



Facultad de Veterinaria

Trabajo de
Fin de Grado

Seroprevalencia de *Rickettsia conorii* en perros de Galicia.
Estudio preliminar.

Clara Hernández Hermida

Grado en Veterinaria

Año 2024

Modalidad del Trabajo: Experimental

Licencia

Excepto donde se haga constar explícitamente, esta obra pertenece a Clara Hernández Hermida y está bajo una licencia de “Creative Commons Reconocimiento 4.0 Internacional”.



1. RESUMEN

La fiebre botonosa mediterránea es una zoonosis causada por la bacteria *Rickettsia conorii* (endémica en España) y transmitida por garrapatas del complejo *Rhipicephalus sanguineus* s.l.. El hospedador preferido del vector es el perro, siendo el ser humano un hospedador accidental. En los animales, la infección cursa de forma subclínica, dificultando el seguimiento de la circulación de la bacteria. Este estudio se planteó como una forma de comprobar la exposición de perros de Galicia a este patógeno, y conocer si existe riesgo de infección para las personas en la zona. Para ello, se analizaron muestras de plasma y suero de perros (n=98) cedidas por entidades colaboradoras (clínicas veterinarias y protectoras) de toda la Comunidad Autónoma mediante Inmunofluorescencia indirecta (IFI), obteniendo una seroprevalencia total del 43,8%. Los resultados se clasificaron en base a la zona climática (según la clasificación de Köppen - Geiger de 1936) en la que habitaban los animales, y la estación del año en la que fue extraída la muestra, con el fin de relacionarlos con la actividad del vector. Se demostró que, en cuanto a distribución geográfica, las seropositividades más altas coinciden con zonas en las que la presencia de la garrapata ha sido confirmada (en el sur de Galicia). Además, las seroprevalencias de las muestras extraídas en otoño e invierno resultaron más altas de lo esperado, indicando que pueden existir garrapatas activas en Galicia también durante estas estaciones.

Palabras clave: *Rickettsia conorii*, *Rhipicephalus sanguineus* s.l., fiebre botonosa mediterránea, Galicia, Inmunofluorescencia indirecta, zoonosis, vector.

RESUMO

A febre botonosa mediterránea é una zoonose causada pola bacteria *Rickettsia conorii* (endémica en España) e transmitida por carrachas do complexo *Rhipicephalus sanguineus* s.l.. O hospedeiro preferido do vector é o can, sendo o ser humano un hospedeiro accidental. Nos animais, a infección cursa de forma subclínica, dificultando o seguimento da circulación da bacteria. Este estudo expúxose como unha forma de comprobar se a exposición dos cans de Galicia a este patóxeno, e de coñecer se existe risco de infección para as persoas na zona. Para iso, analizáronse mostras de plasma e soro de cans (n=98) cedidas por entidades colaboradoras (clínicas veterinarias e protectoras) de toda a Comunidade Autónoma mediante Inmunofluorescencia indirecta (IFI), obtendo unha seroprevalenza total de 43,8%. Os resultados clasificáronse en base á zona climática (segundo a clasificación de Köppen – Geiger de 1936) na que habitaban os animais, e a estación do ano na que foi extraída a mostra, co fin de relacionalos coa actividade do vector. Demostrouse que, en canto á distribución xeográfica, as seropositividades máis altas coinciden con zonas nas que a presenza da carracha foi confirmada (no sur da Comunidade Autónoma). Ademais, as seroprevalencias das mostras extraídas no outono e inverno resultaron máis altas do esperado, indicando que poden existir carrachas activas en Galicia tamén durante estas épocas.

Palabras chave: *Rickettsia conorii*, *Rhipicephalus sanguineus* s.l., febre botonosa mediterránea, Galicia, Inmunofluorescencia indirecta, zoonose, vector.

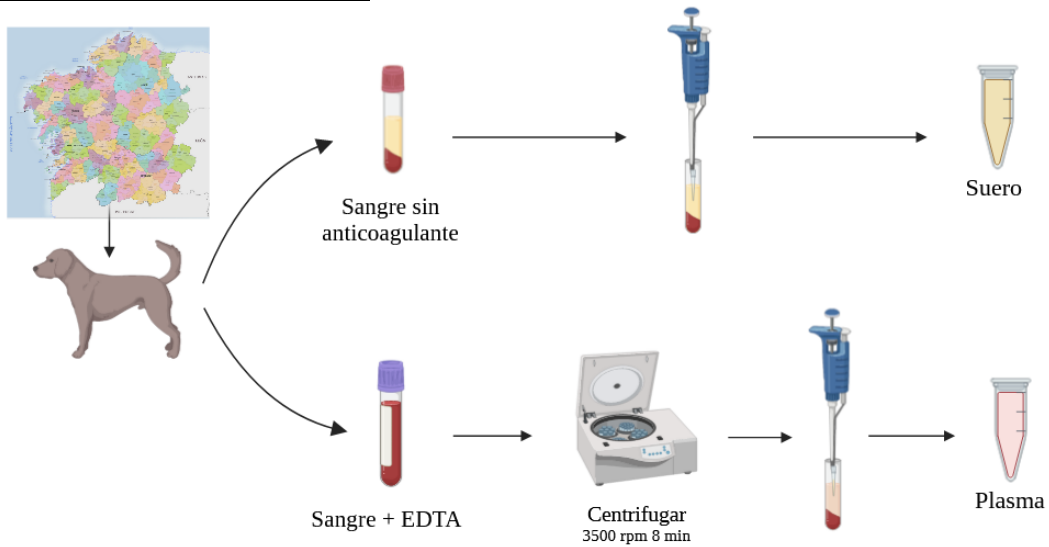
ABSTRACT

Mediterranean spotted fever is a zoonotic disease caused by the bacteria *Rickettsia conorii* (endemic in Spain) and transmitted by ticks of the *Rhipicephalus sanguineus* s.l. complex. The domestic dogs acts as the main host, and humans play an accidental host role. The infection develops subclinically in animals, causing difficulties while tracking the bacteria's circulation. This study was proposed to check whether dogs in the Autonomous Community of Galicia are exposed to this pathogen, and to know the risk of infection for people in this area. Plasma and serum samples of domestic dogs (n=98) were provided by collaborating entities (veterinary clinics and dog shelters) from different places of Galicia. Samples were analyzed by indirect Immunofluorescence (IFA), obtaining a total of 43 positives out of 98 (43.8%). The results were classified according to the Köppen-Geiger climatic zone classification of 1936 in which animals lived, and the season of the year in which the sample was collected, in order to correlate it with competent vectors' activity. In terms of geographic distribution, it was shown that the highest seroprevalence matched the areas where the tick's presence was confirmed (south part of the Autonomous Community). In addition, seroprevalences of samples collected in autumn and winter were higher than expected, indicating that ticks may have been active in Galicia during these periods of the year.

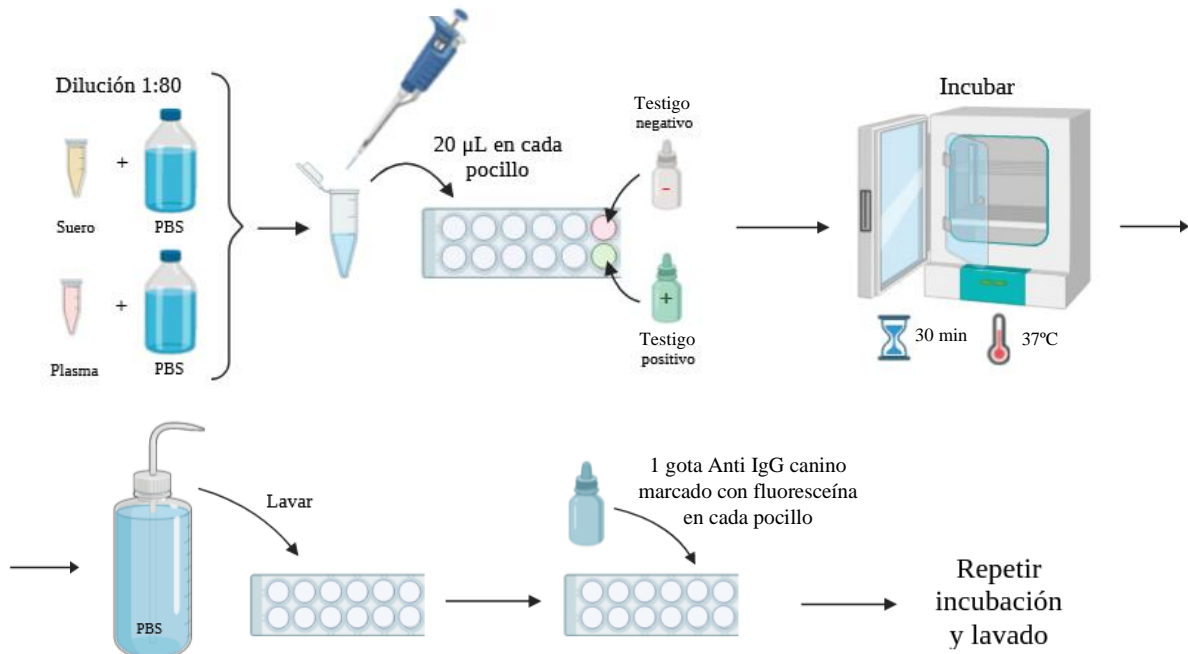
Key words: *Rickettsia conorii*, *Rhipicephalus sanguineus* s.l., mediterranean spotted fever, Galicia, indirect Immunofluorescence, zoonotic disease, vector.

2. RESUMEN GRÁFICO

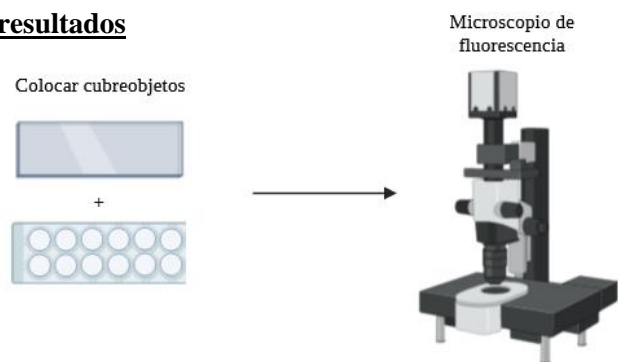
1.1 Procesado de las muestras



1.2 Análisis



1.3 Evaluación de resultados



3. ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. RESUMEN GRÁFICO	6
3. ÍNDICE	7
4. ÍNDICE DE FIGURAS	8
5. ÍNDICE DE TABLAS	8
6. ABREVIATURAS	9
7. INTRODUCCIÓN	11
7.1 <i>Rickettsia</i> spp.: características y clasificación	11
7.2 Las garrapatas y su relación con la transmisión de enfermedades.....	11
7.3 Patogenia de la infección	14
7.4 Las rickettsiosis en Europa.	18
7.5 Presencia de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l. y actividad en Galicia	20
7.6 TIBOLA/DEBONEL en España.....	22
7.7 Objetivos.....	24
8. MATERIAL Y MÉTODOS	24
8.1 Obtención y procesado de las muestras	24
8.2 Características de las muestras utilizadas	25
8.3 Análisis de las muestras	28
8.3.1 Materiales	28
8.3.2 Protocolo	29
8.3.3 Evaluación de los resultados	30
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
9.2 Interpretación de los resultados	31
9.3 Seroprevalencia de rickettsiosis según el clima.....	32
9.4 Seroprevalencia de rickettsiosis según la estación.....	33
10. CONCLUSIONES	35
11. BIBLIOGRAFÍA	36

4. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de un ciclo biológico monofásico. Creado con BioRender	12
Figura 2. Representación de un ciclo biológico trifásico. Creado con BioRender.....	13
Figura 3. Transmisión: garrapata fijada al hospedador, inoculando <i>Rickettsia</i> spp. Creado con BioRender.	16
Figura 4. Invasión: segunda fase del ciclo vital de <i>Rickettsia</i> spp. Creado con BioRender.....	16
Figura 5. Replicación: tercera fase del ciclo vital de <i>Rickettsia</i> spp. Creado con BioRender....	17
Figura 6. Salida: cuarta fase del ciclo vital de <i>Rickettsia</i> spp. Creado con BioRender.....	17
Figura 7. Distribución de los ejemplares de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l. encontrados en Galicia durante el año 2022. Adaptado del informe de ReGaViVec de 2022.	21
Figura 8. Ejemplares de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.l. encontrados en perros de Galicia en 2022 y 2023 en las cuatro estaciones del año. Adaptado de los informes de ReGaViVec de 2022 y 2023 (datos aportados por el grupo COPAR, pendientes de publicar)	21
Figura 9. Distribución de los ejemplares de <i>Dermacentor reticulatus</i> encontrados en Galicia durante el año 2022. Adaptado del informe de ReGaViVec de 2022.	23
Figura 10. Distribución de los ejemplares de <i>Dermacentor marginatus</i> encontrados en Galicia durante el año 2022. Adaptado del informe de ReGaViVec de 2022.	23
Figura 11. Muestras obtenidas de cada municipio.	26
Figura 12. Mapa de distribución de los climas de Köppen (1936) en Galicia.	28
Figura 13. Material empleado. Portaobjetos (azul) sobre cámara húmeda, tubos eppendorf con las muestras, tubos con las diluciones, micropipeta y soporte con puntas de micropipeta.	30
Figura 14. Muestra positiva (izquierda) y muestra negativa (derecha).	30

5. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Seroprevalencia de anticuerpos frente a <i>Rickettsia</i> spp. en suero de perros de diversos países europeos.....	20
Tabla 2. Procedencia de las muestras empleadas en este estudio. Clínicas veterinarias (CV)...	25
Tabla 3. Número de muestras analizadas por zona climática.....	26
Tabla 4. Número de muestras según la estación del año.....	27
Tabla 5. Características de los climas templados según la clasificación de Köppen (1936).....	27
Tabla 6. Porcentaje de animales seropositivos según la zona climática.....	32
Tabla 7. Porcentaje de animales seropositivos hallados según la estación del año.....	33

6. ABREVIATURAS

°C: grados centígrados.

