



Facultad de Veterinaria
Universidad Zaragoza



Trabajo Fin de Grado en Veterinaria

Estudio de la distribución de las garrapatas que parasitan a los perros en
España y sus patógenos asociados

A study of the distribution of ticks and their pathogens parasitizing dogs in Spain

Autor/es

Silvia Pérez Bozal

Director/es

Agustín Estrada Peña
Natalia Fernández Ruiz

Facultad de Veterinaria

2022

Índice

Resumen	3
Abstract	3
Introducción	4
Justificación	8
Objetivos	9
Metodología	9
1. Introducción a la metodología.	9
2. Elección de las clínicas y patógenos a estudio.	9
3. Obtención de las muestras.	10
4. Procesado de las muestras	11
5. Extracción e identificación de ADN de patógenos.	12
Resultados	12
Discusión	16
Conclusiones	21
Conclusions	21
Valoración personal	22
Bibliografía	23
Agradecimientos	28

Estudio de la distribución de las garrapatas que parasitan a los perros en España y sus patógenos asociados

Resumen

Este estudio pretende conocer las especies de garrapatas que afectan a los perros con propietario en España (incluyendo los archipiélagos), la relación entre su distribución y la biogeografía, y la prevalencia de los patógenos de interés en los vectores mediante PCR. Las muestras se obtuvieron a través de una red de 25 clínicas veterinarias que debían muestrear al azar un máximo de 5 perros al mes durante un año, adjuntando un breve formulario para extraer conclusiones.

Las especies de garrapatas identificadas en orden de prevalencia fueron: *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (60,65%), *Rhipicephalus sanguineus* s.s. (15,84%), *Rhipicephalus pusillus* (7,10%), *Ixodes ricinus* (6,28%), *Dermacentor reticulatus* (3%), *Ixodes hexagonus* (2,73%), así como 6 especies más con una prevalencia inferior al 3%. En cuanto al estadio de la garrapata, las hembras se han encontrado en un 63,11% de las ocasiones, seguidas de machos (27,05%). Más de un 21,8% de las garrapatas se extrajeron de la región de la cara de los perros, seguido del cuello (15,89%) y el cráneo (14,56%). Las axilas, el dorso y abdomen tuvieron un porcentaje de parasitación total de 5,29%, 14,9% y 8,61% respectivamente.

Las especies de garrapatas con preferencias ambientales relacionadas con zonas frescas y húmedas, como *I. ricinus* o *D. reticulatus*, han aparecido en el norte y noroeste peninsular. Aunque algunas especies se han encontrado como “bolsas” aisladas, el resto de España ha sido la zona preferida de colonización por *R. sanguineus*. Finalmente, en relación con los patógenos detectados en garrapatas, hay que destacar la baja prevalencia: en total se han hallado 6 lotes de garrapatas positivos a *Babesia* sp. y 3 a *Ehrlichia* sp.

A study of the distribution of ticks and their pathogens parasitizing dogs in Spain

Abstract

This study aims to determine the species of ticks that affect owned dogs in Spain (including the archipelagos), the relationship between their distribution and biogeography, and the prevalence of the pathogens of interest in vectors by PCR. The samples were obtained through a network of 25 veterinary clinics that had to randomly sample a maximum of 5 dogs per month for a year, attaching a brief form to draw conclusions.

The tick species identified in order of prevalence were: *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (60,65%), *Rhipicephalus sanguineus* s.s. (15,84%), *Rhipicephalus pusillus* (7,10%), *Ixodes ricinus* (6,28%), *Dermacentor reticulatus* (3%), *Ixodes hexagonus* (2,73%), as well as 6 more species with a prevalence of less than 3%. Regarding the stage of the tick, females have been found in 63,11% of the cases, followed by males (27,05%). More than 21,8% of the ticks were extracted from the facial region of the dogs, followed by the neck (15,89%) and the skull (14,56%). The armpits, back and abdomen have a percentage of total parasitism of 5,29%, 14,9% and 8,61% respectively.

Tick species with environmental preferences related to cool and humid areas, such as *I. ricinus* or *D. reticulatus*, have appeared in the north and northwest of the peninsula. Although some species have been found as isolated "pockets", the rest of Spain has been the preferred area for colonization by *R. sanguineus*. Finally, in relation to the pathogens detected in ticks, a low prevalence should be highlighted: a total of 6 batches of ticks were found positive for *Babesia* sp. and 3 to *Ehrlichia* sp.

Introducción

Los patógenos transmitidos por artrópodos constituyen uno de los principales problemas en la Salud Pública (Kamani *et al.*, 2019) o animal (Chomel, 2011) en el mundo. La incidencia de algunas de las enfermedades derivadas de estas infecciones no ha dejado de aumentar en Europa, debido a que la circulación de los patógenos responsables parece haberse incrementado en los últimos decenios (Geurden *et al.*, 2018). Concretamente, tanto la densidad como la distribución espacial de varias especies de garrapatas se han visto aumentadas como consecuencia de un complejo multifactorial, que tiene como principal responsable la acción humana (Kamani *et al.*, 2013). Dentro de estos factores, el cambio climático, del cual somos responsables, actúa como motor principal de la transformación del nicho ambiental de las garrapatas (Skotarczak, 2018). El nicho ambiental de un parásito consiste en la combinación de factores abióticos en un espacio determinado, como la temperatura y la humedad. La combinación de estos factores permite que los vertebrados y los vectores asociados puedan sobrevivir, dándose así focos permanentes del agente infeccioso (Estrada-Peña, Estrada-Sánchez y de la Fuente, 2014a). A esto se suma que el riesgo de transmisión de patógenos está determinado por la prevalencia en las garrapatas, la prevalencia del patógeno en los reservorios y la densidad de éstos, así como por la probabilidad del encuentro entre una garrapata infectada y un hospedador susceptible (Fritz, 2009). La deforestación-reforestación transforma dramáticamente los biotopos, lo que afecta a la densidad de garrapatas (Heylen *et al.*, 2021).

Las variaciones de temperatura y humedad pueden tener efectos rápidos en las poblaciones de garrapatas (Zhang *et al.*, 2017) ya que el calentamiento global está asociado con condiciones climáticas que pueden mejorar el nicho ambiental de las poblaciones de algunos vectores, especialmente en los límites de su distribución espacial (Beugnet y Marié, 2009). En la actualidad el aumento de la temperatura ha derivado en inviernos más cálidos, lo que podría explicar que algunas garrapatas puedan permanecer activas todo el año (Folly *et al.*, 2020).

Debido a factores climáticos y geográficos, las especies de garrapatas que infestan a los hospedadores caninos no son las mismas en todos los países. La garrapata marrón del perro, *Rhipicephalus sanguineus* s.l., es probablemente la especie más extendida del mundo, siendo predominante en los perros de África (Heylen *et al.*, 2021; Kamani *et al.*, 2019), América Latina, países mediterráneos y países asiáticos como Bangladesh, Tailandia, Japón y China (Wang, Hua y Cui, 2021; Zhang *et al.*, 2017). Este ejemplo de globalización se ha visto facilitado por los movimientos de perros con sus dueños y a través del comercio (Chomel, 2011). *Dermacentor variabilis* (la garrapata americana del perro) constituye el principal ectoparásito de los cánidos en el oeste de EE. UU., Canadá y México. *Ixodes ricinus* e *Ixodes hexagonus* son los principales ectoparásitos de los perros en Gran Bretaña e Irlanda, y *Dermacentor reticulatus* es común en Europa occidental y central (Chao *et al.*, 2019). Las garrapatas requieren humedad para evitar la desecación durante las fases de su ciclo vital que transcurren fuera del hospedador, por lo que en las ciudades europeas, las zonas verdes como los parques públicos, los jardines y las áreas periurbanas son principalmente los lugares más importantes donde los animales de compañía pueden encontrarse con garrapatas potencialmente infectadas (Jennett, Smith y Wall, 2013; Skotarczak, 2018).

El ciclo de una garrapata consta de tres estadios: larva, ninfa y adulto. Para realizar la muda necesitan ingerir sangre de un vertebrado, por lo que son hematófagos estrictos (Fernández, 2019). Algunas garrapatas parasitan a un amplio abanico de hospedadores, incluyendo ungulados domésticos que comparten hábitat con los hospedadores normales, o mascotas que en sus actividades diarias también pueden invadir de forma esporádica el entorno en el que habitan las garrapatas (Chao *et al.*, 2019). Esto implica una obvia relación entre humanos y animales domésticos con respecto a los patógenos transmitidos por garrapatas. En el caso de algunas especies, la invasión por garrapatas de los entornos humanos (como jardines privados) está mediada normalmente por los perros. Sin las medidas de protección adecuadas, puede resultar común este tipo de “transporte” de garrapatas, generalmente del género *Rhipicephalus* hacia el entorno humano. Este entorno ofrece una amplia variedad de lugares en los que pueden vivir las garrapatas, incluso en el interior del hogar. En el contexto urbano, los perros

desempeñan un papel importante en el mantenimiento de las poblaciones de garrapatas. En el año 2013, se elaboró un trabajo en Reino Unido que mostraba el riesgo de infestación de garrapatas en los perros que frecuentaban un parque periurbano. Aquellos perros que caminaban en parques públicos una vez por semana tenían una infestación aproximada de una garrapata, mientras que los perros que caminaban diariamente en esas zonas tenían una prevalencia de 4-5 infestaciones por semana (Jennett, Smith y Wall, 2013). Además de ser susceptibles a los patógenos transmitidas por estos vectores, las mascotas pueden servir como reservorios de estos y por tanto como indicadores centinela del riesgo en una zona determinada (Wang, Hua y Cui, 2021).

