



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TESIS DOCTORAL

Título
Trobicúlidos y trombiculiasis en La Rioja
Autor/es
Paula Santibáñez Sáenz
Director/es
José Antonio Oteo Revuelta y Aránzazu Portillo Barrio
Facultad
Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e Informática
Titulación
Departamento
Agricultura y Alimentación
Curso Académico
2014-2015



Trobicúlidos y trombiculiasis en La Rioja, tesis doctoral de Paula Santibáñez Sáenz, dirigida por José Antonio Oteo Revuelta y Aránzazu Portillo Barrio (publicada por la Universidad de La Rioja), se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported. Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

© El autor
© Universidad de La Rioja, Servicio de Publicaciones, 2015
publicaciones.unirioja.es
E-mail: publicaciones@unirioja.es

TROMBICÚLIDOS Y TROMBICULIASIS EN LA RIOJA



Tesis doctoral

Paula Santibáñez Sáenz

2015



TESIS DOCTORAL

Trombicúlidos y trombiculiasis en La Rioja

Trombiculid mites and trombiculiasis in La Rioja

Memoria presentada para aspirar al título de Doctor con la Mención de “Doctor Internacional” por la Universidad de La Rioja

Paula Santibáñez Sáenz

2015



Don José Antonio Oteo Revuelta, Doctor en Medicina y Cirugía, y Jefe del Departamento de Enfermedades Infecciosas del Hospital San Pedro - Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR).

Doña Aránzazu Portillo Barrio, Doctora en Ciencias Biológicas, y Responsable del Laboratorio de Patógenos Especiales del Departamento de Enfermedades Infecciosas del Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR).

Por la presente declaran que:

La memoria titulada **“Trombicúlidos y Trombiculiasis en La Rioja”**, que presenta Dña. Paula Santibáñez Sáenz, Licenciada en Ciencias Biológicas y en Bioquímica, ha sido realizada en el Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR) bajo su dirección y reúne las condiciones específicas para optar al grado de Doctor con la mención de “Doctor Internacional”.

Lo que hacen constar en Logroño, a 4 de junio de 2015.

Fdo.: Dr. José A. Oteo Revuelta

Fdo.: Dra. Aránzazu Portillo Barrio

ÍNDICE

Abreviaturas	i
Tablas	iii
Figuras	v
RESUMEN	ix
INTRODUCCIÓN	1
1. UN POCO DE HISTORIA	3
2. LOS TROMBICÚLIDOS	4
2.1. CICLO BIOLÓGICO Y MORFOLOGÍA	4
2.2. DISTRIBUCIÓN	9
2.3. PROCESO DE ALIMENTACIÓN DE LAS LARVAS	13
3. LOS TROMBICÚLIDOS COMO PARÁSITOS DE ANIMALES	17
4. LOS TROMBICÚLIDOS COMO VECTORES DE ENFERMEDADES	18
4.1. TIFUS DE LOS MATORRALES.....	18
4.2. OTRAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS ASOCIADAS A LOS TROMBICÚLIDOS.....	22
5. LOS TROMBICÚLIDOS Y LA DERMATITIS	24
6. LOS TROMBICÚLIDOS EN ESPAÑA	29
OBJETIVOS	31
MATERIAL Y MÉTODOS	35
1. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS.....	37
1.1 MUESTREOS DE LARVAS DE TROMBICÚLIDOS DE LA VEGETACIÓN	37
1.1.1. ÉPOCA Y LUGAR.....	37
1.1.2. TÉCNICAS DE RECOGIDA	39
1.1.2.1. Arrastre	39
1.1.2.2. Captura directa.....	41
1.1.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	42
1.2. MUESTREOS DE LARVAS DE TROMBICÚLIDOS EN AVES.....	43
1.2.1. ÉPOCA Y LUGAR.....	43
1.2.2. TÉCNICA DE RECOGIDA	43
1.2.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.....	44
1.3. MUESTREOS DE ESTADIOS POST-LARVARIOS DE TROMBICÚLIDOS EN EL SUELO.....	44

1.3.1. ÉPOCA Y LUGAR	44
1.3.2. TÉCNICA DE RECOGIDA Y EXTRACCIÓN DE LA EDAFOFAUNA	45
1.3.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS	45
2.1. LARVAS DE TROMBICÚLIDOS.....	47
2.2. ESTADIOS POST-LARVARIOS DE TROMBICÚLIDOS.....	47
3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	48
3.1. EXTRACCIÓN DE ADN.....	48
3.2. CUANTIFICACIÓN DE ADN.....	49
3.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	49
3.3.1. IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE LARVAS DE TROMBICÚLIDOS	51
3.3.2. DETECCIÓN DE BACTERIAS EN LARVAS DE TROMBICÚLIDOS	54
3.3.2.1. ARNr 16S universal de bacterias	54
3.3.2.2. <i>Rickettsia</i> spp.	54
3.3.2.3. <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	56
3.3.2.4. <i>Borrelia</i> spp.....	57
3.3.2.5. <i>Coxiella burnetii</i>	58
3.3.2.6. <i>Bartonella</i> spp.	59
3.3.2.7. <i>Orientia tsutsugamushi</i>	60
3.4. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA	61
3.5. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS POSITIVOS	61
3.6. INCORPORACIÓN DE SECUENCIAS A LA BASE DE DATOS GENBANK.....	62
4. DESCRIPCIÓN DE CASOS HUMANOS Y CANINOS	63
4.1. CASOS HUMANOS.....	63
4.2. CASOS CANINOS	64
RESULTADOS	65
1. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS	67
1.1. MUESTREOS DE LARVAS DE TROMBICÚLIDOS EN VEGETACIÓN.....	67
1.1.1. AÑO 2008	69
1.1.2. AÑO 2009	71
1.1.3. AÑO 2010	72
1.2. MUESTREOS DE LARVAS DE TROMBICÚLIDOS EN AVES	77
1.3. MUESTREOS DE ESTADIOS POST-LARVARIOS DE TROMBICÚLIDOS EN EL SUELO.....	79
2. CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA	80
2.1 LARVAS DE TROMBICÚLIDOS.....	80

2.1.1. LARVAS RECOGIDAS DE LA VEGETACIÓN	80
2.1.2. LARVAS RETIRADAS DE AVES	82
2.2. ESTADIOS POST-LARVARIOS DE TROMBICÚLIDOS	85
3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	86
3.1 IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE LARVAS DE TROMBICÚLIDOS	86
3.1.1. LARVAS RECOGIDAS DE LA VEGETACIÓN	86
3.1.2. LARVAS RETIRADAS DE AVES	86
3.2. DETECCIÓN DE BACTERIAS EN LARVAS DE TROMBICÚLIDOS	87
3.2.1. LARVAS RECOGIDAS DE LA VEGETACIÓN	87
3.2.2. LARVAS RETIRADAS DE AVES	88
3.3. SECUENCIAS INTRODUCIDAS EN GENBANK	89
3.3.1. SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DE <i>Neotrombicula inopinata</i> (GEN <i>COI</i>).	89
3.3.2. SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DE BACTERIAS NO CULTIVADAS EN <i>Neotrombicula inopinata</i> (GEN <i>gltA</i>).....	91
4. CASOS HUMANOS.....	97
4.1. INCORPORACIÓN AL ESTUDIO	97
4.1.1. AÑO 2008.....	97
4.1.2. AÑO 2009.....	100
4.1.3. AÑO 2010.....	103
4.2. DESCRIPCIÓN DEL CUADRO CLÍNICO.....	107
5. CASOS CANINOS	116
5.1. INCORPORACIÓN AL ESTUDIO	116
5.1.1. AÑO 2008.....	116
5.1.2. AÑO 2009.....	118
5.1.3. AÑO 2010.....	120
5.2. DESCRIPCIÓN DEL CUADRO CLÍNICO.....	126
6. MAPA DE DISTRIBUCIÓN DE LOS TROMBICÚLIDOS Y LA TROMBICULIASIS EN LA RIOJA	128
DISCUSIÓN	129
CONCLUSIONES.....	151
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	155
ANEXO I.....	175
ANEXO II	179

ANEXO III..... 183

ANEXO IV 187

ANEXO V..... 191

ANEXO VI..... 197

Abreviaturas

°C	Grados centígrados
µg/ml	Microgramo/mililitro
µl	Microlitro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNmt	Ácido ribonucleico mitocondrial
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CIBIR	Centro de Investigación Biomédica de La Rioja
cm	Centímetro
cm³	Centímetro cúbico
DEET	Dietil-meta-toluamida
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EE.UU.	Estados Unidos
g/l	Gramos/Litro
g/ml	Gramo/mililitro
h	Horas
kDa	Kilodalton
kb	Kilobase
km²	Kilómetro cuadrado
m	Metro
m²	Metro cuadrado
min	Minutos
ml	Mililitros

mm	milímetro
mM	Milimolar
N	Norte
n, n°	Número
ng	Nanogramos
ng/μl	Nanogramos/microlitro
nm	Nanómetro
O	Oeste
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
pmol	Picomoles
pmol/μl	Picomoles/microlitro
p/V	Peso/volumen
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
S	Svedberg
S. C. P.	Sociedad civil privada
S. L.	Sociedad limitada
s.l.	<i>Sensu lato</i>
TBE	Tris Borato EDTA
U/μl	Unidades/microlitro
ZEPA	Zona de especial protección para las aves

Tablas

Tabla 1. Clasificación taxonómica de los trombicúlidos.	4
Tabla 2. Distribución y enfermedades causadas por las principales especies de trombicúlidos..	10
Tabla 3. Componentes de la reacción de PCR, concentración y volumen de cada uno de ellos.	50
Tabla 4. Secuencias nucleotídicas de los cebadores de PCR, condiciones de amplificación y tamaños de los amplicones utilizados para la identificación genética.	51
Tabla 5. Secuencia nucleotídica de los cebadores de PCR y condiciones de amplificación del gen ARNr 16S universal de bacterias.	54
Tabla 6. Secuencia nucleotídica de los cebadores de PCR y condiciones de amplificación de los genes <i>ompA</i> , <i>ompB</i> , <i>gltA</i> y <i>htrA</i> del género <i>Rickettsia</i>	55
Tabla 7. Secuencia nucleotídica de los cebadores de PCR y condiciones de amplificación para <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	57
Tabla 8. Secuencia nucleotídica de los cebadores de PCR y condiciones de amplificación de <i>Borrelia</i> spp.	58
Tabla 9. Secuencia nucleotídica de los cebadores de PCR y condiciones de amplificación de <i>Coxiella burnetii</i>	59
Tabla 10. Secuencia nucleotídica de los cebadores de PCR y condiciones de amplificación de <i>Bartonella</i> spp.	59
Tabla 11. Secuencia nucleotídica de los cebadores de PCR y condiciones de amplificación de <i>Orientia tsutsugamushi</i>	60
Tabla 12. Larvas de trombicúlidos recogidas en los muestreos realizados durante 2008.	70
Tabla 13. Larvas de trombicúlidos recogidas en los muestreos realizados durante 2009.	71

Tabla 14. Larvas de trombicúlidos recogidas en los muestreos realizados durante 2010.	73
Tabla 15. Larvas de trombicúlidos recogidas en zonas de interés, excluida La Pineda.	76
Tabla 16. Larvas de trombicúlidos y grado de engorde de las mismas recogidas de cada ejemplar de ave en los anillamientos.	78
Tabla 17. Datos de los muestreos de estadios post-larvarios de trombicúlidos en el suelo.	79
Tabla 18. Medidas estándar de las larvas de <i>Neotrombicula inopinata</i> clasificadas en este estudio.	84
Tabla 19. Datos de los casos humanos extraídos de las encuestas clínico-epidemiológicas realizadas durante 2008.	98
Tabla 20. Datos de los casos humanos extraídos de las encuestas clínico-epidemiológicas realizadas durante 2009.	101
Tabla 21. Datos de los casos humanos extraídos de las encuestas clínico-epidemiológicas realizadas durante 2010.	104
Tabla 22. Localización de las picaduras según la actividad desarrollada durante la parasitación en los pacientes recogidos en este estudio.	107
Tabla 23. Datos de los casos caninos extraídos de las encuestas realizadas durante 2008.	117
Tabla 24. Datos de los casos caninos extraídos de las encuestas realizadas durante 2009.	119
Tabla 25. Datos de los casos caninos extraídos de las encuestas realizadas durante 2010.	121
Tabla 26: Porcentajes de identidad de las secuencias nucleotídicas obtenidas en este estudio.	142

Figuras

Figura 1. Morfología de los trombicúlidos (<i>Eutrombicula alfreddugesi</i>).....	6
Figura 2. Ciclo biológico de <i>Leptotrombidium pallidum</i>	7
Figura 3. Larvas de trombicúlidos en la vegetación.	9
Figura 4. a) Etapas iniciales de la formación del estilostoma. b) Estilostoma totalmente formado.	14
Figura 5. Zona endémica del tifus de los matorrales, conocida como triángulo de tsutsugamushi.....	19
Figura 6. a) <i>Leptotrombidium deliense</i> . b) <i>Leptotrombidium pallidum</i>	20
Figura 7. Escara y eritema el quinto día de enfermedad en el brazo izquierdo de un paciente.	21
Figura 8. Picaduras de trombicúlidos.....	27
Figura 9. Mapa de La Rioja con el Parque Natural Sierra Cebollera en azul, y ortofoto del paraje de La Pineda.	37
Figura 10. Paraje de La Pineda.	38
Figura 11. a) Arrastre de la plantilla por el suelo durante un muestreo. b) Recogida de larvas de trombicúlidos de la plantilla.	39
Figura 12. Zona de muestreo en La Pineda, delimitada en azul. En rojo se detalla el punto fijo..	40
Figura 13. Trayectorias realizadas en los muestreos del método de arrastre.....	40
Figura 14. Grupo de larvas de trombicúlidos en el ápice de una rama.	41
Figura 15. Municipios donde se llevaron a cabo muestreos de larvas de trombicúlidos en la vegetación..	42
Figura 16. Trombicúlidos recogidos a) a simple vista y b) con microscopio estereoscópico (0,8 x).	43
Figura 17. Retirada de larvas de trombicúlidos con la ayuda de a) una pinza y b) un hisopo.	44

Figura 18. Recogida de tierra para el estudio de fases post-larvarias de trombicúlidos.....	45
Figura 19. Embudos de Berlese-Tullgren empleados para la extracción de ácaros del suelo.....	46
Figura 20. a) Dípticos en el Centro de Salud de Ortigosa de Cameros. b) Cartel en La Venta de Piqueras (Lumbreras).	63
Figura 21. Grupos de larvas de trombicúlidos en la vegetación de La Pineda.....	69
Figura 22. Larvas de trombicúlidos recogidas en el punto fijo y en el punto variable mediante la técnica de arrastre durante 2008.....	71
Figura 23. Larvas de trombicúlidos recogidas en el punto fijo y en el punto variable mediante la técnica de arrastre durante 2009.....	72
Figura 24. Larvas de trombicúlidos recogidas en el punto fijo y en el punto variable mediante la técnica de arrastre durante 2010.....	74
Figura 25. Larvas de trombicúlidos recogidas mediante la técnica de arrastre en el punto fijo durante los tres años de muestreo (2008-2010).	75
Figura 26. Larvas de trombicúlidos recogidas mediante la técnica de arrastre en el punto variable durante los tres años de muestreo (2008-2010).	75
Figura 27. Mapa de La Rioja con los lugares donde se han encontrado larvas de trombicúlidos en la vegetación.....	76
Figura 28. a) Hayedo y b) Pinar, en Villavelayo. c) Rebollar en Fuente Tosca (Ocón). d) Bosque mixto en la Venta de Piqueras (Lumbreras).	77
Figura 29. Mapa de La Rioja con los lugares donde se han recogido larvas de trombicúlidos de aves.....	78
Figura 30. Larvas de trombicúlidos alimentándose en la zona de la cloaca de un petirrojo europeo (<i>Erithacus rubecula</i>) capturado en La Pineda.	79
Figura 31. Larva de <i>Neotrombicula inopinata</i> vista al microscopio óptico.....	80
Figura 32. a) Larva de <i>Neotrombicula inopinata</i> vista al microscopio óptico con óptica de contraste interdifereencial y b) Larva de <i>N. inopinata</i> vista al microscopio electrónico de barrido.	81

Figura 33. Vista dorsal (a), ventral (b), detalle del escudo (c) y detalle de las patas (d) de un ejemplar de <i>Neotrombicula inopinata</i>	82
Figura 34. Larva alimentada de <i>Neotrombicula inopinata</i> retirada de un ejemplar de petirrojo europeo (<i>Erithacus rubecula</i>).....	83
Figura 35. Adultos de <i>Neotrombicula inopinata</i>	85
Figura 36. Mapa de La Rioja con los lugares donde los pacientes afectados de trombiculiasis han sido picados por larvas de trombicúlidos.	108
Figura 37. Representación esquemática de las áreas corporales en las que se encontraron las lesiones cutáneas en los pacientes de trombiculiasis.....	109
Figura 38. Lesiones cutáneas observadas en pacientes con trombiculiasis.	115
Figura 39. Larvas de trombicúlidos adheridas al vientre de un perro.	122
Figura 40. Larvas de trombicúlidos alrededor del ojo de un perro.	123
Figura 41. Larvas de <i>Neotrombicula</i> spp. retiradas de un ejemplar de perro... ..	123
Figura 42. Mapa de La Rioja con los lugares donde se han recogido casos de trombiculiasis canina.....	126
Figura 43. Mapa de La Rioja con los lugares donde se han encontrado trombicúlidos.	128

RESUMEN

Resumen

Los trombicúlidos son ácaros de distribución mundial pertenecientes a la familia Trombiculidae. Algunos géneros tienen gran importancia en medicina humana y veterinaria. En América y Europa se asocian a cuadros clínicos de dermatitis pruriginosas estacionales (trombiculiasis). En el Sudeste Asiático e Islas del Pacífico son los vectores reconocidos del tifus de los matorrales. Su potencial papel en la transmisión de otras enfermedades infecciosas se desconoce. Los objetivos de este trabajo fueron: 1) Descripción de la epidemiología de la trombiculiasis en La Rioja; 2) Identificación del agente causal y su ciclo biológico; 3) Estudio de la presencia de *Rickettsia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia* spp., *Coxiella burnetii*, *Bartonella* spp. y *Orientia tsutsugamushi* en trombicúlidos y 4) Descripción clínica de la trombiculiasis en La Rioja. Nuestros datos han puesto de manifiesto la coincidencia de la estacionalidad de los cuadros de trombiculiasis humana y canina con la presencia de larvas de trombicúlidos en la vegetación de zonas definidas en La Rioja. Se ha descrito la presencia de *N. inopinata* por primera vez en España. La identificación de esta especie de trombicúlidos en la época y lugar donde se producían los casos de trombiculiasis, implica epidemiológicamente a *N. inopinata* como agente causal de esta afección. En la zona de estudio, se encontraron larvas de *N. inopinata* en la vegetación desde mediados de verano hasta finales de otoño. Los ejemplares adultos de esta misma especie se detectaron en el suelo durante la primavera. Las larvas de trombicúlidos retiradas de aves, potencialmente migratorias, se clasificaron también como *N. inopinata*. En nuestro medio, no tenemos evidencia de que los trombicúlidos estén infectados por *Rickettsia* spp., *A. phagocytophilum*, *Borrelia* spp., *C. burnetii*, *Bartonella* spp. ni *O. tsutsugamushi*. No obstante, su papel como causantes de trombiculiasis humanas y caninas ha de ser tenido en cuenta desde el punto de vista de la Salud Pública. En las personas, los trombicúlidos producen cuadros clínicos molestos de dermatitis muy pruriginosas, mientras que los perros sufren parasitaciones masivas con procesos graves que pueden llegar a ser fatales. La única medida de prevención eficaz es evitar el contacto con la vegetación en aquellas zonas donde se ha

documentado la presencia de trombicúlidos. Por tanto, se deben impulsar campañas que informen a la población del riesgo de sufrir trombiculiasis en La Rioja.

Abstract

Trombiculid mites, also known as chiggers, belong to Family Trombiculidae and are worldwide distributed. Some genera have medical and veterinary importance. In America and Europe they are associated with seasonal pruriginous dermatitis (trombiculiasis). In Southeast Asia and Pacific Islands they are recognized vectors of scrub typhus. The potential role of trombiculid mites in the transmission of other infectious diseases is unknown. The objectives of this study were: 1) Description of the epidemiology of trombiculiasis in La Rioja; 2) Identification of the etiological agent and study of its life cycle; 3) Investigation of the presence of *Rickettsia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia* spp., *Coxiella burnetii*, *Bartonella* spp. and *Orientia tsutsugamushi* in chiggers, and 4) Clinical characterization of trombiculiasis in La Rioja. Our data have shown the coincidence between the seasonality of human and canine cases of trombiculiasis and the presence of larvae over vegetation in well-defined areas from La Rioja. *N. inopinata* has been described for the first time in Spain. The identification of this trombiculid species in the same season and area where trombiculiasis cases occurred, epidemiologically involves *N. inopinata* as the etiological agent of this condition. In the studied area, *N. inopinata* larvae were detected over vegetation since mid-summer to the end of autumn. Furthermore, in spring, adult trombiculid mites belonging to the same species were found in the soil. Trombiculid larvae removed from potentially migratory birds were classified as *N. inopinata*. In our environment, there is no evidence of *Rickettsia* spp., *A. phagocytophilum*, *Borrelia* spp., *C. burnetii*, *Bartonella* spp. or *O. tsutsugamushi* infection in trombiculid larvae. Nevertheless, their role in human and canine trombiculiasis has to be taken into account as a Public Health concern. People parasitized with trombiculid mites suffer from very disturbing pruriginous dermatitis, whereas massive parasitation in dogs lead to severe clinical pictures reaching sometimes a fatal outcome. To avoid contact with vegetation in periods of time and areas where the presence of trombiculid larvae has been documented is the only effective preventive measure against trombiculiasis. Therefore, preventive strategies to inform the population about the risk of trombiculiasis in La Rioja should be established.

INTRODUCCIÓN

1. UN POCO DE HISTORIA

Etimológicamente, las palabras trombicúlido y trombiculosis o trombiculiasis tienen sus raíces en el griego *tromein*, que significa temblar. Así, trombicúlido viene de *tromein* y del latín *culex* (mosquito), mientras que trombiculosis deriva de *tromein* y el sufijo griego *osis* (afección) (Fernández-Rubio, 1999).

Las primeras referencias a estos ácaros como causa de “molestias” se recopilaron en China en el siglo VI (Bowman *et al.*, 2008). Tuvieron que pasar 12 siglos hasta que en 1733, en Norte América, se recogieran por primera vez trombicúlidos durante estudios faunísticos. En 1758, Linnaeus hizo la primera descripción de la especie *Acarus batatas* (actualmente *Eutrombicula batatas*) en *Systema Naturae* (Shatrov y Kudryashova, 2006). Unos años más tarde se definió en Europa una segunda especie “que pica al hombre”, *Acarus autumnalis* (Brennan y Goff, 1977). Aunque el género *Trombicula*, que contenía 6 especies, se definió en 1905, la familia Trombiculidae fue descrita por primera vez por Ewing en 1944 (Stekolnikov y Daniel, 2012).

Se podría decir que el interés por los trombicúlidos no surgió hasta la Segunda Guerra Mundial. Durante la misma, miles de soldados de las tropas aliadas y japonesas resultaron afectados del tifus de los matorrales, afección transmitida por la picadura de trombicúlidos. De hecho, cientos de ellos fallecieron durante las campañas militares en zonas del Pacífico (Brennan y Goff, 1977). La enfermedad fue nombrada y descrita por primera vez en Japón por Baelz y Kawakamien en 1979 (Takahashi *et al.*, 2003; Valbuena y Walker, 2012). Sin embargo, los avances con respecto a la taxonomía y biología de estos ácaros no se produjeron hasta los años 50 del siglo XX, cuando su importancia médica fue mundialmente reconocida. Desde entonces hasta nuestros días, se han descrito nuevas especies de estos ácaros, y se conoce mejor su distribución y las enfermedades que provocan.

2. LOS TROMBICÚLIDOS

Los trombicúlidos son ácaros de distribución mundial pertenecientes a la familia Trombiculidae (Tabla 1) (Burns, 2009). El número de especies conocidas supera las 3.000 (Brennan y Goff, 1977), entre las que se encuentran algunas con gran importancia para la salud humana. Éste es el caso de los géneros *Leptotrombidium*, vectores de *Orientia tsutsugamushi*, agente causal del tifus de los matorrales, o *Eutrombicula* y *Neotrombicula*, responsables de cuadros de dermatitis (Mullen y O'Connor, 2002).

Tabla 1. Clasificación taxonómica de los trombicúlidos.

Filo	Arthropoda
Subfilo	Chelicerata
Clase	Arachnida
Subclase	Acari
Superorden	Acariformes
Orden	Trombidiformes
Suborden	Prostigmata
Cohorte	Parasitengona
Superfamilia	Trombiculoidea
Familia	Trombiculidae

2.1. CICLO BIOLÓGICO Y MORFOLOGÍA

El ciclo biológico de los trombicúlidos comprende 7 estadios: huevo, prelarva, larva, protoninfa, deutoninfa, tritoninfa y adulto, con alternancia de fases activas e inactivas.

