



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en

Autor/es

Director/es

Facultad de Veterinaria

Índice

• Resumen/Abstract	Página 2
• Introducción	Página 4
• Justificación y objetivos	Página 5
• Material y métodos	Página 6
• Datos de clima	Página 7
• Estadística	Página 8
• Resultados	Página 9
○ Datos reales de fenología	Página 9
○ Datos de temperatura y NDVI	Página 10
○ Datos de modelo y su ajuste a los datos reales	Página 11
• Discusión	Página 15
• Conclusiones/Conclusions	Página 19
• Valoración Personal	Página 20
• Leyenda de las figuras	Página 21
• Referencias	Página 22

Resumen.

Se han colectado mensualmente todos los estadios activos de la garrapata *Ixodes ricinus* en dos lugares en el norte de España entre los años 2000 y 2007. Se ha usado la acumulación percentil mensual de cada estadio activo para desarrollar correlaciones simples y coherentes entre la acumulación de larvas y ninfas en la vegetación con los datos mensuales del clima y la vegetación registrada por la serie de satélites MODIS. Estos datos incluyen la temperatura mensual y acumulada y el índice normalizado de vegetación (NDVI). Este marco estadístico no pretende predecir la abundancia real de garrapatas en el campo (medida de la exposición para humanos) sino proporcionar una estructura para abordar la fenología de la garrapata. Este estudio demuestra que la acumulación de larvas es una función sigmoidea de la temperatura acumulada desde el comienzo del año. También se demuestra que la temperatura acumulada necesaria para reclutar ninfas desde la etapa larval es una función de la actividad de las larvas, de la temperatura acumulada y el NDVI. Los bajos valores de “p” obtenidos en las regresiones confirman que dicho reclutamiento puede calcularse utilizando intervalos de tiempo para estimar, por ejemplo, el comienzo del período de búsqueda o la época del año en que se puede esperar el máximo de población ninfal. El modelo es coherente porque la comparación entre las temperaturas acumuladas pronosticadas y reales para el reclutamiento de larvas y ninfas tuvo un error promedio de 20 días en un año completo. El uso de la temperatura acumulada y el NDVI, propuestos en este estudio, abren la posibilidad de predecir la fenología de *I. ricinus* como medida básica de auto-protección en humana. El marco que se propone en este estudio podría evaluar las mismas correlaciones a lo largo del rango geográfico de la garrapata.

Abstract.

Monthly collections of every questing active stage of the tick *Ixodes ricinus* were carried out in two places in the northern Spain area between 2000 and 2007. The monthly percentile accumulation of every active state is used to develop simple and coherent correlations between the larvae and nymphs accumulation on the vegetation and the MODIS-derived monthly climate and vegetation data. These data include temperature, monthly-accumulated temperature and the normalized difference vegetation index (NDVI). This statistical context does not claim to predict the actual number of ticks in the vegetation (a measure of human exposure) but to set a structure to deal with the tick phenology. The study proves that the larval accumulation is a sigmoid function of accumulated temperature from the beginning of the year. It also proves that the accumulated temperature required to recruit nymphs from the larval state is a function of larval activity, accumulated temperature and NDVI. The low “p” values obtained in regressions support that the recruiting of nymphs can be obtained using time lapses to estimate, i.e. the

beginning of the search cycle or the time of the year to expect the maximum nymph population. The model is consistent because the comparison between the predicted and the true accumulated temperatures had a 20 days average error in a whole year. The use of accumulated temperature and NDVI suggested in this study open the possibility to predict the phenology of *I. ricinus* as a basic measure of human self-protection. The framework of this study could evaluate the same correlations along the tick geographical range.

Introducción.

Las garrapatas son ácaros, una subclase de los arácnidos, agrupados en el suborden Ixodida. Existen 4 familias de garrapatas. Las Ixodidae, conocidas como garrapatas duras (Ixodidae), blandas (Argasidae), más la considerada como “fósil viviente” (Nuttalliellidae), con una única especie que se considera un eslabón perdido en la evolución de estos parásitos hematófagos (Mans et al., 2016). Se ha reconocido recientemente una cuarta familia, Deinocrotonidae (Peñalver et al., 2017) representada hasta la fecha por un solo ejemplar fósil conservado en ámbar birmano de alrededor de 90 millones de años de antigüedad.

El ciclo vital de los Ixodidae está compuesto por 4 estadios, que consisten en el huevo, del cual eclosionarán las larvas, que mudarán a ninfa y adulto. A este ciclo también se le llama ciclo de 3 hospedadores ya que cada estadio debe encontrar un hospedador e ingerir sangre para poder mudar al próximo estadio. Las larvas parasitan normalmente a pequeños mamíferos o reptiles. Una vez repletas de sangre se desprenden de su hospedador y caen al suelo para realizar la muda a ninfa. Las ninfas repetirán este mismo proceso de alimentación y muda, pero en este caso sus hospedadores pueden ser también grandes mamíferos. En la mayoría de las especies la fecundación de los adultos se produce sobre el hospedador. Una vez que la hembra esté repleta de sangre (la cual puede llegar a ingerir hasta 100 veces su peso en sangre aumentando notablemente su tamaño) cae al suelo para realizar la puesta de huevos, cuyo número oscila entre 1500 y 16000 según el género de la garrapata. Finalmente, tras la puesta de huevos, la garrapata muere. La duración de todo este proceso es variable, oscilando entre 1 y 5 años, dependiendo de las condiciones climáticas, abundancia de hospedadores, o las peculiaridades de la especie de garrapata (Estrada-Peña, 2015).

Los ixódidos buscan a sus hospedadores de forma pasiva entre la vegetación, en la que realizan una serie de ciclos de ascenso y descenso para mantener su balance hídrico, siempre que la temperatura esté por encima de un umbral crítico de activación. Todo el proceso está influido por la temperatura y humedad. En primavera, con una temperatura media, una humedad adecuada y el correspondiente incremento del fotoperiodo, las garrapatas esperan al hospedador en las porciones más altas de la vegetación. Según aumentan la temperatura y disminuye la humedad, la garrapata desciende para recuperar el balance hídrico perdido. Si en invierno no han encontrado hospedador, entran en diapausa por el corto fotoperiodo y las bajas temperaturas. En resumen, la mayor parte del ciclo vital de estos parásitos depende en gran medida del clima, ya que son las condiciones de fotoperiodo temperatura y humedad las que condicionan su actividad (de la Fuente et al., 2008; Gray et al., 2016).

Las garrapatas suponen un importante riesgo para la salud humana y animal, ya que son los artrópodos hematófagos que pueden transmitir una mayor variedad de agentes patógenos, principalmente virus y bacterias, además de protozoos y otros parásitos (Estrada-Peña, 2015b). Es necesario indicar que producen toxinas durante su alimentación y que una parasitación grave deriva en una seria anemia, así como otros trastornos derivados de la diversidad de proteínas que inoculan con su saliva para completar su alimentación (de la Fuente et al., 2008).