Durante las últimas décadas ha aumentado el número de animales de compañía en los países desarrollados (de Wet *et al.*, 2020). Además, muchos propietarios comparten con ellos la mayor parte de su espacio vital, incluyendo la cama. En un estudio publicado en el año 2018, se determinó que las viviendas con mascotas tenían entre 1,49 y 1,83 veces más riesgo de albergar garrapatas en su interior que aquellos hogares en los que no existían animales domésticos (Jones *et al.*, 2018). En realidad, los resultados que proceden de estudios de este tipo señalan continuamente la necesidad de la protección adecuada del perro, o su examen tras el paseo por zonas que pueden estar infestadas, como la mejor medida para impedir el asentamiento de poblaciones de garrapatas en el hogar, la parasitación de la familia que convive con la mascota o incluso la transmisión de agentes infecciosos.

Del mismo modo, se han realizado diversos estudios en diferentes países europeos para evaluar la presencia y distribución de las garrapatas, así como de los patógenos que transmiten a los animales de compañía. Sin embargo, este proceso de vigilancia activa, que incluye implícitamente el muestreo de amplias zonas, con la consiguiente inversión en tiempo y recursos, se ha venido complementando en los últimos años con medidas de vigilancia pasiva. Este tipo de “muestreos” no están realizados por especialistas, sino que se alimentan de los datos proporcionados por los ciudadanos usando diferentes medios. Tal es la importancia de la vigilancia pasiva que se están aprovechando las ventajas de los aparatos de comunicación móvil. Así, en el año 2019 se desarrolló “Tekenscanner” en los Países Bajos, una aplicación que permite crear una base de datos con la localización espacial (coordenadas) de las garrapatas encontradas sobre los animales domésticos (Jongejan *et al.* 2019). Esta forma de participación ciudadana se ha extendido también a otros países (ver comentarios en Fernández *et al.*, 2019). Sin embargo, el problema aún no está resuelto totalmente con este tipo de aplicaciones, pues los ciudadanos no están capacitados para poder identificar las garrapatas. En lugares en los que su variedad es baja, como en el norte de Europa, puede ser fácil deducir la identificación a partir de una

fotografía. Sin embargo, en zonas como la región Mediterránea, en las que la variedad de garrapatas que parasitan a los perros es elevada, la identificación implica el envío del material a un laboratorio especializado. Esto implica un mayor despliegue de recursos, pues los propietarios deben tener a su disposición tanto el material necesario para recoger y enviar la garrapata, como un sistema de envío rápido, seguro y gratuito.

En Reino Unido, se utilizó una gran red centinela de clínicas veterinarias a través de los registros electrónicos de salud (EHR, por sus siglas en inglés) para proporcionar un sistema de vigilancia y realizar estimaciones temporales y espaciales de la actividad de las garrapatas (Tulloch *et al.*, 2017). Otros estudios se han llevado a cabo en una mayoría de países europeos, desde los puramente mediterráneos como Italia, Portugal, Grecia, Albania o Malta (Zanet *et al.*, 2020; Maurelli *et al.*, 2018; Barradas *et al.*, 2020; Latrofa *et al.*, 2017; Shukullari *et al.*, 2016; Licari *et al.*, 2017), hasta países bálticos como Letonia o Polonia (Namina *et al.*, 2019; Kocoń *et al.*, 2020; Król *et al.*, 2015, 2016), o países del norte y centro de Europa como Irlanda, Suiza, Bélgica, Austria y Alemania (de Waal *et al.*, 2020; Eichenberger, Deplazes y Mathis, 2015; Claerebout *et al.*, 2013; Leschnik *et al.*, 2012; Beck *et al.*, 2014; Schreiber *et al.*, 2014). La mención de estos estudios indica el alto interés que el problema está despertando tanto en salud animal como humana, la importancia que las garrapatas tienen en la circulación de patógenos de relevancia clínica, y la preocupación ante la tendencia del clima y la invasión por garrapatas de zonas que antes se consideraban libres de las mismas.

En España se han desarrollado estudios análogos a los mencionados, algunos de ellos de índole puramente local, y al menos uno que intentó abarcar el mayor territorio nacional posible, excluyendo los archipiélagos. En un informe realizado en 2017 (Estrada-Peña *et al.*, 2017a) se dividió España en 4 regiones biogeográficas: (i) Norte-Noroeste, con alta humedad y temperaturas suaves; (ii) Centro, con clima de tipo continental (iii) Mediterránea, de clima templado en invierno y veranos calurosos, y (iv) Sur, cálida y seca. El estudio recolectó un total de 1.628 garrapatas en 660 perros, de los cuales, el 76,8% portaban al menos una garrapata adulta. Las principales especies de garrapatas fueron: *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (53%), *Dermacentor reticulatus* (9%), *Ixodes ricinus* (9%) e *Ixodes hexagonus* (4%). Durante todo el año y a lo largo de toda la geografía nacional se hallaron en las garrapatas los patógenos: *Babesia* spp., *Theileria* spp., *Rickettsia* spp., *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* y *Borrelia* spp. Un estudio más reciente realizado en 2019 analizó 1.600 garrapatas en perros domésticos. Se detectó ADN de *Rickettsia* spp. en el 60% de los lotes de *D. reticulatus* y en el 40% de *R. sanguineus* s.l. (Vila *et al.*, 2019), aunque no se presentaron datos sobre la “Minimum Infection Rate” (MIR) de esos lotes, un valor necesario para conocer la

prevalencia de los patógenos. Es necesario indicar que las bacterias del género *Rickettsia* se consideran endosimbiontes de las garrapatas, independientemente de que sean capaces de provocar una clínica más o menos grave en vertebrados (pueden ser mortales en la especie humana). Por ello, cabe esperar que su presencia en las garrapatas sea elevada, pues llevan a cabo procesos fisiológicos para los que la propia garrapata carece de rutas metabólicas adecuadas (de la Fuente *et al.*, 2008; Estrada-Peña *et al.*, 2021a).

Este estudio pretende evaluar la diversidad y distribución de las garrapatas en los perros domésticos en España; un objetivo secundario es la evaluación de la tendencia de su distribución regional al comparar los resultados con los de informes anteriores, aunque sea problemático comparar la intensidad de parasitación. Para ello, se han usado muestras de garrapatas capturadas mensualmente sobre perros domésticos con propietario, seleccionados al azar, a través de clínicas veterinarias en la península, Islas Canarias e Islas Baleares (Figura 1). Las garrapatas han sido recogidas a lo largo de un año natural para incluir su periodo completo de actividad. Estas muestras también fueron sometidas a la detección de patógenos transmitidos como *Babesia spp.*, *Borrelia spp.*, *Anaplasma platys* y *Ehrlichia canis*. En resumen, nuestro estudio pretende continuar los estudios anteriores, comprobar los posibles cambios en la distribución de las garrapatas, y contribuir a establecer un calendario de protección de las mascotas, lo que es un punto importante en Salud Pública.

Justificación

El aumento del número de perros como animales de compañía en los hogares sigue una tendencia al alza entre la población. Según datos de la Red Española de Identificación de Animales de Compañía el número de perros registrados en España asciende a más de 7 millones. El contacto de las personas con los perros y con la naturaleza es cada vez más estrecho, aumentando así el riesgo de padecer enfermedades producidas por los patógenos transmitidos por estos artrópodos. Estos hechos, sumados a otros factores como el posible efecto del cambio climático sobre el incremento del periodo de actividad de las garrapatas, puede provocar un aumento de los problemas asociados a estos parásitos. Por ello, es necesario mantener una vigilancia que evalúe la situación epidemiológica por garrapatas en España. Los datos obtenidos en este trabajo pretenden mostrar la necesidad de reforzar el desarrollo de medidas preventivas destinadas tanto a los propietarios de mascotas como a la ciudadanía.

Este estudio tiene el valor añadido de poder estimar no sólo la presencia o ausencia de las especies de garrapatas y los patógenos que circulan, sino también evaluar si se observa un

cambio de patrón en la distribución geográfica con respecto a los resultados de un estudio similar realizado en 2017, el cual podría muy posiblemente adscribirse a las acciones del cambio climático incluso en tan corto espacio de tiempo. El estudio se realiza pues bajo el paraguas del concepto de “una sola salud” que nos permita proteger no solo a nuestros animales sino también a las personas.

Objetivos

Los objetivos de este trabajo persiguen (i) conocer las especies de garrapatas que parasitan a los perros con propietario en España, (ii) analizar su biogeografía, (iii) evaluar los diferentes patógenos vehiculados por las garrapatas y (iv) observar la evolución de la distribución geográfica de las garrapatas en España en el periodo de los últimos cinco años. Se pretende proporcionar una panorámica actual de estos parásitos en el territorio nacional con el fin de obtener una estimación real del contacto existente entre los animales de compañía y los parásitos estudiados.