Los ácaros de la familia Trombiculidae son los únicos de la cohorte Parasitengona que durante su fase larvaria parasitan hospedadores vertebrados (Shatrov y Kudryashova, 2006). Conocidas en la literatura científica como *chiggers*, las larvas de trombicúlidos parasitan un amplio rango de vertebrados y son capaces de transmitir patógenos o provocar dermatitis cuando pican. Sin embargo, las fases post-larvarias son de vida libre, habitan en el suelo y se alimentan de diversos artrópodos y de sus huevos. Las deutoninfas, único estadio ninfal activo,

son casi idénticas en apariencia a los adultos, aunque ligeramente más pequeñas. En los adultos, de ocho patas, el dimorfismo sexual no es evidente, al menos aparentemente (Kampen, 2000; Shatrov y Kudryashova, 2006). Debido a que los estadios post-larvarios de la mayoría de las especies de trombicúlidos no han sido nunca observados en la superficie del suelo, la taxonomía de estos ácaros está basada en las larvas (Mağkol *et al.*, 2010).

Las larvas, de 6 patas, forma redondeada y pequeño tamaño (aproximadamente 200 μm), son generalmente rojas, aunque pueden variar entre anaranjadas y amarillentas según la especie (Mullen y O'Connor, 2002). Las principales características morfológicas de las larvas (ver figura 1) incluyen la presencia de un único escudo dorsal, posterior al margen frontal del idiosoma que alberga un par de tricobotrias (setas sensoriales) y 4-7 setas ramificadas táctiles y mecanoreceptoras; quelíceros cortos; coxas I y II unidas; la presencia y posición del órgano de Claparede (con función sensorial) en el margen postero-lateral de la coxa I; un número específico de setas en los segmentos de los pares de patas I-III; dos uñas y empodio en los tarsos de las patas; presencia de solenidios, un número variado de setas ramificadas, y a veces setas subterminales lisas en el tarso de los palpos; un número constante 1-1-3 de setas en el trocánter, gena y tibia del palpo, respectivamente; y setas del idiosoma, normalmente organizadas en filas uniformes (Shatrov y Kudryashova, 2006).

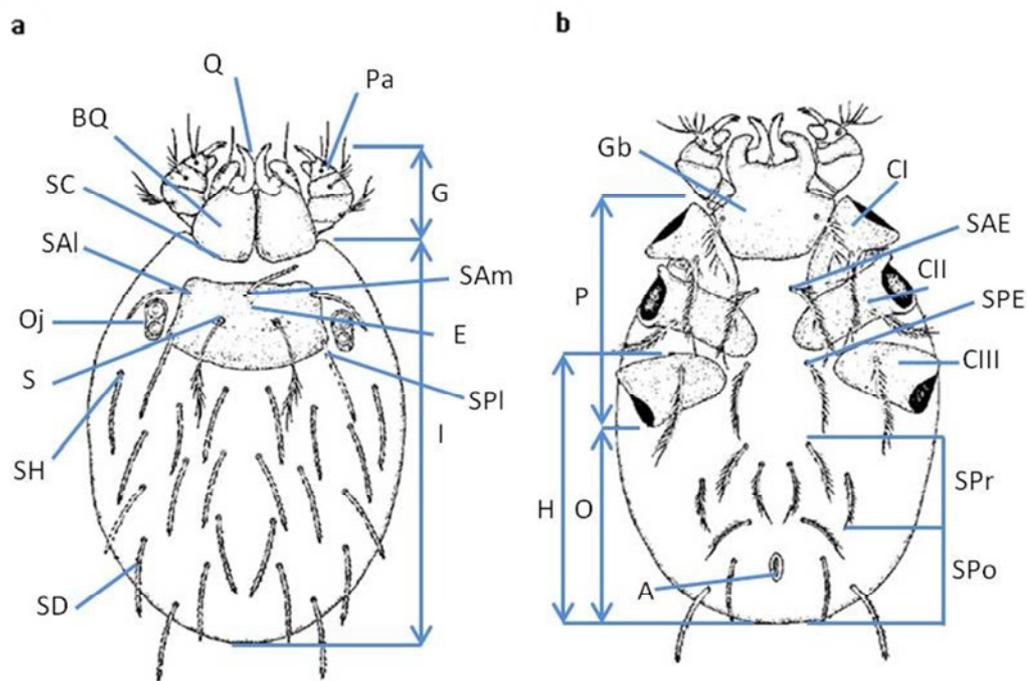


Figura 1. Morfología de los trombicúlidos (*Eutrombicula alfreddugesi*). a) Vista dorsal. G: gnatosoma, I: idiosoma, BQ: base de los quelíceros, Q: quelíceros Pa: palpos, SAm: Seta anteromediana, E: escudo, SPI: Seta posterolateral, SD: seta dorsal del idiosoma, SH: setas humerales, S: sensilias, Oj: ojos, SAI: Seta anterolateral, SC: surco circumcapitular. b) Vista ventral. H: histerosoma, P: podosoma, O: opistosoma, Gb: base del gnatosoma, CI: coxa I, SAE: seta anterior del esternón, CII: coxa II, SPE: seta posterior del esternón, CIII: coxa III, SPPr: setas pre-anales, SPo: setas post-anales, A: ano, Adaptado de Goff *et al.*, 1982.

La biología de los trombicúlidos ha sido estudiada principalmente en el laboratorio debido a la complejidad del ciclo biológico, por lo que, aún hoy, éste no es bien conocido en la naturaleza. Como ya se ha dicho anteriormente, los hábitats de las fases post-larvianas son mayoritariamente desconocidos. De hecho sólo se conocen las fases post-larvianas de menos del 10% de las especies de trombicúlidos descritas (Brennan y Goff, 1977; Shatrov, 2011).

La característica más destacable de su ciclo biológico es la duración constante de los periodos inactivos (prelarva, protoninfa y tritoninfa), y la duración variable de las fases activas (larva, deutoninfa y adulto) (Figura 2). Durante su ciclo biológico las hembras depositan los huevos en las capas superiores de la tierra, preferiblemente sobre hojarasca, en suelos húmedos pero bien drenados. Los huevos eclosionan y emergen las larvas, que trepan por la vegetación baja donde

esperan agrupadas a un hospedador adecuado. Una vez alcanzado el hospedador, se dirigen hacia aquellas zonas donde la piel es más fina, donde se alimentan de linfa y fluidos tisulares de la dermis a través de una especie de tubo (estilostoma) que se forma en la piel del hospedador. La alimentación puede durar desde unas horas hasta 10 días. Una vez repletas, requisito indispensable para alcanzar el siguiente estadio, las larvas caen al suelo y mudan a las fases ninfales y posteriormente, a la fase adulta (Mullen y O'Connor, 2002; Shatrov y Kudryashova, 2006).

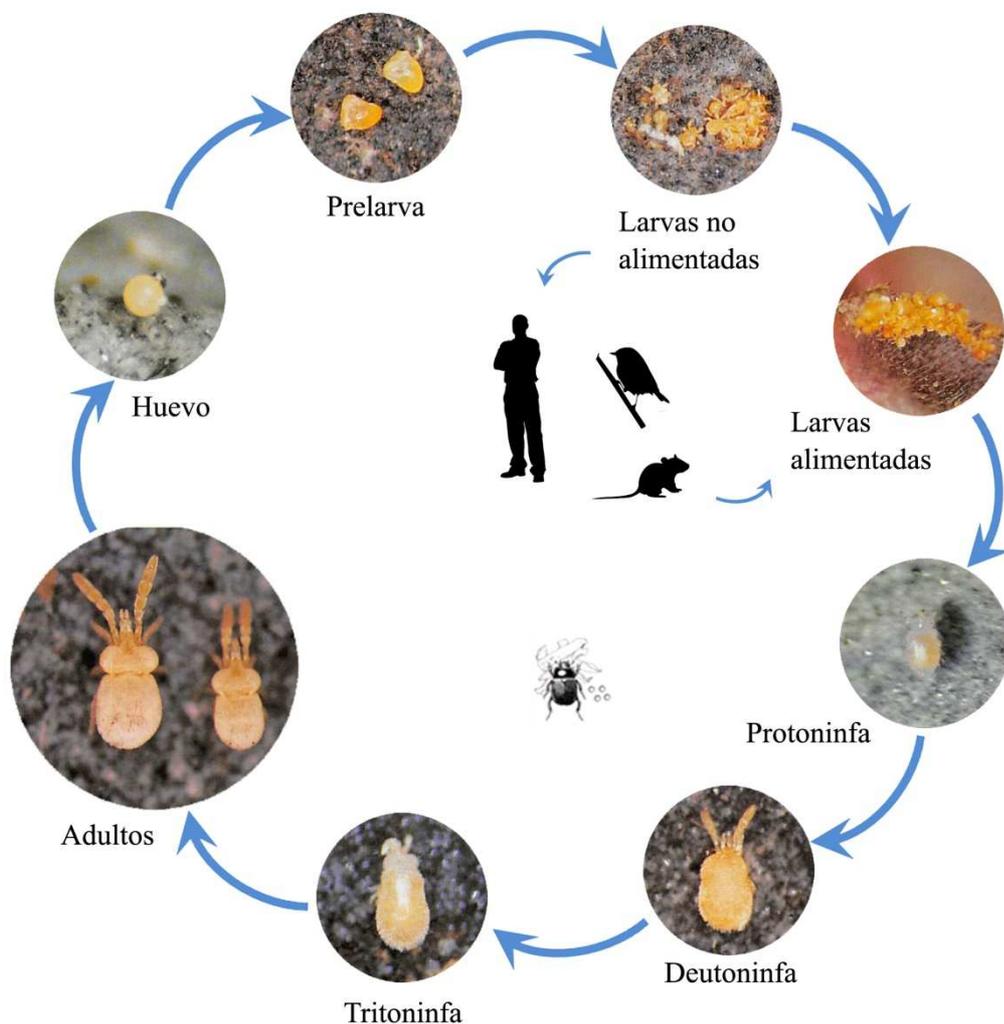


Figura 2. Ciclo biológico de *Leptotrombidium pallidum*. Adaptado de Takahashi *et al.*, 2003.

En la naturaleza, el ciclo biológico se completa en 2-12 meses o más, dependiendo de las especies y condiciones ambientales. Así, se ha visto que en las especies boreales el ciclo dura entre 150 y 400 días, en zonas templadas puede haber entre 1 y 3 generaciones al año, y en zonas tropicales el ciclo es más corto y tiene lugar de forma continua a lo largo del año (Mullen y O'Connor, 2002; Shatrov y Kudryashova, 2006). La mayoría de especies tienen una generación por año, pero las generaciones se van superponiendo, cada una bien sincronizada con las estaciones. Esto sucede debido a su capacidad de hibernar durante la mayoría de los estadios (huevo, larva, deutoninfa y adulto), y a que los adultos tienen un periodo de vida largo (Belozarov, 2010).

Los trombicúlidos viven en suelos húmedos de bosques cubiertos con vegetación arbustiva donde habitan potenciales hospedadores (Moss y Beeching, 2003). En la vegetación las larvas forman “focos o islas”, dando lugar a una distribución parcheada. Estas “islas de trombicúlidos” están claramente definidas espacialmente, de tal manera que las larvas se acumulan en ellas mientras que las zonas limítrofes están totalmente libres de ellas (Kampen, 2002; Schöler *et al.*, 2006). Además, las larvas se organizan en cúmulos, pudiendo encontrar decenas e incluso más de un centenar de individuos sólo en un ápice de la vegetación (Figura 3). De ahí que al contacto con la vegetación infestada, las parasitaciones resulten masivas.



Figura 3. Larvas de trombicúlidos en la vegetación. Aportación original.

2.2. DISTRIBUCIÓN

Los trombicúlidos tienen una distribución mundial, aunque la mayor diversidad de especies se encuentra en zonas tropicales, subtropicales y las zonas templadas más septentrionales (Moniuszko y Małol, 2014). En la tabla 2 se enumeran las principales especies de trombicúlidos y su distribución geográfica. Dada su amplia distribución, reciben diferentes nombres comunes según la zona en la que habitan, y en ocasiones son confundidos con otros ácaros o insectos y se les denomina incorrectamente ácaros de Mower [*Leptus autumnalis* (Acari: Erythraeidae)] (McClain *et al.*, 2009; Ken *et al.*, 2014) o *jigger*, *chigoe* o niguas [*Tunga penetrans* (Insecta: Siphonaptera)] (Elston, 2006; Witt *et al.*, 2004).

Tabla 2. Distribución y enfermedades causadas por las principales especies de trombicúlidos (Rozendaal, 1997; Mullen y O'Connor, 2002; White, 2003; Takahashi *et al.*, 2004; Ripka y Stekolnikov, 2006; Burns, 2009; Kim y Walker, 2011; Lee *et al.*, 2011; Shatrov, 2011; Stekolnikov y Daniel, 2012; Faccini-Martínez *et al.*, 2014; Kim *et al.*, 2014; Stekolnikov *et al.*, 2014).

Especie	Distribución	Enfermedad
<i>Blankaartia acuscutellaris</i>	Hungría, España, Moldavia, Ucrania, Rusia, Sumatra, Malasia, África	Trombiculiasis
<i>Eushoengastia koreaensis</i>	Corea	Tifus de los matorrales ¹
<i>Euschoengastia xerothermobia</i>	Europa	Trombiculiasis
<i>Eutrombicula alfreddugesi</i>	Canadá, sur de Estados Unidos (excepto suroeste), América Central (incluidas las Islas del Caribe), Suramérica	Trombiculiasis
<i>Eutrombicula batatas</i>	Bolivia, Méjico, América Central, Suramérica, suroeste y sudeste de Estados Unidos	Trombiculiasis
<i>Eutrombicula lipovskyi</i>	Estados Unidos: desde Alabama y oeste de Tennessee hasta Arkansas, Oklahoma, Kansas	Trombiculiasis
<i>Eutrombicula sarcina</i>	Sudeste asiático, Australia, Islas del Pacífico	Trombiculiasis
<i>Eutrombicula splendens</i>	Este de Estados Unidos (desde la costa del Golfo hasta Massachusetts y Minnesota), Ontario	Trombiculiasis
<i>Eutrombicula wichmanni</i>	Japón, sudeste asiático, Australia, Islas del Pacífico	Trombiculiasis
<i>Kepkatrombicula desaleri</i>	Italia, Austria, Bulgaria	Trombiculiasis
<i>Leptotrombidium akamushi</i>	Japón, China, sudeste asiático, Indonesia, Filipinas, Nueva Guinea	Tifus de los matorrales
<i>Leptotrombidium arenicola</i>	Malasia, Indonesia, Tailandia	Tifus de los matorrales
<i>Leptotrombidium chiangraiensis</i>	Tailandia	Tifus de los matorrales
<i>Leptotrombidium deliense</i>	China, Taiwán, Sri Lanka, Nepal, Bangladesh, India, Myanmar, Vietnam, Camboya, Tailandia, Singapur, Brunei, Malasia, Indonesia, Filipinas, Nueva Guinea, Islas del Pacífico surorientales, norte de Australia, Pakistán, Kazakstán, Uzbekistán, Afganistán	Tifus de los matorrales

Especie	Distribución	Enfermedad
<i>Leptotrombidium fletcheri</i>	Sudeste asiático, Malasia, Nueva Guinea, Filipinas, Indonesia, Melanesia	Tifus de los matorrales
<i>Leptotrombidium fuji</i>	Japón	Tifus de los matorrales ¹
<i>Leptotrombidium gaohuensis</i>	China	Tifus de los matorrales
<i>Leptotrombidium imphalum</i>	Tailandia	Tifus de los matorrales
<i>Leptotrombidium intermedium</i>	Japón	Tifus de los matorrales ¹
<i>Leptotrombidium kitasatoi</i>	Japón	Tifus de los matorrales ¹
<i>Leptotrombidium orientale</i>	Japón, Corea, extremo oriental de Rusia	Tifus de los matorrales ¹
<i>Leptotrombidium pallidum</i>	Japón, Corea, extremo oriental de Rusia	Tifus de los matorrales ¹
<i>Leptotrombidium palpale</i>	Japón, Corea, extremo oriental de Rusia	Tifus de los matorrales ¹
<i>Leptotrombidium pavlovsky</i>	Japón, Corea, extremo oriental de Rusia	Tifus de los matorrales
<i>Leptotrombidium scutellare</i>	Japón, norte de China, Corea, Tailandia, Malasia	Tifus de los matorrales Hantavirus ¹
<i>Leptotrombidium subquadratum</i>	Sudáfrica	Trombiculiasis
<i>Neotrombicula autumnalis</i>	Europa (incluyendo las Islas Británicas, y excluyendo Noruega, Suecia, Finlandia y el norte de Rusia), Turquía, Turkmenistán	Trombiculiasis
<i>Neotrombicula inopinata</i>	España*, República Checa, Inglaterra, Austria, Alemania, Bulgaria, Francia, estados de la antigua Yugoslavia, Ucrania, Rusia, Rumanía, Hungría, Eslovaquia, Polonia	Trombiculiasis
<i>Neotrombicula japonica</i>	Corea, Europa	Trombiculiasis ¹ Tifus de los matorrales ¹
<i>Neotrombicula nagayoi</i>	Japón, China, Rusia	Trombiculiasis
<i>Neotrombicula zachvatkini</i>	Europa	Trombiculiasis
<i>Odontacarus</i> spp.	Sudeste asiático, Australia, Islas del Pacífico	Trombiculiasis
<i>Shoengastia hanmyaensis</i>	Japón	Tifus de los matorrales ¹
<i>Schoengastia</i> spp.	Sudeste asiático, Australia, Islas del Pacífico	Trombiculiasis
<i>Trombicula toldti</i>	Austria	Trombiculiasis

¹: no confirmado. *: resultado de este trabajo.

Alrededor de 50 especies de trombicúlidos pican frecuentemente al hombre causándole enfermedad (Mullen y O'Connor, 2002; Arlian, 2009). El género *Leptotrombidium* es el más estudiado, debido a que sus larvas son las responsables de la transmisión de *O. tsutsugamushi*, el agente causal del tifus de los matorrales. Como se detalla más adelante, este género está ampliamente distribuido por el sudeste asiático y las Islas del Pacífico surorientales. Estos trombicúlidos habitan en los márgenes de bosques y valles de ríos, y en campos de cultivo abandonados. Sus principales hospedadores naturales son roedores de los géneros *Rattus*, *Microtus* y *Apodemus*, aunque también parasitan insectívoros, marsupiales, ganado, perros y gatos (Mullen y O'Connor, 2002).

Eutrombicula alfreddugesi es la especie más común y extendida en el hemisferio occidental, desde Canadá hasta Argentina y en las Islas del Caribe. En América del Norte se le conoce como *red bug*, *red mite* o *berry mites*, siendo especialmente popular en el sudeste de Estados Unidos (McClain *et al.*, 2009; Ken *et al.*, 2014). En Méjico se le conoce como *tlalzahuatl* y en otras partes de Suramérica como “coloradilla” o “bicho colorao”, entre otros (Beltrán *et al.*, 2009). Son especialmente abundantes en áreas con arbustos y matorrales de moras y zarzamoras (*Rubus* spp.), en los márgenes de pantanos y zonas de transición entre bosques y campo abierto o praderas. Sus larvas parasitan una gran variedad de anfibios, reptiles, aves y mamíferos entre finales de verano y principios de otoño en las zonas más templadas, mientras que están presentes todo el año en las zonas tropicales y subtropicales, incluyendo Florida. Aunque esta especie es la causa más común de trombiculiasis (o trombidiosis) en el Nuevo Mundo, no ha sido involucrado en la transmisión de ningún patógeno humano (Mullen y O'Connor, 2002; Burns, 2009).

La especie *Eutrombicula splendens* constituye una causa frecuente de dermatitis en el este de Estados Unidos, sobre todo en el sudeste, donde es sólo superada en número de casos por *E. alfreddugesi*. *E. splendens* es especialmente abundante en zonas húmedas como pantanos y zonas de altitud baja con tocones podridos y árboles caídos. Las larvas parasitan anfibios, reptiles, aves y mamíferos, pero muestran preferencia por serpientes y tortugas como hospedadores naturales. Su estacionalidad es similar a la de *E. alfreddugesi* (Mullen y O'Connor, 2002).

Neotrombicula autumnalis, conocida como ácaro de la cosecha (en inglés, *harvest mite*) es la especie de trombicúlido que más comúnmente pica al hombre en Europa y las Islas Británicas (Brennan y Goff, 1977). También se le conoce como *aoutat* o *bête rouge* en Francia, *orange tawny* en Irlanda y *augustelingen* en Alemania (White, 2003; Burns, 2009; Martens *et al.*, 2012). La mayoría de casos de trombiculiasis en Europa se han asociado a esta especie, y siempre entre finales de verano y otoño (Kampen, 2000; Guarneri *et al.*, 2005). En general, las larvas están presentes desde julio hasta el comienzo del invierno, y alcanzan el pico de abundancia normalmente en septiembre. Se ha visto que las larvas son más activas en días soleados y cálidos, y se encuentran tanto en zonas urbanas como en orillas de riachuelos y arroyos, zonas arbustivas y de matorrales, praderas y campos de cultivo de cereal (Schöler *et al.*, 2006). Su amplia distribución refleja la gran variedad de hospedadores naturales a los que parasita, especialmente mamíferos y aves. Los conejos son hospedadores muy comunes, también zorros, ardillas, micromamíferos, aves (silvestres y domésticas), mascotas y ganado (Mullen y O'Connor, 2002).

E. alfreddugesi y *E. batatas* son las principales causantes de trombiculiasis en Suramérica (Tweeten y Muñoz-Bravo, 2008). Además de “bicho colorao”, “coloradillas” o “ácaro rojo”, en Venezuela se les conoce comúnmente como “coloraditas” o “chivacoas” y en Perú como “isangos” (Chaccour, 2005; Beltrán *et al.*, 2009).

2.3. PROCESO DE ALIMENTACIÓN DE LAS LARVAS

A diferencia de otros ectoparásitos como garrapatas, pulgas o piojos, los trombicúlidos no se alimentan de sangre. Para alimentarse sobre vertebrados, las larvas forman un característico tubo en la piel del hospedador, el estilostoma (Goff *et al.*, 1982). Las larvas de trombicúlidos tienen los quelíceros muy cortos, por lo que necesitan dicha estructura, tanto para el anclaje al hospedador como para la obtención de alimento. La larva perfora el estrato corneo de la epidermis con sus quelíceros, mientras que la porción apical del hipostoma se retrae para crear un efecto de bombeo en la superficie de la piel que ayudará a la succión de nutrientes (Shatrov y Stekolnikov, 2011). Inmediatamente después de adherirse a

la piel del hospedador, la larva secreta una sustancia pegajosa que forma la parte inicial del estilostoma y que proporciona una fuerte adherencia (Shatrov, 2009). Una vez formado este cono eosinófilo, la solidificación de las secreciones salivares de la larva da lugar al estilostoma como tal: una estructura en forma de tubo con un canal central que se proyecta en el hospedador desde la superficie de la epidermis (donde están insertadas las piezas bucales de la larva) hasta la capa de tejido conjuntivo subyacente (Shatrov, 2011). Este proceso desencadena en el hospedador una respuesta inflamatoria de intensidad dérmica moderada. Como resultado, se forma una cavidad en la parte más distal del estilostoma que contiene una mezcla líquida que sirve de alimento a la larva: células de la epidermis rotas, neutrófilos, linfocitos, macrófagos y eritrocitos migrados de los vasos sanguíneos dilatados al foco inflamatorio (Shatrov, 2009). En consecuencia, los tejidos del hospedador alrededor del estilostoma quedan parcialmente destruidos y necrotizados (Figura 4).

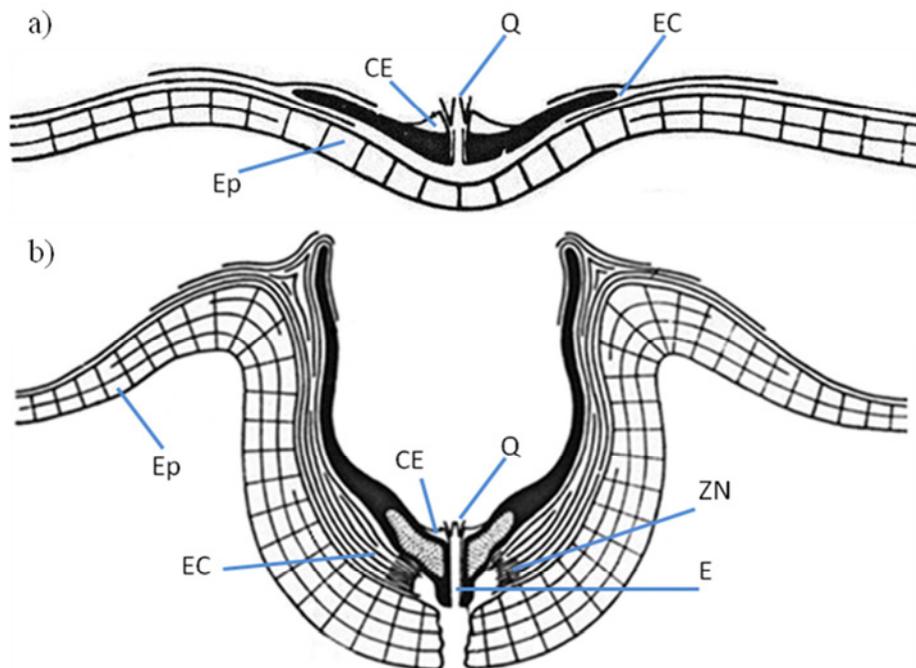


Figura 4. a) Etapas iniciales de la formación del estilostoma. b) Estilostoma totalmente formado. CE: cono eosinófilo, Q: quelíceros, EC: estrato corneo, Ep: epidermis, ZN: zona necrotizada, E: estilostoma. Adaptado de Shatrov, 2000.

