y cols. 1998) otras cuatro genoespecies: *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. afzelii* y *B. lusitaniae* (Tabla I.5).

Al igual que en Europa, *I. ricinus*, parece ser el principal vector de la enfermedad de Lyme, habiéndose detectado altas prevalencias de *B. burgdorferi* sensu lato en ejemplares recogidos de la vegetación de diferentes regiones españolas. En el País Vasco se ha detectado la presencia del ADN de estas espiroquetas en el 4-10% de los ejemplares adultos y en el 1,5-2% de las ninfas (Barral y cols. 2002, Gil y cols. 2005), en La Rioja en un 12,5% de los adultos y en el 51% de las ninfas (Estrada-Pena y cols. 1995), y en Madrid en un 25% de los adultos (solo se capturaron y analizaron ocho ejemplares) (Toledo y cols. 2009b).

En las zonas en que *I. ricinus* no está presente, otras especies del género *Ixodes*, como *Ixodes hexagonus* e *Ixodes canisuga*, pueden estar implicadas en la epidemiología de esta enfermedad (Estrada-Pena y cols. 1995, Estrada-Peña y Oteo 1991). También se ha identificado la presencia de *B. burgdorferi* sensu lato en *Ixodes frontalis*, *H. punctata* y *H. lusitanicum* (Barral 1998, Estrada-Pena y cols. 1995, Toledo y cols. 2009b). Estos hallazgos podrían explicar el hecho de que en España se hayan observado casos de enfermedad de Lyme en zonas donde *I. ricinus* no está presente (Estrada-Peña y Oteo 1991).

Tabla I.5: Genoespecies de *B. burgdorferi* identificadas en España.

Genoespecie	Muestra	Procedencia	Referencia
<i>B. burgdorferi</i> sensu stricto	Garrapatas de vegetación	País Vasco	(Barral y cols. 2002, Escudero y cols. 2000, Gil y cols. 2005)
		Madrid-Toledo	(Toledo y cols. 2009b)
	Micromamífero	País Vasco	(Gil y cols. 2005)
<i>B. garinii</i>	Biopsia humana	La Rioja	(Escudero y cols. 2000, Oteo y cols. 1998)
	Garrapatas de vegetación	País Vasco	(Barral y cols. 2002, Escudero y cols. 2000, Gil y cols. 2005)
		La Rioja	(Escudero y cols. 2000)
		Castilla-León	(Escudero y cols. 2000)
		Madrid-Toledo	(Toledo y cols. 2009b)
	Garrapatas de personas	Castilla-León	(Fernández-Soto 2003)
	Garrapatas de aves	La Rioja	(Estrada-Pena y cols. 2005)
<i>B. valaisiana</i>	Garrapatas de vegetación	País Vasco	(Barral y cols. 2002, Escudero y cols. 2000, Gil y cols. 2005)
		La Rioja	(Escudero y cols. 2000)
	Garrapatas de aves	La Rioja	(Estrada-Pena y cols. 2005)
	Garrapatas de personas	Castilla-León	(Fernández-Soto 2003)
<i>B. afzelii</i>	Garrapatas de vegetación	País Vasco	(Gil y cols. 2005)
	Garrapatas de roedores	La Rioja	(Estrada-Pena y cols. 2005)
	Garrapatas de aves	La Rioja	(Estrada-Pena y cols. 2005)
	Garrapatas de jabalí	La Rioja	(Estrada-Pena y cols. 2005)
	Biopsia humana*	Galicia	(Fernandez-Jorge y cols. 2006)
<i>B. lusitaniae</i>	Garrapatas de vegetación	País Vasco	(Barral y cols. 2002, Gil y cols. 2005)
	Garrapatas de personas	Castilla-León	(Fernández-Soto 2003)

*Caso posiblemente importado de Suiza, donde residía el paciente.

En cuanto al conocimiento de los reservorios de la espiroqueta en España, es muy poco lo que se sabe sobre los posibles reservorios, pero es probable que sean las mismas especies de micromamíferos y de aves que se consideran reservorios en otros países europeos. En el único trabajo realizado con micromamíferos, Gil y cols. (2005) detectaron la presencia de ADN de *B. burgdorferi* sensu stricto en un *A. sylvaticus* (prevalencia del 0,8%) capturado en el País Vasco. En este mismo estudio, identificaron una nueva especie de *Borrelia*, denominada R57, en el 12% de los micromamíferos analizados. Los análisis filogenéticos realizados por los autores, sitúan a esta espiroqueta fuera del grupo de las borrelias de Lyme así como del grupo que produce fiebre recurrente, y han sugerido que

puedan estar implicadas en la alta seropositividad encontrada entre la población del País Vasco. En otro estudio en el que se analizaron ninfas de *I. ricinus* (Estrada-Pena y cols. 2005), los autores detectaron la presencia de ADN de *B. afzelii*, *B. valaisiana* y *B. garinii* en ninfas que en el estadio de larva se habían alimentado sobre diferentes especies de aves, y ADN de *B. afzelii* en dos ninfas que provenían de larvas alimentadas, una en un ratón de campo y la otra en un jabalí.

Respecto al papel de otros mamíferos silvestres en España, apenas hay estudios realizados, aun cuando en otros países algunos ungulados y cánidos son considerados como reservorios (Bhide y cols. 2004, Magnarelli y cols. 1995, Mather y cols. 1994). Recientemente, se ha publicado el primer estudio de seroprevalencia en cánidos (zorros y lobos) silvestres procedentes de diferentes regiones españolas (Sobrino y Gortazar 2008), encontrado una positividad del 8% y del 15% para los zorros y los lobos respectivamente. Sí que disponemos de un mayor número de trabajos que evalúan el papel de los perros domésticos (Amusatégui y cols. 2008, Merino y cols. 2000, Rojo 1997, Solano-Gallego y cols. 2006), en los que se indica que estos animales podrían ser un importante reservorio de *B. burgdorferi* sensu lato y que la seroprevalencia detectada en los perros en zonas donde la enfermedad de Lyme es endémica, es comparable a la de las personas. Aunque estos datos podrían indicar que los perros y sus garrapatas pudieran tener un papel importante en la transmisión de la enfermedad al ser humano, el escaso carácter antropofílico de *R. sanguineus*, la principal garrapata del perro, sugiere lo contrario.

Actualmente, en nuestro entorno, el conocimiento sobre los aspectos clínicos de las enfermedades anteriormente descritas es amplio, sin embargo, diferentes aspectos como la epidemiología, las especies de garrapatas vectoras, así como las especies de animales silvestres que pueden actuar como reservorios no son tan bien conocidos. El desarrollo de las técnicas moleculares que ha tenido lugar durante estos últimos años, ha proporcionado una serie de herramientas analíticas como la PCR y RLB, de gran sensibilidad y especificidad, que permiten detectar el ADN de los distintos agentes transmitidos por las garrapatas tanto en el artrópodo vector como en el animal reservorio. Por lo tanto es posible llevar a cabo estudios con un número elevado de muestras que permitan mejorar el conocimiento sobre estas enfermedades transmitidas por garrapatas.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

II.1. CAPTURA DE GARRAPATAS DE LA VEGETACIÓN

II.1.1 Selección de los puntos de muestreo

Estudios 1 / 2: Los muestreos realizados entre marzo de 2003 y abril de 2005 se llevaron a cabo en **10 áreas recreativas** de la Comunidad Autónoma del País Vasco (CAPV), cinco de ellas localizadas en parques naturales en los que se había constatado previamente la presencia de garrapatas (Figura II.1).

En el Estudio 1, los resultados de las capturas obtenidos en la CAPV se compararon con los datos de los resultados de las capturas de garrapatas obtenidos en muestreos realizados en 7 áreas de muestreo de la Comunidad Autónoma de Madrid (CAM) y uno en Toledo (Comunidad Autónoma de Castilla La Mancha, CACLM), llevados a cabo con similar protocolo de recogida de las garrapatas y durante el mismo periodo de tiempo (marzo de 2003 y abril de 2005) por el grupo de la Dra. Sonia Olmeda (Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid).

En el Estudio 2, los resultados de las capturas obtenidos en la CAPV se compararon con los datos previos existentes en esta comunidad procedentes de un estudio realizado con la misma metodología entre marzo de 1992 y abril de 1993 (Barral y cols. 1993).

Estudio 3: Los muestreos tuvieron lugar entre marzo de 2006 y octubre de 2008 en **6 áreas de muestreo**, cuatro en la CAPV y otras dos en la Comunidad Autónoma de La Rioja (CAR). La selección de los puntos se fundamentó en el conocimiento previo de la abundancia de *I. ricinus*.



Figura II.1: Área recreativa donde se realizaron muestreos de garrapatas de vegetación

II.1.2. Recogida de las garrapatas de vegetación

Una vez seleccionados los puntos de muestreo, y con una periodicidad mensual se procedió a la captura de las garrapatas presentes en la vegetación, para lo cual se empleó la técnica del arrastre de la manta (Sonenshine 1993).

Estudios 1 / 2: El procedimiento empleado consistió en pasear por la zona seleccionada arrastrando una manta de felpa blanca (Figura I.2) de dimensiones 2 m x 1,6 m durante 30 minutos (tiempo real de arrastre). Cada 2-5 minutos se paraba y se recogían las garrapatas adultas para evitar su desprendimiento y se introducían en un tubo convenientemente acondicionado y etiquetado. Una vez acabado el muestreo, la manta se introducía en una bolsa blanca que se cerraba convenientemente hasta la llegada al laboratorio. En una ficha de campo (Anexo I) se anotaban diferentes datos referidos a las condiciones medioambientales en las que se había llevado a cabo el muestreo: hora de llegada, tiempo dedicado al muestreo (minutos), temperatura (T^a) y humedad relativa (HR) ambiental y del suelo, estado del suelo (seco, húmedo, mojado, etc.), tipo de día (soleado, nublado, etc.), altura de la vegetación (alta, media, baja), y presencia de animales en el momento de realizar el muestreo.

Posteriormente en el laboratorio, se revisaban las mantas y se recogían todos los adultos y las ninfas presentes (Figura. II.2). En el caso de las larvas, como éstas pueden presentarse en algunos casos a millares, se realizaba una estimación, contando las larvas presentes en una parte representativa de la manta.



Figura II.2: Revisión de la manta en el laboratorio, para la recogida de garrapatas

La identificación de las garrapatas se realizó mediante el uso de claves taxonómicas (Gil-Collado y cols. 1979, Manilla 1998). Una vez identificadas, los resultados se anotaban en la ficha de laboratorio (Anexo II) y las garrapatas se almacenaban en viales a -80°C hasta su posterior procesado, identificadas convenientemente, en lotes y agrupadas en función de su origen, de la especie y del estadio.

Para poder comparar la densidad de garrapatas entre los diferentes muestreos y entre los puntos de muestreo, se calculó el “índice de abundancia de garrapatas” (TAI, *Tick Abundance Index*), el cual equivalía al número de garrapatas capturadas dividido entre la duración del muestreo, medida en minutos, expresado en tanto por cien.

$$\text{TAI} = \text{TR} \times 100 / t$$

Siendo, TR: Número de garrapatas capturadas; t: duración del muestreo en minutos.

Estudio 3: La periodicidad de los muestreos también fue mensual y la metodología empleada en este estudio fue prácticamente similar a la descrita en el apartado anterior. Así, en este estudio el arrastre de la manta de felpa (1 m x 1 m) se realizaba a lo largo de una distancia comprendida entre 100 y 300 metros, parando cada 5 metros para recoger las garrapatas adultas. La toma de datos referidos al recuento e identificación de las garrapatas en el laboratorio no varió con respecto a lo mencionado para los estudios 1 y 2.

El “índice de abundancia de *I. ricinus*” en este estudio, denominado AI (*I. ricinus Abundance Index*), se correspondía con el número de ejemplares capturados dividido entre la superficie de muestreo, medida en m^2 , expresado en tanto por cien.

$$\text{AI} = \text{TR} \times 100 / a$$

Siendo, TR: Número de garrapatas capturadas; a: superficie de muestreo en m^2 .

II. 2. CAPTURA DE MICROMAMÍFEROS

El estudio de las zoonosis bacterianas transmitidas por garrapatas en micromamíferos (Estudio 5) se llevó a cabo a lo largo de cinco años (2000 - 2005). Inicialmente las capturas tuvieron lugar desde abril de 2000 hasta noviembre de 2002 y se muestreó en el entorno de 5 explotaciones ovinas de Guipúzcoa, tanto en el interior de las instalaciones, como en zonas de bosque próximas a las praderas utilizadas por los rebaños. Posteriormente, desde septiembre de 2003 hasta mayo de 2005, se capturaron micromamíferos en cada una de las

10 áreas recreativas en las que se recogieron las garrapatas de vegetación para el Estudio 1.

Para poder proceder a la captura de micromamíferos fue necesario obtener los permisos oportunos de las secciones responsables de las Diputaciones Forales provinciales. En el caso de capturar alguna especie protegida o no incluidas en el estudio, eran liberadas inmediatamente, sin realizar ninguna toma de muestras.

Los muestreos se concentraron principalmente en los meses de primavera y otoño, empleándose trampas de los modelos Sherman (7,6 cm x 8,9 cm x 22,9 cm; Sherman traps, Tallahassee, Florida, EEUU) e INRA (5 cm x 5 cm x 15 cm; BTS Mechanique, Besançon, Francia) (Figura II.3). En la primera parte del estudio (muestreos 2000-2002) se colocaron entre 100 y 120 jaulas (20 Sherman en el interior de las explotaciones para capturar ratones domésticos y 100 INRA en el exterior) y 100 jaulas INRA en la segunda parte (muestreos 2003-2005). Las jaulas se colocaban al atardecer en líneas de 25 trampas (Figura II.3), separadas 4-5 metros y al abrigo de vegetación abundante, y se mantenían puestas durante dos noches consecutivas (muestreos 2000-2002) o se recogían a la mañana siguiente (muestreos 2003-2005). Los animales capturados muertos, principalmente musarañas, se introducían en bolsas de cierre hermético para evitar la pérdida de los ectoparásitos antes de su llegada al laboratorio. En el periodo 2000-2002 también se procedió a la captura de topos (*Talpa* spp.), para lo cual se emplearon 25 trampas especiales, Pincer traps (Michel Touchard et Fils, Grainville Langannerie, Francia).

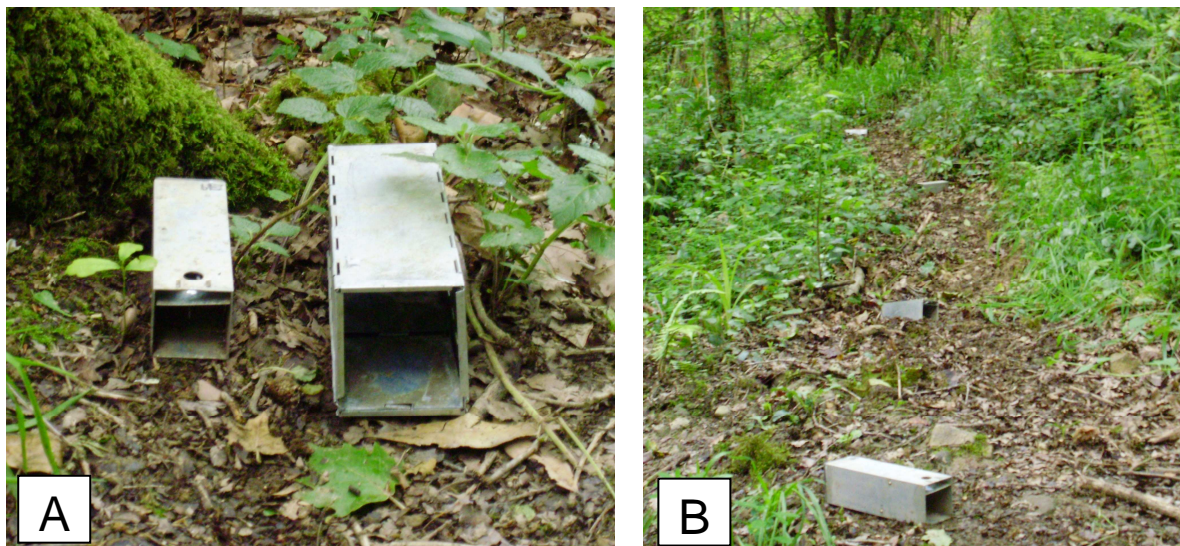


Figura II.3: Trampas para la captura de micromamíferos

A: Modelo INRA (izquierda) y Sherman (derecha)

B: Línea de trampas INRA en el bosque

Para poder comparar el número de micromamíferos capturados se calculó el “índice de abundancia de micromamíferos” (SAI, *Small-mammals Abundance Index*), que se corresponde con el número de animales capturados, dividido entre el número de jaulas colocadas y el número de noches que permanecieron puestas, expresado en tanto por cien.

$$\text{SAI} = \text{SC} \times 100 / \text{T} \times \text{N}$$

SC: Número de micromamíferos capturados. T: Número de trampas colocadas. N: Número de noches que permanecieron puestas las trampas.

II. 3 PROCESADO Y ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

II.3.1 Procesado de las garrapatas

La ruptura y homogeneización de las garrapatas adultas se realizó de forma individual. Las garrapatas analizadas en el Estudio 4 se introducían en un vial de extremo redondeado al que se añadían previamente 200 µl de buffer TE (Tris 10 mM / EDTA 1 mM, pH 8), y con una punta de pipeta estéril se procedía a la ruptura de la garrapata. El homogeneizado obtenido se empleaba en su totalidad para la posterior extracción de ADN.

Las garrapatas adultas procedentes del Estudio 3 se colocaban individualmente en tubos de 1,5 ml, y las ninfas en grupos de 5, junto con 240 µl de PBS (*Phosphate Buffered Saline*, pH 7,2) y varias bolitas metálicas de acero inoxidable, y se introducían en un homogeneizador durante el tiempo mínimo necesario para lograr su disgregación. Del homogeneizado obtenido, 100 µl se destinaban a la extracción de ARN.

II.3.2 Procesado de los micromamíferos

Para facilitar el manejo de los animales vivos, fueron anestesiados con hidrocloreto de ketamina (Imalgene[®], Merial, Francia) a la dosis de 10 mg/kg de peso vivo, vía intramuscular. En primer lugar se tomaba el peso y diferentes medidas biométricas y se anotaban las características morfológicas. A continuación se procedía a la recogida de sangre y posteriormente al examen de los ectoparásitos (Figura II.3). Las garrapatas encontradas fueron clasificadas utilizando las mismas claves taxonómicas empleadas para la identificación de las garrapatas recogidas de la vegetación (ver apartado II.1.2).

Posteriormente se realizaba la necropsia y la toma de muestras de diferentes órganos (oreja, vejiga, bazo, riñón, hígado, pulmón y encéfalo). Estos órganos fueron almacenados individualmente a -80°C para su posterior estudio mediante técnicas moleculares. Separadamente, en un vial se preparó un *pool* de órganos, incluyendo una pequeña porción de muestra de oreja, para la extracción de ADN y posterior análisis por PCR.

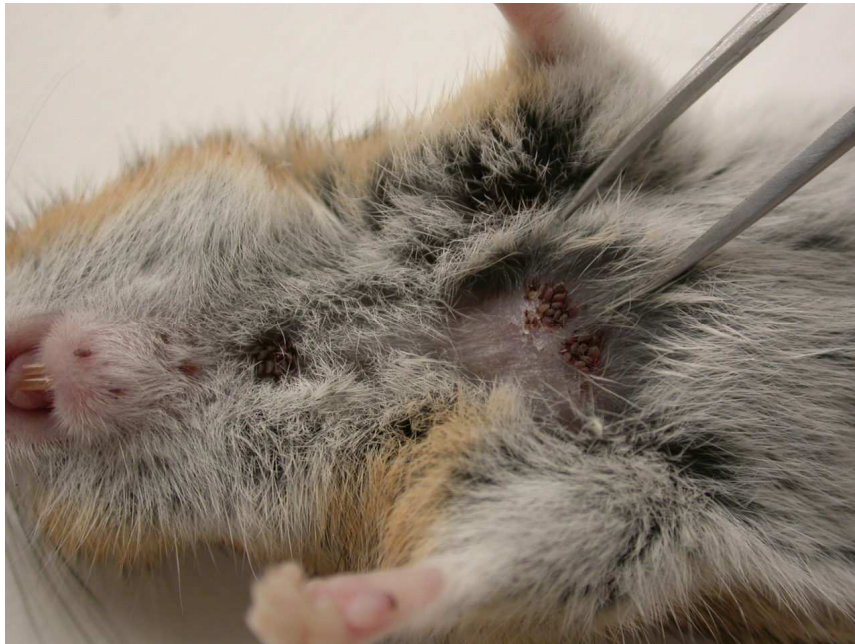


Figura II.5: Recogida de garrapatas presentes en el micromamíferos

Para la identificación de las especies de micromamíferos se analizaron los datos morfo-biométricos de cada individuo. Cuando se trataba de especies con características similares se emplearon claves taxonómicas basadas en la morfología de las arcadas dentarias (Alvarez y cols. 1986, Blanco 1998, Panzironi y cols. 1993).

II.3.3 Extracción de ADN

La obtención del ADN se realizó con un kit de extracción comercial, QIAamp DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Alemania), siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante pero con algunas modificaciones dependiendo del tipo de muestra.

La extracción del ADN de las garrapatas se realizaba a partir de los 200 μ l del homogeneizado de garrapata al que se le agregaban 20 μ l de Proteinasa K (20 mg/ml) y 180 μ l del tampón ATL. Tras mezclar bien la muestra con vórtex, se procedía a su incubación a 56°C durante 2 horas, mezclando ocasionalmente. A continuación, se añadían 200 μ l del tampón AL y se incubaba nuevamente a 70°C durante 10 minutos. Finalizadas las incubaciones, se añadía a la muestra 200 μ l de etanol absoluto y tras mezclar bien se pasaba todo el contenido a las columnas de extracción y se centrifugaba a 8.000 rpm durante un minuto. Seguidamente, se añadía el buffer AW1 y se centrifugaba a 8.000 rpm durante un minuto, se añadía el buffer AW2 y se centrifugaba dos veces a 13.000 rpm durante 3 minutos. Para finalizar la extracción el ADN se eluía en un volumen de 60 μ l del buffer de elución.

La extracción del ADN del *pool* de órganos (incluyendo la muestra de pabellón auricular) de los micromamíferos se realizaba a partir de 0,5 g de tejidos con 3 ml de TE que

se homogeneizaba en un Stomacher-80. Del homogeneizado resultante se transferían 200 µl a un tubo estéril y se le añadían 20 µl de Proteinasa K (20 mg/ml) y 180 µl de ATL, para a continuación proceder a la lisis del tejido incubando la muestra a 56°C durante 3 horas. A partir de esta fase el protocolo de extracción de ADN era similar al descrito para las garrapatas.

La concentración del ADN extraído de cada muestra fue determinada en el espectrofotómetro (NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technologies, DE, EEUU). Como medida de seguridad, en cada lote de extracción de 10 muestras se incluía un control de extracción con el fin de detectar posibles contaminaciones tanto en el proceso de extracción como en el de amplificación.

II.3.4 Extracción de ARN

El estudio del virus de la encefalitis vírica transmitida por garrapatas (TBEV) (Estudio 3) se llevó a cabo únicamente en garrapatas adultas y ninfas de la especie *I. ricinus*. El ARN de los homogeneizados de garrapatas (100 µl) se extrajo mediante el método de la guanidina tiocianato-fenol-cloroformo, empleando para ello el Trizol® LS reagent (Invitrogen, CA, EEUU), y disolviendo el pellet de ARN resultante con RNAsecure™ Resuspension Solution (Ambion, EEUU). Así, 100 µl de homogeneizado de garrapata se echaban en un tubo estéril y se añadían 300 µl de Trizol® a 4°C, agitándose brevemente en vórtex. A continuación se incubaba a Tª ambiente durante 5 minutos, se añadían 60 µl de cloroformo a la mezcla y se agitaba de nuevo en vórtex incubando a Tª ambiente durante 10 minutos (volviendo a mezclar con vortex a los 5 minutos), tras lo cual cada tubo se centrifugaba a 15.000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El sobrenadante de esta operación se transfería a nuevos tubos estériles y se añadían 150 µl de isopropanol, almacenado a -20°C, y se agitaba la nueva mezcla. A continuación, se centrifugaban los tubos a 15.000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. Tras retirar el sobrenadante se añadían 300 µl de etanol 75%, almacenado a -20°C, se agitaba en vortex durante 1 minuto y se centrifugaban a 14.000 rpm durante 6 minutos a 4 °C, tras lo cual, se procedía a retirar el sobrenadante. A continuación, se dejaban los tubos abiertos durante 45 minutos a temperatura ambiente (o el tiempo necesario) para eliminar completamente el etanol, revisando de vez en cuando para evitar que se secaran excesivamente. Finalmente, para resuspender el pellet de ARN obtenido, se añadían 30 µl de “RNAsecure”, pre-calentado a 60°C justo antes de su uso y se mantenía en agitación durante 10 minutos a 60 °C.

Como medida de seguridad, con el fin de detectar posibles contaminaciones sufridas durante el proceso de extracción, en cada lote de extracción de 6 muestras se incluía un control negativo de extracción.

II.3.5 RT-PCR a tiempo real para la detección del virus TBE (*Tick-borne encephalitis virus*)

Con el objetivo de detectar la presencia del TBEV en *I. ricinus* (Estudio 3) se empleó el método Taq-Man RT-PCR descrito previamente (Schwaiger y Cassinotti 2003). Esta técnica tiene como diana de amplificación la región 3' no codificante del genoma del virus, conservada en todos los subtipos del TBEV y localizada entre los nucleótidos 11054 y 11121 del subtipo TBEV-Eu. Para realizar la RT-PCR se utilizó el SuperScript™ III Platinum® One-step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen, CA, EEUU), añadiendo 5 µl de muestra. Los cebadores y la sonda Taq-Man empleados, descritos previamente por Schwaiger y Cassinotti (2003), fueron sintetizadas por la empresa MWG Biotech AG (Alemania), siendo sus secuencias las siguientes:

- F-TBE 1: GGG CGG TTC TTG TTC TCC
- R-TBE 1: ACA CAT CAC CTC CTT GTC AGA CT
- TBE-Probe-WT: FAM-5'-TGA GCC ACC ATC ACC CAG ACA CA-3'-TAMRA

El volumen final de la RT-PCR fue de 25 µl, el cual contenía 12,5 µl de 2X Reaction Mix, 0,5 µl de SSIII RT Platinum Taq Mix, 300 nM de cada cebador y 200 nM de la sonda Taq-Man. El proceso de amplificación y detección se llevó a cabo en un termociclador ABI 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, EE.UU.) utilizando un programa que incluía una primera fase de retrotranscripción a 40°C durante 30 minutos, seguida de una incubación a 95°C durante 10 minutos con objeto de finalizar la actividad retrotranscriptasa e iniciar la actividad polimerasa, previa a la fase de amplificación (95°C 15 s, 60°C 1 min) de 45 ciclos de duración.

El control positivo empleado en la RT-PCR (ARN vírico) fue suministrado por el Dr. Philippe Mendonça (Dpto. Parasitología, Ludwig-Maximilians-Universität - LMU Munich, Alemania). En cada reacción de RT-PCR se incluía también un control negativo para comprobar que ninguno de los reactivos de RT-PCR estaba contaminado.

II.3.6 PCR multiplex para la detección de bacterias zoonóticas transmitidas por garrapatas

El ADN procedente tanto de las garrapatas de vegetación (Estudio 4) como de los micromamíferos (Estudio 5) se sometía a dos PCR multiplex, una para la detección de *C. burnetii* y *A. phagocytophilum* y la otra para la detección de Rickettsias del GFM y de *Borrelia* spp. Para comprobar si las muestras positivas a *Borrelia* spp. pertenecían al grupo de *B. burgdorferi* sensu lato, se sometían a una nueva PCR amplificando el espacio intergénico 5S-23S rRNA, tras la cual se realizaba una hibridación inversa o *Reverse Line*

Blotting (RLB) (Rijpkema y cols. 1995). Ello permite la diferenciación entre las diferentes genoespecies (Schwartz y cols. 1992) y la detección de infecciones mixtas.

Los cebadores empleados, descritos con anterioridad por diferentes autores, fueron sintetizados por la empresa MWG Biotech AG (Alemania). La secuencia de los cebadores, el gen diana para cada uno de ellos y el tamaño del producto amplificado se muestran en la tabla II.1. Uno de los cebadores de cada pareja fue marcado en el extremo 5' con biotina, para el análisis posterior mediante hibridación inversa por RLB.

Tabla II.1. Cebadores empleados en la amplificación parcial de cada uno de los genes.

Agente	Cebador	Secuencia (5' – 3')	Amplificación	Gen	Referencia
<i>C. burnetii</i>	Trans 1	TATGTATCCACCGTAGCCAGTC	687 pb	<i>htpAB</i>	(Willems y cols. 1994)
	Trans 2	biotina-CCCAACAACACCTCCTTATTC			
<i>A. phagocytophilum</i>	Msp2-3F	CCAGCGTTTAGCAAGATAAGAG	334 pb	<i>msp2</i>	(Zeidner y cols. 2000)
	Msp2-3R	biotina-GCCCAGTAACAACATCATAAGC			
<i>Rickettsia</i> spp.	Rr190.70p	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA	532 pb	<i>ompA</i>	(Regnery y cols. 1991)
	Rr190.602n	biotina-AGTGCAGCATTGCTCCCCCT			
<i>Borrelia</i> spp.	BORF	CGCTGGCAGTGCGTCTTAA	491 pb	16S rRNA	(Gil y cols. 2005)
	16S	Biotina-GCGGCTGCTGGCACGTAATTAGC			
<i>B. burgdorferi</i> s.l.	23SN2	ACCATAGACTCTTATTACTTTGACCA	225 pb	5S-23S rRNA	(Rijpkema y cols. 1995)
	5SCB	Biotina-GAGAGTAGGTTATTGCCAGGG			

Para lograr la optimización de las PCR multiplex, se probaron varias condiciones de temperatura, tiempos y número de ciclos, y diferentes concentraciones de $MgCl_2$ y de *Taq* DNA polimerasa, hasta lograr el máximo rendimiento de cada reacción, es decir, la detección del menor número de copias de cada agente estudiado. Las temperaturas y tiempos finalmente seleccionados figuran en la tabla II.2.

Tabla II.2. Temperaturas, tiempos y número de ciclos empleados en cada reacción de PCR.

<i>Anaplasma-Coxiella</i>			<i>Rickettsia-Borrelia</i>			<i>B. burgdorferi</i>		
T ^a	Tiempo	Nº ciclos	T ^a	Tiempo	Nº ciclos	T ^a	Tiempo	Nº ciclos
94°C	30 seg	5	94°C	3 min	1	94°C	1 min	1
71°C (↓ 2°C)	1 min		94°C	15 seg	40	94°C	30 seg	50
72°C	1 min		46°C	1 min		54°C	30 seg	
94°C	30 seg	40	72°C	1.5 min	1	72°C	1 min	1
63°C	30 seg		72°C	5 min		72°C	5 min	
72°C	1 min							

Para cada una de las tres PCR realizadas, el volumen final de cada reacción era de 25 μ l y la cantidad de ADN añadida oscilaba entre 100 y 200 ng; sin embargo, la concentración de los reactivos empleados y la cantidad de cada cebador añadido era diferente para cada una de ellas (Tabla II.3).

Tabla II.3. Concentración o cantidad de los reactivos empleados en cada reacción de PCR.

Anaplasma-Coxiella		Rickettsia-Borrelia		B. burgdorferi	
Reactivo	Concentración	Reactivo	Concentración	Reactivo	Concentración
Msp2-3F	0,4 μ M	Rr190.70p	0,4 μ M	23SN2	0,2 μ M
Msp2-3R	0,4 μ M	Rr190.602n	0,4 μ M	5SCB	0,2 μ M
Trans1	0,2 μ M	BORF	0,4 μ M		
Trans2	0,2 μ M	16S	0,4 μ M		
dNTP mix	200 μ M	dNTP mix	200 μ M	dNTP mix	200 μ M
MgCl ₂	1,5 mM	MgCl ₂	1,5 mM	MgCl ₂	2,5 mM
Buffer 10x	x1	Buffer 10x	x1	Buffer 10x	x1
Taq polimerasa	1,5 U	Taq polym.	1,5 U	Taq polym.	1 U
Agua	c.s.p.* (25 μ l)	Agua	c.s.p.* (25 μ l)	Agua	c.s.p.* (25 μ l)

- c.s.p. cantidad suficiente para completar el volumen requerido
-

En cada reacción de PCR se incluía un control negativo, el cual contenía todos los reactivos excepto el ADN, que era sustituido por el mismo volumen de agua libre de ADNAsas y ARNAsas (Sigma-Aldrich Química S.A., España). Este control permitía comprobar que ninguno de los reactivos de PCR estaba contaminado.

Para disponer de controles positivos para las reacciones de PCR, se clonó un amplicón de cada una de las regiones génicas diana de las PCR. Para ello, se procedió inicialmente a la extracción y purificación de fragmentos de ADN visualizados en geles de agarosa con el GFX-PCR kit (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia), y su posterior clonación mediante la ligación de dichos fragmentos con el vector pCR[®]4-TOPO[®] y la siguiente transformación del vector recombinante en células de *E. coli*, químicamente competentes, de acuerdo al protocolo suministrado por el fabricante (TOPO TA Cloning[®] kit for Sequencing, Invitrogen, CA, EEUU). Los productos obtenidos fueron posteriormente enviados a secuenciar al Servicio de Secuenciación Automática de DNA (SSAD) del Centro de Investigaciones Biológicas (Madrid), donde se confirmó la identidad de los controles.

II.3.7 Reverse Line Blotting (RLB)

Los productos amplificados obtenidos de las dos PCR multiplex se sometían a una hibridación inversa por RLB para determinar la especie así como para aumentar el umbral de detección. El soporte empleado para la hibridación era una membrana con carga negativa (Biodyne C®, Pall Europe Ltd., Portsmouth, Reino Unido), de un tamaño de 15 cm x 15 cm, activada previamente en una solución EDAC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) (Sigma-Aldrich Química, S.A., España) al 16% en agua destilada durante 10 minutos. En esta membrana se fijaron 3 sondas específicas (*C. burnetii*, *A. phagocytophilum* y *Borrelia* sp. R57) y 2 genéricas (*Borrelia* spp. y *Rickettsia* spp.), con una modificación amino (C6) en el extremo 5', sintetizadas por la empresa MWG Biotech (Alemania). Las sondas, previamente resuspendidas a una concentración 100 µM, fueron diluidas en concentraciones de 0,3 a 16,2 µM (Tabla II.4) en un tampón (NaHCO₃ 500 mM). A continuación, aplicaron 140 µl de cada sonda en un patrón de líneas utilizando un Miniblotter® 45 (Immunelect, Cambridge, EEUU) y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente para lograr su unión covalente a la membrana. Posteriormente, se bloqueó la membrana por inactivación con una solución de NaOH 100mM durante 9 minutos a temperatura ambiente y se procedió a su lavado con 2xSSPE-0,1%SDS durante 5 minutos a 60°C en baño con agitación. Finalmente, se lavó la membrana en EDTA 20 mM (pH 8) durante 15 minutos a temperatura ambiente y se almacenó a 4° C sumergida en EDTA 20 mM (pH 8) hasta su uso.

Para llevar a cabo la RLB de las muestras se diluía una alícuota de 25 µl de cada producto de PCR en 110 µl de tampón de muestra (2xSSPE-0.1%SDS), se desnaturalizaban mediante incubación en bloque de calor a 100°C durante 10 minutos e inmediatamente se introducían en hielo. Tras colocar la membrana en el *miniblotter*, girada 90° con respecto a la posición de las sondas, con el fin de que cada muestra de producto amplificado se enfrentara a todas las sondas fijadas, se aplicaban 140 µl de cada muestra y se incubaban en el horno de hibridación (Shaken Snack – Hybaid, ThermoFisher Scientific, EEUU) a 48°C durante 60 minutos. Finalizada la incubación, se aspiraban las muestras de cada uno de los canales de reacción del *miniblotter* y se pasaba la membrana al tubo de hibridación para ser lavada dos veces con tampón de lavado (2xSSPE-0.5%SDS) en el interior del horno de hibridación a 40°C durante 10 minutos. Para poder revelar la reacción, la membrana se incubó a 42°C durante 30 minutos con una dilución 1:40000 del conjugado de estreptavidina marcado con peroxidada (estreptavidina-POD, Roche Diagnostics S.L., Barcelona, España) en tampón de lavado. Seguidamente se pasaba la membrana a un tubo de hibridación limpio en el que se realizaban dos lavados con el tampón de lavado durante 10 minutos a 42°C. A continuación, tras colocar la membrana en una bandeja con 2XSSPE se realizaban dos

nuevos lavados durante 5 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, la hibridación se visualizaba mediante quimioluminiscencia, para lo cual se sumergía la membrana en el sustrato SuperSignal West Dura® (Meridian Rd, Rockford, IL, EEUU) y se exponía a una película de rayos X (Hiperfilm ECL, Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd., Buckinghamshire, Reino Unido).

La identificación de la geno especie a la que pertenecían las muestras positivas para *B. burgdorferi* sensu lato se realizó también mediante la hibridación inversa por RLB, tal y como se ha descrito anteriormente. Para ello se fijaron en una nueva membrana 6 sondas para el espacio intergénico 5S-23S rRNA, una específica para *B. burgdorferi* sensu lato y el resto para las geno especies *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana* y *B. lusitaniae*. Estas sondas, descritas previamente por diversos autores (Tabla II.4), fueron sintetizadas por la empresa MWG Biotech (Alemania).

Para determinar la sensibilidad del conjunto de las técnicas de PCR y RLB se realizaron 10 diluciones seriadas de los controles positivos en buffer TE. El número mínimo de copias detectadas para *Rickettsia* spp. fue de 60, mientras que para el resto de agentes se llegó a detectar 6 copias.

Tabla II.4. Sondas utilizadas en la RLB para la detección de los agentes bacterianos (todas modificadas con un grupo amino (C6) en el extremo 5').

Bacteria	Secuencia (5' – 3')	Gen	Concentración	Referencia
<i>C. burnetii</i>	GCAAGAATACGGACTCACGA	<i>htpAB</i>	2 µM	Estudio
<i>A. phagocytophilum</i>	GGTTACGAGCGCTTCAAGACC	<i>msh2</i>	2 µM	Estudio
<i>Rickettsia</i> spp.	GGCAAAAGCTTAACTTTAAA	rOmpA	2 µM	Estudio
<i>Borrelia</i> spp.	GAGGAATAAGCTTTGTAGGAAATG	16S rRNA	2 µM	(Gil y cols. 2005)
<i>Borrelia</i> sp. R 57	AGTCATTAAGATGTTTAAATG	16S rRNA	16,2 µM	(Gil y cols. 2005)
<i>B. burgdorferi</i> s.l.	CTTTGACCATATTTTTATCTTCCA	5S-23S	0,3 µM	(Rijkema y cols. 1995)
<i>B. burgdorferi</i> s.s.	AACACCAATATTTAAAAACATAA	5S-23S	0,3 µM	(Rijkema y cols. 1995)
<i>B. afzelii</i>	AACATTTAAAAATAAATTCAAGG	5S-23S	0,3 µM	(Rijkema y cols. 1995)
<i>B. garinii</i>	AACATGAACATCTAAAAACATAAA	5S-23S	0,3 µM	(Rijkema y cols. 1995)
<i>B. valaisiana</i>	CATTAATAAATAAATAAATAAATTCAAGG	5S-23S	0,3 µM	(Rijkema y cols. 1995)
<i>B. lusitaniae</i>	TCTATTTTATTTTTATATTTTTTT	5S-23S	0,9 µM	(Gil 2002)

II.3.8 Identificación de las rickettsias del grupo de las fiebres manchadas

Para identificar las especies de *Rickettsia* presentes en las garrapatas, las muestras positivas a *Rickettsia* spp. en la hibridación se sometían a una nueva PCR que amplificaba un fragmento de 385 pares de bases del gen que codifica para la citrato sintasa (*glfA*)

descrita por Regnery y cols. (1991). Los cebadores empleados (Rglt-F y Rglt-R) fueron sintetizados por la empresa Sigma-Aldrich, (España), siendo las secuencias las siguientes:

- Rglt-F: CTTTGGGGRCCTGCTCACGG
- Rglt-R: ATTGCAAAAAGTACMGTGAACA

La amplificación fue desarrollada con 150 ng de ADN en un volumen de reacción de 25 µl. Los componentes de la reacción de PCR y el perfil del programa al que se sometieron las muestras se muestran en las tablas II.5 y II.6, respectivamente.

Veintidós productos de amplificación fueron posteriormente purificados con el kit GFX PCR DNA y enviados a secuenciar al SSAD del Centro de Investigaciones Biológicas (Madrid), para la identificación de la especie de *Rickettsia*.

Las secuencias obtenidas fueron analizadas mediante la búsqueda de homologías con las secuencias de nucleótidos extraídas de la base de datos de GenBank utilizando el programa BLAST del *Nacional Center for Biotechnology Information* (NCBI), disponible vía Internet. Los alineamientos múltiples de las secuencias se realizaron usando el programa AlignX (Vector NTI 8.0 suite, InforMax, North Bethesda, MD, EEUU) basado en algoritmo ClustalW (Thompson y cols. 1994).

Tabla II.5. Componentes de reacción de PCR *gltA*

Reactivo	Concentración
Rglt-F	0,2 µM
Rglt-R	0,3 µM
dNTP mix	200 µM
MgCl ₂	2,5 mM
Buffer 10x	x1
<i>Taq</i> platinum	0,35 U
Agua *	c.s.p. (25 µl)

Tabla II.6. Programa del termociclador

T ^a	Tiempo	Nº ciclos
94°C	4 min	1
94°C	20 seg	
62°C	20 seg	35
72°C	35 seg	

II.3.9 Análisis estadísticos generales

Los datos de recuentos de garrapatas fueron sometidos a una transformación logarítmica para su análisis estadístico. Para realizar los diferentes análisis estadísticos se utilizó el paquete estadístico SAS 9.1 (SAS Institute Inc., Cary, NC, EEUU). Tal y como se detalla en los diferentes artículos, se utilizaron diferentes procedimientos, como la comparación de medias, la correlación y regresión múltiple, y la comparación de proporciones mediante Chi cuadrado.

III. ARTÍCULOS / ESTUDIOS

ARTÍCULO / ESTUDIO 1

Differences in Questing Tick Species Distribution between Atlantic and Continental Climate Areas in Spain

J.F. Barandika,¹ S.A.Olmeda,² M.A. Casado-Nistal,² A. Hurtado,¹ R.A. Juste,¹ F. Valcárcel,³ P. Anda,⁴ and A.L. García-Pérez¹

¹ NEIKER-Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, Berreaga 1, 48160 Derio, Bizkaia, Spain

² Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

³ Centro de Investigación en Sanidad Animal-INIA, Valdeolmos, 28130-Madrid, Spain

⁴ Instituto de Salud Carlos III, Centro Nacional de Microbiología, Majadahonda, 28220 Madrid, Spain

Enviado al:

Journal of Medical Entomology, 23/03/2010 (en revision, ver Anexo III)

Summary

Climate and vegetation in Spain vary from north to south affecting tick distribution and consequently the presence of tick-borne diseases. The aim of this study was to investigate throughout a two-year study the distribution of the different exophilic questing tick species present in 18 areas; 8 located in Central and 10 in Northern Spain. The same methodology was used in both areas, sampling vegetation on a monthly basis by blanket dragging for 20-30 min intervals. A total of 12 species belonging to the genera *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Rhipicephalus*, *Dermacentor* and *Hyalomma* were identified. Differences in species distribution and prevalence were dramatically different. The most frequent and abundant species in Northern Spain were *Ixodes ricinus* and *Haemaphysalis punctata*, whereas *Hyalomma lusitanicum* and *Dermacentor marginatus* were the most abundant in Central Spain. *I. ricinus*, *H. punctata*, *D. marginatus* and *Rhipicephalus bursa* were captured in both regions, but in significantly different quantities. *I. ricinus* accounted for 66.7% of adult ticks identified in Northern Spain, whereas in Central Spain this species only represented 0.3%. Similarly, prevalence of adult *H. punctata* was higher in Northern Spain (8.1%) than in Central Spain (0.04%). Conversely, *H. lusitanicum* represented 85.5% of the adult ticks captured in Central Spain, being totally absent in the North. There were important differences in the monthly seasonal patterns for the different tick species. These results highlight important differences in tick distribution in neighboring areas and underline the need for ongoing surveillance schemes to monitor tick population dynamics and the prevalence of tick-borne pathogens.

Introduction

Tick infection represents an important problem in livestock production. Extensive flock management systems where animals spend part of the year in mountain grazing areas favor the survival and the maintenance of questing ticks that can cause high infections under suitable climatic conditions. Farmers apply long-lasting periodic treatments with insecticides to maintain tick burden at low levels and consequently, prevent tick-borne diseases (granulocytic anaplasmosis, piroplasmosis, etc.) (Jongejan 1999, Jongejan y Uilenberg 2004). On the other hand, these arthropods are very well-known for a wide sector of the human population exposed to their bites (farmers, foresters, etc) in regions where diseases such as tick-borne encephalitis virus, Lyme disease, several rickettsiosis and granulocytic anaplasmosis have been reported (Estrada-Peña y Jongejan 1999, Parola y Raoult 2001b). Certain environmental conditions and biotopes favor survival of different tick species, determining their geographic distribution and consequently, defining the risk area for different tick-borne diseases (Parola y Raoult 2001b). Each pathogen is usually transmitted more efficiently by certain tick species (Parola y Raoult

2001b), thus, knowledge of tick species distribution and phenology provides valuable information to evaluate the risk of diffusion of these agents.

There are several methods to estimate the presence and abundance of exophilic questing ticks in a particular area. Direct collection (dragging or flagging and walking) is considered the standard method for collecting active exophilic ticks questing on vegetation (Sonenshine 1993), and approximates human biting risks. However, its efficiency has been shown to vary substantially with different tick species and stage (Talleklint-Eisen y Lane 2000, Vassallo y cols. 2000). Other methods, such as CO₂ or pheromone traps, attract ticks from a distance. These methods reduce the sampling effort but have the additional logistical problems of CO₂ source (dry ice) acquisition, transport and storage, or the specificity of the pheromones. Again, the collection success also varies with the tick species (Falco y Fish 1991, Schulze y cols. 1997, Sonenshine 2006). On the other hand, the method of choice to study endophilic species is the direct collection of ticks found attached to livestock and wild animals (Sonenshine 1993).

Despite its relatively small area (583,254 Km²), the Iberian Peninsula shows a great biodiversity on flora and fauna, including ticks, with more than 20 species of ixodid ticks identified (Cordero del Campillo y cols. 1994). Climate in the different regions of the Iberian Peninsula varies from north to south and this affects landscape, which varies greatly along latitude. Both, climate and vegetation affect tick distribution and presence of tick-borne diseases. In fact, the Iberian Peninsula is a geographical bridge between Europe and Africa. There is a natural borderline dividing the so-called humid Spain in the north (annual RH > 70%) and the dry Spain in the centre and south (annual RH < 70%) (<http://www.aemet.es/>), and each one of these areas have probably different tick species and tick-borne diseases. The aim of this study was to investigate the distribution of the different exophilic ticks in 18 representative field sites of Northern and Central Spain by identifying questing species, and assessing their abundance and seasonal activity during the same period of time (two years) and using the same methodology. Data about land-use, wild and domestic animal presence, vegetation and altitude from each area were also analyzed.

Material and Methods

Selection of Sampling Areas

Eighteen areas were selected from the two climatic areas, 10 sites in the Basque Country, Northern Spain (NS) and 8 areas in Central Spain (CS): 7 in the Community of Madrid and 1 in the province of Toledo (Figure 1). NS has an Atlantic climate with abundant rainfall (1200-2600 mm a year) throughout the year and mild temperatures in summer (mean maximum temperatures below 25°C) and winter (mean minimum temperatures above 4°C).

CS has a Continental climate with an annual rainfall below 500 mm, with minimum levels in August and maximum ones in May and December, and with high mean maximum temperatures in summer ($>30^{\circ}\text{C}$) and low minimum temperatures in winter months ($<2^{\circ}\text{C}$).

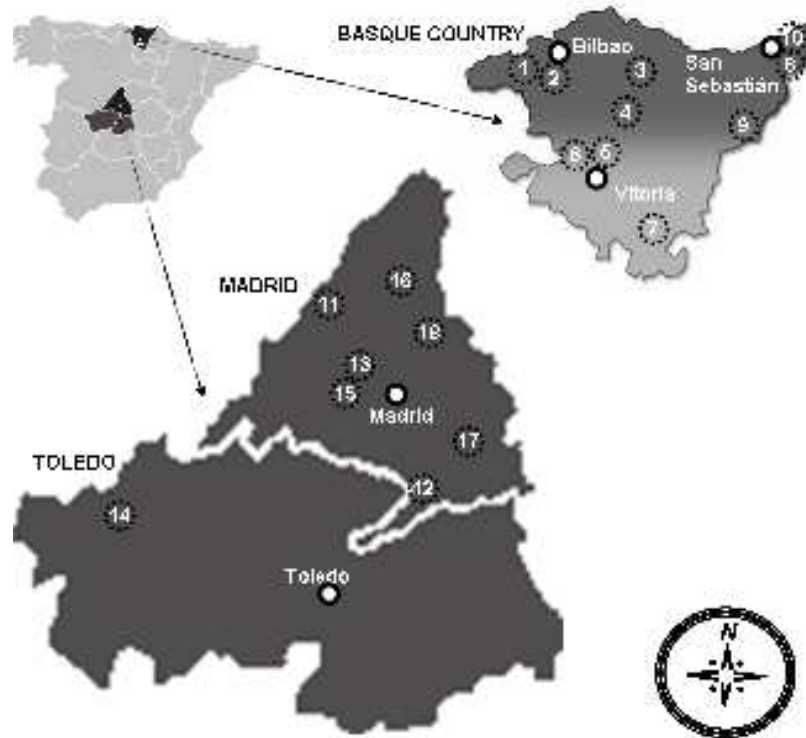


Fig. 1. Geographic distribution of the sampling sites.

Pasture-raised livestock is abundant in the sampled regions, with a population of 316,994, 180,038 and 565,056 sheep; 20,414, 27,072 and 100,350 goats; 59,314, 39,019 and 35,811 beef cattle and 13,500, 4,173 and 3,546 free-ranging horses in the Basque Country, the Community of Madrid and the province of Toledo, respectively (National Statistics Institute, <http://www.ine.es>).

Sampling sites were selected to account for the geographical, climatic, botanical and land-use diversity of the natural regions, including lowland fenced pastures, mountain communal-grazing land, conifer and/or deciduous forests and human recreational areas (footpaths and picnic grounds). Domestic herbivores and wildlife species were present in almost all the zones. Table 1 presents a brief description of the predominant wildlife species, type of forest, ground cover and main use of the sampling sites. Also, the coordinates and altitude of the sampling areas were recorded on the first visit to each area.

Table 1. General description of coordinates, altitude, annual mean medium, maximum and minimum air temperatures, mean annual rainfall, mean annual RH (%), use, type of forest, undergrowth, and main livestock species and wildlife present in sampling sites (NA=non available data).