Metodología

1. Introducción a la metodología.

En el presente trabajo se han caracterizado los patrones de asociación entre los animales de compañía y las garrapatas a niveles regionales y biogeográficos, con el fin de sensibilizar a los propietarios acerca de la importancia de la desparasitación de sus animales. Para ello se han recogido garrapatas de clínicas veterinarias a lo largo de todo el territorio español incluidos los archipiélagos. Es la primera vez que un estudio de este tipo utiliza datos de las Islas Canarias. El estudio pretende analizar las principales especies de garrapatas que parasitan a los perros en España, así como los principales patógenos que éstas portan. La duración del estudio ha sido de un año completo permitiendo obtener información sobre la actividad estacional de las garrapatas. La autora de este trabajo ha participado durante su último año académico en una parte de dicho proyecto con el fin de poder mostrar algunos de los resultados obtenidos.

2. Elección de las clínicas y patógenos a estudio.

Para el presente estudio se han seleccionado 25 clínicas de todo el territorio nacional para que cubrieran en la medida de lo posible el país (Figura 1) optimizando el coste de la recogida de datos y procesado de las muestras con la información biogeográfica obtenida. Con el fin de realizar una selección sencilla y homogénea se contactó con la cadena de clínicas y productos para animales Kiwoko pet, S.L.U. Esto permitió establecer contacto con un único ente, capaz de

coordinar diversas clínicas repartidas por la geografía española, incluyendo los archipiélagos. En lo referente a la selección de patógenos a analizar se escogieron los géneros *Borrelia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma* y *Babesia*. Estos géneros agrupan las principales especies de patógenos que afectan a la salud de los animales de compañía. Respecto a las bacterias del género *Rickettsia*, ya se ha mencionado que son endosimbiontes de las garrapatas (Vila *et al.*, 2019). Es decir, es de esperar una elevada prevalencia en las garrapatas. Por ello, no se ha incluido *Rickettsia* en este estudio ya que no aportaba una información relevante.

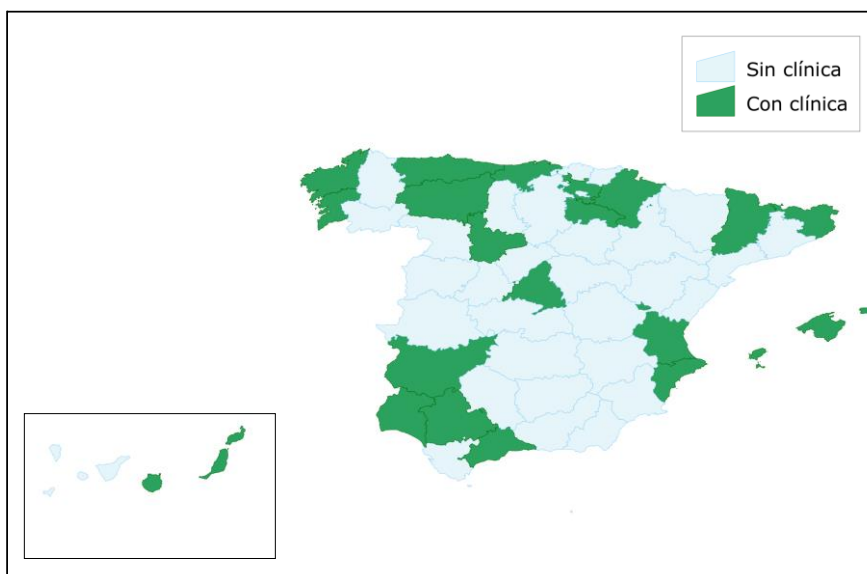


Figura 1: Mapa con las provincias participantes en el estudio con al menos una clínica.

3. Obtención de las muestras.

Cada clínica recibió instrucciones para muestrear los perros al azar, palpando al animal para comprobar la presencia de garrapatas si no eran directamente visibles. El muestreo de garrapatas se realizaba mensualmente y se interrumpía cuando se obtenía material procedente de hasta cinco perros al mes. Las muestras se obtuvieron durante el periodo 01/05/2021 hasta 31/05/22 y fueron enviadas al laboratorio de referencia en el interior de tubos etiquetados individualmente que contenían una solución de alcohol para su correcta conservación. Sin embargo, y debido a las fechas de entrega y defensa del proyecto de TFG, el material de mes de mayo de 2022 no pudo ser incluido y analizado con tiempo suficiente. Con el fin de que las muestras mantuvieran su integridad hasta su procesado, se almacenaron en refrigeración a una temperatura de -20°C. Cada muestra era acompañada de un formulario que recogía la siguiente información esencial: (i) fecha de recogida de la muestra; (ii) código postal, municipio y provincia de residencia del animal; (iii) edad del animal en días que fue posteriormente transformada a “edad fisiológica” según los conceptos de Cafazzo (2010) y Hutchinson (2011); (iv) porcentaje de

tiempo diario que el perro pasa en el exterior de la vivienda (24 horas = 100% del día); (v) lugar donde vive (opciones: casa, jardín, perrera); (v) hábitat frecuentado (opciones: campo, montaña y mar); (vi) viajes recientes (opciones: “sí” o “no”, en caso afirmativo indicar lugar) y (vii) porción corporal de la que se recolectaron las garrapatas (opciones: cráneo, cara, cuello, axilas, dorso, abdomen, patas, rabo, ano, vagina, espacios interdigitales e ingles). Toda la información anterior se usó para el análisis de los datos.

4. Procesado de las muestras

Tras la recepción de las muestras se pasó la información preliminar recogida a un formulario siguiendo un etiquetado único e inequívoco. Posteriormente se identificaron las garrapatas contenidas en cada vial, a través de una lupa estereoscópica y utilizando como referencia dos guías de identificación morfológica (Estrada-Peña *et al.*, 2014b; Estrada-Peña, Mihalca y Petney, 2017b) determinando la especie, el sexo y el estadio de desarrollo. Los datos de identificación se introdujeron también en el formulario final, asociando los datos recogidos por las clínicas veterinarias con los datos originados en el laboratorio. A continuación, mediante un bisturí, se realizó un corte longitudinal de cada garrapata. Una de las mitades se procesó para la obtención de ADN (ver más abajo) y la otra mitad se retuvo en el laboratorio, con objeto de mantener material de referencia ante posibles resultados no concluyentes en la detección de los patógenos, y por si era necesaria la repetición de los análisis. Cuando se recibía más de una garrapata de un mismo animal, se realizaron lotes con la mitad de varias garrapatas cumpliendo las siguientes características: (i) muestras que provengan del mismo animal, (ii) muestras que sean de la misma especie de garrapata y (iii) la cantidad de fragmentos dependerá del tamaño de cada garrapata y el volumen del tampón de lisis para el ADN. Es decir, en el caso de procesar varios ejemplares repletos (tras la ingestión parcial de sangre) era necesario procesarlos en varios tubos, o los fragmentos “empapaban” completamente el tampón de lisis. La serie de muestras reservadas para la posible comprobación posterior se conservaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml con alcohol de 70º almacenado a -20ºC.

El segundo lote de fragmentos se depositó en un microtubo estéril de tapón de rosca con 800µl de tampón de lisis (MagMAX™ CORE Lysis Solution) y perlas de zirconio de 1mm. Esta muestra se envió al laboratorio perteneciente a la empresa Exopol S.L, en la que se realizaron los análisis moleculares y la identificación de los patógenos indicados. Todo el proceso de laboratorio de las muestras se realizó con las medidas de esterilidad acostumbradas, empleando diferentes hojas de bisturí y desinfectando el material restante con lejía cada vez que se procedía con un ejemplar diferente, para evitar contaminaciones cruzadas.

5. Extracción e identificación de ADN de patógenos.

La identificación genética de los patógenos que portaban las garrapatas se ha centrado en los géneros *Borrelia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma* y *Babesia*. La obtención y análisis de ADN fueron llevados a cabo de forma íntegra por la empresa Exopol S.L. La muestra se sometió previamente a dos ciclos de homogenización durante 25s a 6.000 rpm con un equipo MagNA Lyser (Roche). Después de un centrifugado de 2 min a 1000g, se transfirieron 200µl del sobrenadante para la extracción. El ADN se obtuvo utilizando un robot automático de extracción KingFisher Flex 96 y el kit comercial MagMAX™ CORE Nucleic Acid Purification Kit (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las indicaciones del fabricante. La identificación de los agentes fue realizada utilizando los siguientes kits comerciales: EXOone *Borrelia burgdorferi*, EXOone *Anaplasma* spp. y EXOone *Babesia* spp. Pets (propiedad intelectual de Exopol S.L., España), los cuales usan como diana para el ensayo de qPCR el gen *flagelline B*, el *16S* rRNA y el *18S* rRNA respectivamente. Todas las muestras fueron evaluadas adicionalmente con un ensayo de qPCR para identificar la presencia de material genómico de garrapatas (*16S* rRNA), con el fin de descartar falsos negativos. El desarrollo de las qPCR fue realizado siguiendo las indicaciones del fabricante. Con todos los datos, incluyendo los procedentes de las clínicas veterinarias, las identificaciones de las garrapatas y la detección de los patógenos, se confeccionó la base de datos completa.