“*Ca. R. rioja*”: “*Candidatus Rickettsia rioja*”.

CV: clínica veterinaria.

COPAR, Grupo de Investigación (GI-2120): Control de Parásitos en animales e Persoas: diagnóstico, prevención y tratamiento. Departamento de Patoloxía Animal, Facultade de Veterinaria, Universidade de Santiago de Compostela.

DEBONEL: *Dermacentor borne necrosis, erythema, lymphadenopathy* (Necrosis, eritema y linfadenopatía transmitidas por *Dermacentor* spp.)

IgG: inmunoglobulina G.

Min: minuto.

mL: mililitro.

µl: microlitro.

mm: milímetro.

OmpA: Proteína A de la membrana externa.

OmpB: Proteína B de la membrana externa.

ReGaViVec: Rede Galega de Vixilancia de Vectores.

RENAVE: Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica.

R. akari: Rickettsia akari.

R. australis: Rickettsia australis.

R. conorii: Rickettsia conorii.

R. felis: Rickettsia felis.

R. massiliae: Rickettsia massiliae.

R. monacensis: Rickettsia monacensis.

R. raoultii: Rickettsia raoultii.

R. rickettsii: Rickettsia rickettsii.

R. sanguineus: Rhipicephalus sanguineus

R. sibirica: Rickettsia sibirica.

R. slovacae: Rickettsia slovacae.

Rpm: revoluciones por minuto.

Sca 0: Antígeno 0 de células madre.

Sca 1: Antígeno 1 de células madre.

Clara Hernández Hermida

Sca 2: Antígeno 2 de células madre.

Sca 4: Antígeno 4 de células madre.

Sca 5: Antígeno 5 de células madre.

s.l.: sensu lato.

spp.: especies.

subsp.: subespecie.

TIBOLA: *tick borne lymphadenopathy* (linfadenopatía transmitida por garrapatas)

Todas las imágenes, tablas y esquemas han sido realizados durante el desarrollo del trabajo por la autora del mismo.

7. INTRODUCCIÓN

7.1 *Rickettsia* spp.: características y clasificación

El género *Rickettsia* pertenece a la familia Rickettsiaceae, que se engloba a su vez en el orden Rickettsiales, al que históricamente pertenecían también las familias Bartonellaceae y Anaplasmataceae. (Raoult y Roux, 1997). Esta clasificación cambia constantemente por los avances en genética molecular y el descubrimiento de nuevas características que permiten diferenciar cada género. Existen incluso discrepancias entre expertos (Parola et al., 2005).

Las bacterias de esta familia se caracterizan por ser patógenos intracelulares (Bernabeu-Wittel y Segura-Porta, 2005). La extrema dependencia del medio intracelular de su hospedador dificulta su cultivo en laboratorio (McGinn y Lamason, 2021), siendo totalmente inefectivos los métodos tradicionales y necesaria la utilización de animales vivos u otros métodos más complejos. Su ciclo vital consta de vectores y hospedadores, que varían dependiendo de la especie de la bacteria. En general, para la mayoría de las especies de *Rickettsia* spp., el ser humano es un hospedador accidental (Bernabeu-Wittel y Segura-Porta, 2005; Ortuño et al., 2009; Kim, 2022)

Las especies del género *Rickettsia* se suelen dividir en dos grupos según su presentación clínica: grupo de fiebres manchadas, y grupo de fiebres tíficas. Las enfermedades más prevalentes en Europa pertenecen al primero, y son la fiebre botonosa, seguida de TIBOLA/DEBONEL (*Tick borne lymphadenopathy* o *Dermacentor borne necrosis, erythema, lymphadenopathy*) (Oteo y Portillo, 2012). La fiebre botonosa mediterránea (*Mediterranean spotted fever*) es una zoonosis causada por la bacteria *Rickettsia conorii*. Es endémica en los países de la cuenca mediterránea, y de declaración obligatoria en España (Orden SSI/445/2015). Se transmite por la picadura de garrapatas del complejo *Rhipicephalus sanguineus* (“garrapata marrón del perro”) (Moerbeck et al., 2022). Este está formado por diversas especies del género *Rhipicephalus*, difíciles de distinguir entre sí debido a la gran similitud que existe en cuanto a lo que su morfología se refiere (Zemtsova et al., 2016). Debido a esto, se engloban en un mismo grupo, al que nos referiremos como *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (s.l.). Las garrapatas de este complejo son las únicas con competencia vectorial demostrada (Oteo y Portillo, 2012).

7.2 Las garrapatas y su relación con la transmisión de enfermedades

Las garrapatas son ectoparásitos temporales obligados que presentan ciclos biológicos complejos y juegan un papel importante en la transmisión de numerosas enfermedades. La gran mayoría de especies pertenecen a dos grandes familias: Ixodidae, conocidos como garrapatas

duras o ixódidos, y Argasidae, también denominadas garrapatas blandas o argásidos. Se diferencian gracias a que exhiben ciclos de vida y características (tanto fisiológicas como morfológicas) muy distintas (Estrada-Peña, 2015).

Los Ixódidos son los vectores principales de las rickettsiosis del grupo de las fiebres manchadas (Parola et al., 2013). Estas garrapatas pasan por cuatro estadios: huevo, larva, ninfa y adulto. Las tres últimas se alimentan de sangre del hospedador durante varias horas seguidas, pero una única vez en cada estadio (Estrada-Peña, 2015). La cantidad de tiempo y el número de hospedadores dependen del género, de forma que existen ciclos más o menos largos y que necesitan uno (monofásico), dos (bifásico) o tres (trifásico) hospedadores distintos. Las garrapatas se colocan en la parte superior de la vegetación a la espera de que pase algún animal al que poder agarrarse. Dependiendo del ciclo biológico que presenten, realizarán sus mudas para pasar de un estadio a otro o bien sobre dicho hospedador, o bien en el suelo. En las Figuras 1 y 2 se representan ciclos de uno y tres hospedadores, respectivamente.

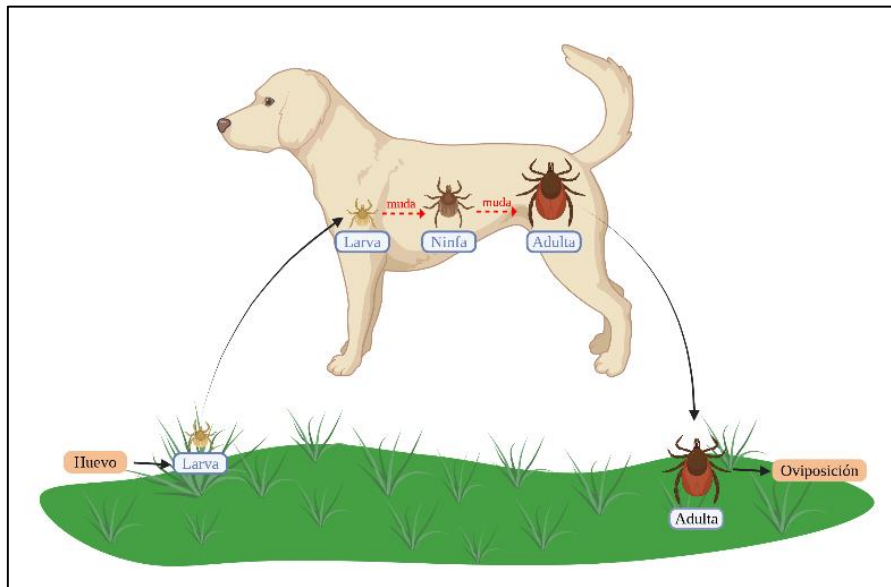


Figura 1. Representación de un ciclo biológico monofásico. Creado con BioRender

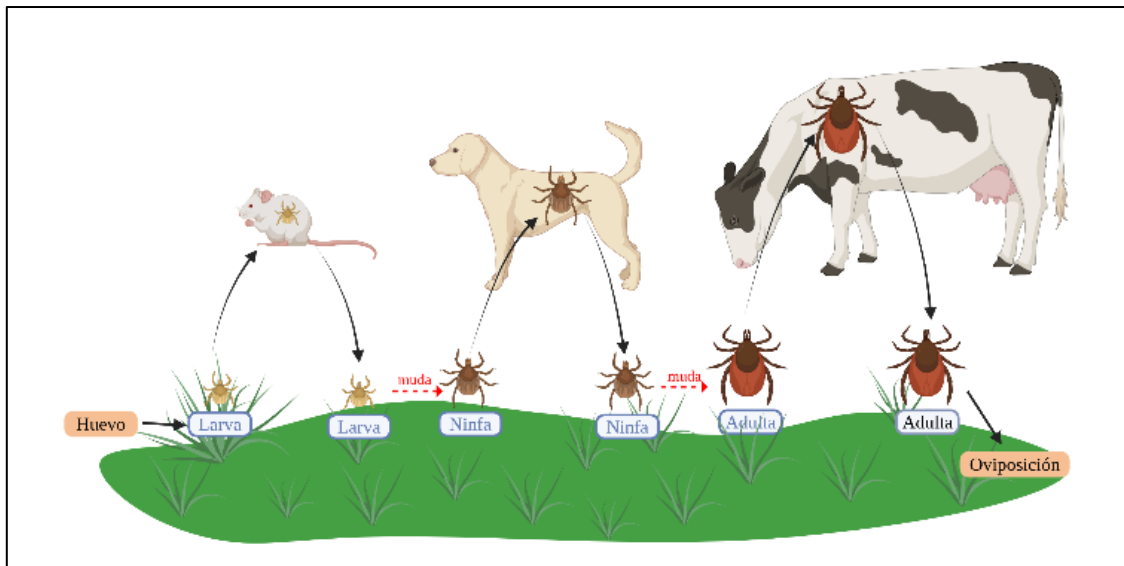


Figura 2. Representación de un ciclo biológico trifásico. Creado con BioRender

Las larvas y ninfas, debido a su pequeño tamaño y al menor desarrollo de su aparato bucal, habitualmente buscan hospedadores también pequeños, como roedores. Cuando se suben al animal, se mueven sobre él para buscar un sitio adecuado para alimentarse. Al insertar su aparato bucal en la piel, secretan una sustancia, denominada cemento, que contribuye a que la garrapata se quede fijada. A continuación, ocurren una serie de cambios físicos y químicos que permiten que el flujo de sangre sea continuo (Estrada-Peña, 2015).