Ixodes ricinus es la especie de mayor interés sanitario en Europa (Medlock et al., 2013). Es el vector demostrado de las especies de bacterias del grupo *Borrelia burgdorferi* s.l., los agentes etiológicos de la borreliosis de Lyme. También es el vector de diferentes *Flavivirus*, que causan las Encefalitis transmitidas por garrapatas (TBE), más comunes en el norte y este de Europa. *Ixodes ricinus* es también el vector de *Anaplasma phagocytophilum*, de *Babesia divergens*, de varias especies de *Rickettsia* y de *Neoehrlichia michuriensis*. Todos estos agentes han demostrado tener acciones patógenas en los humanos. Muchas de estas enfermedades se consideran emergentes, ya que en las últimas décadas ha aumentado la incidencia de casos por múltiples factores como el cambio climático, el auge de las actividades al aire libre, o los cambios en el uso del suelo (Rizzoli et al., 2014).

Justificación y Objetivos.

Las autoridades sanitarias europeas recomiendan la autoprotección contra las garrapatas como la única medida adecuada para evitar la transmisión de agentes patógenos por garrapatas a los humanos (<https://ecdc.europa.eu/en/tick-borne-diseases>, página visitada en mayo de 2018). Sin embargo, también se reconoce que es necesaria una herramienta preventiva adecuada que permita obtener estimaciones de la abundancia de garrapatas en el campo, o al menos, una aproximación de los momentos de mayor riesgo. Este planteamiento se basa en el hecho de que las variables climáticas constituyen la principal (si no la única) fuente de variabilidad inter-anual y de acumulación de garrapatas en la vegetación (Estrada-Peña et al., 2004; Gray, 2008; Perret et al., 2000). Los muestreos de campo pueden ser orientativos, pero es necesario obtener a partir de ellos un modelo generalista que permita obtener tales estimaciones. Aunque se han hecho algunos avances en este campo (Daniel et al., 2015), nunca se han integrado largas series de muestreos de garrapatas en el campo con datos de clima registrados por satélites. Estos constituyen la fuente más fiable y con mayor periodicidad del registro climático, y deberían ser el paradigma alrededor del cual elaborar un modelo de riesgo por garrapatas.

El objetivo de este estudio es crear un modelo de predicción de la abundancia de las ninfas de *I. ricinus* a partir de datos mensuales de campo tomados durante 9 años de muestreos en dos

lugares diferentes de España, y utilizando datos de clima y de vigor vegetal (el índice NDVI) procedentes de registros de los satélites de la serie MODIS. Se ha elegido el estadio ninfal de *I. ricinus* porque es el que parasita en mayor proporción a los humanos. Se ha pretendido construir un modelo simple, basado en regresiones múltiples, que sea de aplicación a diferentes lugares en Europa, una vez que las largas series de datos de campo necesarias estén accesibles, para comprobar su validez como una herramienta de ayuda a la auto-protección en humana. Este estudio pretende proponer un modelo estadístico simple que explique cómo se recluta la población de ninfas de *I. ricinus* en el campo, bajo condiciones reales, para, de esta forma, explicar las relaciones del clima con la actividad de las garrapatas y la exposición de los humanos a las mismas.

Material y Métodos.

1. Muestreos de garrapatas en el campo.

Para el desarrollo del modelo de riesgo por ninfas de *I. ricinus*, se realizaron muestreos de campo para averiguar la abundancia de garrapatas, datos sobre los que se ajustaron posteriormente los datos climáticos. Los muestreos se realizaron en 2 lugares diferentes del norte y centro de España, en los que los valores invernales de clima son diferentes, y por ello cabía esperar una dinámica estacional distinta. El primer sitio de muestreo se encuentra en el Pirineo Oscense cerca del Monasterio de San Juan de la Peña (42°30'N, 0°41'W). En este punto se muestreó desde enero del año 2000 hasta noviembre de 2006. El segundo sitio de muestreo se encuentra en La Rioja, en la Sierra de Cameros, concretamente en la zona del Camero Nuevo (42°06'N, 2°41'W). En este lugar se muestreó desde enero de 2001 hasta diciembre de 2007. Los muestreos se realizaron una vez al mes durante los periodos citados previamente, su duración fue de media hora, en días sin lluvia y a media mañana. Los muestreos se realizaron siempre por las mismas personas entrenadas para evitar sesgos. Para realizar estos muestreos se empleó el llamado “método de la bandera”, en el cual se extiende una tela blanca de 1 metro cuadrado, mientras se camina lentamente, y se recogen las garrapatas que se hayan prendido a la tela. Conociendo la distancia recorrida (aproximadamente unos 300 metros en los 30 minutos de muestreo) se puede calcular la densidad de garrapatas por hectárea. Aunque en los muestreos se colectaron los tres estadios activos de *I. ricinus*, solamente se han modelado los datos correspondientes a las ninfas. De cualquier forma, también se ha trabajado sobre los datos de reclutamiento de las larvas, como una de las medidas necesarias para poder predecir el comportamiento de las ninfas. El concepto de “reclutamiento” indica la incorporación de ejemplares activos en la vegetación, bien porque han terminado la muda o bien porque se han activado por las temperaturas después de la diapausa invernal. Dado que la población de ninfas

procede de la muda de las larvas alimentadas, el reclutamiento de las ninfas dependerá, además del clima reinante, del momento del año en el que las larvas están activas. Por otro, los adultos de *I. ricinus* son escasos, por lo que su densidad puede originar problemas estadísticos a la hora de elaborar los modelos. Sin embargo, se han utilizado los datos de reclutamiento de las larvas para mejorar el modelo de las ninfas.

Los datos sobre la densidad de garrapatas se escalaron a la fracción mensual de ninfas (AMN), y la fracción acumulada de ninfas (A-AMN) que se entiende como el sumatorio del incremento mensual de la población de ninfas, por cada mes, año y sitio de estudio, para normalizar la variabilidad entre años y sitios y para estimar el inicio, los máximos y el final de la temporada de actividad. Por lo tanto, siendo N el número total de larvas o ninfas recogidas en el año 'y', en el sitio 's', el valor escalado de N en el mes m tiene la forma

$$AML(m, y, s) = \sum_{i=1}^m L\{i, y, s\} \div \sum_{i=1}^{12} L\{i, y, s\}$$

$$AMN(m, y, s) = \sum_{i=1}^m N\{i, y, s\} \div \sum_{i=1}^{12} N\{i, y, s\}$$

En este estudio, utilizaremos tanto AMN como A-AMN, observadas en un mes, año y lugar determinados, como datos de entrada para análisis estadísticos con las variables ambientales detectadas remotamente. El objetivo es obvio: se trata de poder predecir tanto la densidad de ninfas esperada en un mes del año, a partir de los datos de clima de ese mes, y de los meses anteriores, como el porcentaje de la población de ninfas (A-AMN) que ya ha estado activo en los meses anteriores, y que representa el “reclutamiento” de la población completa de ninfas activas. Este segundo parámetro permite conocer si la época de riesgo para los humanos, en un territorio determinado “ya ha terminado” pues el total de la población de ninfas ha sido reclutado por las condiciones climáticas reinantes.