Resultados

En este estudio se ha llevado a cabo la recogida de garrapatas parasitando a perros con propietario a través una cadena de clínicas veterinarias repartidas en el territorio nacional durante el período comprendido desde el 01/05/2021 hasta el 31/05/2022. Se recolectaron un total de 325 garrapatas procedentes de 160 perros (66 hembras y 94 machos). La mayoría de ellos estaban parasitados por una sola especie (96,87%) mientras que el parasitismo por dos especies fue anecdótico, tan solo en un 3,12% de los animales muestreados. Asimismo, más del 66,87% los perros estaban parasitados con una única garrapata, siendo la media de parasitación de 2,03 garrapatas/perro. El hecho de que los perros con una sola garrapata constituyan más de la mitad de las muestras, mientras que la prevalencia media sea ligeramente superior a 2, indica que los perros parasitados con más de una garrapata tenían tendencia a estar parasitados por 5-10 ejemplares. Es decir, el número de garrapatas que se encontraron en las mascotas siguió la conocida como “distribución binomial negativa”, en la que la mayoría de los perros tenían muy pocas garrapatas (solamente 1 en más del 66% de los animales) mientras que sólo unos pocos hospedaban números mayores de estos artrópodos.

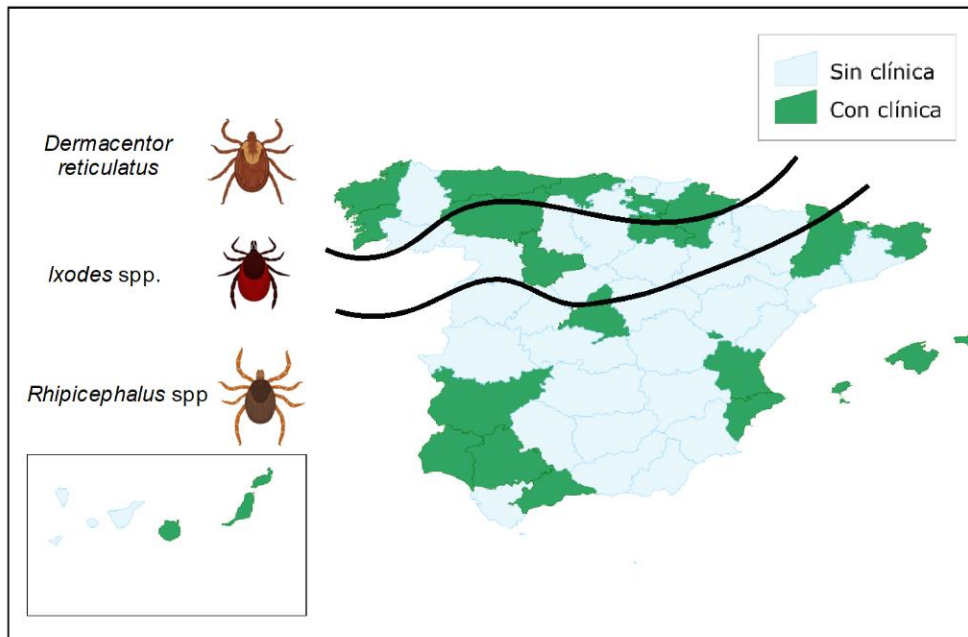
Las especies de garrapatas identificadas en orden de prevalencia fueron: *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (60,65%), *Rhipicephalus sanguineus* s.s. (15,84%), *Rhipicephalus pusillus* (7,10%), *Ixodes ricinus* (6,28%), *Dermacentor reticulatus* (3%), *Ixodes hexagonus* (2,73%), *Ixodes* spp., *Rhipicephalus bursa*, *Haemaphysalis erinacei*, *Hyalomma lusitanicum*, *Haemaphysalis parva* y *Haemaphysalis punctata*, todas ellas con porcentajes inferiores al 3% y cuya parasitación a los perros debe considerarse como un hallazgo puramente accidental. Debe destacarse que este estudio arroja los primeros hallazgos de *H. erinacei* y *H. parva* en España, de las que se encontró un solo ejemplar de cada especie en todo el estudio, y que normalmente parasitan a animales que viven en madrigueras. En cuanto al estadio de las garrapatas identificadas, las hembras se han encontrado en un 63,11% de las ocasiones, seguidas de los machos, que arrojaron una prevalencia de 27,05%. Tanto las ninfas como las larvas proporcionaron valores muy bajos de prevalencia (9,01% y 0,81%, respectivamente). Estos valores de prevalencia tienen una clara relación con el tamaño del ejemplar encontrado: las mayores son las hembras en diferentes estadios de alimentación, mientras que las larvas solamente pueden ser detectadas tras un minucioso examen del animal. En la figura 2 se pueden observar las garrapatas recogidas por provincia, lo cual no es indicativo de la abundancia relativa, sino que más probablemente esté relacionada con el esfuerzo de búsqueda en cada animal por los responsables de la clínica veterinaria de la zona.

Más de un 21,8% de las garrapatas se extrajeron de la región de la cara de los perros, seguido del cuello (15,89%) y el cráneo (14,56%). Las axilas, el dorso y abdomen mostraron un porcentaje de parasitación total de 5,29%, 14,9% y 8,61%. Las regiones del tercio posterior como el ano, rabo, vagina e ingles apenas han sobrepasado el 5% de infestación respectivamente. Sin embargo, las extremidades tanto delanteras como traseras tienen un porcentaje de parasitación de hasta un 9,9%. Esto parece indicar que las garrapatas se adhieren al animal principalmente durante el movimiento de olfateo, ya que los porcentajes más altos se encuentran en la región de la cabeza, y todos los valores de prevalencia alta se encuentran en las zonas anteriores del cuerpo del animal. Desde un punto de vista fisiológico, la edad de los perros se divide generalmente en cuatro etapas: infantil (nacimiento - 6 meses), juvenil (6 meses - 2 años), adulto (2 años - 7 años) y senior (más de 7 años). En este trabajo se ha encontrado que los animales examinados y correspondientes al periodo juvenil tenían un mayor número de garrapatas (2,8 garrapatas/animal) que los perros adultos. En estos últimos, la prevalencia de la infestación se mantuvo constante alrededor de 1,9 garrapatas/perro, que también se mantuvo en los animales pertenecientes al periodo senior (2 garrapatas/perro). El hecho de que la mayor prevalencia es observada en animales jóvenes, menores de 2 años, puede indicar que debido a su corta edad,

todavía podrían no haber sido sometidos a un tratamiento de desparasitación formalmente establecido.

A partir de los datos cumplimentados acerca de las características ambientales que rodean al animal, se puede determinar que aquellos animales que pasan más tiempo al aire libre son los que más garrapatas han tenido. Aquellos animales que viven el 100% de su tiempo fuera de una casa han contribuido al estudio con 73 garrapatas. Sin embargo, la abundancia de garrapatas en los perros que viven la mayoría de su tiempo en jardín o casa fue similar entre ambos casos, con un total de 154 y 134, respectivamente. De los 160 perros analizados solamente 27 indicaron en el formulario el hecho de haber viajado recientemente, de los cuales únicamente 6 ubicaron el lugar de destino. Esta falta de datos impide profundizar en el conocimiento de si algunas garrapatas no fueron adquiridas en el lugar habitual de residencia.

La figura 2 incluye la distribución aproximada de las garrapatas examinadas, así como su cantidad por zona geográfica. Debido a la ausencia de puntos de muestreo en ciertas zonas geográficas (indicadas en ambas figuras) no ha sido posible un análisis pormenorizado de la asociación de las garrapatas encontradas con las regiones ecológicas del país. Sin embargo, sí resulta interesante indicar el patrón geográfico observado en la distribución de las especies de parásitos con mayor prevalencia. Esta distribución sigue un claro patrón bioclimático. Las especies de garrapatas con preferencias ambientales relacionadas con zonas frescas y húmedas, como *I. ricinus*, han aparecido en el norte y noroeste peninsular. Ese esquema de distribución es similar al de *D. reticulatus*, aunque esta especie parece que prefiere zonas aún más frías, sin que se observe una mayor dependencia de la humedad ambiental. Por ello, se encuentra en pequeñas bolsas, al parecer no conectadas entre sí, aunque muy probablemente este hallazgo se derive de las circunstancias del muestreo, centralizado en clínicas veterinarias que se encuentran en lugares urbanizados relativamente grandes, alejados de las zonas frecuentadas por esta garrapata. El resto del país, archipiélagos incluidos, es el territorio preferido por las especies termófilas como todas las del género *Rhipicephalus*. Como se ha indicado, el resto de las especies se consideran hallazgos casuales, ya que el perro no es su hospedador habitual. No se indican en el mapa de la figura la distribución desagregada de las dos especies de *Ixodes* (*ricinus* y *hexagonus*) encontradas sobre los perros en esta encuesta. A pesar de que *I. ricinus* no ha arrojado más de un 6% de parasitaciones, ha resultado ser mucho más común que *I. hexagonus*, la cual ha aparecido en el 5% de las ocasiones en las que la identificación correspondía a garrapatas del género *Ixodes*.