La infección primaria con *Rickettsia* spp. de una garrapata no infectada, sucede al alimentarse de un hospedador cuya sangre contiene la bacteria (lo cual se denomina bacteriemia, y en este caso concreto rickettsemia) (Parola et al., 2005). El conocimiento del ciclo vital de las garrapatas revela que tienen, en total, 3 oportunidades para infectarse (una por cada alimentación que realizan): como larva, como ninfa o como garrapata adulta (Kahl, 2018). Para que el patógeno se transmita a otro hospedador, es necesario que exista transmisión transtadiaria, es decir, que sobreviva en la garrapata de un estadio al siguiente (Parola et al., 2005). Juega un papel muy importante sobre todo en ciclos de 3 hospedadores. En varias especies del género *Rickettsia* ocurre además la denominada transmisión vertical, que consiste en el traspaso transovárico del patógeno, de una hembra infectada a su descendencia. De este tipo de transmisión dependen los patógenos cuyos vectores presentan ciclos de 1 hospedador (Kahl, 2018). Se ha hablado también de otros métodos de transmisión, como *cofeeding* (Philip, 1959; Voordouw, 2015; Moraes-Filho et al., 2018), que consiste en el traspaso del patógeno entre una garrapata infectada y otra no infectada que se encuentran alimentándose extremadamente cerca en el hospedador. En este caso, no se produce rickettsemia (Kahl, 2018).

Rhipicephalus sanguineus s.l. es una de las garrapatas más comunes y se encuentra ampliamente distribuida por todo el mundo (Gray et al., 2013). Como ya se comentó anteriormente, se la conoce como “la garrapata marrón del perro” debido a su estrecha relación con este animal, que es su hospedador preferido. Esto trae como consecuencia su frecuente contacto con el ser humano (Zemtsova et al., 2016). Debido a su naturaleza endófila, es común encontrarlas en áreas urbanas, en casas en las que habitan perros o refugiadas en grietas o recovecos en lugares con gran densidad de ellos (Dantas - Torres y Otranto, 2017). Por ello también recibe el nombre de “garrapata de las perreras” o *kennel tick* (Gray et al., 2013). La garrapata, además de vector, también actúa como reservorio de *Rickettsia conorii*. Las hembras infectadas transmiten la bacteria a sus huevos (transmisión transovárica), que permanecerán infectados durante todos los estadios posteriores (larva, ninfa y adulto) (transmisión transestadial), de forma que en cada alimentación que realicen, la inocularán a un nuevo hospedador (Oteo & Portillo, 2012; Gray et al., 2013).

Las enfermedades transmitidas por garrapatas se localizan en áreas geográficas delimitadas (Parola et al., 2013), que coinciden con zonas de condiciones óptimas para la supervivencia de estas. Para que las infecciones se extiendan a nuevas áreas, es necesario que haya un desplazamiento del vector y/o del reservorio, y que en esas zonas existan otros vectores o reservorios capaces de mantener el ciclo del patógeno (Parola y Raoult, 2001).

7.3 Patogenia de la infección

Como se comentó anteriormente, una característica esencial del género *Rickettsia* es su estricta localización intracelular. La infección *in vivo* se caracteriza por la afectación de las células endoteliales de los vasos sanguíneos (Sahni y Rydkina, 2009). Este tipo de células juegan un papel muy importante en la respuesta inmunitaria e inflamatoria del organismo, al producir y reaccionar a diversas sustancias, como son las citocinas y quimiocinas, factores de crecimiento y sustancias vasoactivas (Sahni y Rydkina, 2009).

Cuando una garrapata que porta la bacteria se adhiere y alimenta en una persona, puede aparecer lo que comúnmente se conoce como “mancha negra”, una escara necrótica originada por la inoculación inicial de *Rickettsia* spp. en la zona. Se producen grados variables de inflamación y necrosis local, originadas por la vasculitis que causa la bacteria en los capilares de la dermis (Kim, 2022). La enfermedad cutánea generalizada se presenta como un exantema máculo - papuloso, con manchas de color rojizo - púrpura, que aparece principalmente en las extremidades (sobre todo en palmas de las manos y plantas de los pies), aunque también se puede extender al tronco (Oteo y Portillo, 2012). Estas características clínicas se producen cuando *Rickettsia* spp.

se disemina por todo el organismo en el torrente sanguíneo. Sus células predilectas son las células endoteliales de capilares y pequeños vasos. Sin embargo, en formas severas pueden verse afectados vasos más grandes y otros órganos, y manifestarse signos más severos como gangrena en las extremidades, neumonía, meningoencefalitis, y fallo multiorgánico (Abdad et al., 2018).

El ciclo de las bacterias del género *Rickettsia* consiste básicamente en 4 fases: transmisión (de la garrapata al animal), invasión de células, replicación intracelular, y salida de la bacteria de la célula (Kim, 2022). *Rickettsia* spp. no puede multiplicarse cuando se encuentra circulando en el torrente sanguíneo, sino que ha de introducirse en una célula eucariota. En los estudios realizados *in vitro* se observó que las especies patógenas pueden infectar a prácticamente todos los tipos de células, lo que sugiere que no existe en las células endoteliales un receptor específico para *Rickettsia conorii* (Teyssere et al., 1995; Sahni y Rydkina, 2009). Además, también se observó que la adhesión de la bacteria a las células no se producía tras el tratamiento de estas con calor o su incubación en tripsina (Li y Walker, 1992; Balraj et al., 2009), por lo que se dedujo que el ligando responsable de la interacción era una proteína.

Hoy en día sabemos que, en las rickettsias del grupo de las fiebres manchadas, existen 5 proteínas que participan activamente en la adhesión celular: Sca0 u OmpA (*Outer membrane protein A*), Sca 1, Sca2, Sca4 y Sca5 u OmpB. De estas 5, OmpA y OmpB juegan un papel imprescindible en la patogenia de las bacterias de este grupo, especialmente la segunda (Sahni et al., 2019). OmpB interacciona con múltiples proteínas de la membrana plasmática. Específicamente, el receptor Ku70, presente también en el núcleo y en el citoplasma tanto de estas células como de otras células eucariotas, parece posibilitar que la invasión de la bacteria se produzca con éxito (Martínez et al., 2005; Chan et al., 2009). Dicha interacción permite que, en células no fagocíticas, como son las endoteliales, se produzca una fagocitosis mediada por actina (también denominada fagocitosis inducida) (Chan et al., 2009). Este proceso consiste en la recolocación del citoesqueleto en el sitio de contacto, de manera que se forma una vacuola o fagosoma que envuelve a la bacteria (Walker et al., 2003). Una vez dentro de la célula, *Rickettsia* spp. es capaz de lisar la pared del fagosoma, quedando libre en el citoplasma (Teyssere et al., 1995; Sahni et al., 2019). La salida del patógeno de la vacuola induce la polimerización de la actina de la célula para formar la denominada “cola de cometa”. Esta estructura permitirá a la bacteria moverse por el citosol y pasar a las células contiguas (lo que se conoce como propagación de célula a célula), evadiendo así la respuesta inmune del hospedador (Heinzen, 2003). La bacteria se replica por fisión binaria en el interior de la célula, y para salir de ella e infectar a otras, provoca su necrosis (Walker et al., 2003). En las Figuras 3,4, 5 y 6 se representan los mecanismos explicados en este apartado.

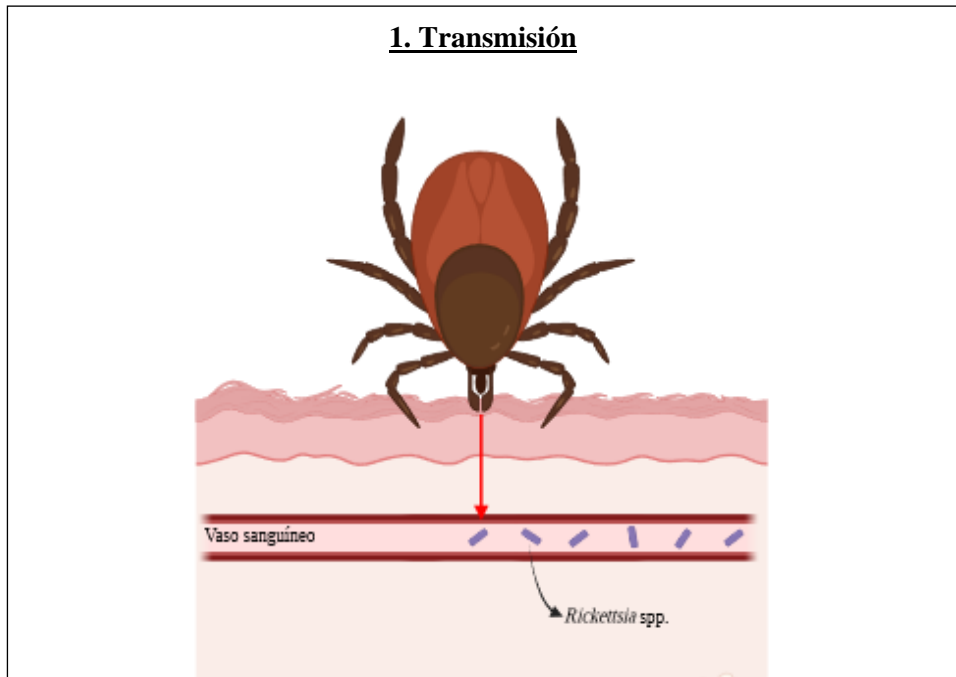


Figura 3. Transmisión: garrapata fijada al hospedador, inoculando *Rickettsia* spp. Creado con BioRender.

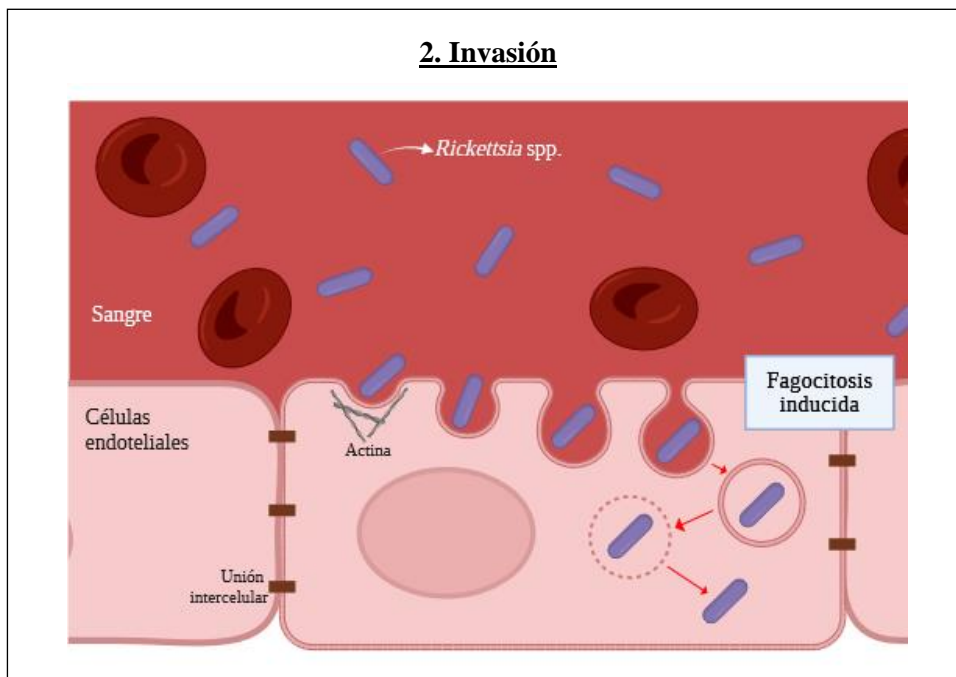


Figura 4. Invasión: segunda fase del ciclo vital de *Rickettsia* spp. Creado con BioRender.