Region	Area	Coordinates	Altitude	Mean med T ^a	Mean max T ^a	Mean min T ^a	Rainfall (l/m ²)	RH (%)	Use of area	Forest	Predominant vegetation	Livestock	Wildlife species
NS	1	X: 464630 Y: 4786329	500	14.2	17.2	11.4	950.9	76.6	Recreational	Pine	Bracken, Gorse Bramble	Cattle Horses Sheep	Badger, Foxes, Roe deer Wild boar
	2	X: 504191 Y: 4785432	550	13.5	18.7	9.0	1205.9	76.0	Recreational	Pine	Bracken, Gorse Bramble, Hawthorn	Sheep, Cattle Horses	Badger, Foxes, Roe deer Wild boar
	3	X: 531620 Y: 4785745	760	8.7	11.7	6.1	1255.3	86.1	Recreational	Pine, Oak	Bracken, Gorse Bramble, Heather	Cattle, Horses	Badger, Foxes, Roe deer Wild boar
	4	X: 525752 Y: 4768590	615	10.3	14.4	6.8	1520.4	86.0	Recreational	Pine, others	Bracken, Gorse Bramble, Heather	Sheep, Cattle Horses	Badger, Foxes, Roe deer Wild boar
	5	X: 513545 Y: 4758873	655	11.6	16.9	7.0	1108.3	83.6	Recreational	Pine, Oak	Bracken, Gorse Bramble, Heather	Cattle, Horses	Badger, Foxes, Red deer Roe deer, Wild boar
	6	X: 501236 Y: 4753619	865	9.5	13.5	6.5	1198.7	79.7	Recreational	Pine, Beech	Bracken, Gorse, Heather, Hawthorn Juniper	Sheep, Cattle Horses	Badger, Foxes, Roe deer Wild boar
	7	X: 543300 Y: 4726922	695	9.7	15.3	4.4	766.9	75.9	Recreational	Pine, Oak	Bracken, Bramble Gorse, Heather	Cattle, Horses	Badger, Foxes, Roe deer Wild boar
	8	X: 599182 Y:4793824	500	12.4	18.2	7.9	2150.1	77.4	Recreational	Pine	Bracken, Bramble Gorse	Sheep, Cattle Horses	Badger, Foxes, Roe deer Wild boar
	9	X: 572683 Y: 4759624	620	13.1	18.8	8.6	1242.7	81.2	Recreational	None	Bracken, Bramble Gorse	Sheep, Cattle Horses	Badger, Foxes, Roe deer Wild boar
	10	X: 593685 Y: 4801250	310	12.3	15.2	9.7	1118.4	81.0	Recreational	Pine	Bracken, Bramble Gorse, Heather	Sheep, Cattle Horses	Badger, Foxes, Roe deer Wild boar
CS	11	X: 410750 Y: 4510400	1200	11.5	18.0	5.8	794.8	NA	Recreational	Pine, Oak	Bracken, Lavender Blackberry, Broom	Cattle, Horses	Roe deer, Dormice Wild boar
	12	X: 432750 Y: 4420400	490	14.4	NA	NA	318.4	61.5	Grazing	Pine, Holm Oak	Lavender, Thyme Broom	Sheep, Cattle Horses	Rabbit
	13	X: 423750 Y: 4485400	809	15.2	21.1	8.9	391.3	48.4	Recreational	Holm, Oak	Rockrose, Broom	None	Rabbit, Red deer Wild boar
	14	X: 313600 Y: 4420200	500	15.4	22.5	8.6	379.3	59.2	Grazing	Holm, Oak	Lavender, Thyme Broom	Cattle, Sheep Porcine	Foxes, Fowl, Rabbit Red deer
	15	X: 396794 Y: 4432635	580	15.2	21.1	8.9	391.3	48.4	Recreational	Pine, Holm Oak	Blackberry, Broom	Cattle Horses	Rabbit
	16	X: 443294 Y: 4514135	879	14.7	21.2	8.1	350.9	54.6	Recreational	Pine, Holm Oak	Thyme, Broom Blackberry	Cattle Horses	Rabbit
	17	X: 452310 Y: 4459360	623	15.6	18.0	6.0	323.7	64.3	Grazing area	Pine	Broom	Cattle	Rabbit
	18	X: 461250 Y: 4500900	724	14.7	21.2	8.1	350,9	54.6	Grazing area	Poplar (scarce)	Thyme, Broom	Sheep	Foxes, fowl Rabbit

Tick Collection and Identification

Monthly recordings of tick abundance were conducted between March 2003 and April 2005. Ticks were collected from vegetation by the blanket-dragging method as described by Sonenshine (1993), using a 2 x 1.6 m white cotton towel cloth that was dragged for 20-30 min, stopping every 2-5 min to collect all adult ticks attached to the towel. In each region samplings were always done by the same personnel. For larvae counts, towels were examined at the laboratory, counting them all when the number was low, but in the case of high numbers an estimate was made after visually dividing the towel into ten 10 cm stripes and counting three of them (first, middle and last). Ticks were identified in the laboratory at the species level using taxonomic keys (Gil-Collado y cols. 1979, Manilla 1998), except for some immature stages which could only be identified at the genus level.

To allow for tick counts comparison from samplings with different time intervals, a “tick abundance index” (TAI) was calculated by dividing the number of ticks collected by dragging time in minutes, multiplied by 100 (ticks per 100 minutes sampling).

Data Collection

Climatic data from meteorological stations close to the sampling sites were compiled over the period 2003-2005. Monthly measures of mean, maximum and minimum air temperatures (°C), relative humidity (RH) (%) and precipitation (mm) were obtained from different sources, the Basque Agency of Meteorology (<http://www.euskalmet.euskadi.net/s07-5853x/es/metereologia/climatologia.apl?e=5>) and the Spanish Agency of Meteorology (<http://www.aemet.es/>). Annual mean temperatures, percentages of RH, and mean annual rainfall recorded in the study period in each sampling site are also shown in Table 1.

Statistical Methods

Tick abundance indexes (TAI) for larvae (TAIL), nymphs (TAIN) and adults (TAIA) were transformed according to the natural logarithm of the index plus one [$\ln(\text{TAI} + 1)$] for statistical analyses. SAS 9.1 software (Institute Inc., Cary, NC, USA) was used to compare means using analysis of variance. Pearson correlation and regression models were also used to examine the relationship between tick abundance and weather data. Significance was set at $P < 0.05$.

Results

Total Number and Prevalence of Tick Species

Time of sampling in each region accounted for 4790 min in CS and 5155 min in NS (Table 2). A large number of larvae, nymphs and adults were counted, especially in NS. Table 2 shows TAI index calculations for larvae, nymphs and adults. Ratios for adults, nymphs and larvae were significantly different ($P < 0.05$) in NS (1:12:99) and CS (14:1:10). TAIL was significantly higher in NS, TAIN decreased from North to South, and TAIA was higher in CS.

Table 2. Number of ticks and species collected in each region (NS and CS), and their abundance (TAI).

Tick genera	Tick species	Tick stage	NS (5,155 min sampling)		CS (4,790 min sampling)	
			No.	TAI	No.	TAI
	Total number of ticks		180,177	3,495.2	4,828	100.8
		Larvae	159,950	3,102.8	1,907	39.8
		Nymphs	18,612	361.0	191	4.0
		Adults	1,615	31.3	2,730	57.0
<i>Ixodes</i> spp.	<i>I. ricinus</i>	Adults	1,075	20.8	8	0.2
		Nymphs	17,385	337.2	20	0.4
		Larvae	148,099	2,872.9	5	0.1
	<i>I. ventralloi</i>	Nymphs	0	0	1	0.02
	<i>I. frontalis</i>	Adults	1	0.02	0	0
Nymphs		8	0.2	0	0	
<i>Haemaphysalis</i> spp.	<i>H. punctata</i>	Adults	130	2.5	1	0.02
		Nymphs	1,096	21.3	0	0
		Larvae	10,520	204.1	0	0
	<i>H. inermis</i>	Adults	201	3.9	0	0
		Nymphs	2	0.04	0	0
	<i>H. concinna</i>	Adults	56	1.1	0	0
		Nymphs	121	2.3	0	0
	<i>H. hispanica</i>	Adults	0	0	1	0.02
	<i>Haemaphysalis</i> spp.	Larvae	1,331	25.8	8	0.2
	<i>Dermacentor</i> spp.	<i>D. reticulatus</i>	Adults	99	1.9	0
<i>D. marginatus</i>		Adults	2	0.04	317	6.6
<i>Hyalomma</i> spp.	<i>H. lusitanicum</i>	Adults	0	0	2,333	48.7
		Nymphs	0	0	111	2.3
	<i>Hyalomma</i> spp.	Larvae	0	0	750	15.7
<i>Rhipicephalus</i> spp.	<i>R. bursa</i>	Adults	51	1.0	18	0.4
	<i>R. pusillus</i>	Adults	0	0	52	1.1
		Nymphs	0	0	28	0.6
	<i>Rhipicephalus</i> spp.	Nymphs	0	0	31	0.6
		Larvae	0	0	1,144	23.9

Eight tick species were collected from vegetation in each of the two regions, making up a total of 12 different species of the genera *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* and *Hyalomma* (Table 2). Immature ticks were recovered from all genera but *Dermacentor* (Table 2). The most distributed and abundant species in the Northern region

were *I. ricinus* and *H. punctata*, whereas *H. lusitanicum* and *D. marginatus* were the most prevalent in Central Spain (Table 2). *I. ricinus*, *H. punctata*, *D. marginatus* and *R. bursa* were captured in the two regions, but with significantly different TAI indexes (Table 2). Other species like *Haemaphysalis hispanica*, *Ixodes ventralloi* and *Ixodes frontalis* were only occasionally found. *I. ricinus* accounted for 66.7% of adult ticks identified in NS, whereas in CS this species only represented 0.3%. Similarly, adult *H. punctata* presented higher prevalence in the North (8.1% in NS and 0.04% in CS). On the contrary, *H. lusitanicum* represented 85.5% of the adult ticks captured in CS, whilst it was absent in NS.

Table 3 shows the TAIs for the main tick species in each sampling site. The highest TAIs were obtained from sites located in NS, where 3-5 different species were identified per site. In CS the number of species found per sampling site was similar (2-5). Regarding species within the genus *Dermacentor*, *D. reticulatus* only appeared in sites from NS (8/10 sites) whereas *D. marginatus* was present in almost all sites in CS (7/8 sites) but was scarce in NS (1/10 sites). *Haemaphysalis inermis* (5/10 sites) and *H. concinna* (2/10 sites) appeared only in NS, and *H. lusitanicum* (6/8 sites) and *Rhipicephalus pusillus* (5/8 sites) were only present in CS.

Tick Seasonal Activity

There were important differences in the monthly seasonal patterns according to the tick species. Figure 2 presents the monthly mean kinetics of adults and nymphs, if present, of the tick species with a representative number of captures over the 2-year period, in the site where each tick species was more abundant. The seasonal patterns of *I. ricinus* nymphs and adults were nearly overlapping: the highest activity occurred between April and June, decreasing thereafter and slightly increasing later in autumn-winter months (Figure 2). Larvae of *I. ricinus* were active between May and September, but also appeared in other seasons (data not shown).

Adults of the three main *Haemaphysalis* species showed different activity patterns, and whereas *H. inermis* and *H. punctata* were more abundant in colder months, *H. concinna* was only active from May to September. Larvae of *Haemaphysalis* spp. were only active in summer months (data not shown).

Dermacentor species predominated in autumn and winter months, with longer activity periods for *D. marginatus*, which was also active in spring months (March-June). Finally, adults of *H. lusitanicum* and *R. bursa* were collected exclusively at the end of spring and beginning of summer with peaks in June and July.

Table 3. Tick abundance in each sampling site.

Region	Area	Tick abundance index (ticks collected/ 100 min sampling)									Adults	Nymphs	Larvae	TOTAL
		<i>I. ricinus</i>	<i>H. punctata</i>	<i>H. inermis</i>	<i>H. concinna</i>	<i>D. reticulatus</i>	<i>D. marginatus</i>	<i>R. bursa</i>	<i>H. lusitanicum</i>	<i>R. pusillus</i>				
NS	1	2575.2	105.5	8.9	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.0	23.4	364.3	2302.7	2690.5
	2	5189.0	45.0	6.1	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0	45.0	658.4	4537.4	5240.9
	3	3077.4	152.7	0.0	0.0	7.8	0.0	0.0	0.0	0.0	29.4	187.8	3020.7	3237.9
	4	91.0	0.0	0.0	0.2	2.8	0.0	0.0	0.0	0.0	6.9	42.7	44.9	94.5
	5	6172.2	250.2	1.7	32.6	2.0	0.0	0.0	0.0	0.0	61.5	644.4	5752.8	6458.7
	6	6276.7	403.9	7.5	0.0	0.6	0.0	0.6	0.0	0.0	69.7	868.1	5751.4	6689.2
	7	9718.2	64.0	17.1	0.0	3.9	0.0	1.3	0.0	0.0	66.6	843.7	8894.3	9804.6
	8	232.9	152.3	0.0	0.0	0.6	0.0	2.5	0.0	0.0	10.8	73.2	304.6	388.6
	9	39.7	0.6	0.0	0.0	1.6	0.0	0.0	0.0	0.0	1.7	10.8	29.5	42.1
	10	270.1	1179.6	0.0	0.0	0.3	0.3	4.1	0.0	0.0	13.5	94.9	1346.2	1454.6
CS	11	4.8	1.5	0.0	0.0	0.0	2.6	2.6	0.0	0.0	6.0	3.8	98.3	108.0
	12	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	9.7	0.2	11.4	43.5	20.2	6.1	44.4	70.6
	13	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0	3.3	0.0	3.5	0.7	0.0	4.2
	14	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.8	0.0	160.6	2.0	18.0	9.7	137.6	165.3
	15	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	24.3	8.3	0.5	17.4	26.2
	16	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	3.6	0.3	0.0	0.0	3.9	0.0	33.9	37.8
	17	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	316.1	2.8	310.1	7.6	1.6	319.3
	18	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	38.6	0.2	50.8	22.7	92.2	3.7	16.5	112.4

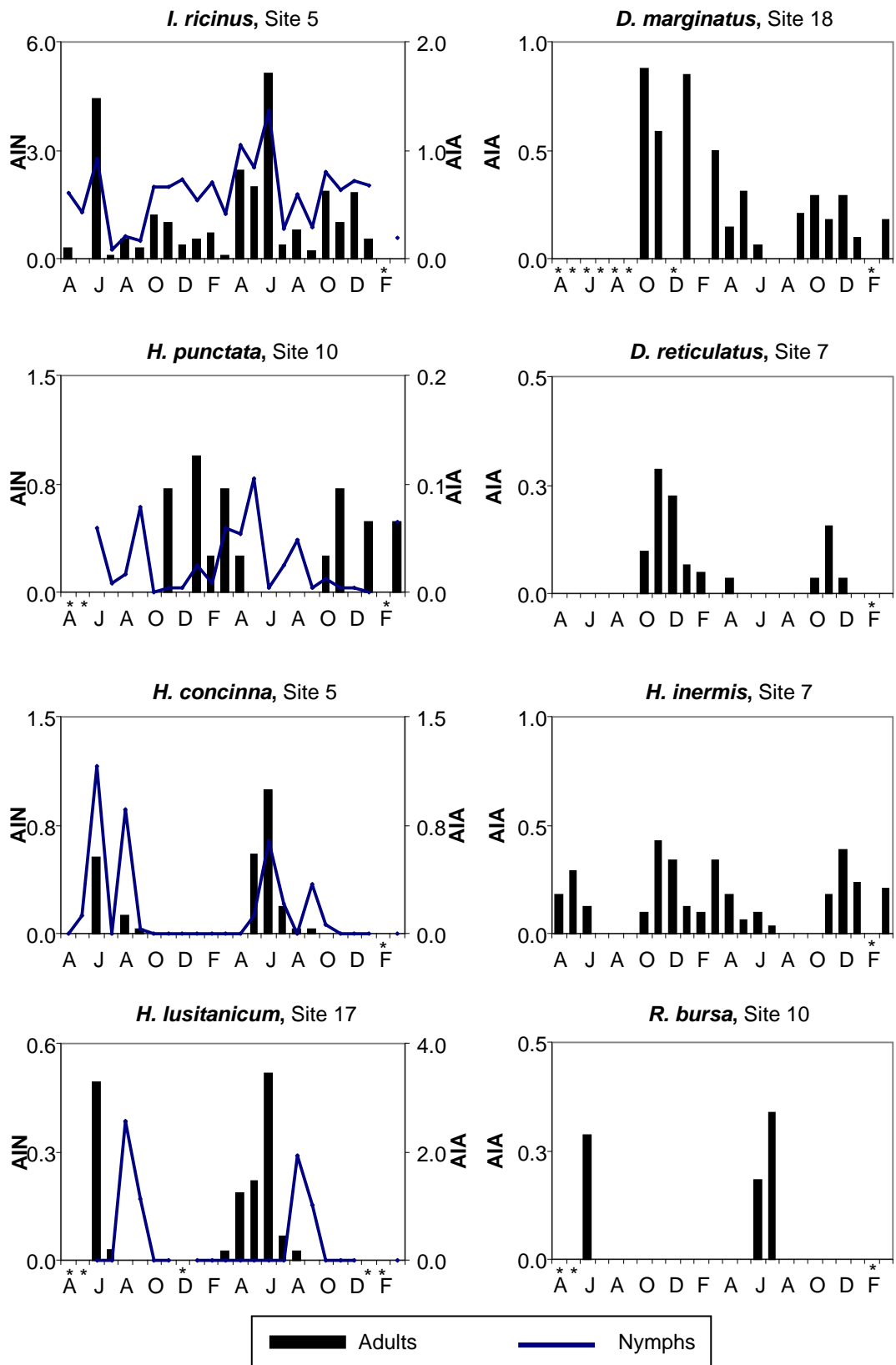


Fig. 2. Seasonal kinetics of the different tick species in the period March 2003 to April 2005. Sampling sites were selected on the basis of abundance of each tick species (Asterisks indicate months when sampling was not done).

Relationship between Tick Abundance and Livestock, Wildlife, Land-use, and Geographical and Climatic Parameters

TAI was significantly higher in NS compared to CS ($P < 0.05$), associated to an Atlantic climate and rainfall above 1000 mm ($P < 0.05$). Altitude of the sampling areas, which ranged from 310 to 1200 m, did not affect tick abundance.

In the overall analysis per sampling sites, there was a negative and significant correlation of the annual mean maximum temperatures and the abundance of several species, such as *I. ricinus* ($r = -0.75$, $P = 0.0005$), *H. punctata* ($r = -0.67$, $P = 0.0033$) and *D. reticulatus* ($r = -0.72$, $P = 0.0010$). Abundance of these tick species showed a significant positive correlation with mean annual rainfall level and with mean annual RH (*I. ricinus*: $r = 0.67$, $P = 0.0023$ and $r = 0.82$, $P < 0.0001$; *H. punctata* $r = 0.61$, $P = 0.0067$ and $r = 0.69$, $P = 0.0020$; *D. reticulatus* $r = 0.49$, $P = 0.0390$ and $r = 0.68$, $P = 0.0025$, respectively). The opposite occurred for *D. marginatus* and *H. lusitanicum*, whose abundance was positively correlated with annual mean maximum temperatures (*D. marginatus*: $r = 0.54$, $P = 0.0026$; *H. lusitanicum*: $r = 0.59$, $P = 0.0100$) and negatively correlated with annual rainfall and RH (*D. marginatus* $r = -0.58$, $P = 0.0108$ and $r = -0.58$, $P = 0.0141$; *H. lusitanicum* $r = -0.61$, $P = 0.0078$ and $r = -0.52$, $P = 0.0309$).

Ixodes and *Haemaphysalis* larvae and nymphs, and *Hyalomma* nymphs showed the same affinities as adult ticks regarding temperatures and humidity conditions. However, *Hyalomma* larvae did not show any significant relationship with weather. No correlation was found between the abundance of the other tick species gathered and the climatic parameters studied.

Multiple regression was used to construct linear models explaining as much of the variance as reasonable. For *Ixodes* larvae and nymphs, the best models included RH and explained around 65% and 67% of the variance, respectively. Mean temperatures explained 56% of the variance of *I. ricinus* adults. The inclusion of other parameters in the predictive models did not provide much improvement. For the remaining species, the predictive models were poor, explaining only a low percentage of the variance.

According with these results, the abundance of *I. ricinus* was significantly higher in areas with higher rainfall level, grazed by livestock (mainly horses and cattle), with pine, beech or oak forest, and with rich and varied undergrowth composed by ferns, gorse and/or heather. Also, the presence of wildlife species such as cervids, wild boar and carnivores was related to higher *I. ricinus* populations.

H. punctata abundance was not associated to any particular type of forest or any particular livestock species. However, in areas where wild carnivores and wild boar were present its abundance was significantly higher ($P < 0.05$). Shrubbery vegetation with bramble patches, heather and ferns was associated to higher populations of this tick species

($P < 0.05$). Other species such as *H. inermis* and *H. concinna* did not show any significant association.

D. reticulatus abundance was significantly higher in oak forest, where wild carnivores were present, and in areas with vegetation composed of heather, furze and fern ($P < 0.05$). *D. marginatus*, *R. pusillus* and *H. lusitanicum* appeared in sites from CS, thus its abundance was associated to the vegetation, forest and wildlife dominant in this part of Spain (Table 1).

Discussion

The current study offers a perspective on the variety of tick species present in the vegetation from Northern and Central Spain and shows well-defined differences between the two areas. The most frequent and abundant species in NS were *I. ricinus* and *H. punctata*, in association with mild temperatures and humid conditions. In CS, tick species more adapted to the drier conditions of the region, such as *H. lusitanicum* and *D. marginatus*, were predominant. The ratio between larvae, nymphs and adults varied from one region to another, with significantly higher TAIL in NS, TAIN decreasing from north to south and a higher TAIA in CS. This could be explained by the fact that *I. ricinus* and *H. punctata* were the most prevalent species in NS, species whose exophilic immature stages were perfectly sampled by the dragging technique (Hillyard 1996, Sonenshine 1993, Vassallo y cols. 2000). Conversely, the endophilic immature stages of the predominant tick species in CS, such as *H. lusitanicum*, *R. pusillus* and *D. marginatus*, are barely collected by this technique and require other more effective sampling methods.

Considering the limits of the dragging technique for collecting endophilic species, the presence of other species cannot be ruled out. Thus, it would be necessary to examine wild and domestic animals to check for the presence of other endophilic species and also immature stages of exophilic species with endophilic habits. In a recent study carried out in NS on tick species in wildlife (unpublished results) we found 4 additional tick species (*Ixodes hexagonus*, *Ixodes canisuga*, *Rhipicephalus sanguineus* and *R. pusillus*) to add to the list of species detected in the present study in vegetation in the same area.

In addition, for adult ticks that exhibit an active host-finding strategy, such as *Hyalomma* spp. (Sonenshine 1993), attractant devices are especially useful; nevertheless, a significant number of *H. lusitanicum* adult ticks were collected by dragging in several sampling sites in CS indicating an extremely high abundance in vegetation.

Most of the species found are potential vectors of tick-borne pathogens for humans and animals. It is well documented that *I. ricinus* is associated with humidity and forested areas in temperate Europe (Hornok y Farkas 2009, Lindstrom y Jaenson 2003, Uspensky 2002). Mild temperatures, high rainfall level and suitable vegetation were common characteristics of

most of the sampling sites in NS but not in CS, explaining the ubiquity and high abundance of *I. ricinus* in NS compared to the CS sites. According to this, several pathogens associated to this species would mostly confine to the Northern half of Spain. In fact Sheep Encephalitis viruses, tick-borne fever in ruminants (*Anaplasma phagocytophilum*), Lyme disease in humans, or rickettsiosis caused by *Rickettsia monacensis*, all of them transmitted by *Ixodes* ticks, have been mostly diagnosed in northern regions of Spain (Anda y cols. 1993, García-Pérez y cols. 2003, González y cols. 1987b, Jado y cols. 2007). Moreover, diseases transmitted by *Ixodes* ticks, such as Lyme disease and granulocytic anaplasmosis have shown a clear seasonality in human clinical cases (Dennis y Hayes 2002, Dumler y cols. 2007), in agreement with periods of increased activity of *I. ricinus* ticks. The second most abundant adult tick species in NS was *H. inermis*, a tick species collected frequently in the same biotopes than *I. ricinus* in several European countries (Hornok y Farkas 2009, Pérez-Eid y cols. 1993). Interestingly, *H. inermis* has been recently reported as a new potential vector of two human pathogenic rickettsia (Hornok y cols. 2010, Portillo y cols. 2008).

On the other hand, species such as *H. lusitanicum* and *D. marginatus* have termophilic requirements and are better adapted to Mesomediterranean vegetation and to continental climate with cold winters and hot and dry summers (Estrada-Pena y cols. 2004a), characteristic of CS, where these tick species predominated in this study. Thus, Mediterranean theileriosis, caused by *Theileria annulata* and transmitted by *Hyalomma* ticks (Habela y cols. 1999), appears to be endemic in cattle in southern, eastern and central Spain (Almeria y cols. 2001, Habela y cols. 1999, Viseras y cols. 1999) where it causes important economic losses in animal production of the indigenous and imported breeds. Again, Mediterranean theileriosis in ruminants has been reported to occur along with the periods of activity of the tick vectors. On the contrary, *Hyalomma* ticks are not so abundant in Northern areas (Cordero del Campillo y cols. 1994) and were absent in that part of the country in the present study. Concerning *Dermacentor* species, which are involved in the transmission of several species of *Rickettsia* to humans, they presented their highest activity in colder months. This is in agreement with the specific seasonal distribution of *Rickettsia slovaca* and *Rickettsia raoultii*, the etiologic agents of TIBOLA/DEBONEL, a disease recently diagnosed in patients from CS (unpublished results) which exhibits a higher incidence during March-May and September-November months (Parola y cols. 2009). Similarly, cases of babesiosis in dogs (Martinod y Gilot 1991) transmitted by *Dermacentor* species have been reported to coincide with the periods of activity of the tick vectors.

Another factor that could likely influence tick species distribution and density is the presence of livestock and wildlife species (Gray y cols. 1995, Ruiz-Fons y Gilbert 2010). Roe deer and red deer are considered the main host animal species for the adult developmental stage of *I. ricinus* in several countries (Gilot y cols. 1994, Gray y cols. 1992, Hudson y cols.

2001, Rosef y cols. 2009). According to this, the highest TAIs for this species were found in NS where roe deer was present in every sampling site. This association was also found with carnivores, even though *I. hexagonus* is the species most commonly found in wild carnivores in NS (unpublished results). Other associations found in CS are in accordance with previous reports (Apanaskevich y cols. 2008, Travassos Santos Dias 1994, Walker y cols. 2000), for example, the association of *R. pusillus* and *H. lusitanicum* with wild rabbits, which are common in CS.

In summary, this study highlights the big differences found in tick species diversity between two close regions of Spain, reinforcing the importance of implementing local questing tick surveillance schemes. Long-term tick population dynamics monitoring schemes could help us to study the effects of climate change on the local distribution and abundance of ticks. Also, updated local data would help to increase human and veterinary clinicians awareness towards tick-borne diseases and implement measures to reduce risk of infection for humans and animals.

Acknowledgements

This work was conducted with the financial support of Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS G03/057) and was also partially funded by EU grant GOCE-2003-010284 EDEN and is catalogued by EDEN Steering Committee as EDEN0203 (www.eden-fp6project.net). The content of this publication are the sole responsibility of the authors and does not necessarily reflect the views of the European Commission.

ARTÍCULO / ESTUDIO 2

Risk factors associated with ixodid tick species distributions in the Basque region in Spain

J. F. Barandika¹, E. Berriatua¹, M. Barral¹, R. A. Juste¹, P. Anda² and
A. L. García-Pérez¹

¹ Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER). Sanidad Animal, Bizkaia, Spain.

² Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain

Publicado en:

Medical and Veterinary Entomology

2006, Volume 20, pp. 177-188

Abstract

Ixodid tick abundance was investigated in the Basque region in Spain in two 1-year longitudinal studies, in 1992-93 and 2003-04. Forty zones were visited monthly and 162,672 ticks (87% larvae, 12% nymphs and 1% adults) were collected by blanket dragging. Eleven tick species belonging to the genera *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Rhipicephalus* and *Dermacentor* were identified including *Haemaphysalis concinna* Koch, which had not previously been reported in Spain. Tick species abundance differed between zones, studies and seasons. In 1992-93, *Haemaphysalis punctata* Canestrini & Fanzago, was the predominant species and distinct spring-summer and autumn-early winter peaks of activity were observed. In 2003-04, *Ixodes ricinus* (Linnaeus) was the most common species and was active throughout the winter. Larvae and nymph seasonal activity patterns coincided in both 1993 and 2003 and this could facilitate co-feeding transmission of pathogens. Higher tick abundance was associated with increased livestock abundance in 1992-93 and milder winter temperatures in 2003-04. Tick collection rates in areas with moderate and high tick density were positively associated with the interaction between ambient temperature at sampling and rainfall 7 days prior to sampling. Collection rates were also significantly higher at medium rather than higher altitude, in forested areas than in open grasslands and lower in recreational areas frequented by people and with wet vegetation at sampling.

Introduction

Ticks present an important world-wide human and animal health hazard as vectors of a wide range of pathogenic viruses, bacteria and protozoa. A number of such pathogens, including *Borrelia burgdorferi* responsible for Lyme disease, *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., *Francisella* spp., *Babesia* spp., *Theileria* spp. and Louping-ill-like viruses, have been diagnosed in the Basque Country, (Arteaga y cols. 1998, Barral y cols. 2002, García-Pérez y cols. 2003, González y cols. 1987b, González y cols. 1987a, Nagore y cols. 2004a, Nagore y cols. 2004b), a 7,200 km² region located in Atlantic Northern Spain with a population of 2,1 million people.

The risk of tick-borne infection is associated with the population dynamics of exogenous (non-nidicolous) tick species, which are commonly seasonal and may vary between years depending on the effects of biotic and abiotic factors, most importantly climate, vegetation type and host density (Sonenshine 1993). These ticks are most abundant in countryside areas with dense populations of small, medium and large-size mammals that allow all tick stages to feed and where vegetation provides adequate shelter and humidity for ticks to survive off the host. Ticks spend a comparatively very short time on the host, and in Europe and elsewhere, spring

and autumn are the time of the year with highest host-seeking (questing) activity, although there are substantial differences between regions in the abundance and timing of questing. Precise knowledge of tick questing periods and of the processes that control tick demography at a local level are essential for tick and tick-borne disease control.

A study of infestations by *Ixodes ricinus* (Linnaeus) in domestic ruminants at eight sites in the Basque region showed that most occurred in October-November or March-April (Moreno y Estrada-Peña 1997). However, such studies in this region are uncommon. Nevertheless, environmental conditions are good for tick survival; there is a maritime climate with cool summers and mild winters, annual rainfall of 600-1500 mm and abundant livestock raised at pasture, including 320 000 sheep, 60 000 beef-cattle and 14 000 equines, as well as wildlife, mainly rodents, foxes, badgers, wild boar, roe-deer and red-deer. Recent increases in the numbers of livestock in this area have led to concern over its effect on tick abundance and incidence of tick-borne disease. As a result, a large-scale surveillance scheme to investigate monthly tick species activity in vegetation and prevalence of tick-borne pathogens in ticks was initiated. Here, tick species distributions observed in the Basque region in 1992-1993 and 2003-2004 are compared and the relationship between tick abundance and climatic, botanical, geographical and livestock and wildlife variables are examined.

Materials and methods

Study design and selection of the study areas

Monthly recordings of tick abundance were conducted between March 1992 and April 1993 (study 1) and between April 2003 and May 2004 (study 2) respectively. In total, sampling was carried out in up to 87 sites in 40 separate zones, which included seven of the eight natural regions of the Basque Country, defined on the basis of terrain altitude, rainfall, temperature and dominant vegetation (Gobierno Vasco 1989) (Fig. 1, Tables 1 and 2). Seven zones in two of the regions were sampled in both studies, allowing comparison between time periods. Sites were selected to account for the geographical, climatic, botanical and land-use variability of the natural regions, including lowland fenced pastures, mountain communal-grazing land, conifer and deciduous forests and human recreational areas (footpaths and picnic grounds) (Table 2).

The altitude, orientation, predominant vegetation and degree of human use of the sampling area were recorded on the first visit in each study. In addition, data on a number of other variables were gathered at each sampling occasion, including ambient temperature, presence of sunshine, overcast and presence of rain and degree of ground wetness; either dry, damp or wet. Furthermore, at the end of each study retrospective data were collected

that included records of daily rainfall at 25 meteorological stations scattered in the region and the 1989 and 1999 livestock census in the areas where sampling was undertaken.

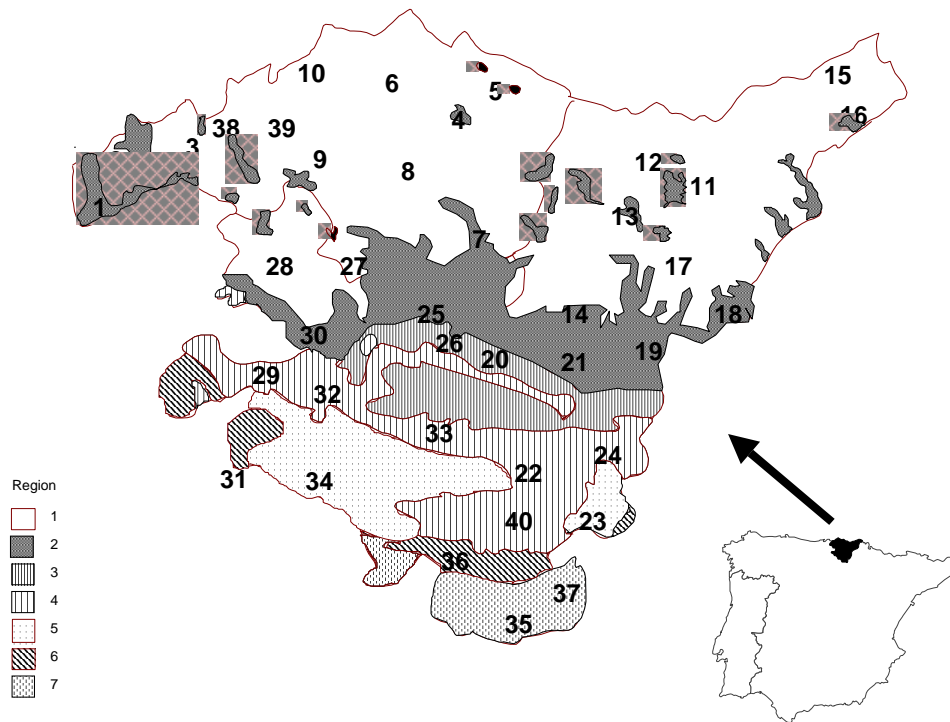


Figure 1. Natural regions and location of the 40 sampling zones in two ixodid tick studies between March 1992 and April 1993 and between April 2003 and May 2004 in the Basque Region in Spain.

Table 1. Natural regions in the Basque Country and study distribution of sampling zones.

Natural region	Annual rainfall (mm)	Dominant climate	Winter and Summer climate	Altitude (m)	Number of sampling zones	
					1992-1993	2003-2004
1	1000-2000	Atlantic	W: cold S: mild	20-600	12	3
2	1200-2600	Atlantic	W: very cold S: mild-cold	600-1551	12	6
3	600-1000	Transition	W: very cold S: hot	500-700	2	0
4	800-1400	Transition	W: very cold S: mild	700-1184	5	1
5	600-800	Transition	W: cold S: hot	450-700	2	0
6	700-1100	Transition	W: very cold S: hot	700-1436	2	0
7	500-700	Mediterranean	W: cold S: very hot	378-650	2	0
8*	1000-1600	Atlantic	W: mild S: mild	0-50	0	0

W, winter; S, summer. * Region 8: Coastal fringe

Table 2. Location, land use, biotic features and mean tick abundance indices (TAIs) of zones sampled in two studies in 1992-1993 (study 1) and 2003-2004 (study 2) in 40 zones including seven zones monitored in both studies.

Zones	Natural region	Altitude	Land use	Tree presence	Predominant undergrowth	Livestock		Mean TAI	
						Density	Main species (other)	Study 1	Study 2
1	2	640	Pasture	None	Gorse, bracken	High	Cattle, (Horse)	30	NS
2	1	525	Pasture	None	Gorse, bracken Heather	Low	Horse	<1	NS
3	1	555	Pasture	None	Heather	low	Sheep, (Cattle, horse)	9	NS
4	2	760	Forest	Pine	Heather, Bracken, gorse	High	Sheep, Cattle, Horse	6	34
5	1	575	Pasture	Pine	Heather	Low	Sheep, (Horse)	3	NS
6	2	570	Pasture	None	Gorse	Low	Sheep, Cattle	0	NS
7	2	758	Forest	Pine	Meadow	low	Sheep	2	2
8	1	500	Forest	Pine	Bracken	Low	Sheep, (Cattle)	25	NS
9	1	210	Forest	Pine	Bracken	Low	Sheep	1	NS
10	1	200	Pasture	None	Bracken	Low	Sheep, Cattle	7	NS
11	1	490	Pasture	None	Heather, Meadow	Low	Horse, Cattle	<1	NS
12	1	225	Pasture	None	Gorse	Medium	Sheep	7	NS
13	2	625	Forest	Pine	Bracken, Heather	Low	Sheep, (Horse)	3	NS
14	2	950	Forest	Pine	Heather	Medium	Sheep, (Cattle, horse)	3	NS
15	1	275	Pasture	Pine	Heather	Medium	Sheep, Cattle, Horse	10	6
16	2	500	Forest	Pine	Heather	Low	Sheep, Horse, Cattle	1	3
17	1	300	Forest	Pine	Heather	None	--	<1	NS
18	2	950	Pasture	None	Meadow, Bracken	High	Sheep, Horse, Cattle	<1	<1
19	2	1200	Forest	Beech	Heather, Bracken	High	Sheep	1	NS
20	3	575	Forest	Pine	Gorse, Meadow	High	Sheep, (Horse)	38	NS
21	2	925	Pasture	None	Heather	High	Sheep, (Horse)	<1	NS

Table 2. Continued.

Zones	Natural region	Altitude	Land use	Tree presence	Predominant undergrowth	Livestock		Mean TAI	
						Density	Main species (other)	Study 1	Study 2
22	4	860	Pasture	Beech	Heather	Medium	Horse, Sheep, Cattle	31	NS
23	5	700	Forest	Oak	Heather	Medium	Cattle	6	NS
24	4	990	Pasture	None	Heather	Low	Horse	9	NS
25	2	900	Forest	Pine	Heather, Bracken	High	Sheep, Horse	9	NS
26	3	580	Pasture	Oak	Heather	Low	Sheep, Horse	<1	NS
27	1	600	Pasture	Oak, Beech, Pine	Heather, Gorse	Low	Sheep, (Cattle, horse)	27	45
28	1	450	Forest	Pine, Oak	Heather	Low	Sheep (Goat)	216	NS
29	4	1025	Forest	Beech	Heather	High	Sheep, Cattle, Horse	2	NS
30	2	700	Pasture	Pine, Beech	Heather, Bracken	High	Sheep, Cattle, Horse	39	39
31	6	830	Forest	Pine	Heather	High	Cattle, (Horse)	137	NS
32	4	1050	Pasture	Beech	Heather	Low	Cattle, Horse	7	NS
33	4	900	Pasture	None	Heather	Medium	Cattle, Horse	42	NS
34	5	650	Pasture	None	Heather	Low	Sheep	5	NS
35	7	580	Pasture	None	Aromatic	Low	Sheep, Cattle	<1	NS
36	6	900	Pasture	Oak	Heather	Medium	Horse, (Cattle)	<1	NS
37	7	600	Forest	Pine	Aromatic	Low	Sheep	<1	NS
38	1	468	Forest	Pine	Bracken, Gorse	High	Horse, Cattle, Sheep	NS	49
39	1	510	Forest	Pine	Meadow, Bracken	Medium	Horse Cattle, (Sheep)	NS	22
40	4	670	Forest	Oak	Meadow, bracken	Medium	Cattle (Horse)	NS	174

Tick collection and identification

Ticks were collected from the vegetation by the blanket-dragging method as described by Sonenshine (1993), using a 2 x 1.6 m blanket that was dragged for 5 min in study 1 and 20-30 min in study 2, stopping every 2-5 minutes to collect all adult ticks attached to the blanket. The ground covered in 5 min ranged between 100-150 m depending on the terrain slope and scrub density.

Ticks were identified in the laboratory using taxonomic keys, to species level for all adults and for 36% of the *Ixodes* spp. nymphs and 90% of the *Haemaphysalis* spp. nymphs in study 2, and to genus level for all larvae and other nymphs (Gil-Collado y cols. 1979, Manilla 1998).

Statistical analysis

To allow comparison of tick counts from samplings with different time intervals, a “tick abundance index” (TAI) was calculated by dividing the number of ticks collected by the dragging time in minutes (ticks per minute sampling). EpiInfo 6.0 (CDC, Atlanta, GA, U.S.A.) software was used to compare means and proportions using Kruskal-Wallis non-parametric analysis of variance and Yates corrected chi-squared test, respectively, and to estimate linear correlation coefficients.

Random effects Poisson regression analysis was used to examine the relationship between tick counts and potential predictor variables in areas with moderate and high tick abundance, to account for correlation between tick counts from the same place (using the GLIMMIX macro in SAS v. 8.2, SAS Institute). In Poisson models the dependent variable was the natural-log (ln) transformed TAI+1 and categorised fixed predictor variables related to the sampling area. These included: orientation, altitude (dichotomized at the median: 450-650, 660-900), weather type, ground wetness, ground scrub-cover, human presence, presence of forest, livestock census (dichotomized at the median: 10334-17365, 19869-32340), study (1 and 2) and a variable representing the interaction between the ambient temperature at sampling (four levels: 1-14, 15-19, 20-24, 25-36) and cumulative rainfall (mm) in the 7 days prior to sampling (2 levels only: 0-48 mm and 53-1927 mm, to avoid having categories with few observations and considering that cumulative rainfall distribution values for the 10%, 25%, 50%, 75% and 90% percentiles were 0 mm, 5 mm, 25 mm, 130 mm, 356 mm, 560 mm, respectively).

A backward-elimination strategy was used to identify the model containing the maximum number of variables significantly associated ($P < 0.05$, for a two-tailed test) with the outcome. Variable significance and “goodness of fit” of the model was assessed using the deviance statistic [(Kleinbaum y cols. 1998); SAS Institute: Analysis of Count Data]. The

exponential of regression coefficients were used to obtain rate ratios which represent the proportional increase in the rate for a unit change in the predictor (Dohoo y cols. 2003) and the rate was defined as $\ln(\text{ticks})/\text{area} \times \text{time}$.

Results

Total number and prevalence of tick species

In study 1, a total of 49 172 ticks were collected, of which 86% were larvae, 13% nymphs and 1% adults (Table 3). In study 2, a total of 113 543 ticks were collected, of which 88% were larvae, 11% nymphs and 1% adults (Table 3). In most cases tick abundance was very similar in different areas within the same zone, but varied significantly between zones. In the 37 zones sampled in study 1, no ticks were ever found in one zone and mean TAI were 0-10 ticks/min_{sampling} in 27 zones, 20-50 ticks/min_s in seven zones and was >100 ticks/min_s and >200 ticks/min_s in the remaining two zones (Table 2). Similarly, mean TAI in study 2 were 0-10 ticks/min_s in four zones, 20-50 ticks/min_s in five zones and >100 ticks/min_s in the remaining zone (Table 2). Mean TAI in the seven zones sampled in both studies was significantly greater in study 2 compared to study 1 ($P < 0.05$).

Eleven species of the genera *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Dermacentor* and *Rhipicephalus* were found and all immature ticks belonged to the genera *Ixodes* and *Haemaphysalis*. The most frequent adult species were *I. ricinus* and *H. punctata* Canestrini & Fanzago (Table 3). Adults of *H. hispanica* Gil Collado, *H. sulcata* Canestrini & Fanzago, *R. pusillus* Gil Collado and *R. sanguineus* Latreille were found only rarely in study 1, whilst adults of *H. concinna* Koch was only seen in study 2, and this is the first report of this species in Spain.

The relative frequency of genera and species present differed between studies and this was particularly evident for adult ticks. Overall, adult *I. ricinus* accounted for 26% of ticks in study 1 and 70% in study 2. Adult *H. punctata* represented 58% of ticks in study 1 and 10% in study 2 ($P < 0.05$; Table 3). However, these differences were less clear in the seven zones that were sampled in both studies (Table 3). In study 2, *Ixodes* nymphs included 99.8% *I. ricinus* and 0.2% *I. frontalis* Lucas and *Haemaphysalis* nymphs included 88.5% *H. punctata*, 11.4% *H. concinna* and 0.1% *H. inermis* Birula.

Of the 40 zones examined for ticks, including the 7 zones sampled both years, adults of *H. punctata* were present in 36 zones and adults of *I. ricinus* were found in 25 zones. Adults of both species coincided in 20 (43%) zones, neither were found in six (13%) zones, adults of *H. punctata* were found alone in 16 (34%) zones and adults of *I. ricinus* were seen alone in five (11%) zones. In contrast, larvae of *Ixodes* spp. and *Haemaphysalis* spp. coincided in 30 (79%) zones, seven (15%) zones had neither of them, seven (15%) zones had *Ixodes* only

and three (6%) zones had only *Haemaphysalis* spp., indicating larvae of these genera were more commonly found together than expected by chance.

Table 3. Frequency of tick species and stages in the Basque region in Spain recorded in two studies in 1992-1993 (study 1) and 2003-2004 (study 2) in 40 zones including seven zones monitored in both studies.

Tick stages	Species	All zones (n=40)		Zones in both studies (n=7)	
		Study 1	Study 2	Study 1	Study 2
		% (number)	% (number)	% (number)	% (number)
Adults	<i>Ixodes ricinus</i>	26 (144)	68 (760)	38 (25)	64 (426)
	<i>Haemaphysalis punctata</i>	58 (323)	10 (103)	35 (23)	14 (94)
	<i>H. inermis</i>	7 (39)	13 (135)	11 (7)	6 (40)
	<i>H. hispanica</i>	1 (5)	0 (0)	6 (4)	0 (0)
	<i>H. sulcata</i>	<1 (1)	0 (0)	2 (1)	0 (0)
	<i>H. concinna</i>	0 (0)	3 (30)	0 (0)	5 (30)
	<i>Rhipicephalus bursa</i>	4 (21)	2 (21)	9 (6)	2 (14)
	<i>R. sanguineus</i>	<1 (3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>R. pusillus</i>	<1 (1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	<i>Dermacentor reticulatus</i>	3 (18)	7 (75)	0 (0)	9 (59)
	<i>D. marginatus</i>	1 (5)	<1 (1)	0 (0)	<1 (1)
Total	100 (560)	100 (1124)	100 (66)	100 (664)	
Larvae	<i>Ixodes</i> sp.	63 (26310)	96 (96700)	30 (1758)	91 (32719)
	<i>Haemaphysalis</i> sp.	37 (15785)	4 (3666)	70 (4197)	9 (3201)
	Total	100 (42095)	100 (100366)	100 (5955)	100 (35920)
Nymphs	<i>Ixodes</i> sp.	68 (4426)	93 (11163)	78 (825)	85 (4575)
	<i>Haemaphysalis</i> sp.	32 (2091)	7 (890)	22 (237)	15 (817)
	Total	100 (6517)	100 (12053)	100 (1062)	100 (5392)
All		100 (49172)	100 (113543)	100 (7083)	100 (41976)

Seasonal frequency of ticks

Ticks were detected every month and there was evidence of seasonality in all stages (Fig. 2). Larval abundance was highest between May and September and appeared to follow a bimodal pattern, with an initial peak in May and a later one in July and August. The patterns of nymphal activity appeared to be similar to that of adults, with peak abundance between March and May, decreasing thereafter. The abundance of both stages increased again slightly in October-November (adults) and November-December (nymphs) (Fig. 2).

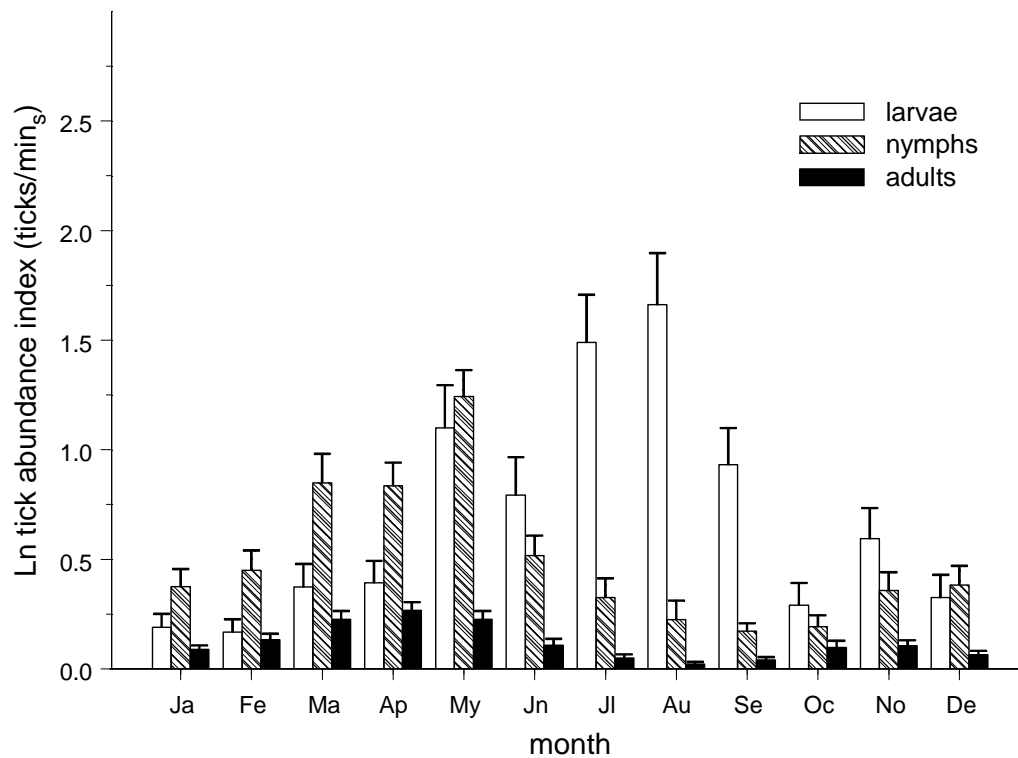


Figure 2. Monthly mean of natural-log transformed tick abundance indices (no. ticks/min_s) in vegetation in 40 sites in the Basque Region in Spain sampled by blanket dragging between March 1992 and April 1993 and between April 2003 and May 2004 (n=879).

However, there were important differences between the studies in the monthly pattern of tick abundance. In the first study, larvae peaked sharply in August 1992, decreased to almost zero in October and two smaller peaks were observed later in December and March 1993 (Fig. 3). By contrast, in the second study larval abundance reached an even higher peak in June and July 2003, decreased considerably over the following 2 months, peaked again in November 2003 and to a much lesser extent in February 2004 and increased significantly in May 2004 (Fig. 3). The pattern of nymph and adult tick abundance appeared to be in synchrony most of the time in both studies and coincided also with the larval activity pattern during 1993 and 2003. In 1992, nymphs and adults were most abundant between March and May, dropped to very low levels between July and November and peaked again in December and later in March 1993. By contrast, the number of adults and especially nymphs remained high throughout winter and spring 2004 (Fig. 3). Correlation coefficients for natural-log transformed adult and nymphal and nymphal and larval TAIs in the seven sites sampled in both studies were $r_{a-n}=0.66$ and $r_{n-l}=0.41$, respectively ($P < 0.05$).

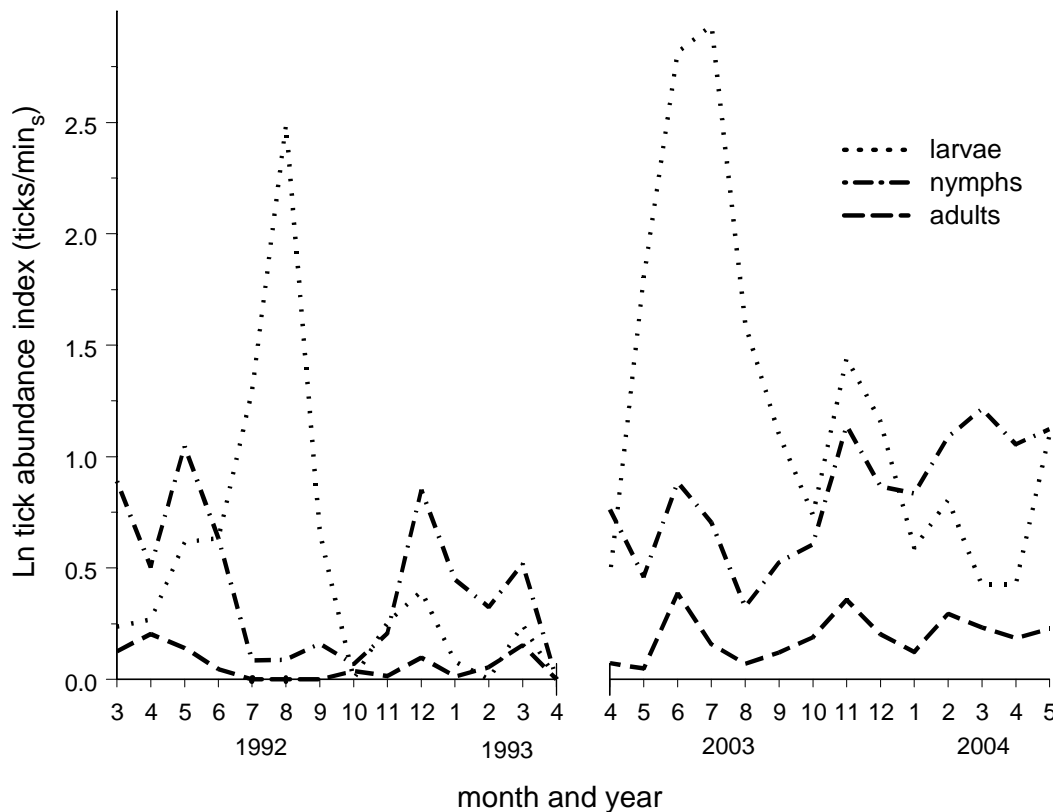


Figure 3. Month- and year-specific mean of natural-log transformed tick abundance indices (no. ticks/min_{sampling}) in vegetation in seven sites in the Basque Region in Spain sampled by blanket dragging between March 1992 and April 1993 and between April 2003 and May 2004 (n=252).