A

Zona geográfica	Nº Garrapatas
Cataluña	81
País Vasco	14
Comunidad Valenciana	18
Asturias	8
Extremadura	2
Cantabria	10
Islas Baleares	1
La Rioja	4
Andalucía	38
Islas Canarias	42
Castilla y León	35
Galicia	22
Navarra	33
Madrid	9
No identificable	8
Total	325

B

Figura 2: A) Mapa de la distribución aproximada de las especies de garrapatas analizadas en el estudio.

B) Tabla donde se muestra el número de garrapatas por zona geográfica de estudio.

De la misma forma, es de interés la mención a la presencia, con una frecuencia relativamente alta, de *R. pusillus*, una garrapata que se considera monoxena de los conejos. Las posibles razones serán comentadas en la Discusión. Finalmente, en relación con los patógenos detectados en garrapatas, hay que destacar la baja prevalencia de todos los patógenos que

fueron considerados como presentes en las garrapatas del área geográfica a estudiar. Este hecho se ha debido, muy posiblemente, a que la mayoría de los perros examinados son animales que visitan regularmente los servicios veterinarios, y por lo tanto mantienen unas pautas relativamente adecuadas de desparasitación. En total, se han hallado 6 lotes positivos a *Babesia* sp. y 3 a *Ehrlichia* sp. Aunque no se ha procedido a la secuenciación génica de las muestras positivas, debemos suponer que se tratan de especies de *Babesia* como *B. gibsoni* o *B. vogeli* y de *E. canis*, ya que todas ellas han sido identificadas en garrapatas del género *Rhipicephalus*, el vector reconocido de estos agentes patógenos.

Discusión

En este trabajo se ha examinado la distribución de las garrapatas que se alimentan sobre perros en España a lo largo de un gradiente biogeográfico del país, trazado desde las zonas más húmedas y frías del norte, hasta el cálido y seco sureste peninsular, e incluyendo los archipiélagos. El objetivo principal ha sido la determinación de la composición faunística de las garrapatas parásitas del perro, y la detección de los patógenos que podrían transmitirse a través de una picadura de garrapata. El paradigma de una correcta vigilancia de las garrapatas requiere de la obtención de un número adecuado de muestras durante un largo período de tiempo, con un seguimiento fiable por parte de los profesionales involucrados en el protocolo de recogida. Normalmente se incluye un tiempo mínimo de examen de cada animal en función de su tamaño y su tipo de pelaje. Algunas de las hipótesis de este estudio previas a su inicio eran (i) el bajo número de animales con garrapatas, debido a que se trata de perros con propietario que acuden al veterinario, y para los que se supone la existencia de tratamientos antiparasitarios y (ii) la casi total ausencia de larvas y/o ninfas de garrapatas debido a su pequeño tamaño y al poco tiempo dedicado por los profesionales para su colecta. Ambas hipótesis se han visto refrendadas por los resultados del estudio: se han podido procesar 160 perros en un año (se esperaba un máximo de 125 mensuales, suponiendo que todos los meses se podría obtener material en todas las clínicas de un máximo de 5 perros), y se han identificado un total de tan solo 9,01% ninfas y 0.81% larvas, respectivamente. Mientras que los estadios inmaduros de algunas especies de garrapatas parasitan a roedores o aves, al menos los de *R. sanguineus* s.l. son parásitos comunes en el perro (Claerebout *et al.*, 2013).

Es necesario indicar aquí las diferentes denominaciones que hemos utilizado para referirnos a *R. sanguineus*. El problema radica en la extraordinaria variabilidad morfológica de las garrapatas del grupo, que no está correlacionada con variaciones en las secuencias de los genes

comúnmente empleados para la identificación molecular de las garrapatas, como el *16S rRNA* o el *coxI*. De esta forma, se ha comprobado que algunos ejemplares de *R. sanguineus* con idéntica secuencia molecular producen progenie estéril en la F2, es decir, resultan de un proceso de hibridación debido a que serían realmente especies diferentes. Este tipo de especies se suelen denominar “sibling” en inglés, aunque no existe una traducción canónica al castellano. Tras la definición formal del neotipo de *R. sanguineus* (Nava et al., 2018) se acordó que aquellos individuos cuya morfología se solapaba claramente con la del neotipo, debería denominarse “sensu stricto” (*R. sanguineus* s.s.) mientras que aquéllos que mostraban diferencias morfológicas y cuyo aspecto no podía englobarse en la definición de otras especies del grupo, aunque fueran molecularmente idénticas, deberían denominarse “sensu lato” (*R. sanguineus* s.l.) hasta que su adscripción taxonómica fuera finamente resuelta.

Los resultados de este estudio coinciden con los presentados en un estudio realizado en Italia (Maurelli et al., 2018), donde más del 95% de los animales estaban parasitados por una sola especie, mientras que la co-infestación por más de una especie también fue irrelevante. Como se muestra en los resultados de nuestro estudio, la mayor parte de las garrapatas han sido extraídas de las regiones craneal y cervical de las mascotas, lo que parece indicar que las garrapatas se adhieren al animal principalmente durante el movimiento de olfateo. Estas ubicaciones, características de dichos artrópodos, también fueron mencionadas en otros estudios llevados a cabo en Alemania (Beck et al., 2014) e Italia (Maurelli et al., 2018). En ambos trabajos, la cabeza y el cuello fueron considerados como los sitios de picadura más comunes.

Este estudio también ha querido evaluar las características ambientales que rodean al animal y su relación con las garrapatas encontradas, sin entrar en detalles estadísticos debido al tamaño muestral. Un detalle llamativo es que la residencia en un hábitat rural parece conllevar más probabilidades de estar parasitado por *Ixodes* spp. lo que indica que estas garrapatas no serían frecuentes en el entorno urbano. En concreto, *I. ricinus* ha sido la segunda especie más frecuentemente recogida (si se incluye en una sola denominación a las especies del grupo *R. sanguineus*). El resto de las especies han sido halladas tanto en animales que indicaban vivir habitualmente dentro de la casa o en el jardín, lo cual vuelve a indicar la importancia de la correcta desparasitación de los perros y su implicación en la Salud Pública, aunque la mayor parte de las garrapatas de este estudio han sido extraídas de perros que visitaban asiduamente el campo. De nuevo, es necesario recalcar aquí la ausencia de datos de una cierta cantidad de formularios con respecto a estos detalles, debida al procesado deficiente de los formularios en los que debían incluirse los datos obtenidos del propietario. Sin embargo, estos resultados son similares a los publicados en estudios llevados a cabo en Irlanda y en Italia, en los que se indicaba

que los perros de jardín o con estilos de vida libre y rurales tenían un riesgo mayor de exposición e infestación de garrapatas (de Waal *et al.*, 2020; Maurelli *et al.*, 2018). Un estudio realizado en EE.UU. mencionó que los perros que pasaban menos de una hora al aire libre o caminaban solo por pavimento durante sus paseos tenían menor riesgo de encuentros con garrapatas. Por el contrario, las actividades recreativas al aire libre, la existencia de roedores cerca de casa o el contacto directo con otros animales o cadáveres de animales se relacionaba con un mayor riesgo de infestación por garrapatas (de Wet *et al.*, 2020).

Es difícil extraer un patrón de estacionalidad claro, debido a que este TFG está basado en datos parciales, y no totales de cada una de las clínicas; es por ello por lo que no se han incluido resultados sobre esta parte de los datos. Sin embargo, cabe destacar que no existen grandes diferencias entre los periodos primaveral y otoñal en los datos analizados. En un estudio desarrollado en Reino Unido el patrón de actividad máxima de las garrapatas abarcó un período de tiempo que se extendía entre los meses de mayo y julio, mientras que se registró una actividad mínima (o incluso nula) de garrapatas entre los meses de diciembre y febrero (Tulloch *et al.*, 2017). Estos resultados coinciden igualmente con un trabajo realizado en Alemania en el que la mayor frecuencia de infestación de perros por parte de garrapatas se registró durante el mes de mayo (Beck *et al.*, 2014). En Albania, que es un país de características climáticas plenamente mediterráneas, se concluyó que los perros del estudio examinados durante la primavera, el verano y el otoño tenían un riesgo significativamente mayor de infestación que los perros examinados durante el invierno (Shukullari *et al.*, 2016). En cualquier caso, es interesante destacar que, incluso en ausencia de un análisis estadístico completo, el antiguo paradigma de “mayor actividad en primavera” parece no ser ya cierto, muy probablemente producido por veranos más largos y una transición rápida hacia el invierno. También es posible que el verano sea ya lo suficientemente cálido en España como para permitir una muda más rápida que acentúe la presencia de adultos en el otoño.

Rhipicephalus sanguineus ha sido la principal especie identificada en más de un 70% de las muestras recogidas. El predominio de *R. sanguineus* probablemente se explica porque los hábitats urbanos y suburbanos constituyen un entorno propicio para una especie que es propiamente endófila, y que puede infestar las casas, ya que la mayor parte de los perros del estudio vivían en un ambiente de casa o casa-jardín. Este grupo de especies ha sido dominante en todo el estudio y es el único representante en las muestras obtenidas de los archipiélagos balear y canario. Es también posible que el calentamiento al que hemos venido haciendo referencia en el párrafo anterior, esté “empujando” a especies conocidas como propias de regiones frescas y húmedas (como *D. reticulatus* e *I. ricinus*) a zonas más norteñas, o incluso las

obligue a refugiarse en regiones en las que el nicho ambiental propio de estas especies aún se mantenga bajo los límites adecuados para su supervivencia.