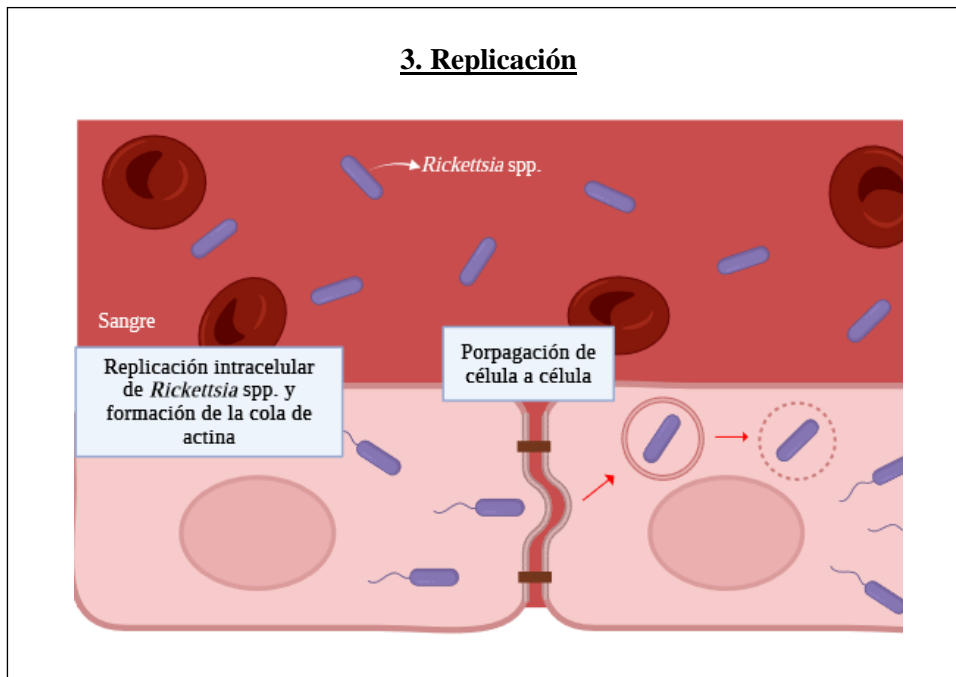


Figura 5. Replicación: tercera fase del ciclo vital de *Rickettsia* spp. Creado con BioRender.

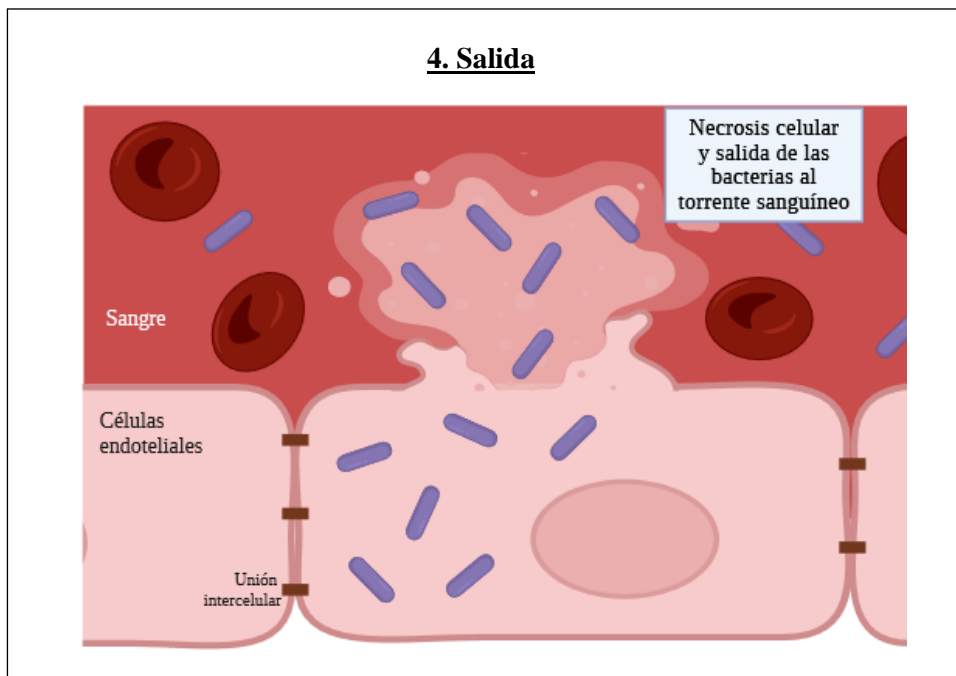


Figura 6. Salida: cuarta fase del ciclo vital de *Rickettsia* spp. Creado con BioRender.

La respuesta inmunitaria del hospedador también juega un papel importante en la patogenia de la infección. Se ha observado que las células infectadas secretan interleucinas (interleucinas 1-alfa y 6), quimiocina IL-8 y proteína 1 quimioatrayente de monocitos (Sahni y Rydkina, 2009) y que los Linfocitos T CD8 citotóxicos son capaces de inducir la apoptosis de células infectadas (Walker et al., 2001), liberando las bacterias de nuevo al torrente sanguíneo, lo que frena su multiplicación.

Comprender la patogenia de la infección nos permite entender cómo se producen las manifestaciones clínicas. Como sabemos, en casos avanzados de la enfermedad aparece una vasculitis generalizada que desencadena el incremento de la permeabilidad vascular. Esta es provocada por la muerte de células endoteliales (mediante apoptosis y necrosis) y por la destrucción de las uniones intercelulares debida a la propagación célula a célula (Sahni y Rydkina, 2009). En cuadros clínicos graves puede desencadenar en la formación de edema, especialmente en cerebro y pulmones, con los consiguientes signos clínicos (signos neurológicos, hipoxemia, etc) (Walker et al., 2003).

En perros, a pesar de ser un elemento clave en el ciclo y transmisión de *Rickettsia conorii*, la infección pasa desapercibida (enfermedad subclínica) o aparecen signos leves como fiebre de corta duración, letargia y mialgias, sin presentar signos cutáneos (Allison y Little, 2013). Sin embargo, se ha comprobado que utilizarlos como centinelas y realizar mapas epidemiológicos basados en sus resultados serológicos es útil para determinar el riesgo de infección para las personas (Mannelli et al., 2003; Moerbeck et al., 2022). Los perros, al igual que ocurre en los humanos, generan anticuerpos frente a la bacteria al ser inoculados con esta. Sin embargo, a diferencia de en las personas, las inmunoglobulinas frente a *R. conorii* duran en su sangre poco tiempo: aproximadamente menos de un año (Levin et al., 2012). Esto nos permite deducir que individuos positivos a técnicas indirectas de detección de anticuerpos, han sido infectados hace pocos meses, y que, por lo tanto, es probable que la bacteria se encuentre presente en la zona en este momento. Además, también se ha demostrado que los anticuerpos de los perros no son protectores, por lo que son susceptibles a reinfectarse, y a servir de nuevo como reservorio y fuente de infección para garrapatas libres de la bacteria (Levin et al., 2012).

7.4 Las rickettsiosis en Europa.

A pesar de que *Rickettsia* spp. puede ser transmitida por distintas especies de artrópodos, las rickettsiosis transmitidas por garrapatas son las más comunes en Europa (Portillo et al., 2015). Sin embargo, solo se comenzaron a distinguir las diferentes especies de la bacteria y su distribución cuando entraron en juego técnicas avanzadas de biología molecular.

En el continente europeo, la rickettsiosis más prevalente es la fiebre botonosa mediterránea, endémica en la Península Ibérica (Moerbeck et al., 2022). Como se comentó anteriormente, se sabe que el agente etiológico de esta enfermedad es *R. conorii*. Sin embargo, esta especie engloba varias subespecies: *R. conorii* subsp. *conorii*, *R. conorii* subsp. *israelensis*, *R. conorii* subsp. *indica*, y *R. conorii* subsp. *caspia*. Las dos primeras son las únicas que se han descrito en la Península Ibérica, en España y Portugal respectivamente (Moerbeck et al., 2022).

La enfermedad conocida como TIBOLA o DEBONEL es la segunda rickettsiosis más frecuente en Europa, y también en la Península Ibérica (Oteo y Portillo, 2012). Históricamente, el agente causal de esta enfermedad (*Rickettsia slovacica*) era considerada una especie no patógena para los humanos (Raoult y Roux, 1997). En la actualidad sabemos que es patógena, y que otras dos especies causan también TIBOLA: *Rickettsia raoultii* y “*Candidatus R. rioja*” (Santibáñez et al., 2022). Las bacterias son transmitidas por *Dermacentor marginatus*, aunque se ha observado que *Dermacentor reticulatus* también puede actuar como vector (Oteo y Portillo, 2012).

El perro doméstico (*Canis familiaris*) es el hospedador preferido de *Rhipicephalus sanguineus* s.l., y un elemento del ciclo de *Rickettsia conorii* muy útil para conocer la epidemiología de la bacteria. Las técnicas preferidas son aquellas basadas en la detección de anticuerpos, es decir, indirectas, debido a su sencillez, accesibilidad y rapidez de obtención de resultado (Portillo et al., 2017). Además, también permiten estimar el momento de la infección en la que se encuentra el animal, mediante la realización de análisis periódicos y la comparación de los títulos de anticuerpos obtenidos (Portillo et al., 2017).

En la Tabla 1 se muestran las seroprevalencias de anticuerpos frente a *Rickettsia* spp. en sueros de perros, recopiladas de estudios realizados en diversos países de Europa en los últimos años. En todos los casos, las muestras fueron analizadas mediante inmunofluorescencia indirecta, ya que es considerada la técnica de referencia para el diagnóstico serológico de esta bacteria (Portillo et al., 2017).

País	Especie	Perros seropositivos (%)	Referencia	
Portugal	<i>R. conorii</i>	20,35%	Afonso et al., 2024	
Montenegro	<i>R. conorii</i>	73,36%	Laušević et al., 2019	
Alemania	<i>Rickettsia</i> spp. (grupo de las fiebres manchadas)	77,9%	Wächter et al., 2015	
Grecia	<i>R. conorii</i>	46,5%	Diakou et al., 2019	
Italia	<i>R. conorii</i>	64,9%	Mendoza-Roldan et al., 2021	
España	Cataluña	<i>R. conorii</i>	42%	Espejo et al., 2016
	Islas Canarias	<i>R. conorii</i>	4,4%	Bolaños-Rivero et al., 2011

Tabla 1. Seroprevalencia de anticuerpos frente a *Rickettsia* spp. en suero de perros de diversos países europeos.

7.5 Presencia de *Rhipicephalus sanguineus* s.l. y actividad en Galicia

Como sabemos, la aparición de enfermedades transmitidas por garrapatas en seres humanos o animales en una zona está condicionada por la presencia del vector en dicha región. Según el informe de ReGaViVec de 2022, en Galicia encontramos los tres vectores de las rickettsiosis más frecuentes en la Península Ibérica: *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (vector de la fiebre botonosa mediterránea), *Dermacentor marginatus* y *Dermacentor reticulatus* (vectores de TIBOLA). *R. sanguineus* s.l es la especie que más apareció en 2022 (Informe ReGaViVec, 2022), y 2023 (Informe ReGaViVec, 2023) (información aportada por el grupo COPAR, pendiente de publicación) en perros de Galicia, en los que se encontraron principalmente ninfas y adultos. Como se puede apreciar en la Figura 7, su distribución se concentra en el sur de la Comunidad, en las provincias de Pontevedra y Ourense, encontrándose en esta última la mayor densidad de ejemplares.

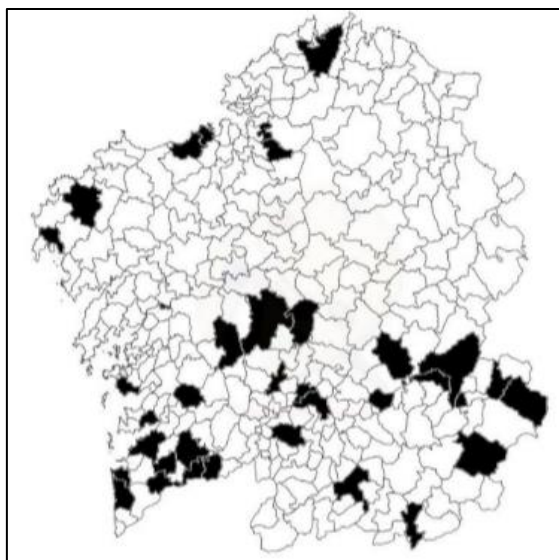


Figura 7. Distribución de los ejemplares de *Rhipicephalus sanguineus* s.l. encontrados en Galicia durante el año 2022. Adaptado del informe de ReGaViVec de 2022.

En la Figura 8 aparece representada la cantidad de ejemplares de *R. sanguineus* s.l. obtenidos por ReGaViVec. en las diferentes estaciones del año. En 2022 la estacionalidad resultó muy acusada, observándose un pico elevado en verano, y un número muy bajo de ejemplares en invierno. Sin embargo, en 2023, las diferencias estacionales fueron mucho más leves.