The seasonal patterns of abundance of tick stages also differed within and between genera; synchronicity between larval and nymphal abundance was more common for *Ixodes* spp. than for *Haemaphysalis* spp. (Fig. 4). Moreover, with respect to adult ticks, *H. punctata* were more abundant than *I. ricinus* in the winter months of 1992 and 1993 (Fig. 5). Instead, although both species were found in winter 2003-04, the latter were relatively more abundant than the former (Fig. 5). Neither of these two species were collected in July and August 1992. Similarly, *H. punctata* was not found in July and August 2003, and *I. ricinus* was present all year round in the second study (Fig. 5). Concerning other adult species, *H. sulcata*, *D. marginatus* and *H. hispanica* (not shown in Fig. 5) were found only scarcely in March 1992, February 2004 and April and May 1992, respectively; *R. bursa* was found both years in late spring and early summer only; *D. reticulatus* and *H. inermis* collected in the second and both studies, respectively, were found all year round except in summer; and, finally, *H. concinna* was seen in summer 2003 and spring 2004 (Fig. 5).

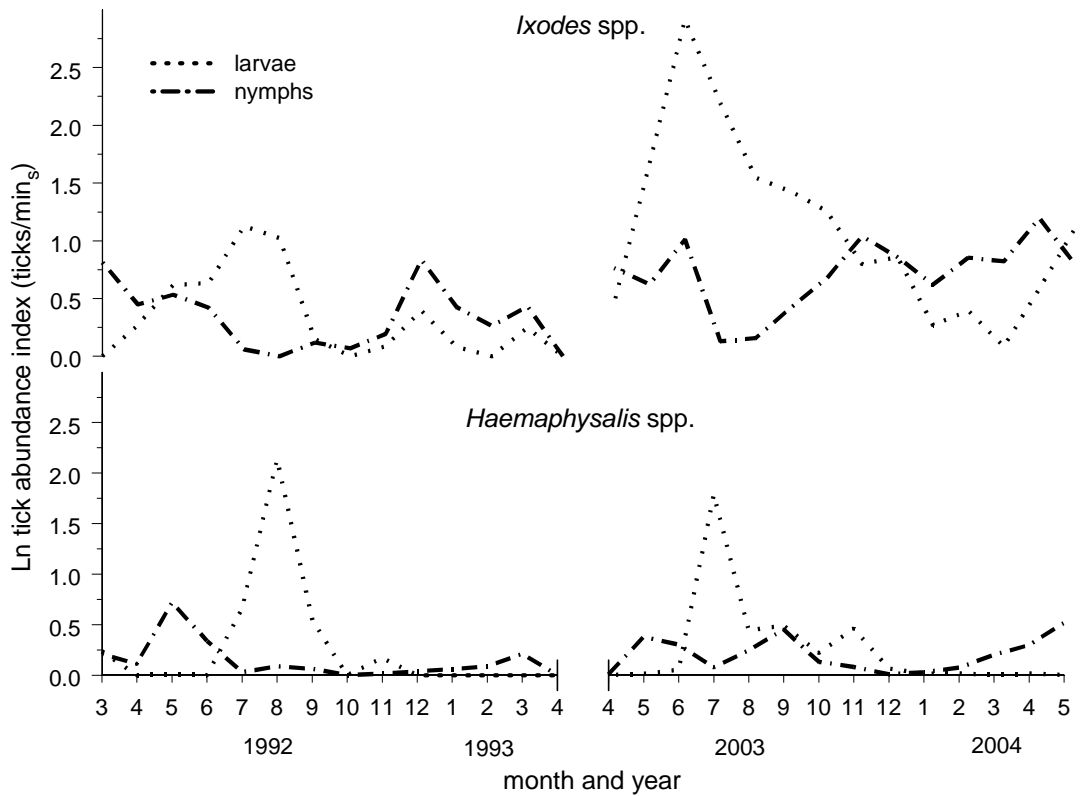


Figure 4. Month- and year-specific mean of natural-log transformed *Ixodes* spp. and *Haemaphysalis* spp. larvae and nymph abundance indices (no. ticks/min_{sampling}) in vegetation in seven sites in the Basque Region in Spain sampled by blanket-dragging between March 1992 and April 1993 and between April 2003 and May 2004 (n=252).

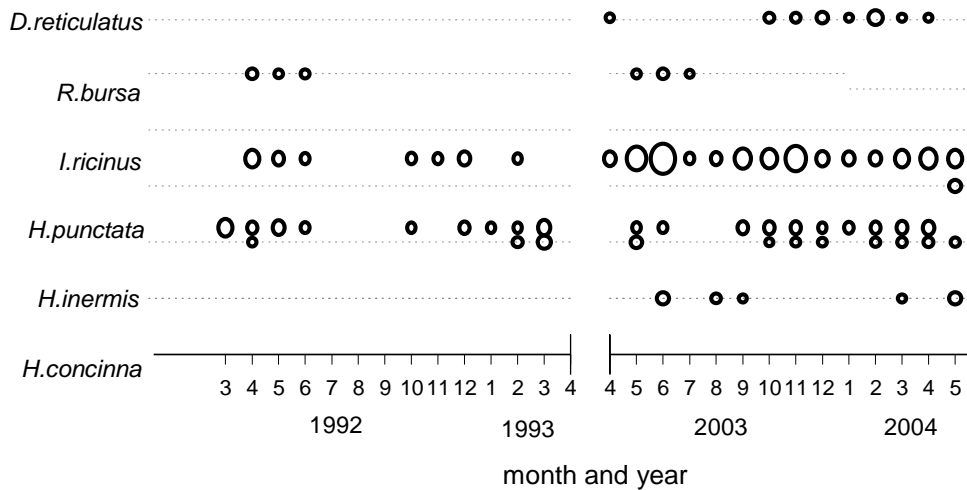


Figure 5. Month- and year-specific relative frequency of the main adult tick species identified in vegetation in seven sites in the Basque Region in Spain sampled by blanket dragging between March 1992 and April 1993 and between April 2003 and May 2004 (bubble size is proportional to tick abundance).

Geographical, climatic, livestock census, land-use and other differences between studies and low and medium-high tick abundance areas

Compared to study 1, proportionally more samplings in study 2 were carried out in sunny, warm days preceded by less rain in the seven days prior to sampling and there were more sampling areas with dry ground, higher livestock density, less scrub-cover, more forest and deciduous trees, as well as with higher human presence ($P < 0.05$; Table 4). The distribution of samplings according to explanatory variables in low and medium-high tick-density areas differed less than between studies. However, compared to low tick-density areas, more samplings in medium-high tick density areas took place in sunny, warm days and there were more sampling areas with highest livestock-density, trees and a mixture of deciduous and conifers, less highest degree of scrub-cover and highest human presence ($P < 0.05$).

Table 4. Relative percentage (number) of samplings according to independent variables in zones sampled in study 1 and study 2 and in zones with low (0-10 ticks/min_s) and medium (20-50 ticks/min_s) or high (>100 ticks/min_s) mean tick abundance index in both studies.

Variable	Categories	Study 1	Study 2	Tick density area	
				Low	Medium or high
Natural region	1	24 (39)	14 (12)	36 (235)	33 (74)
	2	76 (125)	86 (76)	40 (264)	34 (76)
	3	-	-	2 (12)*	11 (24)
	4	-	-	6 (38)*	18 (41)
	5	-	-	5 (33)*	0 (0)
	6	-	-	4 (23)	5 (11)
	7	-	-	7 (48)*	0 (0)
	8	-	-	-	-
Altitude (m)	200-500	29 (48)	33 (29)	34 (219)*	19 (43)
	501-800	46 (75)	48 (42)	43 (283)*	59 (133)
	801-1200	25 (41)	19 (17)	23 (151)	22 (50)
Orientation	North	42 (69)	52 (46)	37 (241)	34 (72)
	Other	58 (95)	48 (42)	63 (412)	66 (142)
Livestock census ¹					
Ovine	1400-8500	44 (72)*	34 (30)	48 (316)*	3 (6)
	9000-13500	27 (45)*	18 (16)	26 (171)*	37 (84)
	15500-34000	29 (47)*	48 (42)	25 (166)*	60 (136)
Bovine	200-1200	37 (60)*	27 (24)	41 (268)*	17 (38)
	1240-1750	56 (92)*	0 (0)	31 (205)*	17 (39)
	2050-6150	7 (12)*	73 (64)	28 (180)*	66 (149)
Equine	16-450	44 (72)*	27 (24)	49 (320)*	0 (0)
	460-660	44 (72)*	21 (18)	28 (180)*	53 (119)
	665-1350	12 (20)*	52 (46)	23 (153)*	47 (107)
Human presence ¹	Medium	15 (24)*	35 (31)	11 (73)*	28 (63)
	High	0 (0)*	9 (8)	0 (0)*	4 (8)
	Null-Low	85 (140)*	56 (49)	89 (580)*	69 (155)

Table 4. Continued.

Variable	Categories	Study 1	Study 2	Tick density area	
				Low	Medium or high
Forested area ¹	Yes	36 (59)*	59 (52)	32 (210)*	43 (98)
	No	64 (105)	41 (36)	68 (443)	57 (128)
Predominant tree type ¹	Conifer	100 (59)*	78(50)	71 (153)*	59 (61)
	Deciduous	0 (0)*	10 (6)	26 (55)*	14 (14)
	Mixture	0 (0)*	12 (8)	4 (8)*	28 (29)
Ground scrub cover ¹	25-42 %	6 (10)*	43 (38)	7 (47)	14 (32)
	50-86 %	43 (70)	57 (50)	36 (234)*	48 (109)
	90-100 %	51 (84)*	0 (0)	57 (372)*	38 (85)
Sampling hour ²	9-11	15 (24)	16 (14)	21 (138)	22 (50)
	11-13	36 (59)	42 (37)	42 (272)	42 (95)
	13-15	36 (59)	30 (26)	21 (139)	24 (54)
	15-17	12 (19)	13 (11)	13 (86)	12 (26)
	17-19	2 (3)	0 (0)	3 (18)	<1 (1)
Type day ²	Presence of sunshine	32 (52)*	71 (62)	33 (214)*	46 (104)
	Overcast	51(83)*	28 (24)	52 (335)*	37 (84)
	Presence of rain	17 (28)*	1 (1)	16 (102)	16 (37)
Soil state ²	Dry	37 (60)*	80 (70)	49 (321)	53 (119)
	Damp	55 (90)*	21 (18)	45 (260)	40 (90)
	Wet	8 (13)*	0 (0.0)	6 (39)	7 (17)
Ambient temperature °C ²	-1-9	39 (56)*	2 (2)	27 (161)	23 (49)
	10-15	40 (57)*	31 (27)	40 (238)	34 (73)
	16-20	13 (18)*	28 (25)	21 (125)	22 (48)
	21-36	8 (12)*	37 (34)	12 (69)*	21 (45)
Rainfall ³ (mm)	0-9	21 (32)	14 (12)	21 (126)	18 (37)
	10-98	17 (26)*	31 (27)	23 (133)	27 (55)
	101-495	38 (58)	49 (43)	41 (243)	41 (84)
	527-2294	23 (35)*	7 (6)	15 (86)	15 (30)

* Proportion significantly different to proportion in next cell to the right ($P < 0.05$).

δ Livestock census in local district. Data for study 1 and 2 correspond to 1989 and 1999 census, respectively (source: <http://www.eustat.es>).

1 Study-level measure.

2 Sampling occasion measure.

3 Seven days prior to sampling.

Multivariable relationship between tick counts and geographic, climatic, livestock census and other explanatory variables in areas with moderate-high tick density

Tick abundance was associated with the interaction between rainfall 7 days prior to sampling and ambient temperature at the time of sampling, ground wetness, altitude, presence of forest and degree of human use of the zone and was not associated to livestock census, type of day, scrub-cover and study (Table 5).

Predicted tick collection rates were higher for greater ambient temperatures and rainfall prior to sampling and for dry-ground, low-altitude, forested areas with low human presence compared to wet-ground, medium-high altitude areas with no trees and more frequented by

people. Furthermore, there was significant correlation between tick counts in the same area (Table 5).

Table 5. Estimates from a random-effects Poisson-regression model investigating factors associated with tick abundance in areas with moderate-high tick abundance in the Basque region in Spain (n=200). * Rainfall 7 days prior to sampling and ambient temperature at sampling.

Variable	Rate ratios	95%CI	P-value
Fixed effects			
Rainfall (mm); temperature (°C)*			
0-48; 0.5-14	1.00	-	-
0-48; 15-19	1.66	1.11, 2.49	0.01
0-48; 20-24	2.15	1.44, 3.20	0.014
0-48; 25-36	2.11	1.48, 3.02	0.0002
53-1927; 0.5-14	1.22	0.90, 1.66	0.2
53-1927; 15-19	1.59	1.16, 2.19	0.005
53-1927; 20-24	2.18	1.50, 3.16	<0.0001
53-1927; 25-36	2.96	1.98, 4.42	<0.0001
Ground moisture state			
Dry	1	-	-
Damp	0.89	0.74, 1.07	0.2
Wet	0.38	0.20, 0.65	0.0009
Altitude (m)			
660-900	1	-	-
450-650	1.53	1.11, 2.12	0.004
Forest			
Absent	1	-	-
Present	1.43	1.13, 1.81	0.004
Human presence			
Null and Low	1	-	-
Moderate and high	0.58	0.42, 0.79	0.0007
Random effects: variance estimate and standard errors			
Sampling area	0.06	0.03	0.039
Residual	0.71	0.08	<0.0001

Discussion

Local and large-scale tick and tick borne disease control relies on tick monitoring and surveillance and the present study describes the time and space distribution of tick species throughout the Basque region in Northern Spain and its relationship with climatic, environmental

and host variables. *Ixodes ricinus* and *H. punctata* were the most common adult tick species present overall, representing 83% and 77% of adult ticks in the first and second study, respectively. Other adult tick species including *H. inermis*, *R. bursa* and *D. reticulatus* accounting for 2-10% of adult ticks in both studies, and *H. concinna*, which contributed to 3% of adult ticks in the second study and this is the first report of this species in Spain. The presence of the latter species only in the second study may indicate that it is a newly introduced tick species or, alternatively, that the species is historically present in low numbers and being comparatively thermophilic (Hubalek y cols. 2003), its detection was favoured by the higher temperatures at sampling in 2003-2004 than in 1992-1993. However, the relative abundance of the species might have been biased to some extent by the sampling method used since some species might attach to a drag-blanket better than others.

The high prevalence of *I. ricinus* is compatible with the wet and mild or cold climate typical of the Basque region and other North and Central European regions. Similarly, *H. punctata* is distributed throughout Atlantic and Central Europe (Estrada-Pena y cols. 2004c) and Mediterranean countries (Estrada-Pena y cols. 2004a). There is less information concerning the distribution and abundance of *H. inermis* and *D. reticulatus*. In studies in the Iberian Peninsula *H. inermis* has only been reported from Northern Spain (Cordero del Campillo y cols. 1994). Similarly, *D. reticulatus* has been reported in Northern Spain and throughout France (Estrada-Pena y cols. 2004a). By contrast, *R. bursa* is common in drier regions and is well distributed throughout the Mediterranean region (Estrada-Pena y cols. 2004a) and was the predominant species together with *R. turanicus*, *D. marginatus* and *H. punctata* in sheep in Aragón, North-East Spain, where the climate is drier and temperatures more extreme than in the Basque region. These reports suggest *H. punctata* is widely distributed in Europe; in the present study adults of *H. punctata* were found in more places than those of *I. ricinus*. The latter might partly explain why *H. punctata* was more abundant than *I. ricinus* in study 1, in which a greater number of sites were sampled than in study 2. Other unknown reasons may account for this finding, including, varying host preferences and more generally, differences between species in the survivability and reproductive efficiency under particular biotic and abiotic conditions or less likely, that recovery rates of *I. ricinus* and *H. punctata* adults by blanket dragging differ according to sampling time which was shorter in the first compared to the second study.

In the present study, in most analyses of seasonal patterns of abundance, individual tick species were not distinguished. Investigating the monthly abundance of Ixodid ticks in general is important for tick and tick-borne disease control and this approach maximized the use of the tick data collected. Tick abundance varied within and between years and was greatest in summer months and in 2003-2004 compared to 1992-1993. Seasonality is regulated by behavioural and morphogenetic diapause (Gray 1991); temperature, humidity

and photoperiod are considered the major driving forces and short term climate variation may cause important changes in tick abundance (Kovats y cols. 2001). Extreme weather in Central and Northern Europe results in most ticks feeding once each year, completing their life cycle in three years and typically gives two activity peaks in spring-early summer and to a lesser extent in the autumn (Gray 1991, Randolph y cols. 2002). Where climate is milder, ticks may not require long diapause periods and may complete their life cycle in less time.

Seasonality in the first study (1992-1993) was, to some extent, comparable to that of *I. ricinus* in wet and relatively mild Ireland (Gray 1982) and Southern England and Wales (Randolph y cols. 2002), with a marked spring-summer peak and a new smaller peak in autumn-early winter. Such peaks were also observed in the second study (2003-2004) but ticks were overall more abundant and active throughout the winter than in 1992-1993 probably indicating that diapause was not present or short-lasting.

It is not possible to ascertain if the greater abundance of ticks in 2003-2004 compared to 1992-1993 is the result of a gradual increase in tick density over the decade between studies or represents an isolated fluctuation in the demographics of the local tick population. A significant gradual increase in *I. ricinus* activity between 1994 and 2002 was recently reported in the neighbouring southern region of La Rioja, although no consistent and constant similar change in climate variables was established (Estrada-Pena y cols. 2004b). Similarly, there were no major climatic differences between 1992-1993 and 2003-2004 in the Basque region, although there are some indications that winter in the region was milder in 2003-2004 than in 1992-1993 (<http://www.eustat.es>).

Activity patterns appeared to be similar for adults and nymphs most of the time and for nymphs and larvae during most of 2003 and 1993. Synchronicity in larvae and nymph activity allows ticks to co-feed in the same host and may facilitate disease transmission between individuals. In the localised tick-borne encephalitis endemic foci in Central and North-East Europe, synchronization is related to climate-induced autumnal diapause and spring re-emergence of larvae and nymphs simultaneously (Randolph y cols. 1999, Randolph y cols. 2000). Possibly several years of synchrony between immature stages may be necessary for the tick-borne encephalitis virus to achieve endemic stability, and the climate in the Basque region is very different from that in tick-borne encephalitis foci. Other factors such as tick density and ratios of infected nymphs and infectible larvae feeding on rodents influence tick-borne encephalitis virus transmission (Randolph y Storey 1999). Host tick-infestation studies in this region have showed that rodents often have large larvae burdens, but fewer than expected nymphs (Gil y cols. 2005) which are more common in other hosts. In spite of the lack of evidence of tick-borne encephalitis virus in the Basque region (Juste y cols. 1997a) a tick-borne encephalitis virus-related virus affecting sheep, similar to the Louping-ill virus of

Scotland, was detected in sheep following their first introduction to mountain pastures (González y cols. 1987b, González y cols. 1987a). It would be useful to investigate whether Louping-ill endemicity in some areas of the Basque region is related to larval and nymphal dynamics.

Daily rainfall records from nearby national meteorological centres and ambient temperature may be useful to give broad descriptions of the macroclimate of a particular area, but correlate poorly with temperatures and humidity in the off-host tick micro- and meso-environments that influence questing (Sonenshine 1993). However, tick collection rates increased with rising temperature when rainfall in the previous week had been moderate or heavy.

Ixodes ricinus requires high relative humidity for survival and questing (Sonenshine 1993) and high ambient temperatures may be detrimental for its survival. However, this study suggests that ticks in this region may be quite resistant to 25-36°C so long as there is sufficient relative humidity. These findings are important in terms of local tick and tick infestation control. However, given the limited amount of data used in the analysis here, further studies to confirm this finding should be carried out. Climate may also partly explain the greater abundance of ticks in lower compared to higher altitude sites. Instead, the lower tick abundance in wet compared to dry ground is likely due to smaller collections when using wet compared to dry drag-sampling blankets (Sonenshine 1993).

Tick collection was greater in forests than in open grassland areas and this agrees with previous observations that woodlands better provide the necessary host density and high humidity than more exposed open fields (Gray 1991). In the Basque region, cervids are prevalent in some forested areas and domestic herbivores commonly graze open pastures; in some study areas the latter have been systematically treated with ectoparasiticidals to combat the sheep mange mite *Psoroptes ovis* (Hering) since the late 1980s (Ariznabarreta y cols. 2002).

The number of livestock was greater in high compared to low density tick areas, however no correlation was found between livestock and tick abundance within areas with moderate and high tick density. The livestock census used may not be a good proxy measure for livestock density in sampled areas. Tick abundance can strongly depend on the presence of certain rodent species (Smart y Caccamise 1988, Sonenshine 1993). Furthermore, although increasing livestock density may support larger tick populations, it may also contribute to fewer drag captures as more ticks attach to hosts quicker and may be ingested, and by grazing pasture down makes it unsuitable for tick survival. Inappropriate micro-environmental conditions may also explain why fewer ticks were recovered in human

recreational places than elsewhere, although other reasons, such as animals avoiding sites frequented by humans, may be responsible for this finding (Cilek y Olson 2000).

To conclude, this large-scale study of tick species and seasonal tick questing activity in the Basque region reinforces the need for further longer-lasting studies to complement ongoing research of tick-borne infections in the region.

Acknowledgements

This work was supported by funding from FIS (grant ref.: G03/057) and from the Department of Agriculture and Fisheries and Food of the Basque Government.

ARTÍCULO / ESTUDIO 3

Seasonal Dynamics of *Ixodes Ricinus* in a 3-Year period in Northern Spain: First Survey on the Presence of Tick-Borne Encephalitis Virus

J. F. Barandika, A Hurtado, R. A. Juste and A. L. García-Pérez

NEIKER-Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario, Berreaga 1, 48160 Derio, Bizkaia, Spain.

Publicado en:

Vector-Borne and Zoonotic Diseases (2010) (en prensa, ver anexo IV)

Abstract

No cases of Tick-borne encephalitis (TBE) in humans have been ever diagnosed in Spain. However, it is not clear if the necessary conditions for TBE virus (TBEV) persistence and transmission exist there, particularly synchrony in larval and nymphal activity, which has been related to the appearance of TBE in several countries. This synchrony allows ticks to co-feed on the same rodent host, facilitating transmission of TBEV between tick stages. From March 2006 to October 2008, 182 tick samplings were carried out on a monthly basis in six field sites in northern Spain using the blanket dragging technique. A total of 954 adults ticks, 10,117 nymphs, and 73,534 larvae were counted. *Ixodes ricinus* was the predominant tick species. More number of adults, nymphs and larvae were captured during the first year (2006) compared to the second or third years ($p < 0.05$). Adults and nymphs were more active between April and June, whereas the peak of larvae appeared between May and September. Good synchrony between larvae and nymphs was observed only in two sampling sites, where mean maximum temperatures below 10°C were from November 2006 to March 2007, but this synchrony was not maintained during the third year. Significant associations were found between abundance of *I. ricinus* larvae and temperature. Presence of TBEV was investigated by real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction in 1800 nymphs analyzed in pools of 5 and in 630 adults processed individually, and all of them were negative. We therefore concluded that TBEV prevalence is either very low or absent in the investigated regions and current conditions do not seem to favor TBEV maintenance. However, active and extensive surveillance based on epidemiological data collection, including data on changes in livestock, temporal fluctuations in density of small mammals, as well as tick seasonal population dynamics, is indispensable to predict the appearance of new TBE foci and recommend preventive measures.

Introduction

Tick-borne encephalitis (TBE) is a zoonotic viral disease present in central and eastern Europe, Scandinavia, Russia and some parts of northern Asia. TBE virus (TBEV) is the most important and widespread arboviruses transmitted by ticks in Europe, with about 3000 hospital cases reported each year (www.euro.who.int/document/e91865.pdf). The disease is endemic in areas where vectors (*Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus*) are well distributed. Humans are infected by the bite of infected ticks and rarely by the ingestion of raw milk from infected domestic animals (Dumpis y cols. 1999). There are some indicators of an increasing trend in the incidence of the disease, which appears to be spreading to geographical areas where it had not been previously reported. This may be due in part to improved diagnosis,

nonbiological causes such as political and sociological changes, and, more likely, ecological changes that have led to increase in vector tick populations (Randolph 2001).

Ixodes ticks are both the vector and reservoir of the virus. Ticks remain infected through the different stages of their life (nymph and adult) and occasionally transmit the virus to their progeny. TBEV is very short-lived in its principal rodent hosts, which do not commonly develop patent systemic infections (Labuda y cols. 1993). Several studies have demonstrated that TBEV circulates more actively in areas where a combination of climatic and host factors allow large numbers of *I. ricinus* larvae and nymphs feeding together on rodents, thus permitting the nonsystemic transmission of the virus through cofeeding ticks. This transmission mechanism affords a greater degree of virus amplification than the viraemic route (Labuda y Randolph 1999, Randolph y cols. 1999). TBE is a seasonal disease dependent on climate-related tick activity. In some parts of Europe, *I. ricinus* activity starts in spring, when day length is increasing and the weekly mean daily maximum air temperature approaches 7°C. It usually persists until October/November, when the temperature falls (Gray 1984, Perret y cols. 2000, Randolph 2004). Suitable temperature and humidity, specific biotypes such as meadows and forests with rich undergrowth, and favourable density of hosts determine abundance of ticks.

Human habits could strongly influence the incidence and seasonal distribution of TBE (Randolph y cols. 2008). Frequently, the disease is contracted during leisure time in the hot summer months or in the autumn despite lower than average tick density at that time. Until now, no clinical cases have ever been reported in Spain, although first reports suggesting the presence of encephalitic flaviviruses in Spain date from 1980. A survey of around 100 individuals from southern Spain found 6% positive reactions in the hemagglutination inhibition test for Louping-ill virus (Lozano 1980). The most recent survey on TBE in Spain examined 700 human sera from the Basque Country (northern Spain) by ELISA (EnzyQuick FSME) but none complied with the supplier specifications for positive sera (Juste y cols. 1997a).

The objective of this work was to study whether seasonal dynamics of *I. ricinus* larvae and nymphs in this part of Europe could be suitable for TBEV transmission through cofeeding. In addition, a representative number of nymphs and adult *I. ricinus* ticks were processed by real time reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) to investigate the presence of TBEV RNA.

Material and Methods

Study area

Six recreational mountain areas from Northern Spain, four (sites 1-4) located in the Basque Country (7,234km²) and two (sites 5 and 6) in the La Rioja region (5,034 km²) (Fig. 1), were selected on the basis of *I. ricinus* abundance (Barandika y cols. 2006, Barandika y cols. 2008). A maritime climate, characterized by relatively mild winters, warm but not hot summers and, generally abundant rainfall spread out over the year (1200-2600 mm), prevails in the Basque Country. Climate in La Rioja is European Atlantic, with mild summers and cold winters and more seasonal rainfall (900-1100 mm). Landscape in sites 1, 2 and 4 consisted of abundant undergrowth and mountain pastures with scarce trees. Sites 3, 5 and 6 are located in pine or oak woodlands, (Table 1). Livestock in semiextensive grazing systems mainly includes sheep in the both Basque Country (344,288 sheep, 56,191 beef cattle, and 17,457 free-ranging horses) and La Rioja (150,916 sheep, 17,001 beef cattle, and 4,933 free-ranging horses). Among wildlife species, red deer (*Cervus elaphus*) is present only in sites 3 and 5, whereas roe deer (*Capreolus capreolus*) is present in all sites. Other species such as wild boars (*Sus scrofa*), foxes (*Vulpes vulpes*), badgers (*Meles meles*), hedgehogs (*Erinaceus europeaeus*), and red squirrels (*Sciurus vulgaris*) are very common. Among small mammals, the wood mouse (*Apodemus sylvaticus*) and bank vole (*Myodes glareolus*) are the most abundant species (Barandika y cols. 2007, Estrada-Pena y cols. 2005). The global positioning system geographical coordinates, altitude, predominant vegetation, main livestock, and cervid species present in sampling areas are summarized in Table 1.

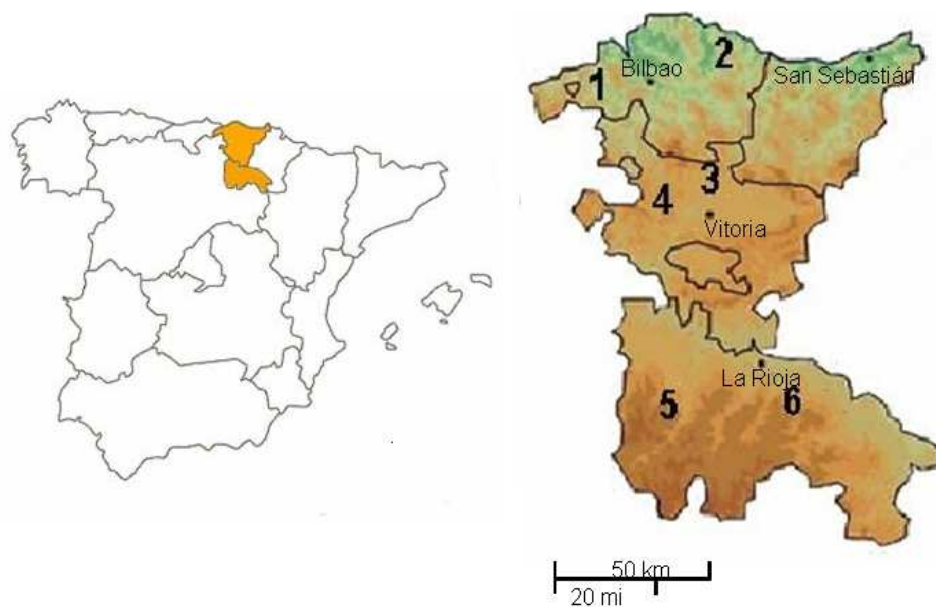


Figure 1. Location of sampling sites in the two Spanish regions, Basque Country (sites 1-4) and La Rioja (sites 5-6).

Tick sampling

Monthly recordings of tick density were conducted between March 2006 and October 2008. All samplings were done by the same operator using standardized methods for capture of questing ticks, which involved dragging a 1 m² white cotton towel over vegetation transects of 100 m, stopping every 5 m to collect and count attached nymph and adult ticks. For larvae counts, towels were examined in the laboratory and all the larvae counted if the number was low, or, if there were many, an estimate was made after visually dividing the towel into ten 10 cm stripes and counting three of them (first, middle, and last). Ticks were identified using taxonomic keys (Gil-Collado y cols. 1979, Manilla 1998), and stored at -80°C until subsequent RNA purification. Data on the presence and abundance of livestock grazing was registered at each sampling occasion, considering the abundance as low, medium, or high when livestock standard units recorded were <4, 4–6 or >6, respectively.

To compare the abundance of *I. ricinus* ticks between samplings and sites, tick data were converted to abundance indices (AI) for larvae (AIL), nymphs (AIN) and adults (AIA), which express the number of ticks collected in transects of 100 m² as $AI = TR \times 100 / a$, where TR is the number of *I. ricinus* ticks recorded and *a* is the sampled area in square meters.

Table 1. Characteristics of sampling sites, including global positioning system geographical coordinates, altitude, vegetation, livestock, and cervid species.

Site	Coordinates (WGS84)	Altitude (m)	Forest	Predominant vegetation	Livestock	Cervids
1	003,41780°W 43,16613°N	615	None	Bracken, gorse, grass, bramble	Cattle, horses, sheep	Roe deer
2	002,60884°W 43,22493°N	693	Oaks (scarce)	Bracken, gorse, grass, heather, bramble	Cattle, horses, sheep	Roe deer
3	002,83379°W 42,98567°N	686	Pine, Oaks	Bracken, gorse, grass, heather, bramble	Cattle, horses	Red deer Roe deer
4	002,96468°W 42,94478°N	817	Beeches (scarce)	Heather, bracken, bramble, grass, hawthorn	Sheep, cattle, horses	Roe deer
5	002,88509°W 42,25387°N	1056	Pine, Oaks	Heather, grass, bramble, hawthorn	Cattle, horses	Red deer Roe deer
6	002,24117°W 42,26551°N	1284	Oaks	Bracken, heather, bramble, juniper, nettle	Cattle, horses	Roe deer

RNA extraction and real time RT-PCR

Adult ticks (individually) and nymphs (in pools of five) were processed for RNA extraction, following the guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform procedure using Trizol® LS

Reagent (Invitrogen, CA) according to the manufacturer's instructions. TBEV RNA was detected on an ABI 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA), targeting a part of the 3'-noncoding region of the TBEV that is conserved in essentially all TBEV subtypes. Primers (F-TBE 1 and R-TBE 1) and TaqMan probe (TBE-Probe-WT) as previously described by (Schwaiger y Cassinotti 2003) were synthesized by MWG-Biotech AG (Ebersberg, Germany). Real time RT-PCR were performed using the SuperScript™ III Platinum® One-step Quantitative RT-PCR System (Invitrogen) in 25 μ L mixtures containing 12.5 μ L 2X Reaction Mix, 0.5 μ L SSIII RT Platinum Taq Mix, 300 nM of the forward and reverse primers, 200 nM of the TaqMan probe and 5 μ L of the extracted RNA. Amplification and detection were carried out as a one-step RT-PCR consisting of a 30 min RT step at 40 °C, followed by incubation at 95 °C for 10 min, before to a two-step amplification (95 °C for 15 s, 60 °C for 60 s) for 45 cycles. To exclude false-positive results, negative controls were included during RNA extraction and RT-PCR amplification. A TBEV isolated from a human patient (strain Ljubljana 2) (Avsic-Zupanc y cols. 1995) was included in each amplification assay as positive control (provided by Dr. P. Mendonca, Ludwig-Maximilians-Universität, Munich, Germany).

To monitor the extraction procedure and exclude possible presence of PCR inhibitors the 18S rRNA gene of the tick *I. ricinus* was amplified from 10% of the collected ticks by real time RT-PCR using universal primers and probe following the conditions described above for TBEV.

Data collection

To investigate changes in climatic conditions, climatic data from meteorological stations close to the sampling sites were compiled over the period 2006-2008. Daily measures of mean, maximum, and minimum air temperatures (°C), relative humidity (%), and precipitation (mm) were obtained from two different sources, the Basque Country (<http://www.euskalmet>) and La Rioja (site 5: <http://www.larioja.org/npRioja>; site 6: <http://ias1.larioja.org/estaciones>). Saturation deficit (SD) was calculated from temperature and relative humidity data as described by Randolph and Storey (Randolph y Storey 1999). To investigate general trends and differences in climate among the stations, monthly and annual means were calculated for all these parameters. In addition, the averages of climate parameters were calculated in time intervals with regard to samplings (7, 14, 21, and 28 days before samplings).

Statistical methods

Tick abundance indexes (AIA, AIN, and AIL) were transformed to natural log values, $(\ln(AI + 1))$ for statistical analyses. SAS 9.1 software (Institute Inc., Cary, NC) was used to

compare means by analysis of variance. Linear correlation was used to analyze the relationship between larvae and nymphs abundance at samplings. To evaluate the degree of synchrony between larvae and nymphs along the year, the coincidence index (CI), calculated as $CI = AIL \times AIN / 100$, was used to graphically represent the period/s of the year when synchrony between these stages was higher. Finally, assuming that only spring temperatures affect the onset of questing activity of larvae and nymphs, correlation was also used to examine the relationship between ticks and weather data between February and June.

Results

Tick samplings results

Since March 2006, monthly samplings were carried out in each field site and a total of 182 samplings were done using the dragging technique. In the 3-year samplings, 954 adults, 10,117 nymphs and 73,534 larvae of *I. ricinus* were counted, representing a ratio of 77 larvae and 11 nymphs per each adult captured (1:11:77). Overall, captures of *I. ricinus* nymphs and larvae were significantly higher during the first year (2006) compared to the second or third years. Table 2 shows the captures per 100 m² obtained per sampling site and year. Sites 5 and 6 had the highest captures of ticks. When density of livestock at sampling was moderate or high, nymphs and adults abundance, respectively, were significantly reduced ($p < 0.05$).

Table 2. Abundance of larvae, nymphs and adult ticks / 100m² per year and sampling site.

Site	Adults				Nymphs				Larvae				Ratio
	2006	2007	2008	2006-2008	2006	2007	2008	2006-2008	2006	2007	2008	2006-2008	
1	1.8	1.4	3.9	2.7	55.8	31.4	24.2	33.8	569	319.5	510.7	470.3	1:13:175
2	3.8	3	1.9	2.7	38.8	35.4	23.5	30.9	293	62.4	149.7	163.7	1:11:60
3	3.3	3.5	4.1	3.7	66.8	50.4	27.4	44.3	226.1	106.8	140.8	150.9	1:12:41
4	2.9	2.1	1.5	2.0	38.4	27.7	16.6	24.6	158.1	205.3	91.2	138.0	1:12:70
5	5.6	5.2	6.2	5.7	110.8	53.2	40.8	63.5	772.2	273.2	450.3	487.8	1:11:85
6	14.3	4.7	2.6	6.0	78.3	33.7	28.2	41.9	493.9	443.9	128.5	306.1	1:7:51
Mean	5.2	3.3	3.3	3.8	65.6	38.8	26.5	39.8	427.8	234.9	247.2	288.6	1:10:76

Seasonal activity of larvae and nymphs

Larvae showed a bimodal pattern of activity (sites 1, 3, 4 and 5) with a main peak in May-July and a small peak in autumn. Nymphs showed different patterns in different sites.

Whereas in sites 1, 2 and 3 nymphs peaked in different months (mainly during spring and autumn-winter), in sites 4, 5 and 6 nymphs reached a main peak in May and June (Fig. 2). These three sites, located at higher altitude (817-1284 meters), showed similar patterns in larvae and nymph activity, with slight differences in appearance of peaks. In general, adult ticks were more active between April and June. In the sampling sites located in the Basque Country (sites 1-4) the peak of nymphs always appeared weeks before the peak of larvae. No significant correlations were observed between these stages in any of the sites, either in the overall analysis or in the analysis by individual years. On the contrary, in La Rioja (sites 5-6) there was good synchrony between larvae and nymphs. In fact, correlations between larvae and nymphs abundance were statistically significant in site 5 ($r=0.77$, $p < 0.0001$) and 6 ($r=0.70$, $p < 0.0001$). But when correlation analysis was done separately for each year, a positive and significant correlation between larvae and nymphs was only found in 2006 in site 5 ($r=0.65$, $p < 0.05$), whereas in site 6 significant correlations were observed in 2006 ($r=0.66$, $p < 0.05$) and 2007 ($r=0.73$, $p < 0.05$) but not in 2008, when the peak appeared in May-June for nymphs and later for larvae (June and September) (Fig. 2). Comparing data for the 3 years, the highest CI values (red lines in Fig. 2), were always found in May-June 2006 in all sampling sites. Sites in La Rioja (sites 5 and 6) had higher population of ticks and also, as stated above, higher synchrony between larvae and nymphs, giving high CI values in all the 3 years (site 5) or in the first 2 years (site 6). On the contrary, sites 3 and 4 presented low CI values along the study period, indicating lack of synchrony between immature tick stages.

Associations between climatic data and ticks

Year 2006 was exceptionally warm compared with 2007 and 2008. Monthly mean daily maximum temperatures were above 10°C from March to November 2006 (Fig. 2), whereas in 2007 and 2008 mean maximum temperatures above 10°C occurred from April to October. Site 3 had the highest annual mean maximum temperatures (17.6°C) while site 5, which had the lowest (13.3°C). Accordingly, SD index was higher in 2006 (mean, 2.46 mm Hg) compared with 2007 (mean, 1.84 mm Hg) and 2008 (mean, 1.74 mm Hg). SD higher than 2.5 mm Hg was detected between June and September, but values reached above 5 mm Hg only in site 6 (Fig. 2). In agreement with this, annual rainfall level was significantly lower in 2006 than in 2007 and 2008 and ranged between 325 mm / year in site 5 and 1400 mm / year in site 2 (data not shown).

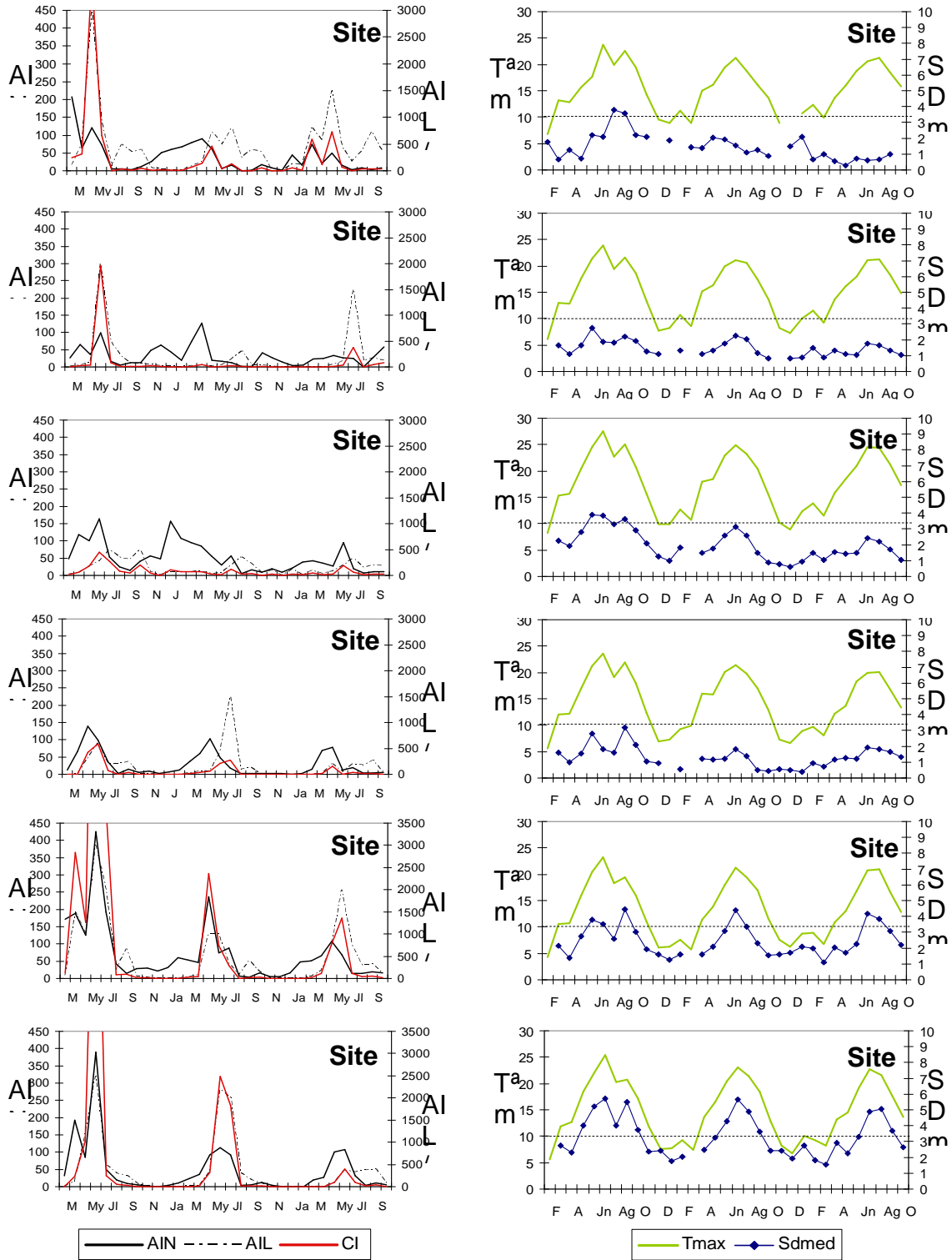


Figure 2. Monthly dynamics of nymph and larvae activity and coincidence index ($CI = AIN \times AIL / 100$) (left column), and monthly mean daily maximum temperatures (T_{max}) and saturation deficit (SD_{med}) (right column) in each sampling site through March 2006 to October 2008. The mean spring maximum air temperatures threshold of 10°C for *Ixodes ricinus* larval activity (Randolph 2004) is indicated by a dashed line.

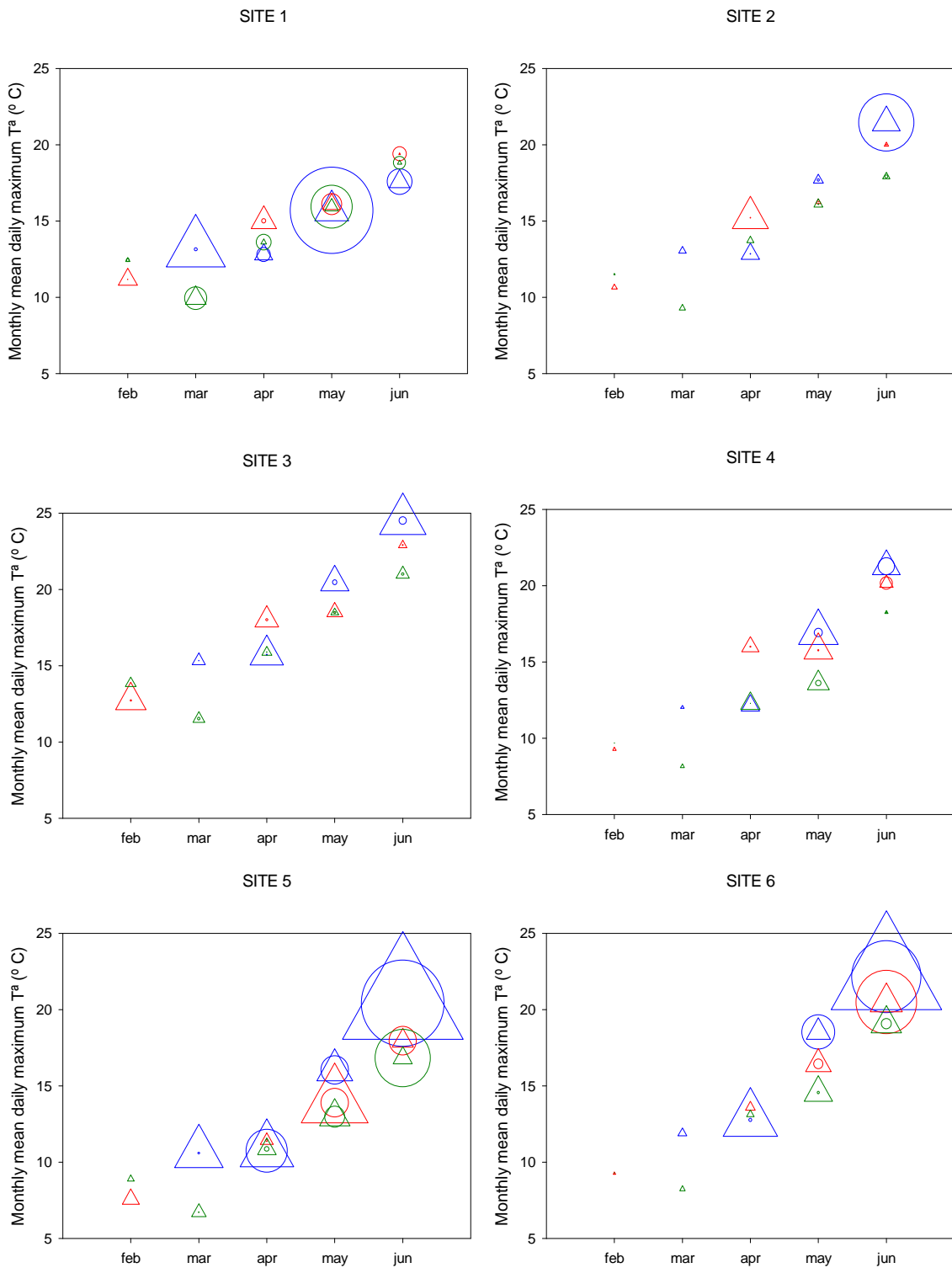


Figure 3. Abundance of larvae (AIL, circles) and nymphs (AIN, triangles) in relation to monthly mean daily maximum temperatures from February to June in each sampling site. Blue symbols represent records for 2006, red symbols for 2007, and green symbols for 2008. The size of the bubbles indicates the abundance (original values of AIL divides by 100, and AIN divided by 10).

Significant associations were found between the relative abundance of *I. ricinus* larvae and temperatures. Very few larvae were collected when the mean maximum temperatures in the sampling sites were below 10°C (Fig. 2), the threshold value for the onset of *I. ricinus* larval activity in spring (Randolph 2004). In several sites, higher SD indexes coincided with the highest larval activity. Figure 3 shows interannual variation of nymph and larvae abundance during the season in which these tick stages start activity (February to June) with respect to differences in monthly mean maximum temperatures between years. Nymphs appeared from the beginning of the season, and their abundance was not restricted by temperature. The most unfavorable conditions for coincidence of larvae and nymphs at high levels were observed in sites 2, 3 and 4, where larvae were not abundant. Taking into account the weather data for this period (February to June), the highest correlation r -values for larvae were recorded for daily mean temperatures during the 21 days previous to each sampling ($r=0.65$, $p < 0.0001$). A significant association between temperatures and tick abundance was also observed for nymphs or adults, but the correlation was much less strong.

Real time RT-PCR analyses

The 18S rRNA gene of *I. ricinus* was successfully amplified from all 98 ticks analyzed (78 adult and 20 pools of nymphs), confirming the integrity of nucleic acids and the absence of PCR inhibitors. However, all 1800 nymphs (360 pools of five) and 630 adults analyzed were negative for TBEV.

Discussion

TBE is present in a large geographical area across Europe, and during the last decades there has been increased incidence of the disease in many countries. Human cases have been reported from new areas (Broker y Gniel 2003), indicating the spread of TBEV. Sociopolitical circumstances as well as biological, climate and geographical factors may play an important role in the incidence of TBEV. Temperatures between 6°C and 25°C and humidity levels above 85%, together with specific biotypes with rich undergrowth and high density of suitable hosts, are conditions potentially suitable for ticks (Lindquist y Vapalahti 2008). These conditions are likely to occur in northern Spain, where the vector *I. ricinus* is one of the main tick species (Barandika y cols. 2006, Barandika y cols. 2008). This species harbors several tick-borne pathogens such as *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in the area (Barandika y cols. 2008), but TBEV had never been studied before.

I. ricinus is the main source of TBEV, and co-feeding of infected nymph and uninfected larvae in clusters on rodent hosts is considered a major factor for TBEV transmission (Labuda y cols. 1996). Only when large numbers of larvae feed together with nymphs is this transmission route possible (Randolph y cols. 1999), and this requires that both immature tick stages become active in synchrony. A rapid temperature decrease in autumn would send larvae into behavioral diapause and a rapid warming in spring would make both larvae and nymphs start their activity at the same time (Randolph y cols. 1999, Randolph y cols. 2000). However, the rate of warming in the spring is biologically a more critical factor than the temperature decrease in autumn (Randolph y Sumilo 2007) for synchrony in larval and nymphal activity. The warm climate in the study area in autumn and winter months, especially in the years 2006 and 2007, prevented the simultaneous occurrence of larvae and nymphs the following spring. Thus, in sites 1, 2, 3 and 4, nymphs clearly started activity several months before larvae in the spring 2007. However, synchrony between these immature stages was acceptable in sites 5 and 6, where mean maximum temperatures below 10°C were maintained from November 2006 to March 2007, making the coincidence of larvae and nymphs possible in May 2007. However, this synchrony was not maintained in site 6 over the 3-years period; the warmer temperatures in the autumn-winter of 2007-08 lead nymphs to an earlier activation. Because synchrony has to be maintained for years to facilitate more active circulation of TBEV, a longer follow-up of tick dynamics in this area is needed to confirm if persistence is possible in this scenario. Nevertheless, a previous study carried out for a 9-year period (1994-2002) (Estrada-Pena y cols. 2004b), in another area of La Rioja with similar characteristics, clearly showed that nymphs became active before larvae.