2. Datos de clima.

Como se ha mencionado, los datos de clima se han obtenido a partir de registros de los satélites de la serie MODIS. En primer lugar, fue imposible la utilización de datos de clima procedentes de casetas de registro de la red climatológica nacional, debido a su lejanía a los lugares de muestreo (y por lo tanto no reflejando las condiciones reales de clima en el punto de muestreo) y debido a que las garrapatas desarrollan su actividad en los primeros 50-80 centímetros de la vegetación, mientras que las casetas climáticas registran datos a dos metros de altura (según

condiciones oficiales de registro). Sin embargo, los registros de satélite no están tampoco exentos de variabilidad, debido a la presencia de nieve, hielo y nubes que producen los llamados “píxeles contaminados”, los cuales se pueden procesar y eliminar adecuadamente.

Se ha utilizado la temperatura de la superficie terrestre durante el día y la noche y el Normalized Difference Vegetation Index (NDVI) registrado por la serie de satélites MODIS. El NDVI es un índice que evalúa el vigor vegetal, y que se ha venido utilizando como un indicador adecuado de la humedad relativa en el territorio. Se descargaron los productos mensuales de los conjuntos de datos MOD11C3, MYD11C3, MOD13C1 y MYD13C1 (versión 5) en la serie MODIS para los años 2000 a 2007 (en el repositorio oficial accesible en https://lpdaac.usgs.gov/dataset_discovery/modis/modis_products_table). Los datos MOD11C3 y MYD11C3 incluyen la temperatura de la superficie terrestre durante el día (LSTD) y la temperatura de la superficie terrestre durante la noche (LSTN) de los satélites Terra y Aqua (solo después de 2002 para la serie Aqua), respectivamente, mientras que MOD13C1 y MYD13C1 incluyen mediciones de NDVI de ambos satélites. Cada satélite traza una ruta orbital única sobre la región de estudio, lo que origina estimaciones ligeramente divergentes de las variables diarias. La resolución espacial nominal del conjunto de datos es de 0.05° (~ 5800 m). Las imágenes se recortaron de acuerdo con el área geográfica de la región de estudio y las mediciones se convirtieron en grados Celsius para LSTD y LSTN y un rango común para NDVI (- 1 a +1) (MRT User's Manual, 2011). Los indicadores de calidad se corrigieron eliminando los píxeles identificados por MODIS como de baja fiabilidad de píxeles debido a nubes, nieve o mediciones nulas o no válidas y que podrían afectar los valores de LSTD, LSTN o NDVI. Este procedimiento aseguró que solo los píxeles grabados de forma óptima se usaran para el estudio. El conjunto completo de datos de temperatura y vegetación se convirtió en valores promediados mensuales, porque esta es la unidad de tiempo utilizada para las muestras de campo.

Todo el procesado digital de imágenes se desarrolló en el software qGIS (<http://qgis.org>, visitada en febrero de 2018) que permite tanto el procesado de imágenes raster como la transferencia de datos a datos vectoriales. En nuestro caso, esta capacidad es esencial, pues es preciso “transportar” los datos de temperatura y NDVI a los puntos en los que se realizaron los muestreos, y obtener así una tabla de variables explicativas de la variable de campo (el número de garrapatas capturadas).

3. Estadística

Para la confección de los modelos de este estudio se ha empleado un método estadístico llamado regresión lineal múltiple. En una regresión lineal se sigue una ecuación del tipo $y = a +$

bx en el que sólo existe una variable independiente (y) y otra dependiente (x) La regresión múltiple se utiliza cuando se quiere estudiar la posible relación entre diferentes variables independientes (predictivas o explicativas) y otra variable dependiente (criterio, explicada o respuesta). En este caso queremos estudiar el número de garrapatas activas en el campo, el cual consideramos como hipótesis que puede estar relacionado con la temperatura del suelo o la humedad relativa del suelo (evaluada en base al NDVI). Por tanto, una regresión múltiple seguiría un modelo del tipo $y = a + bx_1 + cx_2 + dx_3 \dots$ ecuación en la que “y” sería el número de garrapatas activas en el campo, mientras que bx_1 , cx_2 , $dx_3 \dots$ serían las variables independientes procedentes de los datos climáticos satelitales.

Es obvio que existen otros métodos estadísticos que pueden proporcionar un mejor ajuste o quizás elaborar un modelo más robusto. Entre las técnicas más usadas recientemente se encuentran las redes neurales, los árboles de regresión o las llamadas “support vector machines” que producen normalmente mejores resultados que una regresión múltiple. Sin embargo, se trata de modelos complejos, en los que en algunas ocasiones se diluye el significado ecológico de las variables explicativas. Por otro lado, tales modelos suelen ser de escasa utilidad fuera de los datos con los que han sido ajustados. Es decir, son capaces de predecir adecuadamente la serie de datos a estudiar, pero necesitan de nuevos ajustes cuando se aplican a nuevas series de datos.

La estadística de este estudio se ha realizado entre todas las variables procedentes de los dos satélites Terra y Aqua, con los datos de temperatura diurnos y nocturnos, junto con los datos de NDVI de ambos satélites (diurnos y nocturnos) para cada uno de los puntos de muestreo. En cada caso, se ha pretendido explicar tanto la fracción percentil de ninfas (AMN) como el valor percentil acumulado, como se ha explicado más arriba. El procesamiento estadístico se ha realizado en el software JMP versión 9 (Instituto SAS). Se ha buscado el mejor modelo basado en el Criterio de Información de Akaike (AIC), que se basa en producir el mejor ajuste utilizando el menor número y la mejor combinación de variables climáticas. Todas las variables explicativas se han utilizado de forma única y simple (sin términos cuadráticos) para no añadir redundancia al modelo. Es sabido que esta recursividad en la introducción de las variables mejora los modelos, al coste de la redundancia en la inclusión de variables auto-correlacionadas. Como se ha mencionado antes, es importante conocer cuando está activa la población de larvas, con objeto de tener una mejor aproximación al momento de actividad de las ninfas (Randolph et al., 2002). Por ello, y aunque el objetivo principal de este estudio no es la obtención de un modelo para las ninfas, también se comprobó la influencia de la temperatura (real y acumulada) en el reclutamiento de las larvas, como una variable más a incluir en los modelos de actividad de las

ninfas. Las variables detectadas como adecuadas para explicar la abundancia de garrapatas se han identificado mediante el valor de “p”, y la bondad del ajuste del modelo mediante su coeficiente de determinación de Spearman.

Resultados

1. Datos reales de fenología

Aunque los modelos se han realizado con el estadio de ninfa de *I. ricinus*, se ha incluido la fenología completa de todo el ciclo vital de la garrapata, entre los años 2000 y 2007, en las zonas de muestreo. Las gráficas en la Figura 1 muestran la abundancia relativa (percentil) de las larvas, ninfas y adultos capturados en Pirineos (A) y Rioja (B) como porcentaje del total de la población de individuos, para normalizar los resultados. Estas gráficas indican varios hechos de interés que se repiten de forma constante en todos los años de muestreos:

- Las larvas aparecen siempre a mediados del verano, después del reclutamiento de las ninfas, lo que indica que las larvas presentes en un año, darán lugar a las ninfas activas al año siguiente, y no al contrario.
- Las ninfas tienen siempre un pico de actividad en la primavera, que puede ser único (unimodal) en los Pirineos o doble (bimodal) en Rioja. En otras palabras, las larvas que aparecen activas en Rioja durante el verano, son responsables de la cohorte de ninfas en el otoño del mismo año, solamente en Rioja. El patrón bimodal de actividad de las ninfas aparece en Pirineos exclusivamente en los años 2000 y 2005.
- Los máximos de actividad ninfal en Rioja son variables, no aparecen siempre en fechas semejantes, y puede haber varios meses de diferencia entre unos años y otros. De la misma forma, el máximo de actividad en primavera puede ser mayor que el de otoño en algunos años, o menor, en otros.
- Los adultos están activos prácticamente durante todo el año, con máximos en otoño-invierno.