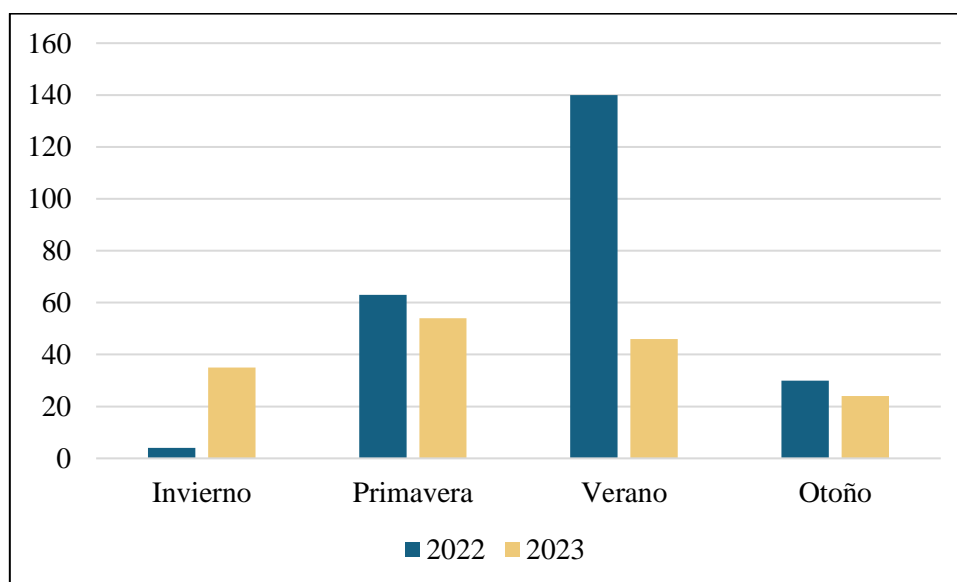


Figura 8. Ejemplares de *Rhipicephalus sanguineus* s.l. encontrados en perros de Galicia en 2022 y 2023 en las cuatro estaciones del año. Adaptado de los informes de ReGaViVec de 2022 y 2023 (datos aportados por el grupo COPAR, pendientes de publicar)

El informe anual sobre la situación de la fiebre botonosa mediterránea en España de RENAVE del año 2022 reveló que la tasa de incidencia en Galicia para esta enfermedad es de 0,07 casos por cada 100.000 habitantes, con solo dos casos confirmados en todo ese año. Esta resultó ser menor que la tasa de incidencia nacional (0,43 casos por cada 100.000 habitantes).

Recientemente se publicó un estudio (Remesar et al., 2019) que tenía como finalidad identificar las principales especies de *Rickettsia* spp. presentes en garrapatas recolectadas en Galicia. Se analizaron tres especies de garrapatas: *Ixodes ricinus*, *Dermacentor marginatus* y *Dermacentor reticulatus*; y se identificaron cinco especies de la bacteria: *R. felis*, *R. monacensis*, *R. raoultii*, *R. slovacica* y “*Ca. R. rioja*”. Sin embargo, en dicho estudio no se analizó ningún ejemplar de *Rhipicephalus sanguineus* sl., ni se identificó *R. conorii* en ninguna especie de las analizadas.

En Galicia, a diferencia de en otras Comunidades Autónomas españolas, no se ha realizado ningún estudio sobre seroprevalencias de anticuerpos frente a *R. conorii* en la población humana y/o canina. El presente estudio se considera de utilidad para comenzar a esclarecer y actualizar los datos sobre la presencia de la bacteria en la Comunidad Autónoma y relacionar la epidemiología del patógeno en garrapatas, perros y humanos.

7.6 TIBOLA/DEBONEL en España

TIBOLA (*tick borne lymphadenopathy*) o DEBONEL (*Dermacentor borne necrosis, erythema, lymphadenopathy*) es la segunda rickettsiosis más frecuente en España (Moerbeck et al., 2022). Sus agentes causales son *Rickettsia slovacica*, *Rickettsia raoultii* y “*Ca. R. rioja*”, y su principal vector, *Dermacentor marginatus* (Santibáñez et al., 2022), aunque se ha sugerido que *Dermacentor reticulatus* también podría actuar como tal (Remesar et al., 2019).

La mayoría de las picaduras en humanos se localizan en la cabeza, ya que estas garrapatas prefieren adherirse a la piel de lugares con abundante cantidad de pelo (Oteo & Portillo, 2012). Aparecen como una escara necrótica, negruzca, rodeada de un halo de eritema. La enfermedad cursa con una linfadenopatía regional muy dolorosa, y contracturas musculares y cefalea intensa (Santibáñez et al., 2022). En España no es de declaración obligatoria, pero se han descrito más de 300 casos en lo que llevamos de siglo (Silva-Pinto et al., 2014; Santibáñez et al., 2022).

La actividad de *Dermacentor marginatus* se desarrolla entre finales de agosto y mediados de mayo, presentando una estacionalidad opuesta a *R. sanguineus* s.l., y la mayoría de los casos se diagnostican en primavera (Santibáñez et al., 2022). Su distribución se concentra en países mediterráneos y en el norte de África (Silva-Pinto et al., 2014). *Dermacentor reticulatus* presenta

una estacionalidad similar a *D. marginatus*, aunque su pico de actividad se concentra en otoño. Esta especie se adapta muy bien a climas fríos, por lo que se encuentran en mayor densidad en centro Europa (Silva-Pinto et al., 2014). En ambas especies, las larvas y ninfas están activas durante el verano (Dantas - Torres y Otranto, 2017).

En Galicia se sabe que están presentes ambas especies de *Dermacentor* spp. gracias a los informes de ReGaViVec. *D. reticulatus* se encuentra ampliamente distribuida por toda la Comunidad, y se considera una especie en expansión en zonas húmedas (Informe ReGaViVec, 2022). En 2022 no se encontró ningún ejemplar de *D. marginatus* (vector principal de TIBOLA) en el medio, pero sí sobre hospedadores (principalmente vacas, y dos personas) (Informe ReGaViVec, 2022).

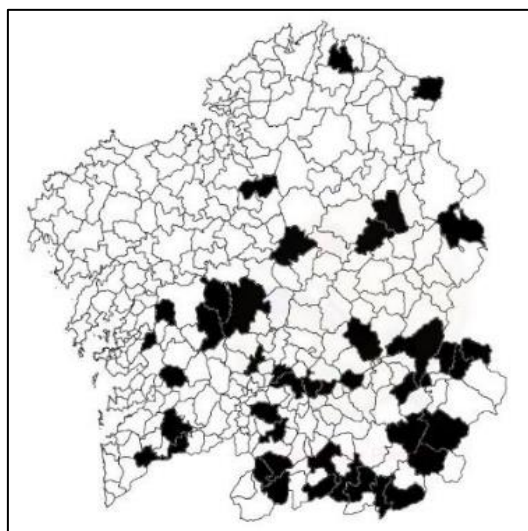


Figura 9. Distribución de los ejemplares de *Dermacentor reticulatus* encontrados en Galicia durante el año 2022. Adaptado del informe de ReGaViVec de 2022.

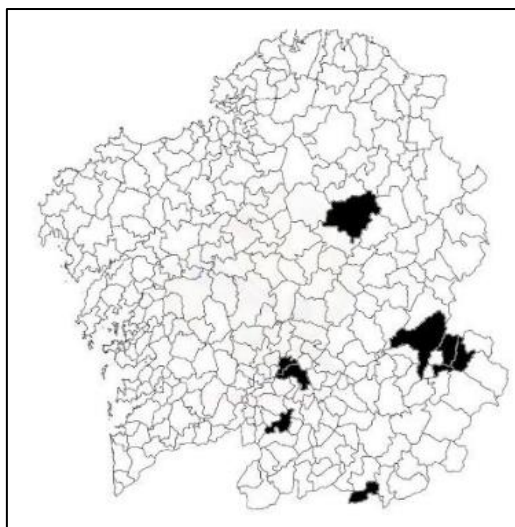


Figura 10. Distribución de los ejemplares de *Dermacentor marginatus* encontrados en Galicia durante el año 2022. Adaptado del informe de ReGaViVec de 2022.

En el estudio de Remesar et al. (2019), el 100% de los ejemplares analizados de *D. marginatus* dio positivo a *Rickettsia* spp. En el caso de *D. reticulatus*, se obtuvo una prevalencia del 23,5%. En ambos casos, las especies encontradas fueron *R. slovacca*, *R. raoultii* y/o “*Ca R. rioja*”. Esto confirma la competencia vectorial de *D. reticulatus* para las especies de *Rickettsia* spp. causales de TIBOLA, y su presencia en Galicia.

7.7 Objetivos

Gracias a los informes de ReGaViVec de 2022 y 2023, sabemos que *R. sanguineus* s.l. está presente en Galicia. Además, RENAVE publicó que entre 2019 y 2022 se notificaron 15 casos de fiebre botonosa mediterránea en personas de la Comunidad Autónoma. Este estudio se plantea como una posibilidad de analizar la distribución de la bacteria utilizando datos actualizados y al perro doméstico como especie centinela. Para ello, se establecen los siguientes objetivos:

- 1) Determinar la presencia de anticuerpos frente a *Rickettsia conorii* en sangre de perros de Galicia.
- 2) Analizar el riesgo de exposición a *R. conorii* en perros de Galicia en distintas épocas del año.
- 3) Relacionar la distribución del vector *Rhipicephalus sanguineus* s.l. en la Comunidad Autónoma Gallega con los resultados serológicos obtenidos.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 Obtención y procesado de las muestras

Para realizar el estudio se utilizaron perros que no habían salido de Galicia en los 12 meses previos a la toma de muestra de sangre. Estas fueron aportadas por diversas clínicas veterinarias y protectoras que colaboran con el grupo COPAR (GI-2120) de la Facultad de Veterinaria perteneciente a la Universidad de Santiago de Compostela. Los centros facilitaron muestras de sangre que pertenecían en unas ocasiones a perros sanos, a los que se les realizan controles de rutina, y otras veces, a perros con patologías diversas. Si hay alguna información interesante, es posible que la aporten, aunque de la mayoría de los animales solo conocemos la procedencia. En ningún caso se nos indicaba la presencia o la sospecha de infección por *R. conorii* en algún paciente.

Una vez al mes, el grupo recibía las muestras acumuladas en ese tiempo por las clínicas, habitualmente en tubos con EDTA o sin anticoagulante. La sangre que llegaba muy hemolizada se desechaba, pero sí que se utilizaron las que presentaban un bajo grado de hemólisis, debido a que el fabricante del kit no indicaba que los resultados se pudiesen ver alterados en caso de utilizarlos. A partir de las muestras con EDTA se obtuvo plasma, que es la fracción que se congela y utiliza para hacer las pruebas serológicas. Los tubos se centrifugaron a 3500 revoluciones por minuto (rpm) durante 8 min, tras lo cual se retiró la fase transparente. El plasma así obtenido se almacenó a -20°C contenido en tubos eppendorf que se rotularon con la identificación del paciente. En el caso de las muestras que llegaban en tubos sin anticoagulante se retiraba directamente el suero (que presenta un aspecto muy similar al plasma), que también puede utilizarse para análisis serológicos. Finalmente, el suero así obtenido se guardó y congeló como se indicaba anteriormente.

8.2 Características de las muestras utilizadas

Se utilizaron en total 98 muestras (83 plasmas y 16 sueros) aportadas por entidades colaboradoras, reflejadas en la Tabla 1.

Provincia	Procedencia
A Coruña	- CV Gran Vía (Carballo) - Protectora Gatocan (Coirós) - CV Melide (Melide)
Lugo	- CV Occidente (Ribadeo) - CV Recatelo (Lugo) - CV Canis Monforte (Monforte de Lemos) - CV Eduardo Pagano (Becerreá)
Ourense	- Protectora A Canceira (A Rúa) - CV Don Guau (Calvos de Randín)
Pontevedra	- CV Animalia Deza (Lalín) - CV Peniche (Vigo)

Tabla 2. Procedencia de las muestras empleadas en este estudio. Clínicas veterinarias (CV).