As stated above, infection of larvae occurs most efficiently during co-feeding with infected nymphs in *Apodemus* mice or other rodents such as *M. glareolus*, which efficiently amplify TBEV (Labuda y cols. 1993). *A. sylvaticus* is the predominant species among wild small wild mammals in woodlands of the Basque Country and La Rioja, but nymphs parasitizing these rodents are scarce or absent (Barandika y cols. 2007, Estrada-Pena y cols. 2005, Gil y cols. 2005). This low nymphal infestation may limit the capacity for transmission of tick-borne pathogens. This could be especially true when transovarial transmission of pathogens in ticks is absent or occurs at very low level, as in the case of TBEV. Further studies on tick infections in rodents during the months with high CI values are needed to confirm parasitization of rodents by nymphs and to measure rates of co-feeding.

Humidity is a crucial factor for *I. ricinus* survival, and therefore larvae and nymphs select microhabitats where relative humidity is mostly above 80% to avoid desiccation (Anderson y Magnarelli 2008). As shown in Figure 2, the SD in the sampling sites remained at optimal levels throughout the study period, being the highest values (5-7 mm Hg in sites 5 and 6

during summer months) below those recorded in other places in nearby regions (Estrada-Pena y cols. 2004b) or in other countries (Burri y cols. 2007, Perret y cols. 2000). These low SD values do not probably affect tick questing behaviour (Perret y cols. 2000) Under these optimal conditions, larvae would quest for hosts at the ground level whereas nymphs would move to the upper parts of the vegetation (Mejlon y Jaenson 1997, Randolph y Storey 1999) targeting larger animals. Adult ticks feed on large vertebrate host while immature tick stages feed on all vertebrate species including birds and mammals of all sizes (Estrada-Pena y cols. 2005, Moran y cols. 2007). The proportion of questing tick population is inversely related with host density (Randolph 2004). In the present study, the density of livestock at samplings was negatively correlated with the number of captured nymphs and adults. This could indicate that, under the conditions of this study, nymphs feed on large animals rather than on small mammals, which would explain the high densities of *Ixodes* nymphs on domestic ruminants previously reported in this region (Moreno y Estrada-Peña 1997).

A significant number of ticks per sampling site were analyzed by real-time RT-PCR for the presence of TBEV, but all molecular analyses were negative. The number of nymphs analyzed (300 nymphs per site) should be high enough to detect TBEV if present at the rates (0.1-5.0%) reported in endemic countries (Lindquist y Vapalahti 2008), because one nymph positive per site would represented a 0.3% of infection. Although an internal amplification control was not included in the real-time RT-PCR procedure used here, inhibition was excluded by *I. ricinus* 18S rRNA gene amplification in a percentage of samples. Therefore, we can conclude that TBEV prevalence is either very low or absent in *I. ricinus* ticks from these regions, in agreement with the absence of suspected cases in humans in Spain. Nevertheless, TBEV is present in neighboring countries like France, with 5-10 cases reported each year from the Alsace-Lorraine region (Hansmann y cols. 2004), and one recent autochthonous case in a farmer from Southwestern France (Herpe y cols. 2007), close to Northern Spain. The latter was though to be caused by Spanish Sheep Encephalitis virus (SSEV) (Randolph 2008), a virus genetically and antigenically similar to the one detected in sheep flocks from the Basque Country (González y cols. 1987b, Marin y cols. 1995). Although the real-time RT-PCR primers and probe used in our study were able to amplify SSEV (data not shown), surprisingly, all the ticks analyzed were negative, including those from sampling site 4, where SSEV had been detected in sheep in the past (González et al. 1987). Thus, we can hypothesize that flaviviruses exist in questing ticks at levels too low to be detected even when using sensitive techniques like real-time RT-PCR. Nevertheless, SSEV presence and transmission rely on different epidemiological factors; for instance, transmission occurs via viraemic large ungulates and therefore does not depend on synchrony of immature ticks feeding on rodents (Gilbert y cols. 2000).

In conclusion, TBEV prevalence in ticks is a useful indicator of virus circulation and can be used to evaluate the risk of TBEV infection in a particular area. This study indicated that TBEV prevalence is either very low or absent in the investigated regions of Spain. Therefore, risk of human infection, if present, is currently low. But some places in La Rioja, where climatic conditions favor synchrony of larvae and nymphs, are at higher risk of becoming suitable for TBEV persistence. Therefore, active and extensive surveillance based on epidemiological data collection, including changes on livestock; temporal fluctuations in density of small mammals, which could result in variations in tick density; as well as tick seasonal population dynamics, is indispensable to predict the appearance of new TBE foci and recommend preventive measures. For further tick analyses in this area, sampling of nymphs should concentrate on May and June, when tick abundance is higher and risk of transmission and spreading of TBEV, if present, would be higher.

Acknowledgements

This study is part of the Subproject Tick-Borne diseases (TBD), included in the project “Emerging diseases in a changing European Environment”, funded by the EU grant GOCE-2003-010284 EDEN and is catalogued by EDEN Steering Committee as EDEN0155 (www.eden-fp6project.net). The content of this publication are the sole responsibility of the authors and does not necessarily reflect the views of the European Commission.

ARTÍCULO / ESTUDIO 4

Prevalence of Tick-Borne Zoonotic Bacteria in Questing Adult Ticks from Northern Spain

J. F. Barandika¹, A. Hurtado¹, J. García-Sanmartín¹, R. A. Juste¹, P. Anda²
and A. L. García-Pérez¹

¹ Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER). Sanidad Animal, Bizkaia, Spain.

² Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain

Publicado en:

Vector-Borne and Zoonotic Diseases
2008, Volume 8, Number 6, pp. 829–835

Abstract

A total of 691 questing adult ixodid ticks of the genera *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Dermacentor* and *Rhipicephalus* were tested by polymerase chain reaction (PCR) and reverse line blot (RLB) for the presence of *Anaplasma phagocytophilum*, *Coxiella burnetii*, *Borrelia* spp., and spotted fever group (SFG) rickettsiae. Ticks were collected by blanket dragging along two sampling years (2003-2005) in 10 recreational areas in the Basque Country (Northern Spain). Adult ticks were collected every month of the year and eight different species were identified among which *Ixodes ricinus* was the most abundant and widespread. Three pathogens for humans, *Borrelia burgdorferi*, *A. phagocytophilum* and *C. burnetii*, as well as rickettsiae of unknown pathogenicity were detected. The latter were identified as *Rickettsia* sp. RpA4/DnS14 by sequencing of the citrate synthase (*gltA*) gene. The infection rates varied from 0.1 %-6.9%. DNA of *A. phagocytophilum* was detected mainly in *I. ricinus*, but also in *Haemaphysalis punctata*, *Haemaphysalis concinna* and *Rhipicephalus bursa*. *C. burnetii* was detected in only one specimen of *H. punctata*, and *Borrelia* spp. in 8 ticks. Furthermore, PCR-RLB analysis specific for *B. burgdorferi* sensu lato detected one *H. punctata* with positive hybridization with the *B. burgdorferi* sensu stricto probe, and two *I. ricinus* positive for *B. afzelii* and *B. garinii*. SFG rickettsiae were the pathogens more frequently found, present in 48 of 97 *D. reticulatus* analyzed. Mixed infections were not found in any of the analyzed ticks. These results are compared and discussed with data obtained in previous studies carried out in the same and other regions.

Introduction

Ticks are important vectors of various pathogenic bacteria, protozoa and viruses that cause disease in humans and animals worldwide. The prevalence of the diseases caused by these pathogens is primarily dependent on the geographic distribution and activity of vector ticks. Environmental conditions in the Basque Country favour tick survival and reproduction, and a recent study showed a significant increase in the abundance of ixodid ticks in the last years (Barandika y cols. 2006). Screening of these arthropods for such pathogens using molecular tools such as polymerase chain reaction (PCR) and reverse line blot (RLB) can provide good estimations of their prevalence in a particular area.

Coxiella burnetii, the etiological agent of Q fever, is recognized as an important pathogen as well as a potential bioterrorism agent (Azad y Radulovic 2003), and it is particularly relevant in Northern Spain where Q fever pneumonia is endemic (Montes y cols. 2006). More than 40 species of ticks are naturally infected with *C. burnetii* and ticks are considered to be a major reservoir and a possible vector (Arricau-Bouvery y Rodolakis

2005), and thus may be involved in the natural cycle of this pathogen among wild vertebrates (Maurin y Raoult 1999).

In Europe, *Anaplasma phagocytophilum* is considered the etiologic agent of human granulocytic anaplasmosis (HGA) and the ruminant syndrome called tick-borne fever (TBF). The bacterium has been detected by PCR in *Ixodes* ticks from most European countries (Brouqui y cols. 2004), and *Ixodes ricinus*, a tick species common throughout most of Europe, is considered its vector (Parola y Raoult 2001a). Its presence has also been recorded in ticks from Northern Spain (Barral 1998), and *A. phagocytophilum* is considered one of the main causes of ovine abortion in several mountainous areas of this region (García-Pérez y cols. 2003).

Tick-borne rickettsioses are caused by bacteria of the genus *Rickettsia* of the spotted fever group (SFG), and these zoonoses are among the oldest known vector-borne diseases. These rickettsiae are usually associated with ixodid ticks, which act as both vector and reservoir (Beninati y cols. 2002). Some SFG rickettsiae detected or isolated from ticks only, initially considered as potential pathogens, were later formally described and recognized as emerging pathogens (Parola y cols. 2005b). *Rickettsia monacensis* was recently described as the etiologic agent of Mediterranean spotted fever-like illness in two patients from Northern Spain (Jado y cols. 2007), and several new rickettsiae of unknown pathogenicity have been recently described in ixodid ticks removed from humans in Spain (Fernández-Soto y cols. 2006b, Ibarra y cols. 2006, Merino y cols. 2005).

Lyme borreliosis, caused by *Borrelia burgdorferi* sensu lato, is the most prevalent arthropod-transmitted zoonosis in Europe, mainly transmitted by ixodid ticks of the *Ixodes* complex (Burgdorfer 1984). In the Basque Country there are some areas where Lyme borreliosis is endemic; epidemiological studies on *B. burgdorferi* sensu lato in questing ticks have been performed and five different genospecies (*Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae* and *B. afzelii*) were identified (Barral y cols. 2002, Gil y cols. 2005).

Previous studies have revealed the presence of *B. burgdorferi* sensu lato (Barral y cols. 2002, Gil y cols. 2005) and *Anaplasma* sp. (Barral y cols. 1999) in questing ticks from several areas in the Basque Country (Northern Spain), but no data are available regarding presence of *C. burnetii* and SFG rickettsiae. We conducted this study to assess the infection prevalence of these zoonotic pathogens in adult questing ticks collected from vegetation in 10 recreational areas in the Basque Country, using the same molecular methodology (multiplex PCR, followed by RLB hybridization) successfully used to investigate the prevalence of these tick-borne bacteria in the small-mammal population of the region (Barandika y cols. 2007). Using genus-specific and species-specific probes, we determined the prevalence in questing

ticks of *B. burgdorferi* sensu lato species, *C. burnetii*, *A. phagocytophilum* and SFG rickettsiae.

Materials and methods

Tick collection

Monthly recordings of tick abundance were conducted between April 2003 and May 2005 in 10 recreational mountain areas in the Basque Country. The characteristics of the sampling areas were described in detail by Barandika y cols. (2006) and are summarized in Table 1. Ticks (adults, nymphs and larvae) were collected from the vegetation by blanket dragging, stopping every 2-5 min to collect attached adult ticks. Ticks were counted and identified using taxonomic keys (Gil-Collado y cols. 1979, Manilla 1998), and stored at -80°C until subsequent DNA purification.

Table 1. Location, land use, and biotic features of sampling areas

Area	UTM					Livestock	
	coordinates	Altitude	Land use	Tree presence	Predominant undergrowth	Density ^a	Main species ^b
4	30531308 E 4785959 N	760	Forest	Pine	Heather, bracken, gorse	High	Cattle, horse, sheep
7	30525752 E 4768590 N	758	Forest	Pine	Meadow	Low	Sheep
15	30593685 E 4801250 N	275	Pasture	Pine	Heather	Medium	Cattle, horse, sheep
16	30599182 E 4793824 N	500	Forest	Pine	Heather	Low	Cattle, horse, sheep
18	30572683 E 4759624 N	950	Pasture	None	Meadow, bracken	High	Cattle, horse, sheep
27	30513545 E 4758873 N	600	Pasture	Oak, beech, pine	Heather, gorse	Low	Sheep, (cattle, horse)
30	30503153 E 4753721 N	700	Pasture	Pine, beech	Heather, bracken	High	Cattle, horse, sheep
38	30497472 E 4791946 N	468	Forest	Pine	Bracken, gorse	High	Cattle, horse, sheep
39	30504191 E 4785432 N	510	Forest	Pine	Meadow, bracken	Medium	Cattle, horse, (sheep)
40	30543300 E 4726922 N	670	Forest	Oak	Meadow, bracken	Medium	Cattle, (horse)

^a Livestock density is a subjective estimate of the grazing density at each sampling time.

^b The predominant grazing species in the area. In parentheses are the species only occasionally present.

To compare the abundance of ticks between samplings and sites, the tick abundance index (TAI) was calculated as follows: $TAI = TR \times 100 / t$, where TR = number of ticks recorded and t = duration of sampling in minutes.

Tick analysis

Adult ticks were individually crushed with a sterile pestle in tubes containing 200 µl of TE buffer (Tris 10 mM / EDTA 1 mM, pH 8). DNA was extracted using the QIAamp Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) and concentration was determined with a NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, DE).

Extracted DNA (100-200 ng) was subjected to two multiplex PCR amplifications, one for the detection of *C. burnetii* and *A. phagocytophilum*, and a second one for SFG rickettsiae and *Borrelia* spp. PCR reaction conditions are detailed elsewhere (Barandika y cols. 2007). Prevention of cross-contamination and false-positives was managed by using plugged tips, setting PCR reactions in a separate room from that used for post-PCR analysis, and including a negative (water) control in each run.

RLB hybridization was subsequently performed to increase the sensitivity using specific probes for *C. burnetii* and *A. phagocytophilum*, and generic probes for SFG rickettsiae, and *Borrelia* spp. (Barandika y cols. 2007). To exclude false-positive results, negative controls included during DNA extraction and PCR amplification were also subjected to RLB hybridization. Specificity and sensitivity of the assay were tested previously (Barandika y cols. 2007).

Samples positive to *Borrelia* spp. were analyzed using a PCR specific for *B. burgdorferi* sensu lato targeting the 5S-23S rRNA intergenic spacer, followed by RLB with specific probes for *B. burgdorferi* sensu lato, *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana* and *B. lusitaniae* (Barandika y cols. 2007).

To identify the species, *Rickettsia* spp.-positives samples were subjected to a further PCR to amplify a 381-bp fragment of the citrate synthase gene (*gltA*) as previously described (Regnery y cols. 1991). Twenty two amplified products were purified and sequenced using a 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). The obtained sequences were identified by comparison with the GenBank database by homology searches made at the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using BLAST. Multiple sequence alignments were performed using the program AlignX (Vector NTI 8.0 suite, InforMax, North Bethesda, MD) with an engine based on the ClustalW algorithm (Thompson y cols. 1994).

Statistical analysis

Prevalence of each bacterial species was analyzed according to independent variables such as tick species, sampling site, and sampling season by chi-square or Fisher exact tests by using

the SAS statistical package (Version 8.0; SAS Institute Inc., Cary, NC). Significance was set at $p < 0.05$.

Nucleotide sequence accession number

The *gltA* sequence described in this work was deposited in GenBank under accession no. EU653273.

Results

Tick collection

A total of 180,146 ticks were collected (1,615 adults, 18,612 nymphs and 159,919 larvae) over the 2-year study, in a proportion of 1:12:99 (adult:nymphs:larvae). Larvae and nymphs belonged exclusively to the genera *Haemaphysalis* and *Ixodes*, but captured adult ticks belonged to 6 different species: 1,075 *I. ricinus*, 201 *H. inermis*, 130 *H. punctata*, 99 *Dermacentor reticulatus*, 56 *H. concinna*, and 51 *Rhipicephalus bursa* (Table 2). Sporadic captures of *D. marginatus* (2 ticks) and *I. frontalis* (1 tick) were also made, but were not included for further analysis. *Ixodes ricinus* was captured in all sampled areas, *H. punctata* and *D. reticulatus* in eight, *H. inermis* in five, *R. bursa* in six and *H. concinna* in one. The TAI for adult ticks varied markedly between sampling areas ($p < 0.0001$) and not significantly ($p = 0.5640$) between years, being higher in the second year. Adult ticks were detected every month of the year, with an abundance peak between late spring and early summer. However, there were important seasonal differences between species. Thus, whereas *I. ricinus* and *H. punctata* were captured regularly in all seasons, TAI for other tick species varied markedly (Fig. 1).

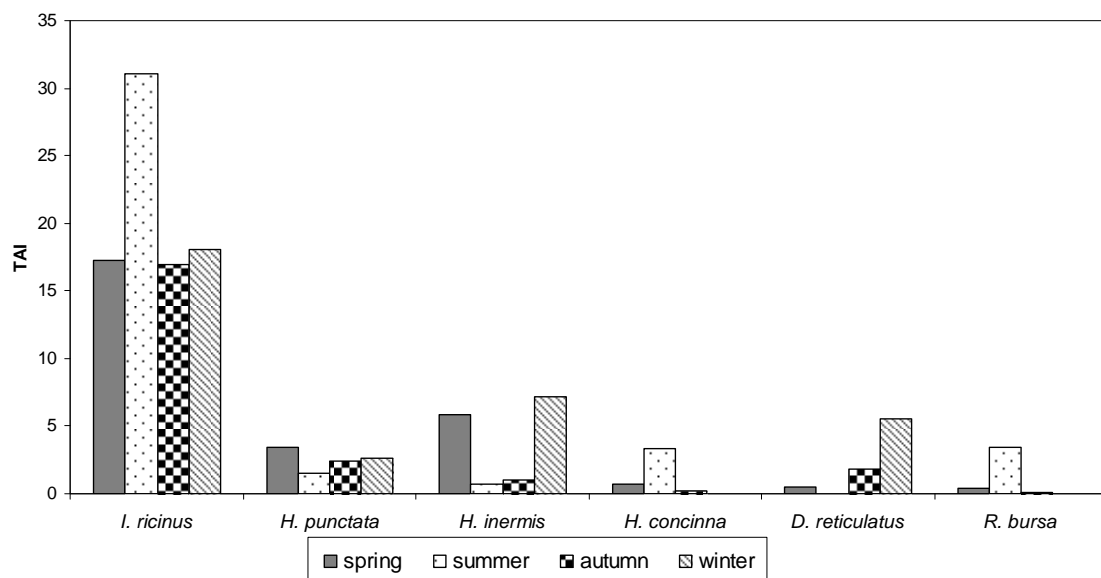


Figure 1. Seasonal abundance of tick species

Presence of bacterial DNA

Six hundred and ninety-one adult ticks belonging to 6 species (288 *I. ricinus*, 109 *H. punctata*, 97 *D. reticulatus*, 95 *H. inermis*, 50 *R. bursa* and 52 *H. concinna*) were individually analyzed. In 77 (11.1%), DNA of the studied pathogens was detected, always in single occurrence. Infection prevalence was different ($p < 0.0001$) among tick species and ranged from 49.5% (48/97) for *D. reticulatus* to 2.0% (1/50) for *R. bursa*; all specimens of *H. inermis* studied were negative (Table 2).

SFG rickettsiae were the tick-borne pathogens more frequently found (6.9% of analyzed ticks), though all positive ticks were *D. reticulatus*, collected from 7 of the 8 zones where this tick species was found; in the negative area only two specimens were collected and analyzed. Although positive ticks were detected more frequently in autumn (57.7%; 15/26) and winter (49.2%; 31/63) than in spring (25.5%; 2/8), differences between the infection rate and the season when ticks were captured were not significant ($p = 0.2697$). The *gltA* amplicon was successfully amplified from all *D. reticulatus*-positive ticks and 22 of them were selected for sequencing, revealing a 100% identity among themselves (accession no. EU653273) and with *Rickettsia* sp. RpA4 (no. AF120029) and *Rickettsia* sp. DnS14 (no. AF120028).

DNA of *A. phagocytophilum* was detected in 20 ticks (2.9%), 16 of them *I. ricinus* captured throughout the year in 6 of 9 areas. In the tenth site (area 18) the only *I. ricinus* collected was not analyzed. Although infection prevalence fluctuated between sampling seasons (3.8-14.3%) and sites (0-14.3%), there were no significant differences between infection rates and these two variables ($p = 0.3497$ and $p = 0.2112$, respectively).

C. burnetii was detected in a single tick (0.1%), 1 *H. punctata* captured in an area (site 30) where livestock density (sheep, cattle and horse) was high (Table 1). In this site, where 117 ticks were analyzed (72 of them *H. punctata*), 1 *H. punctata* adult tick was positive for *C. burnetii*, representing 0.9% of all adults analyzed and 1.4% of *H. punctata*.

Borrelia spp. DNA was detected in 8 ticks (1.2%), 5 *I. ricinus* (1.7%) and 3 *H. punctata* (2.8%), which were captured throughout the year in 4 sites, where prevalence varied between 1.4% (1/70) for site 15 and 7.5% (3/40) for site 7. The 3 positive ticks in site 7 belonged to *I. ricinus* species, which represented a prevalence of 14.3%. Differences between *Borrelia* spp. infection rates and sampling area were significant ($p = 0.0343$) but not with the different tick species ($p = 0.2625$) or sampling seasons ($p = 0.7263$). RLB analysis of *Borrelia* spp.-positive samples using 5S-23S rRNA genospecies-specific probes identified *B. burgdorferi* sensu stricto in one *H. punctata*, and *B. afzelii* and *B. garinii* in two *I. ricinus* ticks. A third *I. ricinus* tick was positive for *B. burgdorferi* sensu lato but did not hybridize with any of the genospecies-specific probes. Other genospecies like *B. valaisiana* or *B. lusitaniae* were not detected. Four ticks which hybridized with the generic probe of *Borrelia* spp. did not hybridize with any of the specific probes of *B. burgdorferi* sensu lato.

Table 2. Results of RLB analysis in different tick species, season of year, and sampling areas^a

	Captured	TAI	Analyzed	<i>A. phagocytophilum</i>	<i>C. burnetii</i>	SFG <i>Rickettsiae</i>	<i>Borrelia</i> <i>spp.</i>	Total pathogens
Tick species								
<i>I. ricinus</i>	1075	20.9	288	16 (5.6) ^a	0	0	5 (1.7)	21 (7.3)
<i>H. punctata</i>	130	2.5	109	1 (0.9)	1 (0.9)	0	3 (2.8)	5 (4.6)
<i>H. inermis</i>	201	3.9	95	0	0	0	0	0
<i>H. concinna</i>	56	1.1	52	2 (3.8)	0	0	0	2 (3.8)
<i>D. reticulatus</i>	99	1.9	97	0	0	48 (49.5)	0	48 (49.5)
<i>R. bursa</i>	51	1.0	50	1 (2.0)	0	0	0	1 (2.0)
Season								
Winter	437	33.5	132	2 (1.5)	0	31 (23.5)	2 (1.5)	35 (26.5)
Autumn	234	22.3	169	4 (2.4)	1 (0.6)	15 (8.9)	2 (1.2)	22 (13.0)
Spring	423	28.2	189	5 (2.6)	0	2 (1.1)	3 (1.7)	10 (5.3)
Summer	521	40.1	201	9 (4.5)	0	0	1 (0.5)	10 (5.0)
Sampling area								
4	125	29.4	54	2 (3.7)	0	12 (22.2)	0	14 (25.9)
7	44	6.9	40	0	0	11 (27.5)	3 (7.5)	14 (35.0)
15	92	13.5	70	0	0	2 (2.9)	1 (1.4)	3 (4.3)
16	35	10.8	34	1 (2.9)	0	0	0	1 (2.9)
18	11	1.7	10	0	0	5 (50.0)	0	5 (50.0)
27	332	61.5	143	9 (6.3)	0	7 (5.3)	0	16 (11.2)
30	251	69.7	117	2 (1.8)	1 (0.9)	1 (0.9)	2 (1.7)	6 (5.1)
38	259	45.0	49	0	0	0	0	0
39	103	23.4	45	3 (6.7)	0	0	0	3 (6.7)
40	363	66.6	129	3 (2.3)	0	10 (7.8)	2 (1.6)	15 (11.6)

^a Figures in parentheses represent the percentages of positive ticks from the total number of ticks analyzed.

Discussion

We used a combination of PCR and RLB to investigate the prevalence of 4 tick-borne bacteria in adult ixodid ticks collected from vegetation in 10 different recreational areas in Northern Spain (Basque Country) between 2003 and 2005. This is the first time that presence of *C. burnetii* and SFG rickettsiae has been studied in questing ticks in this region. Overall, *I. ricinus* was the predominant tick species (66.6% of adults), and in 9 of 10 areas it was the most common adult species, being active throughout the year. This high prevalence of *I. ricinus* is compatible with the wet and mild climate characteristic of the Basque region, which favours survival and development of this tick species. The recorded TAI was slightly higher during the second year, this rising trend being in accordance with the increase in tick density over a decade (1993-2004) previously reported (Barandika y cols. 2006). Although

the dragging technique used is suitable to capture several tick species like *Ixodes* and other exophilic ticks, the efficiency of this sampling technique varies substantially with different tick species and stages. However, draggability approximates human biting propensity, and in this sense, though the abundance index used (TAI) does not necessarily reflect absolute tick abundance, it is epidemiologically important and relevant to human risk assessment.

A. phagocytophilum and SFG rickettsiae infection rates varied substantially among areas and tick species. *Ixodes ricinus* is considered the principal vector of *A. phagocytophilum* in Europe, where this agent has been detected in 9-10% of adult free-living *I. ricinus* ticks (Kocic y cols. 2007, Wielinga y cols. 2006). Similar results (9.5%) were reported for *I. ricinus* questing ticks collected in our region (Barral y cols. 1999), though the primers used also amplified other members of Anaplasmataceae. Here, using a specific probe for *A. phagocytophilum*, prevalence in *I. ricinus* was lower (5.6%), but the percentage of positive areas was higher than in the study by Barral y cols. (1999) (30% vs. 60%). These variations could be ascribed to differences in characteristics of sampling sites concerning animal reservoirs, density of wildlife, and livestock. Although 80% (16/20) of the positive ticks belonged to *I. ricinus* species, *A. phagocytophilum* DNA was also detected in 3 other tick species (*H. punctata*, *H. concinna* and *R. bursa*) confirming previous findings (Merino y cols. 2005) and supporting the hypothetical role of different tick species as vector for this agent. However, studies on vectorial competence are needed to confirm this hypothesis.

Although more than 40 tick species have been shown to be naturally infected with *C. burnetii*, the rate of tick-borne transmission of Q fever in humans is considered to be low; however, ticks may play a significant role in *C. burnetii* transmission among wild vertebrates (Maurin y Raoult 1999). In Northern Spain human, human Q fever is endemic (Maurin y Raoult 1999) and *C. burnetii* is considered an important small-ruminant abortifacient agent (Oporto y cols. 2006). Abortions in Basque sheep flocks occur in autumn, when animals are raised on mountain pastures and heavily exposed to ticks. This is the occasion for infection to occur, either from sheep to tick (ticks get infected when feeding on infected animals) or the other way round (infected ticks may transmit the pathogen to animals). *Coxiella burnetii* has been found in several tick species in Europe (Psaroulaki y cols. 2006, Rehacek y cols. 1994, Smetanova y cols. 2006). In a study carried out recently in Central Spain, a high number of questing ticks (7.7%) were found positive (Toledo 2007), whereas here, *C. burnetii* DNA was only detected in one *H. punctata* tick using the same technique. This low infection rate suggests that in this area animals might carry the infection without the involvement of ticks. Domestic animals are probably the main source for human infection in Northern Spain, and no tick transmission would seem to be involved.

SFG rickettsiae were the most frequently detected agents (6.9% of analyzed ticks), always in *D. reticulatus* ticks. It is noteworthy, that despite being the most abundant tick

species captured (1075 / 1615) and analyzed (280), all *I. ricinus* ticks were negative for the presence of SFG *Rickettsia*. Conversely, *Rickettsia helvetica* and *Rickettsia* sp. IRS3/IRS4 have been detected frequently in *I. ricinus* ticks removed from humans in Castilla-León (Fernández-Soto y cols. 2004), and *R. monacensis*, also transmitted by *I. ricinus*, has been identified in humans in nearby regions (Jado y cols. 2007). Although *R. slovaca* was recently detected in *D. reticulatus* ticks removed from asymptomatic patients in North-Western Spain (Fernández-Soto y cols. 2006b), in this study the only rickettsiae identified in *D. reticulatus* was *Rickettsia* sp. strains RpA4/DnS14. The rate of rickettsial infection observed in this study (49.5%) was clearly higher than that reported by Fernandez-Soto et al. (2006b) in *D. reticulatus* ticks removed from humans in North-Western Spain (10%), but similar to rates reported in other countries in ticks of this species collected from vegetation (Shpynov y cols. 2004) or removed from carcasses of red foxes (*Vulpes vulpes*) (Sreter-Lancz y cols. 2006). In Spain there are few reports on the presence of *Rickettsia* sp. strains RpA4/DnS14 in *D. reticulatus* ticks; however, in other regions of the Iberian Peninsula where *D. marginatus* ticks are abundant, these genotypes are well recognized (Fernández-Soto y cols. 2006b, Marquez 2008, Ortuno y cols. 2007, Oteo y cols. 2006, Toledo y cols. 2009b, Vitorino y cols. 2007). It is noteworthy, that two *D. marginatus* ticks infected by a SFG *Rickettsia* closely related to *Rickettsia* sp. strains RpA4 and DnS14 were removed from two patients from La Rioja (Northern Spain) who developed a syndrome named DEBONEL (*Dermacentor*-borne necrosis erythema lymphadenopathy) (Ibarra y cols. 2006). The high prevalence of *Rickettsia* sp. strains RpA4/DnS14 detected herein in *D. reticulatus*, together with its wide distribution (it was collected in 8 of 10 sampling areas), suggest that these rickettsiae are well established in this region and could represent a risk for human infection.

The prevalence of *B. burgdorferi* in *I. ricinus* detected in this study was clearly lower than that reported previously in this region (Barral y cols. 2002, Gil y cols. 2005), probably due to the method of analysis and the criteria used to select sampling sites. The low infection rate detected might be associated to the scarce number of small mammals positive to *B. burgdorferi* in these sampled areas (Barandika y cols. 2007). Another explanation could be the negative relationships between tick density and tick infection rate associated with the high density of livestock as observed in Ireland (Gray y cols. 1995), since grazing livestock was present in all the sampling areas. The detection of *B. burgdorferi* DNA in *H. punctata* confirmed previous findings in this tick species in Northern Spain (Barral y cols. 2002) and elsewhere (Talleklint 1996), but the vectorial capacity of this tick species remains unknown.

Three of the five *B. burgdorferi* sensu lato genospecies previously identified in the Basque Country were detected in this study: *B. afzelii* and *B. garinii* in *I. ricinus* and *B. burgdorferi* sensu stricto in *H. punctata*. The absence of hybridization with any of the five specific probes

of a *I. ricinus* positive for *B. burgdorferi* sensu lato would suggest that it corresponded to a different genospecies described in Europe (e.g. *B. spielmanii*, *B. miyamotoi*) (Derdakova y cols. 2003a, Foldvari y cols. 2005, Fraenkel y cols. 2002) but not included in this study. In the same manner, the four ticks positive for the 16S rRNA gene *Borrelia* spp. probe but negative for *B. burgdorferi* sensu lato might belong to a different species. Presence of *Borrelia* sp. R57, described in small mammals in the same area, was however also excluded in all ticks analysed (Gil y cols. 2005). Further sequencing studies will therefore be necessary to identify the species.

Our results indicated that presence of DNA of SFG rickettsiae and *A. phagocytophilum* varied between seasons. These variations could be due to the particular seasonal distribution of each tick species; whereas *A. phagocytophilum* and its vector *I. ricinus* were more prevalent in summer, SFG rickettsiae were detected more frequently in autumn and winter, when *D. reticulatus* was most abundant. Therefore, it can be concluded that in this region tick-borne pathogens could be found at any time of the year.

In summary, the results of this study extend the knowledge of the distribution of four zoonotic tick-borne bacteria in questing adult ticks from Northern Spain. Although at low levels, we have shown presence of *B. burgdorferi*, *A. phagocytophilum* and *C. burnetii* in different questing adult tick species. On the other hand, prevalence of SFG rickettsiae was high in *D. reticulatus* ticks collected in this region. The pathogenicity and risk for human infection of these rickettsiae have been suggested (Ibarra y cols. 2006) but remains to be confirmed.

Acknowledgments

This work was conducted under financial support from FEDER, FIS G03/057 and PI051873; This publication was partially funded by EU grant GOCE-2003-010284 EDEN and is catalogued by EDEN Steering Committee as EDEN0099 (www.eden-fp6project.net). The content of this publication are the sole responsibility of the authors and does not necessarily reflect the views of the European Commission.

ARTÍCULO / ESTUDIO 5

Tick-Borne Zoonotic Bacteria in Wild and Domestic Small Mammals in Northern Spain

J.F. Barandika¹, A. Hurtado¹, C. García-Esteban², H. Gil², R. Escudero², M. Barral¹,
I. Jado², R. A. Juste¹, P. Anda² and A. L. García-Pérez¹.

¹ Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Agrario (NEIKER). Sanidad Animal, Bizkaia, Spain.

² Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain

Publicado en:

Applied and Environmental Microbiology
2007, Volume 73, Number 19, pp. 6166-6171

Abstract

The prevalence and diversity of tick-borne zoonotic bacteria (*Borrelia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, *Coxiella burnetii* and spotted fever group rickettsiae) infecting 253 small mammals captured in the Basque Country (Spain) were assessed using PCR and reverse line blot hybridization. Trapping sites were selected around sheep farms (Study 1, 2000 to 2002) and recreational parks (Study 2, 2003 to 2005). The majority of the studied mammals (162) were wood mice (*Apodemus sylvaticus*), but six other different species were also analysed: yellow-necked mice (*Apodemus flavicollis*), shrews (*Crocidura russula* and *Sorex coronatus*), bank voles (*Clethrionomys glareolus*), domestic mice (*Mus domesticus*) and moles (*Talpa europaea*). The results showed an infection rate ranging from 10.7% to 68.8%, depending on the small mammal species. One *C. russula* shrew and one *A. sylvaticus* mouse gave positive reactions for *A. phagocytophilum*, and *C. burnetii* was detected in two domestic mice and one *A. sylvaticus* mouse in a farm. DNA of *Borrelia* spp. was detected in 67 animals (26.5%), most of them presenting positive hybridization with the probe for *Borrelia* sp. strain R57, the new *Borrelia* species previously detected in small mammals in our region. Furthermore, a second PCR and reverse line blot hybridization specific for *B. burgdorferi* sensu lato revealed the presence of *B. afzelii* in 6.3% of *C. glareolus* voles, and 14.3% of *S. coronatus* shrews. All small mammals were negative to spotted fever group rickettsiae. These results highlight the relevance of small mammals as reservoirs of some zoonotic bacteria.

Introduction

Ticks are important vectors of various pathogenic bacteria, protozoa and viruses that cause disease in humans and animals worldwide. Some of these agents, such as *Coxiella burnetii*, are now recognized as important emerging vector-borne pathogens as well as agents of bioterrorism (Azad y Radulovic 2003). *Ehrlichia* species, rickettsiae and some *Borrelia* species have been reported across the world, and have also been associated with disease in animals and humans (Parola y cols. 2005a, Piesman y Gern 2004).

A wide range of mammalian reservoir hosts, including rodents, are involved in the natural cycle of various bacterial diseases. Different species of small mammals, mainly mice (*Apodemus* spp.) and voles (*Microtus* spp. and *Clethrionomys glareolus*), are recognized vertebrate reservoirs of tick-borne bacterial zoonoses such as Lyme disease (borreliosis) and human granulocytic ehrlichiosis, among others. In Europe, several rodent species seem to be the natural reservoirs of *Borrelia burgdorferi* sensu lato (Piesman y Gern 2004), *Anaplasma phagocytophilum* (Bown y cols. 2003, Liz y cols. 2000), and *C. burnetii* (Webster y cols. 1995), but there are few reports on the role of such species as possible reservoirs of

tick-borne zoonotic bacteria in Spain. The role of small mammals in the biological cycle of *B. burgdorferi* sensu lato was recently investigated in areas of Northern Spain where Lyme disease is endemic (Gil y cols. 2005), and a low prevalence of infection was found (0.5%), but a new *Borrelia* sp. (*Borrelia* sp. strain R57), whose clinical and pathogenic importance remains unknown, was widely distributed among small mammals (12.5%). A limited number of small mammals from the same area was also analysed for the presence of DNA of *A. phagocytophilum* but all the specimens were negative (Oporto y cols. 2003). All these results were explained by the low number of *Ixodes* nymphs parasitizing small mammals in this area, with a 1:450 ratio of infestation of nymphs to that of larvae (Gil y cols. 2005). The study area is particularly relevant due to the endemicity of Q fever pneumonia (Montes y cols. 2006) and its proximity to an area where a new species of *Rickettsia* causing human disease, *Rickettsia monacensis*, has recently been identified in a patient (Jado y cols. 2007). However, no data are available regarding presence of *C. burnetii* or *Rickettsia* spp. in small mammals in Spain. All these create an interest in the search for potential reservoirs of such organisms.

PCR-based methods have become widely used as rapid and effective tools for detection and identification of tick-borne pathogens in ticks and animal reservoirs. Increased sensitivity and specificity can be achieved by combining PCR with a specific hybridization by means of reverse line blot (RLB) hybridization, a macroarray that is able to identify mixed infections (Rijpkema y cols. 1995, Schouls y cols. 1999). This study was undertaken to investigate the prevalence of tick-borne pathogens in domestic and wild small mammals in Northern Spain. The main aim of the study was to determine the risk of disease in areas of potential contact between humans and small mammals carrying pathogens. In recreational areas large numbers of human beings might come in contact with ticks and tick-borne pathogens from wildlife. Sheep farms, on the other hand, were selected since sheep are the most abundant livestock species in the area. Peridomestic small mammals were selected to investigate the role of these species as reservoirs of some tick-borne bacteria affecting sheep (*C. burnetii*, *A. phagocytophilum*) that might put at risk professionals living and working around farms. Rapid screening of a selection of bacteria infecting small-mammal tissues was carried out using multiplex PCR, followed by RLB hybridization using genus-specific or species-specific probes. Using this approach, we report herein the infection rates in small mammals for *A. phagocytophilum*, *C. burnetii*, spotted fever group (SFG) rickettsiae, *B. burgdorferi* sensu lato, and *Borrelia* sp. strain R57, with the purpose to provide an assessment of the role of small mammals as reservoir hosts for tick-borne bacteria.

Material and Methods

Study area and small-mammal sampling.

The Basque Country is a 7,200 km² region located in Atlantic northern Spain where ticks are abundant (Barandika y cols. 2006), there is a maritime climate with mild winters, and annual rainfall ranges from 600 to 1500 mm. Livestock, raised at pasture several months a year, is abundant as well as wildlife, which consists mainly of rodents, foxes, badgers, wild boar, roe deer and red deer.

Small mammals were captured between years 2000 and 2005 in two consecutive studies carried out at 15 different sites in the Basque Country. In the first study (study 1), carried out between April 2000 and November 2002, domestic and wild rodents were sampled in areas surrounding five sheep farms and in forested areas nearby. Study 2 started in September 2003 and finished in May 2005, and small mammals were captured in 10 recreational areas where, as previously described (Barandika y cols. 2006), the tick population was abundant.

After the authority's permissions was obtained, Sherman traps (7.6 cm by 8.9 cm by 22.9 cm; Tallahassee, FL) and INRA traps (5 cm by 5 cm by 15 cm, BTS Mechanique, Besançon, France) were used for the live capture of rodents. Captures were carried out throughout the year, but mainly in the spring and autumn months. In study 1, 120 traps (20 Sherman traps placed inside sheep farms and 100 INRA traps outdoors) were set for two consecutive nights, and 100 INRA traps were set overnight in study 2. In study 1, moles were also captured using 25 Pincer traps (Michel Touchard et Fils, Grainville Langannerie, France) per sampling. To compare the abundance of these animals between studies, small-mammal abundance index (SAI) was calculated as follows: $SAI = (SC \times 100) / (T \times N)$ (where SC is the number of small mammals captured, T is the number of traps and N is the number of nights).

Processing of small mammals.

Trapped animals were immediately transported to the laboratory and examined for attached ticks and other ectoparasites. Live captured rodents were anesthetized with ether and ketamine hydrochloride (Imalgene 500; Merial, France) at a dose of 10 mg/kg of body weight intramuscularly and euthanized in a CO₂ chamber. At necropsy, samples from different tissues were collected (ear, urinary bladder, spleen, liver, kidney, lung and brain) and stored at -80°C. Small mammals were classified by external morphological data and skull features (Alvarez y cols. 1986, Blanco 1998, Panzironi y cols. 1993). Collected ticks were identified using taxonomic keys (Gil-Collado y cols. 1979, Manilla 1998, Panzironi y cols. 1993).

DNA extraction and multiplex PCR.

DNA was extracted from pools of tissues and ear samples by using a QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany), with a previous treatment with proteinase K for 3 h. A negative control was included for every 10 samples. The DNA concentration was determined for each sample with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, DE).

DNA was subjected to two multiplex PCR amplifications, one for the detection of *C. burnetii* and *A. phagocytophilum* and a second one for the detection of SFG rickettsiae and *Borrelia* spp. The oligonucleotide sequences of the primers, the gene targets, the concentration of each primer, and the annealing temperature of the PCR are shown in Table 1. Extracted DNA (100 to 200 ng) was used in each PCR.

One amplicon from each of the genes targeted in this study was routinely cloned, sequenced and used as positive control. Briefly, the amplified products were purified with GFX-PCR kit (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), cloned into a pCR4-TOPO vector, and introduced into *Escherichia coli* according to the manufacturer's instructions (TOPO TA Cloning kit for Sequencing; Invitrogen, CA). Recombinant plasmid DNA was purified using FlexiPrep kit (Amersham Biosciences) and subjected to automatic dye-terminator cycle sequencing. The different plasmids were used to calculate the absolute detection limit of the technique. The concentration of each plasmid was calculated spectrophotometrically, and the plasmids were serially diluted in Tris-EDTA buffer to reach concentrations ranging from 10^8 to 1 copies per microliter.

The prevention of cross-contamination and false-positive results was managed by using plugged tips, setting PCRs in a room separate from that used for DNA extraction, and including a negative (water) control in each run.

RLB hybridization.

To increase the detection limit of the PCR assay, PCR amplicons were hybridized to DNA probes specific for *C. burnetii*, *A. phagocytophilum*, *Borrelia* sp. strain R57, SFG rickettsiae, and *Borrelia* spp. by RLB hybridization. The probes, synthesised by MWG Biotech AG (Germany) with a C6 amino linker, were as listed in Table 1. The preparation of RLB membranes and hybridization were carried out as previously described by Gubbels *et al.* (Gubbels y cols. 1999) with the following adaptations: the complete amplification reaction volume (25 μ l) was loaded onto the blotter after dilution with 2 x SSPE-0.1% sodium dodecyl sulphate (1XSSPE is 0.18 NaCl, 10 mM NaH_2PO_4 , and 1 mM EDTA [pH 7.7]) to a total volume of 160 μ l, incubation was carried out at 48°C for 60 min, and washing steps were performed at 40°C. After hybridization, PCR products were stripped from the membrane as

Table 1. Oligonucleotide sequences of primers and probes used in PCR and RLB hybridization for detection and identification of different pathogens.

Target species	Target gene	Primer/probe name	Primer/probe sequence (5' to 3')	Primer/probe concn (μM)	Annealing temp (°C)	Reference
Primers						
<i>C. burnetii</i>	<i>htpAB</i>	Trans 1	TATGTATCCACCGTAGCCAGTC	0.2	63° C	(Willems y cols. 1994)
		Trans 2	biotin-CCCAACAACACCTCCTTATTC			
<i>A. phagocytophilum</i>	<i>msp2</i>	Msp2-3F	CCAGCGTTTAGCAAGATAAGAG	0.4		(Zeidner y cols. 2000)
		Msp2-3R	biotin-GCCCAGTAACAACATCATAAGC			
SFG Rickettsiae	<i>ompA</i>	Rr190.70p	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA	0.4	46° C	(Regnery y cols. 1991)
		Rr190.602n	biotin-AGTGCAGCATTGCTCCCCCT			
<i>Borrelia</i> spp.	16S rRNA	BORF	CGCTGGCAGTGCCTTTAA	0.4		(Gil y cols. 2005)
		16S	biotin-GCGGCTGCTGGCACGTAATTAGC			
<i>B. burgdorferi</i> s.l.	23S-5S rRNA	23SN2	ACCATAGACTCTTATTACTTTGACCA	0.2	57° C	(Rijpkema y cols. 1995)
		5SCB	biotin-GAGAGTAGGTTATTGCCAGGG			
Probes						
<i>C. burnetii</i>	<i>htpAB</i>	<i>C. burnetii</i>	amino-GCAAGAATACGGACTCACGA	2		This study
<i>A. phagocytophilum</i>	<i>msp2</i>	<i>A. phagocytophilum</i>	amino-GGTTACGAGCGCTTCAAGACC	2		This study
<i>Rickettsia</i> spp.	<i>ompA</i>	OmpA-All	amino-GGCAAAAGCTTAACCTTTAAA	2		This study
<i>Borrelia</i> spp.	16S rRNA	<i>Borrelia</i> sp.	amino-GAGGAATAAGCTTTGTAGGAAATGACA	2		(Gil y cols. 2005)
<i>Borrelia</i> sp. R 57	16S rRNA	<i>Borrelia</i> R 57	amino-AGTCATTAAGATGTTTAATG	16		(Gil y cols. 2005)
<i>B. burgdorferi</i> s. l.	23S-5S rRNA	<i>Bb</i> SL	amino-CTTTGACCATATTTTTATCTTCCA	0.3		(Rijpkema y cols. 1995)
<i>B. burgdorferi</i> s. s.	23S-5S rRNA	<i>Bb</i> SS	amino-AACACCAATATTTAAAAAACATAA	0.3		(Rijpkema y cols. 1995)
<i>B. afzelii</i>	23S-5S rRNA	<i>Bb</i> AF	amino-AACATTTAAAAAATAAATTCAAGG	0.3		(Rijpkema y cols. 1995)
<i>B. garinii</i>	23S-5S rRNA	<i>Bb</i> GA	amino-AACATGAACATCTAAAAACATAAA	0.3		(Rijpkema y cols. 1995)
<i>B. valaisiana</i>	23S-5S rRNA	<i>Bb</i> VA	amino-CATTAATAAAAAATAAAAAATAATTTAAGG	0.3		(Rijpkema y cols. 1995)
<i>B. lusitaniae</i>	16S rRNA	<i>Bb</i> LU	amino-TCTATTTTATTTTTATATTTTTTT	0.9		(Gil 2002)

previously described Gubbels *et al.* (1999) and the membrane was rinsed and stored in 20 mM EDTA (pH 8.0) at 4°C until the next hybridization, and reused a maximum of eight times.

previously described Gubbels *et al.* (1999) and the membrane was rinsed and stored in 20 mM EDTA (pH 8.0) at 4°C until the next hybridization, and reused a maximum of eight times.

To exclude false-positive results, negative controls included during DNA extraction and PCR amplification were also subjected to RLB hybridization. The specificities of the probes were tested against those of the previously constructed plasmids, which were also used as positive controls in each assay.

Identification of species of Borrelia.

Samples positive to *Borrelia* spp. by multiplex PCR (16S rRNA gene) and RLB hybridization were analyzed using a PCR specific for *B. burgdorferi* sensu lato, targeting the 5S-23S rRNA intergenic spacer, followed by RLB hybridization with specific probes described previously (Gil 2002, Gil y cols. 2005, Rijpkema y cols. 1995, Schouls y cols. 1999) for *B. burgdorferi* sensu lato, *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. valaisiana* and *B. lusitaniae* (Table 1). RLB hybridization was performed as previously described (Gil y cols. 2005).

Statistical analysis.

Prevalence of each bacteria species was analysed according to independent variables, such as host species, study (study 1 and study 2), and date of sampling (season and year), by chi-square or Fisher's exact tests by using the SAS statistical package (version 8.0; SAS Institute Inc, Cary, NC). Significance was set at a *P* value of <0.05. Different logistic regression models including the same variables were performed on the data of the only agent (*Borrelia* sp. strain R57) that had a large enough set of positive results, and the model that better fitted the rates of infections was used.

Results

Small mammals captured and tick infestation.

A total of 6,580 trap nights were placed over the two studies (3,680 in study 1 and 2,900 in study 2), and 334 small mammals belonging to seven species were trapped (186 in study 1 and 148 in study 2) with a global SAI of 5.1 (5.05 for study 1 and 5.10 for study 2). During study 1, 450 pincer traps were also placed and 30 moles (*Talpa* spp.) were captured. *A. sylvaticus* was the most frequently found species (69.8%) and the most ubiquitous in both studies.

One hundred and twenty four of the 334 animals captured harboured at least one tick, with a maximum of 202 ticks observed in one *A. sylvaticus* mouse. The total amount of

collected ticks was 1,961, accounting for 1,934 larvae (98.6 %), 26 nymphs (1.3 %) and one adult (an *Ixodes acuminatus* female). The percentage of small mammals parasitized and the number of ticks collected varied between studies and the individual tick infestation followed a Poisson distribution. Whereas in study 1 the percentage of animals infested with ticks was low (9.1%), in study 2, 1,883 larvae were collected from 72.3% of the captured animals. Very few nymphs were found over the study periods and all of them were collected in study 2, and consisted of 26 nymphs that were detached from 10 *A. sylvaticus* mice and one *C. glareolus* vole, giving a 1:72 average ratio of infestation nymphs to that of larvae.

Ixodes ricinus was the most abundant tick species found, corresponding to 89.3% of larvae (100% in study 1 and 89.1% in study 2) and 96.2% of nymphs (all from study 2) collected. Three other species (*Ixodes trianguliceps*, *Rhipicephalus turanicus* and *Haemaphysalis concinna*) were sporadically collected. *I. ricinus* larval infestation varied strongly among captured small mammal species. *A. sylvaticus* was the most parasitized species with 7.3 larvae/animal, followed by *C. glareolus* with 1.1 larvae/animal. Other small mammal species harboured very few larvae, i.e., *Apodemus flavicollis* with 0.7, *Sorex coronatus* with 0.5 and *Crocidura russula* with 0.2, whereas *Mus domesticus* and *Talpa europaea* had none.

Tick-borne bacteria infection in small mammals.

All the nucleotide probes designed for hybridization assays gave positive results with their corresponding positive controls and did not show any cross-reaction. The sensitivity of the hybridization assay was assessed by RLB hybridization processing serially diluted PCR products and found to be 1 or 2 orders of magnitude higher than that calculated for the multiplex PCR only. The absolute limit of detection for the combined PCR and subsequent RLB hybridization procedures using gene clones as templates was between 6 and 60 gene molecules for the different multiplex PCR amplifications.