En general, el estilostoma mide entre 100-200 μm de longitud y 30-70 μm de diámetro (Shatrov y Kudryashova, 2006). Tanto la forma, composición y estructura, como el proceso de formación del estilostoma y la respuesta inflamatoria inducida en el hospedador, son específicas de la especie de trombicúlido, independientemente del sitio de picadura y de la especie hospedadora (Shatrov, 2009). Sin embargo, la longitud del estilostoma parece estar determinada por el grosor de la epidermis y la presencia o ausencia de costras en el sitio de la picadura (Shatrov *et al.*, 2014).

En los hospedadores naturales las larvas se alimentan generalmente durante 3-6 días, tanto en la naturaleza como si el proceso se lleva a cabo en el laboratorio (Shatrov, 1996; Kampen, 2002). En humanos, sin embargo, el proceso tiene una duración muy variable. En el caso de larvas que no transmiten enfermedades infecciosas varía entre 3-8 h y 1-2 días, mientras que se extiende hasta 2-10 días en larvas del género *Leptotrombidium* transmisoras del tifus de los matorrales (Kampen, 2000; Mullen y O'Connor, 2002; Guarneri *et al.*, 2005; Díaz, 2010). Se cree que la transmisión de bacterias patógenas requiere que el proceso de alimentación dure al menos 6 h (Kim y Walker, 2011).

El hecho de que las larvas se mantengan adheridas a la superficie de la piel mientras se alimentan, confiere a la mayoría de los trombicúlidos la condición de ectoparásitos. Sin embargo, las larvas de algunos géneros pueden introducirse parcial o totalmente bajo la piel y formar diversos tipos de cápsulas mientras se alimentan en anfibios y mamíferos (Shatrov y Kudryashova, 2006). En estos casos, las larvas permanecen alimentándose varias semanas, e incluso meses. Como curiosidad, cabe destacar el caso de unas estructuras adaptativas específicas que pueden desarrollar las lagartijas en la piel, denominadas “bolsillos de ácaros”, que sirven para minimizar el daño causado por las larvas durante el proceso de alimentación (Goldberg y Holshuh, 1992).

La saliva de los trombicúlidos tiene efecto irritante cuando pican al hombre, induciendo una reacción inflamatoria dérmica de intensidad moderada y una respuesta inmune adaptativa. La intensidad de la respuesta parece estar determinada por factores concomitantes como el sitio de la picadura y las condiciones específicas de la piel en el punto de la picadura. Los componentes de

la saliva se caracterizan por tener propiedades líticas y antigénicas moderadas (Shatrov, 2009). De hecho, se especula que la baja actividad antigénica de las sustancias que forman el estilostoma podría ser una estrategia para evitar que los trombicúlidos se desprendan rápidamente debido a la reacción inmunológica de los tejidos del hospedador (Shatrov *et al.*, 2014). Por otro lado, se ha visto que las exposiciones repetidas a las picaduras de trombicúlidos provocan que la respuesta inmune adaptativa sea más rápida y eficaz. Así, algunas personas que viven en zonas infestadas desarrollan un alto grado de tolerancia a las sustancias antigénicas inyectadas durante las picaduras (Arlan, 2009). Sin embargo, también se han descrito casos de hipersensibilidad a dichas sustancias en forma de urticaria o formación de ampollas (Takahashi *et al.*, 2004).

La intensidad de la reacción del hospedador en los tejidos es de particular interés con respecto a la transmisión de patógenos, ya que las características del estilostoma y el tipo de reacción cutánea pueden ser indicadores indirectos del potencial de las larvas para actuar como vectores efectivos de los mismos (Shatrov, 2011). En el caso del género *Leptotrombidium*, los estilostomas son especialmente largos, lo que provoca un daño más profundo en la dermis, y una reacción dermatológica bastante intensa. La combinación de neutrófilos y macrófagos rodeando el estilostoma y sobre todo acumulados en el nivel más profundo de la dermis, parece jugar un papel importante en la transmisión de *O. tsutsugamushi* (Shatrov, 2011).

3. LOS TROMBICÚLIDOS COMO PARÁSITOS DE ANIMALES

Las larvas de trombicúlidos parasitan todos los grupos de vertebrados excepto los peces, aunque los principales hospedadores son los pequeños mamíferos y las aves (Zhang, 1998; Mullen y O'Connor, 2002; Durden *et al.*, 2004; Elston, 2006; Literak *et al.*, 2007; Cakiroglu *et al.*, 2008; Lei *et al.*, 2010). Prácticamente no existe información acerca de que las larvas de trombicúlidos se alimenten sobre invertebrados (Moniuszko y Małol, 2014). El hombre es un hospedador accidental. De hecho, la especificidad de las larvas por un hospedador determinado continúa siendo motivo de debate. Probablemente, los trombicúlidos se asocian a un hábitat determinado y no a un hospedador específico. Es decir, parasitarán al primer animal que encuentran a su alcance dentro de su hábitat, aunque por supuesto mantengan preferencias por unos hospedadores sobre otros (Shatrov y Kudryashova, 2006; Cakiroglu *et al.*, 2008).

La mayoría de casos de trombiculiasis en animales se han descrito en perros (Heyne *et al.*, 2001; Guarneri *et al.*, 2005; Kavitha *et al.*, 2011; Giannouloupoulos *et al.*, 2012, Tudor, 2012) y gatos (Giannouloupoulos *et al.*, 2012; Leone *et al.*, 2013). Sin embargo, también se han comunicado casos aislados en ciervos, osos, walabíes, alpacas y ranas (O'Callaghan *et al.*, 1994; Little *et al.*, 1997; Cunningham *et al.*, 2001; Mendez *et al.*, 2010; Gomez-Puerta *et al.*, 2012).

En general, se considera que los trombicúlidos, cuando pican a sus hospedadores naturales, causan irritación de la piel y/o prurito, aunque sin detrimento del estado general (Little *et al.*, 1997; Takahashi *et al.*, 2004). Sin embargo, durante la realización de este trabajo hemos podido constatar que estos casos pueden ser fatales en perros parasitados que no reciben tratamiento o si éste se instaura de manera tardía.

4. LOS TROMBICÚLIDOS COMO VECTORES DE ENFERMEDADES

A pesar de su impacto en salud humana, la biología y base genética de la competencia de los trombicúlidos como vectores de enfermedades es poco conocida (Hill, 2010). Se han detectado diversos microorganismos en diferentes especies de trombicúlidos, pero su papel como vectores de enfermedades infecciosas sólo ha sido demostrado en el caso del tifus de los matorrales.

4.1. TIFUS DE LOS MATORRALES

El tifus de los matorrales, también llamado fiebre o enfermedad de tsutsugamushi [del japonés *tsutsuga* (enfermedad) y *mushi* (ácaro)], es una enfermedad causada por *O. tsutsugamushi*, una α -proteobacteria intracelular obligada, y transmitida por larvas del género *Leptotrombidium* (Rajapakse *et al.*, 2011). Más de la mitad de la población mundial (55%) vive en zonas endémicas, por lo que aproximadamente un billón de personas tienen riesgo de adquirir la enfermedad (Li *et al.*, 2014), y se estima que aparecen un millón de casos nuevos al año (Watt y Parola, 2003). Sin embargo, estas cifras están probablemente subestimadas porque la enfermedad es difícil de identificar, debido, principalmente, a que su espectro clínico se solapa con el de otras causas de fiebre muy comunes en las zonas endémicas (Paris *et al.*, 2012).

O. tsutsugamushi (conocida anteriormente como *Rickettsia orientalis* o *Rickettsia tsutsugamushi*) fue reclasificada como un nuevo género separado de *Rickettsia* en base a diferencias fenotípicas y genotípicas (Tamura *et al.*, 1995). *Orientia* spp. difiere de *Rickettsia* spp. en la estructura de la pared celular, el perfil antigénico y el tamaño del genoma, que es casi dos veces mayor que el de *Rickettsia*. Hay tres cepas principales, Gilliam, Karp y Kato, aunque se han reconocido más de 20 serotipos antigénicamente distintos en zonas endémicas (Kelly *et al.*, 2009), y actualmente se conocen más de 70 cepas de *O. tsutsugamushi* (Paris *et al.*, 2013).

La enfermedad es endémica en una región geográfica de 13.000.000 km² definida triángulo tsutsugamushi (Figura 5). Esta región se extiende desde el norte de Japón, Corea y el extremo oriental de Rusia en el norte, al norte de Australia en el sur y hasta Pakistán y Afganistán en el oeste, incluyendo las islas occidentales de

los océanos Pacífico e Índico, como Taiwán, Filipinas, Nueva Guinea, Indonesia y Sri Lanka (Jensenius *et al.*, 2004).

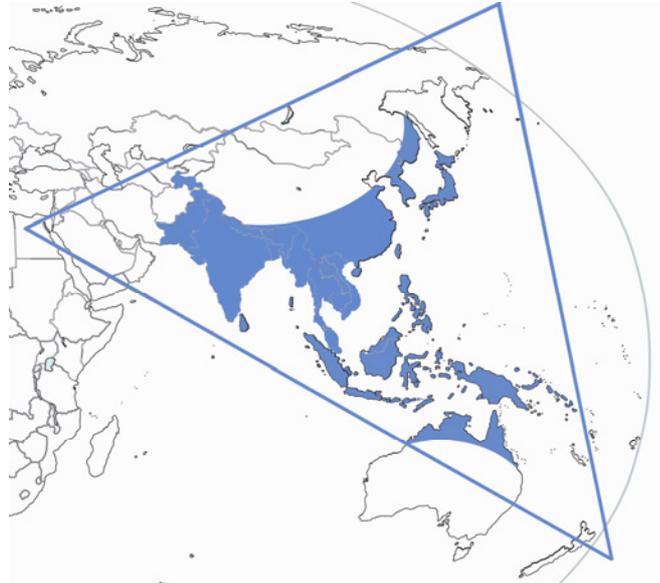


Figura 5. Zona endémica del tifus de los matorrales, conocida como triángulo de tsutsugamushi. Aportación original.

Sólo unos pocos casos de “tifus de los matorrales-like” se han descrito fuera de esta zona: dos casos, con diagnóstico únicamente serológico, probablemente adquiridos en África (Osuga *et al.*, 1991; Ghorbani *et al.*, 1997), un caso febril adquirido en Dubái causado por *Orientia chuto* (Izzard *et al.*, 2010), y otro provocado por una cepa divergente de *Orientia* spp. en Chile (Balcells *et al.*, 2011).

Los casos de tifus de los matorrales tienen lugar en zonas húmedas tropicales donde los trombicúlidos del género *Leptotrombidium* actúan como reservorios de *O. tsutsugamushi*, y sus larvas la transmiten al hombre a través de sus picaduras (Traub *et al.*, 1975). Las picaduras se producen mientras el hombre realiza actividades ocupacionales o recreativas y entra en contacto con la vegetación infestada en arrozales, matorrales y zonas de deforestación primaria (Rodkvamtook *et al.*, 2013; Dhiman, 2014). La estacionalidad de esta enfermedad viene dada por el periodo de actividad de las larvas de *Leptotrombidium* spp. Las principales especies que actúan como vectores varían según las zonas endémicas: *Leptotrombidium deliense* (Figura 6a), *Leptotrombidium fletcheri*, y

Leptotrombidium arenicola son las especies más representativas en zonas tropicales y sub-tropicales, como el sudeste asiático y el Pacífico suroccidental, mientras que *Leptotrombidium akamushi*, *Leptotrombidium pallidum* (Figura 6b) y *Leptotrombidium scutellare* lo son en zonas cálidas, como Japón y Corea (Seong *et al.*, 2001).

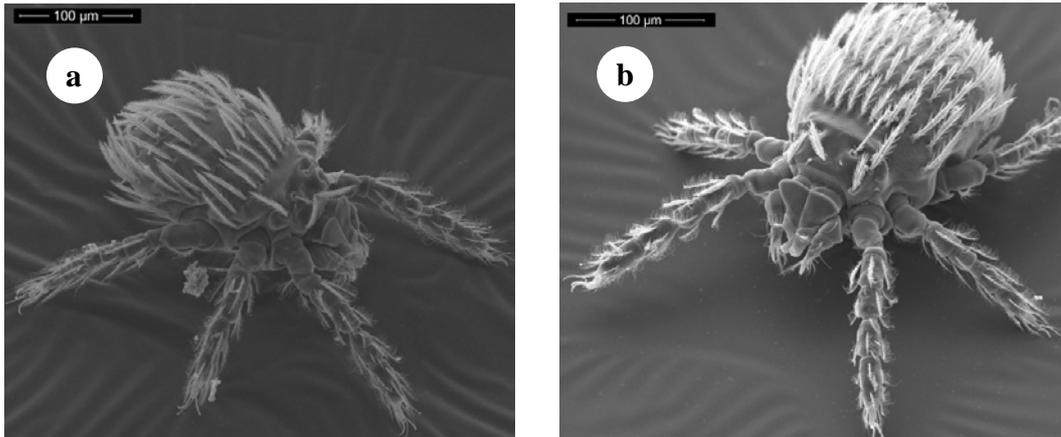


Figura 6. a) *Leptotrombidium deliense*. b) *Leptotrombidium pallidum*. Imágenes cedidas por Dr. Stekolnikov (Instituto de Zoología de la Academia de Ciencias de Rusia).

Las larvas de *Leptotrombidium* spp. se alimentan sobre el hombre y tras la picadura, *O. tsutsugamushi* se multiplica en el sitio de inoculación. Este proceso desencadena manifestaciones clínicas locales (escara) y sistémicas, que varían desde leves a severas (Paris *et al.*, 2012). El periodo de incubación es de unos 10-12 días, aunque puede oscilar entre 5 y 21 (Raj *et al.*, 2014). La fiebre aparece de manera abrupta, acompañada de cefalea, mialgia y malestar general. A la semana del inicio de los síntomas aparece la escara en el lugar de inoculación, que puede ser única o múltiple, con una prevalencia que varía entre 7-97% de los casos (Kim *et al.*, 2007; Rajapakse *et al.*, 2011). La escara representa la necrosis cutánea localizada en el lugar de la picadura (con la apariencia de una quemadura de cigarro), y constituye un marcador casi diagnóstico del tifus de matorrales (Figura 7) (Rajapakse *et al.*, 2011). Los sitios más comunes donde aparecen las escaras son el tronco, los brazos y las piernas, y también el cuero cabelludo, las axilas, los genitales, la cintura y otras partes expuestas del cuerpo (Seong *et al.*, 2001; Kim y Walker, 2011). Otro síntoma característico de la enfermedad es la linfadenopatía regional, que aparece en el ganglio linfático más próximo a la escara primaria

(Faccini-Martínez *et al.*, 2014). Aunque no es muy común, una semana después del inicio de los síntomas puede aparecer un *rash* maculopapular con distribución centrífuga, que comienza en el tronco y se extiende hasta las extremidades inferiores (Jeong *et al.*, 2007; Faccini-Martínez *et al.*, 2014).



Figura 7. Escara y eritema el quinto día de enfermedad en el brazo izquierdo de un paciente de 36 años. Imagen cedida por Dr. Takahashi (Universidad Médica Saitama, Japón).

A partir de la segunda semana, una proporción de pacientes (sobre todo los que no reciben tratamiento) muestran clínica de infección sistémica severa (Seong *et al.*, 2001). Las complicaciones más frecuentes, que pueden resultar fatales, son el fallo cardíaco, el fallo renal agudo, y la afectación de los sistemas nerviosos central y respiratorio, con neumonía intersticial y síndrome de *distress* respiratorio agudo (Jensenius *et al.*, 2004; Kim y Walker, 2011; Rajapakse *et al.*, 2011; Faccini-Martínez *et al.*, 2014; Rungta, 2014). La tasa de mortalidad en pacientes no tratados es de aproximadamente un 10%, aunque se estima un rango del 0-30% (Rajapakse *et al.*, 2011).

Teniendo en cuenta la severidad de la infección por *O. tsutsugamushi*, el tratamiento debe comenzarse lo antes posible, sin esperar al diagnóstico microbiológico. Aunque el *gold standard* en el diagnóstico del tifus de los matorrales es el aislamiento del microorganismo en cultivo celular, la técnica de referencia sigue siendo la inmunofluorescencia indirecta (Blacksell *et al.*, 2007;

Koh *et al.*, 2010). La incorporación de la técnica de PCR en el diagnóstico de esta enfermedad ha supuesto una ventaja importante, ya que permite detectar la infección antes de que tenga lugar la respuesta inmunológica (Paris *et al.*, 2011). En cuanto al tratamiento, la doxiciclina y el cloranfenicol son los antibióticos de elección (Jeong *et al.*, 2007), aunque la azitromicina y la rifampicina constituyen buenas alternativas (Raoult, 2010). Dado que actualmente no se dispone de quimiopprofilaxis ni vacunas contra esta infección (Valbuena y Walker, 2012), la prevención se basa fundamentalmente en evitar las picaduras de los trombicúlicos. Para ello, se deben limitar las visitas a las zonas endémicas, usar repelentes e ir vestido de manera apropiada (García-Álvarez *et al.*, 2013).

4.2. OTRAS ENFERMEDADES INFECCIOSAS ASOCIADAS A LOS TROMBICÚLIDOS

Hasta el momento sólo se ha demostrado que las larvas de trombicúlicos transmitan *O. tsutsugamushi* al hombre. Dado que en muchas ocasiones los trombicúlicos comparten hábitat con hospedadores, reservorios y vectores de diversos microorganismos patógenos transmitidos por artrópodos, su capacidad para actuar como vectores de dichos agentes ha sido motivo de investigación desde hace más de 65 años. Así, se ha especulado acerca del papel de los trombicúlicos en la transmisión de bacterias y virus patógenos para el hombre en todo el mundo. En Europa se comunicó la presencia de *Anaplasma phagocytophilum* en larvas de *N. autumnalis* recogidas de la vegetación en España (Fernández-Soto *et al.*, 2001), y *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.), en trombicúlicos retirados de aves en Alemania (Kampen *et al.*, 2004) y de micromamíferos en la República Checa (Literak *et al.*, 2008). En cuanto al género *Rickettsia*, recientemente se ha descrito por primera vez la presencia de *Rickettsia monacensis* y *Rickettsia helvetica* en *Hirsutiella zachvatkini* y de *R. monacensis* en *Keptatrombicula storkani* retirados de roedores en Eslovaquia (Mit'ková *et al.*, 2015). En Asia, se detectó *Bartonella tamiiae* en trombicúlicos del género *Leptotrombidium* retirados de roedores silvestres en Tailandia (Kabeya *et al.*, 2010), y de más de una decena de *Rickettsia* spp. en trombicúlicos retirados de roedores en Corea y Taiwán (Choi *et al.* 2007; Tsui *et al.* 2007).

En lo que respecta a enfermedades virales, sólo un par de publicaciones de los años 60 asociaron el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas con *Neotrombicula* spp. (Grinbergs, 1959; Daniel, 1961). Posteriormente, se sugirió una posible relación entre *Leptotrombidium* y Hantavirus (Song, 1999). Esta hipótesis se afianzó con los trabajos relacionados con la fiebre hemorrágica con síndrome renal en China (Wu *et al.*, 1996), con la detección del ARN de Hantavirus en trombicúlidos en Texas (EE.UU.) (Houck *et al.*, 2001) y con el síndrome pulmonar por Hantavirus (Yu y Tesh, 2014).

Sin embargo, pese a los hallazgos señalados, la competencia de los trombicúlidos como vectores de otros microorganismos, aparte de *O. tsutsugamushi*, no está comprobada.

5. LOS TROMBICÚLIDOS Y LA DERMATITIS

La trombiculiasis es una dermatitis causada por las picaduras de las larvas de ácaros trombicúlidos (Goff, 1982). Aunque está poco documentada, esta ectoparasitosis es mundialmente prevalente, excepto en la región ártica (Martens *et al.*, 2012). Sin embargo, debido a su carácter transitorio y a la ausencia de signos sistémicos, queda en muchas ocasiones sin diagnosticar. En áreas no tropicales los casos de trombiculiasis son más frecuentes a finales del verano y principios del otoño, cuando coincide el pico de abundancia de las larvas y el periodo en el que se realizan más actividades al aire libre (Jiménez *et al.*, 2001; Kampen, 2002; Elston, 2006; Martens *et al.*, 2012; Santibañez-Sáenz *et al.*, 2014). Se ha descrito la presencia de trombicúlidos asociados a trombiculiasis en parques, jardines, áreas de césped y zonas húmedas junto a lagos y arroyos (Mullen y O'Connor, 2002). Como se ha mencionado anteriormente, las larvas se distribuyen en “parches” en los bordes de pequeños claros de la vegetación de zonas arbustivas y con abundante hierba, temperaturas del suelo templadas y humedad alta, y donde habitan sus hospedadores potenciales (Schöler *et al.*, 2006).

De las 3.000 especies de trombicúlidos descritas, tan sólo alrededor de 15 provocan reacciones cutáneas en el hombre y los animales domésticos (Arlian, 2009). Actualmente las especies consideradas como la causa más frecuente de trombiculiasis son *E. alfreddugesi* en el continente americano, *N. autumnalis* en Europa, *E. batatas* en Suramérica y *Eutrombicula wichmanni* en el sudeste asiático, Australia y las Islas del Pacífico (Steen *et al.*, 2004; Burns, 2009; Díaz, 2010).

E. alfreddugesi y *E. splendens* son las principales especies causantes de trombiculiasis en Norte América. Los casos ocurren entre finales de verano y principios de otoño en las zonas más templadas, mientras que pueden aparecer durante todo el año en las zonas tropicales (Mullen y O'Connor, 2002). Aunque es menos importante, *Eutrombicula lipovsky* también causa trombiculiasis en Estados Unidos. Se encuentra en zonas húmedas de las orillas de pantanos y arroyos, y parasita reptiles, roedores y aves (Mullen y O'Connor, 2002).

En América del Sur *E. alfreddugesi* y *E. batatas* constituyen la causa más común de trombiculiasis. Tweeten y Muñoz-Bravo en 2008, describieron en Bolivia una plaga denominada “Qhapa” con la misma clínica, y asociada a *E. batatas* (Tweeten y Muñoz-Bravo, 2008). Recientemente se implicó *E. alfreddugesi* en un caso de trombiculiasis en un turista después de unas vacaciones en Brasil (Martens *et al.*, 2012). Además, en Venezuela un alto porcentaje de los casos diagnosticados de sarna pueden realmente corresponder a casos de trombiculiasis (Chaccour, 2005). Por otro lado, en Perú, muchos de los cuadros clínicos compatibles clínicamente con trombiculiasis se asocian con *N. autumnalis* (Beltrán *et al.*, 2009).

En el sudeste asiático, Australia y las Islas del Pacífico, aunque *E. wichmanni* es la principal causante de trombiculiasis, *E. sarcina* y algunas especies de los géneros *Odontacarus* y *Schoengastia* también se han considerado agentes causales (Burns, 2009). Además, *Neotrombicula nagayoi* se ha relacionado con un caso de trombiculiasis en Japón (Takahashi *et al.*, 2004).

Con respecto a África, no existe bibliografía sobre la distribución de los trombicúlidos. Únicamente se ha descrito un caso de trombiculiasis humana y canina causada por *Leptotrombidium subquadratum* en Sudáfrica (Heyne *et al.*, 2001).

En Europa, hasta hace poco tiempo se consideraba probado el papel de 4 especies de trombicúlidos como causantes de trombiculiasis: *N. autumnalis*, *Blankaartia acuscutellaris*, *Keptatrombicula desaleri* y *Trombicula toldti* (Ripka y Stekolnikov, 2006; Shatrov y Stekolnikov, 2011). Como ya se ha explicado anteriormente, *N. autumnalis* está ampliamente distribuida por todo el continente (Tabla 2) y es la especie más conocida, y a la que se le atribuyen la mayoría de casos de trombiculiasis. Respecto al resto de las especies, *B. acuscutellaris* está ampliamente distribuida y se asocia con cañaverales o márgenes de ríos, lagos y pantanos, y parasita principalmente a aves típicas de esos biotopos, aunque el hombre es un hospedador accidental (Ripka y Stekolnikov, 2006). *K. desaleri* es un parásito de ungulados y sólo ha sido documentado en humanos por Methlagl en 1928, cuando se describió esta especie (Stekolnikov *et al.*, 2014). Tiene la peculiaridad de poseer un disco succionador en la parte apical del hipostoma que

permite a la larva alimentarse con éxito sobre grandes hospedadores, lo que resulta inusual para la mayoría de los trombicúlidos. *T. toldti* sigue teniendo hoy en día una posición taxonómica poco clara, y sólo fue encontrado en Austria por Winkler en 1953 (Stekolnikov *et al.*, 2014). Además, las especies *Euschoengastia xerothermobia*, *Neotrombicula japonica* y *Neotrombicula zachvatkini* también han sido consideradas como causantes de trombiculiasis en Europa, aunque no existen descripciones de los casos humanos asociados (Kampen, 2000). Recientemente, y gracias a los trabajos para la realización de esta tesis doctoral se describió *Neotrombicula inopinata* como posible agente causal de trombiculiasis en España (Santibañez-Sáenz *et al.*, 2014; Stekolnikov *et al.*, 2014). *N. inopinata* también está ampliamente distribuido en Europa y comparte rango de hospedadores con *N. autumnalis* (Kudryashova, 1998).