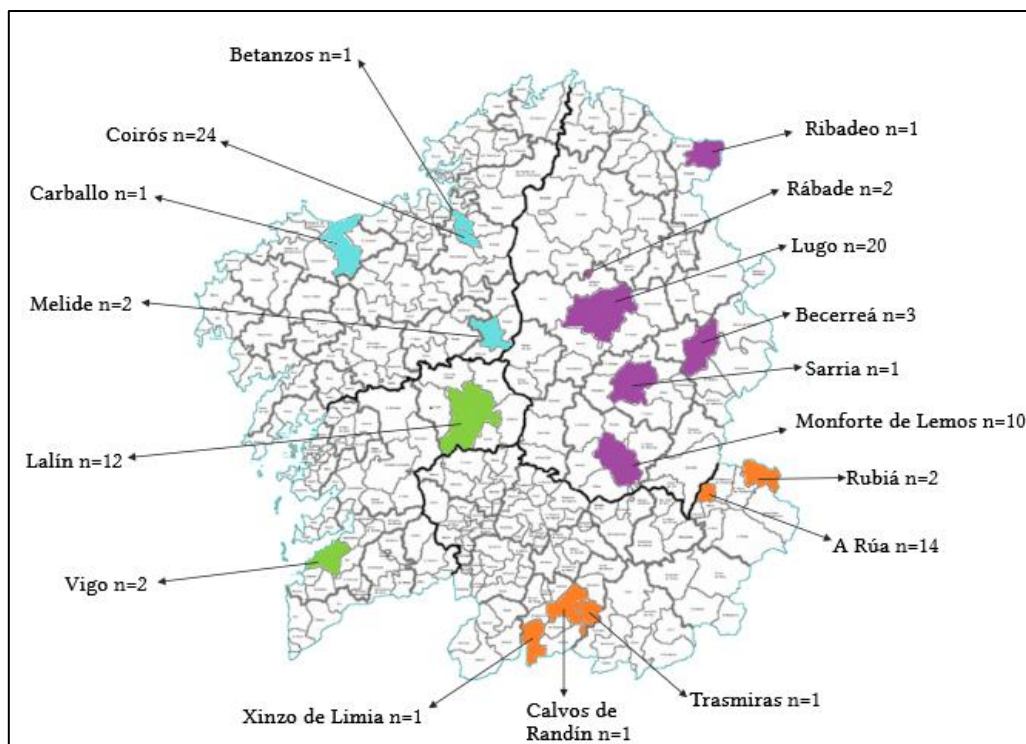


Figura 11. Muestras obtenidas de cada municipio.

Los datos comunes a todas las muestras fueron: municipio y provincia, fecha de extracción (mes) y tipo de muestra (suero o plasma). De ellos se extrajeron la zona climática en la que habitaba el animal, y la época/estación del año en la que se obtuvo la sangre. No se tuvieron en cuenta datos intrínsecos de los animales ya que se conocían de un número excesivamente bajo de muestras.

Zona climática	Municipios	Número de muestras
Cfb	Ribadeo, Carballo, Coirós, Betanzos, Melide	29
Csb	Rábade, Lugo, Sarria, Becerreá, Lalín, Vigo	40
Csa	Monforte de Lemos, A Rúa, Calvos de Randín, Xinzo de Limia	29

Tabla 3. Número de muestras analizadas por zona climática.

Estación	
Invierno	28
Primavera	3
Verano	7
Otoño	41
Desconocido	18

Tabla 4. Número de muestras según la estación del año.

Las zonas climáticas se establecieron siguiendo la clasificación de Köppen – Geiger (1936). En la primera versión, utilizó valores de temperatura y precipitaciones obtenidos durante varios años para crear valores umbral a partir de los cuales dividir la geografía siguiendo la distribución de la vegetación y el clima. En las dos siguientes décadas, se publicaron revisiones y actualizaciones, hasta obtener la clasificación que sirvió de base para la publicación de Peel et al. (2007). Esta ha servido de guía para realizar el presente estudio.

Köppen (1936) establece un código de tres letras para nombrar cada tipo de clima. La primera letra distingue los 5 tipos básicos: A, tórrido; B, árido; C, templado; D, frío; E, polar. La segunda letra caracteriza las precipitaciones, y la tercera, la temperatura. En España el clima predominante es el de tipo C (templado), que abarca casi toda la Península Ibérica, encontrándose especialmente en zonas de altitud baja y media.

1ª letra: Tipo de clima	2ª letra: Precipitaciones	3ª letra: Temperaturas
C (templado)	s: verano seco	a: subtropical. se superan los 22°C de media en el mes más cálido
	w: invierno seco	b: templado. no se superan los 22°C de media en el mes más cálido, y las temperaturas medias superan los 10°C al menos 4 meses al año
	f: húmedo, sin estación seca	c: frío. el verano es frío, y menos de 4 meses al año tienen una temperatura media superior a 10°C.

Tabla 5. Características de los climas templados según la clasificación de Köppen (1936).

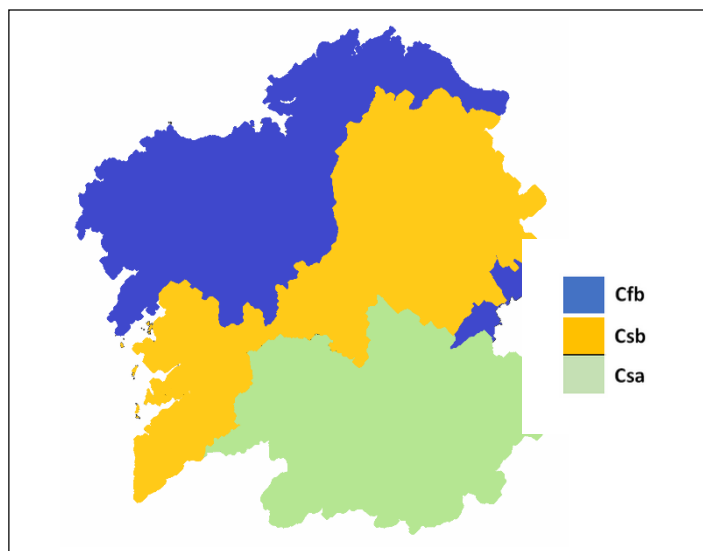


Figura 12. Mapa de distribución de los climas de Köppen (1936) en Galicia.

En Galicia, encontramos tres tipos de climas templados: Csa, Csb y Cfb. El clima Cfb aparece en casi toda la costa gallega, ocupando la provincia de A Coruña y la Mariña lucense. Además, también lo vemos en dos puntos del interior de la provincia de Lugo, en la frontera con León. El clima Csb, ocupa la costa de Pontevedra (Rías Baixas) y prácticamente todo el interior de la provincia de Lugo. El Csa se localiza en la provincia de Ourense y el interior de Pontevedra, donde las temperaturas son, sobre todo en verano, más altas que en el resto de la comunidad.

8.3 Análisis de las muestras

8.3.1 Materiales

Para analizar las muestras de sangre se utilizó el kit MegaFLUO® RICKETTSIA *conorii*, que permite la detección indirecta semicuantitativa mediante inmunofluorescencia de anticuerpos IgG específicos frente a *Rickettsia conorii* en plasma o suero del perro.

El kit contiene:

- 10 portaobjetos sembrados con células infectadas con *R. conorii*.
- 1 frasco (3 mL) de FLUO FITC conjugado IgG anti – canino.
- 1 frasco (0,5 mL) de testigo positivo.
- 1 frasco (0,5 mL) de testigo negativo.
- 1 frasco (3 mL) de medio de montaje.

Además, para la realización del análisis se utilizó también:

- PBS (solución salina tamponada con fosfato) con pH 7,2 – 7,4.
- Micropipetas.
- Agua destilada.
- Cámara húmeda.
- Incubadora a 37°C.
- Cubreobjetos de 24 x 50 mm.
- Microscopio de fluorescencia.

Antes de comenzar con el procedimiento todos los componentes del kit se encontraban a temperatura ambiente.

8.3.2 Protocolo

1. Diluir cada muestra de suero o plasma con PBS. En este caso se realizó una dilución 1:80, ya que era la recomendada por el fabricante (1 μ l de muestra + 79 μ l de PBS). Homogeneizar el contenido, idealmente con ayuda de un vórtex.
2. Colocar el portaobjeto sobre la cámara de humedad, y añadir una gota del testigo positivo y otra de testigo negativo en dos campos de antígeno diferentes.
3. Añadir una gota (20 μ l) de las diluciones de las muestras en los 10 campos de antígeno restantes.
4. Incubar durante 30 min a 37°C.
5. Lavado: retirar las muestras lavando con una pipeta Pasteur con PBS cada campo individualmente. A continuación, sumergir el portaobjetos en PBS y realizar movimientos suaves de agitación durante 5 min. Trascurrido este tiempo, repetir este último paso con PBS fresco. Por último, enjuagar el portaobjetos brevemente con agua destilada. Golpearlo suavemente sobre una superficie para eliminar el exceso de agua. Es importante cuidar que los campos de antígeno no se sequen por completo.
6. Añadir una gota de del FLUO FITC conjugado IgG anti – canino en cada campo.
7. Incubar 30 minutos a 37°C en oscuridad (se puede cubrir la cámara húmeda con papel aluminio).
8. Repetir la etapa de lavado (punto 5).
9. Añadir una gota del medio de montaje sobre cada campo de antígeno, y el cubreobjetos encima. Evitar la formación de burbujas.



Figura 13. Material empleado. Portaobjetos (azul) sobre cámara húmeda, tubos eppendorf con las muestras, tubos con las diluciones, micropipeta y soporte con puntas de micropipeta.

8.3.3 Evaluación de los resultados

Las muestras se evaluaron bajo el microscopio de fluorescencia, inicialmente a 200 aumentos para observar el campo en general, y luego a 400 aumentos para ver las células más en detalle.

Las células de las muestras positivas exhiben una coloración verde fluorescente, apreciable en forma de punteado a 400 aumentos. Al añadir un suero o plasma con anticuerpos frente a *R. conorii*, estos se unen a los antígenos presentes en el portaobjetos. Cuando se añade el FLUO FITC conjugado IgG anti – canino, los complejos antígeno – anticuerpo se tiñen, de forma que, al exponerlos a la luz azul del microscopio, emitirán fluorescencia. Es importante guardar los portaobjetos en oscuridad una vez evaluados para evitar la pérdida de dicha fluorescencia.

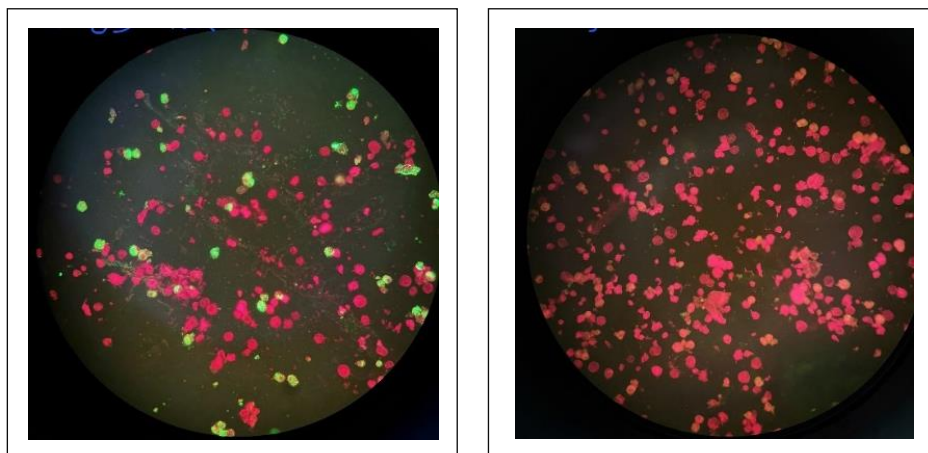


Figura 14. Muestra positiva (izquierda) y muestra negativa (derecha).

El fabricante expone en las instrucciones del kit las posibles reacciones cruzadas con otras especies de *Rickettsia* pertenecientes al grupo de las fiebres manchadas, como *R. raoultii*, *R. massiliae*, *R. rickettsii*, *R. akari*, *R. australis*, *R. sibirica*, etc.

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados del estudio revelan que del total de muestras analizadas (n=98), 43 resultaron positivas, lo que se corresponde con un 43,8% aproximadamente. Este resultado es menor que los obtenidos en Montenegro (73,36%) (Laušević et al., 2019), Alemania (77,9%) (Wächter et al., 2015) e Italia (64,9%) (Mendoza-Roldan et al., 2021), y similar a los observados en Grecia (46,5%) (Diakou et al., 2019) y Cataluña (42%) (Espejo et al., 2016).

Con el fin de analizar la distribución de animales seropositivos y relacionarlos con la presencia del vector, los resultados se clasificaron en base a la zona climática de procedencia del animal, y la estación del año en la que se recogió la sangre.