Pools of tissues from 253 animals (127 from study 1 and 126 from study 2) belonging to *A. sylvaticus* (162; 64%) and six other species, were subjected to the two multiplex PCRs described above and RLB hybridization. The prevalences of infection were different between animal species (Table 2). The most frequently infected species was *C. glareolus*, with 68.8% of the studied specimens (11/16) harboring DNA from some of the bacteria investigated, followed by *A. sylvaticus* (33.3 %), *C. russula* (16.7 %), *S. coronatus* (14.3 %) and *M. domesticus* (10.7 %). All the moles and *A. flavicollis* were negative, though only three of the latter were examined. The prevalences were similar between studies (Table 2), with 26.0 % of the analyzed animals being positives in study 1 and 30.1 % in study 2.

Borrelia spp. DNA was detected in 67 (26.5 %) animals, and most of these positive animals also hybridized with the specific probe for *Borrelia* sp. strain R57 (62/67). A total of

37.5 % of small mammals trapped in spring were positive, whereas the prevalences among summer, autumn and winter captures was 20.0, 15.0 and 21.1%, respectively. Statistical differences were observed only between spring and autumn prevalences ($P < 0.05$). Infection rates varied significantly among species ($P < 0.0001$), from 3.6 % in *M. domesticus* to 68.7 % in *C. glareolus*, while none of the *T. europaea*, *A. flavicollis* and *C. russula* strains analyzed harboured DNA of *Borrelia* spp. The best logistic regression model included study, host species, season, and *Ixodes* larval number and showed that *C. glareolus* had an odds ratio to be infected that was 5.62 (95% confidence interval [CI], 1.63 to 19.33;) for *A. sylvaticus*, 29.22 (95% CI, 5.43 to 157.10) for *M. domesticus*, and 16.95 (95% CI, 2.54 to 113.13) for *S. coronatus*. Also, the odds ratio was 3.37 (95% CI, 1.62 to 6.99) higher in spring than in fall. Five animals hybridized with the generic probe for *Borrelia* spp. but not with *Borrelia* sp. strain R57 after RLB analysis targeting the 16S rRNA gene. To check whether *B. burgdorferi* sensu lato could be involved in these five animals and in mixed infections with *Borrelia* sp. strain R57, all *Borrelia*-positives samples were subjected to 5S-23S rRNA RLB hybridization. *B. burgdorferi* sensu lato was detected in two *S. coronatus* (14.3 %) and one *C. glareolus* (6.3%), and *B. afzelii* was the genospecies identified. In one animal (*C. glareolus*), *B. afzelii* was detected in a mixed infection with *Borrelia* sp. strain R57. Other genospecies such as *B. garinii*, *B. valaisiana*, *B. lusitaniae* and *B. burgdorferi* sensu stricto were not detected. Three animals positive for *Borrelia* spp. did not hybridize with any of the specific probes.

Two domestic mice (*M. domesticus*) captured in spring and winter in 2000 in the premises of a sheep farm (study 1) had positive hybridization with the *C. burnetii* probe. The remaining captures of that period were negative for *C. burnetii* (seven *A. sylvaticus* mice, two *C. glareolus* voles, one *A. flavicollis* mouse and one *S. coronatus* shrew). In the spring of 2001, one of the seven *A. sylvaticus* mice captured in a forest area near the same farm was also positive, whereas other small mammals trapped in this season (five *M. domesticus* mice and two *C. glareolus* voles) were negative. These results indicate that 28.6% of domestic mice (*M. domesticus*) and a 7.1% of wood mice (*A. sylvaticus*) were infected in this farm. *A. phagocytophilum* was detected in one *C. russula* shrew captured in study 1 and one *A. sylvaticus* mouse from study 2, which represent 16.7 % and 0.6% infection rates for these species, respectively, and an overall infection of 0.8%. *Rickettsia* was the only pathogen included in this study that was never detected in any of the small mammals tested. Coinfection with more than one pathogen was found in two small mammal species and accounted for 0.8% (2/253) of the animals analyzed (Table 2). The combinations were those formed by *B. afzelii* and *Borrelia* sp. strain R57 in one *C. glareolus* vole and by *C. burnetii* and *Borrelia* sp. strain R57 in one *A. sylvaticus* mouse.

Table 2. Results of RLB analysis for the two studies and the different species of small mammals.

<i>No. (%) of infected animals</i>										
Infesting pathogen(s)	Study 1	Study 2	Total	<i>A. sylvaticus</i>	<i>A. flavicollis</i>	<i>C. glareolus</i>	<i>S. coronatus</i>	<i>C. russula</i>	<i>M. domesticus</i>	<i>T. europaea</i>
	(186/127) ^a	(148/126)	(334/253)	(233/162)	(3/3)	(17/16)	(17/14)	(6/6)	(28/28)	(30/24)
RLB hybridization results										
<i>C. burnetii</i>	2 (1.6)	0	2 (0.8)	0	0	0	0	0	2 (7.1)	0
<i>A. phagocytophilum</i>	1 (0.8)	1 (0.8)	2 (0.8)	1 (0.6)	0	0	0	1 (16.7)	0	0
<i>Borrelia</i> spp.	1 (0.8)	2 (1.6)	3 (1.2)	3 (1.9)	0	0	0	0	0	0
<i>Borrelia</i> sp. strain R 57	27 (21.3)	33 (26.2)	60 (23.7)	49 (30.2)	0	10 (62.5)	0	0	1 (3.6)	0
<i>B. afzelii</i>	1 (0.8)	1 (0.8)	2 (0.8)	0	0	0	2 (14.3)	0	0	0
<i>B. afzelii</i> / <i>Borrelia</i> sp. strain R57	0	1 (0.8)	1 (0.4)	0	0	1 (6.3)	0	0	0	0
<i>C. burnetii</i> / <i>Borrelia</i> sp. strain R57	1 (0.8)	0	1 (0.4)	1 (0.6)	0	0	0	0	0	0
Total single and mixed infections	33 (26.0)	38 (30.2)	71 (28.1)	54 (33.3)	0	11 (68.8)	2 (14.3)	1 (16.7)	3 (10.7)	0
Results by genus:										
<i>C. burnetii</i>	3 (2.4)	0	3 (1.2)	1 (0.6)	0	0	0	0	2 (7.1)	0
<i>A. phagocytophilum</i>	1 (0.8)	1 (0.8)	2 (0.8)	1 (0.6)	0	0	0	1 (16.7)	0	0
<i>Borrelia</i> spp.	30 (23.6)	37 (29.4)	67 (26.5)	53 (32.7)	0	11 (68.8)	2 (14.3)	0	1 (3.6)	0

^a The first number in parentheses represents the number of animals captured, and the second number represents the number of animals analyzed.

Discussion

To investigate the role of small mammals as potential reservoir hosts for tick-borne bacterial zoonoses in northern Spain, small mammals were captured between years 2000 and 2005 in two consecutive studies. Almost half of the captured mammals harboured at least one attached tick, but the number of parasitized animals and ticks collected was higher in study 2 than in study 1, probably because sampling sites in study 2 were selected on the basis of tick abundance, whereas in study 1, sampling sites were nearby lowland sheep farms where the presence of ticks was normally scarce. *I. ricinus* was the predominant tick species (91.6 % of larvae and 79.4 % of nymphs) feeding on small mammals. This observation is consistent with the tick collection rates obtained by blanket dragging the vegetation in this region (Barandika y cols. 2006). *A. sylvaticus* was clearly the most abundant species trapped over the two studies, indicating that this species is predominant in woodland areas from northern Spain, which is in agreement with reports from La Rioja, a neighbouring region in North-Central Spain (Estrada-Pena y cols. 2005). *A. sylvaticus* was also the rodent species most heavily infested with *I. ricinus* larvae and nymphs, in agreement with other reports in Europe (Gil y cols. 2005, Gray y cols. 1999, Kurtenbach y cols. 1995). The different tick infection levels observed for different animal species (*C. glareolus* versus *A. sylvaticus*), were explained by acquired immunity to *I. ricinus* larvae after repeated infestations in *C. glareolus* (Dizij y Kurtenbach 1995).

The mean number of *I. ricinus* larvae in *A. sylvaticus* in both studies (7.3) is clearly lower than in studies from Sweden (49.1) (Talleklint y Jaenson 1993) but higher than in several European studies, e.g., 1.7 in Switzerland (Liz y cols. 2000), 2.0 in La Rioja, Spain (Estrada-Pena y cols. 2005), or 2.1 in Ireland (Gray y cols. 1999). In addition, few nymphs (26 nymphs) were collected providing a 72:1 overall ratio of larvae to nymphs. This low nymphal infestation may limit the capacity of transmission of tick-borne bacteria to small mammals. This could be especially true when transovarial transmission of pathogens in ticks does not exist or occurs at very low level and infection must be transmitted in the course of feeding by infected nymphs, as is the case for *B. burgdorferi*. However, the observed 72:1 ratio of larvae to nymphs was markedly lower than the one reported by Gil et al. (2005) in the same region (450:1), but the prevalence of *B. burgdorferi* sensu lato in small mammals was higher (0.8% in study 1 and 1.6% in study 2) than in the former study (0.5%), suggesting an increase in nymphal infestation in recent years. Interestingly, this is the first report of *B. afzelii* infection of small mammals in Spain and the first time that *S. coronatus* has been involved as reservoir of Lyme borreliosis. The prevalence values of *B. afzelii* infection found in *S. coronatus* (14.3%) and *C. glareolus* (6.3%) were markedly lower than those found in shrews and rodents in Central Europe (Humair y cols. 1993, Khanakah y cols. 2006, Zore y cols. 1999). In any case, our results confirm reports by other groups that propose small

mammals as reservoirs of *B. afzelii* (Hanincova y cols. 2003, Humair y cols. 1995). Despite being the most abundant species captured and analyzed, none of the *A. sylvaticus* specimens was positive to *B. burgdorferi* sensu lato, suggesting its low contribution in the transmission of these spirochetes to subadult tick stages. These findings are in accordance with previous studies that found lower number of ticks and higher infection prevalence in bank voles than in *Apodemus* mice (Kurtenbach y cols. 1995, Michalik y cols. 2003). The absence of *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* and *B. valaisiana* in the analysed small mammals contrasts with the results reported for questing ticks from the vegetation in our region, where *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. garinii* and *B. valaisiana* and not *B. afzelii* are the most prevalent genospecies (Barral y cols. 2002, Escudero y cols. 2000, Gil y cols. 2005). Hence, the main reservoir hosts for *B. burgdorferi* sensu lato in northern Spain remain unknown, and probably other mammal species, lizards or birds may play a major role in the maintenance of this spirochete in the natural environment.

The novel *Borrelia* sp. strain R57, a spirochete closely related to the genus *Borrelia* but forming a clade separate from that of the Lyme disease agent and relapsing fever organisms (Gil y cols. 2005), was widely distributed in rodents and shrews, both in sheep farms boundaries (22.1%) and in recreational parks (27.8%). Especially noteworthy were the detection of *Borrelia* sp. strain R57 in a domestic mouse and its high prevalence in bank voles (68.8%). These two species of small mammals and most of the animals captured in study 1 had low tick infestation levels, suggesting that *Borrelia* sp. strain R57 might be transmitted by ectoparasites other than ticks. This was already proposed by Gil et al. (2005), who found that all the ticks collected from *Borrelia* sp. strain R57-positive small mammals were negative. The overall prevalence of *Borrelia* sp. strain R57 obtained in this study was two times higher than that previously reported by Gil et al. (2005) for regions in Northern Spain where Lyme disease is endemic (Gil y cols. 2005). The only methodological difference among both studies was probe concentration, which was much higher in the present study (16 versus. 0.4 μ M), thus increasing the sensitivity of the assay. Interestingly, *Borrelia* sp. strain R57 and *B. afzelii*, the only genospecies of *B. burgdorferi* found in northern Spain, were found as a mixed infection in a *C. glareolus* specimen, which suggest that an exclusion phenomenon does not exist between these two species, although the influence of such possibility of the lack of distribution of other *Borrelia* genospecies should be further investigated.

In the United States, rodents are implicated as natural reservoirs for *A. phagocytophilum* (Walls y cols. 1997). In Europe, this pathogen has been detected in several species of rodents such as *A. flavicollis* (Liz y cols. 2000, Smetanova y cols. 2006), *Apodemus agrarius*, *Rattus rattus* (Christova y Gladnishka 2005), *C. glareolus*, *A. sylvaticus* (Liz y cols. 2000) and shrews (*Sorex araneus*) (Liz y cols. 2000), but their role as reservoir is

not clear. In our area, this agent has been associated with ovine and bovine abortion in several mountainous areas (García-Pérez y cols. 2003, Juste y cols. 1989) and in roe deer (Oporto y cols. 2003), but it was not detected among a small number of small mammals tested, probably due to the relatively low number of nymphs found infesting them (Oporto y cols. 2003). In the present study, we detected *A. phagocytophilum* in *A. sylvaticus* (0.6%) and *C. russula* (16.7%). Here, the relatively higher proportion of nymphs observed would explain the higher prevalence in a manner similar to that described above for *B. burgdorferi*. Also interesting was the detection of *A. phagocytophilum* in *C. russula*, since this is the first time that this shrew species is involved as a possible reservoir. Nevertheless, the overall prevalence (0.8 %) found in this study is clearly lower than in Bulgaria (7.7%) (Christova y Gladnishka 2005) and in Switzerland (8 to 10%) (Liz y cols. 2000), where rodents seem to represent important reservoirs for this agent.

C. burnetii has a worldwide distribution, and many wild and domestic mammals (mainly sheep, cattle and goats), birds and arthropods such as ticks are considered their reservoirs. However, domestic ruminants represent the most frequent source of human infection. The disease occurs throughout Spain, and the incidence of its respiratory manifestations is especially high in our area (Basque Country) (Montes y cols. 2006), where the largest series of Q fever pneumonia in Europe have been reported (Maurin y Raoult 1999). Furthermore, this agent has a high importance as an abortifacient agent in sheep flocks in Northern Spain (Oporto y cols. 2006). There are several serological studies that implicate small mammals in the wild and domestic cycle of Q fever (Literak 21995, Riemann y cols. 1979, Webster y cols. 1995), but very few studies demonstrating the presence of *C. burnetii* DNA in small mammals by molecular techniques (Smetanova y cols. 2006). Therefore, the molecular detection of *C. burnetii* DNA in *A. sylvaticus* (0.6%) and *M. domesticus* (7.1%) captured in a sheep farm with previous reports of abortion (P. Gabiria, personal communication) is an interesting finding. These results suggest that mice would have acquired the infection by direct contact with infected sheep or with sheep fetuses or placentae inside the farm or in the pasture and that in the study region, *C. burnetii* develops in a peridomestic cycle rather than in a wild cycle and associated with infected flocks. Consequently, the risk of transmission to humans is mainly associated with domestic ruminants, and control and surveillance programs of *C. burnetii* in the animal reservoir environment are therefore needed to avoid human infection.

Ixodidae ticks may act as vectors, reservoirs, and amplifiers of SFG rickettsiae (Parola y cols. 2005b), and small rodents have been shown to be susceptible to infection by several *Rickettsia* species (Rehacek y cols. 1992). However, the DNA of the SFG rickettsiae was not detected in any of the animals analyzed in this study, suggesting that these animals are not involved as reservoirs of these pathogens in this area. This is in accordance with

available data on the scarce number of *Rickettsia*-positive tick specimens in the same areas (J.F. Barandika, unpublished data) and with the low incidence of human rickettsiosis in the studied area (<http://www.osasun.ejgv.euskadi.net>).

In summary, a better knowledge of the wild and peridomestic cycle of tick-borne bacteria has been achieved and questions have been raised concerning the ecology of these zoonotic organisms. The complex cycle of these agents and the variations that could suffer over time suggest the need for continuous environmental surveillance to detect variations and prevent risks for transmission to humans.

Acknowledgments

This work was conducted under financial support from FEDER, FIS G03/057 and PI051873; INIA RTA02-001, and from the Department of Agriculture and Fisheries and Food of the Basque Government. We thank the EDEN Sixth Framework EU project (contract ref.: 010284-2) for providing resources for ongoing work and an expert tick and TBD forum for discussion.

IV. RESUMEN DE LOS RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para proceder a la captura de las garrapatas exófilas presentes en la vegetación y que han dado lugar a los estudios presentados en esta Tesis Doctoral, se empleó la técnica del arrastre de la manta. Los motivos que llevaron a esta elección fueron su sencillez y su estandarizabilidad, la cual permitió comparar los resultados obtenidos entre diferentes áreas geográficas (Estudio 1).

Las técnicas de muestreo de garrapatas ixódidas se dividen en cuatro categorías principales: el método del arrastre de la manta, el empleo de trampas de dióxido de carbono, el método de caminar por la vegetación recogiendo los ixódidos sobre la ropa de la persona que realiza el muestreo y la recogida de garrapatas enganchadas en la piel de los hospedadores (Ginsberg y Ewing 1989, Gray 1985b). Cada uno de los métodos tiene sus ventajas e inconvenientes, pero cuando se desea estudiar la prevalencia de patógenos en las garrapatas, se debe escoger alguno de los métodos que capturan garrapatas directamente de la vegetación, ya que si éstas proceden de los animales, no se sabe si los patógenos detectados pertenecían a las garrapatas o al propio hospedador (Ginsberg y Ewing 1989). En cuanto a las trampas de CO₂, algunos estudios han demostrado que la eficiencia de captura para determinadas especies de garrapatas es mayor que con el arrastre de la manta o la recogida sobre la ropa de las personas (Schulze y cols. 1997, Solberg y cols. 1992). Además, esta técnica permite capturar garrapatas en zonas de gran densidad de vegetación y permite realizar muestreos prolongados en el tiempo (varios días) (Ginsberg y Ewing 1989, Gray 1985b). Sin embargo, algunas especies de garrapatas, entre ellas *I. ricinus*, tienen una reducida capacidad de movimiento horizontal (Falco y Fish 1991, Gray 1985b) por lo que sería necesario emplear numerosas trampas para que el muestreo fuera efectivo, con lo que se incrementarían los problemas logísticos (coste de las trampas, disponibilidad de la fuente de CO₂, transporte y almacén) asociados al uso de estas trampas (Schulze y cols. 1997). Por otro lado, los resultados obtenidos con esta técnica son difíciles de comparar, ya que factores ambientales como la temperatura y el viento, y el nivel de CO₂ emitido pueden influir en el grado de atracción de las trampas (Gray 1985b, Schulze y cols. 1997).

Cuando uno de los objetivos de los muestreos es evaluar las poblaciones de garrapatas a lo largo del tiempo, generalmente se emplea el método del arrastre de la manta o el de la recogida directa sobre la persona, por tratarse de técnicas fácilmente estandarizables (duración, distancia, superficie) (Ginsberg y Ewing 1989). No obstante, el método de la recogida directa sobre la ropa de la persona está sujeto a ciertos sesgos inherentes a la propia técnica, como por ejemplo las características del tejido de la ropa, la superficie de contacto del operario o la diferente capacidad de atracción hacia las garrapatas propia de cada persona (Ginsberg y Ewing 1989, Vassallo y cols. 2000). Además esta técnica no resulta eficaz para capturar los ixódidos que se hallan a ras del suelo, ya que la

ropa del operario no contactará adecuadamente con la superficie. La elección del arrastre de la manta solventa la mayoría de los problemas anteriormente citados, sin embargo, también presenta algunos inconvenientes que debemos conocer antes de iniciar los muestreos. Es un método poco eficaz cuando la vegetación, principalmente arbustiva, es muy densa, ya que la manta solo contactará con la parte superior de la misma, capturando únicamente las garrapatas que estén en la superficie (Carroll y Schmidtman 1992, Ginsberg y Ewing 1989, Gray 1985b, Schulze y cols. 1997). Otro aspecto que debemos tener en cuenta es la pérdida de los ejemplares enganchados en la manta por el efecto de arrastre de la vegetación, por lo que podemos estar subestimando la abundancia de garrapatas (Li y Dunley 1998, Schulze y Jordan 2001). Este efecto es mayor cuando la vegetación es más densa y rugosa, por lo que es necesario recoger las garrapatas de la manta más frecuentemente, cada 10 m cuando la vegetación es densa y cada 20 m cuando es escasa (Schulze y Jordan 2001). Relacionada también con la vegetación está la distancia o superficie que se debe de muestrear para calcular de forma adecuada la abundancia de ixódidos de una zona. De esta forma, cuando la composición vegetal del área de estudio es homogénea, no es necesario muestrear una gran superficie (Vassallo y cols. 2000); estos autores, proponen que en el caso de las ninfas de *I. ricinus*, es suficiente con realizar cinco subtransectos de 10 m². En definitiva, el arrastre de la manta, es utilizado frecuentemente en la investigación de las garrapatas, por ser un método sencillo y adecuado para recoger garrapatas que se hallan encaramadas en la vegetación (Tsunoda y cols. 2004).

La técnica del arrastre de la manta ya fue empleada en estudios previos realizados en la CAPV (Barral y cols. 1993, Gil 2002), capturándose entonces un total de 12 especies diferentes de ixódidos. En los estudios que forman parte del presente trabajo se identificaron 8 especies: *I. ricinus*, *I. frontalis*, *H. punctata*, *H. inermis*, *H. concinna*, *D. reticulatus*, *D. marginatus* y *R. bursa*. En consonancia con los datos obtenidos por Gil (2002), *I. ricinus* fue la especie más abundante en todas las zonas muestreadas a lo largo de los cinco años de muestreos, tanto entre los adultos como entre los estadios inmaduros. Sin embargo, los datos obtenidos por Barral y cols. (1993) una década antes mostraron, para el estadio adulto, una mayor abundancia y distribución de *H. punctata*. Es probable que esta diferencia pudiera deberse en parte a que en aquel estudio algunos de los puntos de muestreo estaban situados en comarcas de la mitad sur de la provincia de Álava, cuyas características climatológicas, con un menor régimen de precipitaciones, y de vegetación, de tipo mediterráneo, son poco favorables para *I. ricinus* y adecuadas para una especie más xerófila como *H. punctata* (Cotty y cols. 1986, Garben y cols. 1981, Nosek 1971b). No obstante, el predominio de *H. punctata*, entre los ejemplares adultos, tuvo lugar también en la mayoría de las comarcas naturales donde coincidieron los muestreos de ambos estudios.

La mayor presencia de *I. ricinus* genera también un mayor riesgo de transmisión de enfermedades para el hombre, puesto que este artrópodo es reconocido vector de un gran número de patógenos zoonóticos.

Otro resultado destacable del presente estudio fue el hallazgo de una población estable de *H. concinna* en una de las zonas de muestreo situada en el norte de la provincia de Álava (Parque Natural del Gorbea). Los muestreos realizados a lo largo de dos años en esta área, permitieron capturar ejemplares adultos de forma regular, principalmente durante los meses de verano. *H. concinna*, es una garrapata ampliamente distribuida en los bosques caducifolios y mixtos, generalmente en zonas húmedas (orillas de ríos y lagos) de la Eurasia templada, desde el océano Atlántico hasta las islas del mar de Japón (Lebedeva y Korenberg 1981, Nosek 1972). Estos ixódidos parasitan a muchas especies de mamíferos, aves y reptiles (Lebedeva y Korenberg 1981, Nosek 1972). Los individuos adultos se alimentan principalmente en artiodáctilos y carnívoros domésticos y silvestres, en erizos y en lagomorfos; las ninfas en numerosas especies de aves, roedores e insectívoros, en algunos artiodáctilos como el corzo y el ciervo, en lagomorfos y en lagartos; mientras que las larvas tienen como principales hospedadores a los insectívoros, roedores y lagomorfos, aves y los lagartos (Nosek 1971a). Este amplio rango de hospedadores ha podido contribuir a la aparición de esta población en una nueva distribución, ya que pudo ser introducida a través de animales parasitados, como el ganado doméstico (garrapatas adultas) o aves migratorias (estadios inmaduros), y que encontraron un biotopo adecuado para su desarrollo. Por lo tanto, el hallazgo de una población bien desarrollada de esta especie de ixódido tiene una gran importancia tanto desde el punto de vista de la salud pública como de la animal, puesto que a las especies de garrapatas “autóctonas” existentes, ahora hay que añadir una nueva especie de reconocido poder vector de numerosas enfermedades (Nosek 1971a, Shpynov y cols. 2006). Otros hallazgos de esta especie de garrapata en otras dos zonas de Vizcaya, un macho de *H. concinna* recogido en una zona situada al oeste de la provincia (Gil 2002) y otro ejemplar adulto capturado durante este trabajo en una zona próxima al Parque Natural del Gorbea, deben considerarse hallazgos ocasionales y probablemente no se traten de poblaciones estables. No obstante, no habría que descartar que en otras áreas que reúnan unas condiciones similares al del punto de muestro del Parque Natural del Gorbea (bosques de robles y mixtos de coníferas y robles, próximos a un río) puedan haber prosperado otras poblaciones.

H. inermis constituyó la segunda especie más abundante, entre los adultos, encontrada a lo largo de este trabajo, mostrando una actividad marcadamente estacional (invierno-primavera). Actualmente, *H. inermis* es considerada como una especie emergente, habiéndose encontrado en la mayoría de los países europeos, así como en el este y sur de Asia (Hornok y Farkas 2009); sin embargo, históricamente ha sido una especie a la que se

ha prestado poca atención (Pérez-Eid y cols. 1993), por lo que el conocimiento existente es bastante escaso. En España, no fue descrita hasta 1993 (Barral y cols. 1993), siendo en ese momento la tercera especie más numerosa entre los individuos adultos capturados en la vegetación de la CAPV. No es de extrañar su abundancia en esta región, puesto que su presencia en otros países ha sido descrita principalmente en bosques con una vegetación abundante, localizados en zonas con una climatología de tipo atlántico cálido o templado (Hornok y Farkas 2009, Pérez-Eid y cols. 1993), características encontradas frecuentemente en el País Vasco. Aun cuando tradicionalmente *H. inermis* no ha destacado por su papel como vector de enfermedades, hallazgos recientes podrían convertirlo en un nuevo y significativo vector de rickettsias patógenas para el hombre. Así, podríamos destacar la detección en España de *R. aeschlimannii* en el 16,7% de los ejemplares analizados procedentes de La Rioja (Portillo y cols. 2008), y de *R. helvetica* en el 98,5% de estas garrapatas capturadas en Hungría (Hornok y cols. 2010).

De la especie *D. reticulatus*, al igual que sucedió con *D. marginatus* y *R. bursa*, solo se capturaron ejemplares adultos. No es de extrañar este hecho, ya que se trata, al igual que *H. inermis*, de especies cuyos estadios inmaduros tienen un carácter endófilo, desarrollando su actividad en las cuevas y/o madrigueras de sus hospedadores, por lo que el método de captura de garrapatas empleado en este estudio no permitió su detección. *D. reticulatus*, especie de carácter hidrófilo y asociada a climas fríos o templados, se encontró regularmente distribuida a lo largo de toda la CAPV, mostrando principalmente su actividad entre los meses de octubre y abril. Al contrario que esta última especie, en nuestra región *R. bursa* mostró preferencia por meses más calidos (mayo-julio), sin embargo, no fue una especie abundante, estando ausente en varias de las zonas muestreadas. En cuanto a *D. marginatus*, su presencia en el presente trabajo puede considerarse meramente testimonial, puesto que únicamente fueron identificados dos ejemplares en una de las zonas de muestreo. Este hallazgo fue similar al obtenido por Barral y cols. (1993), por lo que cabría pensar que sus poblaciones están mínimamente desarrolladas en las zonas estudiadas, con unas densidades muy bajas.

Por último también se encontró de forma ocasional algún ejemplar de la especie *I. frontalis*. Ésta, es una especie de carácter totalmente endófilo que parásita a las aves, por lo que la captura de estos individuos en la vegetación podría considerarse como algo "accidental".

En el transcurso del Estudio 1, se compararon los datos de capturas obtenidos durante dos años de muestreos mensuales (marzo de 2003 – abril de 2005), utilizando similar metodología (arrastre de la manta) en dos regiones españolas, la CAPV (10 zonas) y la zona centro peninsular (7 zonas en la CAM y 1 en la CACM, en la provincia de Toledo). En

este estudio se muestra de forma descriptiva los resultados obtenidos (especies y abundancia) con el método del manto, así como su validez como técnica de muestreo en dos zonas con características geográficas, climatológicas y de vegetación bien diferenciadas.

La climatología del País Vasco es de tipo marítimo, caracterizado por inviernos templados y veranos no excesivamente calurosos, y con precipitaciones abundantes (1200-2600 mm) repartidas a lo largo de casi todo el año. En el centro de la península la climatología es de tipo mediterráneo continental, siendo los inviernos fríos y los veranos calurosos, y con precipitación baja (400 mm) y claramente estacional.

Con todo ello, el clima del País Vasco favorece la aparición de una vegetación arbustiva y herbácea abundante a lo largo de casi todo el año, que junto a las elevadas precipitaciones, ayudan a mantener una humedad relativa ambiental elevada cerca del suelo, adecuada para el desarrollo de especies de garrapatas hidrófilas. Así, hemos citado anteriormente que las especies predominantes en esta región son *I. ricinus*, *H. inermis*, *H. punctata*, *H. concinna* y *D. reticulatus*, especies todas ellas que requieren un grado de humedad bastante elevado para su supervivencia. Como era de esperar por la climatología propia de la zona central, las especies de ixódidos predominantes fueron aquellas que tienen un carácter más xerófilo y termófilo, correspondiendo la gran mayoría (97%) de los ejemplares adultos capturados a las especies *H. lusitanicum* (85.5 %) y *D. marginatum* (11.6 %). Aun cuando se identificó algún ejemplar de *I. ricinus* (8) y de *H. punctata* (1), principalmente en la zona norte de la CAM donde las precipitaciones son más abundantes, podría considerarse que las especies mesófilas e hidrófilas se hallan prácticamente ausentes de estas zonas del centro peninsular. Cabe destacar la gran cantidad de *H. lusitanicum* capturados en la vegetación con el método del arrastre de la manta, ya que como se mencionaba con anterioridad en este mismo apartado, este método no se considera adecuado para la captura de garrapatas “cazadoras”. Estas garrapatas suelen permanecer escondidas en el suelo y cuando detectan la presencia de un posible hospedador avanzan rápidamente en su busca, por lo que para que se obtuviera este éxito de capturas probablemente la densidad de esta especie de garrapatas en estas áreas sea muy elevada.

La presencia de ganado doméstico fue habitual en las zonas de muestreo, predominando el vacuno, equino y ovino en el País Vasco y en Madrid, y el porcino en Toledo. La fauna silvestre también estuvo presente en todas las áreas, aunque mostrando una gran variabilidad de especies entre ambas regiones. En el País Vasco los cérvidos, principalmente corzos, jabalíes, zorros y tejones aparecieron distribuidos por todas las áreas, mientras que en la zona central fueron los conejos la especie predominante (en 7 áreas). En esta región, solamente se constató la presencia de cérvidos en tres de los puntos

y de jabalíes y zorros en dos, no observándose en ninguna zona la presencia de tejones. El disponer de información sobre las especies de fauna silvestre y su densidad aproximada en una zona es muy importante para el estudio de las poblaciones de ixódidos, ya que van a actuar como sus posibles hospedadores. Las garrapatas adultas se alimentan principalmente sobre grandes vertebrados mientras que los estadios inmaduros lo hacen prácticamente sobre cualquier especie de vertebrado, incluidos aves y reptiles (Estrada-Pena y cols. 2005, Moran y cols. 2007). Además ciertas especies de ixódidos muestran una relación estrecha con determinados hospedadores, así por ejemplo los cérvidos están considerados en diferentes países como los principales hospedadores de los adultos de *I. ricinus* (Danica 1988, Gilot y cols. 1994, Hudson y cols. 2001), mientras que los lagomorfos, entre ellos el conejo silvestre, están considerados como los hospedadores más importantes de todos los estadios de *R. pusillus* y de los inmaduros de *H. lusitanicum* (Apanaskevich y cols. 2008, Travassos Santos Dias 1994, Walker y cols. 2000). Por lo tanto no es de extrañar que los muestreos realizados revelaran una abundancia elevada de *I. ricinus* en el País Vasco y de *H. lusitanicum* y de *R. pusillus* en el centro de la península.

Para poder estudiar la evolución en el tiempo de la distribución, abundancia y variedad de las especies de garrapatas presentes en la vegetación, los muestreos deben ser realizados en los mismos puntos y empleando similar metodología. En el Estudio 2 se muestran los índices de abundancia obtenidos en siete puntos del País Vasco, en los que se capturaron garrapatas en dos periodos separados once años (entre marzo de 1992 y abril de 1993 y entre abril de 2003 y mayo de 2004), siendo significativamente superiores los encontrados en 2003-2004. Este aumento se debió a la gran cantidad de *I. ricinus* capturados en el segundo periodo, puesto que el número de *H. punctata* identificados, la especie más abundante en el primero (1992-1994), fue claramente menor. El hecho de que solamente podamos comparar datos de un solo año de muestreo en cada periodo, hace que no se pueda asegurar que se haya producido un incremento real de la densidad de garrapatas, puesto que las poblaciones pueden fluctuar de forma importante de un año a otro. Los principales factores que pueden ocasionar esta variación son los cambios en el hábitat y la climatología, que afectará a la distribución y abundancia de los hospedadores y por lo tanto a la supervivencia de las garrapatas (Mannelli y cols. 1997, Wilson y cols. 1990). Al realizarse los muestreos en las mismas zonas, no se observaron variaciones significativas en el hábitat; por otro lado, el análisis de las variables meteorológicas (temperatura y precipitaciones) no mostró diferencias significativas entre ambos periodos, si bien las temperaturas invernales en 2003-04 fueron más suaves, lo cual pudo favorecer el aumento de las poblaciones de garrapatas. Esta misma tendencia de incremento de la densidad de garrapatas de la especie *I. ricinus*, fue también observada a lo largo de ocho años de

estudio (1994-2002) en una misma área de La Rioja (Estrada-Pena y cols. 2004b), y tampoco allí encontraron que el hábitat o las condiciones climatológicas variaran de forma significativa a lo largo del tiempo.

Durante los dos últimas décadas, en varios países de Europa Central se ha observado un aumento de los casos de TBE y de su principal vector, *I. ricinus* (Sumilo y cols. 2008). Entre las principales causas consideradas por los autores, que han podido influir en el incremento de las poblaciones de garrapatas figuran ciertos cambios sociológicos, como el abandono de la actividad agraria y el descenso de las cabaña ganadera. Estos cambios han provocado la transformación de tierras de cultivo y praderas en áreas de matorral y de bosque, hábitats que proporcionan unas condiciones ambientales favorables para el desarrollo de *I. ricinus*, y de sus principales hospedadores, micromamíferos y ungulados silvestres. Asimismo, en la CAPV en el periodo comprendido entre 1993 y 2004 (Estudio 2) se observó un descenso de la superficie agrícola y un aumento equivalente de la superficie forestal (<http://www.eustat.es/estadisticas>; <http://www.nekanet.net/estadisticas>). En cuanto a la cabaña ganadera, aun cuando se observa un descenso del efectivo bovino total, se da la circunstancia de que el ganado vacuno de aptitud cárnica, el que es explotado en régimen extensivo y accede a los pastos de las sierras de este territorio, aumentó su número (<http://www.nekanet.net/estadisticas>). De forma similar, el efectivo ovino y equino también sufrió un incremento durante este periodo de tiempo. Respecto a la evolución de los ungulados silvestres, no hay disponibles estadísticas oficiales en la Comunidad, sin embargo los datos aportados por la Diputaciones Forales de Álava, Vizcaya y Guipuzcoa respecto al censo de corzos y jabalíes, basados en estimaciones y por los ejemplares cazados (Marta Barral, comunicación personal), indican un notable aumento de sus poblaciones. Por lo tanto, las modificaciones que han tenido lugar a lo largo de estos años en el medio natural del País Vasco, probablemente estén favoreciendo el aumento de las densidades de los ixódidos, principalmente de aquellas especies que ocupan hábitats arbolados y/o forestales, como por ejemplo *I. ricinus* y *H. inermis*.

El aumento de las poblaciones de *I. ricinus* traería como posible consecuencia un mayor riesgo de transmisión de enfermedades para el hombre, principalmente en aquellas épocas del año en las que la actividad sea mayor. Los datos obtenidos a lo largo de los diferentes estudios nos indican que, en general, en el País Vasco, las ninfas y adultos permanecen activos prácticamente a lo largo de todo el año, mostrando un patrón de actividad bifásico. Entre los meses de abril y junio tiene lugar el pico de máxima actividad, y tras el descenso que se produce en la época más cálida y seca del año, se produce un nuevo pico de actividad, aunque menor que el anterior. Sin embargo, la actividad de larvas no se mantiene a lo largo de todo el año, ya que ésta cesa durante el invierno. Este estadio

también presenta dos picos de diferente actividad, entre mayo y julio tiene lugar el de máxima actividad, y durante el otoño el de menor intensidad.

Los muestreos realizados en la CAR en el Estudio 3 mostraron una distribución estacional para los adultos similar a la de la CAPV; sin embargo, las larvas y las ninfas mostraron un único pico de actividad, el cual tuvo lugar entre mayo y junio en 2006 y 2007, retrasándose hasta junio-septiembre el de las larvas en 2008. Esta coincidencia en la estacionalidad de los estadios inmaduros que encontramos en La Rioja, en los dos primeros años del estudio, no la hallamos en el País Vasco. Este hecho puede tener una gran importancia epidemiológica, sobre todo en el caso de la transmisión de aquellos agentes para los que la garrapata es considerada vector y principal reservorio, y en los cuales la transmisión transovárica no existe o tiene lugar de forma poco eficaz, como por ejemplo ocurre con el TBEV (Randolph y cols. 1996). Como anteriormente mencionábamos, las larvas y ninfas de *I. ricinus* pueden alimentarse sobre los mismos hospedadores, principalmente pequeños vertebrados. Cuando coinciden en un mismo animal (co-alimentación) ninfas infectadas y larvas sin infectar, el virus puede pasar de unas garrapatas a otras a nivel local, en las células de Langerhans de la piel del hospedador aun cuando no se produzca una infección sistémica (Labuda y cols. 1996). Para que la transmisión del virus sea eficiente y pueda permanecer en la naturaleza, el grado de co-alimentación que se debe de producir tiene que ser elevado, para lo cual es necesario que ambos estadios comiencen su actividad en sincronía, lo que dependerá de las condiciones medioambientales (Randolph y cols. 1999, Randolph y cols. 2000). Así, cuando durante el invierno la media semanal de las temperaturas máximas diarias permanecen por debajo del umbral de actividad de las ninfas y las larvas (7 y 10°C respectivamente) (Gray 1984, Perret y cols. 2000, Randolph 2004), y posteriormente en primavera se produce un rápido aumento de la temperatura, ambos estadios iniciarán su actividad simultáneamente (Randolph y cols. 1999, Randolph y cols. 2000). Por todo ello, las temperaturas registradas durante los inviernos de 2006 y 2007 en los puntos de La Rioja posibilitaron la existencia de sincronía entre las larvas y las ninfas, cosa que no ocurrió durante el 2008. En el estudio realizado por Estrada y cols. (2004) a lo largo del periodo 1994-2002 en un área de esta Comunidad, de características similares a las muestreadas en el Estudio 3, no se encontró una coincidencia importante en la actividad de estos estadios, ya que mientras que las ninfas mostraron el mayor pico de actividad en abril, las larvas lo presentaron en julio. La sincronía encontrada en nuestro estudio podría ser algo puntual, que ha tenido lugar por las condiciones climatológicas particulares de esos dos años, o tal vez nos esté mostrando un cambio en el periodo de actividad de las larvas con el paso de los años. Para confirmar esta tendencia sería imprescindible continuar con los muestreos en estos mismos puntos durante varios años.

Las características (vegetación y fauna doméstica y silvestre) de las zonas muestreadas en la CAR son similares a las de la CAPV, sin embargo existe una distinción clara en cuanto a la altitud en la que se hallan los puntos. Las zonas de La Rioja están situadas por encima de los 1000 m de altitud (1056 y 1284 m), mientras que las del País Vasco se hallan entre los 600 y 800 m. Por lo tanto, las especies de garrapatas presentes en estas zonas, su densidad y su estacionalidad, probablemente estén determinadas por las características climatológicas que les confiere a estas áreas su situación geográfica. La climatología en La Rioja se caracteriza por tener unos veranos cálidos y unos inviernos fríos, con un régimen de precipitaciones bastante estacional. Sin embargo, en las zonas muestreadas las temperaturas que se alcanzan tanto en verano como en invierno son tres o cuatro grados inferiores a la de zonas situadas a una altitud inferior (<http://www.larioja.org>; <http://ias1.larioja.org/estaciones>), encontrando *I. ricinus* condiciones adecuadas para su desarrollo. De hecho la abundancia encontrada para las larvas, ninfas y adultos de esta especie en La Rioja fue aproximadamente dos veces superior a la del País Vasco.

El presente trabajo (Estudio 3) representa la primera ocasión en la que se intenta evidenciar la posible presencia del TBEV en garrapatas (*I. ricinus*) en España, además de comprobar si la dinámica estacional de las larvas y ninfas de estos ixódidos en el norte de la península permitiría su co-alimentación en los micromamíferos, principal mecanismo de transmisión del virus entre las ninfas infectadas y las larvas no infectadas (Labuda y cols. 1996). La encefalitis transmitida por garrapatas es considerada actualmente como una zoonosis emergente en diversos países del centro y este de Europa, siendo endémica en aquellas zonas donde las garrapatas del complejo *I. ricinus*, su principal vector y reservorio, son abundantes. Las características climatológicas y la vegetación existente en el norte de España, favorecen el desarrollo de poblaciones importantes de garrapatas, y como se comprobó en el Estudio 1, *I. ricinus* es la especie predominante; sin embargo, la enfermedad no ha sido diagnosticada en España (Donoso y cols. 2008, Suss 2008). Probablemente sea este el motivo por el cual el número de trabajos de investigación realizados en España sea muy escaso. De hecho, el único estudio llevado a cabo hasta la fecha (Chastel y cols. 1980), trató de detectar la presencia del virus en micromamíferos procedentes de diversas zonas del país. Los autores encontraron un animal (0,3%) positivo (título 1/40) en el test de la inhibición de la hemaglutinación; sin embargo, también mostró titulación frente a otros flavivirus, por lo que podría tratarse de una reacción cruzada, y no de un verdadero caso positivo.

Cabe recordar en este punto que aunque existe cierta transmisión transovárica del virus y por lo tanto podrían nacer algunas larvas infectadas, la circulación del virus es más intensa en aquellas áreas en las que las condiciones climatológicas permiten a los estadios inmaduros de *I. ricinus* la co-alimentación sobre los roedores. Entre las principales especies

de micromamíferos que se han visto en Europa que intervienen en el ciclo de transmisión del TBEV, figuran el ratón de campo (*A. sylvaticus*) y el topillo rojo (*M. glareolus*) (Labuda y cols. 1993). Estas dos especies son las más abundantes tanto en los bosques del País Vasco, tal y como se ha evidenciado en el Estudio 5 y anteriormente en el estudio realizado por Gil y cols. (2005), como en los de La Rioja (Estrada-Pena y cols. 2005).

Hemos podido comprobar que en el norte de la península se presentan los dos principales elementos implicados en la existencia de los focos de TBE, *I. ricinus* y los roedores, y sin embargo, la enfermedad no parece estar presente. Además los análisis que realizamos con 1800 ninfas (en pools de 5) y 630 adultos de *I. ricinus* mostraron resultados negativos, por lo que parece que el virus no se halla en nuestro entorno o si lo está, su prevalencia es muy baja. Probablemente, el principal motivo de esta ausencia del TBEV sea la falta de sincronía en la actividad de los estadios inmaduros de *I. ricinus*, tal y como hemos podido comprobar (Estudio 3) en los cuatro puntos de muestreo del País Vasco, lo cual imposibilitaría el mantenimiento del TBEV en la naturaleza. Sin embargo, la buena sincronía observada en La Rioja en 2006 en dos puntos y también en 2007 en uno de ellos, a diferencia de lo observado por Estrada y cols. (2004) entre 1994 y 2002, puede indicar que se esté produciendo un cambio en el periodo de actividad de las larvas que posibilite la coexistencia con las ninfas. Si este hecho se confirmara, y si el TBEV se hallara o se introdujera en esas áreas, por ejemplo a través de aves migratorias parasitadas por garrapatas infectadas, podría mantenerse el ciclo del virus, y por lo tanto existir riesgo de transmisión para los humanos.

Dos de los objetivos planteados al inicio de esta tesis eran el estudio de la presencia de algunos agentes zoonóticos bacterianos transmitidos por garrapatas (*Borrelia* spp., *Rickettsia* spp., *A. phagocytophilum* y *C. burnetii*) en los ixódidos presentes en la vegetación de la CAPV, y conocer el papel de los micromamíferos silvestres y domésticos como posibles reservorios de algunas de estas bacterias. Así, a lo largo de los Estudios 4 y 5, se trató de detectar la presencia de las cuatro bacterias anteriormente citadas en las garrapatas y micromamíferos capturados, utilizando la combinación de PCR y RLB. Para reducir la laboriosidad que representaría realizar una reacción de PCR para cada uno de los patógenos, se pusieron a punto dos PCR multiplex, una que permitía la detección simultánea de *A. phagocytophilum* y *C. burnetii* y otra para *Borrelia* spp. y *Rickettsia* spp. La posterior hibridación de los amplicones mediante RLB con sondas específicas, permitió comprobar la ausencia de reacciones cruzadas y aumentar la sensibilidad de la PCR en 1 o 2 órdenes de magnitud, lográndose detectar entre 6 y 60 copias de los diferentes genes diana. Esta técnica de PCR-RLB resultó también de gran validez para identificar las diferentes genoespecies de *B. burgdorferi* sensu lato presentes tanto en las garrapatas

como en los micromamíferos. Para ello el ADN de las muestras que mostraron hibridación en la sonda de *Borrelia* spp. fue sometido a una PCR específica para *B. burgdorferi* sensu lato, e hibridado posteriormente con sondas especie-específicas. Esta metodología nos permitió la identificación de las diferentes genoespecies implicadas sin necesidad de utilizar la secuenciación.

Las técnicas moleculares empleadas mostraron ser un instrumento de alta sensibilidad y especificidad en la detección de microorganismos patógenos tanto en animales como en garrapatas, aplicable en estudios epidemiológicos con una gran cantidad de muestras, y nos permitieron alcanzar los dos objetivos planteados al inicio de este trabajo.

Mediante el uso de estos métodos, en el Estudio 4 se analizaron de forma individual 691 garrapatas adultas pertenecientes a 6 especies (288 *I. ricinus*, 109 *H. punctata*, 97 *D. reticulatus*, 95 *H. inermis*, 52 *H. concinna* y 50 *R. bursa*), detectándose alguna de las cuatro bacterias estudiadas en 77 (11%) ejemplares. Cabe destacar, que este trabajo representa la primera ocasión en la que se ha estudiado la presencia de rickettsias del GFM y de *C. burnetii* en garrapatas recogidas de la vegetación del País Vasco.

Las rickettsias del GFM fueron las más frecuentes (6,9% de las garrapatas), aunque únicamente se detectaron en *D. reticulatus*, siendo la mitad de los individuos positivos en la RLB. La secuenciación de 22 de los productos de amplificación (*gltA*) positivos, revelaron que estas rickettsias tenían una similitud del 100% entre ellas y con *Rickettsia* sp. RpA4 y *Rickettsia* sp. DnS14, denominadas posteriormente como *R. raoultii* (Mediannikov y cols. 2008). Ningún ejemplar de *I. ricinus* fue portador de alguna de las rickettsias del grupo, contrariamente a lo observado en otras regiones españolas. Por ejemplo, en *I. ricinus* recogidos de la vegetación y de animales en Andalucía, el 30% portaba ADN de *R. monacensis* o *R. helvetica* (Marquez 2008). Esta rickettsia también fue detectada (Toledo y cols. 2009b) en garrapatas de la vegetación de la zona centro de la península (12,5%), así como en ejemplares que habían picado a personas en Castilla y León (Fernández-Soto y cols. 2004), donde el 3,6% fueron portadores de diferentes rickettsias (*Rickettsia* sp. IRS3/IRS4, *R. helvetica*, *R. massiliae*, *R. aeschlimannii* y *R. raoultii*). En estas tres regiones españolas y en otras como La Rioja (Oteo y cols. 2006, Portillo y cols. 2008) se ha detectado la presencia de diferentes rickettsias del GFM en varias especies de ixódidos, sin embargo, llama la atención que en el presente trabajo la única especie positiva fuera *D. reticulatus*.

El desarrollo de la enfermedad denominada TIBOLA/DEBONEL está asociado en los pacientes a la picadura por *D. marginatus* y *D. reticulatus*, aislándose en la mayoría de las ocasiones *R. slovaca* como agente etiológico (Ibarra y cols. 2006, Parola y cols. 2009,

Raoult y cols. 2002b). No obstante a veces es *R. raoultii* la causante del proceso (Ibarra y cols. 2006, Mediannikov y cols. 2008, Parola y cols. 2009). Por el contrario, en las garrapatas del género *Dermacentor* la distribución de *R. raoultii* es más frecuente que la de *R. slovaca* (Renvoise y cols. 2009). Esta asociación entre la garrapata y la enfermedad es clara, y de hecho en Europa no se registran casos durante los meses calurosos del verano, registrándose los picos de máxima incidencia de la enfermedad durante la primavera y el otoño (Parola y cols. 2009), coincidiendo con la actividad de *Dermacentor*. Los datos obtenidos en nuestro estudio no se corresponden totalmente con la anterior distribución, ya que la mayor abundancia de *D. reticulatus* la encontramos durante el invierno, menor en el otoño y muy baja en primavera. Además, y aunque las diferencias no fueron significativas, la prevalencia de infección también fue superior en los individuos capturados en otoño e invierno. Estos datos nos indicarían que la época de máximo riesgo de transmisión de la rickettsia al hombre es el invierno, y en menor medida el otoño.

En la Península Ibérica, *R. raoultii* ha sido frecuentemente identificada en *D. marginatus* (Fernández-Soto y cols. 2006b, Marquez 2008, Ortuno y cols. 2007, Oteo y cols. 2006, Toledo y cols. 2009b, Vitorino y cols. 2007), encontrándose tasas de infección elevadas, sin embargo, es menos habitual el hallazgo en *D. reticulatus*. De hecho, hasta este estudio solamente en ejemplares recogidos de personas en Castilla y León se había encontrado esta rickettsia (Fernández-Soto y cols. 2006b). Probablemente el motivo sea la propia distribución de esta especie de garrapata, dadas sus necesidades ecológicas, es abundante en la zona norte peninsular, pero está ausente en gran parte del centro y sur, donde se han realizado los estudios anteriormente mencionados.

Al igual que *R. raoultii*, *R. slovaca* se encuentra ampliamente distribuida en *D. marginatus* en España y Portugal (Fernández-Soto y cols. 2006b, Marquez 2008, Ortuno y cols. 2007, Oteo y cols. 2006, Toledo y cols. 2009b, Vitorino y cols. 2007), y fue también encontrada en un *D. reticulatus* (1/90) de entre los recogidos en personas en Castilla y León (Fernández-Soto y cols. 2006b). Sin embargo, en el presente estudio *D. marginatus* estuvo prácticamente ausente, y en ninguno de los *D. reticulatus* analizados (97) se detectó su presencia, lo cual parece indicar que esta rickettsia no está presente en estos ixódidos del País Vasco, o sí lo estuviera su prevalencia debe de ser muy baja, inferior al 1%.