Es preciso mencionar que el máximo reclutamiento del estadio larvario (cerca del 100%) se produce casi siempre en el mes de septiembre, apareciendo en algunos años en octubre. Sin embargo, en Rioja, la acumulación completa de larvas reclutadas se observa en el mes de octubre (100%) en todos los años. Como se ha mencionado, los adultos tienen una actividad muy variable, y no se observa un patrón claro. La disminución de horas luz durante el otoño y el invierno no interfiere en su actividad.

2. Datos de temperatura y NDVI.

La Figura 2 incluye los datos de temperatura registrados y procesados para este estudio, tanto para la serie de datos diurnos (LSTD) como nocturnos (LSTN) y para los dos satélites usados (Terra y Aqua) indicados como grados Celsius acumulados por meses (la unidad temporal de trabajo en este estudio). Puede comprobarse la obvia diferencia entre los valores diurnos y nocturnos, pero, de mayor interés, la diferencia entre los dos satélites para registrar cada una de las series de valores. Debido a la serie de lanzamientos, los dos satélites no estaban operativos en las mismas fechas, por lo que las series comparativas comienzan a partir del año 2002. De cualquier forma, como dato más significativo, resulta obvio que la zona de muestreo en Rioja es más fría que la zona de Pirineos. Aunque los datos de verano son semejantes para las dos zonas, el invierno en Rioja es más frío y ligeramente más largo en algunos años. El satélite Aqua casi siempre registró datos mayores de temperatura que el satélite Terra, debido a que sus horas de paso sobre España se producen en momentos diferentes.

La Figura 3 muestra los valores de NDVI (vigor vegetal o unidades de actividad fotosintética) para los dos lugares y años de muestreo, exclusivamente con el sensor Terra. Es de destacar que el valor de NDVI es siempre mayor en el Pirineo, y que la depresión observada durante el otoño e invierno, con la disminución de los valores de NDVI es siempre mucho más pronunciada en Rioja. Este hecho puede ser debido a dos factores: (a) la mayor presencia de nieve en Rioja que contamina píxeles durante más tiempo y produce estimaciones de NDVI más bajas (factor que descartamos debido a que no se observa en las series de temperaturas) o (b) la existencia de árboles caducifolios en Rioja (fundamentalmente *Quercus* spp.) y perennes en Pirineos (fundamentalmente *Pinus* spp. y *Abies* spp.) que provoca la pérdida de hoja en los primeros disminuyendo profundamente el valor de las mediciones de NDVI.

3. Datos de modelo y su ajuste a los datos reales

La Figura 4 muestra el reclutamiento de la población de larvas en función de la temperatura acumulada, expresado como el percentil de la población de larvas de *I. ricinus*. Se observa que ese crecimiento sigue en todos los casos una curva sigmoidea saturada, y que este comportamiento se repite en los dos puntos de muestreo. Los datos modelados se explican mediante los datos de la Tabla 1.

Tabla 1. Ecuaciones de regresión lineal que describen la acumulación en percentiles de las larvas de *I. ricinus* en la vegetación como una función de la temperatura diurna acumulada, registrada por el sensor Terra. Se muestran los resultados de forma independiente para ambos lugares de captura, así como integrados en una sola ecuación para mostrar que el modelo es aplicable a ambos lugares independientemente de los datos con los que se entrene.

Sitio	Término	Estimación	Valor P
Pirineos	T. independiente	-6.5852	<0.0001
	LSTD acumulada (Terra)	0.0024	<0.0001
Rioja	T. independiente	-8.1455	<0.0001
	LSTD acumulada (Terra)	0.0027	<0.0001
Pirineos+Rioja	T. independiente	-6.9921	<0.0001
	LSTD acumulada (Terra)	0.0024	<0.0001

La regresión para el cálculo de la fracción acumulada de larvas en la vegetación frente a la temperatura se muestra en la Tabla 1. La mejor correlación se obtuvo utilizando solo una variable, la LSTD acumulada del sensor Terra (Pirineos: $R^2 = 0,91$, $P < 0,0001$; Rioja : $R^2 = 0,93$, $P < 0,0001$; sitios combinados: $R^2 = 0,91$, $P < 0,0001$). La inclusión de otras variables (por ejemplo, temperatura mensual no acumulada o NDVI) no mejoró la regresión, lo cual indica que el reclutamiento de las larvas en la vegetación es una función directa de la temperatura acumulada a lo largo del año.

Tabla 2. Importancia de las variables que describen la fracción acumulada de ninfas de *I. ricinus* en la vegetación, como función de la fracción acumulada de larvas y de los datos climáticos registrados mediante satélite. Se incluyen como variables el lugar de muestreo y el año como efectos sobre las regresiones.

Término	T-Ratio	Valor P
Fracción acumulada de larvas	-7.41	<0.0001
LSTD acumulada (Terra)	-1.15	0.116
LSTD acumulada (Aqua)	5.57	<0.0001
NDVI acumulado (Terra)	46.23	<0.0001
NDVI acumulado (Aqua)	0.98	0.105
Año	1.04	0.109

Sitio de muestreo	-1.98	0.098
-------------------	-------	-------

Las variables que describen la temperatura acumulada necesaria para "desarrollar" (mudar+activar) la población de larvas según los datos registrados en el año "y" hacia una fracción de ninfas en el año "y + 1" se incluyen en la Tabla 2. Tanto el NDVI de Aqua como el LSTD de Terra tienen una discriminación pobre, así como las variables 'año' y 'sitio'. Tanto el NDVI acumulado de Terra y los valores mensuales (es decir, no acumulados) de LSTD de Aqua son las mejores variables. El mejor conjunto de variables es LSTD mensual derivado de Aqua, NDVI mensual acumulado derivado de Terra y la fracción de larvas ya reclutadas. Los valores de R^2 para los Pirineos y Rioja fueron de 0.99 y 0.91, respectivamente ($P < 0.0001$ en ambos casos). Cuando los datos de ambos sitios de recolección se usaron juntos para la regresión múltiple, el valor de R^2 fue 0,99 ($P < 0,0001$). La Tabla 3 proporciona los coeficientes de las regresiones para los tres conjuntos de datos.

Tabla 3. Ecuaciones de regresión que describen la fracción acumulada escalada de las ninfas de en la vegetación en función de la temperatura diurna acumulada (LSTD) del sensor Aqua, el NDVI acumulado (Terra) y los valores de LSTD del mes de estudio. Los resultados de los dos sitios de recolección (Pirineos y Rioja) se muestran por separado, y se combinan también en una sola ecuación para demostrar la validez del método empleado para predecir la acumulación de ninfas en una región, aunque se entrenen los modelos con datos de la otra. Los resultados a incluyen los modelos con el valor más bajo del criterio de información Akaike como una medida del mejor modelo.