Aunque desde la literatura científica antigua se da por hecho que la trombiculiasis es bastante común y está ampliamente distribuida en Europa, en realidad existen pocos casos clínicos bien documentados. En ciertas zonas de Europa como los alrededores de Viena, la zona del Tirol en Austria, la zona de Basilea en Suiza, Francia y Holanda, se considera que los casos de trombiculiasis son especialmente abundantes (Kampen, 2000). Sin embargo, únicamente en los trabajos de Guarneri *et al.*, en 2005 y Santibañez-Sáenz *et al.*, en 2014 se pueden encontrar descripciones exhaustivas de los cuadros clínicos (Guarneri *et al.*, 2005; Santibañez-Sáenz *et al.*, 2014).

El cuadro clínico se caracteriza por la aparición de lesiones cutáneas en forma de pápulas muy pruriginosas en los sitios de las picaduras, como resultado de la combinación de las enzimas salivares del ácaro y la respuesta inmune del hospedador (Figura 8) (Mullen y O'Connor, 2002; Elston, 2006). Debido a su pequeño tamaño, las larvas resultan difíciles de distinguir a simple vista, y normalmente pasan inadvertidas incluso cuando las picaduras son evidentes (White, 2003). Además, se cree que los trombicúlidos que causan dermatitis no sobreviven más de 1-2 días alimentándose sobre el hombre, como resultado de la reacción adversa del huésped y del rascado de las lesiones (Mullen y O'Connor, 2002; Shatrov y Kudryashova, 2006). El hombre se infesta mientras trabaja o camina en zonas de vegetación baja, y las lesiones cutáneas aparecen

generalmente en aquellas zonas en las que la piel es más fina (tobillos, pantorrillas, axilas...) o en zonas comprimidas por la ropa (cintura, alrededor de las costuras de la ropa interior...) (Burns, 2009).



Figura 8. Picaduras de trombicúlidos. Aportación original.

El tratamiento de estos cuadros clínicos es fundamentalmente sintomático y consiste en la administración de antipruríticos, antihistamínicos y corticoesteroides tópicos (Jones, 1987). Aunque el picor desaparece durante la primera semana, la curación de las lesiones no se alcanza hasta la segunda o tercera (Kampen, 2002). En los casos en los que los pacientes desarrollan una superinfección bacteriana asociada al rascado de las lesiones, puede ser necesario el uso de antibióticos (Elston, 2006). Se debe usar ropa apropiada y repelente como medidas de prevención para evitar las picaduras (White 2003; García-Álvarez *et al.*, 2013).

Aunque son menos frecuentes, se han descrito casos de hipersensibilidad asociados a las picaduras de trombicúlidos en el pene de los niños en diversas zonas de EE.UU. (Smith *et al.*, 1998; Schulert y Gigante, 2014). El cuadro, que se conoce como “síndrome veraniego del pene”, se caracteriza por la rápida

aparición de edema y prurito en la piel de la zona genital tras el contacto con la vegetación durante actividades al aire libre, y tiene una estacionalidad definida entre primavera y verano. Por otro lado, recientemente se ha descrito en Reino Unido el único caso de conjuntivitis causada por *N. autumnalis* (Parcell *et al.*, 2013). Tras dos semanas con dolor en un ojo, que tenía aspecto arenoso y enrojecido, se observó una larva viva en el borde del párpado superior de la paciente.

6. LOS TROMBICÚLIDOS EN ESPAÑA

De acuerdo a los trabajos sobre trombicúlidos retirados de pequeños mamíferos, reptiles y aves, se han descrito 18 especies de trombicúlidos en España (Kepka, 1960; Varma, 1964; Pereira-Lorenzo, 1993; Imaz *et al.*, 2006;): *B. acuscutellaris*, *Hirsutiella billabeta*, *H. zachvatkini*, *Xinjiangsha tarda*, *N. autumnalis*, *Neotrombicula hispanica*, *N. japonica*, *Neotrombicula jordana*, *Neotrombicula vulgari*, *Ericotrombidium hasei*, *Leptotrombidium europaeum*, *Leptotrombidium silvaticum*, *Brunehaldia bulgarica*, *Cheladonta ikaoensis*, *Cheladonta pannonica*, *Helenicula olsufjevi*, *Schoutedenichia dipodilli* y *Schoutedenichia krampitzi*.

Hasta el comienzo de este trabajo, además de los informes faunísticos nombrados previamente, solamente existían 2 publicaciones científicas en relación a los trombicúlidos. Los dos trabajos hacían referencia a *N. autumnalis*, y se llevaron a cabo en la misma zona montañosa del norte del país, que además coincide con el área de estudio de este trabajo (Fernández-Soto *et al.*, 2001; Jimenez *et al.*, 2001).

En la Comunidad Autónoma de La Rioja, desde hace varias décadas se tiene conocimiento de casos de dermatitis estacional en personas que entran en contacto con la vegetación en determinadas zonas del Parque Natural Sierra Cebollera, entre finales de verano y mediados de otoño. Desde hace 15 años, estos casos se relacionan con los trombicúlidos. Además, en la misma época y lugar, y siempre con el antecedente de contacto con la vegetación, ocurren casos de parasitaciones masivas en perros que pueden llegar a ser fatales. En los últimos otoños, el cuadro ha tomado mayores dimensiones, con un gran número de personas y perros afectados y gran repercusión en los medios de comunicación. En 2001, se comunicó que estos cuadros aparecían en personas que visitaban determinadas áreas del Parque Natural, siendo la gran mayoría empleados que trabajaban en limpieza del monte, guardas forestales o cazadores que acudían a la zona (Jiménez *et al.*, 2001).

Además, en 2005 se atendió en el Departamento de Enfermedades Infecciosas (Complejo Hospitalario San Millán-San Pedro de La Rioja) a una pareja y a su perro en estado de máxima gravedad, con un cuadro compatible con la parasitación por trombicúlidos (era otoño y habían visitado la zona de Piqueras, en el Parque Natural Sierra Cebollera). Se logró amplificar *Rickettsia felis* por

primera vez en España, mediante PCR en sangre, en ambos pacientes y el perro (Oteo *et al.*, 2006). Lógicamente, no se pudo afirmar que esta rickettsia fuera transmitida por las larvas de trombicúlidos, ya que los pacientes y el perro habían sido también picados por pulgas. Como ya se ha mencionado, se detectó *A. phagocytophilum* en larvas de *N. autumnalis* recogidas en la misma zona donde nuestro grupo había descrito los casos de trombiculiasis humana y canina (Fernández-Soto *et al.*, 2001). Teniendo en cuenta lo anterior, y dado que los trombicúlidos del género *Leptotrombidium* son el vector demostrado de *O. tsutsugamushi*, parece lógico plantearnos cuál podría ser el papel de los trombicúlidos como vectores de enfermedades en nuestra zona.

OBJETIVOS

Objetivos

1. Descripción de la epidemiología de la trombiculiasis en La Rioja.
2. Identificación del agente causal y su ciclo biológico.
3. Estudio de la presencia de *Rickettsia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia* spp., *Coxiella burnetii*, *Bartonella* spp. y *Orientia tsutsugamushi* en trombicúlidos.
4. Descripción clínica de la trombiculiasis en La Rioja.

Objectives

1. Description of the epidemiology of trombiculiasis in La Rioja.
2. Identification of the etiological agent and study of its life cycle.
3. Investigation of the presence of *Rickettsia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia* spp., *Coxiella burnetii*, *Bartonella* spp. and *Orientia tsutsugamushi* in chiggers.
4. Clinical characterization of trombiculiasis in La Rioja.

MATERIAL Y MÉTODOS

1. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

1.1 MUESTREOS DE LARVAS DE TROMBICÚLIDOS DE LA VEGETACIÓN

1.1.1. ÉPOCA Y LUGAR

Entre agosto de 2008 y diciembre de 2010, y con el objeto de recoger larvas de trombicúlidos, se llevaron a cabo muestreos sobre vegetación en La Pineda (42° 6' N, 2°33' O). Este paraje está situado en el Parque Natural Sierra Cebollera y pertenece al municipio de Lumbreras, al sur de La Rioja, España (Figura 9).



Figura 9. Mapa de La Rioja con el Parque Natural Sierra Cebollera en azul, y ortofoto del paraje de La Pineda. C: casa forestal. Modificado de www.iderioja.larioja.org. Escala: 1/4.000.

El entorno de La Pineda es un bosque situado por encima de los 1.200 m de altitud, en el que predomina el pino silvestre (*Pinus sylvestris*), con sotobosque de enebros (*Juniperus communis*), brezos (*Erica* sp.) y acebos (*Ilex aquifolium*), entre otras muchas variedades vegetales (Figura 10).



Figura 10. Paraje de La Pineda. Aportación original.

Se trata de una zona de gran riqueza faunística en la que habitan desde mamíferos de gran porte como ciervos (*Cervus elaphus*), corzos (*Capreolus capreolus*) y jabalíes (*Sus scrofa*), hasta pequeños roedores como el ratón de campo (*Apodemus sylvaticus*) o la musaraña gris (*Crocidura russula*), entre otros. Además, el área está catalogada como zona de especial protección para las aves (ZEPA). Por otro lado, existe ganado en explotación extensiva, fundamentalmente vacuno (*Bos taurus*) y ovino (*Ovis aries*).

De acuerdo a nuestra experiencia y gracias a la información facilitada por los guardas forestales de La Pineda, sabemos que, en años anteriores, las primeras picaduras de trombicúlidos se habían producido a finales de agosto o principios de septiembre. Por ello, los muestreos de trombicúlidos sobre la vegetación se llevaron a cabo semanalmente, desde mediados de agosto, en las fechas que se detallan a continuación:

- En 2008: 14, 21 y 28 de agosto; 4, 11, 18 y 25 de septiembre; 3, 10, 17, 21 y 27 de octubre; 4 y 12 de noviembre.
- En 2009: 12, 19 y 26 de agosto; 2, 9, 15, 23 y 29 de septiembre; 8, 15, 23 y 29 de octubre; 5, 13, 19 y 24 de noviembre; 2 y 10 de diciembre.
- En 2010: 24 y 31 de agosto; 7, 14, 19 y 27 de septiembre; 2, 13, 19 y 29 de octubre; 4, 11, 16 y 24 de noviembre; 1, 13, 20 y 28 de diciembre.

1.1.2. TÉCNICAS DE RECOGIDA

Cada muestreo tuvo una duración aproximada de 3 h, llevándose a cabo siempre a partir del mediodía para evitar las horas más frías, en las que los ácaros se encuentran menos activos. La indumentaria para los muestreos incluía un buzo de polipropileno, guantes desechables y botas de goma para prevenir las picaduras de trombicúlidos.

La recogida de larvas de trombicúlidos de la vegetación se realizó mediante dos técnicas distintas:

1.1.2.1. Arrastre

Es una adaptación del método de barrido, utilizado comúnmente para recoger garrapatas de la vegetación, en el que se arrastra a ras de suelo una tela de felpa (o similar). En nuestro caso, se arrastró a ras de suelo una plantilla rígida plastificada de color negro de 20 cm x 40 cm con la ayuda de dos cuerdas atadas en los extremos (Figura 11 a). Al contacto con la plantilla, los trombicúlidos situados en la vegetación quedaron adheridos a la misma, y se recogieron en una bandeja que contenía agua destilada con ayuda de una brocha (Figura 11 b). De ahí, se transfirieron a tubos estériles de 50 ml.



Figura 11. a) Arrastre de la plantilla por el suelo durante un muestreo. b) Recogida de larvas de trombicúlidos de la plantilla. Aportación original.

Para obtener datos comparables sobre la abundancia de trombicúlidos y estudiar la distribución estacional de las larvas, en cada muestreo se recogieron los

trombicúlidos en lo que se denominó el “punto fijo”, que correspondía a un área del pinar de 56 m², más o menos cuadrada, delimitada por 8 pinos (Figura 12).



Figura 12. Zona de muestreo en La Pineda, delimitada en azul. En rojo se detalla el punto fijo. C: casa forestal. Modificado de www.iderioja.larioja.org. Escala: 1/2.000.

En cada muestreo, la plantilla se arrastró siguiendo los trazados mostrados en la figura 13, intentando invertir el mismo tiempo en el recorrido.

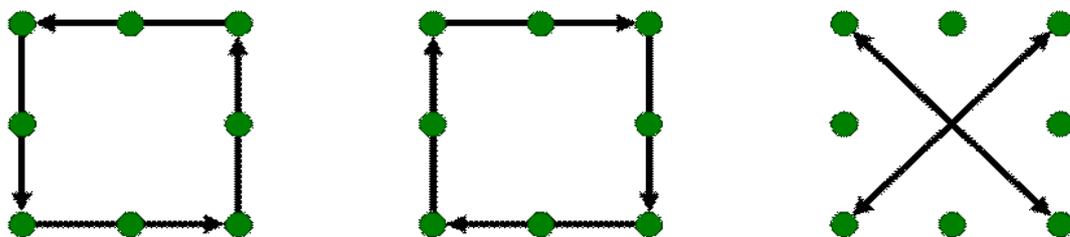


Figura 13. Trayectorias realizadas en los muestreos del método de arrastre.

Además, cada día de muestreo se escogió dentro de la zona de La Pineda (Figura 12), un área de dimensiones similares al punto fijo a la que se designó “punto variable”, que se muestreó siguiendo la misma metodología explicada anteriormente.

1.1.2.2. Captura directa

Para aumentar el número de ejemplares a estudiar, se realizaron muestreos mediante captura directa en la misma zona de La Pineda (Figura 12). Así, se recogieron los cúmulos de trombicúlidos introduciendo los ápices de las hierbas o ramas en microtubos y agitando para que los ácaros se soltaran y cayeran dentro del tubo (Figura 14).



Figura 14. Grupo de larvas de trombicúlidos en el ápice de una rama. Aportación original.

Del mismo modo, se investigó la presencia de larvas de trombicúlidos en otras zonas cercanas a La Pineda con ecosistemas similares, o en lugares donde visitantes o lugareños habían señalado la existencia de estos ácaros. Se visitaron diferentes puntos a lo largo de las Cuencas del Iregua, del Leza-Jubera, del Cidacos, del Najerilla, y la Sierra de la Demanda (Figura 15). En los muestreos, realizados el 15 de octubre de 2009, 7 y 19 de octubre, y 4 de noviembre de 2010, se examinó la vegetación y, en el caso de localizar larvas, se llevó a cabo la técnica de captura directa.

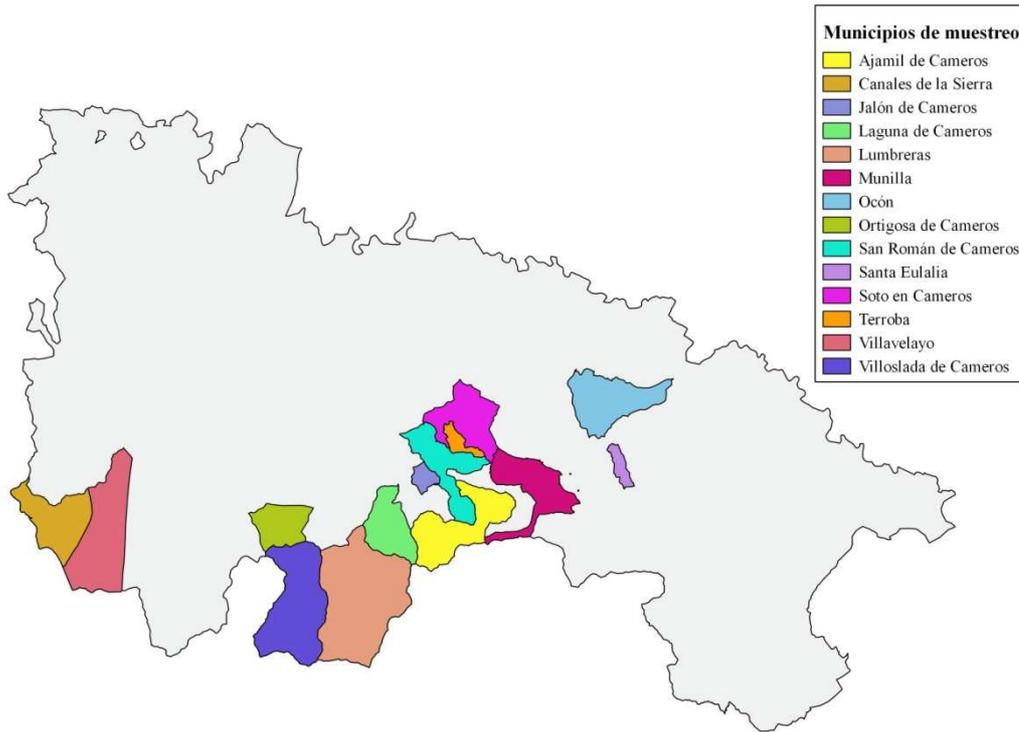


Figura 15. Municipios donde se llevaron a cabo muestreos de larvas de trombicúlidos en la vegetación. Modificado de www.iderioja.larioja.org.

1.1.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las larvas de trombicúlidos y el material empleado en los muestreos se almacenaron a -40°C al menos 3 días para evitar posibles picaduras durante su manejo y procesamiento.

Los ejemplares se separaron del material vegetal, partículas de tierra y otros restos. Para ello, el contenido de los tubos de 50 ml se filtró con papel de filtro que se colocó sobre una placa de Petri y se seleccionaron los trombicúlidos con un microscopio estereoscópico (Nikon SMZ1000) y con ayuda de una aguja enmangada (Figura16 a y b).

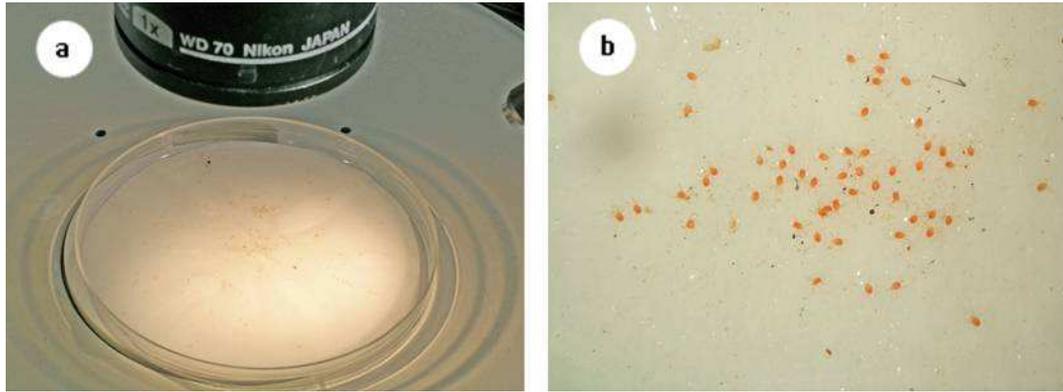


Figura 16. Trombicúlidos recogidos **a)** a simple vista y **b)** con microscopio estereoscópico (0,8 x). Aportación original.

Una vez separados del material vegetal, los trombicúlidos se almacenaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior procesamiento.

1.2. MUESTREOS DE LARVAS DE TROMBICÚLIDOS EN AVES

1.2.1. ÉPOCA Y LUGAR

Como resultado de una colaboración establecida con anilladores de aves acreditados (Sociedad de Ciencias Aranzadi y Abies Recursos Ambientales S. L.) se recogieron larvas de trombicúlidos durante los anillamientos realizados los días 22 de noviembre de 2009, 23 de enero y 16 de octubre de 2010 en Santa Eulalia ($42^{\circ} 12' \text{ N}$, $2^{\circ} 12' \text{ O}$), y el 19 de septiembre de 2010 en La Pineda (Lumbreras).

1.2.2. TÉCNICA DE RECOGIDA

Los trombicúlidos se retiraron con la ayuda de pinzas finas o con hisopo, intentando siempre minimizar el daño al animal (Figura 17).

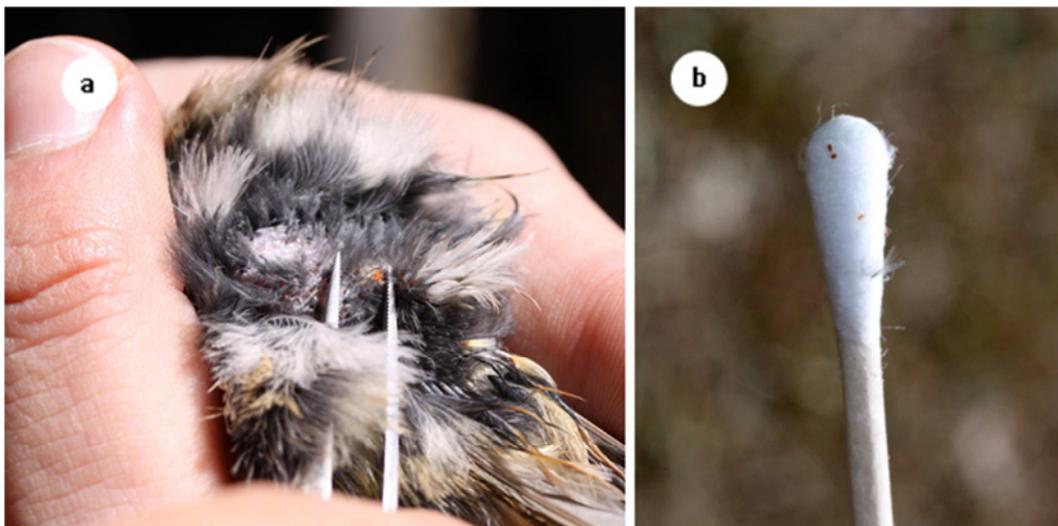


Figura 17. Retirada de larvas de trombicúlidos con la ayuda de **a)** una pinza y **b)** un hisopo. Aportación original.

1.2.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Las larvas retiradas de aves directamente con pinzas se transfirieron a tubos limpios para desechar los restos de plumas. Los ejemplares recogidos con hisopo se introdujeron en tubos con ayuda de unas pinzas. Las larvas se almacenaron a -80°C hasta su posterior procesamiento.

1.3. MUESTREOS DE ESTADIOS POST-LARVIARIOS DE TROMBICÚLIDOS EN EL SUELO

1.3.1. ÉPOCA Y LUGAR

Durante 2008, 2009 y 2010 se recogieron muestras de tierra para la búsqueda de los estadios post-larvarios de trombicúlidos en la misma zona de La Pineda en la que se llevaron a cabo los muestreos de larvas (Figura 12). Los muestreos se realizaron con una periodicidad mensual en las siguientes fechas:

- En 2008: 14 de enero, 13 de febrero, 18 de marzo, 15 de abril, 14 de mayo, 16 de junio, 18 de julio, 8 de agosto, 11 de septiembre, 17 de octubre, 12 de noviembre y 15 de diciembre.

- En 2009: 14 de enero, 26 de febrero, 18 de marzo, 22 de abril, 28 de mayo, 30 de junio, 31 de julio, 12 de agosto, 9 de septiembre, 15 de octubre, 19 de noviembre y 10 de diciembre.

- En 2010: 21 de enero, 23 de febrero, 23 de marzo, 27 de abril, 17 de mayo, 24 de junio, 9 de julio, 12 de agosto, 14 de septiembre, 13 de octubre, 11 de noviembre y 13 de diciembre.

1.3.2. TÉCNICA DE RECOGIDA Y EXTRACCIÓN DE LA EDAFOFAUNA

En cada muestreo se recogieron aproximadamente 1.200 cm³ de tierra, en un punto a 3 profundidades distintas (0-15cm, 15-30cm y 30-45cm) (Figura 18).



Figura 18. Recogida de tierra para el estudio de fases post-larvarias de trombicúlidos. Aportación original.

1.3.3. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Para estudiar los artrópodos presentes en las muestras de tierra se utilizó la técnica del embudo de Berlese modificada por Tullgren (Berlese, 1905; Tullgren, 1918). La tierra recogida se colocó sobre una malla fijada a un embudo sobre un vaso colector. Al aplicar un foco de luz que a la vez emitía calor sobre la muestra de tierra se generaba un gradiente de humedad negativo y de temperatura positivo. La fauna del suelo se caracteriza por su afinidad por la humedad y por huir de la luz, por lo que las condiciones generadas por la bombilla en la parte superior (luz, alta temperatura y sustrato seco) resultaban hostiles y provocaban que los artrópodos descendieran hasta el vaso colector, permitiendo su recogida (Figura 19).