Anteriormente se menciona que en el presente estudio únicamente se detectó una especie de rickettsia del GFM, sin embargo, el hecho de que en otras regiones españolas se hayan encontrado diferentes rickettsias en especies de garrapatas presentes en la CAPV, hace sospechar que también podrían estar circulando en esta Comunidad. Curiosamente, el primer caso de rickettsiosis por *R. sibirica* subsp. *mongolitimoniae* en España, tuvo lugar en un paciente de la CAPV, el cual se había retirado varias garrapatas adquiridas probablemente mientras trabajaba en unos montes de Vizcaya (Aguirrebengoa y cols. 2008,

Portillo y cols. 2008). Los ixódidos del género *Hyalomma* son los considerados vectores principales de esta rickettsia (Parola y cols. 2005b, Portillo y cols. 2008, Renvoise y cols. 2009), no obstante su presencia ha sido detectada también en garrapatas de las especies *R. pusillus*, en España y Portugal (De Sousa y cols. 2006, Toledo y cols. 2009b), y *R. bursa* en España (Toledo y cols. 2009b). Aunque ambas especies de *Rhipicephalus* están descritas en la CAPV, en el presente trabajo se observó que la presencia de *R. pusillus* fue muy escasa (un ejemplar adulto capturado), sin embargo, *R. bursa* mostró una mayor abundancia y distribución a lo largo de los años de muestreo. Teniendo en cuenta que Toledo y cols. (2009b), empleando similar metodología, obtuvieron una prevalencia del 3,6% (6/56) en *R. bursa*, era esperable haber encontrado algún ejemplar positivo en el presente estudio (50 analizados). El hecho de no encontrar ningún ejemplar positivo indicaría que la prevalencia en el País Vasco es inferior al de la zona centro de España, e inferior al 2%. No obstante, se debe tener en cuenta que las garrapatas halladas positivas por Toledo y cols (2009b) y De Sousa y cols (2008) fueron recogidas sobre animales. Al tratarse de garrapatas que se estaban alimentando, es posible que las rickettsias detectadas pudieran ser adquiridas directamente de la sangre del hospedador o por co-alimentación, de garrapatas infectadas a no infectadas, por lo que es probable que en la zona centro de España la prevalencia en las garrapatas de vegetación sea inferior a la hallada en los ejemplares recogidos en animales. Estos hallazgos, mostrarían la necesidad de analizar garrapatas procedentes de diferentes especies animales cuando se desee detectar la presencia de un patógeno transmitido por garrapatas, sobre todo cuando la prevalencia esperada para un determinado agente es pequeña o cuando el número de ejemplares recogidos en la vegetación es escaso.

Como hemos mencionado anteriormente, este trabajo representa también la primera ocasión en el que se estudia el papel de los ixódidos del País Vasco como posibles vectores de *C. burnetii*. Son numerosas las especies de garrapatas que se han encontrado infectadas de forma natural por este patógeno, por lo que se consideran como importantes reservorios y posibles vectores (Arricau-Bouvery y Rodolakis 2005), y probablemente desempeñen un papel importante en el ciclo natural de este agente entre los vertebrados silvestres (Maurin y Raoult 1999). En el norte de España la fiebre Q es considerada como una enfermedad endémica (Maurin y Raoult 1999, Montes y cols. 2006, Pascual-Velasco y cols. 1998), con una amplia distribución en el ganado doméstico del País Vasco (Ruiz-Fons y cols. 2010), donde también se ha comprobado su importancia como agente abortivo para los pequeños rumiantes (Oporto y cols. 2006). Los rebaños ovinos de esta Comunidad permanecen durante el verano y otoño en los montes y sierras, donde, como ya hemos visto, la presencia de diferentes especies de garrapatas es abundante. Gran parte de los abortos ovinos tienen

lugar durante el otoño, por lo que en este momento concurren unas circunstancias muy favorables para la transmisión bidireccional de *C. burnetii* entre las ovejas y las garrapatas. Además, bien las ovejas a través de sus excreciones o bien las garrapatas mediante su picadura pueden actuar como origen de infección para otras especies animales, entre las que se incluyen las silvestres, como recientemente ha sido comprobado con la detección de ADN de *C. burnetii* en varias especies de animales silvestres procedentes del País Vasco (Astobiza y cols. 2010).

La presencia de *C. burnetii* en garrapatas ha sido demostrada en varios países europeos (Psaroulaki y cols. 2006, Rehacek y cols. 1994, Smetanova y cols. 2006, Spitalska y Kocianova 2003) y recientemente, en la zona centro de España (Toledo y cols. 2009a). Este último grupo encontró cuatro especies (*H. lusitanicum*, *D. marginatus*, *R. sanguineus* y *R. pusillus*) infectadas, con una prevalencia general del 7,7% para las garrapatas procedentes de la vegetación, y del 3,4% en las recogidas en animales; sin embargo, en el presente estudio una única garrapata (0,1 %), de la especie *H. punctata* (0,9%), fue positiva en la RLB. Esta gran diferencia entre la prevalencia encontrada en la zona centro con respecto al norte probablemente sea debida a las diferentes especies de garrapatas halladas en ambas zonas. Ninguna de las cuatro especies que fueron encontradas positivas por Toledo y cols. (2009a) se capturaron en el presente estudio, y por lo tanto no pudieron ser analizadas. De las cuatro especies positivas, las dos más abundantes, y en las que la tasa de infección fue superior, *H. lusitanicum* y *D. marginatus* fueron las consideradas por los autores como posibles reservorios de *C. burnetii* (Toledo y cols. 2009a). Estas dos especies han sido también reconocidas como posibles vectores de este patógeno en otros países europeos donde son abundantes (Psaroulaki y cols. 2006, Rehacek y cols. 1994). Por el contrario, en estudios realizados en países centroeuropeos, donde al igual que en el País Vasco, *I. ricinus* es el ixódido predominante, la prevalencia obtenida fue muy baja (Rehacek y cols. 1993, Smetanova y cols. 2006, Spitalska y Kocianova 2003). La baja prevalencia encontrada en las garrapatas analizadas en este estudio, parece indicar que las especies de ixódidos presentes en la vegetación del País Vasco no actúan como reservorios y/o vectores de *C. burnetii*, por lo que este papel lo desempeñan los animales domésticos, sin descartar participación de las especies silvestres en el ciclo de *C. burnetii*.

A diferencia de *Coxiella*, el número de garrapatas en la que se detectó la presencia de ADN de *A. phagocytophilum* fue alto. La fiebre por garrapatas, enfermedad que afecta de forma importante al ganado ovino del País Vasco (García-Pérez y cols. 2003) tiene en *I. ricinus* a su principal vector en Europa, donde presenta unas prevalencias de infección del 9-10% (Koci y cols. 2007, Wielinga y cols. 2006). Estudios previos realizados con garrapatas recogidas de la vegetación de nuestra Comunidad (Barral 1998) detectaron por PCR

porcentajes de infección similares (8% en adultos y 12 % en ninfas). En el presente estudio la prevalencia detectada en *I. ricinus* adultos fue inferior (5,6%), sin embargo, esta diferencia probablemente sea debida a que los cebadores empleados en la PCR por Barral (1998) amplificaban, además de *A. phagocytophilum*, otros miembros pertenecientes a la familia *Anaplasmataceae*. En cuanto a la distribución del agente, ésta parece ser bastante extensa, ya que fue encontrado en 6 de las 10 áreas estudiadas, hecho que concuerda con la aparición de numerosos rebaños ovinos afectados por la enfermedad cuando acuden en verano a los pastos de las sierras (García-Pérez y cols. 2003). La prevalencia de infección en estos ixódidos parece mostrar cierta estacionalidad, aun cuando las diferencias no fueron significativas, fueron las garrapatas capturadas durante la época estival (junio-agosto) las que presentaron un porcentaje superior de positividad. Es precisamente en esta estación cuando la abundancia de *I. ricinus* es mayor, por lo que el riesgo de transmisión de la enfermedad será mayor tanto para las personas como para los animales.

Además de encontrar positividad en *I. ricinus*, también fue detectada la presencia de ADN de *A. phagocytophilum* en otras especies de garrapatas, como *H. punctata*, *H. concinna* y *R. bursa*. No es la primera vez que en nuestra región se obtiene este tipo de hallazgo, ya que previamente Barral (1998) detectó su ADN en ejemplares adultos de *H. punctata*, *H. inermis*, *R. bursa* y *D. reticulatus* recogidos de la vegetación. En nuestro país, son pocos los trabajos llevados a cabo con el objeto de conocer la distribución de *A. phagocytophilum* en garrapatas no alimentadas. Recientemente, Toledo y cols. (2009) han publicado un estudio realizado con ixódidos procedentes de la zona centro peninsular, en el cual encontraron por PCR-RLB un 1,8% de garrapatas positivas. La presencia de *I. ricinus* en esta zona es muy escasa, por lo que los autores no pudieron encontrar ningún ejemplar positivo, sin embargo sí que los hallaron en otras cuatro especies (*H. lusitanicum*, *D. marginatus*, *R. bursa* y *R. pusillus*). La presencia de *A. phagocytophilum* en ixódidos no pertenecientes al complejo *I. ricinus* parece ser habitual en la península, ya que también ha sido detectada en varias de las especies de garrapatas anteriormente citadas, que fueron recogidas en animales silvestres o en personas (De La Fuente y cols. 2005, Fernández-Soto 2003, Merino y cols. 2005). Estos hallazgos hacen que, en alguna ocasión, los autores hayan sugerido la posibilidad de que en aquellas áreas donde *I. ricinus* no está presente o su abundancia sea escasa, otras especies de ixódidos puedan desempeñar el papel de vector que tiene *I. ricinus*. Sin embargo, mientras no se lleven a cabo experimentos que demuestren la competencia de estas garrapatas en la transmisión y mantenimiento del agente, no se conocerá realmente la importancia epidemiológica de estos hallazgos.

Los resultados obtenidos en este estudio vienen a corroborar los obtenidos previamente (Barral 1998) en esta misma región, por lo tanto podríamos afirmar que *A. phagocytophilum* se halla ampliamente difundida en las poblaciones de ixódidos, lo que

supone un riesgo importante de infección para la población humana y para los animales que frecuenten las áreas de distribución de estas garrapatas.

En cuanto a *Borrelia* spp., es destacable el bajo porcentaje de positividad obtenido, el 1,2% para el conjunto de las garrapatas analizadas, encontrándose ejemplares positivos en dos especies: *I. ricinus* y *H. punctata*. Cabe mencionar también, que no fue *I. ricinus* la especie en la que se halló la mayor prevalencia, puesto que de los ocho ejemplares positivos, cinco sí pertenecieron a esta especie, lo que representa un 1,7% de positividad dentro de la especie, pero los otros tres eran *H. punctata*, lo que supone el 2,8%. El ADN de cuatro garrapatas (dos de cada especie) que presentaron hibridación con la sonda 16S rRNA de *Borrelia* spp. fueron negativos en la PCR-RLB (gen 5S-23S rRNA) específica para *B. burgdorferi*, por lo que probablemente se tratasen de especies diferentes a *B. burgdorferi*. Como no se procedió a secuenciar los productos de amplificación, no se pudo comprobar este hecho, no obstante, no debemos descartar la probabilidad de que se trate de una nueva especie de espiroqueta presente en los ixódidos. De hecho, un hallazgo de este tipo fue obtenido unos pocos años antes por Gil y cols. (2005), cuando descubrieron, mediante la amplificación del gen 16S rRNA en micromamíferos capturados en esta región, una nueva especie de espiroqueta a la que denominaron *Borrelia* sp. R57, perteneciente al género *Borrelia* pero diferente a las especies del grupo de *B. burgdorferi* sensu lato y el grupo de las especies causantes de la fiebre recurrente.

Considerando que las cuatro espiroquetas identificadas como *Borrelia* spp. no fuesen *B. burgdorferi* sensu lato, tendríamos en este estudio una prevalencia total para *B. burgdorferi* del 1% en *I. ricinus* y del 0.9% en *H. punctata*. En general estas tasas de infección son inferiores a las documentadas previamente en el País Vasco por Barral y cols. (2002) y Gil y cols. (2005), quienes encontraron unas prevalencias del 2,1-9,3% y del 4,1% respectivamente. Estas diferencias podrían en parte deberse a las técnicas de análisis empleadas, puesto que en los primeros estudios además de emplear la PCR o PCR-RLB directamente sobre los *I. ricinus*, también se realizaron cultivos de *I. ricinus* en medio BSK II, y posteriormente se sometieron a las técnicas moleculares los sedimentos de los cultivos, lo cual permitió detectar como positivas algunas garrapatas que habían sido negativas solo por PCR.

La presencia en todas las zonas de muestreo de ganado doméstico y de ungulados silvestres (principalmente corzos) pudo tener un efecto de dilución en la tasa de infección de los ixódidos. Es conocido el efecto borrelícida que tiene el suero de los cérvidos para las tres genoespecies patógenas para el hombre (*B. afzelii*, *B. garinii* y *B. burgdorferi* sensu stricto) (Kurtenbach y cols. 1998c), lo cual concordaría con el hecho de que los grandes ungulados mantienen elevadas poblaciones de garrapatas, pero no son reservorios competentes para

B. burgdorferi sensu lato (Gray y cols. 1995, Rosef y cols. 2009, Talleklint y Jaenson 1996). Este postulado estaría de acuerdo con el dato de que la mayor prevalencia encontrada a lo largo del Estudio 4, tuvo lugar en la zona de muestreo con menor densidad de ungulados domésticos o silvestres (área 7). Al tratarse esta zona de un área recreativa rodeada de zonas de pastoreo de ganado se halla vallada, por lo que la presencia de animales en su interior fue ocasional, y muy reducido el número de *I. ricinus* capturado. El mayor porcentaje de infección se debería a que las garrapatas se alimentarían sobre reservorios competentes para *B. burgdorferi* sensu lato, como los micromamíferos, de menor tamaño y con menor capacidad para mantener poblaciones importantes de ixódidos.

En cuanto a las genoespecies de *B. burgdorferi* sensu lato encontradas, se identificaron tres de las cinco citadas con anterioridad en el País Vasco. Así, en *I. ricinus* fueron detectados *B. afzelii* y *B. garinii*, mientras que en *H. punctata*, se identificó *B. burgdorferi* sensu stricto. Una de las muestras procedentes de *I. ricinus* que mostró una clara señal para la sonda de *B. burgdorferi* sensu lato, no hibridó con ninguna de las cinco sondas específicas, por lo tanto podría tratarse de alguna otra genoespecie diferente a las incluidas en el estudio, como por ejemplo *B. spielmanii* o *B. miyamotoi*, descritas en diversos países europeos (Derdakova y cols. 2003a, Foldvari y cols. 2005, Fraenkel y cols. 2002).

Parece repetirse la detección de ejemplares positivos de *H. punctata* recogidos en la vegetación o en animales domésticos en la zona norte de España (Barral 1998, Estrada-Peña y Oteo 1991, Marquez y Constan 1990). Por este motivo, no habría que descartar la posibilidad de que *H. punctata* pudiera estar actuando como vector de *B. burgdorferi* en las regiones del norte, donde este ixódido tiene una amplia distribución. En otros países europeos también se ha detectado la presencia de *B. burgdorferi* en *H. punctata* (Angelov y cols. 1996, Talleklint 1996), sin embargo, no se conoce aún su posible papel epidemiológico en el ciclo de la enfermedad, por lo que sería necesario llevar a cabo futuras investigaciones que confirmen la capacidad vectorial de esta especie.

Diversos agentes zoonóticos pueden ser transmitidas por el mismo vector, por lo tanto es habitual la existencia de coinfecciones en las garrapatas. En Europa son numerosas las citas en las que se describe la detección de infecciones mixtas en ixódidos (Derdakova y cols. 2003b, Halos y cols. 2006, Koci y cols. 2007, Milutinovic y cols. 2008, Piccolin y cols. 2006, Stanczak y cols. 2004), y también se ha descrito en diferentes regiones españolas (Fernández-Soto 2003, Toledo y cols. 2009b). En el País Vasco el único trabajo en el que se ha investiga la posible existencia de coinfecciones en garrapatas recogidas en la vegetación, es el realizado por Barral (1998), en el que solo en una ocasión (un adulto de *I. ricinus*) se observó la presencia de coinfección por *B. burgdorferi* y *A. phagocytophilum*.

Especial interés adquieren las infecciones mixtas cuando *A. phagocytophilum* es uno de los patógenos implicados, debido al efecto inmunosupresor que produce en el hospedador, exacerbando el efecto de infecciones concurrentes (Dumler y cols. 2007). En este estudio, *A. phagocytophilum* fue el agente más frecuentemente identificado, no obstante, en ninguna ocasión se detectó una infección mixta. Hecho que no resulta sorprendente, puesto que salvo en *D. reticulatus*, la prevalencia detectada en el resto de especies para las diferentes bacterias fue baja. El hecho de que la mitad de los *D. reticulatus* analizados fueran positivos a *Rickettsia* spp., hacía que estos ixódidos tuvieran la mayor probabilidad de presentar alguna infección mixta, sin embargo, no resultaron positivos para ninguno de los otros tres patógenos bacterianos estudiados.

Los micromamíferos pueden desempeñar un importante papel en la naturaleza como reservorios de agentes que pueden causar brotes de enfermedades, por esta razón es necesario conocer la epidemiología de dichos agentes y enfermedades. Habitualmente, las especies de micromamíferos silvestres tienen poco contacto con el hombre y con los animales domésticos, sin embargo, pueden mantener en circulación agentes infecciosos en focos endémicos, durante largos periodos de tiempo. Es aquí, donde los vectores tales como las garrapatas pueden actuar como transmisores de estos microorganismos al hombre y a los animales domésticos, e incluso a los roedores peridomésticos. Además se da la circunstancia de que las larvas de *I. ricinus* tienen gran afinidad por parasitar a los roedores (Humair y cols. 1995, Matuschka y cols. 1991).

Si bien en varios países europeos y en Estados Unidos son numerosos los estudios realizados con el objetivo de identificar las especies de micromamíferos que pueden actuar como reservorio de las zoonosis bacterianas estudiadas en este trabajo, en España el número es muy reducido. El único estudio llevado a cabo para comprobar el papel de los micromamíferos como reservorio de *B. burgdorferi* fue realizado en el País Vasco por Gil y cols (2005). En este trabajo analizaron 184 animales, obteniendo una baja incidencia de infección por *B. burgdorferi* sensu lato, pero sorprendentemente se identificó una nueva espiroqueta, a la que se denominó *Borrelia* sp. R57.

En el presente estudio, se capturaron un total de 334 micromamíferos siendo, al igual que en el estudio de Gil y cols. (2005), *A. sylvaticus* la especie más abundante y ubicua. De entre los diferentes micromamíferos capturados, los considerados como roedores silvestres (*Apodemus* spp. y *M. glareolus*) mostraron un mayor grado de parasitación por garrapatas que los insectívoros (*Sorex* spp. y *Crocidura* spp.). Como ya ocurriera anteriormente en el trabajo de Gil y cols. (2005), *A. sylvaticus* fue la especie de roedor más parasitado, e *I. ricinus* la especie de ixódido claramente predominante, lo cual concordaría con los hallazgos obtenidos en los muestreos de vegetación, donde este ixódido fue el identificado

mayoritariamente. El promedio de larvas de *I. ricinus* detectado en esta especie de micromamífero (7,3 por animal) fue superior al encontrado por Gil y cols. (2005), y aun no siendo una cifra muy elevada, se hallaría dentro del rango que se ha encontrado en diversos países europeos (Gray y cols. 1999, Liz y cols. 2000, Michalik y cols. 2003). Un aspecto que sí puede tener importancia epidemiológica es el escaso número de ninfas que se hallaron (26 en 11 animales), lo cual podría estar limitando el paso de los diversos agentes transmitidos por garrapatas hacia los roedores. Este hecho afectará principalmente a aquellos microorganismos que no pueden ser transmitidos transováricamente en los ixódidos, o lo hacen con una baja eficiencia, como es el caso de *B. burgdorferi*, *A. phagocytophilum* o el TBEV. Para estos agentes es primordial el papel de las ninfas, ya que serán estas quienes lo transmitan al hospedador sobre el que se alimentarán las larvas, posibilitando así la infección de estas últimas. Aun siendo bajo el ratio Ninfas / Larvas (1:72) encontrado en el presente estudio, sí que fue superior al previamente obtenido (1:450) por Gil y cols. (2005), lo cual podría explicar la mayor prevalencia de *B. burgdorferi* sensu lato encontrada en los micromamíferos en nuestro estudio.

En cuanto a los resultados obtenidos mediante la PCR-RLB con los pools de tejidos de los 253 micromamíferos analizados, el agente más frecuentemente detectado fue *Borrelia* spp., siendo positivos 67 (26,5%). En la gran mayoría de las ocasiones (62), los amplificadores hibridaron con la sonda específica de *Borrelia* sp. R57, mientras que solamente 3 lo hicieron con la de *B. burgdorferi* sensu lato. Ninguno de los ADN positivos para *B. burgdorferi* sensu lato pertenecía a ratones de la especie *A. sylvaticus*, los más abundantes y más parasitados por garrapatas, por lo que es probable que estos ratones desempeñen un papel poco importante en el mantenimiento de estas espiroquetas en las zonas muestreadas. Su lugar parecen ocuparlo otras especies como *C. glareolus* y *S. coronatus*, especies menos numerosas y sobre las que se encontraron pocas garrapatas.

A diferencia de *B. burgdorferi* sensu lato, *Borrelia* sp. R57 no parece tener su vector en los ixódidos (Gil y cols. 2005), de ahí que no resulte extraño el hecho de que la prevalencia más alta la encontráramos en *C. glareolus*, o que uno de los *M. domesticus* fuera positivo cuando no se observó la presencia de garrapatas en ninguno de los 28 ejemplares capturados. No se conoce cual es el vector de esta nueva espiroqueta, pero probablemente sea algún ectoparásito que se encuentre preferentemente en pequeños roedores (*Apodemus* spp., *C. glareolus*, etc.) ya que su presencia en los insectívoros (*Sorex* spp., *Crocidura* spp. y *Talpa* spp.) es muy escasa, como lo demuestra el hecho de que no se haya detectado ningún ejemplar positivo en el presente estudio, y solamente uno en el de Gil y cols. (2005).

En Europa, los micromamíferos están considerados como los principales reservorios de *B. afzelii*, *B. burgdorferi* sensu stricto y de algunos serotipos de *B. garinii* (Gern 2008), genoespecies que han sido identificadas en garrapatas recogidas de la vegetación del País Vasco (Barral y cols. 2002, Escudero y cols. 2000, Gil y cols. 2005). Hasta la fecha, en los micromamíferos de esta Comunidad ha sido demostrada la presencia de ADN de *B. afzelii* y de *B. burgdorferi* sensu stricto, por lo que aún estaría pendiente de detectar *B. garinii* en estos animales. Por otro lado, aun no se han estudiado en esta región otras especies animales como las aves o reptiles, que pudieran estar actuando como reservorios de *B. garinii*, *B. valaisiana* o *B. lusitaniae* (Gern 2008) descritas en las garrapatas de esta Comunidad (Barral y cols. 2002, Escudero y cols. 2000, Gil y cols. 2005).

El papel de los micromamíferos como posibles reservorios de *A. phagocytophilum* ya fue sugerido por diversos autores, tanto en Europa como en Estados Unidos (Christova y Gladnishka 2005, Liz y cols. 2000, Telford y cols. 1996) donde encontraron, por PCR, unos porcentajes de positividad entre el 7 y el 11%. Sin embargo, en España, aun cuando diversas especies de animales domésticos y silvestres han sido objeto de investigación (De La Fuente y cols. 2005, De La Fuente y cols. 2008, García-Pérez y cols. 2003, Juste y cols. 1989, Oporto y cols. 2003, Toledo 2007), el conocimiento que se tiene del papel que desempeñan los pequeños mamíferos es prácticamente nulo. El presente estudio representaría la primera ocasión en la que se analizan por métodos moleculares un número importante de micromamíferos, siendo además la segunda ocasión en la que se detecta la presencia de ADN de *A. phagocytophilum* en los mismos (Toledo 2007). La prevalencia general encontrada fue baja (0,8%), lo cual sugiere que en las zonas de muestreo, los pequeños mamíferos, o al menos las especies analizadas en mayor número (*A. sylvaticus*, *M. glareolus* y *S. coronatus*), no serían, por sí solos, capaces de mantener el ciclo de infección entre el reservorio y el ixódido vector (*I. ricinus*). Como se mencionaba con anterioridad, en el País Vasco *A. phagocytophilum* es un agente ampliamente difundido en el ganado doméstico (García-Pérez y cols. 2003, Juste y cols. 1997b), y también se ha detectado su presencia entre la población de corzos (Oporto y cols. 2003), por lo que diferentes especies de ungulados domésticos o silvestres podrían también estar implicadas como reservorios, tal y como ha sido descrito en diferentes estudios (Alberdi y cols. 2000, De La Fuente y cols. 2005, Liz y cols. 2002).

Analizados los resultados por especie de micromamífero, observamos que en el 16,7% (1/6) de los individuos de la especie *C. russula* se detectó la presencia del agente. Este valor está en consonancia con los obtenidos en los estudios citados con anterioridad (7-11%) (Christova y Gladnishka 2005, Liz y cols. 2000, Telford y cols. 1996), y cuyos autores consideran a los micromamíferos como posibles reservorios, por lo que cabría pensar en su

potencial papel en el ciclo del agente en la naturaleza. Sin embargo, el bajo número de ejemplares analizados, la baja parasitación por garrapatas de las musarañas en general y el bajo índice de abundancia obtenido en las capturas podrían restar valor al papel como reservorio de la enfermedad, haciendo necesario el estudio de más ejemplares de las especies minoritarias.

Probablemente el hallazgo más relevante obtenido en el Estudio 5 fue la detección de ADN de *C. burnetii* en los micromamíferos. En la actualidad, poco se sabe del papel de los micromamíferos dentro del ciclo doméstico y silvestre de la Fiebre Q, así como el de otras especies silvestres. Aunque existe algún estudio serológico que implica a los roedores domésticos (*R. norvegicus*) en brotes de Fiebre Q en el Reino Unido (Webster y cols. 1995), todavía son muy pocos los trabajos publicados en los que se demuestre la presencia de ADN del agente en los micromamíferos (Smetanova y cols. 2006).

C. burnetii puede infectar a diversas especies de mamíferos, tanto domésticos como silvestres, así como a aves, siendo su principal ruta de transmisión la aérea y estando asociada frecuentemente con abortos en los rumiantes domésticos (Arricau-Bouvery y Rodolakis 2005). Las garrapatas son también consideradas como un importante reservorio y vector de este agente en diversos países, pudiendo tener un importante papel en la transmisión de la coxiellosis entre los animales silvestres, especialmente en roedores, lagomorfos y aves (Arricau-Bouvery y Rodolakis 2005).

El hallazgo en este trabajo de ADN de *C. burnetii* en tres ratones (2 *M. domesticus* y 1 *A. sylvaticus*) podría confirmar la implicación de los micromamíferos en el ciclo doméstico de la Fiebre Q en nuestro entorno. Estos roedores positivos fueron capturados en el entorno de un rebaño ovino con problemas de abortos, por lo que es probable que adquirieran el patógeno de las ovejas, a través de placentas contaminadas. El hecho de que los gatos puedan ser también reservorios del agente (Arricau-Bouvery y cols. 2006), confiere una especial relevancia a estos hallazgos, ya que al ser estos animales depredadores de los ratones, es probable su infección, pudiendo a su vez actuar como transmisores de la enfermedad al hombre, tal y como ya se ha sido sugerido por diversos autores (Cairns y cols. 2007, Komiya y cols. 2003).

Las rickettsias del GFM sólo se transmiten a través de picadura de garrapata, siendo a su vez éstas, el principal reservorio (Raoult y Roux 1997). Numerosos animales (mamíferos y aves) son susceptibles a estos agentes, no obstante, el papel de estos en el mantenimiento de los focos de zoonosis, está aun por determinar (Parola y cols. 2005a, Raoult y Roux 1997). Hasta el momento, en España no se conoce el papel que los micromamíferos pueden desempeñar en el ciclo epidemiológico de la enfermedad. Sin

embargo, sí que diversos autores sugieren la participación de algunas especies de animales domésticos o silvestres en la epidemiología de *R. conorii* (Herrero-Herrero y cols. 1989) o de *R. slovaca* (Ortuno y cols. 2007). Además, la detección de ADN de *Rickettsia* spp. por Toledo (2007) en cuatro de los 27 micromamíferos (14.8%) analizados, apunta también hacia la participación de estos pequeños vertebrados en el ciclo de las rickettsias. En el presente trabajo, no se detectó ADN de las rickettsias del GFM en ninguno de los micromamíferos analizados, por lo que no parece que estos animales participen en el ciclo de este grupo de agentes en la CAPV. Con todo, el hallazgo obtenido por Toledo (2007), y el hecho de que los ratones de la especie *M. domesticus* sean considerados reservorio de *R. akari* (Bennett y cols. 2007), y que el ganado vacuno lo sea para *R. africae* (Parola y cols. 2005a), hace imprescindible continuar con la vigilancia epidemiológica tanto de las especies animales domésticas como silvestres.

Probablemente el Estudio 5 represente la primera ocasión en que micromamíferos del género *Talpa* han sido investigados como reservorios de agentes zoonóticos en España. Se analizaron 24 de los 30 ejemplares capturados, resultando todos ellos negativos a las cuatro bacterias incluidas en el estudio. Este resultado negativo, junto con el hecho de que en ninguno de los topos se observó la presencia de garrapatas, parece indicar que esta especie de micromamífero no actuaría como reservorio de los patógenos investigados.

Los resultados obtenidos en este estudio y el hecho de la detección reciente de una nueva borrelia en los micromamíferos, reforzaría la necesidad de establecer un sistema de vigilancia activa que permita detectar, con suficiente antelación, la aparición de nuevas especies patógenas en nuestro entorno, o las posibles variaciones que sufran las ya existentes.

En definitiva, el presente estudio ha permitido obtener unos resultados de gran interés en Salud Pública y Animal. En este sentido, se ha detectado por primera vez en nuestro entorno una rickettsia emergente como *R. raoultii*, con una elevada prevalencia en garrapatas de la especie *D. reticulatus*. También se ha podido confirmar que *I. ricinus* actúa como vector de *A. phagocytophilum* y de *B. burdorferi* sensu lato. Por el contrario, los ixódidos de la CAPV no parecen tener un papel reseñable en el ciclo silvestre de la fiebre Q. En relación con esta enfermedad, la detección de ADN de *C. burnetii* en micromamíferos domésticos implicaría a estos animales en la epidemiología de la fiebre Q. Ha sido notorio también, el hallazgo de ADN de *B. afzelii* y *A. phagocytophilum* en musarañas de las especies *S. coronatus* y *C. russula* respectivamente, ya que se implicaría por primera vez a ambas especies como posibles reservorios de los agentes detectados. Asimismo, el haber

realizado muestreos de garrapatas de la vegetación durante cinco años consecutivos, ha permitido tener un conocimiento más preciso de la dinámica estacional de los ixódidos, y en consecuencia, los momentos del año de mayor riesgo para las personas y animales de ser picados por las garrapatas y de adquirir los agentes transmitidos por estos artrópodos. La implantación de programas de vigilancia continuada de la dinámica de las poblaciones de garrapatas en zonas piloto podría servir para evaluar tendencias y modificaciones en las dinámicas poblacionales asociadas a cambios climáticos o de otro tipo que pudieran afectar a la transmisión de patógenos.

V. CONCLUSIONES

1. La técnica del arrastre de la manta por la vegetación ha demostrado ser un método válido para la recogida de garrapatas exófilas en dos zonas con características geográficas, climatológicas y de vegetación bien diferenciadas. Ha permitido la captura de 12 especies diferentes de ixódidos adultos pertenecientes a 5 géneros (*Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* e *Hyalomma*).
2. Las condiciones climatológicas favorecen la supervivencia y el desarrollo de especies de garrapatas hidrófilas en el norte de la península (*Ixodes ricinus*, *Haemaphysalis punctata*, *H. inermis*, *H. concinna* y *Dermacentor reticulatus*), y de especies xerófilas en el centro (*Hyalomma lusitanicum*, *D. marginatus* y *Rhipicephalus pusillus*.). *I. ricinus* ha sido la especie más abundante en el norte y *H. lusitanicum*, en la zona centro.
3. Por vez primera, se han detectado poblaciones estables de *Haemaphysalis concinna* a lo largo de los 2 años de muestreo en uno de los puntos del País Vasco, así como hallazgos esporádicos en una segunda zona. Estos resultados confirman el interés de la realización de labores de vigilancia epidemiológica continua para la detección de especies de reciente introducción.
4. La abundancia de garrapatas en las capturas de la vegetación del País Vasco se ha asociado positivamente con las temperaturas, con precipitaciones moderadas-altas durante los siete días previos al muestreo, con la presencia de arbolado, con altitudes medias y con zonas de pastoreo.
5. No se ha detectado la presencia de ARN del virus de la encefalitis vírica transmitida por garrapatas (TBEV) en los adultos y ninfas de la especie *I. ricinus* procedentes del País Vasco y de La Rioja; por lo tanto el TBEV probablemente no está presente en estas zonas, o si lo está, su prevalencia es muy baja. La ausencia de sincronía entre larvas y ninfas en el comienzo de la actividad primaveral, con la consecuente falta de co-alimentación de ambos estadios sobre los micromamíferos, puede ser la explicación a la ausencia de TBEV en nuestro entorno.
6. Se ha detectado por primera vez la presencia de ADN de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas en las garrapatas del País Vasco. *Rickettsia raoultii* ha sido la única especie de rickettsia identificada, detectándose en aproximadamente el 50% de las garrapatas de la especie *D. reticulatus*. El invierno es la época del año

en que el riesgo de transmisión de *R. raoultii* será mayor, coincidiendo con los periodos de máxima actividad de *D. reticulatus*.

7. La baja prevalencia observada para *Coxiella burnetii* parece indicar que los ixódidos en el País Vasco no intervienen como reservorios y/o vectores del agente en el ciclo silvestre de la fiebre Q. Así mismo, se ha detectado la presencia en garrapatas de ADN de *Anaplasma phagocytophilum* y *Borrelia burgdorferi* sensu lato pero con prevalencias ligeramente inferiores a las observadas en estudios previos. La causa de estas fluctuaciones en las prevalencias merecen futuros análisis.
8. En los bosques del País Vasco, *Apodemus sylvaticus* es el micromamífero predominante y el que presenta una mayor parasitación por larvas de *I. ricinus*. Sin embargo, el número de ninfas encontrado ha sido muy bajo, lo que supone un freno en su papel de reservorio de aquellos agentes en los que las ninfas son el motor de la infección, bien transmitiendo directamente el agente al hospedador o a través de la co-alimentación, transmitiendo la infección a las larvas.
9. Las musarañas son especies de gran interés en el mantenimiento de bacterias zoonóticas transmitidas por garrapatas. Así, se ha detectado por primera vez la presencia de ADN de *A. phagocytophilum* en *Crocidura russula* y ADN de *Borrelia afzelii* en *Sorex coronatus*, con prevalencias de 17% y 14% respectivamente. Estas prevalencias moderadas son similares a las halladas en las poblaciones de micromamíferos de otras zonas europeas.
10. El hallazgo de ADN de *C. burnetii* en tres ratones capturados en el entorno de explotaciones ganaderas, sugiere la participación de los micromamíferos domésticos y silvestres en el ciclo doméstico de la Fiebre Q, especialmente *Mus domesticus*, en los que se ha detectado el agente en un 7% de los ejemplares analizados. Por el contrario, los micromamíferos no parecen formar parte del ciclo de *Rickettsia* sp. en la naturaleza.
11. De este trabajo se desprenden varios interrogantes que requieren nuevas investigaciones, por ejemplo, el conocer el significado biológico de la amplia distribución de *Borrelia* sp. R57 en *Myodes glareolus* y *A. sylvaticus*. También el investigar el significado de la detección de ADN de *A. phagocytophilum* y *B. burgdorferi* en especies de garrapatas no consideradas vectoras de estos agentes,

así como el encontrar explicaciones a la ausencia de agentes potencialmente transmitidos por *I. ricinus* (como algunas especies de *Rickettsia*) y que a pesar de la abundancia del vector en el medio y del número representativo de ejemplares analizados, no han sido detectados todavía en el País Vasco.

VI. RESUMEN, ABSTRACT

El presente trabajo de Tesis Doctoral esta integrado por cinco estudios sobre enfermedades transmitidas por garrapatas en las poblaciones de ixódidos y en los micromamíferos del Norte de España.

El clima y la vegetación en la Península Ibérica cambian gradualmente entre el norte y sur, afectando a la distribución de las garrapatas y consecuentemente a las enfermedades que transmiten. Con el objetivo de conocer las diferentes especies de garrapatas exófilas presentes en dos regiones de España con condiciones climatológicas y de vegetación totalmente diferentes se llevo a cabo el **Estudio 1**. Para ello, se seleccionaron 18 áreas de muestreo, 10 situadas en el Norte (País Vasco) y 8 en el Centro (Madrid y Toledo), donde mensualmente a lo largo de dos años, se realizaron las capturas. Para poder comparar los resultados de ambas regiones se empleó similar metodología, siendo la técnica seleccionada el arrastre de la manta por la vegetación. Estos muestreos permitieron capturar 12 especies diferentes de ixódidos, pertenecientes a los géneros *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Rhipicephalus*, *Hyalomma* y *Dermacentor*. La distribución de las especies fue muy diferente entre ambas regiones, en el Norte, *Ixodes ricinus* y *Haemaphysalis punctata* fueron las especies más abundantes, mientras que en el Centro predominaron *Hyalomma lusitanicum* y *Dermacentor marginatus*. También se observó una clara diferencia en la abundancia de los diferentes estadios de los ixódidos, así, mientras que en la zona Centro el mayor índice de abundancia se obtuvo para los adultos, con un ratio 14:1:10 entre adultos, ninfas y larvas, en el Norte los estadios inmaduros predominaron sobre los adultos, siendo el ratio 1:12:99. De las 12 especies identificadas, 4 de ellas (*I. ricinus*, *H. punctata*, *D. marginatus* y *Rhipicephalus bursa*) se capturaron en ambas regiones. En el Norte se recogieron también de forma regular ejemplares de las especies *Haemaphysalis inermis*, *Haemaphysalis concinna* y *D. reticulatus*, mientras que en el Centro se encontraron frecuentemente individuos de la especie *Rhipicephalus pusillus*. Las diferentes especies capturadas mostraron importantes diferencias en su estacionalidad. Así, los estadios adultos y las ninfas de *I. ricinus* fueron más abundantes entre abril y junio, y las larvas entre mayo y septiembre. Los adultos de las especies *H. punctata* y *H. inermis* estuvieron más activos durante los meses fríos, mientras que los de *H. concinna* fueron capturados entre mayo y septiembre. Las dos especies de *Dermacentor* fueron más abundantes en otoño e invierno, mientras que los adultos de *H. lusitanicum* y de *R. pusillus* únicamente fueron capturados al final de la primavera y al comienzo del verano, con la máxima abundancia en los meses de junio y julio. Todas las áreas de muestreo eran lugares frecuentadas tanto por personas como por animales silvestres y/o domésticos. Las principales especies del centro de España, *D. marginatus*, *H. lusitanicum* y *R. pusillus*, mostraron una asociación positiva con la abundancia de conejos silvestres. Mientras en el Norte, la abundancia de *I. ricinus*

fue significativamente superior en aquellas zonas con presencia de varias especies de ganado doméstico y de animales silvestres (cérvidos, jabalíes y carnívoros). Además, la presencia de jabalíes y de carnívoros silvestres también estuvo asociada positivamente con *H. punctata*, y *D. reticulatus* fue más abundante en las zonas con presencia de carnívoros silvestres. El resto de especies no mostraron ninguna asociación con la abundancia de animales en las zonas de muestreo.

El desarrollo del **Estudio 2**, permitió comparar la evolución a lo largo del tiempo de la abundancia de los ixódidos en la vegetación del País Vasco. Para ello se realizaron dos estudios de doce meses de duración en dos periodos diferentes, el primero de ellos en 1992-93 y el segundo en 2003-04. Durante el primer periodo se muestrearon 37 áreas y 10 en el segundo, siendo 7 de las áreas comunes a ambos periodos. La técnica empleada para la captura de garrapatas fue el arrastre de la manta. En total se identificaron 11 especies diferentes, siendo *H. punctata* la más abundante entre los adultos en 1992-93, e *I. ricinus* la especie predominante en 2003-04 y entre los estadios inmaduros del primer periodo. Un hecho destacable en el segundo periodo, fue la identificación de una población estable de garrapatas de la especie *H. concinna* en uno de los puntos. Este punto también fue muestreado durante el primer periodo, resultando negativo a la presencia de *H. concinna* por lo que cabría pensar que se trata de una especie de nueva introducción en el País Vasco. En cuanto a la abundancia de los ixódidos, los índices de abundancia obtenidos fueron superiores en 2003-04, tanto en las 7 áreas comunes como para el conjunto de zonas muestreadas. Este incremento se asoció al hecho de que las temperaturas del invierno de 2003 fueran más suaves que las de 1992. Se pudo comprobar que la mayor abundancia de garrapatas estuvo positivamente asociada a la interacción entre la temperatura ambiental en el momento del muestreo y las precipitaciones registradas durante los siete días previos. Asimismo, se observó que las capturas en las áreas situadas a menor altitud fueron superiores a las de las zonas altas, y también en las zonas forestales con respecto a los pastizales, e inferior en las áreas recreativas con respecto a zonas menos humanizadas.

Los estudios realizados hasta el momento habían puesto de manifiesto que la especie de ixódido más abundante del País Vasco era *I. ricinus*, reconocido vector y reservorio del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBE). Esta enfermedad está considerada como endémica en numerosas regiones europeas donde *I. ricinus* es abundante, sin embargo, hasta la fecha no ha sido diagnosticado ningún caso en España. La presencia del virus de la TBE (TBEV) en una determinada zona no solo depende de la presencia del vector, si no que también es necesario que se den unas condiciones climatológicas particulares, que permitan durante la primavera el inicio conjunto de la actividad de las larvas y las ninfas de *I. ricinus*. Esta sincronía permite que ambos

estadios se alimenten al mismo tiempo en los roedores, facilitando la transmisión del TBEV de las ninfas infectadas a las larvas no infectadas. Con el objetivo de comprobar si en el norte de España se dan las condiciones necesarias que permitan esta sincronía, y si había ejemplares adultos y/o ninfas infectadas por el virus, se llevo cabo el **Estudio 3**. Para ello, desde marzo de 2006 hasta octubre de 2008, con una periodicidad mensual, se realizaron 182 muestreos de garrapatas de vegetación en seis zonas del norte de España, cuatro situadas en el País Vasco y dos en La Rioja. *I. ricinus* fue la especie predominante en todas las zonas, siendo su abundancia significativamente superior el primer año comparando con el segundo y tercer año. Al igual que sucedió en los dos estudios previos, los adultos y las ninfas mostraron su máxima actividad entre los meses de abril y julio, mientras que las larvas presentaron su pico de actividad entre mayo y septiembre. Se pudo observar la existencia de buena sincronía entre las larvas y las ninfas únicamente en los dos puntos de La Rioja, y durante los dos primeros años, donde coincidió que la media mensual de las temperaturas máximas durante el invierno 2006-07 fue inferior a 10°C (umbral del inicio de la actividad de las larvas en primavera). Para comprobar la posible presencia del TBEV en las zonas de muestreo, se analizaron mediante RT-PCR a tiempo real 630 *I. ricinus* adultos de forma individual, y 1800 ninfas en lotes de 5 ejemplares, siendo el resultado negativo para todas las muestras. En vista de los resultados obtenidos en este estudio, se pudo concluir que en estas zonas del norte de España el TBEV no está presente en las garrapatas, o al menos su prevalencia es muy baja, además se ha podido comprobar que no se dan las condiciones adecuadas para el mantenimiento del virus en la naturaleza.

Los ixódidos además de ser vectores del TBEV, también son capaces de transmitir numerosas bacterias zoonóticas como por ejemplo *Borrelia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, *Coxiella burnetii* o diversas rickettsias del grupo de las fiebres manchadas (GFM). Con el objetivo de conocer mejor la prevalencia de estos agentes en los ixódidos del País Vasco se desarrolló el **Estudio 4**. Para ello se analizaron de forma individual, mediante PCR multiplex y RLB, un total de 691 garrapatas adultas recogidas durante el Estudio 1, pertenecientes a las 6 especies de ixódidos más abundantes en la vegetación de esta región: *I. ricinus* (288), *H. punctata* (109), *H. inermis* (95), *H. concinna* (52), *D. reticulatus* (97) y *R. bursa* (50). En 77 de los ixódidos procesados se detectó la presencia de ADN de alguno de los cuatro patógenos estudiados, no encontrándose ninguna infección mixta. El patógeno más prevalente fue una rickettsia del GFM, identificada mediante secuenciación del gen de la citrato sintasa (*gltA*) como *Rickettsia* sp. RpA4/DnS14 (posteriormente denominada *Rickettsia raoultii*). Esta rickettsia fue detectada en garrapatas de la especie *D. reticulatus*, en 48 de los 97 ejemplares analizados, recogidos en 8 de las 10 áreas recreativas. *A. phagocytophilum* fue el

segundo agente más abundante, identificándose principalmente en *I. ricinus* (5,6%), procedentes de 6 zonas diferentes, pero también en *H. punctata*, *H. concinna* y en *R. bursa*. El ADN de *Borrelia* spp. se detectó en 5 *I. ricinus* y en 3 *H. punctata*. Los posteriores análisis de PCR-RLB específicos para *B. burgdorferi* sensu lato permitieron identificar la presencia de *B. burgdorferi* sensu stricto en un *H. punctata*, y *B. afzelii* y *B. garinii* en dos *I. ricinus*. Finalmente, *C. burnetii* únicamente fue detectada en un ejemplar de *H. punctata*. Los resultados obtenidos en este estudio muestran que *R. raoultii*, rickettsia perteneciente al GFM que ha sido implicada en casos de rickettsiosis (TIBOLA/DEBONEL), se encuentra bien establecida en esta región y puede representar un riesgo para la población principalmente durante el otoño y el invierno, cuando *D. reticulatus* es más abundante. Por otro lado, podríamos considerar el verano como la época del año de mayor riesgo de infección por *A. phagocytophilum* y *B. burgdorferi* sensu lato, coincidiendo con la mayor abundancia de *I. ricinus*.

Con el objetivo de conocer mejor el papel de los micromamíferos silvestres y domésticos del País Vasco como posibles reservorios de los agentes bacterianos estudiados con anterioridad en las garrapatas, se llevo a cabo el **Estudio 5**. Así, se analizó la prevalencia de los patógenos mediante PCR multiplex y RLB en micromamíferos capturados alrededor de varias granjas ovinas y en algunas de las áreas recreativas muestreadas en el Estudio 1. Se capturaron 334 micromamíferos pertenecientes a 7 especies diferentes, siendo *Apodemus sylvaticus* (69,8%) la especie más abundante. También se procedió a la captura de topos, obteniendo un total de 30 ejemplares. El análisis de 253 animales (162 *A. sylvaticus*, 3 *Apodemus flavicollis*, 6 *Crocidura russula*, 16 *Myodes glareolus*, 28 *Mus domesticus*, 14 *Sorex coronatus* y 24 *Talpa europaea*) mostró una prevalencia de infección que varió entre el 10,7% y el 68,8%, dependiendo de la especie de micromamífero analizada. El ADN de *Borrelia* spp. fue detectado en 67 animales, la mayoría de los cuales (62) hibridaron también con la sonda específica de *Borrelia* sp. R57, la nueva especie de borrelia identificada previamente en los micromamíferos de esta región. El análisis posterior con la PCR-RLB específica para *B. burgdorferi* sensu lato, permitió identificar la presencia de *B. afzelii* en dos *S. coronatus* y en un *M. glareolus*; siendo esta la primera ocasión en la que se implica a la especie *S. coronatus* como posible reservorio de la enfermedad de Lyme. *C. burnetii*, fue identificado en 3 micromamíferos (2 *M. domesticus* y 1 *A. sylvaticus*) capturados en una granja ovina que previamente había tenido casos de abortos, por lo que se podría pensar que los ratones pudieron infectarse por el contacto con las ovejas. El ADN de *A. phagocytophilum* fue detectado en 2 animales, un ejemplar de *A. sylvaticus* y otro de *C. russula*, siendo también la primera ocasión en la que se describe la presencia

este agente en esta especie de musaraña. En ninguno de los animales se detectó la presencia de ADN de la rickettsias del GFM.

Por lo tanto, podemos concluir que los diferentes estudios realizados han permitido conocer mejor el papel de los ixódidos del País Vasco como posibles vectores de varias enfermedades que pueden afectar tanto a la población humana como a la animal (doméstica y silvestre). Asimismo, se ha puesto de manifiesto el importante papel de los micromamíferos de esta región, como reservorios de algunas bacterias zoonóticas transmitidas por garrapatas.

This PhD Thesis includes five studies on different aspects of ixodid tick-borne diseases and small-mammals in northern Spain.

Climate and vegetation in the Iberian Peninsula gradually changes from North to South thus affecting tick distribution and, consequently, the presence of tick-borne diseases. **Study 1** was conducted with the aim of investigating the distribution of the different exophilic questing tick species present in two Spanish regions with very different climate and vegetation characteristics. Eighteen sampling points were selected, 10 located in Northern Spain (Basque Country) and 8 in Central Spain (Madrid and Toledo), and ticks were collected on monthly bases during two years using the same methodology, sampling vegetation by blanket dragging for 20-30 min intervals. A total of 12 species belonging to the genera *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Rhipicephalus*, *Dermacentor* and *Hyalomma* were identified. Differences in species distribution and prevalence were soundly different between the two regions. The most frequent and abundant species in Northern Spain were *Ixodes ricinus* and *Haemaphysalis punctata*, whereas *Hyalomma lusitanicum* and *Dermacentor marginatus* were the most abundant in Central Spain. Abundance of the different immature stages was also clearly different. Hence, while in Central Spain abundance index was higher for adults, with a ratio of 14:1:10 for adults, nymphs and larvae, in Northern Spain immature stages were more prevalent, with a ratio of 1:12:99. Four of the 12 tick species identified (*I. ricinus*, *H. punctata*, *D. marginatus* y *Rhipicephalus bursa*) were captured in both regions. In addition, *Haemaphysalis inermis*, *Haemaphysalis concinna* and *D. reticulatus* specimens were regularly collected in Northern Spain, and *Rhipicephalus pusillus* in Central Spain. Different tick species showed marked differences in seasonality patterns. Thus, *I. ricinus* adults and nymphs were more abundant in April – June, and larvae in May – September. *H. punctata* and *H. inermis* adults were more active in colder months, whereas *H. concinna* adults were captured between May and September. Both *Dermacentor* species (*D. marginatus* and *D. reticulatus*) were more abundant in autumn and winter, and *H. lusitanicum* and *R. pusillus* adults were only collected at the end of spring and beginning of summer, with maximum peaks in June and July. All sampled areas were frequented by people and animals, both livestock and wildlife. An association was found between the species found in Central Spain, *D. marginatus*, *H. lusitanicum* and *R. pusillus*, and presence of wild rabbits. In the North, *I. ricinus* abundance was significantly higher in areas where several livestock species and wildlife (deer, wild boar and carnivores) were present. Presence of wild boar and carnivores was also associated with *H. punctata*, and *D. reticulatus* was more abundant in areas with wild carnivores. No associations with animal abundance were found for the remaining tick species.

Study 2 allowed us to compare the evolution of the abundance of ixodid ticks in the vegetation in the Basque Country in two different one-year sampling periods 10 years apart, one that had been conducted in the past (1992-93) and another carried out during the course of this Thesis (2003-04). Thirty seven sites were sampled during the first period (1992-93) and 10 during the second (2003-2004), being 7 of them common to both periods. Again, blanket dragging was the method used to collect questing ticks from the vegetation. Eleven different species were identified, being *H. punctata* the most abundant in 1992-93, and *I. ricinus* in 2003-04 and among the immature stages collected during the first period. During the second period an established population of *H. concinna* was detected in one of the sampling sites, which had also been sampled during the first period but with negative results. The presence of this species only in the second period might indicate that *H. concinna* has been recently introduced in the Basque Country. Tick abundance was higher in 2003-04 than in 1992-93, both for the 7 common sites and for all the sites sampled each year. This increase was associated with milder winter temperatures in 2003-04. Tick collection rates were positively associated with the interaction between ambient temperature at sampling and rainfall 7 days prior to sampling. Collection rates were also higher at medium rather than higher altitude, in forested areas than in open grasslands and lower in recreational areas than elsewhere.