Sitio	Término	Estimación	Valor P
Pirineos	T. independiente	733.646	<0.0001
	Fracción acumulada de larvas	-10.495	<0.0001
	NDVI acumulado (Terra)	665.855	<0.0001
	LSTD (Aqua)	0.462	0.0105
Rioja	T. independiente	1647.795	<0.0001
	Fracción acumulada de larvas	-21.072	<0.0001
	NDVI acumulado (Terra)	336.364	<0.0001
	LSTD (Aqua)	1.105	<0.0001

Pirineo+Rioja	T. independiente	721.843	<0.0001
	Fracción acumulada de larvas	-15.351	<0.0001
	NDVI acumulado (Terra)	535.655	<0.0001
	LSTD (Aqua)	0.533	<0.0001

Discusión.

Se han utilizado los datos de abundancia de 168 colectas mensuales de la garrapata *I. ricinus* en dos zonas de España, junto con la información ambiental derivada de los registros de satélite de la serie MODIS, para demostrar que existen correlaciones simples entre el porcentaje de garrapatas activas, la temperatura y el vigor vegetal. Estos modelos se han desarrollado para las ninfas de *I. ricinus*, porque son el estadio que más frecuentemente afecta a los humanos y es el mayor responsable de la transmisión de agentes patógenos en humana. Este estudio es un intento de proporcionar un marco estadístico para predecir el momento de actividad de esta garrapata como una herramienta más de prevención. La temperatura acumulada necesaria para reclutar ninfas desde la etapa larval puede calcularse con un error promedio de aproximadamente 20 días en un año completo. Los bajos valores de “p” obtenidos en las regresiones confirman que dicho reclutamiento puede calcularse para estimar, por ejemplo, la época del año en la que podrían esperarse los máximos poblacionales. Estos resultados respaldan informes previos acerca de que el reclutamiento de larvas (Estrada-Peña et al., 2004) es una función sigmoidea de la temperatura acumulada. El marco propuesto no pretende medir la abundancia real de garrapatas, que tiene una relación compleja no solo con el clima, sino también con la población de hospedadores (Dobson, 2014), y no puede explicarse solo por los componentes abióticos del medio ambiente (Estrada-Peña et al., 2013).

Las poblaciones de garrapatas pueden presentar variaciones estacionales tanto en el tiempo de inicio de actividad como en su duración. Su respuesta a las señales ambientales es generalmente no lineal, lo que hace que la predicción del riesgo planteado por las garrapatas y los patógenos transmitidos sea un desafío (Bisanzio et al., 2008). Sin embargo, sigue habiendo una gran incertidumbre sobre la regulación de la actividad de garrapatas en amplias zonas geográficas (Gray et al., 2009), particularmente la fenología (tiempo de duración y actividad de los estadios del ciclo) y la duración de eventos poblacionales clave. El aumento de la temperatura puede conducir a un aumento en la densidad de garrapatas debido a un inicio más temprano de su actividad en la primavera y una menor duración del desarrollo entre una etapa y la siguiente, siempre que la comunidad de hospedadores no se vea afectada por los cambios de temperatura, y las garrapatas dispongan de un entorno adecuado para encontrar a un hospedador antes de morir por desecación o agotamiento energético (Gray, 1991).

La modalidad de los patrones estacionales es con frecuencia diferente entre diferentes años y / o áreas. Gray (1991) revisó la modulación de estos patrones en *I. ricinus*. En primer lugar, la variabilidad de año en año en el número absoluto de garrapatas y pequeñas variaciones en el pico de garrapatas activas, indican un patrón unimodal de actividad de las ninfas que se ha

registrado consistentemente en los Pirineos, mientras que el patrón bimodal de actividad ninfal es la regla en Rioja. Las características ambientales detectadas por los satélites de la serie MODIS en Rioja muestran que esta área es más fría y seca, con temperaturas más bajas en otoño e invierno, que empujan a las larvas a retrasar su actividad, para comenzar la muda en la primavera del próximo año, lo que resulta en el segundo pico de actividad. La longevidad de las garrapatas será más corta en Rioja debido a las mayores tasas de desecación y la vegetación abierta. Por lo tanto, los picos de actividad estacional resultantes tenderán a estar más separados, es decir, a presentar un patrón bimodal.

En una zona boscosa más cálida (Pirineos), las larvas que se alimentan en otoño podrían terminar la muda en la primavera del año siguiente, ya que son reclutadas para comenzar la actividad con el aumento de la temperatura. La longevidad de las garrapatas se extenderá y tenderá a producir un patrón unimodal. El aumento de la temperatura puede conducir a un aumento en la densidad de garrapatas debido a la actividad de garrapatas en primavera y a una menor duración del desarrollo de una etapa a la siguiente. Nuestros datos no son compatibles con un aumento de la temperatura que induzca un pico de otoño (como lo mencionan Steele y Randolph, 1985, Randolph et al., 2002). Por el contrario, el aumento de la temperatura se correlacionó sistemáticamente con la ausencia de dicho pico en otoño. Estos datos sugieren, junto con estudios previos sobre el desarrollo de campo de garrapatas repletas (Estrada-Pena et al., 2004; Gray, 2008), que la temperatura acumulada en el verano es suficiente para reclutar ninfas en el mismo año, solo si las larvas se alimentan muy temprano en la primavera. Por lo tanto, estos datos apoyan la interpretación de que (a) las larvas de un año pueden dar ninfas solo al año siguiente, independientemente del número de picos en la temporada de actividad y (b) que la temperatura acumulada corregida con una estimación del vigor vegetal (NDVI) está impulsando el reclutamiento de ninfas. Nuestros datos sobre la actividad de garrapatas no han podido ser correlacionados con la densidad del hospedador porque razones logísticas impidieron registrar este parámetro para la amplia gama de todos los hospedadores naturales, durante 7 años a intervalos mensuales.

Las regresiones entre las variables ambientales y las densidades escaladas de los estadios inmaduros de *I. ricinus* obtenidas para los dos sitios de recolección fueron coherentes, en el sentido de que un único marco estadístico es capaz de explicar las observaciones de diferentes períodos de tiempo (con clima diferente) y con patrones de actividad unimodales o bimodales. La temperatura acumulada predice mejor la acumulación de larvas en la vegetación desde el comienzo del año, lo que sugiere que ni la temperatura en el momento de la recolección ni el estrés hídrico (medido indirectamente por el NDVI) son variables significativas que describen la

acumulación estacional de larvas activas. Hemos supuesto el comienzo del año porque no se conoce el momento de la puesta de huevos (y por lo tanto el comienzo del desarrollo del huevo) a partir de muestreos de campo y porque está bien documentado que el desarrollo del huevo ocurre consistentemente al comienzo de la primavera debido al efecto de reinicio de las temperaturas frías invernales (Gray, 1984, 1991). Nuestra suposición, por lo tanto, no es completamente confiable, pero consideramos despreciable el efecto que las bajas temperaturas alrededor del final del otoño y el invierno pueden ejercer sobre los huevos en desarrollo (Gray, 2008). La temperatura acumulada necesaria para describir el intervalo de tiempo necesario para "convertir" una fracción poblacional de larvas en el año X en una fracción acumulada de ninfas en el año $x + 1$ es un valor que está modulado por la temperatura promedio mensual y el NDVI acumulado. Por lo tanto, la cantidad de ninfas en la vegetación está regulada no solo por la temperatura acumulada para la larva-muda ninfa, sino también por las condiciones climáticas actuales, junto con un efecto modulador de la mortalidad o el cese de actividad capturado por el NDVI acumulado.