Figura 19. Embudos de Berlese-Tullgren empleados para la extracción de ácaros del suelo. Aportación original.

Los embudos fueron diseñados según el fundamento explicado anteriormente y quedaron perfectamente sellados. Las muestras se mantuvieron en ellos de 3 a 5 días y los artrópodos se recogieron en un vaso colector que contenía etanol 70%. Los trombicúlidos extraídos se almacenaron en etanol 70% hasta su posterior procesamiento.

2. CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA

2.1. LARVAS DE TROMBICÚLIDOS

Las larvas recogidas de la vegetación y de las aves se fijaron en etanol 70% y se montaron sobre portaobjetos en medio Faure-Berlese (Entomopraxis S. C. P., Barcelona, España) (Chick, 2011) con ayuda de un microscopio estereoscópico. Posteriormente, se clasificaron de acuerdo a claves morfológicas (Kudryashova, 1998) utilizando un microscopio con óptica de contraste interdifereencial (Nikon Eclipse TiU 100W). Para ello, se determinaron los caracteres morfológicos (medidas estándar) de acuerdo a la nomenclatura y descripciones de Goff *et al.*, 1982. Se tomaron fotografías con una cámara digital (DS-Fi1, NIKON), y se realizaron las correspondientes medidas utilizando un programa de tratamiento de imágenes (Nikon NIS-D Elements). Además, se tomaron imágenes bajo un microscopio electrónico de barrido (Leica TCS SP5).

Esta metodología se puso a punto en nuestro laboratorio gracias a una colaboración con el Dr. Stekolnikov (Instituto Zoológico, Academia de Ciencias Rusa, Universidad de San Petersburgo, Rusia), experto en taxonomía y filogenia de larvas de la familia Trombiculidae.

2.2. ESTADIOS POST-LARVIARIOS DE TROMBICÚLIDOS

Los ejemplares post-larvarios conservados en etanol 70% se transparentaron en líquido de Nesbitt (Entomopraxis S. C. P., Barcelona, España) y se montaron en medio Faure-Berlese (Entomopraxis S. C. P., Barcelona, España) (Chick, 2011) con ayuda de un microscopio estereoscópico.

Se estableció una colaboración con la Dra. Makol (Departamento de Sistemática y Ecología de Invertebrados, Instituto de Biología-Facultad de Medio Ambiente y Ciencias de la Vida, Universidad de Wrocław, Polonia), especializada en la taxonomía y filogenia de los estadios post-larvarios de la familia Trombiculidae. El montaje de los ejemplares se realizó en nuestro laboratorio mientras que la clasificación, basada en claves morfológicas (Crossley, 1960; Wohltmann *et al.*, 2007), se llevó a cabo por la Dra. Makol.

3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

3.1. EXTRACCIÓN DE ADN

Las larvas de trombicúlidos de vegetación y de aves se desinfectaron superficialmente con etanol 70% y se aclararon con agua destilada estéril.

Para la clasificación genética de trombicúlidos de vegetación, el ADN se extrajo individualmente. En aquellos ejemplares de la vegetación en los que se investigó la presencia de bacterias, el ADN se extrajo en lotes de 10 ejemplares. En las larvas retiradas de aves, se extrajo el ADN de los ejemplares retirados de una misma ave (uno o varios).

Para ello, se siguieron las instrucciones del kit comercial QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany), que brevemente se detallan a continuación:

Se añadieron 180 μ l de la solución ATL y 20 μ l de proteinasa K a cada tubo. Se mezclaron con un vortex durante 15 s, se dio un pulso en la microcentrífuga y se incubaron a 56°C durante al menos 3 h, mezclando con un vórtex cada 30 min. Completada la incubación, se dio un pulso en la microcentrífuga para recuperar las gotas que quedaban en la tapa. Se añadieron 200 μ l de la solución AL, se dio un vortex durante 15 s y se incubó a 70°C durante 10 min. Se centrifugó 1 min a 13.000 rpm y se añadieron 200 μ l de etanol 96%. Se agitó con un vortex 15 s y se dio un pulso en la microcentrífuga. Se transfirió todo el contenido a una columna de extracción en un tubo de 2 ml (suministrado en el kit). Se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto. Se transfirió la columna a un tubo de 2 ml limpio y se añadieron 500 μ l de la solución AW1. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto. Se traspasó la columna a un tubo de 2 ml limpio y se añadieron 500 μ l de la solución AW2. Se centrifugó a 13.000 rpm durante 3 minutos y se cambió de nuevo la columna a un tubo limpio de 2 ml, centrifugando a 13.000 rpm durante 1 min. Se depositó la columna de extracción en un tubo estéril de 1,5 ml y se añadieron 100 μ l de la solución AE. Se incubó a temperatura ambiente durante 5 min y se centrifugó a 13.000 rpm durante 2 min. El extracto de ADN se guardó a -20°C hasta su uso.

3.2. CUANTIFICACIÓN DE ADN

Para determinar la concentración de ADN de una muestra, se procedió a la lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro a las longitudes de onda de 260 y 280 nm. A 260 nm, una densidad óptica de una unidad arbitraria de absorbancia corresponde, aproximadamente, a 50 µg/ml de ADN de doble hebra y a 20 µg/ml, si el ADN es monocatenario. El valor del cociente de la lectura de absorbancias medidas a 260 y 280 nm permite estimar la pureza de los ácidos nucleicos. Si este cociente oscila entre 1,8 y 2, el ADN de la muestra es puro y puede emplearse (Sambrook *et al.* 1989).

3.3. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Todas las reacciones de PCR se llevaron a cabo en cabina de PCR en las más estrictas condiciones de esterilidad, de tal forma que la mezcla de la reacción se preparó en una sala y la adición del ADN se llevó a cabo en otra. Del mismo modo, en el caso de reacciones de PCR anidadas o semianidadas, la segunda reacción, en la que se trabajaba con producto amplificado, se realizó en otro laboratorio.

La mayoría de los ensayos de PCR descritos en este apartado se llevaron a cabo siguiendo los protocolos utilizados de rutina en el Laboratorio de Patógenos Especiales (Centro de Rickettsiosis y Enfermedades Transmitidas por Artrópodos Vectores) del Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (CIBIR).

En todas las reacciones de PCR se introdujeron controles positivos y controles negativos. Como controles positivos, se utilizó ADN de *Rickettsia amblyommii* cedido por el Dr. Labruna (Universidad de San Pablo, Brasil); de la cepa Webster de *A. phagocytophilum*, cedida por los Dres. Raoult y Dumler (Unidad de Investigación de Enfermedades Infecciosas y Tropicales Emergentes, Francia y Hospital Johns Hopkins, EE. UU.); de *B. burgdorferi* sensu stricto, cedido por el Dr. Fingerle (Centro Alemán de Referencia Nacional para *Borrelia*, Alemania); de *C. burnetii* obtenido en nuestro laboratorio de la biopsia de un paciente y de *Bartonella henselae* extraído de una pulga de gato (*Ctenocephalides felis*) en nuestro laboratorio. En la PCR de amplio espectro del gen ARNr 16S se utilizó

ADN de *Enterococcus faecalis* obtenido de la biopsia de un paciente en nuestro laboratorio. Para la identificación genética, cuando fue posible se utilizó como control positivo el ADN de un ejemplar de *Ixodes ricinus* recogido de la vegetación en La Rioja.

Como controles negativos se incluyeron, en cada reacción de PCR, un tubo con todos los componentes de la reacción excepto los cebadores, y otro tubo con todos los componentes salvo el ADN. Además, cada 23 muestras se añadió una muestra de agua estéril cuyo ADN se extrajo en paralelo y se incluyó en los ensayos de PCR.

La mezcla de reacción de PCR se preparó en un volumen final de 50 µl, utilizando los componentes y las concentraciones indicadas en la tabla 3.

Tabla 3. Componentes de la reacción de PCR, concentración y volumen de cada uno de ellos.

Componentes (distribuidor)	Concentración del stock	Volumen por reacción	Concentración final de reacción
Cebador directo	50 pmol/µl	1 µl	1 pmol/µl
Cebador inverso	50 pmol/µl	1 µl	1 pmol/µl
BIOTAQ™ ADN polimerasa (Bioline)*	5 U/µl	0,3 µl	0,03 U/µl
Tampón de reacción NH ₄ (10x) (Bioline)		5 µl	(1x)
MgCl ₂ (Bioline)	50 mM	3 µl	3 mM
4 dNTP mix (Bioline)	10 mM	1 µl	0,2 mM
ADN molde	---	1,5 µl-38,7 µl	3 ng/µl
Agua miliQ estéril (Sigma)	---	Hasta completar 50 µl	---

* Con la excepción de los ensayos de PCR que amplifican un fragmento largo de aproximadamente 8 kb (Shao *et al.*, 2005) (ver tabla 4) para el cual se utilizaron los componentes de un kit específico (QIAGEN LongRange), siguiendo las recomendaciones del fabricante.

3.3.1. IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE LARVAS DE TROMBICÚLIDOS

En paralelo a la clasificación morfológica, se trabajó en la búsqueda de un fragmento génico que permitiera la identificación de los trombicúlidos mediante técnicas de biología molecular. Dada nuestra experiencia previa, y puesto que al comienzo de este trabajo apenas existían secuencias nucleotídicas de la familia Trombiculidae disponibles en la base de datos GenBank, se comenzó probando diferentes parejas de cebadores utilizados en la rutina de nuestro laboratorio para la clasificación genética de garrapatas y otros ácaros, como los genes ARNr 12S y ARNr 16S y el espacio intergénico del ARNr 5.8S-28S (*ITS2*). Se utilizaron también como dianas de PCR otros fragmentos del ARN mitocondrial (ARNmt) como el gen citocromo B (*COB*) y el gen que codifica para la subunidad I de la citocromo C oxidasa (*COI*) (Tabla 4).

Tabla 4. Secuencias nucleotídicas de los cebadores de PCR, condiciones de amplificación y tamaños de los amplicones utilizados para la identificación genética.

Secuencia de los cebadores (5' → 3')	Condiciones	Referencia (tamaño del amplicón)
ARNr 12S	94°C 5 min 1 ciclo	
T1B: AA ACTAGGATTAGATACCCT	94°C 15 s	Beati y Keirans, 2001 (338 pb)
T2A: AATGAGAGCGACGGGCGATGT	51°C 30 s	
	68°C 30 s	
	94°C 15 s	
	53°C 30 s	
	70°C 30 s	
	70°C 5 min 1 ciclo	
ARNr 12S (1ª reacción)	94 °C 1 min 1 ciclo	
J-199: TACTATGTTACGACTTAT	92 °C 30 s	Skerratt <i>et al.</i> , 2002 (395 y 355 pb)
N-594: AA ACTAGGATTAGATACCA	40 °C 30 s	
	68 °C 1 min	
ARNr 12S (2ª reacción)	68°C 7 min 1 ciclo	
J-233: AAGAGCGACGGGCGATGTGT		
N-588: AA ACTAGGATTAGATACCCTATTT		

Secuencia de los cebadores (5'→3')	Condiciones	Referencia (tamaño del amplicón)
ARNr 12S	94 °C 2 min 1 ciclo	
12S-F: TTTTCTGGCGGTTTATTACC	92 °C 20 s	Dermauw
12S-R: CGACTTATCTATCAAAAGAGTGACC	53 °C 30 s 35 ciclos	<i>et al.</i> , 2009
	72 °C 1 min	(316 pb)
	72 °C 2 min 1 ciclo	
ARNr 16S	92°C 1 min	
16S+1: TGCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGTGG	48°C 1 min 10 ciclos	
16S-1: CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT	72°C 1,5 min	Black y
	92°C 1 min	Piesman, 1994
	54°C 35 s 32 ciclos	(456 pb)
	72°C 1,5 min	
	72°C 7 min 1 ciclo	
ITS2	95°C 5 min 1 ciclo	
RI-F: CCATCGATGTGAAAYTGCAGGACA	95°C 30s	Zahler <i>et al.</i> ,
RI-R: GTGAATTCTATGCTTAAATTCAGGGGGT	55°C 1 min 35 ciclos	1995
	72°C 1,5 min	(1200 pb)
	72°C 7 min 1 ciclo	
ITS2	95°C 4 min 1 ciclo	
LC1: CGAGTATCGATGAAGAACGCAGC	92°C 1 min	Navajas <i>et al.</i> ,
HC2: ATATGCTTAAGTTCAGCGGG	52°C 1 min 35 ciclos	1992
	72°C 1 min	(805 pb)
	72°C 1 min 1 ciclo	
COI-COB	95 °C 1 min 1 ciclo	
COB-F: TATGCAATTTTGGGATCAATTCCT	95 °C 40 s	Shao <i>et al.</i> ,
COI-R: ATCCGGGCAAATAAGAATATACA	57 °C 45 s 37 ciclos	2005
	68 °C 10 min	(8.511 pb)
	68 °C 10 min 1 ciclo	

Secuencia de los cebadores (5'→3')	Condiciones	Referencia (tamaño del amplicón)
COI-COB	95 °C 1 min 1 ciclo	
COI-F: CTATGTTGTTGCTCATTTCCTACTA	95 °C 40 s	Shao <i>et al.</i> , 2005 (7.713 pb)
COB-R: TAGTAATTACTGTTGCACCTCAAA	57 °C 45 s	
	68 °C 10 min	
	68 °C 10 min 1 ciclo	
COI	95°C 4 min 1 ciclo	
772: TGATTTTTTGGTCACCCAGAAG	92°C 1 min	Söller <i>et al.</i> , 2001 (334 pb)
773: TACAGCTCCTATAGATAAAAC	50°C 1 min	
	72°C 1 min	
	72°C 5 min 1 ciclo	
COI	95°C 1 min 1 ciclo	
LCO: GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	95°C 1 min	Folmer <i>et al.</i> , 1994 (701 pb)
HCO: TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	40°C 1 min	
	72°C 1,5 min	
	72°C 7 min 1 ciclo	
COI	94°C 1 min 1 ciclo	
LepF: ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG	94°C 1 min	Young <i>et al.</i> , 2012 (658 pb)
LepR: TAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA	45°C 1,5 min	
	72°C 1,5 min	
	94°C 1 min	
	50°C 1,5 min	
	72°C 1,5 min	
	72°C 5 min 1 ciclo	

Y: C/T

3.3.2. DETECCIÓN DE BACTERIAS EN LARVAS DE TROMBICÚLIDOS

Para la detección de bacterias en las larvas de trombicúlidos se emplearon reacciones de PCR que amplificaban el gen ARNr 16S, así como fragmentos génicos de *Rickettsia* spp., *A. phagocytophilum*, *Borrelia* spp., *C. burnetii*, *Bartonella* spp. y *O. tsutsugamushi*.

3.3.2.1. ARNr 16S universal de bacterias

En la tabla 5 se detallan las condiciones de PCR para la amplificación del gen ARNr 16S universal de bacterias.

Tabla 5. Secuencia nucleotídica de los cebadores de PCR y condiciones de amplificación del gen ARNr 16S universal de bacterias.

Secuencia de los cebadores (5' → 3')	Condiciones	Referencia (tamaño del amplión)
ARNr 16S	95°C 10 min 1 ciclo	
fD1: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	95°C 30 s	Weisburg <i>et al.</i> , 1991 (1.500 pb)
rP2: ACGGCTACCTTGTTACGACTT	53°C 30 s	
	72°C 90 s	
	72°C 3 min 1 ciclo	

3.3.2.2. *Rickettsia* spp.

Para llevar a cabo la amplificación de *Rickettsia* spp. se utilizaron cebadores específicos para los genes *ompA*, *ompB*, *gltA* y *htrA* de dicho género bacteriano, que codifican un antígeno de superficie de 190 kDa y 120 kDa, la enzima citrato sintasa y una proteína antigénica de 17 kDa, respectivamente (Tabla 6).

Tabla 6. Secuencia nucleotídica de los cebadores de PCR y condiciones de amplificación de los genes *ompA*, *ompB*, *gltA* y *htrA* del género *Rickettsia*.

Secuencia de los cebadores (5'→3')	Condiciones	Referencia (tamaño del amplicón)
<i>ompA</i> (1ª reacción)	95°C 3 min 1 ciclo	
Rr190.70: ATGGCGAATATTTCTCCAAAA	95°C 20 s	Regnery <i>et al.</i> , 1991 (631 pb)
Rr190.701: GTTCCGTTAATGGCAGCATCT	46°C 30 s 35 ciclos	
	63°C 1 min	
	72°C 7 min 1 ciclo	
<hr/>		
<i>ompA</i> (2ª reacción)	96°C 2 min 1 ciclo	
Rr190.70: ATGGCGAATATTTCTCCAAAA	94°C 30 s	Roux <i>et al.</i> , 1996 (532 pb)
Rr190.602: AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT	49°C 30 s 35 ciclos	
	72°C 45 s	
	72°C 7 min 1 ciclo	
<hr/>		
<i>ompB</i> (1ª reacción)	95°C 5 min 1 ciclo	
OF: GTAACCGGAAGTAATCGTTTCGTAA	95°C 15 s	Choi <i>et al.</i> , 2005 (511 pb)
OR: GCTTTATAACCAGCTAAACCACC	54°C 15 s 35 ciclos	
	72°C 30 s	
	72°C 3 min 1 ciclo	
<hr/>		
<i>ompB</i> (2ª reacción)*	95°C 5 min 1 ciclo	
SFG-IF: GTTTAATACGTGCTGCTAACCAA	95°C 15 s	Choi <i>et al.</i> , 2005 (420/230 pb)
TG-IF: AAGATCCTTCTGATGTTGCAACA	56°C 15 s 35 ciclos	
SFG/TG-IR: GGTTTGGCCCATATACCATAAG	72°C 30 s	
	72°C 3 min 1 ciclo	
<hr/>		
<i>gltA</i> (región central) (1ª reacción)	95°C 1 min 1 ciclo	
CS.877p: GGGGGCCTGCTCACGGCGG	95°C 20 s	Regnery <i>et al.</i> , 1991; Choi <i>et al.</i> , 2005 (381 pb)
CS.1258n: ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA	49°C 30 s 35 ciclos	
	60°C 2 min	
	60°C 7 min 1 ciclo	

Secuencia de los cebadores (5' → 3')	Condiciones	Referencia (tamaño del amplicón)
<i>gltA</i> (región central) (2ª reacción)	95°C 5 min 1 ciclo	Regnery <i>et al.</i> , 1991; Choi <i>et al.</i> , 2005 (337 pb)
CS.896p: GGCTAATGAAGCAGTGATAA	95°C 15 s	
CS.1233n: GCGACGGTATACCCATAGC	54°C 15 s 35 ciclos	
	72°C 30 s	
	72°C 3 min 1 ciclo	
<i>gltA</i> (extremo 5')	95°C 3 min 1 ciclo	Labruna <i>et al.</i> , 2004 (401 pb)
78: GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT	95°C 15 s	
323: GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT	48°C 30 s 40 ciclos	
	72°C 30 s	
	72°C 7 min 1 ciclo	
<i>htrA</i>	94°C 3 min 1 ciclo	Oliveira <i>et al.</i> , 2002; Webb <i>et al.</i> , 1990 (434 pb)
17kDa-1: GCTCTTGCAACTTCTATGTT	94°C 1 min	
17kDa-2: CATTGTTTCGTCAGGTTGGCA	48°C 5 min 35 ciclos	
	72°C 2 min	
	72°C 5 min 1 ciclo	

*Para la detección del gen *ompB* de *Rickettsia* del Grupo Fiebres Manchadas se utilizaron los cebadores SFG-IF y SFG/TG-IR. Para la detección del gen *ompB* de *Rickettsia* del Grupo Tifus se utilizaron los cebadores TG-IF y SFG/TG-IR.

3.3.2.3. *Anaplasma phagocytophilum*

Se llevaron a cabo reacciones de PCR utilizando cebadores específicos del gen *msp2* (proteína mayor de superficie) y del gen ARNr 16S de *A. phagocytophilum*. (Tabla 7).

Tabla 7. Secuencia nucleotídica de los cebadores de PCR y condiciones de amplificación para *Anaplasma phagocytophilum*.

Secuencia de los cebadores (5'→3')	Condiciones	Referencia (tamaño del amplicón)
<i>msp2</i>	94°C 4 min 1 ciclo	Zeidner <i>et al.</i> , 2000; (334 pb)
msp3F: CCAGCGTTTAGCAAGATAAGAG	94°C 30 s	
msp3R: GCCCAGTAACAACATCATAAGC	55°C 30 s 40 ciclos	
	72°C 1 min	
	72°C 5 min 1 ciclo	
ARNr 16S (1ª reacción)	95°C 2min 1 ciclo	Massung <i>et al.</i> , 1998 (932 pb)
g3a: CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC	94°C 30 s	
g10r: TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC	55°C 30 s 40 ciclos	
	72°C 1 min	
	72°C 5 min 1 ciclo	
ARNr 16S (2ª reacción)	95°C 2min 1 ciclo	Massung <i>et al.</i> , 1998 (546 pb)
ge9f: AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCT	94°C 30 s	
ge2: GGCAGTATTAAGCAGCTCCAGG	55°C 30 s 30 ciclos	
	72°C 1 min	
	72°C 5 min 1 ciclo	

3.3.2.4. *Borrelia* spp.

Se realizaron ensayos de PCR utilizando como diana un fragmento del gen de la flagelina (*flaB*) y del espacio intergénico 5S-23S del ARNr de *Borrelia* spp. (Tabla 8).

Tabla 8. Secuencia nucleotídica de los cebadores de PCR y condiciones de amplificación de *Borrelia* spp.

Secuencia de los cebadores (5'→3')	Condiciones	Referencia (tamaño del amplicón)
<i>flaB</i> (1ª reacción)	95°C 1min 1 ciclo	
flaB1: AARGAATTGGCAGTTCAATC	94°C 30 s	Clark <i>et al.</i> , 2005 (497 pb)
flaB2: GCATTTTCWATTTTAGCAAGTGATG	52°C 30 s	
	68°C 45 s	
	72°C 5 min 1 ciclo	
<hr/>		
<i>flaB</i> (2ª reacción)	95°C 1min 1 ciclo	
flaB3: ACATATTCAGATGCAGACAGAGGTTCTA	94°C 30 s	Clark <i>et al.</i> , 2005 (389 pb)
flaB4: GAAGGTGCTGTAGCAGGTGCTGGCTGT	55°C 30 s	
	68°C 45 s	
	72°C 5 min 1 ciclo	
<hr/>		
5S-23S ARNr (1ª reacción)	94°C 3 min 1 ciclo	
23SC1: TAAGCTGACTAATACTAATTACCC	94°C 30 s	Rijpkema <i>et al.</i> , 1995 (380 pb)
23SN1: ACCATAGACTCTTATTACTTTGAC	52°C 30 s	
	72°C 1 min	
	72°C 5 min 1 ciclo	
<hr/>		
5S-23S ARNr (2ª reacción)	94°C 5 min 1 ciclo	
5SCB: GAGAGTAGGTTATTGCCAGGG	94°C 30 s	Rijpkema <i>et al.</i> , 1995 (226 pb)
23SN2: ACCATAGACTCTTATTACTTTGACCA	55°C 30 s	
	72°C 1 min	
	72°C 5 min 1 ciclo	

R = A/G; W= A/T

3.3.2.5. *Coxiella burnetii*

Se llevaron a cabo reacciones de PCR utilizando cebadores específicos del gen de la enzima superóxido dismutasa (*htpA*) y de la secuencia de inserción IS1111 de *C. burnetii* (Tabla 9).

Tabla 9. Secuencia nucleotídica de los cebadores de PCR y condiciones de amplificación de *Coxiella burnetii*.

Secuencia de los cebadores (5'→3')	Condiciones	Referencia (tamaño del amplicón)
<i>htpA</i>	95 °C 2 min 1 ciclo	
CB-1: ACTCAACGCACTGGAACCGC	95°C 20 s	Stein y Raoult, 1992 (257 pb)
CB-2: TAGCTGAAGCCAATTCGCC	50°C 1 min 30 ciclos	
	72°C 2 min	
	72°C 5 min 1 ciclo	
IS1111 “touchdown PCR”	94°C 30 s	Willems <i>et al.</i> , 1994 (687 pb)
Trans1: TATGTATCCACCGTAGCCAGTC	66-61°C 1 min 1 ciclo	
Trans2: CCCAACAACACCTCCTTATTC	72°C 1 min	
	94°C 30 s 35 ciclos	
	60°C 1 min	
	72°C 1 min	
	72°C 5 min 1 ciclo	

3.3.2.6. *Bartonella* spp.

Se realizaron ensayos de PCR utilizando como dianas el gen de la subunidad beta de la ARN polimerasa (*rpoB*) y el espacio intergenico 16S-23S del ARNr (*ITS*) de *Bartonella* spp. (Tabla 10).

Tabla 10. Secuencia nucleotídica de los cebadores de PCR y condiciones de amplificación de *Bartonella* spp.