I. ricinus, the main ixodid tick species in the Basque Country, is both the vector and the reservoir of the tick-borne encephalitis (TBE) virus. TBE is considered an endemic disease in some European regions where the vector is well distributed; however, so far, no human clinical cases of TBE have ever been diagnosed in Spain. The establishment of TBE virus (TBEV) in a particular area requires both the presence of the vector and some particular climatic conditions that permit larvae and nymphs of *I. ricinus* start their activity in spring in synchrony. This synchrony allows ticks to co-feed on the same rodent host, facilitating transmission of TBEV between infected nymphs and non-infected larvae. **Study 3** was conducted with the objective to investigate if the necessary conditions exist in Northern Spain for this synchrony to occur. From March 2006 to October 2008, 182 tick samplings were carried out on a monthly basis in six field sites from Northern Spain, four of them located in the Basque Country and two in La Rioja. *I. ricinus* was the predominant tick species, with higher abundance the first year compared with the second and third years. As happened in the two previous studies, adults and nymphs were more active between April and June, whereas the peak of larvae appeared between May and September. Good synchrony between larvae and nymphs was observed only in the two sampling sites from La Rioja, where 2006-07 winter mean maximum temperatures were below 10°C (larvae activity threshold), but this synchrony was not maintained during the third year. With the aim to investigate if TBEV was present in this part of Spain, 630 adults

processed individually and 1800 nymphs, in pools of five, were analysed by real-time RT-PCR, and all of them were negative. We therefore concluded that TBEV prevalence is either very low or absent in the investigated regions in Northern Spain and current conditions there do not seem to favour TBEV maintenance.

Ixodid ticks are also important vectors of various zoonotic bacteria as *Borrelia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, *Coxiella burnetii* or some spotted fever group (SFG) rickettsiae. **Study 4** was conducted to assess the infection prevalence of these zoonotic pathogens in ixodid ticks from the Basque Country. A total of 691 questing adult ticks of the six species more abundant in the vegetation of this region (288 *I. ricinus*, 109 *H. punctata*, 95 *H. inermis*, 52 *H. concinna*, 97 *D. reticulatus* and 50 *R. bursa*), collected during the course of Study 1, were individually tested by multiplex PCR and RLB. Seventy seven of the processed ticks were positive, but mixed infections were not found. The most prevalent detected pathogen was a rickettsia of the SFG, identified by sequencing of the citrate synthase (*gltA*) gene as *Rickettsia* sp. RpA4/DnS14 (later named *R. raoultii*). This rickettsia was detected in 48 of 97 analysed *D. reticulatus* ticks, which had been collected in eight of the ten recreational areas sampled. *A. phagocytophilum* was the second most abundant pathogen, detected mainly in *I. ricinus* ticks (5.6%) from six recreational areas, but also in *H. punctata*, *H. concinna* and *R. bursa*. DNA of *Borrelia* spp. was detected in five *I. ricinus* and in three *H. punctata*. Furthermore, PCR-RLB analysis detected one *H. punctata* with positive hybridization to the *B. burgdorferi* sensu stricto probe, and two *I. ricinus* positive for *B. afzelii* and *B. garinii*. *C. burnetii* was detected in only one specimen of *H. punctata*. Results of this study indicated that *R. raoultii*, a rickettsia involved in human clinical cases of rickettsiosis (TIBOLA/DEBONEL), is well established in this region and could present a risk for human infection mainly in autumn and winter seasons, when *D. reticulatus* is more abundant. On the other hand, summer represents the season of the year of greater risk for *A. phagocytophilum* and *B. burgdorferi* sensu lato infection when *I. ricinus* is more abundant.

Study 5 was conducted with the purpose of assessing the role of small mammals as reservoir host for the tick-borne bacteria previously studied in ticks. The prevalence of these pathogens was assessed using multiplex PCR and RLB in small mammals captured in areas surrounding sheep farms and in the recreational parks sampled in Study 1. A total of 334 small mammals belonging to seven species were trapped. *Apodemus sylvaticus* was the most frequently found species (69.8%). Moles (*Talpa* spp.) were also trapped, and 30 specimens were captured. Pools of tissues of 253 animals (162 *A. sylvaticus*, 3 *Apodemus flavicollis*, 6 *Crocidura russula*, 16 *Myodes glareolus*, 28 *Mus domesticus*, 14 *Sorex coronatus* and 24 *Talpa europaea*) were analysed. The results showed an infection rate ranging from 10.7% to 68.8%, depending on the small mammal

species. DNA of *Borrelia* spp. was detected in 67 animals, most of them (62) hybridized with the probe for *Borrelia* sp. R57, the new *Borrelia* previously detected in small mammals of this region. Furthermore, a second PCR and RLB hybridization specific for *B. burgdorferi* sensu lato revealed the presence of *B. afzelii* in two *S. coronatus* shrews and in one *M. glareolus* vole. This is the first time that this shrew species has been involved as possible reservoir of Lyme disease. *C. burnetii* was detected in three rodents (2 *M. domesticus* and 1 *A. sylvaticus*) captured in a farm with previous reports of abortion. This result suggests that mice could have acquired the infection by direct contact with infected sheep. DNA of *A. phagocytophilum* was detected in two animals, one *A. sylvaticus* and one *C. russula*, being this the first time that the presence of this pathogen is reported in this shrew species. All small mammals were negative for SFG rickettsiae.

In summary, these five studies provided a better knowledge of the role of ixodid ticks as vectors of several tick-borne diseases that affect humans and/or animals (wilds and domestics), and highlighted the relevance of small mammals as reservoirs of some tick-borne zoonotic bacteria in Northern Spain.

VII. ANEXOS

ANEXO I: FICHA DE CAMPO – MUESTREO DE GARRAPATAS DE VEGETACIÓN

<i>MUESTREO DE GARRAPATAS EN VEGETACION</i>				
Punto de muestreo:		Provincia:		
Número de muestreo:		Fecha de muestreo:		
Hora inicio:				
T ^a ambiente:		T ^a suelo:		
Humedad relativa ambiente (%):		Humedad relativa suelo (%):		
Tipo de día (X):	Soleado:	Nublado:	Lluvia:	Nieve:
Estado del suelo:	Seco:	Mojado:	Encharcado:	Nevado:
Viento: Ausencia:	Leve:	Moderado:	Fuerte:	
Altura de vegetación:	Alta (>30cm):	Media (15-30):	Baja (<15cm):	
Presencia de animales:	Vacuno	Equino	Ovino	Otros
Incidencias:				
Persona que realiza el muestreo:				

Ficha de campo donde se anotan las condiciones medioambientales observadas durante el muestreo de garrapatas de la vegetación.

ANEXO III: ENVIO DEL ARTÍCULO 1 A LA REVISTA “JOURNAL OF MEDICAL ENTOMOLOGY” (13/09/2009)

Mensaje original-----

De: system@rapidreview.com [<mailto:system@rapidreview.com>] En nombre de pubs@entsoc.org Enviado el: martes, 23 de marzo de 2010 18:02
Para: agarcia@neiker.net
Asunto: Manuscript Submission

You have successfully submitted your manuscript via the Rapid Review system.

Your Manuscript Number is: ME-10-079 Version 1.

Take note of this number for future reference. You can log on to the Rapid Review system at any time to see the current status of your manuscript(s). The web address is <http://www.rapidreview.com/ESA2/CALogon.jsp> and your username is anagarcia.

If you wish to contact the journal office, here's how:

Journal of Medical Entomology
10001 Dereewood Lane, Suite 100
Lanham, Maryland 20706-4876
Phone: 301-731-4535
Fax: 301-731-4538
Email: pubs@entsoc.org

Thank you for your submission.

Managing Editor
Journal of Medical Entomology

ANEXO IV: ACEPTACIÓN DEL ARTÍCULO 3 ENVIADO A LA REVISTA "VECTOR-BORNE AND ZONOTIC DISEASES" (13/09/2009)

-Mensaje original-----

De: onbehalfof+sthiggs+utmb.edu@manuscriptcentral.com

[<mailto:onbehalfof+sthiggs+utmb.edu@manuscriptcentral.com>] En nombre de sthiggs@utmb.edu Enviado el: viernes, 13 de noviembre de 2009 19:24

Para: agarcia@neiker.net

Asunto: Vector-Borne and Zoonotic Diseases - Decision on Manuscript ID VBZ-2009-0148.R1

13-Nov-2009

Dear Dr. Garcia-Perez:

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "SEASONAL DYNAMICS OF IXODES RICINUS IN A THREE YEAR PERIOD IN NORTHERN SPAIN. FIRST SURVEY ON THE PRESENCE OF TICK-BORNE ENCEPHALITIS VIRUS" in its current form for publication in Vector-Borne and Zoonotic Diseases. The comments of the reviewer(s) who reviewed your manuscript are included at the foot of this letter.

The Copyright Agreement form attached to this email should be sent to the publisher as soon as possible. Manuscripts cannot be published without this form. The corresponding author is responsible for obtaining signatures of coauthors. Authors not permitted to release copyright must still return the form signed under the statement of the reason for not releasing the copyright.

Please fax the Copyright Agreement form to 914-740-2101.

If preferred, the Copyright Agreement form may be completed electronically and emailed to copyrightforms@liebertpub.com.

Authors who would like their papers to be made free online immediately after publication can sign up for Liebert Open Option for a one-time fee. If the paper has NIH funding, it will also be uploaded onto PubMedCentral on behalf of the author. Please contact Karen Ballen at kballen@liebertpub.com or at (914) 740-2194 for more information.

Thank you for your fine contribution. On behalf of the Editors of Vector-Borne and Zoonotic Diseases, we look forward to your continued contributions to the Journal.

Sincerely,

Dr. Stephen Higgs
Editor-in-Chief, Vector-Borne and Zoonotic Diseases

VIII. BIBLIOGRAFIA

- Aguero-Rosenfeld, M.E. Laboratory aspects of tick-borne diseases: lyme, human granulocytic ehrlichiosis and babesiosis. **Mt Sinai J Med** 2003; 70:197-206.
- Aguirrebengoa, K.; Portillo, A.; Santibanez, S. y cols. Human *Rickettsia sibirica mongolitimonae* infection, Spain. **Emerg Infect Dis** 2008; 14:528-529.
- Alberdi, M.P.; Walker, A.R.; Urquhart, K.A. Field evidence that roe deer (*Capreolus capreolus*) are a natural host for *Ehrlichia phagocytophila*. **Epidemiol Infect** 2000; 124:315-323.
- Almeria, S.; Castella, J.; Ferrer, D. y cols. Bovine piroplasms in Minorca (Balearic Islands, Spain): a comparison of PCR-based and light microscopy detection. **Vet Parasitol** 2001; 99:249-259.
- Alvarez, J.; Bea, A.; Faus, J.M. y cols. Atlas de los vertebrados continentales de Alava, Vizcaya y Guipúzcoa. Vitoria: Gobierno Vasco, Viceconsejería de Medio Ambiente; 1986.
- Amusategui, I.; Tesouro, M.A.; Kakoma, I. y cols. Serological reactivity to *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Neorickettsia risticii*, *Borrelia burgdorferi* and *Rickettsia conorii* in dogs from northwestern Spain. **Vector Borne Zoonotic Dis** 2008; 8:797-803.
- Anda, P.; Rodríguez, I.; de la Loma, A. y cols. A Serological Survey and Review of Clinical Lyme Borreliosis in Spain. **Clin Infect Dis** 1993; 16:310-319.
- Anda, P.; Sanchez Yebra, W.; Vitutia, M.M. y cols. A new *Borrelia* species isolated from patients with relapsing fever in Spain. **Lancet** 1996; 348:162-165.
- Anderson, J.F. y Magnarelli, L.A. Biology of ticks. **Infect Dis Clin North Am** 2008; 22:195-215.
- Angelov, L.; Dimova, P.; Berbencova, W. Clinical and laboratory evidence of the importance of the tick *D. marginatus* as a vector *B. burgdorferi* in some areas of sporadic Lyme disease in Bulgaria. **Eur J Epidemiol** 1996; 12:499-502.
- Anton, E.; Nogueras, M.M.; Pons, I. y cols. *Rickettsia slovaca* infection in humans in the northeast of Spain: seroprevalence study. **Vector Borne Zoonotic Dis** 2008; 8:689-694.
- Apanaskevich, D.A.; Santos-Silva, M.M.; Horak, I.G. The genus *Hyalomma* Koch, 1844. IV. Redescription of all parasitic stages of *H. (Euhyalomma) lusitanicum* Koch, 1844 and the adults of *H. (E.) franchinii* Tonelli Rondelli, 1932 (acar: ixodidae) with a first description of its immature stages. **Folia Parasitol (Praha)** 2008; 55:61-74.
- Ariznabarreta, A.; García-Pérez, A.L.; García-Sanmartín, M.J. y cols. Estudio clínico de brotes de sarna psoróptica en rebaños ovinos del País Vasco. En: XXVII Jornadas Científicas y VI Jornadas Internacionales de la Sociedad española de Ovinotecnia y Caprinotecnia. 2002;494-497.
- Arricau-Bouvery, N.; Hauck, Y.; Bejaoui, A. y cols. Molecular characterization of *Coxiella burnetii* isolates by infrequent restriction site-PCR and MLVA typing. **BMC Microbiol** 2006; 6:38
- Arricau-Bouvery, N. y Rodolakis, A. Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? **Vet Res** 2005; 36:327-349.
- Arteaga, F. y Garcia-Monco, J.C. [Association of Lyme disease with work and leisure activities]. **Enferm Infecc Microbiol Clin** 1998; 16:265-268.
- Arteaga, F.; Golightly, M.G.; Garcia, P.A. y cols. Disparity between serological reactivity to *Borrelia burgdorferi* and evidence of past disease in a high-risk group. **Clin Infect Dis** 1998; 27:1210-1213.
- Astobiza, I.; Barral, M.; Ruiz-Fons, F. y cols. Investigation of *Coxiella burnetii* occurrence in wildlife and ticks. **Vet Microbiol** 2010;(Enviado)

- Avsic-Zupanc, T.; Poljak, M.; Maticic, M. y cols. Laboratory acquired tick-borne meningoencephalitis: characterisation of virus strains. **Clin Diagn Virol** 1995; 4:51-59.
- Ayres, J.G.; Flint, N.; Smith, E.G. y cols. Post-infection fatigue syndrome following Q fever. **QJM** 1998; 91:105-123.
- Azad, A.F. y Radulovic, S. Pathogenic rickettsiae as bioterrorism agents. **Ann N Y Acad Sci** 2003; 990:734-738.
- Bakken, J.S. y Dumler, J.S. Human granulocytic ehrlichiosis. **Clin Infect Dis** 2000; 31:554-560.
- Barandika, J.F.; Berriatua, E.; Barral, M. y cols. Risk factors associated with ixodid tick species distributions in the Basque region in Spain. **Med Vet Entomol** 2006; 20:177-188.
- Barandika, J.F.; Hurtado, A.; Garcia-Esteban, C. y cols. Tick-borne zoonotic bacteria in wild and domestic small mammals in northern Spain. **Appl Environ Microbiol** 2007; 73:6166-6171.
- Barandika, J.F.; Hurtado, A.; Garcia-Sanmartin, J. y cols. Prevalence of Tick-Borne Zoonotic Bacteria in Questing Adult Ticks from Northern Spain. **Vector Borne Zoonotic Dis** 2008; 8:829-835.
- Baranton, G.; Postic, D.; Saint-Girons, I. y cols. Delineation of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia garinii* sp. nov., and group VS461 associated with Lyme borreliosis. **Int J Syst Bacteriol** 1992; 42:378-383.
- Barbour, A.G. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. **Yale J Biol Med** 1984; 57:521-525.
- Barbour, A.G.; Tessier, S.L.; Todd, W.J. Lyme disease spirochetes and ixodid tick spirochetes share a common surface antigenic determinant defined by a monoclonal antibody. **Infect Immun** 1983; 41:795-804.
- Barral, M. Estudio de la infección por *Borrelia burgdorferi*, grupo *Ehrlichia phagocytophila* y virus de la encefalitis ovina en las poblaciones de ixódidos de la Comunidad Autónoma Vasca. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza. España; 1998.
- Barral, M.; Benedicto, L.; Gil, H. y cols. Detection of *Ehrlichia phagocytophila* DNA in *Ixodes ricinus* from areas in the North of Spain. En "**Rickettsiae and rickettsial diseases at the turn of the third millenium**" Raoult,D and Brouqui,P Ed Elsevier 1999;428-431.
- Barral,M.; García-Pérez,A.L.; Juste,R.A.y cols. Distribución y actividad de los Ixódidos presentes en la vegetación de la Comunidad Autónoma Vasca 1993.
- Barral, M.; Garcia-Perez, A.L.; Juste, R.A. y cols. Distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) ticks from the Basque Country, Spain. **J Med Entomol** 2002; 39:177-184.
- Bauerfeind, R.; Kreis, U.; Weiss, R. y cols. Detection of *Borrelia burgdorferi* in urine specimens from dogs by a nested polymerase chain reaction. **Zentralbl Bakteriol** 1998; 287:347-361.
- Beati, L.; Peter, O.; Burgdorfer, W. y cols. Confirmation that *Rickettsia helvetica* sp. nov. is a distinct species of the spotted fever group of rickettsiae. **Int J Syst Bacteriol** 1993; 43:521-526.
- Beati, L. y Raoult, D. *Rickettsia massiliae* sp. nov., a new spotted fever group Rickettsia. **Int J Syst Bacteriol** 1993; 43:839-840.
- Beati, L.; Roux, V.; Ortuno, A. y cols. Phenotypic and genotypic characterization of spotted fever group Rickettsiae isolated from Catalan *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **J Clin Microbiol** 1996; 34:2688-2694.

- Beceiro, A.; Zuniga, C.; Guerrero, A. Low incidence of Lyme's disease in Northwestern Galicia. **Enferm Infecc Microbiol Clin** 2001; 19:505
- Bekker, C.P.; de Vos, S.; Taoufik, A. y cols. Simultaneous detection of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in ruminants and detection of *Ehrlichia ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks by reverse line blot hybridization. **Vet Microbiol** 2002; 89:223-238.
- Beninati, T.; Lo, N.; Noda, H. y cols. First detection of spotted fever group rickettsiae in *Ixodes ricinus* from Italy. **Emerg Infect Dis** 2002; 8:983-986.
- Bennett, S.G.; Comer, J.A.; Smith, H.M. y cols. Serologic evidence of a *Rickettsia akari*-like infection among wild-caught rodents in Orange County and humans in Los Angeles County, California. **J Vector Ecol** 2007; 32:198-201.
- Bergstrom, S.; Noppa, L.; Gylfe, A. y cols. Molecular and Cellular Biology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. In Lyme Borreliosis. Biology, Epidemiology and Control. Gray, J., Kahl, O., Lane, R. S., and Stanek, G. Oxon (Reino Unido): CABI Publishing; 2002: 47-90.
- Bernabeu-Wittel, M.; Del Toro, M.D.; Nogueras, M.M. y cols. Seroepidemiological study of *Rickettsia felis*, *Rickettsia typhi*, and *Rickettsia conorii* infection among the population of southern Spain. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** 2006a; 25:375-381.
- Bernabeu-Wittel, M.; Del Toro, M.D.; Nogueras, M.M. y cols. Presence of human past infections due to the Bar29 rickettsial strain in Southern Spain. **J Infect** 2006b; 52:e117-e119.
- Berri, M.; Rousset, E.; Champion, J.L. y cols. Ovine manure used as a garden fertiliser as a suspected source of human Q fever. **Vet Rec** 2003; 153:269-270.
- Bhide, M.R.; Curlik, J.; Travnicek, M. y cols. Protein A/G dependent ELISA a promising diagnostic tool in Lyme disease seroprevalence in game animals and hunting dogs. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis** 2004; 27:191-199.
- Bjoersdorff, A.; Bergstrom, S.; Massung, R.F. y cols. Ehrlichia-infected ticks on migrating birds. **Emerg Infect Dis** 2001; 7:877-879.
- Blanco, J.C. Mamíferos de España Barcelona, Spain: Planeta; 1998.
- Blanco, J.R. y Oteo, J.A. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. **Clin Microbiol Infect** 2002; 8:763-772.
- Bolaños, M.; Santana, O.E.; Perez-Arellano, J.L. y cols. Fiebre Q en Gran Canaria. Aportación de 40 nuevos casos. **Enferm Infecc Microbiol Clin** 2003; 21:20-23.
- Bown, K.J.; Begon, M.; Bennett, M. y cols. Seasonal dynamics of *Anaplasma phagocytophila* in a rodent-tick (*Ixodes trianguliceps*) system, United Kingdom. **Emerg Infect Dis** 2003; 9:63-70.
- Broker, M. y Gniel, D. New foci of tick-borne encephalitis virus in Europe: consequences for travellers from abroad. **Travel Med Infect Dis** 2003; 1:181-184.
- Brouqui, P.; Bacellar, F.; Baranton, G. y cols. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. **Clin Microbiol Infect** 2004; 10:1108-1132.
- Brouqui, P.; Parola, P.; Fournier, P.E. y cols. Spotted fever rickettsioses in southern and eastern Europe. **FEMS Immunol Med Microbiol** 2007; 49:2-12.
- Brown, S.L.; Hansen, S.L.; Langone, J.J. Role of serology in the diagnosis of Lyme disease. **JAMA** 1999; 282:62-66.
- Brump, E. Longevité du virus de la fièvre boutonnière (*Rickettsia conorii*, n. sp.) chez la tique *Rhipicephalus sanguineus*. **C R Soc Biol** 1932; 110:1197-1199.

- Buller, R.S.; Arens, M.; Hmiel, S.P. y cols. *Ehrlichia ewingii*, a newly recognized agent of human ehrlichiosis. **New Engl J Med** 1999; 341:148
- Bullova, E.; Lukan, M.; Stanko, M. y cols. Spatial distribution of *Dermacentor reticulatus* tick in Slovakia in the beginning of the 21st century. **Vet Parasitol** 2009; 165:357-360.
- Burgdorfer, W. Discovery of the Lyme disease spirochete and its relation to tick vectors. **Yale J Biol Med** 1984; 57:515-520.
- Burgdorfer, W.; Aeschlimann, A.; Peter, O. y cols. *Ixodes ricinus*: vector of a hitherto undescribed spotted fever group agent in Switzerland. **Acta Trop** 1979; 36:357-367.
- Burgdorfer, W.; Barbour, A.G.; Hayes, S.F. y cols. Lyme disease- a tick-borne spirochetosis? **Science** 1982; 216:1317-1319.
- Burgdorfer, W.; Lane, R.S.; Barbour, A.G. y cols. The western black-legged tick, *Ixodes pacificus*: a vector of *Borrelia burgdorferi*. **Am J Trop Med Hyg** 1985; 34:925-930.
- Burgess, E.C.; Wachal, M.D.; Cleven, T.D. *Borrelia burgdorferi* infection in dairy cows, rodents and bird from four Wisconsin dairy farms. **Vet Microbiol** 1993; 35:61-77.
- Burri, C.; Cadenas, F.M.; Douet, V. y cols. *Ixodes ricinus* density and infection prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato along a North-facing altitudinal gradient in the Rhone Valley (Switzerland). **Vector Borne Zoonotic Dis** 2007; 7:50-58.
- Burridge, M.J. y Simmons, L.A. Exotic ticks introduced into the United States on imported reptiles from 1962 to 2001 and their potential roles in international dissemination of diseases. **Vet Parasitol** 2003; 113:289-320.
- Cairns, K.; Brewer, M.; Lappin, M.R. Prevalence of *Coxiella burnetii* DNA in vaginal and uterine samples from healthy cats of north-central Colorado. **J Feline Med Surg** 2007; 9:196-201.
- Cardenosa, N.; Roux, V.; Font, B. y cols. Short report: isolation and identification of two spotted fever group rickettsial strains from patients in Catalonia, Spain. **Am J Trop Med Hyg** 2000; 62:142-144.
- Carroll, J.F. y Schmidtman, E.T. Tick sweep: modification of the tick drag-flag method for sampling nymphs of the deer tick (Acari: Ixodidae). **J Med Entomol** 1992; 29:352-355.
- Charrel, R.N.; Attoui, H.; Butenko, A.M. y cols. Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. **Clin Microbiol Infect** 2004; 10:1040-1055.
- Chastel, C.; Launay, H.; Rogues, G. y cols. Infection a arbovirus en Espagne: enquete serologique chez les petits mammiferes. **Bull Soc Pathol Exot** 1980; 73:384-390.
- Chen, S.M.; Dumler, J.S.; Bakken, J.S. y cols. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. **J Clin Microbiol** 1994a; 32:589-595.
- Chen, S.M.; Dumler, J.S.; Feng, H.M. y cols. Identification of the antigenic constituents of *Ehrlichia chaffeensis*. **Am J Trop Med Hyg** 1994b; 50:52-58.
- Christova, I. y Gladnishka, T. Prevalence of infection with *Francisella tularensis*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in rodents from an endemic focus of tularemia in Bulgaria. **Ann Agric Environ Med** 2005; 12:149-152.
- Cilek, J.E. y Olson, M.A. Seasonal distribution and abundance of ticks (Acari: ixodidae) in northwestern Florida. **J Med Entomol** 2000; 37:439-444.
- Cinco, M.; Barbone, F.; Grazia, C.M. y cols. Seroprevalence of tick-borne infections in forestry rangers from northeastern Italy. **Clin Microbiol Infect** 2004; 10:1056-1061.

- Cisak, E.; Chmielewska-Badora, J.; Zwolinski, J. y cols. Risk of tick-borne bacterial diseases among workers of Roztocze National Park (south-eastern Poland). **Ann Agric Environ Med** 2005; 12:127-132.
- Cisak, E.; Chmielewska-Badora, J.; Zwolinski, J. y cols. Study on Lyme borreliosis focus in the Lublin region (eastern Poland). **Ann Agric Environ Med** 2008; 15:327-332.
- Conor, A. y Bruch, A. Une fièvre éruptive observée en Tunisie. **Bull Soc Pathol Exot** 1910; 8:492-496.
- Cordero del Campillo, M.; Castañón Ordoñez, L.; Reguera Feo, A. Índice-catálogo de zooparásitos ibéricos. **León: Universidad, Secretariado de Publicaciones** 1994;
- Cotte, V.; Bonnet, S.; Cote, M. y cols. Prevalence of Five Pathogenic Agents in Questing *Ixodes ricinus* Ticks from Western France. **Vector Borne Zoonotic Dis** 2009;
- Cotty, A.; Aeschlimann, A.; Schneeberger, S. Distribution et fluctuation de populations d'*Ixodes ricinus* (L.), *Haemaphysalis punctata* (Can. & Fanz.) et *Dermacentor marginatus* (Sulzer) (Acarina, Ixodoidea) en Suisse. **J Invest Dermatol** 1986; 108:92-97.
- Courtney, J.W.; Dryden, R.L.; Wyleto, P. y cols. Characterization of *Anaplasma phagocytophila* and *Borrelia burgdorferi* genotypes in *Ixodes scapularis* ticks from Pennsylvania. **Ann N Y Acad Sci** 2003; 990:131-133.
- Crippa, M.; Rais, O.; Gern, L. Investigations on the mode and dynamics of transmission and infectivity of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Borrelia afzelii* in *Ixodes ricinus* ticks. **Vector Borne Zoonotic Dis** 2002; 2:3-9.
- Danica, T. The Significance of the Roe-Deer (*Capreolus capreolus* Linné, 1758) as the Host and Disseminator of Ixodid Ticks in SR Slovenia (Yugoslavia). **Bioloski Vestnik** 1988; 36:85-94.
- Danielova, V.; Holubova, J.; Daniel, M. Tick-borne encephalitis virus prevalence in *Ixodes ricinus* ticks collected in high risk habitats of the south-Bohemian region of the Czech Republic. **Exp Appl Acarol** 2002; 26:145-151.
- Daniels, T.J.; Battaly, G.R.; Liveris, D. y cols. Avian reservoirs of the agent of human granulocytic ehrlichiosis? **Emerg Infect Dis** 2002; 8:1524-1525.
- Dawson, J.E.; Anderson, B.E.; Fishbein, D.B. y cols. Isolation and characterization of an *Ehrlichia* sp. from a patient diagnosed with human ehrlichiosis. **J Clin Microbiol** 1991; 29:2741-2745.
- De La Fuente, J.; Naranjo, V.; Ruiz-Fons, F. y cols. Potential vertebrate reservoir hosts and invertebrate vectors of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in central Spain. **Vector Borne Zoonotic Dis** 2005; 5:390-401.
- De La Fuente, J.; Ruiz-Fons, F.; Naranjo, V. y cols. Evidence of *Anaplasma* infections in European roe deer (*Capreolus capreolus*) from southern Spain. **Res Vet Sci** 2008; 84:382-386.
- De Sousa, R.; Barata, C.; Vitorino, L. y cols. *Rickettsia sibirica* isolation from a patient and detection in ticks, Portugal. **Emerg Infect Dis** 2006; 12:1103-1108.
- Dennis, D.T. y Hayes, E.B. Epidemiology of Lyme Borreliosis. In Lyme Borreliosis. Biology, Epidemiology and Control. Gray, J., Kahl, O., Lane, R. S., and Stanek, G. Oxon (Reino Unido): CABI Publishing; 2002: 251-280.
- Derdakova, M.; Beati, L.; Pet'ko, B. y cols. Genetic variability within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies established by PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the rrfA-rrlB intergenic spacer in *Ixodes ricinus* ticks from the Czech Republic. **Appl Environ Microbiol** 2003a; 69:509-516.

- Derdakova, M.; Halanova, M.; Stanko, M. y cols. Molecular evidence for *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks from eastern Slovakia. **Ann Agric Environ Med** 2003b; 10:269-271.
- Dizij, A. y Kurtenbach, K. *Clethrionomys glareolus*, but not *Apodemus flavicollis*, acquires resistance to *Ixodes ricinus* L., the main European vector of *Borrelia burgdorferi*. **Parasite Immunol** 1995; 17:177-183.
- Dohoo, I.; Martin, W.; Stryhn, H. Veterinary Epidemiologic Research Charlottetown, Canada: 2003.
- Donoso, M.O.; Schadler, R.; Niedrig, M. A survey on cases of tick-borne encephalitis in European countries. **Euro Surveill** 2008; 13:
- Dressler, F.; Ackermann, R.; Steere, A.C. Antibody responses to the three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* in European Lyme Borreliosis. **J Infect Dis** 1994; 169:313-318.
- Dumler, J.S.; Choi, K.S.; Garcia-Garcia, J.C. y cols. Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. **Emerg Infect Dis** 2005; 11:1828-1834.
- Dumler, J.S.; Madigan, J.E.; Pusterla, N. y cols. Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. **Clin Infect Dis** 2007; 45 Suppl 1:S45-S51.
- Dumpis, U.; Crook, D.; Oksi, J. Tick-borne encephalitis. **Clin Infect Dis** 1999; 28:882-890.
- Ergunay, K.; Ozer, N.; Us, D. y cols. Seroprevalence of West Nile virus and tick-borne encephalitis virus in southeastern Turkey: first evidence for tick-borne encephalitis virus infections. **Vector Borne Zoonotic Dis** 2007; 7:157-161.
- Escudero, R.; Barral, M.; Perez, A. y cols. Molecular and pathogenic characterization of *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates from Spain. **J Clin Microbiol** 2000; 38:4026-4033.
- Espejo-Arenas, E. y Raoult, D. First isolates of *Rickettsia conorii* in Spain using a centrifugation-shell vial assay. **J Infect Dis** 1989; 159:1158-1159.
- Estrada-Peña, A. Las Garrapatas en España: Introducción Valladolid: Junta de Castilla y León. Consejería de Sanidad y Bienestar Social; 1994.
- Estrada-Peña, A. Distribution, abundance, and habitat preferences of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in northern Spain. **J Med Entomol** 2001; 38:361-370.
- Estrada-Peña, A.; Bouattour, A.; Camicas, J.L. y cols. Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region. Zaragoza: University of Zaragoza; 2004a.
- Estrada-Peña, A. y Jongejans, F. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. **Exp Appl Acarol** 1999; 23:685-715.
- Estrada-Peña, A.; Martínez, J.M.; Sánchez, A.C. y cols. Phenology of the tick, *Ixodes ricinus*, in its southern distribution range (central Spain). **Med Vet Entomol** 2004b; 18:387-397.
- Estrada-Peña, A.; Osacar, J.J.; Pichon, B. y cols. Hosts and pathogen detection for immature stages of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in North-Central Spain. **Exp Appl Acarol** 2005; 37:257-268.
- Estrada-Peña, A. y Estrada-Peña, R. Notes on *Dermacentor* ticks: redescription of *D. marginatus* with the synonymies of *D. niveus* and *D. daghestanicus* (Acari: Ixodidae). **J Med Entomol** 1991; 28:2-15.
- Estrada-Peña, A. y Oteo, J.A. Vectors of Lyme disease in Spain. **Research and Reviews in Parasitology** 1991; 51:101-102.
- Estrada-Peña, A.; Oteo, J.A.; Estrada-Peña, R. y cols. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in ticks (Acari: Ixodidae) from two different foci in Spain. **Exp Appl Acarol** 1995; 19:173-180.

- Estrada-Peña, A.; Quiez, J.; Sanchez, A.C. Species composition, distribution, and ecological preferences of the ticks of grazing sheep in north-central Spain. **Med Vet Entomol** 2004c; 18:123-133.
- Estrada-Peña, A.; Venzal, J.M.; Guglielmone, A.A. *Amblyomma dubitatum* Neumman: description of nymph and redescription of adults, together with the description of the immature stages of *A. triste* Koch. **Acarologia** 2002; 42:323-333.
- Falco, R.C. y Fish, D. Horizontal movement of adult *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) attracted to CO₂-baited traps. **J Med Entomol** 1991; 28:726-729.
- Fernández de Luco, D. Estudio sobre la encefalitis vírica similar al louping-ill en el ganado ovino de la Comunidad Autónoma Vasca. **Tesis doctoral Universidad de Zaragoza** 1991;
- Fernandez-de-Mera, I.G.; Zivkovic, Z.; Bolanos, M. y cols. *Rickettsia massiliae* in the Canary Islands. **Emerg Infect Dis** 2009; 15:1869-1870.
- Fernandez-Jorge, B.; Almagro-Sanchez, M.; Escudero-Nieto, R. y cols. Erythema migrans due to *Borrelia afzelii*. **Med Clin (Barc)** 2006; 126:237-238.
- Fernández-Soto, P. Garrapatas que parasitan a las personas en Castilla y León, determinación por serología de su parasitismo y detección molecular de los patógenos que albergan. Tesis doctoral. Universidad de Salamanca; 2003.
- Fernández-Soto, P.; Diaz, M., V; Perez-Sanchez, R. y cols. Increased prevalence of *Rickettsia aeschlimannii* in Castilla y Leon, Spain. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** 2009; 28:693-695.
- Fernández-Soto, P.; Encinas-Grandes, A.; Perez-Sanchez, R. *Rickettsia aeschlimannii* in Spain: molecular evidence in *Hyalomma marginatum* and five other tick species that feed on humans. **Emerg Infect Dis** 2003; 9:889-890.
- Fernández-Soto, P.; Perez-Sanchez, R.; Alamo-Sanz, R. y cols. Spotted fever group rickettsiae in ticks feeding on humans in northwestern Spain: is *Rickettsia conorii* vanishing? **Ann N Y Acad Sci** 2006a; 1078:331-333.
- Fernández-Soto, P.; Perez-Sanchez, R.; Encinas-Grandes, A. y cols. *Rickettsia slovaca* in *Dermacentor* ticks found on humans in Spain. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** 2006b; 25:129-131.
- Fernández-Soto, P.; Perez-Sanchez, R.; Encinas-Grandes, A. y cols. Detection and identification of *Rickettsia helvetica* and *Rickettsia* sp. IRS3/IRS4 in *Ixodes ricinus* ticks found on humans in Spain. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** 2004; 23:648-649.
- Fingerle, V.; Schulte-Spechtel, U.C.; Ruzic-Sabljic, E. y cols. Epidemiological aspects and molecular characterization of *Borrelia burgdorferi* s.l. from southern Germany with special respect to the new species *Borrelia spielmanii* sp. nov. **Int J Med Microbiol** 2008; 298:279-290.
- Foldvari, G.; Farkas, R.; Lakos, A. *Borrelia spielmanii* erythema migrans, Hungary. **Emerg Infect Dis** 2005; 11:1794-1795.
- Fournier, P.E.; Marrie, T.J.; Raoult, D. Diagnosis of Q fever. **J Clin Microbiol** 1998; 36:1823-1834.
- Fournier, P.E. y Raoult, D. Identification of rickettsial isolates at the species level using multi-spacer typing. **BMC Microbiol** 2007; 7:72
- Fraenkel, C.J.; Garpmo, U.; Berglund, J. Determination of novel *Borrelia* genospecies in Swedish *Ixodes ricinus* ticks. **J Clin Microbiol** 2002; 40:3308-3312.
- Frandsen, F.; Bresciani, J.; Hansen, H.G. Prevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in Danish rodents. **APMIS** 1995; 103:247-253.

- Fraser, C.M.; Casjens, S.; Huang, W.M. y cols. Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, *Borrelia burgdorferi*. **Nature** 1997; 390:580-586.
- Fukunaga, M.; Hamase, A.; Okada, K. y cols. *Borrelia tanukii* sp. nov. and *Borrelia turdae* sp. nov. found from ixodid ticks in Japan: rapid species identification by 16S rRNA gene-targeted PCR analysis. **Microbiol Immunol** 1996; 40:877-881.
- Fung, B.P.; McHugh, G.L.; Leong, J.M. y cols. Humoral immune response to outer surface protein C of *Borrelia burgdorferi* in Lyme disease: role of the immunoglobulin M response in the serodiagnosis of early infection. **Infect Immun** 1994; 62:3213-3221.
- Garben, A.F.M.; Vos, H.; Bronswijk, J.E.M.H. *Haemaphysalis punctata* Canestrini and Fanzago 1877, a tick of pastured seadunes on the island of Texel (The Netherlands). **Acarologia** 1981; 23:19-25.
- García-Moncó, C.; Benach, J.L.; Coleman, J.L. y cols. Caracterización de una cepa española de *Borrelia Burgdorferi*. **Med Clin Barc** 1992; 98:89-93.
- García-Pérez, A.L.; Astobiza, I.; Barandika, J.F. y cols. Short communication: investigation of *Coxiella burnetii* occurrence in dairy sheep flocks by bulk-tank milk analysis and antibody level determination. **J Dairy Sci** 2009; 92:1581-1584.
- García-Pérez, A.L.; Barandika, J.; Oporto, B. y cols. *Anaplasma phagocytophila* as an abortifacient agent in sheep farms from northern Spain. **Ann N Y Acad Sci** 2003; 990:429-432.
- García-Sanmartín, J.; Barandika, J.F.; Juste, R.A. y cols. Distribution and molecular detection of *Theileria* and *Babesia* in questing ticks from northern Spain. **Med Vet Entomol** 2008; 22:318-325.
- García-Sanmartín, J.; Nagore, D.; García-Pérez, A.L. y cols. Molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species infecting cattle in Northern Spain using reverse line blot macroarrays. **BMC Vet Res** 2006; 2:16
- Gern, L. *Borrelia burgdorferi* sensu lato, the agent of Lyme borreliosis: life in the wilds. **Parasite** 2008; 15:244-247.
- Gern, L. y Humair, P. Ecology of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Europe. In Lyme Borreliosis. Biology, Epidemiology and Control. Gray, J. S., Kahl, O., Lane, R. S., and Stanek, G. Oxon (Reino Unido): CABI Publishing; 2002: 149-174.
- Gil, H. Zonas endémicas de enfermedad de Lyme en la Comunidad Autónoma del País Vasco: estudio del papel de los micromamíferos en el mantenimiento de *Borrelia burgdorferi* sensu lato en el medio rural. Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza. España; 2002.
- Gil, H.; Barral, M.; Escudero, R. y cols. Identification of a new *Borrelia* species among small mammals in areas of northern Spain where Lyme disease is endemic. **Appl Environ Microbiol** 2005; 71:1336-1345.
- Gil-Collado, J.; Guillén-Llera, J.L.; Zapatero-Ramos, L.M. Claves para la identificación de los Ixodoidea españoles (adultos). **Rev Iber Parasit** 1979; 39:107-111.
- Gilbert, L.; Jones, L.D.; Hudson, P.J. y cols. Role of small mammals in the persistence of Louping-ill virus: field survey and tick co-feeding studies. **Med Vet Entomol** 2000; 14:277-282.
- Gilot, B.; Bonnefille, M.; Degeilh, B. y cols. La colonisation des massifs forestiers par *Ixodes ricinus* (Linne, 1758) en France: utilisation du chevreuil, *Capreolus capreolus* (L., 1758), comme marqueur biologique. **Parasite** 1994; 1:81-86.
- Gilot, B.; Pautou, G.; Moncada, E. y cols. Ecological study of *Ixodes ricinus* (Linne, 1758) (Acarina, Ixodoidea) in southeastern France. **Acta Trop** 1975; 32:232-258.

- Ginsberg, H.S. y Ewing, C.P. 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). **Exp Appl Acarol** 1989; 7:313-322.
- Glazunova, O.; Roux, V.; Freylikman, O. y cols. *Coxiella burnetii* genotyping. **Emerg Infect Dis** 2005; 11:1211-1217.
- Gobierno Vasco. Vegetación de la Comunidad Autónoma del País Vasco. **Departamento de Medio Ambiente Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco** 1989.
- González, L.; Cuervo, L.; Fernández de Luco, D. y cols. Estudios preliminares sobre una enfermedad ovina similar al louping-ill en el País Vasco. **Med Vet** 1987a; 4:297-302.
- González, L.; Reid, H.W.; Pow, I. y cols. A disease resembling louping-ill in sheep in the Basque region of Spain. **Vet Rec** 1987b; 121:12-13.
- Gordon, W.S.; Brownlee, A.; Wilson, D.R. y cols. Tick-borne fever. **J Comp Pathol** 1932; 45:301-302.
- Grard, G.; Moureau, G.; Charrel, R.N. y cols. Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: new insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy. **Virology** 2007; 361:80-92.
- Gray, J. Studies on the dynamics of active populations of the sheep tick, *Ixodes ricinus* L. in Co. Wicklow, Ireland. **Acarologia** 1984; 25:167-178.
- Gray, J. Studies on the larval activity of the tick *Ixodes ricinus* L. in Co. Wicklow, Ireland. **Exp Appl Acarol** 1985a; 1:307-316.
- Gray, J.S. The development and questing activity of *Ixodes ricinus* L. under field conditions in Ireland. **Bull Ent Res** 1982; 71:533-542.
- Gray, J.S. A carbon dioxide trap for prolonged sampling of *Ixodes ricinus* L. populations. **Exp Appl Acarol** 1985b; 1:35-44.
- Gray, J.S. The development and seasonal activity of the tick *Ixodes ricinus*: a vector of Lyme borreliosis. **Rev Med Vet Entomol** 1991; 79:323-333.
- Gray, J.S.; Dautel, H.; Estrada-Pena, A. y cols. Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. **Interdiscip Perspect Infect Dis** 2009; 2009:593232
- Gray, J.S.; Kahl, O.; Janetzki, C. y cols. Studies of the ecology of Lyme disease in a deer forest in County Galway, Ireland. **J Med Entomol** 1992; 29:915-920.
- Gray, J.S.; Kahl, O.; Janetzki, C. y cols. The spatial distribution of *Borrelia burgdorferi*-infected *Ixodes ricinus* in the Connemara region of County Galway, Ireland. **Exp Appl Acarol** 1995; 19:163-172.
- Gray, J.S.; Kirstein, F.; Robertson, J.N. y cols. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks and rodents in a recreational park in south-western Ireland. **Exp Appl Acarol** 1999; 23:717-729.
- Gubbels, J.M.; de Vos, A.P.; van der Weide, M. y cols. Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. **J Clin Microbiol** 1999; 37:1782-1789.
- Guerrero, A.; Escudero, R.; Marti-Belda, P. y cols. Frecuencia de las manifestaciones clínicas de la borreliosis de Lyme en España. **Enferm Infecc Microbiol Clin** 1996; 14:72-79.
- Guglielmo, A.A.; Robbins, R.G.; Apanaskevich, D.A. y cols. Comments on controversial tick (Acari: Ixodida) species names and species described or resurrected from 2003 to 2008. **Exp Appl Acarol** 2009; 48:311-327.

- Gustafson, R.; Forsgren, M.; Gardulf, A. y cols. Clinical manifestations and antibody prevalence of Lyme borreliosis and tick-borne encephalitis in Sweden: a study in five endemic areas close to Stockholm. **Scand J Infect Dis** 1993; 25:595-603.
- Habela, M.; Rol, J.A.; Anton, J.M. y cols. Epidemiology of Mediterranean theileriosis in Extremadura region, Spain. **Parassitologia** 1999; 41 Suppl 1:47-51.
- Halos, L.; Vourc'h, G.; Cotte, V. y cols. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia* sp. and *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA in questing *Ixodes ricinus* ticks from France. **Ann N Y Acad Sci** 2006; 1078:316-319.
- Hanincova, K.; Taragelova, V.; Koci, J. y cols. Association of *Borrelia garinii* and *B. valaisiana* with songbirds in Slovakia. **Appl Environ Microbiol** 2003; 69:2825-2830.
- Hansmann, Y.; Gut, J.P.; Remy, V. y cols. TBE virus infection: clinical and epidemiological data. **Med Mal Infect** 2004; 34:S28-S30.
- Heinz, F.X. y Mandl, C.W. The molecular biology of tick-borne encephalitis virus. Review article. **APMIS** 1993; 101:735-745.
- Hengge, U.R.; Tannapfel, A.; Tying, S.K. y cols. Lyme borreliosis. **Lancet Infect Dis** 2003; 3:489-500.
- Herpe, B.; Schuffenecker, I.; Pillot, J. y cols. Tickborne encephalitis, southwestern France. **Emerg Infect Dis** 2007; 13:1114-1116.
- Herrero, C.; Pelaz, C.; Alvar, J. y cols. Evidence of the presence of spotted fever group rickettsiae in dogs and dog ticks of the central provinces in Spain. **Eur J Epidemiol** 1992; 8:575-579.
- Herrero-Herrero, J.I.; Ruiz-Beltran, R.; Martin-Sanchez, A.M. y cols. Mediterranean spotted fever in Salamanca, Spain. Epidemiological study in patients and serosurvey in animals and healthy human population. **Acta Trop** 1989; 46:335-350.
- Hillyard, P.D. Ticks of North-West Europe Shrewsbury: Field Studies Council; 1996.
- Holman, M.S.; Caporale, D.A.; Goldberg, J. y cols. *Anaplasma phagocytophilum*, *Babesia microti*, and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes scapularis*, southern coastal Maine. **Emerg Infect Dis** 2004; 10:744-746.
- Hoogstraal, H.; Kaiser, M.N.; Traylor, M.A. y cols. Ticks (Ixodoidea) on birds migrating from Africa to Europe and Asia. **Bull World Health Organ** 1961; 24:197-212.
- Hornok, S. y Farkas, R. Influence of biotope on the distribution and peak activity of questing ixodid ticks in Hungary. **Med Vet Entomol** 2009; 23:41-46.
- Hornok, S.; Meli, M.L.; Perreten, A. y cols. Molecular investigation of hard ticks (Acari: Ixodidae) and fleas (Siphonaptera: Pulicidae) as potential vectors of rickettsial and mycoplasmal agents. **Vet Microbiol** 2010; 140:98-104.
- Hubalek, Z.; Halouzka, J.; Juricova, Z. Host-seeking activity of ixodid ticks in relation to weather variables. **J Vector Ecol** 2003; 28:159-165.
- Hudson, P.J.; Rizzoli, A.; Rosa, R. y cols. Tick-borne encephalitis virus in northern Italy: molecular analysis, relationships with density and seasonal dynamics of *Ixodes ricinus*. **Med Vet Entomol** 2001; 15:304-313.
- Humair, P.F.; Péter, O.; Wallich, R. y cols. Strain variation of Lyme disease spirochetes isolated from *Ixodes ricinus* ticks and rodents collected in two endemic areas in Switzerland. **J Med Entomol** 1995; 32:433-438.

- Humair, P.F.; Postic, D.; Wallich, R. y cols. An avian reservoir (*Turdus merula*) of the Lyme borreliosis spirochetes. **Zentralbl Bakteriol** 1998; 287:521-538.
- Humair, P.F.; Rais, O.; Gern, L. Transmission of *Borrelia afzelii* from *Apodemus* mice and *Clethrionomys* voles to *Ixodes ricinus* ticks: differential transmission pattern and overwintering maintenance. **Parasitology** 1999; 118:33-42.
- Humair, P.F.; Turrian, N.; Gern, L. *Borrelia burgdorferi* in a focus of Lyme borreliosis: epizootiologic contribution of small mammals. **Folia Parasitol (Praha)** 1993; 40:65-70.
- Ibarra, V.; Oteo, J.A.; Portillo, A. y cols. *Rickettsia slovaca* infection: DEBONEL/TIBOLA. **Ann N Y Acad Sci** 2006; 1078:206-214.
- Inokuma, H.; Brouqui, P.; Drancourt, M. y cols. Citrate synthase gene sequence: a new tool for phylogenetic analysis and identification of *Ehrlichia*. **J Clin Microbiol** 2001; 39:3031-3039.
- Ishiguro, F.; Takada, N.; Masuzawa, T. y cols. Prevalence of Lyme disease *Borrelia* spp. in ticks from migratory birds on the Japanese mainland. **Appl Environ Microbiol** 2000; 66:982-986.
- Jado, I.; Escudero, R.; Gil, H. y cols. Molecular method for identification of *Rickettsia* species in clinical and environmental samples. **J Clin Microbiol** 2006; 44:4572-4576.
- Jado, I.; Oteo, J.A.; Aldamiz, M. y cols. *Rickettsia monacensis* and human disease, Spain. **Emerg Infect Dis** 2007; 13:1405-1407.
- Johnson, R.C.; Schmid, G.P.; Hyde, F.W. y cols. *Borrelia burgdorferi* sp. nov.: etiologic agent of Lyme disease. **Int J Syst Bacteriol** 1984; 34:496-497.
- Jongejan, F. Integrated control of ticks and tick-borne diseases. **Parassitologia** 1999; 41 Suppl 1:57-58.
- Jongejan, F. y Uilenberg, G. The global importance of ticks. **Parasitology** 2004; 129:S3-S14.
- Juste, R.A.; Barral, M.; Fernández de Luco, D. y cols. Tick-borne encephalitis in Spain. In: Tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis. 4th International Potsdam Symposium on Tick-borne Diseases: 21-22 February; Postdam. J.Süss & O.Kahl: Lengerich; 1997a. 70-76.
- Juste, R.A.; Mandaluniz, N.; Barral, M. y cols. Observations on *Ehrlichia phagocytophila* infection in Spain. **Tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis 4th International Potsdam Symposium on Tick-borne Diseases Ed by J Süss & O Kahl** 1997b;21-26.
- Juste, R.A.; Scott, G.R.; Paxton, E. y cols. Presence of *Cytoecetes phagocytophila* in an atypical disease of cattle in Spain. **Vet Rec** 1989; 124:636.
- Kaiser, R.; Kern, A.; Kampa, D. y cols. Prevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* and tick-borne encephalitis virus in an endemic region in southern Germany. **Zentralbl Bakteriol** 1997; 286:534-541.
- Kawabata, H.; Masuzawa, T.; Yanagihara, Y. Genomic analysis of *Borrelia japonica* sp. nov. isolated from *Ixodes ovatus* in Japan. **Microbiol Immunol** 1993; 37:843-848.
- Kenny, M.J.; Shaw, S.E.; Hillyard, P.D. y cols. Ectoparasite and haemoparasite risks associated with imported exotic reptiles. **Vet Rec** 2004; 154:434-435.
- Khanakah, G.; Kocianova, E.; Vyrostekova, V. y cols. Seasonal variations in detecting *Borrelia burgdorferi* sensu lato in rodents from north eastern Austria. **Wien Klin Wochenschr** 2006; 118:754-758.
- Klee, S.R.; Tyczka, J.; Ellerbrok, H. y cols. Highly sensitive real-time PCR for specific detection and quantification of *Coxiella burnetii*. **BMC Microbiol** 2006; 6:2

- Kleinbaum, D.G.; Kupper, L.L.; Muller, K.E. y cols. Poisson regression analysis. In Applied Regression Analysis and Other Multivariable Methods. Duxbury Press at Brooks/Cole Publishing Co, California, U.S.A.; 1998: 687-709.
- Koci, J.; Movila, A.; Taragel'ova, V. y cols. First report of *Anaplasma phagocytophilum* and its co-infections with *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae) from Republic of Moldova. **Exp Appl Acarol** 2007; 41:147-152.
- Komiya, T.; Sadamasu, K.; Kang, M.I. y cols. Seroprevalence of *Coxiella burnetii* infections among cats in different living environments. **J Vet Med Sci** 2003; 65:1047-1048.
- Korch, G.J. Geographic dissemination of tick-borne zoonoses. In Ecological dynamics of tick-borne zoonoses. Sonenshine, D. E. and Mather, T. N. New York: Oxford University Press; 1994: 139-197.
- Kovats, R.S.; Campbell-Lendrum, D.H.; McMichael, A.J. y cols. Early effects of climate change: do they include changes in vector-borne disease? **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 2001; 356:1057-1068.
- Krause, P.J.; McKay, K.; Thompson, C.A. y cols. Disease-specific diagnosis of coinfecting tickborne zoonoses: babesiosis, human granulocytic ehrlichiosis, and Lyme disease. **Clin Infect Dis** 2002; 34:1184-1191.
- Kunz, C. y Heinz, F.X. Tick-borne encephalitis. **Vaccine** 2003; 21 Suppl 1:S1-S2.
- Kurtenbach, K.; Carey, D.; Hoodless, A.N. y cols. Competence of pheasants as reservoirs for Lyme disease spirochetes. **J Med Entomol** 1998a; 35:77-81.
- Kurtenbach, K.; Dizij, A.; Seitz, H.M. y cols. Differential immune responses to *Borrelia burgdorferi* in European wild rodent species influence spirochete transmission to *Ixodes ricinus* L. (Acari: Ixodidae). **Infect Immun** 1994; 62:5344-5352.
- Kurtenbach, K.; Kampen, H.; Dizij, A. y cols. Infestation of rodents with larval *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) is an important factor in the transmission cycle of *Borrelia burgdorferi* s.l. in German woodlands. **J Med Entomol** 1995; 32:807-817.
- Kurtenbach, K.; Peacey, M.; Rijpkema, S.G. y cols. Differential transmission of the genospecies of *Borrelia burgdorferi* sensu lato by game birds and small rodents in England. **Appl Environ Microbiol** 1998b; 64:1169-1174.
- Kurtenbach, K.; Sewell, H.S.; Ogden, N.H. y cols. Serum complement sensitivity as a key factor in Lyme disease ecology. **Infect Immun** 1998c; 66:1248-1251.
- Labruna, M.B.; Ogrzewalska, M.; Martins, T.F. y cols. Comparative susceptibility of larval stages of *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma cajennense*, and *Rhipicephalus sanguineus* to infection by *Rickettsia rickettsii*. **J Med Entomol** 2008; 45:1156-1159.
- Labuda, M.; Austyn, J.M.; Zuffova, E. y cols. Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission. **Virology** 1996; 219:357-366.
- Labuda, M.; Kozuch, O.; Zuffova, E. y cols. Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks co-feeding on specific immune natural rodent hosts. **Virology** 1997; 235:138-143.
- Labuda, M.; Nuttall, P.A.; Kozuch, O. y cols. Non-viraemic transmission of tick-borne encephalitis virus: a mechanism for arbovirus survival in nature. **Experientia** 1993; 49:802-805.
- Labuda, M. y Randolph, S.E. Survival strategy of tick-borne encephalitis virus: cellular basis and environmental determinants. **Zentralbl Bakteriol** 1999; 289:513-524.
- Le Fleche, A.; Postic, D.; Girardet, K. y cols. Characterization of *Borrelia lusitaniae* sp. nov. by 16S ribosomal DNA sequence analysis. **Int J Syst Bacteriol** 1997; 47:921-925.