Diversos esfuerzos previos para definir los patrones estacionales de la actividad de *I. ricinus* usando información ambiental detectada remotamente (por ejemplo, Bisanzio et al., 2008) no pudieron producir correlaciones simples, probablemente debido al uso de números absolutos de garrapatas activas en lugar de la simplificación de la estacionalidad en densidades acumuladas ponderadas, lo que proporciona un fondo más coherente para la regresión (Eisen et al., 2002). Es interesante observar que la inclusión del año y el lugar de las prospecciones no afecta la combinación de variables necesarias para producir la mejor estimación de las temperaturas acumuladas necesarias para pasar una cohorte de larvas a una nueva cohorte de ninfas. Por supuesto, es necesario producir ecuaciones separadas para cada sitio para producir el mejor ajuste. Por lo tanto, una sola ecuación no puede ajustarse a los patrones de actividad de campo, pero las mismas variables explican los datos observados, lo que indica que se ha detectado un patrón ecológico de la especie, y no una peculiaridad de la zona de muestreo.

Curiosamente, las variables de temperatura utilizadas en este estudio no han incorporado el umbral de 6°C informado como el límite inferior para el desarrollo y la actividad de *I. ricinus* (Gray, 1984) porque se obtuvieron sistemáticamente mejores regresiones con los datos de temperatura bruta sin correcciones adicionales. En este estudio se han utilizado estimaciones mensuales de la temperatura, lo que oscurecía las relaciones diarias entre las garrapatas y el ambiente. Una característica importante de la ecología de garrapatas que no se incluyó en esta evaluación es el fotoperiodo. Los efectos de los días más cortos en otoño e invierno sobre el desarrollo y la actividad de las garrapatas se han discutido exhaustivamente (Belozarov et al.,

2002) y tales efectos se han demostrado empíricamente (Belozarov, 1972, 1995). La inclusión de los valores mensuales de horas luz en las ecuaciones no mejoró la confiabilidad de las predicciones y dio como resultado valores más bajos de R^2 . Sin embargo, algunos efectos derivados del fotoperiodo podrían estar presentes, pero no han sido detectados en el conjunto completo de regresiones.

Los protocolos desarrollados en este estudio se pueden aplicar a los informes disponibles sobre la actividad estacional de *I. ricinus* en su rango de distribución en toda Europa con el fin de evaluar si la dependencia propuesta de las tasas de reclutamiento de garrapatas sobre algunas características ambientales es contextual para la región de estudio o es simplemente una herramienta predictiva general para evaluar el riesgo en grandes regiones. La adaptación a las condiciones locales permite que una especie colonice un amplio abanico de condiciones ambientales y le permite responder a condiciones ambientales variables. *Ixodes ricinus* coloniza un área geográfica amplia (toda Europa templada) en la cual las condiciones climáticas varían considerablemente (Gray, 1982; Barandika et al., 2006, 2010; Burri et al., 2007; Jouda et al., 2004; Gilbert, 2010). La adaptación de este marco estadístico a un amplio rango geográfico requeriría la determinación de la variación geográfica de los procesos fisiológicos de la garrapata, algo que solo se ha abordado parcialmente (Rosà et al., 2003; Rosà y Pugliese, 2007; Estrada-Peña et al., 2013) utilizando enfoques empíricos o de modelización, pero nunca de un modo empírico.

Las técnicas de modelado más avanzadas incluyen el uso de una matriz de población parcial para evaluar la probabilidad de que persista una población de garrapatas dado el clima predominante y la disponibilidad de los hospedadores (Pugliese y Rosà, 2008). Estos enfoques se basan en un modelado adecuado de cada proceso fisiológico de la garrapata y las densidades de los hospedadores disponibles, los cuales también muestran patrones fenológicos complejos (Dobson et al., 2011a). Aunque precisos y confiables, estos métodos requieren una estimación de las densidades de los diferentes hospedadores, así como las tasas de fijación para cada especie de hospedador y los procesos de mortalidad dependientes de la densidad durante la alimentación. Aunque la información sobre variables ambientales está ampliamente disponible, los datos necesarios sobre los hospedadores no se pueden calcular para territorios tan grandes. Por lo tanto, estos modelos, que por otro lado son muy potentes, son problemáticos para la aplicación en la gestión del riesgo para los humanos en áreas amplias. El marco desarrollado aquí muestra que existen relaciones consistentes, ecológicamente significativas y repetibles entre las características ambientales detectadas por satélite a una resolución media y el reclutamiento de las larvas y las ninfas de *I. ricinus* a su fase de actividad. Tal relación estima de

manera adecuada la temperatura acumulada necesaria para la distribución temporal de las ninfas activas en el ambiente con una estimación de campo previa de la fenología larval en el área de interés. En otras palabras, dada una colección de larvas en el año 'X', se puede obtener una aproximación de la fenología de las ninfas en el año 'X + 1' usando la temperatura y el NDVI. Este enfoque abordaría el riesgo para los humanos, estimando los patrones estacionales de ninfas con el registro continuo de parámetros abióticos.

Conclusiones.

1. El reclutamiento de las larvas de *Ixodes ricinus* en la vegetación es una función directa de la temperatura acumulada a lo largo del año, demostrada mediante modelos de su actividad en dos lugares de muestreo mensual en España durante 8 años. Este reclutamiento sigue una curva sigmoidea saturada y se expresa en ambos sitios de muestreo.
2. Las ninfas de *I. ricinus* pueden producir patrones de fenología unimodales o bimodales. En los lugares más fríos y secos no todas las larvas completan su desarrollo en otoño, sino que parte de ellas entran en quiescencia y completan su desarrollo en primavera. De esta forma las larvas que completaron su desarrollo en otoño realizan la muda en primavera dando lugar al primer pico de ninfas y las que lo completaron la primavera siguiente darán lugar al pico de otoño tras la muda, formando así el patrón bimodal. En cambio, en zonas con otoños e inviernos más suaves y húmedos, la mayoría de las garrapatas completa su desarrollo en otoño y la muda en primavera dando lugar a un único pico y al patrón unimodal.
3. La modelización de la actividad de las ninfas, que es el más importante de cara a la salud pública, se puede obtener a partir de los datos de larvas acumuladas del año anterior, temperatura (LSTD Aqua) y NDVI acumulado (Terra), con una fiabilidad del modelo alta ($R^2 = 0,99$ y $p < 0,0001$).
4. Estos resultados permiten elaborar un modelo predictivo para conocer con un error mínimo (20 días en un año) los picos de aparición de las garrapatas y por tanto los momentos de mayor riesgo para los humanos.

Conclusions.