Secuencia de los cebadores (5'→3')	Condiciones	Referencia (tamaño del amplicón)
<i>rpoB</i>	94°C 2 min 1 ciclo	
1400F: CGCATTGGCTTACTTCGTATG	94°C 30 s	Renesto <i>et al.</i> , 2001 (825 pb)
2300R: GTAGACTGATTAGAACGCTG	53°C 30 s 35 ciclos	
	72°C 1 min	
	72°C 2 min 1 ciclo	

Secuencia de los cebadores (5'→3')	Condiciones	Referencia (tamaño del amplicón)
<i>ITS</i>	20°C 10 min 1 ciclo	Jensen <i>et al.</i> , 2000
302p: CTCTTCGTTTCTCTTTCTTCA	95°C 2 min	<i>B. bacilliformis</i> (211pb)
473n: AACCAACTGAGCTACAAGCC	95°C 1 min 45 ciclos	<i>B. clarridgeiae</i> (154 pb)
	60°C 1min	<i>B. elizabethae</i> (241 pb)
	72°C 30 s 1 ciclo	<i>B. henselae</i> (172 pb)
		<i>B. quintana</i> (157 pb)
		<i>B. vinsonii</i> (260 pb)

3.3.2.7. *Orientia tsutsugamushi*

Se llevó a cabo una PCR anidada del gen *TSA*, que codifica un antígeno de superficie de 56 KDa (Tabla 11).

Tabla 11. Secuencia nucleotídica de los cebadores de PCR y condiciones de amplificación de *Orientia tsutsugamushi*.

Secuencia de los cebadores (5'→3')	Condiciones	Referencia (tamaño del amplicón)
<i>TSA</i> (1ª reacción)	94°C 5 min 1 ciclo	
F6: GTTGGAGGAATGAATTACTGG	94°C 30 s	Lin <i>et al.</i> , 2011 (806 pb)
R6: AGCGCTAGGTTTATTAGCAT	57°C 2 min 30 ciclos	
	70°C 2 min	
	72°C 5 min 1 ciclo	
<i>TSA</i> (2ª reacción)	94°C 5 min 1 ciclo	
F7: AGGATTAGAGTGTGGTCCTT	94°C 30 s	Lin <i>et al.</i> , 2011 (653 pb)
R7: ACAGATGCACTATTGGCAA	57°C 2 min 30 ciclos	
	70°C 2 min	
	72°C 5 min 1 ciclo	

3.4. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA

Para la visualización de los fragmentos amplificados por PCR, se utilizó la técnica de electroforesis horizontal en gel de agarosa. Los geles se prepararon con agarosa (Pronadisa) a una concentración en el rango 0,8-1,2% en tampón TBE [54 g/l Tris (hidroximetil) aminometano; 27,5 g/l ácido bórico; 20 ml EDTA 0,5 M, pH8] y bromuro de etidio (Bio-Rad) a una concentración final de 0,5 g/ml. Cada muestra se preparó mezclando 5 µl de ADN con 2 µl de tampón de carga [sacarosa 40% (p/V); azul de bromofenol 0,25% (p/V); xilene cianol 0,25% (p/V)]. Se utilizaron los marcadores de peso molecular Hyperladder IV y V (Bioline) y High DNA Mass Ladder (Life Technologies), según el tamaño del amplicón. Una vez cargadas las muestras en el gel, éste se sumergió completamente en tampón TBE en la cubeta de electroforesis. El ADN migró a 80-100 voltios desde el polo negativo al positivo durante el tiempo necesario para la separación adecuada de los fragmentos de interés. Cuando el frente de la carrera alcanzó el 75-100% de la longitud del gel, éste se visualizó en un transiluminador a 340 nm, y se fotografió con un sistema captador de imágenes Gel DocTM XR, (BioRad) mediante el software Quantity One.

3.5. SECUENCIACIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS POSITIVOS

Las muestras positivas se purificaron y secuenciaron en la Unidad de Diagnóstico Molecular (CIBIR). Las secuencias nucleotídicas obtenidas se analizaron utilizando el editor de secuencias biológicas BioEdit (<<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>>) y se compararon con las disponibles en la base de datos GenBank usando el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), disponible en <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Los alineamientos de secuencias se llevaron a cabo con la herramienta ClustalW2 (<<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>>).

3.6. INCORPORACIÓN DE SECUENCIAS A LA BASE DE DATOS GENBANK

En los casos en que por su carácter novedoso se consideró oportuno, las secuencias nucleotídicas y su traducción a proteínas se depositaron en GenBank empleando el programa Sequin (<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sequin/>>).

4. DESCRIPCIÓN DE CASOS HUMANOS Y CANINOS

4.1. CASOS HUMANOS

Con el objeto de captar el mayor número posible de casos para realizar una correcta descripción clínica se editaron dípticos y carteles (Anexos I y II) que fueron distribuidos por los Centros de Salud y Consultorios de Salud de La Rioja (Figura 20 a y b). En ellos se avisaba del riesgo de padecer esta afección en las salidas al campo en las zonas de riesgo y se explicaban los principales signos y síntomas. Además, se facilitaba un teléfono de contacto y una dirección de correo electrónico en caso de que se requiriera información adicional o valoración clínica.



Figura 20. a) Dípticos en el Centro de Salud de Ortigosa de Cameros. b) Cartel en La Venta de Piqueras (Lumbreras). Aportación original.

Así, se llevó a cabo una búsqueda prospectiva de personas con cuadros caracterizados por lesiones cutáneas eritematosas pruriginosas en la época y lugar compatibles con trombiculiasis. Se reclutaron los pacientes que acudieron al

Departamento de Enfermedades Infecciosas del Hospital San Pedro y las personas que se pusieron en contacto con nosotros refiriendo sintomatología similar y antecedente de contacto con vegetación. A todos ellos se les explicó en qué consistía el estudio y cada paciente leyó y firmó el consentimiento informado. En la primera visita se realizó una anamnesis exhaustiva de cada caso y se invitó a cada paciente a rellenar una encuesta clínico-epidemiológica (Anexo III) y a la toma de fotografías de las lesiones cutáneas. En los casos en los que fue necesario se llevó a cabo el seguimiento de los pacientes en consulta.

4.2. CASOS CANINOS

Además de difundir información sobre los casos de trombiculiasis canina en los dípticos y los carteles indicados arriba, se realizó una búsqueda prospectiva de casos mediante el contacto con clínicas veterinarias de La Rioja. Tanto los dueños de los animales afectados como los veterinarios fueron informados de los objetivos del estudio. Una vez autorizado, para cada caso se completó un formulario con los datos clínicos de interés (Anexo IV).

RESULTADOS

1. RECOGIDA Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS

1.1. MUESTREOS DE LARVAS DE TROMBICÚLIDOS EN VEGETACIÓN

Durante 2008, 2009 y 2010 se recogieron 23.393 trombicúlidos en los 50 muestreos realizados sobre la vegetación en La Pineda. La técnica de arrastre no permitió conocer la distribución exacta de los trombicúlidos en la vegetación. Sin embargo, con la técnica de captura directa se puso de manifiesto que la mayoría de las larvas de trombicúlidos se situaban en los ápices de plantas herbáceas, como *Brachypodium* sp., entre 15-40 cm de altura, y en ramas secas de pinos (*P. sylvestris*) a 25-50 cm del suelo, entre otros tipos vegetales (Figura 21).







Figura 21. Grupos de larvas de trombicúlidos en la vegetación de La Pineda. Aportación original.

A continuación se detallan los resultados de los muestreos realizados durante los 3 años de estudio.

1.1.1. AÑO 2008

El 21 de agosto de 2008 fue el primer día de muestreo en el que se recogieron larvas de trombicúlidos de la vegetación (n=25). El sumatorio de trombicúlidos de los 14 muestreos realizados ascendió a 4.707 ejemplares. De ellos, se recogieron

Resultados

886 y 1.208 larvas en los puntos fijo y variable, respectivamente, mediante la técnica de arrastre, y 2.613 larvas utilizando la técnica de captura directa. Ver tabla 12 y figura 22.

Tabla 12. Larvas de trombicúlidos recogidas en los muestreos realizados durante 2008.

Fecha (día-mes-año)	Número de larvas			
	Punto fijo	Punto variable	Captura directa	Total
14-08-08	0	0	0	0
21-08-08	2	3	20	25
28-08-08	59	42	97	198
04-09-08	63	86	292	441
11-09-08	81	107	271	459
18-09-08	87	168	323	578
25-09-08	141	178	324	643
03-10-08	123	163	221	507
10-10-08	109	142	372	623
17-10-08	95	135	314	544
21-10-08	68	96	329	493
27-10-08	47	61	35	143
04-11-08	11	27	15	53
12-11-08	0	0	0	0
TOTAL	886	1.208	2.613	4.707

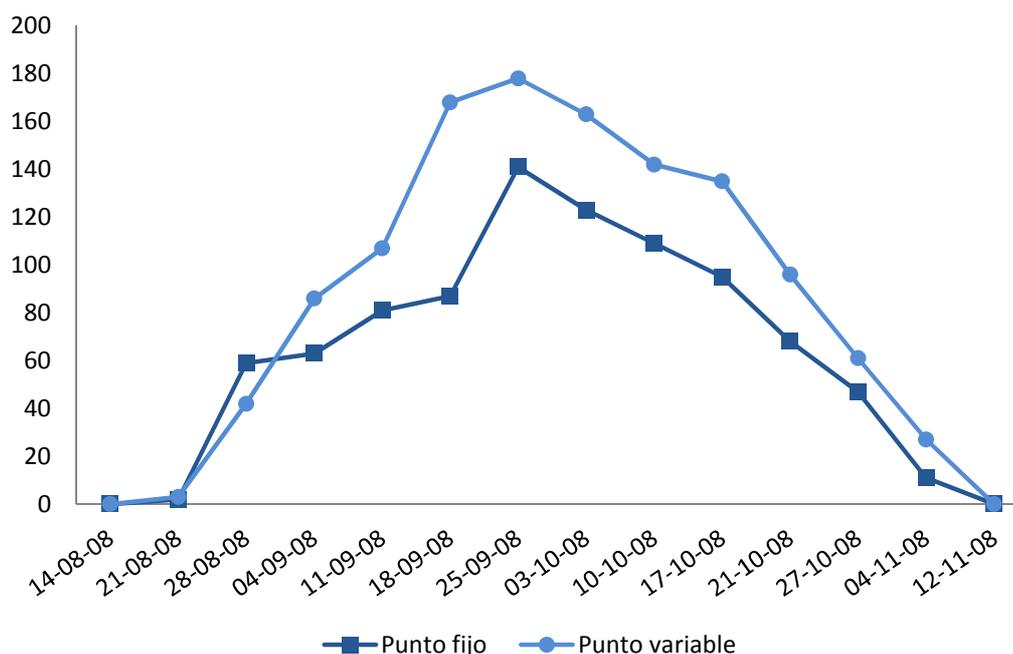


Figura 22. Larvas de trombicúlidos recogidas en el punto fijo y en el punto variable mediante la técnica de arrastre durante 2008.

1.1.2. AÑO 2009

Durante 2009, las primeras larvas de la vegetación ($n=12$) se recogieron en el muestreo del día 19 de agosto de 2009. Como resultado de los 18 muestreos realizados se obtuvo un total de 5.232 larvas. De éstas, 876 se recogieron utilizando la técnica de arrastre en el punto fijo, 1.163 en el punto variable, y 3.193 mediante la técnica de captura directa. Ver tabla 13 y figura 23.

Tabla 13. Larvas de trombicúlidos recogidas en los muestreos realizados durante 2009.

Fecha (día-mes-año)	Número de larvas			
	Punto fijo	Punto variable	Captura directa	Total
12-08-09	0	0	0	0
19-08-09	0	4	7	12
26-08-09	1	4	14	18
02-09-09	70	47	61	178
09-09-09	86	198	154	438
15-09-09	105	223	286	614
23-09-09	171	190	658	1019

Fecha (día-mes-año)	Número de larvas			Total
	Punto fijo	Punto variable	Captura directa	
29-09-09	149	176	139	464
08-10-09	132	109	489	730
15-10-09	61	58	175	294
23-10-09	54	47	441	542
29-10-09	26	24	558	608
05-11-09	2	22	151	175
13-11-09	1	16	25	42
19-11-09	14	3	15	32
24-11-09	2	17	20	39
02-12-09	2	25	nr	27
10-12-09	0	0	0	0
TOTAL	876	1.163	3.193	5.232

nr: no recogidas

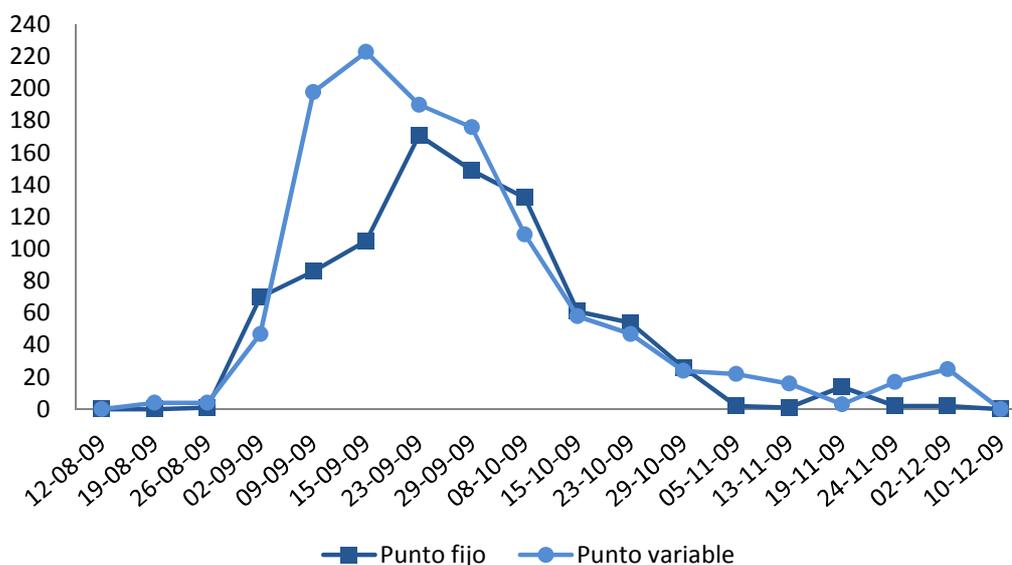


Figura 23. Larvas de trombicúlidos recogidas en el punto fijo y en el punto variable mediante la técnica de arrastre durante 2009.

1.1.3. AÑO 2010

En el muestreo del día 31 de agosto del 2010, se recogieron las primeras larvas de la vegetación (n=5). En total, se recolectaron 13.454 larvas durante los 18 muestreos realizados, 1.112 y 2.851 ejemplares mediante la técnica de arrastre, en

los puntos fijo y variable, respectivamente, y 9.491 individuos recogidos por captura directa. Ver tabla 14 y figura 24.

Tabla 14. Larvas de trombicúlidos recogidas en los muestreos realizados durante 2010.

Fecha (día-mes-año)	Número de larvas			Total
	Punto fijo	Punto variable	Captura directa	
24-08-10	0	0	0	0
31-08-10	0	5	0	5
07-09-10	5	30	121	156
14-09-10	8	21	260	289
19-09-10	35	58	266	359
27-09-10	75	35	1277	1387
02-10-10	114	215	1620	1949
13-10-10	220	477	940	1637
19-10-10	280	310	790	1380
29-10-10	197	341	1650	2188
04-11-10	71	482	2567	3120
11-11-10	46	153	nr	199
16-11-10	5	188	nr	193
24-11-10	16	265	nr	281
01-12-10	32	72	nr	104
13-12-10	5	138	nr	143
20-12-10	3	61	nr	64
28-12-10	0	0	0	0
TOTAL	1.112	2.851	9.491	13.454

nr: no recogidas

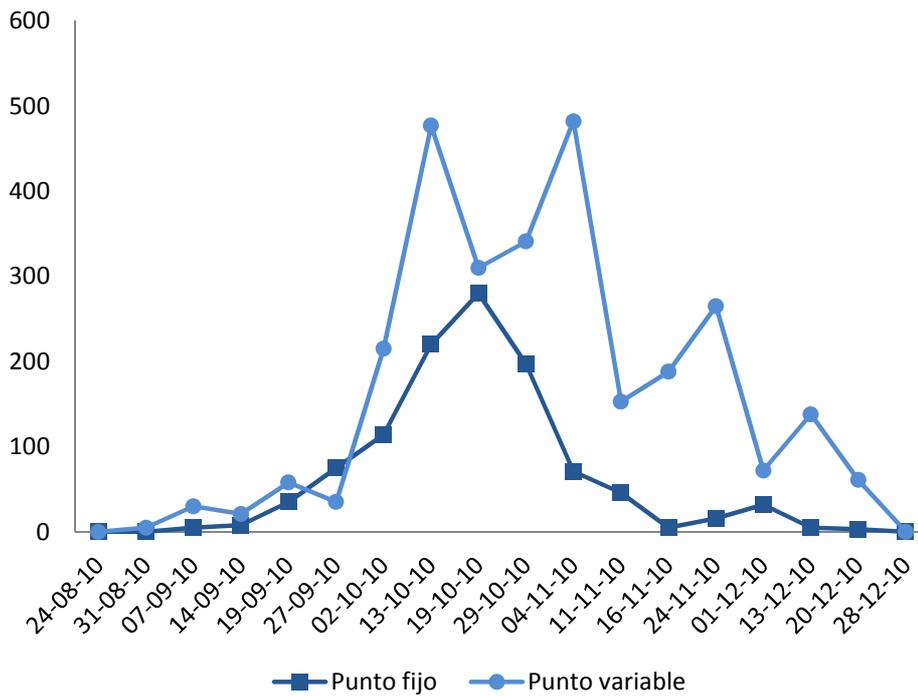


Figura 24. Larvas de trematocidos recogidas en el punto fijo y en el punto variable mediante la técnica de arrastre durante 2010.

En la figura 25 se muestran los datos totales de trematocidos recogidos en el punto fijo y en la figura 26, los del punto variable, para 2008, 2009 y 2010. En La Pineda, utilizando la técnica de arrastre se recogieron 2.874 larvas en el punto fijo y 5.222 en el punto variable, mientras que mediante captura directa se obtuvo un total de 15.297 larvas.

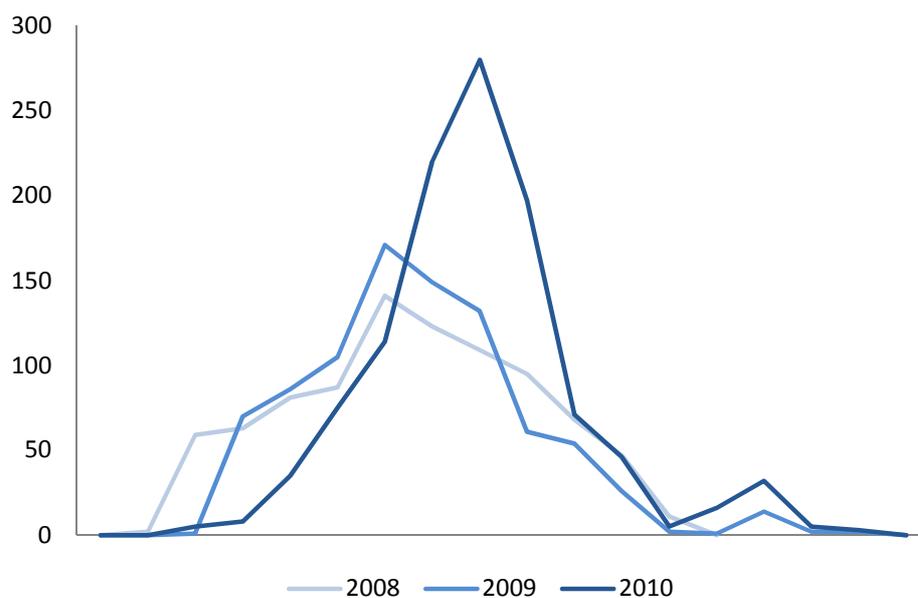


Figura 25. Larvas de trombicúlidos recogidas mediante la técnica de arrastre en el punto fijo durante los tres años de muestreo (2008-2010).

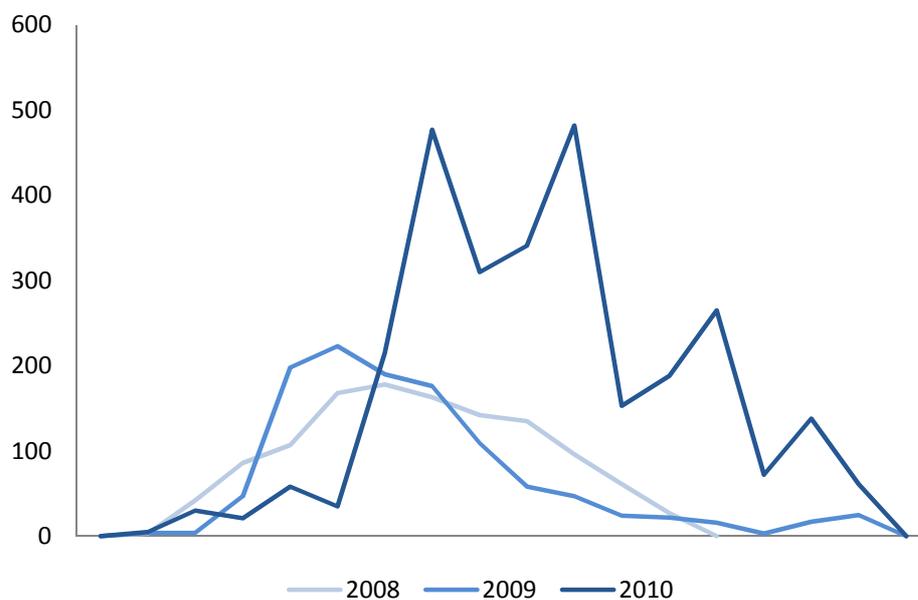


Figura 26. Larvas de trombicúlidos recogidas mediante la técnica de arrastre en el punto variable durante los tres años de muestreo (2008-2010).

Con los muestreos realizados en otras zonas de interés, se confirmó la presencia de larvas de trombicúlidos en la vegetación en los alrededores de la Venta de Piqueras y Valdecalvo (Lumbreras), Ajamil de Cameros, Fuente Tosca (Ocón) y Villavelayo (ver tabla 15, figura 27). Estas zonas son parajes de bosques de pino

silvestre, rebollares (*Quercus pirenaica*), hayedos (*Fagus sylvatica*) y bosques mixtos. En estos muestreos se recogieron 7.289 larvas de trombicúlidos.

Tabla 15. Larvas de trombicúlidos recogidas en zonas de interés, excluida La Pineda.

Paraje	Fechas (día-mes-año)	Número de larvas
Venta de Piqueras	15-10-09	1.053
	19-10-09	1.203
	4-11-10	897
Valdecalvo	15-10-09	683
	19-10-09	607
	4-11-10	365
Ajamil de Cameros	7-10-10	437
Fuente Tosca (Ocón)	7-10-10	932
Villavelayo	4-11-10	1.112

En la figura 27 se detallan los municipios de La Rioja en los que se recogieron larvas de trombicúlidos en la vegetación. La figura 28 muestra imágenes de algunos de los lugares en los que se encontraron estas larvas.

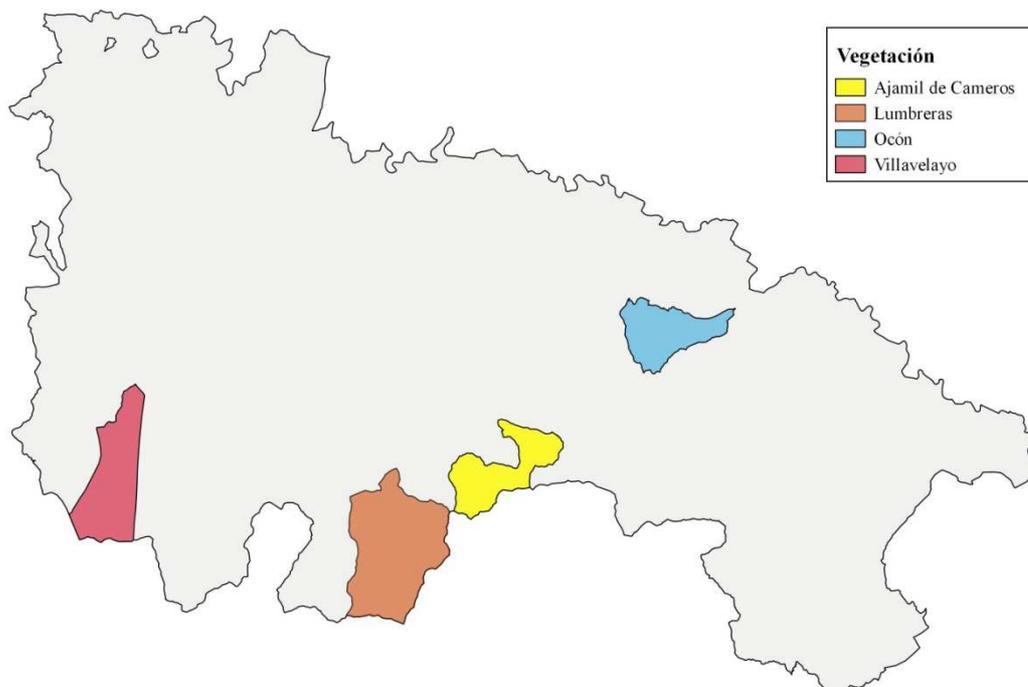


Figura 27. Mapa de La Rioja con los lugares donde se han encontrado larvas de trombicúlidos en la vegetación. Modificado de www.iderioja.larioja.org.