- Lebedeva, N.N. y Korenberg, E.I. Distribution of *Haemaphysalis concinna* Koch in the Soviet Union and some general features of its ecology. **Folia Parasitol (Praha)** 1981; 28:249-261.
- Li, X. y Dunley, J.E. Optimal sampling and spatial distribution of *Ixodes pacificus*, *Dermacentor occidentalis* and *Dermacentor variabilis* ticks (Acari: Ixodidae). **Exp Appl Acarol** 1998; 22:233-248.
- Lindgren, E. y Gustafson, R. Tick-borne encephalitis in Sweden and climate change. **Lancet** 2001; 358:16-18.
- Lindgren, E.; Talleklint, L.; Polfeldt, T. Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease-transmitting European tick *Ixodes ricinus*. **Environ Health Perspect** 2000; 108:119-123.
- Lindquist, L. y Vapalahti, O. Tick-borne encephalitis. **Lancet** 2008; 371:1861-1871.
- Lindstrom, A. y Jaenson, T.G. Distribution of the common tick, *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae), in different vegetation types in southern Sweden. **J Med Entomol** 2003; 40:375-378.
- Literak, I. Prevalence of *Coxiella burnetii* infection in military training areas in the Czech Republic and Slovakia. **Acta Vet Brno** 21995; 64:179-186.
- Liz, J.S.; Anderes, L.; Sumner, J.W. y cols. PCR Detection of Granulocytic Ehrlichiae in *Ixodes ricinus* Ticks and Wild Small Mammals in Western Switzerland. **J Clin Microbiol** 2000; 38:1002-1007.
- Liz, J.S.; Sumner, J.W.; Pfister, K. y cols. PCR detection and serological evidence of granulocytic ehrlichial infection in roe deer (*Capreolus capreolus*) and chamois (*Rupicapra rupicapra*). **J Clin Microbiol** 2002; 40:892-897.
- Lledó, L.; Gegundez, M.I.; Fernandes, N. y cols. The seroprevalence of human infection with *Rickettsia slovaca*, in an area of northern Spain. **Ann Trop Med Parasitol** 2006; 100:337-343.
- Lozano, A. Arboviruses in Spain. In Arboviruses in the Mediterranean Countries. Zbl.Bakt.Suppl.9. Vesenjaj-Hirjan, J., Porterfield, J. S., and Arslanagic, E. Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag; 1980: 143-144.
- Magnarelli, L.A. y Anderson, J.F. Ticks are biting insects infected with the etiologic agent of Lyme disease, *Borrelia burgdorferi*. **J Clin Microbiol** 1988; 26:1482-1486.
- Magnarelli, L.A.; Denicola, A.; Stafford, K.C.I.I.I. y cols. *Borrelia burgdorferi* in an urban environment: white-tailed deer with infected ticks and antibodies. **J Clin Microbiol** 1995; 33:541-544.
- Malloy, D.C.; Nauman, R.K.; Paxton, H. Detection of *Borrelia burgdorferi* using the polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol** 1990; 28:1089-1093.
- Manilla, G. Acari Ixodida. Fauna d'Italia. Bologna: Edizioni Calderini; 1998.
- Mannelli, A.; Tolari, F.; Pedri, P. y cols. Spatial distribution and seasonality of ticks (Acarina: Ixodidae) in a protected area in the northern Apennines. **Parassitologia Roma** 1997; 39:41-45.
- Marconi, R.T.; Hohenberger, S.; Jauris-Heipke, S. y cols. Genetic analysis of *Borrelia garinii* OspA serotype 4 strains associated with neuroborreliosis: evidence for extensive genetic homogeneity. **J Clin Microbiol** 1999; 37:3965-3970.
- Marconi, R.T.; Liveris, D.; Schwartz, I. Identification of novel insertion elements, restriction fragment length polymorphism patterns, and discontinuous 23S rRNA in Lyme disease spirochetes: phylogenetic analyses of rRNA genes and their intergenic spacers in *Borrelia japonica* sp. nov. and genomic group 21038 (*Borrelia andersonii* sp. nov.) isolates. **J Clin Microbiol** 1995; 33:2427-2434.
- Margos, G.; Vollmer, S.A.; Cornet, M. y cols. A new *Borrelia* species defined by multilocus sequence analysis of housekeeping genes. **Appl Environ Microbiol** 2009; 75:5410-5416.

- Marin, M.S.; McKenzie, J.; Gao, G.F. y cols. The virus causing encephalomyelitis in sheep in Spain: a new member of the tick-borne encephalitis group. **Res Vet Sci** 1995; 58:11-13.
- Marquez, F.J. Spotted fever group *Rickettsia* in ticks from southeastern Spain natural parks. **Exp Appl Acarol** 2008; 45:185-194.
- Marquez, F.J. y Constan, M.C. Infection d'*Ixodes ricinus* (L. 1758) et *Haemaphysalis punctata* Canestrini et Fanzago, 1877 (*Acarina, Ixodidae*) par *Borrelia burgdorferi* dans le Nord de la Peninsule Iberique (Pays Basque Espagnol et Navarre). **Bulletin de la Societe Francaise de Parasitologie** 1990; 8:323-330.
- Marquez, F.J.; Ibarra, V.; Oteo, J.A. y cols. Which Spotted Fever Group *Rickettsia* are Present in *Dermacentor marginatus* Ticks in Spain? **Ann N Y Acad Sci** 2003; 990:141-142.
- Marquez, F.J.; Rojas, A.; Ibarra, V. y cols. Prevalence data of *Rickettsia slovaca* and other SFG Rickettsiae species in *Dermacentor marginatus* in the southeastern Iberian peninsula. **Ann N Y Acad Sci** 2006; 1078:328-330.
- Marrie, T.J.; Schlech, W.F., III; Williams, J.C. y cols. Q fever pneumonia associated with exposure to wild rabbits. **Lancet** 1986; 1:427-429.
- Martinod, S. y Gilot, B. Epidemiology of canine babesiosis in relation to the activity of *Dermacentor reticulatus* in southern Jura (France). **Exp Appl Acarol** 1991; 11:215-222.
- Massung, R.F.; Mauer, M.J.; Owens, J.H. y cols. Genetic variants of *Ehrlichia phagocytophila*, Rhode Island and Connecticut. **Emerg Infect Dis** 2002; 8:467-472.
- Masuzawa, T.; Hashimoto, N.; Kudeken, M. y cols. New genomospecies related to *Borrelia valaisiana*, isolated from mammals in Okinawa archipelago, Japan. **J Med Microbiol** 2004; 53:421-426.
- Masuzawa, T.; Suzuki, H.; Kawabata, H. y cols. Identification of spirochetes isolated from wild rodents in Japan as *Borrelia japonica*. **J Clin Microbiol** 1995; 33:1392-1394.
- Masuzawa, T.; Takada, N.; Kudeken, M. y cols. *Borrelia sinica* sp. nov., a lyme disease-related *Borrelia* species isolated in China. **Int J Syst Evol Microbiol** 2001; 51:1817-1824.
- Mather, T.N.; Fish, D.; Coughlin, R.T. Competence of dogs as reservoirs for Lyme disease spirochetes (*Borrelia burgdorferi*). **J Am Vet Med Assoc** 1994; 205:186-188.
- Matuschka, F.; Langer, R.; Spielman, A. y cols. Subadult *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) on rodents in Berlin, West Germany. **J Med Entomol** 1990; 27:385-390.
- Matuschka, F.R.; Eiffert, H.; Ohlenbusch, A. y cols. Transmission of the agent of Lyme disease on a subtropical island. **Trop Med Parasitol** 1994; 45:39-44.
- Matuschka, F.R.; Fischer, P.; Musgrave, K. y cols. Hosts on which nymphal *Ixodes ricinus* most abundantly feed. **Am J Trop Med Hyg** 1991; 44:100-107.
- Maurin, M. y Raoult, D. Q fever. **Clin Microbiol Rev** 1999; 12:518-553.
- Mediannikov, O.; Matsumoto, K.; Samoylenko, I. y cols. *Rickettsia raoultii* sp. nov., a spotted fever group rickettsia associated with *Dermacentor* ticks in Europe and Russia. **Int J Syst Evol Microbiol** 2008; 58:1635-1639.
- Mejlon, H.A. y Jaenson, T.G.T. Questing behaviour of *Ixodes ricinus* ticks (Acari: Ixodidae). **Exp Appl Acarol** 1997; 21:747-754.
- Merino, F.J.; Nebreda, T.; Serrano, J.L. y cols. Tick species and tick-borne infections identified in population from a rural area of Spain. **Epidemiol Infect** 2005; 133:943-949.

- Merino, F.J.; Serrano, J.L.; Saz, J.V. y cols. Epidemiological characteristics of dogs with Lyme borreliosis in the province of Soria (Spain). **Eur J Epidemiol** 2000; 16:97-100.
- Michalik, J.; Hofman, T.; Buczek, A. y cols. *Borrelia burgdorferi* s.l. in *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) ticks collected from vegetation and small rodents in recreational areas of the city of Poznan. **J Med Entomol** 2003; 40:690-697.
- Michalik, J.; Wodecka, B.; Skoracki, M. y cols. Prevalence of avian-associated *Borrelia burgdorferi* s.l. genospecies in *Ixodes ricinus* ticks collected from blackbirds (*Turdus merula*) and song thrushes (*T. philomelos*). **Int J Med Microbiol** 2008; 298:129-138.
- Milutinovic, M.; Masuzawa, T.; Tomanovic, S. y cols. *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum*, *Francisella tularensis* and their co-infections in host-seeking *Ixodes ricinus* ticks collected in Serbia. **Exp Appl Acarol** 2008; 45:171-183.
- Mitchell, P.D.; Reed, K.D.; Hofkes, J.M. Immunoserologic evidence of coinfection with *Borrelia burgdorferi*, *Babesia microti*, and human granulocytic *Ehrlichia* species in residents of Wisconsin and Minnesota. **J Clin Microbiol** 1996; 34:724-727.
- Miyamoto, K.; Nakao, M.; Fujita, H. y cols. The ixodic ticks on migratory birds in Japan and the isolation of Lyme disease spirochetes from bird-feeding ticks. **Jpn J Sanit Zool** 1993; 44:315-326.
- Montejo, B.M.; Corral, C.J.; Aguirre, E.C. Q fever in the Basque Country: 1981-1984. **Rev Infect Dis** 1985; 7:700-701.
- Montes, M.; Cilla, G.; Vicente, D. y cols. Gipuzkoa, Basque Country, Spain (1984-2004): a hyperendemic area of Q fever. **Ann N Y Acad Sci** 2006; 1078:129-132.
- Moran, C.F.; Rais, O.; Humair, P.F. y cols. Identification of host bloodmeal source and *Borrelia burgdorferi* sensu lato in field-collected *Ixodes ricinus* ticks in Chaumont (Switzerland). **J Med Entomol** 2007; 44:1109-1117.
- Moreno, J.A. Las garrapatas (Acari: Ixodidae) de los rumiantes del País Vasco: especies, preferencias ecológicas, dinámica estacional y prevalencia de *Babesia* spp. y *Borrelia burgdorferi* sensu lato. **Tesis doctoral Universidad de Zaragoza** 1995;
- Moreno, J.A. y Estrada-Peña, A. Prevalence and seasonal activity of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) on domestic ruminants of the Basque Country, Spain. **Exp Appl Acarol** 1997; 21:41-48.
- Murphy, C.I.; Storey, J.R.; Recchia, J. y cols. Major antigenic proteins of the agent of human granulocytic ehrlichiosis are encoded by members of a multigene family. **Infect Immun** 1998; 66:3711-3718.
- Nadelman, R.B. y Wormser, G.P. Lyme borreliosis. **Lancet** 1998; 352:557-565.
- Nagore, D.; García-Sanmartín, J.; García-Pérez, A.L. y cols. Detection and identification of equine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blotting: epidemiological survey and phylogenetic analysis. **Vet Parasitol** 2004a; 123:41-54.
- Nagore, D.; García-Sanmartín, J.; García-Pérez, A.L. y cols. Identification, genetic diversity and prevalence of *Theileria* and *Babesia* species in a sheep population from Northern Spain. **Int J Parasitol** 2004b; 34:1059-1067.
- Nakao, M. y Miyamoto, K. Long-tailed sheew, *Sorex unguiculatus*, as a potential reservoir of the spirochetes transmitted by *Ixodes ovatus* in Hokkaido, Japan. **Jpn J Sanit Zool** 1993; 44:237-245.
- Nau, R.; Christen, H.J.; Eiffert, H. Lyme disease--current state of knowledge. **Dtsch Arztebl Int** 2009; 106:72-81.

- Nebreda, T.; Contreras, E.; Jesus, M.F. y cols. [Outbreak of Q fever and seroprevalence in a rural population from Soria Province]. **Enferm Infecc Microbiol Clin** 2001; 19:57-60.
- Niebylski, M.L.; Peacock, M.G.; Fischer, E.R. y cols. Characterization of an endosymbiont infecting wood ticks, *Dermacentor andersoni*, as a member of the genus *Francisella*. **Appl Environ Microbiol** 1997; 63:3933-3940.
- Niebylski, M.L.; Peacock, M.G.; Schwan, T.G. Lethal effect of *Rickettsia rickettsii* on its tick vector (*Dermacentor andersoni*). **Appl Environ Microbiol** 1999; 65:773-778.
- Nilsson, K.; Lindquist, O.; Pahlson, C. Association of *Rickettsia helvetica* with chronic perimyocarditis in sudden cardiac death. **Lancet** 1999; 354:1169-1173.
- Nosek, J. The ecology, bionomics and behaviour of *Haemaphysalis* (*Haemaphysalis*) *concinna* tick. **Z Parasitenkd** 1971a; 36:233-241.
- Nosek, J. The ecology, bionomics, and behaviour of *Haemaphysalis* (*Aboimisisalis*) *punctata* tick in central Europe. **Z Parasitenkd** 1971b; 37:198-210.
- Nosek, J. The ecology and public health importance of *Dermacentor marginatus* and *D. reticulatus* ticks in Central Europe. **Folia Parasitol (Praha)** 1972; 19:93-102.
- Ogden, N.H.; Bown, K.; Horrocks, B.K. y cols. Granulocytic *Ehrlichia* infection in ixodid ticks and mammals in woodlands and uplands of the U.K. **Med Vet Entomol** 1998; 12:423-429.
- Ogden, N.H.; Lindsay, L.R.; Hanincova, K. y cols. Role of migratory birds in introduction and range expansion of *Ixodes scapularis* ticks and of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in Canada. **Appl Environ Microbiol** 2008; 74:1780-1790.
- Ogden, N.H.; Maarouf, A.; Barker, I.K. y cols. Climate change and the potential for range expansion of the Lyme disease vector *Ixodes scapularis* in Canada. **Int J Parasitol** 2006; 36:63-70.
- Olsén, B.; Jaenson, T.G.T.; Noppa, L. y cols. A Lyme borreliosis cycle in seabirds and *Ixodes uriae* ticks. **Nature** 1993; 362:340-342.
- Oporto, B.; Barandika, J.F.; Hurtado, A. y cols. Incidence of ovine abortion by *Coxiella burnetii* in northern Spain. **Ann N Y Acad Sci** 2006; 1078:498-501.
- Oporto, B.; Gil, H.; Barral, M. y cols. A survey on *Anaplasma phagocytophila* in wild small mammals and roe deer (*Capreolus capreolus*) in Northern Spain. **Ann N Y Acad Sci** 2003; 990:98-102.
- Ornstein, K.; Berglund, J.; Nilsson, I. y cols. Characterization of Lyme borreliosis isolates from patients with erythema migrans and neuroborreliosis in southern Sweden. **J Clin Microbiol** 2001; 39:1294-1298.
- Ortuno, A.; Quesada, M.; Lopez-Claessens, S. y cols. The role of wild boar (*Sus scrofa*) in the eco-epidemiology of *R. slovaca* in Northeastern Spain. **Vector Borne Zoonotic Dis** 2007; 7:59-64.
- Ostfeld, R.S.; Canham, C.D.; Oggenfuss, K. y cols. Climate, deer, rodents, and acorns as determinants of variation in lyme-disease risk. **PLoS Biol** 2006; 4:e145
- Oteo, J.A.; Backenson, P.B.; del, M., V y cols. Use of the C3H/He Lyme disease mouse model for the recovery of a Spanish isolate of *Borrelia garinii* from erythema migrans lesions. **Res Microbiol** 1998; 149:39-46.
- Oteo, J.A.; Blanco, J.R.; Martinez, d.A., V y cols. First report of human granulocytic ehrlichiosis from southern Europe (Spain). **Emerg Infect Dis** 2000; 6:430-432.
- Oteo, J.A.; Gil, H.; Barral, M. y cols. Presence of granulocytic ehrlichia in ticks and serological evidence of human infection in La Rioja, Spain. **Epidemiol Infect** 2001; 127:353-358.

- Oteo, J.A. y Ibarra, V. [DEBONEL (Dermacentor-borne-necrosis-erythemalymphadenopathy). A new tick-borne disease?]. **Enferm Infecc Microbiol Clin** 2002; 20:51-52.
- Oteo, J.A.; Martínez de Artola, V.; Fernández-Calvo, J.L. y cols. Prevalencia de anticuerpos frente a la *Borrelia burgdorferi* en una población de riesgo. **Rev Clin Esp** 1990; 187:215-217.
- Oteo, J.A.; Portillo, A.; Santibanez, S. y cols. Prevalence of spotted fever group *Rickettsia* species detected in ticks in La Rioja, Spain. **Ann N Y Acad Sci** 2006; 1078:320-323.
- Panzironi, C.; Cerone, G.; Cristaldi, M. y cols. A method for the morphometric identification of southern Italian populations of *Apodemus (sylvaeus)*. **Hystrix** 1993; 5:1-16.
- Parola, P.; Davoust, B.; Raoult, D. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. **Vet Res** 2005a; 36:469-492.
- Parola, P.; Inokuma, H.; Camicas, J.L. y cols. Detection and identification of spotted fever group Rickettsiae and Ehrlichiae in African ticks. **Emerg Infect Dis** 2001; 7:1014-1017.
- Parola, P.; Paddock, C.D.; Raoult, D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. **Clin Microbiol Rev** 2005b; 18:719-56, table.
- Parola, P. y Raoult, D. Tick-borne bacterial diseases emerging in Europe. **Clin Microbiol Infect** 2001a; 7:80-83.
- Parola, P. y Raoult, D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. **Clin Infect Dis** 2001b; 32:897-928.
- Parola, P.; Rovero, C.; Rolain, J.M. y cols. *Rickettsia slovaca* and *R. raoultii* in tick-borne Rickettsioses. **Emerg Infect Dis** 2009; 15:1105-1108.
- Pascual-Velasco, F.; Montes, M.; Marimon, J.M. y cols. High seroprevalence of *Coxiella burnetii* infection in Eastern Cantabria (Spain). **Int J Epidemiol** 1998; 27:142-145.
- Pérez-Eid, C.; Macaigne, F.; Gilot, B. y cols. Approche ecologique des biotopes d'*Haemaphysalis (Alloceraea) inermis* Birula, 1895, en France. Incidence sur l'epidemiologie de la borreliose de Lyme. **Acarologia** 1993; 34:205-209.
- Perret, J.L.; Guigoz, E.; Rais, O. y cols. Influence of saturation deficit and temperature on *Ixodes ricinus* tick questing activity in a Lyme borreliosis-endemic area (Switzerland). **Parasitol Res** 2000; 86:554-557.
- Petrovec, M.; Bidovec, A.; Sumner, J.W. y cols. Infection with *Anaplasma phagocytophila* in cervids from Slovenia: evidence of two genotypic lineages. **Wien Klin Wochenschr** 2002; 114:641-647.
- Petrovec, M.; Furlan, S.L.; Zupanc, T.A. y cols. Human disease in Europe caused by a granulocytic *Ehrlichia* species. **J Clin Microbiol** 1997; 35:1556-1559.
- Piccolin, G.; Benedetti, G.; Doglioni, C. y cols. A study of the presence of *B. burgdorferi*, *Anaplasma* (previously *Ehrlichia*) *phagocytophilum*, *Rickettsia*, and *Babesia* in *Ixodes ricinus* collected within the territory of Belluno, Italy. **Vector Borne Zoonotic Dis** 2006; 6:24-31.
- Picken, M.M.; Picken, R.N.; Han, D. y cols. Single-tube nested polymerase chain reaction assay based on flagellin gene sequences for detection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** 1996; 15:489-498.
- Picken, R.N. Polymerase Chain Reaction primers and probes derived from flagellin gene sequences for specific detection of the agents of Lyme Disease and North American Relapsing Fever. **J Clin Microbiol** 1992; 30:99-114.

- Piesman, J. y Gern, L. Lyme borreliosis in Europe and North America. **Parasitology** 2004; 129 Suppl:S191-S220.
- Piesman, J.; Mather, T.N.; Sinsky, R.J. y cols. Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. **J Clin Microbiol** 1987; 25:557-558.
- Polin, H.; Hufnagl, P.; Haunschmid, R. y cols. Molecular evidence of *Anaplasma phagocytophilum* in *Ixodes ricinus* ticks and wild animals in Austria. **J Clin Microbiol** 2004; 42:2285-2286.
- Porta, F.S.; Nieto, E.A.; Creus, B.F. y cols. Tick-borne lymphadenopathy: a new infectious disease in children. **Pediatr Infect Dis J** 2008; 27:618-622.
- Portillo, A.; Santibanez, P.; Santibanez, S. y cols. Detection of *Rickettsia* spp. in *Haemaphysalis* ticks collected in La Rioja, Spain. **Vector Borne Zoonotic Dis** 2008; 8:653-658.
- Postic, D.; Garnier, M.; Baranton, G. Multilocus sequence analysis of atypical *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates--description of *Borrelia californiensis* sp. nov., and genomospecies 1 and 2. **Int J Med Microbiol** 2007; 297:263-271.
- Postic, D.; Ras, N.M.; Lane, R.S. y cols. Expanded diversity among Californian borrelia isolates and description of *Borrelia bissetii* sp. nov. (formerly *Borrelia* group DN127). **J Clin Microbiol** 1998; 36:3497-3504.
- Psaroulaki, A.; Germanakis, A.; Gikas, A. y cols. Simultaneous detection of "*Rickettsia mongolotimonae*" in a patient and in a tick in Greece. **J Clin Microbiol** 2005; 43:3558-3559.
- Psaroulaki, A.; Ragiadakou, D.; Kouris, G. y cols. Ticks, tick-borne rickettsiae, and *Coxiella burnetii* in the Greek Island of Cephalonia. **Ann N Y Acad Sci** 2006; 1078:389-399.
- Pusterla, N.; Huder, J.B.; Leutenegger, C.M. y cols. Quantitative real-time PCR for detection of members of the *Ehrlichia phagocytophila* genogroup in host animals and *Ixodes ricinus* ticks. **J Clin Microbiol** 1999; 37:1329-1331.
- Rand, P.W.; Lubelczyk, C.; Lavigne, G.R. y cols. Deer density and the abundance of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **J Med Entomol** 2003; 40:179-184.
- Randolph, S.E. Ticks and tick-borne disease systems in space and from space. **Adv Parasitol** 2000; 47:217-243.
- Randolph, S.E. The shifting landscape of tick-borne zoonoses: tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis in Europe. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 2001; 356:1045-1056.
- Randolph, S.E. Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors. **Parasitology** 2004; 129:S37-65.
- Randolph, S.E. Tick-borne encephalitis virus, ticks and humans: short-term and long-term dynamics. **Curr Opin Infect Dis** 2008; 21:462-467.
- Randolph, S.E.; Asokliene, L.; Avsic-Zupanc, T. y cols. Variable spikes in tick-borne encephalitis incidence in 2006 independent of variable tick abundance but related to weather. **Parasit Vectors** 2008; 1:44
- Randolph, S.E.; Gern, L.; Nuttall, P.A. Co-feeding Ticks: Epidemiological significance for Tick-Borne Pathogen Transmission. **Parasitology Today** 1996; 12:472-479.
- Randolph, S.E.; Green, R.M.; Hoodless, A.N. y cols. An empirical quantitative framework for the seasonal population dynamics of the tick *Ixodes ricinus*. **Int J Parasitol** 2002; 32:979-989.
- Randolph, S.E.; Green, R.M.; Peacey, M.F. y cols. Seasonal synchrony: the key to tick-borne encephalitis foci identified by satellite data. **Parasitology** 2000; 121:15-23.

- Randolph, S.E.; Miklisova, D.; Lysy, J. y cols. Incidence from coincidence: patterns of tick infestations on rodents facilitate transmission of tick-borne encephalitis virus. **Parasitology** 1999; 118:177-186.
- Randolph, S.E. y Rogers, D.J. Fragile transmission cycles of tick-borne encephalitis virus may be disrupted by predicted climate change. **Proc Biol Sci** 2000; 267:1741-1744.
- Randolph, S.E. y Storey, K. Impact of microclimate on immature tick-rodent host interactions (Acari: Ixodidae): implications for parasite transmission. **J Med Entomol** 1999; 36:741-748.
- Randolph, S.E. y Sumilo, D. Tick-borne encephalitis in Europe: dynamics of changing risk. In *Emerging pests and vector-borne diseases in Europe*. Takken, W and Knols, BGJ. Wageningen: Wageningen Academic Publishers; 2007: 187-206.
- Raoult, D.; Brouqui, P.; Roux, V. A new spotted-fever-group rickettsiosis. **Lancet** 1996; 348:412
- Raoult, D.; Fenollar, F.; Stein, A. Q fever during pregnancy: diagnosis, treatment, and follow-up. **Arch Intern Med** 2002a; 162:701-704.
- Raoult, D.; Lakos, A.; Fenollar, F. y cols. Spotless rickettsiosis caused by *Rickettsia slovaca* and associated with Dermacentor ticks. **Clin Infect Dis** 2002b; 34:1331-1336.
- Raoult, D.; Marrie, T.; Mege, J. Natural history and pathophysiology of Q fever. **Lancet Infect Dis** 2005; 5:219-226.
- Raoult, D. y Roux, V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. **Clin Microbiol Rev** 1997; 10:694-719.
- Regnery, R.L.; Spruill, C.L.; Plikaytis, B.D. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. **J Bacteriol** 1991; 173:1576-1589.
- Rehacek, J.; Kaaserer, B.; Urvolgyi, J. y cols. Isolation of *Coxiella burnetii* and of an unknown rickettsial organism from *Ixodes ricinus* ticks collected in Austria. **Eur J Epidemiol** 1994; 10:719-723.
- Rehacek, J.; Krauss, H.; Kocianova, E. y cols. Studies of the prevalence of *Coxiella burnetii*, the agent of Q fever, in the foothills of the southern Bavarian Forest, Germany. **Zentralbl Bakteriol** 1993; 278:132-138.
- Rehacek, J.; Urvolgyi, J.; Kocianova, E. y cols. Susceptibility of some species of rodents to rickettsiae. **Folia Parasitol (Praha)** 1992; 39:265-284.
- Reid, H.W.; Buxton, D.; Pow, I. y cols. Response of sheep to experimental concurrent infection with tick-borne fever (*Cytoecetes phagocytophila*) and louping-ill virus. **Res Vet Sci** 1986; 41:56-62.
- Rendi-Wagner, P. Risk and prevention of tick-borne encephalitis in travelers. **J Travel Med** 2004; 11:307-312.
- Renouse, A.; Mediannikov, O.; Raoult, D. Old and new tick-borne rickettsioses. **International Health** 2009; 1:17-25.
- Ribeiro, J.M. Role of saliva in tick/host interactions. **Exp Appl Acarol** 1989; 7:15-20.
- Ribeiro, J.M. y Francischetti, I.M. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. **Annu Rev Entomol** 2003; 48:73-88.
- Richter, D. y Matuschka, F.R. Perpetuation of the Lyme disease spirochete *Borrelia lusitaniae* by lizards. **Appl Environ Microbiol** 2006; 72:4627-4632.

- Richter, D.; Spielman, A.; Komar, N. y cols. Competence of american robins as Reservoir hosts for Lyme disease spirochetes. **Emerg Infect Dis** 1998; 6:
- Ricketts, H.T. Some aspects of Rocky Mountain spotted fever as shown by recent investigations. 1909. **Rev Infect Dis** 1991; 13:1227-1240.
- Riemann, H.P.; Behymer, D.E.; Franti, C.E. y cols. Survey of Q-fever agglutinins in birds and small rodents in Northern California, 1975-76. **J Wildl Dis** 1979; 15:515-523.
- Rijpkema, S.G.; Molkenboer, M.J.; Schouls, L.M. y cols. Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. **J Clin Microbiol** 1995; 33:3091-3095.
- Rojo, V.J. Seroprevalence of the infections caused by *Borrelia Burgdorferi* and *Rickettsia Conorii* in humans and dogs in primary health care of San Andreas del Rabanedo (Leon, Spain). **Rev Esp Salud Publica** 1997; 71:173-180.
- Rolain, J.M.; Gouriet, F.; Brouqui, P. y cols. Concomitant or consecutive infection with *Coxiella burnetii* and tickborne diseases. **Clin Infect Dis** 2005; 40:82-88.
- Romero-Jimenez, M.J.; Suarez-Lozano, I.; Fajardo, J.M. y cols. Hepatitis aislada como forma de presentacion de la fiebre Q: características clinicas y epidemiologicas en 109 pacientes. **Enferm Infecc Microbiol Clin** 2003; 21:193-195.
- Rosef, O.; Paulauskas, A.; Radzijeuskaja, J. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Anaplasma phagocytophilum* in questing *Ixodes ricinus* ticks in relation to the density of wild cervids. **Acta Vet Scand** 2009; 51:47
- Rudenko, N.; Golovchenko, M.; Grubhoffer, L. y cols. *Borrelia carolinensis* sp. nov., a new (14th) member of the *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato complex from the southeastern region of the United States. **J Clin Microbiol** 2009a; 47:134-141.
- Rudenko, N.; Golovchenko, M.; Lin, T. y cols. Delineation of a new species of the *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato Complex, *Borrelia americana* sp. nov. **J Clin Microbiol** 2009b; 47:3875-3880.
- Rudolph, D. y Knulle, W. Site and mechanism of water vapour uptake from the atmosphere in ixodid ticks. **Nature** 1974; 249:84-85.
- Ruiz-Fons, F.; Astobiza, I.; Barandika, J.F. y cols. Seroepidemiological study of Q fever in domestic ruminants in semi-extensive grazing systems. **BMC Vet Res** 2010; 6:3
- Ruiz-Fons, F. y Gilbert, L. The role of deer as vehicles to move ticks, *Ixodes ricinus*, between contrasting habitats. **Int J Parasitol** 2010;
- Saksida, A.; Duh, D.; Lotric-Furlan, S. y cols. The importance of tick-borne encephalitis virus RNA detection for early differential diagnosis of tick-borne encephalitis. **J Clin Virol** 2005; 33:331-335.
- Sanzo, J.M.; Garcia-Calabuig, M.A.; Saez Garbayo, M.P. y cols. Fiebre Q Sukarra. Estudio de Seroprevalencia en la comunidad Autónoma Vasca Vitoria-Gasteiz: Servicio central de Publicaciones del Gobierno Vasco; 1991.
- Schmid, G.P. The global distribution of Lyme disease. **Yale J Biol Med** 1984; 57:617-618.
- Schneider, H. Ueber epidemische akute "Meningitis serosa". **Wien Klin Wochenschr** 1931; 44:350-352.
- Schouls, L.M.; van de Pol, I.; Rijpkema, S.G.T. y cols. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi* sensu lato, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. **J Clin Microbiol** 1999; 37:2215-2222.

- Schulze, T.L. y Jordan, R.A. Effects of habitat structure on the retention of *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) adults during drag sampling surveys. **J Med Entomol** 2001; 38:606-608.
- Schulze, T.L.; Jordan, R.A.; Hung, R.W. Biases associated with several sampling methods used to estimate abundance of *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). **J Med Entomol** 1997; 34:615-623.
- Schwaiger, M. y Cassinotti, P. Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. **J Clin Virol** 2003; 27:136-145.
- Schwan, T.G. y Piesman, J. Vector interactions and molecular adaptations of lyme disease and relapsing fever spirochetes associated with transmission by ticks. **Emerg Infect Dis** 2002; 8:115-121.
- Schwartz, J.J.; Gazumyan, A.; Schwartz, I. rRNA gene organization in the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. **J Bacteriol** 1992; 174:3757-3765.
- Segura, F.; Diestre, G.; Sanfeliu, I. y cols. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi* infection in the area of Valles Occidental (Barcelona, Spain). **Med Clin (Barc)** 2004; 123:395
- Segura, P.F. Nuevas rickettsiosis. **Med Clin (Barc)** 2004; 122:784-785.
- Seshadri, R.; Paulsen, I.T.; Eisen, J.A. y cols. Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2003; 100:5455-5460.
- Shpynov, S.; Fournier, P.E.; Rudakov, N. y cols. Detection of a rickettsia closely related to *Rickettsia aeschlimannii*, "*Rickettsia heilongjiangensis*," *Rickettsia* sp. strain RpA4, and *Ehrlichia muris* in ticks collected in Russia and Kazakhstan. **J Clin Microbiol** 2004; 42:2221-2223.
- Shpynov, S.; Fournier, P.E.; Rudakov, N. y cols. Detection of members of the genera *Rickettsia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* in ticks collected in the Asiatic part of Russia. **Ann N Y Acad Sci** 2006; 1078:378-383.
- Simser, J.A.; Palmer, A.T.; Fingerle, V. y cols. *Rickettsia monacensis* sp. nov., a spotted fever group Rickettsia, from ticks (*Ixodes ricinus*) collected in a European city park. **Appl Environ Microbiol** 2002; 68:4559-4566.
- Skarpaas, T.; Ljostad, U.; Sundoy, A. First human cases of tickborne encephalitis, Norway. **Emerg Infect Dis** 2004; 10:2241-2243.
- Skotarczak, B. y Cichocka, A. Isolation and amplification by polymerase chain reaction DNA of *Babesia microti* and *Babesia divergens* in ticks in Poland. **Ann Agric Environ Med** 2001; 8:187-189.
- Skotarczak, B.; Rymaszewska, A.; Wodecka, B. y cols. Molecular evidence of coinfection of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, human granulocytic ehrlichiosis agent, and *Babesia microti* in ticks from northwestern Poland. **J Parasitol** 2003; 89:194-196.
- Smart, D.L. y Caccamise, D.F. Population dynamics of the American dog tick (Acari: Ixodidae) in relation to small mammal hosts. **J Med Entomol** 1988; 25:515-522.
- Smetanova, K.; Schwarzova, K.; Kocianova, E. Detection of *Anaplasma phagocytophilum*, *Coxiella burnetii*, *Rickettsia* spp., and *Borrelia burgdorferi* s. l. in Ticks, and wild-living animals in western and middle Slovakia. **Ann N Y Acad Sci** 2006; 1078:312-315.
- Smith, R. y Takkinen, J. Lyme borreliosis: Europe-wide coordinated surveillance and action needed? **Euro Surveill** 2006; 11:E060622

- Smith, T. y Kilbourne, F.L. Investigators into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever. **Bull Bur Anim Ind , US Dept Agric** 1893;1-301.
- Sobradillo, V.; Ansola, P.; Baranda, F. y cols. Q fever pneumonia: a review of 164 community-acquired cases in the Basque country. **Eur Respir J** 1989; 2:263-266.
- Sobrino, R. y Gortazar, C. Seroprevalence of antibodies to *Borrelia burgdorferi* in wild canids in Spain. **Vet Rec** 2008; 162:248-249.
- Solano-Gallego, L.; Llull, J.; Osso, M. y cols. A serological study of exposure to arthropod-borne pathogens in dogs from northeastern Spain. **Vet Res** 2006; 37:231-244.
- Solberg, V.B.; Neidhardt, K.; Sardelis, M.R. y cols. Quantitative evaluation of sampling methods for *Ixodes dammini* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). **J Med Entomol** 1992; 29:451-456.
- Sonenshine, D.E. Biology of Ticks I. New York (USA): Oxford University Press, Inc; 1991.
- Sonenshine, D.E. Biology of ticks II. New York (USA): Oxford University Press. Ed; 1993.
- Sonenshine, D.E. Tick pheromones and their use in tick control. **Annu Rev Entomol** 2006; 51:557-580.
- Sonenshine, D.E.; Lane, R.S.; Nicholson, W.L. Ticks (Ixodida). In Medical and Veterinary Entomology. Mullen, G. R. and Durden, L. A. San Diego, California: Academic Press; 2002: 517-518.
- Spitalska, E. y Kocianova, E. Detection of *Coxiella burnetii* in ticks collected in Slovakia and Hungary. **Eur J Epidemiol** 2003; 18:263-266.
- Spyridaki, I.; Gikas, A.; Kofteridis, D. y cols. Q fever in the Greek island of Crete: detection, isolation, and molecular identification of eight strains of *Coxiella burnetii* from clinical samples. **J Clin Microbiol** 1998; 36:2063-2067.
- Spyridaki, I.; Psaroulaki, A.; Loukaides, F. y cols. Isolation of *Coxiella burnetii* by a centrifugation shell-vial assay from ticks collected in Cyprus: detection by nested polymerase chain reaction (PCR) and by PCR-restriction fragment length polymorphism analyses. **Am J Trop Med Hyg** 2002; 66:86-90.
- Sreter-Lancz, Z.; Szell, Z.; Kovacs, G. y cols. Rickettsiae of the spotted-fever group in ixodid ticks from Hungary: identification of a new genotype ('*Candidatus* Rickettsia kotlanii'). **Ann Trop Med Parasitol** 2006; 100:229-236.
- Stanczak, J.; Gabre, R.M.; Kruminis-Lozowska, W. y cols. *Ixodes ricinus* as a vector of *Borrelia burgdorferi* sensu lato, *Anaplasma phagocytophilum* and *Babesia microti* in urban and suburban forests. **Ann Agric Environ Med** 2004; 11:109-114.
- Steere, A.C.; Malawista, S.E.; Snyderman, D.R. y cols. Lyme arthritis: an epidemic of oligoarticular arthritis in children and adults in three Connecticut communities. **Arthritis Rheum** 1977; 20:7-17.
- Stein, A. y Raoult, D. Detection of *Coxiella burnetii* by DNA amplification using polymerase chain reaction. **J Clin Microbiol** 1992; 30:2462-2466.
- Sumilo, D.; Bormane, A.; Asokliene, L. y cols. Socio-economic factors in the differential upsurge of tick-borne encephalitis in central and Eastern Europe. **Rev Med Virol** 2008;
- Sumner, J.W.; Nicholson, W.L.; Massung, R.F. PCR amplification and comparison of nucleotide sequences from the *groESL* heat shock operon of *Ehrlichia* species. **J Clin Microbiol** 1997; 35:2087-2092.
- Suss, J. Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. **Vaccine** 2003; 21(Suppl 1):19-35.

- Suss, J. Tick-borne encephalitis in Europe and beyond--the epidemiological situation as of 2007. **Euro Surveill** 2008; 13:
- Talleklint, L. Lyme borreliosis spirochetes in *Ixodes ricinus* and *Haemaphysalis punctata* ticks (Acari: Ixodidae) on three islands in the Baltic Sea. **Exp Appl Acarol** 1996; 20:467-476.
- Talleklint, L. y Jaenson, T.G. Relationship between *Ixodes ricinus* density and prevalence of infection with *Borrelia*-like spirochetes and density of infected ticks. **J Med Entomol** 1996; 33:805-811.
- Talleklint, L.; Jaenson, T.G.; Mather, T.N. Seasonal variation in the capacity of the bank vole to infect larval ticks (Acari: Ixodidae) with the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*. **J Med Entomol** 1993; 30:812-815.
- Talleklint, L. y Jaenson, T.G.T. Maintenance by hares of European *Borrelia burgdorferi* in ecosystems without rodents. **J Med Entomol** 1993; 30:273-276.
- Talleklint-Eisen, L. y Lane, R.S. Efficiency of drag sampling for estimating population sizes of *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) nymphs in leaf litter. **J Med Entomol** 2000; 37:484-487.
- Telford, S.R.; Dawson, J.E.; Katavolos, P. y cols. Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1996; 93:6209-6214.
- Telford, S.R., III y Goethert, H.K. Emerging tick-borne infections: rediscovered and better characterized, or truly 'new' ? **Parasitology** 2004; 129 Suppl:S301-S327.
- Telford, S.R., III; Mather, T.N.; Adler, G.H. y cols. Short-tailed shrews as reservoirs of the agents of Lyme disease and human babesiosis. **J Parasitol** 1990; 76:681-683.
- Thompson, J.D.; Higgins, D.G.; Gibson, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res** 1994; 22:4673-4680.
- Thorin, C.; Rigaud, E.; Capek, I. y cols. Seroprevalence of Lyme Borreliosis and tick-borne encephalitis in workers at risk, in eastern France. **Med Mal Infect** 2008; 38:533-542.
- Tissot-Dupont, H.; Amadei, M.A.; Nezri, M. y cols. Wind in November, Q fever in December. **Emerg Infect Dis** 2004; 10:1264-1269.
- Tissot-Dupont, H.; Torres, S.; Nezri, M. y cols. Hyperendemic focus of Q fever related to sheep and wind. **Am J Epidemiol** 1999; 150:67-74.
- Toledo, A. Dinámica de la infección de garrapatas por agente zoonóticos en la zona centro de la Península Ibérica. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid. España.; 2007.
- Toledo, A.; Jado, I.; Olmeda, A.S. y cols. Detection of *Coxiella burnetii* in ticks collected from Central Spain. **Vector Borne Zoonotic Dis** 2009a; 9:465-468.
- Toledo, A.; Olmeda, A.S.; Escudero, R. y cols. Tick-borne zoonotic bacteria in ticks collected from central Spain. **Am J Trop Med Hyg** 2009b; 81:67-74.
- Travassos Santos Dias, J.A. As carraças (Acarina-Ixodoidea) da Península Ibérica. Algumas considerações sobre a sua biogeografia e relacionamento com a ixodofauna afropaleártica e afrotropical Lisboa: Ministério do Planeamento e da Administração do Território. Secretaria de Estado da Ciência e Tecnologia. Instituto de Investigação Científica Tropical; 1994.
- Tsao, J.I. Reviewing molecular adaptations of Lyme borreliosis spirochetes in the context of reproductive fitness in natural transmission cycles. **Vet Res** 2009; 40:36

- Tsunoda, T.; Kasuga, S.; Amano, H. Estimation of the density of nymphs of the bush tick, *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae), by the catch effort method. **Exp Appl Acarol** 2004; 32:69-78.
- Uria, D.F.; Calatayud, M.; Mongelos, J.M. y cols. Meningopolyneuritis as a manifestation of Lyme disease. **Med Clin (Barc)** 1987; 89:381-383.
- Uspensky, I. Preliminary observations on specific adaptations of exophilic ixodid ticks to forests or open country habitats. **Exp Appl Acarol** 2002; 28:147-154.
- van Dam, A.P.; Kuiper, H.; Vos, K. y cols. Different genospecies of *Borrelia burgdorferi* are associated with distinct clinical manifestations of Lyme borreliosis. **Clin Infect Dis** 1993; 17:708-717.
- Vassallo, M.; Pichon, B.; Cabaret, J. y cols. Methodology for sampling questing nymphs of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae), the principal vector of Lyme disease in Europe. **J Med Entomol** 2000; 37:335-339.
- Viseras, J.; Hueli, L.E.; Adroher, F.J. y cols. Studies on the transmission of *Theileria annulata* to cattle by the tick *Hyalomma lusitanicum*. **J Vet Med B** 1999; 46:505-509.
- Vitale, G.; Mansuelo, S.; Rolain, J.M. y cols. *Rickettsia massiliae* human isolation. **Emerg Infect Dis** 2006; 12:174-175.
- Vitorino, L.; De Sousa, R.; Bacellar, F. y cols. Characterization of a tandem repeat polymorphism in *Rickettsia* strains. **J Med Microbiol** 2005; 54:833-841.
- Vitorino, L.; De Sousa, R.; Bacellar, F. y cols. *Rickettsia* sp. strain RpA4 detected in Portuguese *Dermacentor marginatus* ticks. **Vector Borne Zoonotic Dis** 2007; 7:217-220.
- Vredevoe, L.K.; Stevens, J.R.; Schneider, B.S. Detection and characterization of *Borrelia bissetii* in rodents from the central California coast. **J Med Entomol** 2004; 41:736-745.
- Walker, D.H. y Dumler, J.S. Emergence of the ehrlichioses as human health problems. **Emerg Infect Dis** 1996; 2:18-29.
- Walker, J.B.; Keirans, J.E.; Horak, I.G. The Genus *Rhipicephalus* (Acari, Ixodidae). A Guide to the Brown Ticks of the World. Cambridge (UK): Cambridge University Press; 2000.
- Wallner, G.; Mandl, C.W.; Ecker, M. y cols. Characterization and complete genome sequences of high- and low- virulence variants of tick-borne encephalitis virus. **J Gen Virol** 1996; 77 (Pt 5):1035-1042.
- Wallner, G.; Mandl, C.W.; Kunz, C. y cols. The flavivirus 3'-noncoding region: extensive size heterogeneity independent of evolutionary relationships among strains of tick-borne encephalitis virus. **Virology** 1995; 213:169-178.
- Walls, J.J.; Caturegli, P.; Bakken, J.S. y cols. Improved sensitivity of PCR for diagnosis of human granulocytic ehrlichiosis using *epank1* genes of *Ehrlichia phagocytophila*-group ehrlichiae. **J Clin Microbiol** 2000; 38:354-356.
- Walls, J.J.; Greig, B.; Neitzel, D.F. y cols. Natural infection of small mammal species in Minnesota with the agent of human granulocytic ehrlichiosis. **J Clin Microbiol** 1997; 35:853-855.
- Wang, G. Direct detection methods for Lyme *Borrelia*, including the use of quantitative assays. **Vector Borne Zoonotic Dis** 2002; 2:223-231.
- Wang, G.; van Dam, A.P.; Dankert, J. Evidence for frequent OspC gene transfer between *Borrelia valaisiana* sp. nov. and other Lyme disease spirochetes. **FEMS Microbiol Lett** 1999a; 177:289-296.

- Wang, G.; van Dam, A.P.; Le Fleche, A. y cols. Genetic and phenotypic analysis of *Borrelia valaisiana* sp. nov. (*Borrelia* genomic groups Vs116 and M19). **Int J Syst Bacteriol** 1997; 47:926-932.
- Wang, G.; van Dam, A.P.; Schwartz, I. y cols. Molecular typing of *Borrelia burgdorferi* sensu lato: taxonomic, epidemiological, and clinical implications. **Clin Microbiol Rev** 1999b; 12:633-653.
- Webster, J.P.; Lloyd, G.; Macdonald, D.W. Q fever (*Coxiella burnetii*) reservoir in wild brown rat (*Rattus norvegicus*) populations in the UK. **Parasitology** 1995; 110 (Pt 1):31-35.
- Wielinga, P.R.; Gaasenbeek, C.; Fonville, M. y cols. Longitudinal analysis of tick densities and *Borrelia*, *Anaplasma*, and *Ehrlichia* infections of *Ixodes ricinus* ticks in different habitat areas in The Netherlands. **Appl Environ Microbiol** 2006; 72:7594-7601.
- Willems, H.; Thiele, D.; Frolich-Ritter, R. y cols. Detection of *Coxiella burnetii* in cow's milk using the polymerase chain reaction (PCR). **Zentralbl Veterinarmed** 1994; 41:580-587.
- Wilske, B.; Fingerle, V.; Schulte-Spechtel, U. Microbiological and serological diagnosis of Lyme borreliosis. **FEMS Immunol Med Microbiol** 2007; 49:13-21.
- Wilson, M.L.; Litwin, T.S.; Gavin, T.A. y cols. Host-dependent differences in feeding and reproduction of *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae). **J Med Entomol** 1990; 27:945-954.
- Zeidner, N.S.; Burkot, T.R.; Massung, R. y cols. Transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by *Ixodes spinipalpis* ticks: evidence of an enzootic cycle of dual infection with *Borrelia burgdorferi* in Northern Colorado. **J Infect Dis** 2000; 182:616-619.
- Zhang, G.Q.; Nguyen, S.V.; To, H. y cols. Clinical evaluation of a new PCR assay for detection of *Coxiella burnetii* in human serum samples. **J Clin Microbiol** 1998; 36:77-80.
- Zhioua, E.; Bouattour, A.; Chang-MinHu y cols. Infection of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) by *Borrelia burgdorferi* sensu lato in North Africa. **J Med Entomol** 1999; 36:216-218.
- Zhu, Y.; Fournier, P.E.; Eremeeva, M. y cols. Proposal to create subspecies of *Rickettsia conorii* based on multi-locus sequence typing and an emended description of *Rickettsia conorii*. **BMC Microbiol** 2005a; 5:11
- Zhu, Y.; Fournier, P.E.; Ogata, H. y cols. Multispacer typing of *Rickettsia prowazekii* enabling epidemiological studies of epidemic typhus. **J Clin Microbiol** 2005b; 43:4708-4712.
- Zore, A.; Petrovec, M.; Prosenc, K. y cols. Infection of small mammals with *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Slovenia as determined by polymerase chain reaction (PCR). **Wien Klin Wochenschr** 1999; 111:997-999.