En nuestro caso, *D. reticulatus*, *I. hexagonus*, *I. ricinus* y *R. bursa* se han localizado únicamente en regiones del norte de España, coincidiendo con sus preferencias hacia un nicho ecológico fresco y húmedo (Geurden *et al.*, 2018). Esto coincide con estudios realizados en otros países centro y norte europeos que señalan el predominio de *I. ricinus* además de *D. reticulatus*, como Austria (Leschnik *et al.*, 2012), Letonia (Namina *et al.*, 2019), Países Bajos (Jongejan *et al.*, 2019), Suiza (Eichenberger, Deplazes y Mathis 2015), y Polonia (Król *et al.*, 2015; Król *et al.*, 2016). En Reino Unido (Abdullah *et al.*, 2016) y Bélgica (Claerebout *et al.*, 2013) se evidencia que la principal garrapata encontrada en ambos países fue *I. ricinus*. En base a los resultados, la composición de las especies de garrapatas en España sigue confirmando las conclusiones de Estrada-Peña (2017a), en la que destaca un claro gradiente espacial que se corresponde con la influencia atlántica en el norte y noroeste y la influencia mediterránea en el este y en el sur. Este patrón parece no haber cambiado en los últimos cinco años, aunque la menor cantidad de material colectada para este estudio no permite unas conclusiones más precisas.

Siguiendo con la comparación con el último estudio mencionado, se observa que se ha mantenido la prevalencia de las especies, *R. sanguineus* s.l. e *I. hexagonus*. Por el contrario, el número de garrapatas pertenecientes a las especies *D. reticulatus* e *I. ricinus* se ha reducido por debajo de la mitad en comparación con datos previos, posiblemente por la diferente localización geográfica de las clínicas seleccionadas o por la degradación de los ecosistemas favoritos de ambas especies. De la misma forma, *R. sanguineus* s.l. ha estado activa durante todo el año y *D. reticulatus* se ha recogido principalmente en la época de otoño-invierno. Los datos obtenidos en el año 2017 indicaban que tanto *I. hexagonus* como *I. ricinus* no presentaban una estacionalidad clara, un hecho claramente demostrado en los estudios europeos mencionados anteriormente, ya que los adultos suelen estar activos durante todo el año. Sin embargo, los datos de los que se dispone para los años 2021-2022 indican la presencia mayoritaria de estas dos especies en octubre y junio respectivamente.

Un hallazgo interesante del estudio es la presencia de *R. pusillus*, una garrapata comúnmente asociada a conejos (Napoli *et al.*, 2021; Remesar *et al.*, 2021). Se recolectaron 19 garrapatas en perros que vivían en casa y que pasaban un 10-30% del tiempo en el exterior. Este dato puede estar asociado con la alta prevalencia de *Oryctolagus cuniculus* o conejo común en España (González *et al.*, 2016). Se trataría pues de perros que curiosean en el interior de las madrigueras de los conejos, y que son parasitados por las garrapatas que se encuentran en el interior de la madriguera, ya que se trata de una especie endófila. En nuestro estudio la cantidad de

garrapatas recolectadas sobre los perros no puede utilizarse como un marcador fiable de la abundancia real de garrapatas en España. Esto queda reforzado por un análisis realizado por Estrada-Peña (2021), en el que la preferencia de las garrapatas por un hospedador, la susceptibilidad individual de cada animal, las áreas del cuerpo revisadas y la experiencia del veterinario o el tiempo dedicado a buscar garrapatas constituyen factores que pueden falsear los datos obtenidos. En un estudio llevado a cabo en Reino Unido, se obtuvo una información más completa al recoger garrapatas mediante muestreo de la vegetación (vigilancia activa) en un área determinada y comparando los resultados con los artrópodos recolectados de perros que paseaban por esa misma zona (Jennett, Smith y Wall 2013).

Finalmente, es interesante destacar el bajo número de garrapatas infectadas con algún patógeno. Debemos recalcar de nuevo que se trata de animales que asisten regularmente a las consultas veterinarias, y por ello, la cantidad de garrapatas recogidas es menor que la posiblemente encontrada en animales que no lo hacen. El bajo número de garrapatas está obviamente relacionado con la baja prevalencia de patógenos: si la presión parasitaria es baja, la probabilidad de infección también lo es. La toma de muestras de sangre de las mascotas parasitadas con garrapatas con el fin de conocer la seroprevalencia de la población canina, así como para establecer una relación entre los agentes que transmiten las garrapatas, permitiría obtener una información mucho más completa y funcional de la diversidad de garrapatas y patógenos que afectan realmente a nuestras mascotas. Estudios similares se han llevado a cabo en países europeos como Portugal (Barradas *et al.*, 2020) y Malta (Licari *et al.*, 2017); así como otros estudios en el continente africano (Heylen *et al.*, 2021; Kamani *et al.*, 2013), que son incomparables con los datos presentados aquí debido a la disparidad de especies y a su diferente ecología.

A lo largo de la realización del presente trabajo se han identificado una serie de complejidades a la hora de organizar un protocolo de vigilancia activa e identificación de garrapatas. Los principales problemas se pueden resumir en el número de clínicas veterinarias adscritas para cubrir el territorio objetivo, el enfoque de las cuestiones detalladas en el formulario de cada animal y el grado de implicación de los profesionales. Un ejemplo del último punto se observa en los datos obtenidos según los viajes que habían realizado las mascotas, ya que la información aportada en los formularios por los profesionales era incompleta. Debido a ello, no se pudo establecer ninguna relación entre las garrapatas recolectadas en esos casos y la zona geográfica donde pudieron haberse encontrado. Pese a ello, el estudio muestra la importancia que tiene la desparasitación de nuestras mascotas en Salud Animal, y cómo puede no sólo prevenir posibles patologías en nuestros animales sino también afectar a la Salud humana.

Conclusiones

- Las principales especies de garrapatas que parasitan a los perros en España tienen una distribución claramente marcada por la temperatura y la humedad, así como por los factores de riesgo que existen para cada animal, como la zona de vivienda o sus hábitos de paseo.
- Estas garrapatas, de varias especies, se encuentran preferentemente en las zonas de la cabeza y el cuello. Las principales especies han sido *Rhipicephalus* spp. e *Ixodes* spp. junto con *Dermacentor reticulatus*.
- La dinámica estacional de las garrapatas en España parece estar cambiando y aumentando en los meses de otoño. Aunque este dato puede ser debido exclusivamente a las características climáticas del año en el que se desarrolló el estudio.
- Los ejemplares de garrapatas colectados de perros con propietario estaban escasamente infectados con patógenos, muy posiblemente como consecuencia de la baja prevalencia de las garrapatas en sus hospedadores (relación entre el tamaño muestral y la prevalencia).
- La integración de este conocimiento con una buena comprensión de las complejidades actuales en los cambios socioeconómicos y climáticos permitirá a los investigadores desarrollar y proporcionar estrategias de prevención.

Conclusions

- The main species of ticks that parasitize dogs in Spain have a distribution clearly marked by temperature and humidity, as well as by the risk factors that exist for each animal, such as the area where they live or their walking habits.
- These ticks, of various species, are preferably found in the areas of the head and neck. The main species have been *Rhipicephalus* spp. and *Ixodes* spp. along with *Dermacentor reticulatus*.
- The seasonal dynamics of ticks in Spain seems to be changing and increasing in the autumn months. Although this data may be due exclusively to the climatic characteristics of the year in which the study was carried out.

- Tick specimens collected from owned dogs were poorly infected with pathogens, most likely because of the low prevalence of ticks on their hosts (ratio of sample size to prevalence).
- Integrating this knowledge with a good understanding of the current complexities in socioeconomic and climatic changes will allow researchers to develop and deliver prevention strategies.

Valoración personal

Gracias a que el presente trabajo deriva de un proyecto de investigación previamente concertado con el Departamento de Parasitología de la Facultad de Veterinaria, he podido desarrollar algunas de las herramientas más comunes a cualquier modelo de trabajo, como la búsqueda bibliográfica, el estudio laboratorial y el análisis de datos.

Del mismo modo, la oportunidad de colaborar en el citado proyecto me ha permitido valorar algunos de los aspectos más importantes que deben tenerse en cuenta en el desarrollo de un estudio de este calibre, como son la logística y la implicación de cada uno de los miembros que han sido determinantes para su desarrollo (desde los propietarios de los animales hasta el equipo investigador responsable de interpretar los datos obtenidos). Igualmente, también he podido identificar algunas de las dificultades que pueden surgir en las distintas fases que integran este tipo de estudios, como en este caso ha sido la información parcialmente completa de algunos de los sujetos participantes o la obtención de resultados, que por su escasez o poca relevancia, no han podido ser comparados con trabajos anteriores para definir conclusiones consolidadas.