Figura 28. a) Hayedo y b) Pinar, en Villavelayo. c) Rebollar en Fuente Tosca (Ocón). d) Bosque mixto en la Venta de Piqueras (Lumbreras). Aportación original.

1.2. MUESTREOS DE LARVAS DE TROMBICÚLIDOS EN AVES

Coincidiendo con el anillamiento de aves se retiraron 41 larvas de trombicúlicos de 16 ejemplares, correspondientes a las siguientes especies: *Erithacus rubecula* o petirrojo europeo (n=11), *Garrulus glandarius* o arrendajo (n=1), *Turdus philomelos* o zorzal común (n=2) y *Fringilla coelebs* o pinzón vulgar (n=2). Veintisiete larvas estaban poco alimentadas y 14 alimentadas (Tabla 16).

Tabla 16. Larvas de trombicúridos y grado de engorde de las mismas recogidas de cada ejemplar de ave en los anillamientos.

Fecha (día-mes-año)	Número y especie de aves	Larvas de trombicúridos (n=41)		
		n	n/ejemplar de ave	Grado de engorde (n)
22-11-09	2 <i>Erithacus rubecula</i>	2	1	poco alimentada (2)
23-01-10	2 <i>Turdus philomelos</i>	4	2	poco alimentada (4)
19-09-10	8 <i>Erithacus rubecula</i>	29	1-7	poco alimentada (18) alimentada (11)
	2 <i>Fringilla coelebs</i>	2	1	poco alimentada (2)
	1 <i>Garrulus glandarius</i>	3	3	alimentada (3)
16-10-10	1 <i>Erithacus rubecula</i>	1	1	poco alimentada (1)

A excepción de 3 larvas retiradas de 3 ejemplares de un petirrojo y 4 larvas de 2 zorzales comunes capturados en Santa Eulalia, las 34 larvas restantes procedían de los muestreos de La Pineda (Figura 29). Las larvas se encontraron adheridas a las aves alrededor de los ojos y la cloaca (Figura 30).

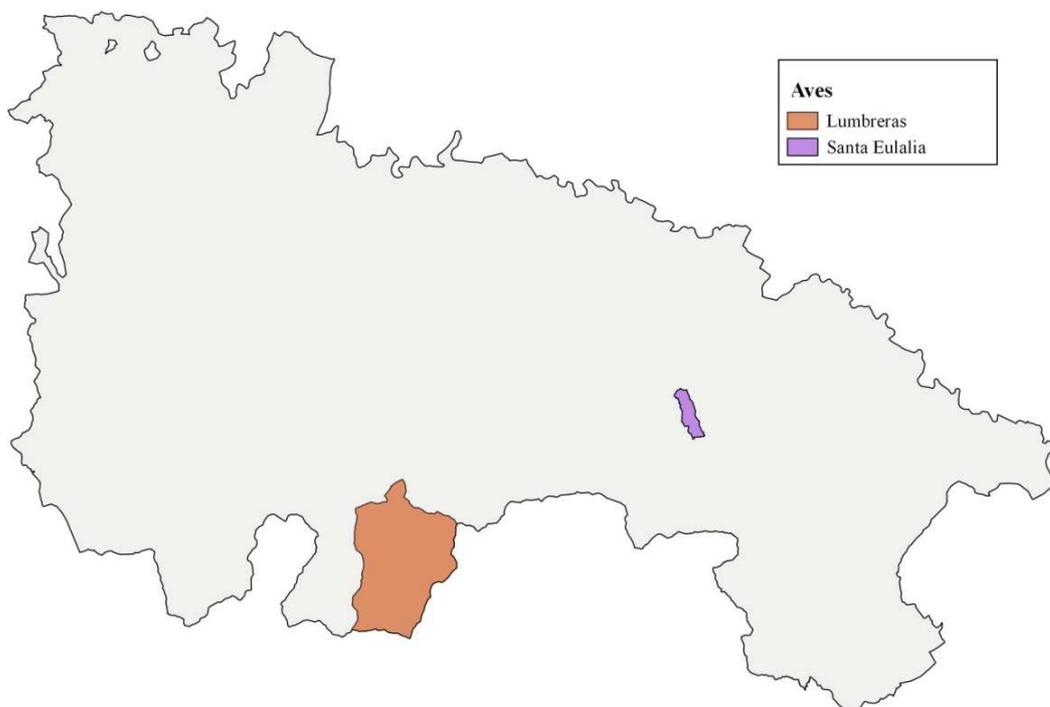
**Figura 29.** Mapa de La Rioja con los lugares donde se han recogido larvas de trombicúridos de aves. Modificado de www.iderioja.larioja.org.



Figura 30. Larvas de trombicúlidos alimentándose en la zona de la cloaca de un petirrojo europeo (*Erithacus rubecula*) capturado en La Pineda. Aportación original.

1.3. MUESTREOS DE ESTADIOS POST-LARVIARIOS DE TROMBICÚLIDOS EN EL SUELO

Durante 2008 y 2009 no se encontraron trombicúlidos en las muestras de tierra analizadas. Por el contrario, se obtuvieron 10 ejemplares de trombicúlidos en estadios post-larvarios de las muestras de tierra recogidas durante 2010. Los datos de fechas, número de ejemplares y profundidad a la que fueron encontrados se muestran en la tabla 17.

Tabla 17. Datos de los muestreos de estadios post-larvarios de trombicúlidos en el suelo.

Fecha (día-mes-año)	Número de trombicúlidos	Profundidad (cm)
14-05-10	4	30-45
24-06-10	2	30-45
28-07-10	4	1-15

2. CLASIFICACIÓN MORFOLÓGICA

2.1 LARVAS DE TROMBICÚLIDOS

2.1.1. LARVAS RECOGIDAS DE LA VEGETACIÓN

Dado que el montaje de las larvas de trombicúlidos previo a su clasificación morfológica puede afectar negativamente a los resultados de las técnicas de biología molecular, se clasificó aproximadamente un 10% de los ejemplares recogidos durante los tres años de muestreos en vegetación. Así, se seleccionaron al azar 3.000 especímenes recogidos en La Pineda (n=2.300), la Venta de Piqueras (n=300), Valdecalvo (n=160), Villavelayo (n=110), Fuente Tosca (n=90) y Ajamil de Cameros (n=40). Todos los ejemplares se clasificaron como larvas sin alimentar de *N. inopinata* (Figuras 31 y 32).



Figura 31. Larva de *Neotrombicula inopinata* vista al microscopio óptico. Aportación original.

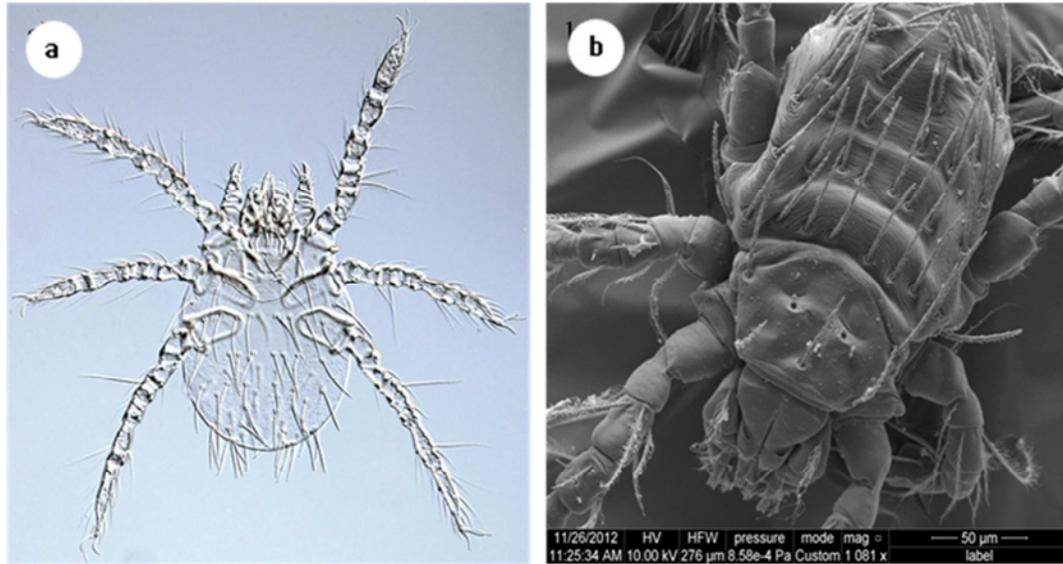


Figura 32. a) Larva de *Neotrombicula inopinata* vista al microscopio óptico con óptica de contraste interdifereencial y b) Larva de *N. inopinata* vista al microscopio electrónico de barrido. Aportación original.

La especie *N. inopinata* se caracteriza por poseer la seta galeal lisa (situada en el lóbulo del hipostoma entre la sérrula del quelícero y el palpo, a cada lado), setas ramificadas en el fémur y la gena del palpo, setas dorsales y laterales lisas y seta ventral ramificada en la tibia del palpo, 3 setas genuales y 1 seta microgenua I (setas lisas de la gena de las patas), presencia de una seta lisa larga en el tarso de la pata III (*mastitarsala*), 2 setas humerales (setas dorsales del margen más anterior del idiosoma) y entre 36-45 setas dorsales del idiosoma organizadas en (6-11)-(8-13)-(6-10)-(2-10)-(2-9)-(0-6), con la variación típica 8-8-8(6)-4-6-2.

En la figura 33 se reflejan las principales medidas necesarias para la clasificación de las larvas de trombicúlidos sobre una imagen de *N.inopinata*.

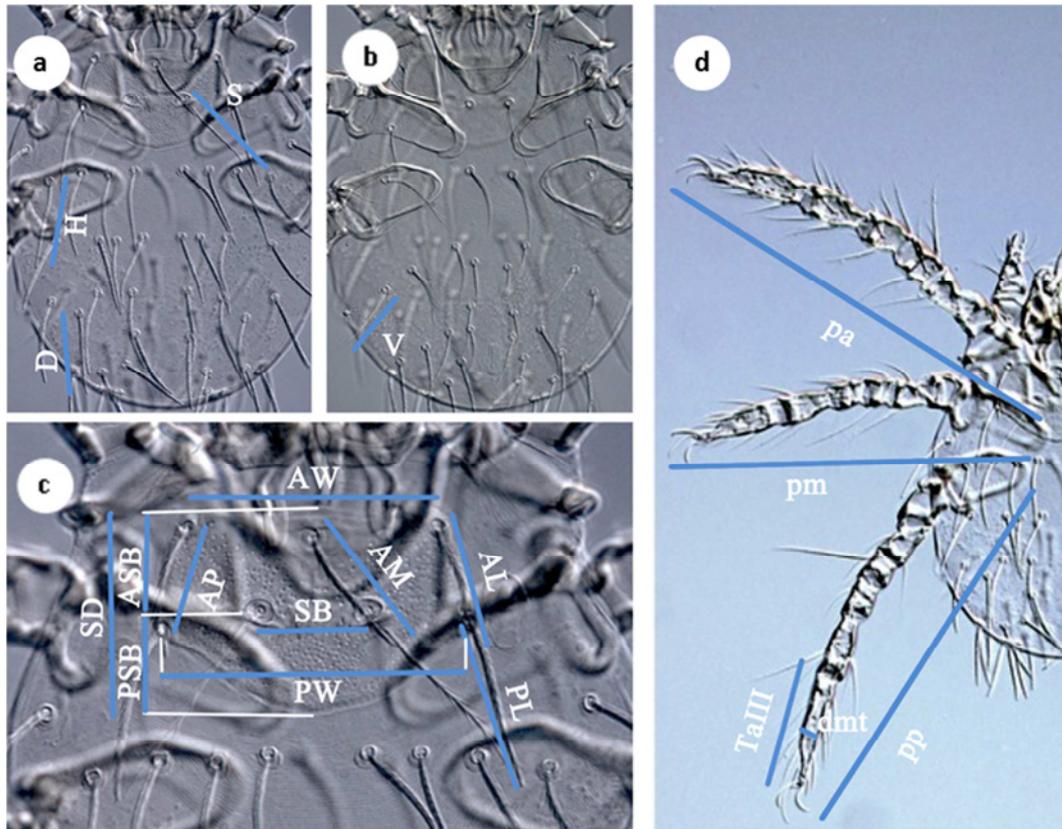


Figura 33. Vista dorsal (a), ventral (b), detalle del escudo (c) y detalle de las patas (d) de un ejemplar de *Neotrombicula inopinata*. Detalle de algunas de las medidas requeridas para su clasificación morfológica. Aportación original.

AW: distancia entre las setas anterolaterales del escudo; PW: distancia entre las setas posterolaterales del escudo; SB: distancia entre las bases de las sensilias; ASB: distancia desde la base de la sensilia hasta el extremo del margen anterior del escudo; PSB: distancia desde la base de la sensilia hasta el extremo del margen posterior del escudo; SD: ASB+PSB; AP: distancia entre las setas anterolaterales y posterolaterales del escudo (de un lado); AM: longitud de la seta anteromediana del escudo; AL: longitud de la seta anterolateral del escudo; PL: longitud de la seta posterolateral del escudo; S: longitud de la sensilia; H: longitud de las setas humerales del idiosoma; D: longitud de las setas dorsales; V: longitud de las setas ventrales; pa: longitud de la pata I (incluida la coxa); pm: longitud de la pata II (incluida la coxa); pp: longitud de la pata III (incluida la coxa); TaIII: longitud del tarso de la pata III; dmt: distancia desde la base del tarso a la base de la seta mastitarsal de la pata III.

En la tabla 18 se listan las medidas obtenidas de las larvas de vegetación de *N. inopinata* clasificadas morfológicamente en este estudio (Tabla 18).

2.1.2. LARVAS RETIRADAS DE AVES

Del total de ejemplares retirados de aves (n=41), se seleccionaron 13 larvas (10 retiradas de 6 petirrojos, 2 de 2 zorzales comunes, y 1 de 1 pinzón vulgar) para su clasificación morfológica. Se escogieron aquellos ejemplares poco alimentados y

en los cuales las estructuras necesarias para la identificación morfológica presentaban un buen estado de conservación, ya que el grado de engorde dificulta tanto el seguimiento de las claves taxonómicas como el montaje requerido para la clasificación (Figura 34, tabla 18).

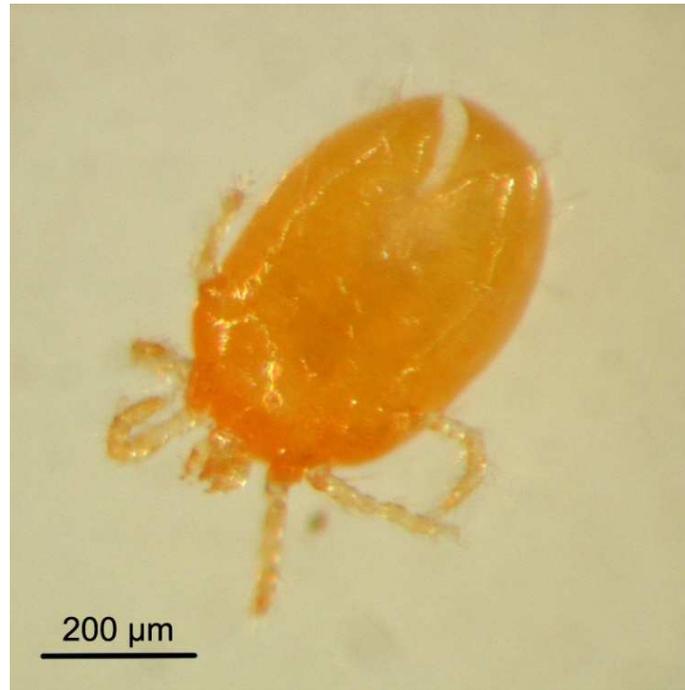


Figura 34. Larva alimentada de *Neotrombicula inopinata* retirada de un ejemplar de petirrojo europeo (*Erithacus rubecula*). Aportación original.

Las 13 larvas fueron clasificadas como *N. inopinata*. Las características de estos ejemplares coinciden con la descripción detallada anteriormente en la sección 2.1.1.

En la tabla 18 se listan las medidas de los caracteres morfológicos evaluados durante la clasificación morfológica, tanto de las larvas recogidas de la vegetación (n=3.000) como de las retiradas de aves (n=13).

Tabla 18. Medidas estándar de las larvas de *Neotrombicula inopinata* clasificadas en este estudio.

Carácter	Medida mínima (µm)	Medida máxima (µm)	Media
AW	68	81	74
PW	82	95	88
SB	26	36	31
ASB	29	33	31
PSB	25	32	29
SD	54	65	60
P-PL	22	31	26
AP	26	33	30
AM	41	56	48
AL	38	46	42
PL	52	62	57
S	66	84	75
H	54	64	59
D	37	60	48
V	27	49	39
pa	308	338	324
pm	263	297	281
pp	306	337	320
Ip	877	972	924
DS	36	45	40
VS	22	31	26
NDV	58	76	66
TaIII	76	86	82
dmt	9	16	12
m-t	0,118	0,186	0,146

AW: distancia entre las setas anterolaterales del escudo; PW: distancia entre las setas posterolaterales del escudo; SB: distancia entre las bases de las sensilias; ASB: distancia desde la base de la sensilia hasta el extremo del margen anterior del escudo; PSB: distancia desde la base de la sensilia hasta el extremo del margen posterior del escudo; SD: ASB+PSB; P-PL: distancia desde el nivel de la seta posterolateral del escudo al extremo posterior del margen del escudo; AP: distancia entre las setas anterolaterales y posterolaterales del escudo (de un lado); AM: longitud de la seta anteromediana del escudo; AL: longitud de la seta anterolateral del escudo; PL: longitud de la seta posterolateral del escudo; S: longitud de la sensilia; H: longitud de las setas humerales del idiosoma; D: longitud de las setas dorsales; V: longitud de las setas ventrales; pa: longitud de la pata I (incluida la coxa); pm: longitud de la pata II (incluida la coxa); pp: longitud de la pata III (incluida la coxa); Ip: índice de patas (pa+pp+pm); DS: número de setas dorsales del idioma; VS: número de setas ventrales del idiosoma; NDV: número de setas del idiosoma (DS+VS); TaIII: longitud del tarso de la pata III; dmt: distancia desde la base del tarso a la base de la seta mastitarsal de la pata III; m-t: ratio dmt/TaIII (ver figura 33).

2.2. ESTADIOS POST-LARVARIOS DE TROMBICÚLIDOS

Los 10 ejemplares de trombicúlidos encontrados en las muestras de tierra se clasificaron como adultos de *N. inopinata* (Figura 35). En todos los ejemplares excepto en 1 se logró identificar el género: 6 hembras y 3 machos.

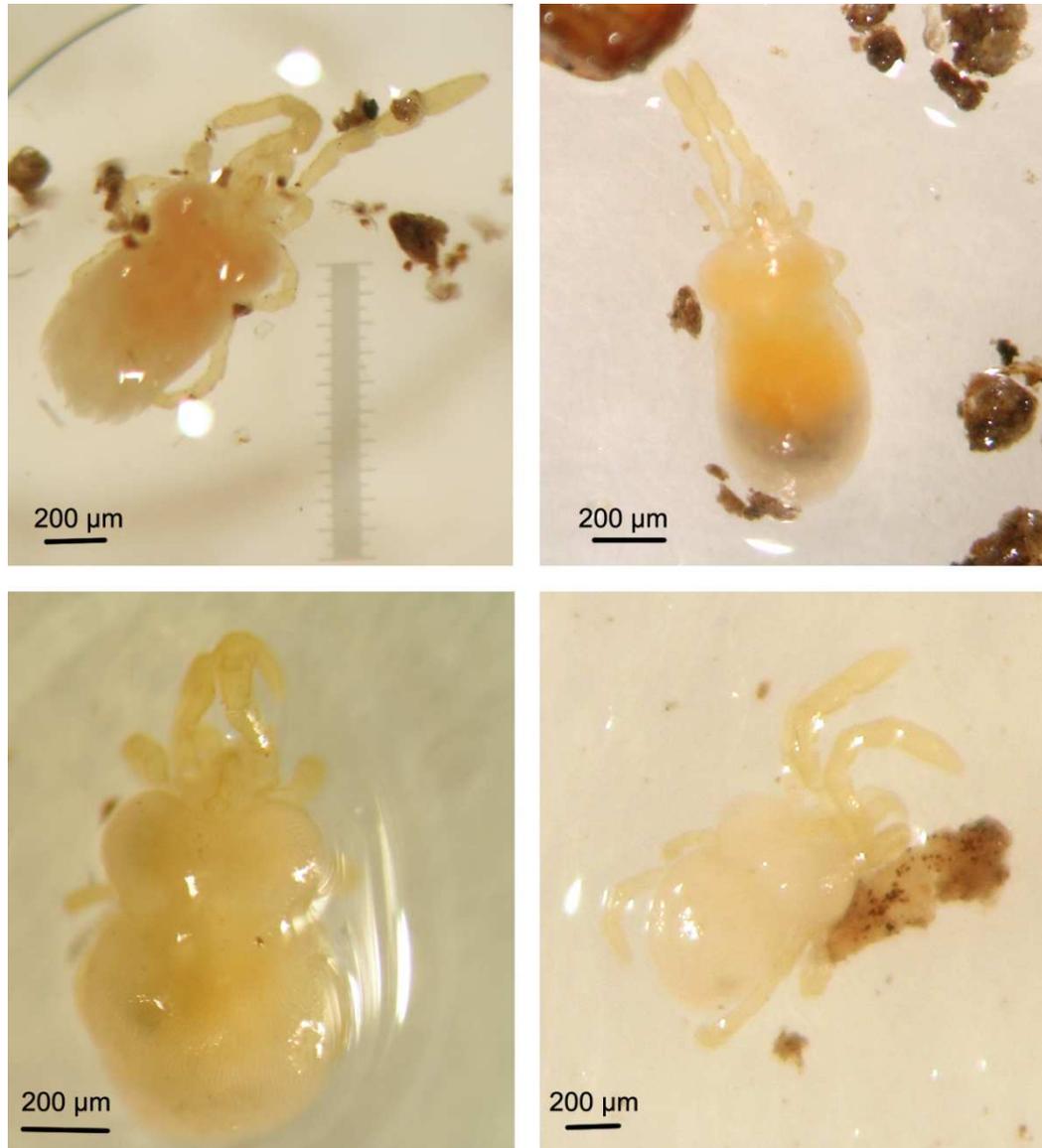


Figura 35. Adultos de *Neotrombicula inopinata*. Aportación original.

3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Los controles positivos y negativos funcionaron correctamente en todos los ensayos de PCR.

3.1 IDENTIFICACIÓN GENÉTICA DE LARVAS DE TROMBICÚLIDOS

3.1.1. LARVAS RECOGIDAS DE LA VEGETACIÓN

Con el fin de identificar genéticamente la especie o especies de trombicúlidos presentes en nuestro medio se analizaron 115 extractos de ADN de larvas de trombicúlidos recogidas de vegetación con cada pareja de cebadores de PCR. No se logró amplificar ningún fragmento génico al utilizar como dianas de PCR los genes ARNr 12S, ARNr 16S, *ITS2* y *COI-COB*. Entre las diferentes parejas de cebadores utilizadas para testar las muestras frente al gen *COI*, únicamente se detectaron bandas del tamaño esperado con los cebadores LepF y LepR. A la vista de estos resultados positivos, el número de ejemplares analizados en este ensayo se incrementó hasta un total de 480. De ellos, en 376 se amplificó el gen *COI*. Todos los amplicones fueron secuenciados. Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron idénticas entre sí y mostraron máxima identidad (76,9%) con la del gen *COI* de *Patricius lucifer* (Insecta: Lycaenidae) (nº de acceso en GenBank: JX093475), depositándose en GenBank con nº de acceso KR337639 (ver sección 3.3).

3.1.2. LARVAS RETIRADAS DE AVES

Dado que el número de larvas de trombicúlidos recogidas de aves (n=41) fue muy inferior al número de especímenes de vegetación (n=23.393), y ante los reiterados resultados negativos obtenidos durante largas temporadas con los diferentes ensayos de PCR realizados para la clasificación genética de estos ácaros, se decidió reservar estos ejemplares para testar la detección de bacterias mediante técnicas de biología molecular.

3.2. DETECCIÓN DE BACTERIAS EN LARVAS DE TROMBICÚLIDOS

3.2.1. LARVAS RECOGIDAS DE LA VEGETACIÓN

Como primer cribado para el estudio de bacterias presentes en trombicúlicos se utilizaron los cebadores fD1 y rP2 en una PCR de amplio espectro que amplifica casi la totalidad del gen ARNr 16S de la mayoría de las bacterias. Como estrategia inicial, se realizó este ensayo en 100 lotes de trombicúlicos de vegetación constituidos por 10 larvas cada uno. En 26 de ellos se obtuvieron bandas débiles del tamaño esperado. Los intentos de secuenciación directa de estos amplicones fueron infructuosos en todos los casos, y se decidió continuar la investigación de microorganismos utilizando otras parejas de cebadores para diferentes géneros bacterianos asociados a artrópodos descritas en Material y Métodos. Todos ellos se testaron en un total de 1.500 lotes.