Además, las muestras se dividieron en base a la fracción de sangre utilizada para realizar el kit (suero o plasma). Sin embargo, este hecho no afecta al resultado del análisis. La diferencia entre ellas radica en la presencia o no de factores de coagulación (en el suero no están presentes). Las inmunoglobulinas (objeto de detección del kit) son proteínas que se encuentran en ambas fracciones, y el fabricante indica que pueden utilizarse indistintamente para su realización.

9.2 Interpretación de los resultados

Como se comentó anteriormente, las muestras se evaluaron bajo el microscopio de fluorescencia, a 400 aumentos. Se consideraron positivos aquellos con una apariencia similar al pocillo de testigo positivo, exhibiendo una fluorescencia de color verde vibrante de apariencia granular intracelular. Aquellas muestras en las que no había fluorescencia alguna, y eran por tanto similares al testigo negativo, se consideraron negativas.

Aparecieron también algunas muestras divergentes, en las que se apreciaba una levísima fluorescencia, de apariencia difusa y de color amarillo muy claro. Estos resultados se interpretaron como negativos, debido a que el fabricante indicaba expresamente que los patrones de reacción distintos a los testigos se consideran inespecíficos, es decir, negativos.

9.3 Seroprevalencia de rickettsiosis según el clima

La seroprevalencia de anticuerpos más elevada (65,5%) se encontró en las zonas con clima Csa, subtropical con verano seco, que se corresponde con el sur de la provincia de Lugo y la provincia de Ourense. En las zonas de clima Cfb (provincia de A Coruña y norte de la provincia de Lugo), se obtuvo un 41,3% de positivos. La seroprevalencia más baja se obtuvo en las zonas de clima Csb, siendo esta de un 30%.

Zona climática	Perros seropositivos (%)
Cfb	41,3% (12/29)
Csb	30% (12/40)
Csa	65,5% (19/29)

Tabla 6. Porcentaje de animales seropositivos según la zona climática.

Rhipicephalus sanguineus s.l. es la garrapata más extendida a nivel mundial (Gray et al., 2013). Es una especie adaptada a una amplia variedad de climas y temperaturas (Dantas - Torres y Otranto, 2017), y es por eso por lo que, dentro del complejo *R. sanguineus* s.l., se han diferenciado dos linajes: el grupo tropical, y el grupo templado. Este último aparece en zonas en las que la media anual no supera los 20°C (Zemtsova et al., 2016), como es el caso de España. El factor que más condiciona su supervivencia es el exceso de humedad (Gray et al., 2013). Se sabe que, gracias a su gran capacidad para controlar las pérdidas de agua, y su preferencia por vivir en refugios, prefieren hábitats secos.

Si comparamos el mapa de distribución de *R. sanguineus* s.l. en Galicia con el mapa de la distribución de los climas de Köppen en la Comunidad Autónoma, observamos que la mayor densidad de garrapatas aparece al sur, en las provincias de Ourense y Pontevedra, que manifiestan unas condiciones climáticas con menos precipitaciones y temperaturas más altas (clima Csa) que las provincias de A Coruña y Lugo. Que tanto la seroprevalencia de anticuerpos como la densidad de garrapatas sean altas en este tipo de clima, nos permite deducir que existe una relación estrecha entre estos factores. Dicha relación parece confirmarse cuando observamos que la seroprevalencia en las zonas Csb es notablemente inferior (30%). La mayoría de las muestras del clima Csb proceden de municipios en los que no se había confirmado la presencia del vector en 2022 (Informe ReGaViVec, 2022), y en los que sí se ha detectado en 2023, pero con menor abundancia que en el sur de Galicia (Informe ReGaViVec, 2023), por ejemplo, Lugo (26,3% de positivos).

Estos resultados parecen indicar que la seroprevalencia de anticuerpos frente a *Rickettsia conorii* se encuentra directamente relacionada con la presencia de su vector, como ya se sugirió anteriormente (Amusatogui et al., 2008; Espejo et al., 2016). Se podría deducir que, en zonas con mayor abundancia del vector, la circulación de la bacteria será mayor, y, por tanto, también será más probable la transmisión de esta a los seres humanos.

La seroprevalencia obtenida en los sueros procedentes del clima Cfb resultó ser del 41,3%, inferior a la obtenida en el estudio de Mendoza-Roldan et al. (2021) (64,9%) realizado en la ciudad de Padua, Italia, con clima subtropical húmedo (clima Cfa). Como ya se comentó anteriormente, *R. sanguineus* s.l. se adapta mejor a climas secos que a aquellos con precipitaciones abundantes. Sin embargo, en el informe del ReGaViVec de 2022 se describe la presencia de *R. sanguineus* s.l. en zonas con clima Cfb. El alto porcentaje de seropositivos obtenidos en este trabajo, así como en el de Mendoza-Roldan et al. (2021), sugieren que la garrapata es capaz de mantener su actividad y parasitar a perros en zonas húmedas.

9.4 Seroprevalencia de rickettsiosis según la estación

Los resultados de seroprevalencia según la estación en la que se extrajo la sangre aparecen sesgados por la gran diferencia en el número de muestras de cada una. Como se expuso anteriormente, solo se consiguieron 3 sangres extraídas en primavera y 7 extraídas en verano, contrastando con las 28 de invierno y las 41 de otoño.

Teniendo esto en cuenta, la mayor seroprevalencia apareció en primavera, con un 66,7%, seguida del invierno, con un 57,2%.

Estación	Perros seropositivos (%)
Invierno	57,2% (16/28)
Primavera	66,7% (2/3)
Verano	28,6% (2/7)
Otoño	43,9% (18/41)
Desconocido	27,8% (5/18)

Tabla 7. Porcentaje de animales seropositivos hallados según la estación del año.

En los países europeos, en los que el linaje templado de *R. sanguineus* s.l. es el más común, se observa una estacionalidad clara en su ciclo biológico: la época de mayor actividad se extiende desde primavera a principios de otoño (Dantas-Torres, 2008). Se sabe que temperaturas extremas frenan el desarrollo de la garrapata (aproximadamente, superiores a 35°C e inferiores a 14°C) (Gray et al., 2013), por lo que es frecuente que, en el sur de Europa, su actividad se vea disminuida en otoño e invierno, y se retome cuando las temperaturas comienzan a ser superiores. En perros de Galicia se extrajeron ejemplares de *R. sanguineus* s.l. durante todo el año. Aunque durante el año 2022 fueron más abundantes en primavera y verano, las diferencias de infestación estacionales fueron menos evidentes en 2023 (Informe ReGaViVec, 2023).

Ortuño et al. (2009) comprobaron mediante un estudio realizado en Barcelona (clima Csa) que la seroprevalencia en perros naturalmente expuestos a la infestación por garrapatas estaba directamente relacionada con los periodos de mayor actividad del vector: los títulos más altos se obtuvieron en verano, tras lo que disminuían significativamente en un plazo de dos meses. Esto concuerda con lo descrito anteriormente por Espejo et al. (1993), que recomiendan realizar los diagnósticos serológicos de *R. conorii* en perros en verano, por observarse títulos de anticuerpos mayores.

La seroconversión en los perros se observa aproximadamente 2 semanas tras la exposición a *Rickettsia conorii*, manifestando títulos elevados (Levin et al., 2012), los cuales disminuyen significativamente en los dos o tres meses siguientes, y en menos de un año, se vuelven negativos (Ortuño et al., 2009; Levin et al., 2012). Esto nos permite deducir, que un perro positivo a una prueba serológica ha estado expuesto a la bacteria hace menos de un año.

La seroprevalencia obtenida en este estudio detectó más animales positivos en otoño e invierno (43,9% y 57,2%, respectivamente) que en verano (28,6%) y difieren en parte a las obtenidas en Cataluña (Ortuño et al., 2009). Sabemos que *R. sanguineus* s.l. disminuye su actividad con las bajas temperaturas, pero no se ha demostrado que exista un periodo estricto de diapausa (Gray et al., 2013). Sin embargo, se sabe que el año 2023 ha sido más cálido de lo normal en toda España (Agencia Estatal de Meteorología [AEMET], 2023), y conocemos la gran capacidad de adaptación de esta especie de garrapata a las condiciones externas. Además, el informe de ReGaViVec (2023) revela que se extrajeron ejemplares de *R. sanguineus* s.l. durante todo el año. Todo esto indica que existen garrapatas activas en pleno otoño, responsables de infectar a los perros que han resultado seropositivos durante esos meses.

Otro factor que considerar es la prevención frente a la infestación, llevada a cabo por los dueños y los profesionales veterinarios. Es habitual utilizar ectoparasiticidas o repelentes en los meses de verano, y dejar de usarlos una vez comienza el otoño. El informe de ReGaViVec reveló que en 2023 hubo perros parasitados todo el año en Galicia. No utilizar ninguna forma de

prevención durante el otoño y el invierno deja abierta la puerta a infestaciones, y con ellas, la transmisión de patógenos. Además, es importante recordar que las garrapatas pasan la mayor parte de su vida fuera del hospedador, por lo que el tratamiento del ambiente en el que habita el animal es, aunque menos habitual, igual de necesario (Dantas-Torres, 2008).

La cantidad de garrapatas en el ambiente tiende a ser mayor en áreas en las que habita una gran densidad de perros, como protectoras o albergues para animales (Gray et al., 2013). En el estudio de Espejo et al. (1993), el único perro que mantuvo altos títulos de anticuerpos en los dos muestreos, separados entre sí por 8 meses, vivía en una protectora y se sabía que había estado parasitado por garrapatas en varias ocasiones durante ese tiempo. Si analizamos los resultados de los perros de la protectora A Canceira, observamos que 11 de los 16 animales analizados (68,75%) fueron positivos a anticuerpos frente a *R. conorii*, lo cual apoya el hecho de que, en ambientes con más densidad del vector, la exposición a la bacteria es también superior.

10. CONCLUSIONES

- 1) Los datos obtenidos sugieren que *Rickettsia conorii* se encuentra circulando en la Comunidad Autónoma Gallega.
- 2) La infección con *Rickettsia conorii* está relacionada con la presencia del vector *Rhipicephalus sanguineus* s.l., que en Galicia se distribuye de forma heterogénea tanto en el espacio como en el tiempo.
- 3) La seroprevalencia y la mayor presencia del vector en zonas con clima Csa, indican que en el sur de Galicia el riesgo de infección es mayor.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Abdad, M. Y., Abdallah, R. A., Fournier, P.-E., Stenos, J., y Vasoo, S. (2018). A Concise Review of the Epidemiology and Diagnostics of Rickettsioses: *Rickettsia* and *Orientia* spp. *Journal of clinical microbiology*, 56(8). <https://doi.org/10.1128/JCM.01728-17>
- AEMET. Informe climático del año 2023. https://www.aemet.es/documentos/es/serviciosclimaticos/vigilancia_clima/resumenes_climat/anales/res_anual_clim_2023.pdf
- Afonso, P., Lopes, A. P., Quintas, H., Cardoso, L., & Coelho, A. C. (2024). *Ehrlichia canis* and *Rickettsia conorii* Infections in Shelter Dogs: Seropositivity and Implications for Public Health. *Pathogens*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/pathogens13020129>
- Allison, R. W., y Little, S. E. (2013). Diagnosis of rickettsial diseases in dogs and cats. *Veterinary Clinical Pathology*, 42(2), 127-144. <https://doi.org/10.1111/vcp.12040>
- Amusategui, I., Tesouro, M. A., Kakoma, I., y Sainz, Á. (2008). Serological reactivity to *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Neorickettsia risticii*, *Borrelia burgdorferi* and *Rickettsia conorii* in dogs from Northwestern Spain. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 8(6), 797-803. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0277>
- Balraj, P., Renesto, P., y Raoult, D. (2009). Advances in *Rickettsia* pathogenicity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1166, 94-105. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04517.x>
- Bernabeu-Wittel, M., y Segura-Porta, F. (2005). Enfermedades producidas por *Rickettsia*. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 23(3), 163-172. <https://doi.org/10.1157/13072167>.
- Bolaños-Rivero, M., Santana-Rodríguez, É., Ángel-Moreno, A., Hernández-Cabrera, M., Limiñana-Canal, J. M., Carranza-Rodríguez, C., Martín-Sánchez, A. M., & Pérez-Arellano, J. L. (2011). Seroprevalence of *Rickettsia typhi* and *Rickettsia conorii* infections in the Canary Islands (Spain). *International Journal of Infectious Diseases*, 15(7). <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2011.03.019>
- Chan, Y. G. Y., Cardwell, M. M., Hermanas, T. M., Uchiyama, T., y Martinez, J. J. (2009). Rickettsial outer-membrane protein B (rOmpB) mediates bacterial invasion through Ku70 in an actin, c-Cbl, clathrin and caveolin 2-dependent manner. *Cellular Microbiology*, 11(4), 629-644. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01279.x>
- Dantas – Torres, F. (2008). The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): From taxonomy to control. *Veterinary Parasitology*, 153(3-4), 173-185. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.030>