Asimismo el trabajo también refleja una serie de conocimientos en un campo determinado que no habría podido adquirir de otro modo, por lo que después del tiempo dedicado a elaborarlo resulta satisfactorio observar el resultado final. Con todo ello no solo he procurado responder a los criterios evaluables de la propia asignatura, sino que realmente espero que el trabajo refleje una pequeña parte del estudio que fue planteado en un principio.

Bibliografía

- Abdullah, S., Helps, C., Tasker, S., Newbury, H. y Wall, R. (2016). "Ticks infesting domestic dogs in the UK: a large-scale surveillance programme". *Parasites & Vectors*, 9(1), pp. 391-399. DOI: 10.1186/s13071-016-1673-4.
- Barradas, P.F., Mesquita, J.R., Ferreira, P., Amorim, I., Gärtner y F. (2020). "Detection of tick-borne pathogens in *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* and dogs from different districts of Portugal". *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 11(6), pp. 1-8. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2020.101536.
- Beck, S., Schreiber, C., Schein, E., Krücken, J., Baldermann, C., Pachnicke, S., von Samson-Himmelstjerna, G. y Kohn, B. (2014). "Tick infestation and prophylaxis of dogs in northeastern Germany: a prospective study". *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5(3), pp. 336-342. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2013.12.009.
- Beugnet, F. y Marié, J.L. (2009). "Emerging arthropod-borne diseases of companion animals in Europe". *Veterinary Parasitology*, 163(4), pp. 298-305. DOI: 10.1016/j.vetpar.2009.03.028.
- Cafazzo, S., Valsecchi, P., Bonanni, R. y Natoli, E. (2010). "Dominance in relation to age, sex, and competitive contexts in a group of free-ranging domestic dogs". *Behavioral Ecology*, 21(3), pp. 443-455. DOI: 10.1093/beheco/arq001.
- Chao, L.L., Hsieh, C.K., Ho, T.Y. y Shih, C.M. (2019). "First zootiological survey of hard ticks (Acari: Ixodidae) infesting dogs in northern Taiwan". *Experimental and Applied Acarology*, 77(1), pp. 105-115. DOI: 10.1007/s10493-018-0328-x.
- Chomel, B. (2011). "Tick-borne infections in dogs-an emerging infectious threat". *Veterinary Parasitology*, 179(4), pp. 294-301. DOI: 10.1016/j.vetpar.2011.03.040.
- Claerebout, E., Losson, B., Cochez, C., Casaert, S., Dalemans, A.C., De Cat, A., Madder, M., Saegerman, C., Heyman, P. y Lempereur, L. (2013). "Ticks and associated pathogens collected from dogs and cats in Belgium". *Parasites & Vectors*, 6, pp. 183-191. DOI: 10.1186/1756-3305-6-183.
- de la Fuente, J., Estrada-Peña, A., Venzal, J. M., Kocan, K. M. y Sonenshine, D. E. (2008). "Overview: ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals". *Front Biosci*, 13, pp. 6938-6946. DOI: 10.2741/3200.
- de Waal, T., Lawlor, A., Zintl, A., Cowley, B. y Bagha, A. (2020). "A Survey of Ticks Infesting Dogs and Cats in Ireland". *Animals*, 10(8), pp. 1404-1411. DOI: 10.3390/ani10081404.

- de Wet, S., Rutz, H., Hinckley, A. F., Hook, S.A., Campbell, S. y Feldman, K.A. (2020). "Love the ones you're with: Characteristics and behaviour of Maryland pets and their owners in relation to tick encounters". *Zoonoses and Public Health*, 67(8), pp. 876–881. DOI: 10.1111/zph.12768.
- Eichenberger, R.M., Deplazes, P. y Mathis, A. (2015). "Ticks on dogs and cats: A pet owner-based survey in a rural town innortheastern Switzerland". *Ticks and Tick-borne Diseases*, 6(3), pp. 267-271. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2015.01.007.
- Estrada-Peña, A., Estrada-Sánchez, A. y de la Fuente, J. (2014a). "A global set of Fourier-transformed remotely sensed covariates for the description of abiotic niche in epidemiological studies of tick vector species". *Parasites & Vectors*, 7, pp. 302-316. Disponible en: <http://www.parasitesandvectors.com/content/7/1/302> [Consultado 05-02-2022].
- Estrada-Peña, A., Walker, A.R., Bouattour, A. y Camicas, J-L. (2014b). *Ticks of Domestic Animals in Africa: a Guide to Identification of Species*. Edinburgh: Atalanta.
- Estrada-Peña, A., Roura, X., Sainz, A., Miró, G. y Solano-Gallego, L. (2017a). "Species of ticks and carried pathogens in owned dogs in Spain: Results of a one-year national survey". *Ticks and Tick-borne Diseases*, 8(4), pp. 443–452. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2017.02.001.
- Estrada-Peña, A., Mihalca, A.D. y Petney, T.N. (2017b). *Ticks of Europe and North Africa. A Guide to Species Identification*. Cham: Springer.
- Estrada-Peña, A., Binder, L. C., Nava, S., Szabó, M. P. y Labruna, M. B. (2021a). "Exploring the ecological and evolutionary relationships between Rickettsia and hard ticks in the Neotropical región". *Ticks and Tick-borne Diseases*, 12(5), pp. 1-11. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2021.101754.
- Estrada-Peña, A., Cevidanes, A., Sprong, H. y Millán, J. (2021b). "Pitfalls in Tick and Tick-Borne Pathogens Research, Some Recommendations and a Call for Data Sharing". *Pathogens*, 10(6), pp.712-731. DOI: 10.3390/pathogens10060712.
- Fernández Ruíz, N. (2019). *Impacto de la tendencia del clima en la circulación de patógenos transmitidos por garrapatas en Europa*. Trabajo Fin de Grado. Universidad de Zaragoza.
- Fernández M.P., Bron G.M., Kache P.A., Larson S.R., Maus A., Gustafson D. Jr., Tsao J.I., Bartholomay L.C., Paskewitz S.M. y Diuk-Wasser M.A. (2019). "Usability and Feasibility of a Smartphone App to Assess Human Behavioral Factors Associated with Tick Exposure (The Tick App): Quantitative and Qualitative Study". *JMIR Mhealth Uhealth*, 7(10). DOI: 10.2196/14769.
- Folly, A.J., Dorey-Robinson, D., Hernández-Triana, L.M., Phipps, L.P. y Johnson, N. (2020). "Emerging Threats to Animals in the United Kingdom by Arthropod-Borne Diseases". *Frontiers in Veterinary Science*. 7, pp. 20-38. DOI: 10.3389/fvets.2020.00020.

- Fritz, C.L. (2009). "Emerging tick-borne diseases". *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, 39(2), pp. 265-278. DOI: 10.1016/j.cvsm.2008.10.019.
- Geurden, T., Becskei, C., Six, R.H., Maeder, S., Latrofa, M.S., Otranto, D. y Farkas, R. (2018). "Detection of tick-borne pathogens in ticks from dogs and cats in different European countries". *Ticks and Tick-borne Diseases*, 9(6), pp.1431-1436. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2018.06.013.
- González, J., Valcárcel, F., Pérez-Sánchez, J.L., Tercero-Jaime, J.M. y Olmeda, A.S. (2016). "Seasonal dynamics of ixodid ticks on wild rabbits *Oryctolagus cuniculus* (Leporidae) from Central Spain". *Exp Appl Acarol*, 70(3), pp.369-380. DOI: 10.1007/s10493-016-0069-7.
- Heylen, D., Day, M., Schunack, B., Fourie, J., Labuschagne, M., Johnson, S., Githigia, S.M., Akande, F.A., Nzalawahe, J.S., Tayebwa, D.S., Aschenborn, O., Marcondes, M. y Madder, M. (2021). "A community approach of pathogens and their arthropod vectors (ticks and fleas) in dogs of African Sub-Sahara". *Parasites & Vectors*, 14(1), pp. 576-596. DOI: 10.1186/s13071-021-05014-8
- Hutchinson, D., Freeman, L. M., Schreiner, K. E. y Terkla, D. G. (2011). Survey of Opinions About Nutritional Requirements of Senior Dogs and Analysis of Nutrient Profiles of Commercially Available Diets for Senior Dogs. *International Journal of Applied Research in Veterinary Medicine*, 9(1), pp. 68-79. Disponible en: <http://www.jarvm.com/articles/Vol9Iss1/Vol9%20Iss1Freeman.pdf> [Consultado 07-06-2022].
- Jennett, A.L., Smith, F.D. y Wall, R. (2013). "Tick infestation risk for dogs in a peri-urban park". *Parasites & Vectors*, 6, pp. 358-367. DOI: 10.1186/1756-3305-6-358.
- Jones, E.H., Hinckley, A.F., Hook, S.A., Meek, J.I., Backenson, B., Kugeler, K.J. y Feldman, K.A. (2018). "Pet ownership increases human risk of encountering ticks". *Zoonoses Public Health*, 65(1), pp. 74-79. DOI: 10.1111/zph.12369.
- Jongejan, F., de Jong, S., Voskuilen, T., van den Heuvel, L., Bouman, R., Heesen, H., Ijzermans, C. y Berger, L. (2019). "Tekenscanner": a novel smartphone application for companion animal owners and veterinarians to engage in tick and tick-borne pathogen surveillance in the Netherlands". *Parasites & Vectors*, 12(1), pp. 116-124. DOI: 10.1186/s13071-019-3373-3.
- Kamani, J., Baneth, G., Mumcuoglu, K.Y., Waziri, N.E., Eyal, O., Guthmann, Y. y Harrus, S. (2013). "Molecular detection and characterization of tick-borne pathogens in dogs and ticks from Nigeria". *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 7(3), pp. 2108-2114. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002108.