1. The abundance of larvae of *Ixodes ricinus* recruited on vegetation is a direct function of the accumulated temperature throughout the year, proven by its activity models in two sampling sites in Spain for 8 years. This recruitment follows a sigmoidal saturated curve and is recorded in both sampling locations.
2. The nymphs of *I. ricinus* can produce unimodal or bimodal phenology patterns. On the coldest and driest sites not all the larvae can fulfil their development in autumn, but part of them enter on quiescence and complete their growth in spring. In this way the larvae that completed their development in autumn conduct their moult in spring, giving place to the first nymph peak and the ones that completed it next spring will give place to the autumn peak after moulting, creating this way the bimodal pattern. However, in

zones with warmer autumns and winters, most of the ticks fulfil their development in autumn and moulting in spring leading to the single peak and the unimodal pattern.

3. The nymph activity modelling, which is the most important stage regarding the public health, can be obtained from the accumulated larvae data from the previous year, temperature (LSTD Aqua) and accumulated NDVI (Terra), with a high model reliability ($R^2 = 0,99$ y $p < 0,0001$).
4. These results allowed us to elaborate a predictive model to identify with a minimal error (20 days in a year) the ticks activity peaks and thus predict the highest risk moments for humans.

Valoración Personal

El objetivo principal de este TFG es aprender sobre la especie de garrapata *Ixodes ricinus*, la cual se considera uno de los mayores vectores de enfermedades para el hombre. Todo esto me ha permitido reforzar mis conocimientos en este campo. Sobre todo, en la fenología, estudiando las relaciones entre el desarrollo de los diferentes estadios de la garrapata y los datos de clima, pudiendo así elaborar un modelo de predicción de riesgo que nos mostrará los meses de mayor actividad de las garrapatas. Sin olvidar el hecho de que gran parte de la bibliografía trabajada se encontraba en inglés, permitiéndome reforzar mi vocabulario con términos científicos y específicos de este campo.

También, mediante la realización de este trabajo he aprendido bastante en materia de estadística, ya que para realizar el estudio fue necesaria la aplicación de regresiones múltiples a los datos de clima y de colecta de garrapatas, además del hecho de trabajar con datos acumulados, como por ejemplo la correlación entre los grados acumulados de temperatura y la muda de las larvas.

Además de todo esto, me ha brindado la oportunidad de trabajar con un gran profesional de este campo, que ha compartido sus amplios conocimientos y escaso tiempo conmigo y al cual agradezco enormemente su colaboración en este trabajo.

Leyenda de las Figuras.

Figura 1. La estacionalidad de las tres etapas activas de *Ixodes ricinus* en los Pirineos (a) y Rioja (b) expresada como el porcentaje del total de ejemplares de cada estadio capturados en cada muestreo y recolectadas durante un año calendario completo. Los gráficos aparecen desplazados para permitir una comparación de las colectas entre los mismos años en los dos sitios.

Figura 2. Valores mensuales de la temperatura de la superficie terrestre proporcionados por los satélites Terra y Aqua tanto en los Pirineos (a) como en Rioja (b) en grados Celsius. Los valores son temperatura mensual acumulada. Los gráficos se han desplazado para permitir una comparación entre colectas de los mismos años en los dos sitios. LSTD: temperatura de la superficie terrestre durante el día; LSTN: temperatura de la superficie terrestre en la noche.

Figura 3. Valores mensuales del Índice de Vegetación de Diferencia Normalizada (NDVI) del satélite Terra en los Pirineos y Rioja.

Figura 4. Valores mensuales acumulados y escalados a percentiles, observados para las larvas de *I. ricinus* activas en función de la temperatura superficial acumulada (LSTD) derivada del sensor Terra en los Pirineos (a) o Rioja (b). El conjunto completo de observaciones se usó para producir el cuadro en (c).

Figura 5. La temperatura acumulada observada y prevista necesaria para el reclutamiento de un determinado percentil de ninfas activas a partir de un percentil dado de larvas activas (ver Tablas 2 y 3 para conocer los coeficientes de las regresiones). Los gráficos muestran las regresiones entre los valores observados y pronosticados en las colecciones de los Pirineos (a), Rioja (b) y ambos (c).