- Dantas – Torres, F. y Otranto, D. (2017). *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (Latreille, 1806). En A. Estrada – Peña *et al.* (Eds.). *Ticks of Europe and North Africa. A guide to species identification* (pp. 323-327).
- Diakou, A., Di Cesare, A., Morelli, S., Colombo, M., Halos, L., Simonato, G., Tamvakis, A., Beugnet, F., Paoletti, B., & Traversa, D. (2019). Endoparasites and vector-borne pathogens in dogs from greek islands: Pathogen distribution and zoonotic implications. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *13*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007003>
- Espejo, E., Alegre, M. D., Font, B., Font, A., Segura, F., & Bella, F. (1993). Antibodies to *Rickettsia conorii* in dogs: seasonal differences. *European Journal Of Epidemiology*, *9*(3), 344-346. <https://doi.org/10.1007/BF00146275>
- Espejo, E., Andrés, M., Pérez, J., Prat, J., Guerrero, C., Muñoz, M. T., Alegre, M. D., Lite, J., y Bella, F. (2016). Prevalence of antibodies to *Rickettsia conorii* in human beings and dogs from Catalonia: A 20-year perspective. *Epidemiology and Infection*, *144*(9), 1889-1894. <https://doi.org/10.1017/S0950268816000261>
- Estrada-Peña, A. (2015). Ticks as vectors: taxonomy, biology and ecology. *Revue scientifique et technique - Office international des épizooties*. *34*(1), 53-65. <https://doi.org/10.20506/rst.34.1.2345>
- Gray, J., Dantas-Torres, F., Estrada-Peña, A., y Levin, M. (2013). Systematics and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Ticks and Tick-borne Diseases*, *4*(3), 171-180. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.12.003>
- Heinzen, R. A. (2003). Rickettsial actin-based motility: Behavior and involvement of cytoskeletal regulators. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *990*, 535-547. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb07424.x>
- Informe *ReGaViVec* (Rede Galega de Vixilancia de Vectores). Vixilancia de carrachas vectores de enfermidades humanas e animais. Año 2022. Grupo de investigación Copar (GI-2120). Xunta de Galicia.
- Kahl, O. (2018). Hard ticks as vectors - some basic issues. *Wiener Klinische Wochenschrift*. *130*(15-16), 479-483. <https://doi.org/10.1007/s00508-018-1360-x>
- Kim, H. K. (2022). *Rickettsia*-Host-Tick Interactions: Knowledge Advances and Gaps. *Infection and Immunity*, *90*(9), 1-17. <https://doi.org/10.1128/iai.00621-21>
- Laušević, D., Ilić, T., Nenadović, K., Bacić, D., & Obrenović, S. (2019). Seroprevalences of *Rickettsia conorii*, *Ehrlichia canis* and *Coxiella burnetii* in Dogs from Montenegro. *Acta Parasitologica*, *64*(4), 769-778. <https://doi.org/10.2478/s11686-019-00098-w>

- Levin, M. L., Killmaster, L. F., y Zemtsova, G. E. (2012). Domestic dogs (*Canis familiaris*) as reservoir hosts for *Rickettsia conorii*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(1), 28-33. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0684>
- Li, H., y Walker, D. H. (1992). Characterization of Rickettsial Attachment to Host Cells by Flow Cytometry. En *Infection and immunity*, 60(5), 2030-2035. <https://doi.org/10.1128/iai.60.5.2030-2035.1992>
- Mannelli, A., Mandola, M. L., Pedri, P., Tripoli, M., y Nebbia, P. (2003). Associations between dogs that were serologically positive for *Rickettsia conorii* relative to the residences of two human cases of Mediterranean spotted fever in Piemonte (Italy). *Preventive Veterinary Medicine*, 60(1), 13-26. [https://doi.org/10.1016/S0167-5877\(03\)00079-5](https://doi.org/10.1016/S0167-5877(03)00079-5)
- Martinez, J. J., Seveau, S., Veiga, E., Matsuyama, S., y Cossart, P. (2005). Ku70, a component of DNA-dependent protein kinase, is a mammalian receptor for *Rickettsia conorii*. *Cell*, 123(6), 1013-1023. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.046>
- Mendoza-Roldan, J. A., Benelli, G., Bezerra-Santos, M. A., Nguyen, V. L., Conte, G., Iatta, R., Furlanello, T., & Otranto, D. (2021). Seropositivity to canine tick-borne pathogens in a population of sick dogs in Italy. *Parasites and Vectors*, 14(1). <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04772-9>
- McGinn, J., y Lamason, R. L. (2021). The enigmatic biology of rickettsiae: Recent advances, open questions and outlook. *Pathogens and Disease*, 79(4). <https://doi.org/10.1093/femspd/ftab019>
- Moerbeck, L., Domingos, A., y Antunes, S. (2022). Tick-Borne Rickettsioses in the Iberian Peninsula. *Pathogens*, 11(11), 1-12. <https://doi.org/10.3390/pathogens11111377>
- Moraes-Filho, J., Costa, F. B., Gerardi, M., Soares, H. S., y Labruna, M. B. (2018). *Rickettsia rickettsii* co-feeding transmission among *Amblyomma aureolatum* ticks. *Emerging Infectious Diseases*, 24(11), 2041-2048. <https://doi.org/10.3201/eid2411.180451>
- Orden SSI/445/2015, de 9 de marzo, por la que se modifican los anexos I, II y III del Real Decreto 2210/1995, de 28 de diciembre, por el que se crea la Red Nacional de Vigilancia Epidemiológica, relativos a la lista de enfermedades de declaración obligatoria, modalidades de declaración y enfermedades endémicas de ámbito regional. *Boletín Oficial del Estado*, n. 65, de 17 de marzo de 2015.
- Ortuño, A., Pons, I., Noguerras, M. M., Castellà, J., y Segura, F. (2009). The dog as an epidemiological marker of *Rickettsia conorii* infection. *Clinical Microbiology and Infection*, 15(SUPPL. 2), 241-242. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02158.x>
- Oteo, J. A., y Portillo, A. (2012). Tick-borne rickettsioses in Europe. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 3(5-6), 271-278. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.10.035>

- Parola, P., Paddock, C. D., y Raoult, D. (2005). Tick-borne rickettsioses around the world: Emerging diseases challenging old concepts. *Clinical Microbiology Reviews*, 18(4), 719-756. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.719-756.2005>
- Parola, P., Paddock, C. D., Socolovschi, C., Labruna, M. B., Mediannikov, O., Kernif, T., Abdad, M. Y., Stenos, J., Bitam, I., Fournier, P. E., y Raoult, D. (2013). Update on tick-borne rickettsioses around the world: A geographic approach. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(4), 657-702. <https://doi.org/10.1128/CMR.00032-13>
- Parola, P., y Raoult, D. (2001). Ticks and Tickborne Bacterial Diseases in Humans: An Emerging Infectious Threat. *Clinical Infectious Diseases*, 32(6), 897-928. <https://doi.org/10.1086/319347>
- Peel, M. C., Finlayson, B. L., y McMahon, T. A. (2007). Updated world map of the Köppen-Geiger climate classification. *Hydrology and Earth System Sciences*, 11(5), 1633-1644. <https://doi.org/10.5194/hess-11-1633-2007>, 2007.
- Philip, C. B. (1959). Some Epidemiological Considerations in Rocky Mountain Spotted Fever. *Public Health Reports*, 74(7), 595-600. <https://doi.org/10.1086/319347>
- Portillo, A., de Sousa, R., Santibáñez, S., Duarte, A., Edouard, S., Fonseca, I. P., Marques, C., Novakova, M., Palomar, A. M., Santos, M., Silaghi, C., Tomassone, L., Zúquete, S., & Oteo, J. A. (2017). Guidelines for the Detection of *Rickettsia* spp. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 17(1), 23–32. <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.1966>
- Portillo, A., Santibáñez, S., García-Álvarez, L., Palomar, A. M., y Oteo, J. A. (2015). Rickettsioses in Europe. *Microbes and Infection*, 17(11-12), 834-838. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2015.09.009>
- Raoult, D., y Roux, V. R. (1997). Rickettsioses as Paradigms of New or Emerging Infectious Diseases. *Clinical microbiology reviews*, 10(4), 694-719. <https://doi.org/10.1128/cmr.10.4.694>
- Remesar, S., Díaz, P., Portillo, A., Santibáñez, S., Prieto, A., Díaz-Cao, J. M., López, C. M., Panadero, R., Fernández, G., Díez-Baños, P., Oteo, J. A., y Morrondo, P. (2019). Prevalence and molecular characterization of *Rickettsia* spp. in questing ticks from north-western Spain. *Experimental and Applied Acarology*, 79(2), 267-278. <https://doi.org/10.1007/s10493-019-00426-9>
- RENAVE. Informe epidemiológico sobre la situación de la fiebre exantemática mediterránea en España. Años 2019, 2020 y 2021. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. CIBERESP.
- RENAVE. Informe epidemiológico sobre la situación de la fiebre exantemática mediterránea en España. Año 2022. Centro Nacional de Epidemiología. Instituto de Salud Carlos III. CIBERESP.

- Sahni, A., Fang, R., Sahni, S. K., y Walker, D. H. (2019). Pathogenesis of Rickettsial Diseases: Pathogenic and Immune Mechanisms of an Endotheliotropic Infection. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 14, 127-152. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012800>
- Sahni, S. K., y Rydkina, E. (2009). Host-cell interactions with pathogenic *Rickettsia* species. *Future Microbiology*, 4(3), 323-339. <https://doi.org/10.2217/fmb.09.6>
- Santibáñez, S., Portillo, A., Ibarra, V., Santibáñez, P., Metola, L., García-García, C., Palomar, A. M., Cervera-Acedo, C., Alba, J., Blanco, J. R., y Oteo, J. A. (2022). Epidemiological, Clinical, and Microbiological Characteristics in a Large Series of Patients Affected by *Dermacentor*-Borne Necrosis-Erythema-Lymphadenopathy from a Unique Centre from Spain. *Pathogens*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/pathogens11050528>
- Silva-Pinto, A., de Lurdes Santos, M., & Sarmiento, A. (2014). Tick-borne lymphadenopathy, an emerging disease. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 5(6), 656–659. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.04.016>
- Teyssie, N., Boudier, J.-A., y Raoult, D. (1995). *Rickettsia conorii* Entry into Vero Cells. *Infection and Immunity*, 63(1), 366-374. <https://doi.org/10.1128/iai.63.1.366-374.1995>
- Voordouw, M. J. (2015). Co-feeding transmission in Lyme disease pathogens. *Parasitology*, 142(2), 290-302. <https://doi.org/10.1017/S0031182014001486>
- Wächter, M., Pfeffer, M., Schulz, N., Balling, A., Chirek, A., Bach, J. P., Moritz, A., Kohn, B., Pachnicke, S., & Silaghi, C. (2015). Seroprevalence of spotted fever group rickettsiae in dogs in Germany. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 15(3), 191-194. <https://doi.org/10.1089/vbz.2014.1715>
- Walker, D. H., Olano, J. P., y Feng, H. M. (2001). Critical role of cytotoxic T lymphocytes in immune clearance of rickettsial infection. *Infection and Immunity*, 69(3), 1841-1846. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.3.1841-1846.2001>
- Walker, D. H., Valbuena, G. A., y Olano, J. P. (2003). Pathogenic mechanisms of diseases caused by *Rickettsia*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 990. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb07331.x>
- Zemtsova, G. E., Apanaskevich, D. A., Reeves, W. K., Hahn, M., Snellgrove, A., y Levin, M. L. (2016). Phylogeography of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato and its relationships with climatic factors. *Experimental and Applied Acarology*, 69(2), 191-203. <https://doi.org/10.1007/s10493-016-0035-4>