- Kamani, J., González-Miguel, J., Mshelbwala, F.M., Shekaro, A. y Apanaskevich, D.A. (2019). "Ticks (Acari: Ixodidae) infesting dogs in Nigeria: epidemiological and public health implications". *Experimental and Applied Acarology*, 78(2), pp. 231-246. DOI: 10.1007/s10493-019-00384-2.
- Kocoń, A., Asman, M., Nowak-Chmura, M., Witecka, J., Kłyś, M. y Solarz, K. (2020). "Molecular detection of tick-borne pathogens in ticks collected from pets in selected mountainous areas of Tatra County (Tatra Mountains, Poland)". *Scientific Reports*, 10(1), pp. 1-7. DOI: 10.1038/s41598-020-72981-w.
- Król, N., Kiewra, D., Szymanowski, M. y Lonc, E. (2015). "The role of domestic dogs and cats in the zoonotic cycles of ticks and pathogens. Preliminary studies in the Wrocław Agglomeration (SW Poland)". *Veterinary Parasitology*, 214(1-2), pp. 208-212. DOI: 10.1016/j.vetpar.2015.09.028.
- Król, N., Obiegala, A., Pfeffer, M., Lonc, E. y Kiewra, D. (2016). "Detection of selected pathogens in ticks collected from cats and dogs in the Wrocław Agglomeration, South-West Poland". *Parasites & Vectors*, 9(1), pp. 351-357. DOI: 10.1186/s13071-016-1632-0.
- Latrofa, M.S., Angelou, A., Giannelli, A., Annoscia, G., Ravagnan, S., Dantas-Torres, F., Capelli, G., Halos, L., Beugnet, F., Papadopoulos, E. y Otranto, D. (2017). "Ticks and associated pathogens in dogs from Greece". *Parasites & Vectors*, 10(1), pp. 301-307. DOI: 10.1186/s13071-017-2225-2.
- Leschnik, M.W., Khanakah, G., Duscher, G., Wille-Piazzai, W., Hörweg, C., Joachim, A. y Stanek, G. (2012). "Species, developmental stage and infection with microbial pathogens of engorged ticks removed from dogs and questing ticks". *Medical and Veterinary Entomology*, 26(4), pp. 440-446. DOI: 10.1111/j.1365-2915.2012.01036.x.
- Licari, E., Takács, N., Solymosi, N. y Farkas, R. (2017). "First detection of tick-borne pathogens of dogs from Malta". *Ticks and Tick-borne Diseases*, 8(3), pp. 396-399. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2017.01.002.
- Maurelli, M.P., Pepe, P., Colombo, L., Armstrong, R., Battisti, E., Morgoglione, M.E., Counturis, D., Rinaldi, L., Cringoli, G., Ferroglio, E. y Zanet, S. (2018). "A national survey of Ixodidae ticks on privately owned dogs in Italy". *Parasites & Vectors*, 11(1), pp. 420-430. DOI: 10.1186/s13071-018-2994-2.
- Namina, A., Capligina, V., Seleznova, M., Krumins, R., Aleinikova, D., Kivrane, A., Akopjana, S., Lazovska, M., Berzina, I. y Ranka, R. (2019). "Tick-borne pathogens in ticks collected from dogs, Latvia, 2011–2016". *BMC Veterinary Research*, 15(1), pp. 398-408. DOI: 10.1186/s12917-019-2149-5.

- Napoli, E., Remesar, S., Gaglio, G., Giannetto, S., Spadola, F., Díaz, P., Morrondo, P. y Brianti, E. (2021). "Ectoparasites of wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in Southern Italy". *Vet Parasitol Reg Stud Reports*, 24 (100555), pp. 1-5. DOI: 10.1016/j.vprsr.2021.100555.
- Nava, S., Beati, L., Venzal, J. M., Labruna, M. B., Szabó, M. P., Petney, T., Saracho-Bottero, M.N., Tarragona, E.L., Dantas-Torres, F., Silva, M.M.S., Mangold, A.J., Guglielmo, A.A. y Estrada-Peña, A. (2018). "Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806): Neotype designation, morphological re-description of all parasitic stages and molecular characterization". *Ticks and tick-borne diseases*, 9(6), pp. 1573-1585. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2018.08.001.
- Remesar, S., Castro-Scholten, S., Cano-Terriza, D., Díaz, P., Morrondo, P., Jiménez-Martín, D., Rouco, C. y García-Bocanegra, I. (2021). "Molecular identification of zoonotic Rickettsia species in Ixodidae parasitizing wild lagomorphs from Mediterranean ecosystems". *Transbound Emerg Dis*, pp. 1-13. DOI: 10.1111/tbed.14379.
- Schreiber, C., Krücken, J., Beck, S., Maaz, D., Pachnicke, S., Krieger, K., Gross, M., Kohn, B. y von Samson-Himmelstjerna, G. (2014). "Pathogens in ticks collected from dogs in Berlin/Brandenburg, Germany". *Parasites & Vectors*, 7, pp. 535-544. DOI: 10.1186/s13071-014-0535-1.
- Shukullari, E., Rapti, D., Visser, M., Pfister y K., Rehbein, S. (2016). "Parasites and vector-borne diseases in client-owned dogs in Albania: infestation with arthropod ectoparasites". *Parasitology Research*, 116(1), pp. 399-407. DOI: 10.1007/s00436-016-5302-0.
- Skotarczak, B. (2018). "The role of companion animals in the environmental circulation of tick-borne bacterial pathogens". *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, 25(3), pp. 473-480. DOI: 10.26444/aaem/93381.
- Tulloch, J.S.P., McGinley, L., Sánchez-Vizcaíno, F., Medlock, J.M. y Radford, A.D. (2017). "The passive surveillance of ticks using companion animal electronic health records". *Epidemiology and Infection*, 145(10), pp. 2020-2029. DOI: 10.1017/S0950268817000826.
- Vila, A., Estrada-Peña, A., Altet, L., Cusco, A., Dandreaño, S., Francino, O., Halos, L. y Roura, X. (2019). "Endosymbionts carried by ticks feeding on dogs in Spain". *Ticks and Tick-borne Diseases*, 10(4), pp. 848-852. DOI: 10.1016/j.ttbdis.2019.04.003.
- Wang, S., Hua, X. y Cui, L. (2021). "Characterization of microbiota diversity of engorged ticks collected from dogs in China". *Journal of Veterinary Science*, 22(3), pp.1-14 DOI: 10.4142/jvs.2021.22.e37.

Zanet, S., Battisti, E., Pepe, P., Ciuca, L., Colombo, L., Trisciuglio, A., Ferroglio, E., Cringoli, G., Rinaldi y L., Maurelli, M.P. (2020). "Tick-borne pathogens in Ixodidae ticks collected from privately-owned dogs in Italy: a country-wide molecular survey". *BMC Veterinary Research*, 16(1), pp. 46-55. DOI: 10.1186/s12917-020-2263-4.

Zhang, J., Liu, Q., Wang, D., Li, W., Beugnet, F. y Zhou, J. (2017). "Epidemiological survey of ticks and tick-borne pathogens in pet dogs in south-eastern China". *Parasite*, 24, pp. 1-8. DOI: 10.1051/parasite/2017036.

Agradecimientos

Quiero mostrar mi agradecimiento en primer lugar a mis directores Agustín Estrada-Peña y Natalia Fernández Ruíz por concederme la oportunidad de poder realizar el presente trabajo, por todo el tiempo que han invertido en mi formación, así como por la ayuda y el apoyo que me han brindado para la elaboración del mismo. También quiero agradecer a Merck, Sharp and Dhome España como precursora del proyecto de investigación a partir del cual he realizado el trabajo; así como a la cadena de clínicas y productos para animales Kiwoko pet, S.L.U, por su colaboración en la recolección de datos y toma de muestras; y a la empresa Exopol S.L. por llevar a cabo el análisis molecular de las mismas y la identificación de patógenos. Una mención especial merece Ana Abad, estudiante de doctorado del Departamento de Microbiología de la Facultad de Veterinaria, por contribuir de forma práctica a reforzar mis conocimientos y habilidades en las técnicas de extracción e identificación de ADN.

Quiero agradecer a mis padres todo el tiempo, esfuerzo y recursos que me han dedicado con el fin de formarme lo mejor posible en el ámbito académico, pero sobre todo en el personal. No me olvido de María, Víctor y Leyre, amigos y futuros compañeros de profesión, sin los cuales estoy segura de que la experiencia de cursar veterinaria no habría sido la misma. Finalmente quiero agradecer a Julio toda la paciencia, comprensión, cariño y apoyo que me ha brindado a lo largo de todo este tiempo, ya que poder llegar a poner el broche final con este trabajo tras varios años llenos de altibajos ha sido en gran parte mérito suyo.