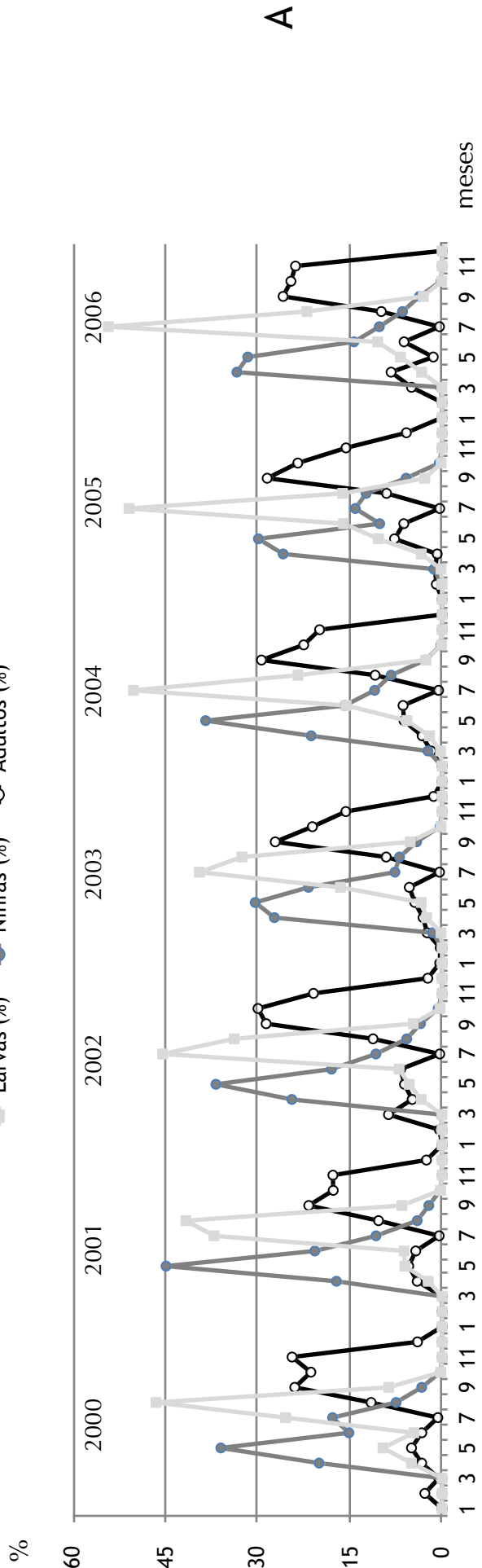
Referencias

- Barandika, J. F., E. Berriatua, M. Barral, R. A. Juste, P. Anda, A. L. García-Pérez, 2006: Risk factors associated with ixodid tick species distributions in the Basque region in Spain. *Med. Vet. Entomol.* 20, 177–188.
- Barandika, J. F., A. Hurtado, R. A. Juste, A. L. García-Pérez, 2010: Seasonal dynamics of *Ixodes ricinus* in a 3-year period in northern Spain: first survey on the presence of tick-borne encephalitis virus. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 10, 1027–1035.
- Belozerov, V. N., 1972: An inversion of photoperiodic reaction which regulates the development and diapause in nymphs of the tick *Ixodes ricinus* L. (Acarina, Ixodidae) and mechanisms of the phenomenon. In: Problems of Photoperiodism and Diapause in Insects, pp. 175–192. Leningrad University Press, Saint Petersburg, Russia.
- Belozerov, V. N., 1995: Some parameters of the two-step photoperiodic reaction controlling seasonal development of nymphs in the European forest tick *Ixodes ricinus* L. (Acarina: Ixodidae). *Parazitologiya* 29, 240–249.
- Belozerov, V. N., L. Fourie, D. J. Kok, 2002: Photoperiodic control of developmental diapause in nymphs of prostrate ixodid ticks (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.* 28, 163–168.
- Berger, K. A., Y. Wang, T. N. Mather, 2013: MODIS-derived land surface moisture conditions for monitoring blacklegged tick habitat in southern New England. *Int. J. Remote Sens.* 34, 73–85.
- Bisanzio, D., G. Amore, C. Ragagli, L. Tomassone, L. Bertolotti, A. Mannelli, 2008: Temporal variations in the usefulness of normalized difference vegetation index as a predictor for *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in a *Borrelia lusitaniae* focus in Tuscany, central Italy. *J. Med. Entomol.* 45, 547–555.
- Burri, C., F. Cadenas, V. Douet, J. Moret, L. Gern, 2007: *Ixodes ricinus* density and infection prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato along a North-facing altitudinal gradient in the Rhône Valley (Switzerland). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 7, 50–58.
- Daniel, M., M. Malý, V. Danielová, B. Kříž, P. Nuttall, 2015. Abiotic predictors and annual seasonal dynamics of *Ixodes ricinus*, the major disease vector of Central Europe. *Parasites & vectors*, 8, 478.
- de la Fuente, J., A. Estrada-Peña, J.M. Venzal, K. Kocan, D.E. Sonenshine, 2008. Overview: ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Front Biosci.* 13, 6938-6946.

- Dobson, A. D., 2014: History and complexity in tick-host dynamics: discrepancies between ‘real’ and ‘visible’ tick populations. *Parasites & Vectors* 7, 231.
- Dobson, A. D., T. J. Finnie, S. E. Randolph, 2011: A modified matrix model to describe the seasonal population ecology of the European tick *Ixodes ricinus*. *J. Appl. Ecol.* 48, 1017– 1028.
- Eisen, L., R. J. Eisen, R. S. Lane, 2002: Seasonal activity patterns of *Ixodes pacificus* nymphs in relation to climatic conditions. *Med. Vet. Entomol.* 16, 235–244.
- Estrada-Peña, A. 2015. Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology. *Rev Sci Tech*, 34, 53-65.
- Estrada- Peña, A., J. M. Martinez, C. Sanchez Acedo, J. Quilez, E. Del Cacho, 2004: Phenology of the tick, *Ixodes ricinus*, in its southern distribution range (central Spain). *Med. Vet. Entomol.* 18, 387–397.
- Estrada- Peña, A., J. S. Gray, O. Kahl, R. S. Lane, A. M. Nijhof, 2013: Research on the ecology of ticks and tick-borne pathogens—methodological principles and caveats. *Front Cell Infect Microbiol.* 3, [doi:10.3389/fcimb.2013.00029](https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00029).
- Gilbert, L., 2010: Altitudinal pattern of tick and host abundance: a potential role for climate change in regulating tick-borne diseases? *Oecologia* 162, 217–225.
- Gray, J. S., 1982: The development and questing activity of *Ixodes ricinus* (L.)(Acari: Ixodidae) under field conditions in Ireland. *Bull. Entomol. Res.* 72, 263–270.
- Gray, J. S., 1984: Studies on the dynamics of active populations of the sheep tick, *Ixodes ricinus* (L.) in Co, Wicklow, Ireland. *Acarologia* 25, 167–178.
- Gray, J. S., 1991: The development and seasonal activity of the tick *Ixodes ricinus*: a vector of Lyme borreliosis. *Rev. Med. Vet. Entomol.* 79, 323–333.
- Gray, J. S., 2008: *Ixodes ricinus* seasonal activity: Implications of global warming indicated by revisiting tick and weather data. *Int. J. Med. Microbiol.* 298, 19–24.
- Gray, J. S., H. Dautel, A. Estrada-Peña, O. Kahl, E. Lindgren, 2009: Effects of climate change on ticks and tick-borne diseases in Europe. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* [doi:10.1155/2009/593232](https://doi.org/10.1155/2009/593232).
- Gray, J. S., O. Kahl, R.S. Lane, M. Levin, J. Tsao, 2016. Diapause in ticks of the medically important *Ixodes ricinus* species complex. *Ticks and tick-borne diseases*, 7, 992-1003.
- Jouda, F., J.-L. Perret, L. Gern, 2004: *Ixodes ricinus* density, and distribution and prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato infection along an altitudinal gradient. *J. Med. Entomol.* 41, 162–169.

- Mans, B. J., M.H. De Castro, R. Pienaar, D. De Klerk, P. Gaven, S. Genu, A.A. Latif, 2016: Ancestral reconstruction of tick lineages. *Ticks and tick-borne diseases* 7, 509-535.
- Medlock, J. M., K.M. Hansford, A. Bormane, M. Derdakova, A. Estrada-Peña, J.C. George, M. Kazimirova, 2013: Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasites & vectors*, 6(1), 1.
- Peñalver, E., A. Arillo, X. Delclòs, D. Peris, D.A. Grimaldi, S.R. Anderson, R. Pérez-de la Fuente, 2017: Ticks parasitised feathered dinosaurs as revealed by Cretaceous amber assemblages. *Nature communications* 8, 1924.
- Perret, J. L., E. Guigoz, O. Rais, L. Gern, 2000: Influence of saturation deficit and temperature on *Ixodes ricinus* tick questing activity in a Lyme borreliosis-endemic area (Switzerland). *Parasitol. Res.* 86, 554–557.
- Pugliese, A., R. Rosà, 2008: Effect of host populations on the intensity of ticks and the prevalence of tick-borne pathogens: how to interpret the results of deer enclosure experiments. *Parasitology* 135, 1531–1544.
- Randolph, S. E., R. M. Green, A. N. Hoodless, M. F. Peacey, 2002: An empirical quantitative framework for the seasonal population dynamics of the tick *Ixodes ricinus*. *Int. J. Parasitol.* 32, 979–989.
- Rizzoli, A., C. Silaghi, A. Obiegala, I. Rudolf, Z. Hubálek, G. Földvári, M. Kazimírová, 2014: *Ixodes ricinus* and its transmitted pathogens in urban and peri-urban areas in Europe: new hazards and relevance for public health. *Frontiers in public health* 2, 251.
- Rosà, R., A. Pugliese, 2007: Effects of tick population dynamics and host densities on the persistence of tick-borne infections. *Math. Biosci.* 208, 216–240.
- Rosà, R., A. Pugliese, R. Norman, P. Hudson, 2003: Thresholds for disease persistence in models for tick-borne infections including non-viraemic transmission, extended feeding and tick aggregation. *J. Theor. Biol.* 224, 359–376.
- Steele, G.M., S.E. Randolph, 1985: An experimental evaluation of conventional control measures against the sheep tick, *Ixodes ricinus* (L.) (Acari: Ixodidae). I. A unimodal seasonal activity pattern. *Bull. Entomol. Res.* 75, 489–500.

■ Larvas (%) ● Ninfas (%) ○ Adultos (%)



■ Larvas % ● Ninfas % ○ Adultos %