Utilizando las parejas de cebadores específicos de los genes rickettsiales *ompA* y *ompB*, no se logró amplificar *Rickettsia* spp. en ninguno de los 1.500 lotes analizados. Por el contrario, se obtuvieron bandas compatibles con infección por *Rickettsia* spp. en 41 de los 1.500 lotes al utilizar una PCR anidada diseñada para la región central del gen *gltA*. Los amplicones correspondientes a estos 41 lotes con resultado positivo fueron secuenciados. De ellos, 11 secuencias nucleotídicas fueron idénticas entre sí y mostraron máxima identidad (99,3%) con el gen *gltA* de una *Rickettsia* que causa la muerte de los machos de *Adalia decempunctata* (Insecta: Coccinellidae) durante la embriogénesis (nº de acceso en GenBank: AJ269522). Esta secuencia se incluyó en GenBank con nº de acceso KR337640 (ver sección 3.3). Por otra parte, 9 secuencias fueron idénticas entre sí y mostraron máxima identidad (98,3%) con la secuencia de *gltA* de *Rickettsia belli* (nº de acceso en GenBank: U59716). La secuencia obtenida se incluyó en GenBank con número de acceso KR337641 (ver sección 3.3). Además, 9 muestras mostraron secuencias nucleotídicas homólogas (100% identidad) a la de *gltA* de *Rickettsia heilongjiangensis* (nº de acceso en GenBank: AF178034). Otras 9 secuencias fueron idénticas entre sí y a su vez homólogas a la secuencia de *gltA* de *Rickettsia conorii* (nº de acceso en GenBank: AE006914). Las 3 muestras restantes mostraron 90,4% identidad con la secuencia del gen *gltA* de una *Rickettsia*

endosimbionte de *Rhaphium crassipes* (Diptera: Dolichopodidae) (n° de acceso en GenBank: JQ925545), quedando depositadas en GenBank con n° de acceso KR337642 (ver sección 3.3).

Estos 41 lotes que resultaron positivos para el gen *gltA* (región central) se testaron además con cebadores dirigidos frente al extremo 5' de ese mismo gen y con cebadores específicos para la detección del gen *htrA*. Desafortunadamente, en estos casos no se obtuvo ningún resultado positivo.

Utilizando las diferentes parejas de cebadores descritas en la sección de material y métodos, la detección de *A. phagocytophilum*, *Borrellia* spp., *C. burnetii*, *Bartonella* spp. y *O. tsutsugamushi* resultó infructuosa en los 1.500 lotes analizados.

3.2.2. LARVAS RETIRADAS DE AVES

De las 41 larvas retiradas de aves, se disponía de 28 ejemplares (14 alimentados y 14 poco alimentados) para la detección de bacterias mediante técnicas de biología molecular, puesto que en los 13 restantes (poco alimentados) se había realizado el montaje previo a la clasificación morfológica.

Como se ha explicado en la metodología, los especímenes se procesaron individualmente (en caso de encontrar una larva por ave) o en lotes constituidos por las larvas retiradas de cada ejemplar de ave. De este modo, se extrajo individualmente el ADN de 6 larvas retiradas de 3 petirrojos, 2 zorzales comunes y 1 pinzón vulgar. Por otra parte, se extrajo el ADN de 5 lotes de larvas: un lote que contenía 3 ejemplares retirados de un arrendajo y 4 lotes con 2, 4, 6 y 7 larvas de 4 petirrojos.

En estos 11 extractos de ADN no se lograron amplificar genes específicos para la detección de *Rickettsia* spp., *A. phagocytophilum* y *Borrellia* spp. Dado que se priorizó la búsqueda de dichas bacterias, estas muestras no fueron testadas frente al gen ARNr 16S de bacterias ni frente a *C. burnetii*, *Bartonella* spp. ni *O. tsutsugamushi*, limitados por la cantidad de ADN disponible.

3.3. SECUENCIAS INTRODUCIDAS EN GENBANK

3.3.1. SECUENCIA NUCLEOTÍDICA DE *Neotrombicula inopinata* (GEN COI).

Nº de acceso en GenBank: KR337639

LOCUS T8 658 bp DNA linear 28-APR-2015

DEFINITION *Neotrombicula inopinata* T8 cytochrome oxidase subunit 1 (COI) gene, partial cds; mitochondrial.

ACCESSION KR337639

VERSION

KEYWORDS.

SOURCE *Neotrombicula inopinata*

ORGANISM *Neotrombicula inopinata*

Eukaryota; Metazoa; Ecdysozoa; Arthropoda; Chelicerata; Arachnida; Acari; Acariformes; Trombidiformes; Prostigmata; Anystina; Parasitengona; Trombiculoidea; Trombiculidae; *Neotrombicula*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 658)

AUTHORS Santibanez,P., Palomar,A.M., Portillo,A. and Oteo,J.A.

TITLE Genetic identification of *Neotrombicula inopinata* larvae from the North of Spain

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 658)

AUTHORS Santibanez,P., Palomar,A.M., Portillo,A. and Oteo,J.A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (28-APR-2015) Infectious Diseases-Center of Rickettsioses and Arthropod-Borne Diseases, Hospital San Pedro-CIBIR, Piqueras 98, Logrono, La Rioja 26006, Spain

COMMENT ##Assembly-Data-START##

Assembly Method: BioEdit v. 7.2.5.

Sequencing Technology: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..658

/organism="*Neotrombicula inopinata*"

/mol_type="genomic DNA"

/isolate="T8"

/isolation_source="larva of *Neotrombicula inopinata* collected over vegetation in La Pineda, La Rioja"

/dev_stage="larva"

/country="Spain"

/lat_lon="42.06 N 02.33 W"

/collection_date="24-Aug-2010"

/collected_by="Paula Santibanez"

Resultados

```
/PCR_primers="fwd_name: LepF1, fwd_seq:attcaaccaatcataaagatattgg,
rev_name: LepR1, rev_seq:taaacttctggatgtccaaaaaatca"
gene <1..>658
/gene="COI"
CDS <1..>658
/gene="COI"
/codon_start=2
/transl_table=5
/product="cytochrome oxidase subunit 1"
/translation="TIYFAMASWAGVMGTGMSFIIIRMELGQVGPFLGNDQIYNSIVTAHAFVMIFFMVMPAMI
GGFGNWLIPMLGAQDMAFPRLNLSFWLLVPSISLLMLSMFSVSGSGTGWTIYPPLSGNIAHSGISMDLVIF
SLHLAGISSILGAINFMATVMNLPPKMSMSWEQMPLFSWAVLVTAILLLLSLPVLGAIITMLLTDRNFNTSFFD
PMGGGDPILFQHLF"
BASE COUNT 166 a 107 c 120 g 265 t
ORIGIN
  1 aaccatttac tttgctatag cctcttgagc tgggtgaata gggaccggta taagatttat
  61 tattcgtata gaattaggtc aggtaggccc ttttctagga aatgaccaga tttataattc
 121 cattgttact gctcatgcat ttgtaataat ttttttcata gttataacctg caatgattgg
 181 gggatttggg aattggttaa ttcctctaata gttagggggc caagatatgg cttttccacg
 241 tcttaataac ttaagatatt gggtattagt cccttctatt agtttattga tgctttcgat
 301 attttctggt tctgggaggg gaacaggatg aacaatctac cctcctcttt caggaaatat
 361 tgctcataga ggaatttcta tagatttagt aattttctct cttcatttag caggaatttc
 421 ttctattttg ggggctatca attttatagc tactgtgata aatttacctc ctaaatogat
 481 aagttgggaa caaatacctt tattttcttg ggctgtgta gttactgcaa ttttacttct
 541 tctatcatta cctgtattag ctggtgcaat tactatattg ttgactgac gaaattttaa
 601 cacttctttt tttgacccta taggtggggg agatcctatt ttgtttcaac atctattt
```

3.3.2. SECUENCIAS NUCLEOTÍDICAS DE BACTERIAS NO CULTIVADAS EN *Neotrombicula inopinata* (GEN *gltA*).

Nº de acceso en GenBank: KR337640

LOCUS *gltA*-4 299 bp DNA linear ENV 28-APR-2015

DEFINITION Uncultured bacterium citrate synthase (*gltA*) gene detected in *Neotrombicula inopinata*, partial cds.

ACCESSION KR337640

VERSION

KEYWORDS ENV.

SOURCE Uncultured bacterium detected in *Neotrombicula inopinata*

ORGANISM Uncultured bacterium detected in *Neotrombicula inopinata*
Unclassified.

REFERENCE 1 (bases 1 to 299)

AUTHORS Santibanez,P., Palomar,A.M., Portillo,A. and Oteo,J.A.

TITLE Genetic identification of *Neotrombicula inopinata* larvae from the North of Spain

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 299)

AUTHORS Santibanez,P., Palomar,A.M., Portillo,A. and Oteo,J.A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (28-APR-2015) Infectious Diseases-Center of Rickettsioses and Arthropod-Borne Diseases, Hospital San Pedro-CIBIR, Piqueras 98, Logrono, La Rioja 26006, Spain

COMMENT ##Assembly-Data-START##

Assembly Method: BioEdit v. 7.2.5.

Sequencing Technology: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..299

/organism="Uncultured bacterium detected in *Neotrombicula inopinata*"

/mol_type="genomic DNA"

/isolate="4"

/isolation_source="larva of *Neotrombicula inopinata*
collected over vegetation in La Pineda, La Rioja"

/host="*Neotrombicula inopinata*"

/dev_stage="larva"

/environmental_sample

/country="Spain"

/collection_date="05-Nov-2009"

gene <1..>299

/gene="gltA"

CDS <1..>299

/gene="gltA"

Resultados

```
/codon_start=3
/product="citrate synthase"
/translation="MLKEIGSSENIPKYIAKAKDKNDPFRLMGFGRVYKKNYDPRAAVLKETCKEVLKELGQL
DGNPLLQIAIELEAIALKDEYFIERKLYPNVDFYSGIIYK"
BASE COUNT 108 a 40 c 56 g 95 t
ORIGIN
  1 atatgcttaa agaaatcggg agttctgaaa atattcctaa atatatagct aaagctaagg
 61 ataaaaatga tccctttagg ttaatgggct ttggatcatc tgtatataaa aactacgatc
121 ctctgcccgc agtacttaaa gaaacttgta aggaagtatt aaaggaactt gggcagctag
181 atggtaacct gttattacaa atagcaatag agcttgaagc tatcgctcct aaagatgaat
241 attttattga gagaaaatta tatccaaatg ttgattttta ttcgggtatt atctataaa
```

Nº de acceso en GenBank: KR337641

LOCUS gltA-18 299 bp DNA linear ENV 28-APR-2015

DEFINITION Uncultured bacterium citrate synthase (gltA) gene detected in Neotrombicula inopinata, partial cds.

ACCESSION KR337641

VERSION

KEYWORDS ENV.

SOURCE Uncultured bacterium detected in Neotrombicula inopinata

ORGANISM Uncultured bacterium detected in Neotrombicula inopinata
Unclassified.

REFERENCE 1 (bases 1 to 299)

AUTHORS Santibanez,P., Palomar,A.M., Portillo,A. and Oteo,J.A.

TITLE Genetic identification of Neotrombicula inopinata larvae from the North of Spain

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 299)

AUTHORS Santibanez,P., Palomar,A.M., Portillo,A. and Oteo,J.A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (28-APR-2015) Infectious Diseases-Center of Rickettsioses and Arthropod-Borne Diseases, Hospital San Pedro-CIBIR, Piqueras 98, Logrono, La Rioja 26006, Spain

COMMENT ##Assembly-Data-START##

Assembly Method: BioEdit v. 7.2.5.

Sequencing Technology: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..299

/organism="Uncultured bacterium detected in Neotrombicula inopinata"

/mol_type="genomic DNA"

/isolate="18"

/isolation_source="larva of Neotrombicula inopinata collected over vegetation in La Pineda, La Rioja"

/host="Neotrombicula inopinata"

/dev_stage="larva"

/environmental_sample

/country="Spain"

/collection_date="15-Sep-2009"

gene <1..>299

/gene="gltA"

CDS <1..>299

/gene="gltA"

/codon_start=3

/product="citrate synthase"

Resultados

/translation="MLKEIGSVENIPKYIAKAKDKNDNFKLMGFGRVYKNYDPRAAVLKESCKEVLKELGQL
DNNPLLQIAIELEAIALKDEYFIERKLYPNVDFYSGIIYK"

BASE COUNT 113 a 37 c 62 g 87 t

ORIGIN

```
1  atatgctgaa agaaataggc agtgtagaga atatacctaa atatatagca aaggctaaag
61  ataaaaatga taattttaag ctaatgggct ttggtcacg  tgtatataaa aactatgac
121 cgcgtgctgc agtgcttaaa gagagctgca aggaggtgtt aaaagaatta gggcagctag
181 ataacaacc  attactacaa atagcgatag agcttgaagc ttcgctctt  aaagatgagt
241 attttattga gagaaaatta tatccaaacg ttgatTTTTA ttcgggtatt attataaa
```

Nº de acceso en GenBank: KR337642

LOCUS gltA-11 299 bp DNA linear ENV 28-APR-2015

DEFINITION Uncultured bacterium citrate synthase (gltA) gene detected in Neotrombicula inopinata, partial cds.

ACCESSION KR337642

VERSION

KEYWORDS ENV.

SOURCE Uncultured bacterium detected in Neotrombicula inopinata

ORGANISM Uncultured bacterium detected in Neotrombicula inopinata
Unclassified.

REFERENCE 1 (bases 1 to 299)

AUTHORS Santibanez,P., Palomar,A.M., Portillo,A. and Oteo,J.A.

TITLE Genetic identification of Neotrombicula inopinata larvae from the North of Spain

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 299)

AUTHORS Santibanez,P., Palomar,A.M., Portillo,A. and Oteo,J.A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (28-APR-2015) Infectious Diseases-Center of Rickettsioses and Arthropod-Borne Diseases, Hospital San Pedro-CIBIR, Piqueras 98, Logrono, La Rioja 26006, Spain

COMMENT ##Assembly-Data-START##

Assembly Method: BioEdit v. 7.2.5.

Sequencing Technology: Sanger dideoxy sequencing

##Assembly-Data-END##

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..299

/organism="Uncultured bacterium detected in Neotrombicula inopinata"

/mol_type="genomic DNA"

/isolate="11"

/isolation_source="larva of Neotrombicula inopinata collected over vegetation in La Pineda, La Rioja"

/host="Neotrombicula inopinata"

/dev_stage="larva"

/environmental_sample

/country="Spain"

/collection_date="25-Sep-2010"

gene <1..>299

/gene="gltA"

CDS <1..>299

/gene="gltA"

/codon_start=3

/product="citrate synthase"

Resultados

/translation="MLKEIGTPENIPKYIAKAKDKDDSFRLMGFHRVYKNYDPRAAVLKETCKEVLGELGQS
KNNPLLQIAMELEAIALKDQYFIEHKLYPNVDFYSGIIYQ"

BASE COUNT 109 a 46 c 58 g 86 t

ORIGIN

```
1  atatgctgaa agaaattggc acaccagaaa atattccaaa atatatagcg aaagccaaag
61  ataaagacga ttcgtttagg ctgatgggct ttggatcatcg agtatataaa aattacgatc
121  cacgagctgc cgttcttaaa gaaacttgca aagaggatatt aggggagcta gggcaatcaa
181  aaaataaacc attattgcaa attgccatgg agcttgaagc tattgctctg aaagatcaat
241  attttattga acataaatta tatccgaatg ttgatTTTTA ttcgggtatt atttaccaa
```

4. CASOS HUMANOS

4.1. INCORPORACIÓN AL ESTUDIO

Durante el periodo de estudio se han recopilado y estudiado un total de 91 casos de pacientes diagnosticados de trombiculiasis.

4.1.1. AÑO 2008

Entre los meses de septiembre y octubre de 2008 se atendió a 21 personas con un cuadro clínico y antecedentes epidemiológicos compatibles con trombiculiasis (Tabla 19). El periodo de incubación osciló entre 3 y 15 h. Todos presentaron manifestaciones dermatológicas en forma de pápulas eritematosas muy pruriginosas y malestar general. En 3 de ellos se constató elevación de temperatura, que en ningún caso superó los 38°C. Cinco de los afectados eran trabajadores forestales, 2 de la zona de Canales de La Sierra, 2 de La Pineda y 1 de Villavelayo. El resto de los pacientes fueron parasitados mientras realizaban actividades al aire libre como la caza (n=2), la recolección de setas (n=6) o el paseo (n=8) en varias zonas del municipio de Lumbreras. En todos los casos las lesiones cutáneas se encontraron en las extremidades inferiores, y en 7 de ellos las extremidades superiores. Además, en 5 pacientes se encontraron afectadas las ingles; en 3, ingles y cintura; en 1, ingles y axilas; y en 1, las axilas. Siete de las personas afectadas iban acompañadas de sus perros. Respecto a las medidas de prevención, 12 personas llevaban ropa adecuada y 4 habían usado repelente. A todos los pacientes se les prescribieron baños con avena coloidal con agua tibia y el uso de ropa blanca de algodón. Además, se sugirió la toma de antihistamínicos a demanda en función de la tolerancia al prurito. En todos los casos la evolución fue favorable, el prurito desapareció a los 3-7 días, y las lesiones cutáneas a los 10-18 días después de sufrir las picaduras.

Tabla 19. Datos de los casos humanos extraídos de las encuestas clínico-epidemiológicas realizadas durante 2008.

Fecha parasitación	PI (horas)	Fiebre	Localización picaduras		Actividad	Zona actividad	Con perro	Perro parasitado	Ropa adecuada	Repelente
			EESS	Otras						
sep-08	6	no	sí	Ingles	Trabajo	Villavelayo	no	-	sí	sí
	9	no	no	no	Paseo	Sierra Cebollera	no	-	sí	no
	5	no	no	no	Paseo	Sierra Cebollera	sí	dd	no	no
	3	<38°C	no	no	Paseo	Sierra Cebollera	no	-	sí	no
	5	no	no	Ingles, cintura	Trabajo	Canales de la Sierra	no	-	sí	no
	7	no	sí	Axilas	Setas	Sierra Cebollera	no	-	no	no
	13	no	sí	Ingles	Setas	Sierra Cebollera	no	-	sí	no
	11	no	no	no	Trabajo	Canales de la Sierra	no	-	sí	sí
	12	no	no	no	Paseo	Sierra Cebollera	sí	sí	sí	sí
	3	no	no	no	Paseo	Sierra Cebollera	sí	sí	no	no
oct-08	5	no	no	Ingles, cintura	Caza	Sierra Cebollera	sí	dd	sí	no
	4	<38°C	sí	Ingles	Caza	Sierra Cebollera	sí	sí	sí	no
	12	no	no	no	Setas	Sierra Cebollera	no	-	no	no
	10	no	sí	Ingles, axilas	Trabajo	La Pineda	no	-	sí	no

Fecha parasitación	PI (horas)	Fiebre	Localización picaduras		Actividad	Zona actividad	Con perro	Perro parasitado	Ropa adecuada	Repelente
			EESS	Otras						
	6	no	no	Ingles	Trabajo	La Pineda	no	-	sí	sí
	15	no	no	no	Paseo	Sierra Cebollera	no	-	no	no
	7	no	no	no	Paseo	Sierra Cebollera	sí	sí	sí	no
	5	<38°C	no	Ingles, cintura	Setas	Sierra Cebollera	no	-	no	no
	9	no	sí	no	Setas	Sierra Cebollera	no	-	no	no
	8	no	sí	no	Setas	Sierra Cebollera	no	-	no	no
	5	no	no	Ingles	Paseo	Venta de Piqueras	sí	sí	no	no

PI: periodo de incubación; EESS: extremidades superiores; dd: dato desconocido. Con el objetivo de facilitar su lectura, se han eliminado aquellas columnas que incluían la misma respuesta para todos pacientes [Picor: sí; Malestar general: sí; Pápulas eritematosas: sí; Localización de las picaduras en extremidades inferiores: sí].

4.1.2. AÑO 2009

Tenemos conocimiento de al menos 28 casos de trombiculiasis entre los meses de septiembre y noviembre de 2009 (Tabla 20). Cuatro pacientes fueron picados en más de una ocasión, como es el caso de una paciente picada en dos semanas consecutivas mientras recogía setas, otro que realizaba excursiones por la zona, y 2 trabajadores forestales. Las manifestaciones dermatológicas características y el prurito generalizado se evidenciaron en todos los casos, apareciendo a las 4-16 h de haber estado en contacto con la vegetación. Además, 2 personas presentaron febrícula. Las zonas corporales más afectadas por las picaduras fueron las extremidades inferiores, sobre todo tobillos y huecos poplíteos. De hecho, todas las personas referían picaduras en las piernas, aunque sólo 7 presentaban picaduras en las extremidades superiores. Además, 7 de ellos presentaban lesiones en las ingles; 5 en tronco; 4 en ingles y cintura; 2 en tronco y axilas y 1 en axilas.

La totalidad de las personas afectadas habían visitado la zona de Lumbreras o áreas colindantes. En 9 casos las picaduras se produjeron durante trabajos forestales. En el resto (n=19), las parasitaciones se produjeron mientras disfrutaban de actividades de ocio al aire libre, como senderismo (n=10), recolección de setas (n=7) o caza (n=2). Ocho de los pacientes iban acompañados por perros mientras cazaban (n=2), paseaban (n=4) o recogían setas (n=2). Con referencia a los hábitos de prevención, 16 personas llevaban ropa adecuada, y 5 repelente. Respecto al tratamiento, se hicieron las mismas recomendaciones que el año anterior. Todos los pacientes evolucionaron satisfactoriamente, con remisión del prurito en 4-7 días, y de las lesiones cutáneas en 12-20 días después de aparecer las picaduras.

Tabla 20. Datos de los casos humanos extraídos de las encuestas clínico-epidemiológicas realizadas durante 2009.

Fecha parasitación	PI (horas)	Fiebre	Localización picaduras		Actividad	Zona actividad	Con perro	Perro parasitado	Ropa adecuada	Repelente
			EESS	Otras						
sep-09	7	no	no	Ingles	Paseo	Sierra Cebollera	no	-	no	no
	5	no	no	Ingles, cintura	Setas	La Pineda	sí	sí	sí	no
	10	no	sí	Tronco	Trabajo	La Pineda	no	-	sí	no
	9	no	sí	Axilas	Trabajo	Sierra Cebollera	no	-	sí	sí
	4	no	no	Ingles	Trabajo	Sierra Cebollera	no	-	sí	no
	12	no	no	no	Caza	Sierra Cebollera	sí	dd	sí	no
	6	no	sí	Tronco, axilas	Setas	Sierra Cebollera	no	-	no	no
	5	no	no	no	Caza	Sierra Cebollera	sí	dd	sí	no
	10	<38°C	no	Ingles	Paseo	Sierra Cebollera	sí	sí	no	no
8	no	sí	no	Setas	Sierra Cebollera	no	-	no	no	
oct-09	7	no	no	Tronco	Trabajo	Sierra Cebollera	no	-	sí	no
	9	no	sí	Tronco	Trabajo	La Pineda	no	-	sí	no
	8	no	no	Ingles	Trabajo	La Pineda	no	-	sí	sí
	16	no	no	no	Paseo	Sierra Cebollera	no	-	sí	no
	12	no	no	no	Paseo	Sierra Cebollera	sí	sí	sí	no

Fecha parasitación	PI (horas)	Fiebre	Localización picaduras		Actividad	Zona actividad	Con perro	Perro parasitado	Ropa adecuada	Repelente
			EESS	Otras						
	8	no	no	Ingles	Paseo	Sierra Cebollera	no	-	no	no
	7	no	no	no	Paseo	Sierra Cebollera	no	-	no	no
	11	no	no	Tronco	Paseo	Sierra Cebollera	no	-	no	no
	4	no	no	no	Setas	Sierra Cebollera	no	-	no	no
	14	no	no	no	Setas	Sierra Cebollera	sí	sí	sí	sí
	5	no	sí	Ingles, cintura	Trabajo	La Pineda	no	-	sí	sí
	13	no	no	Tronco, axilas	Trabajo	Sierra Cebollera	no	-	sí	sí
	4	<38°C	no	Ingles	Paseo	Sierra Cebollera	sí	sí	no	no
	5	no	sí	Ingles, cintura	Setas	Sierra Cebollera	no	-	no	no
	9	no	no	Tronco	Paseo	Sierra Cebollera	no	-	no	no
	8	no	no	no	Paseo	Sierra Cebollera	sí	sí	sí	no
nov-09	8	no	no	Ingles	Setas	La Pineda	no	-	no	no
	6	no	no	Ingles, cintura	Trabajo	Sierra Cebollera	no	-	sí	no

PI: periodo de incubación; EESS: extremidades superiores; dd: dato desconocido. Con el objetivo de facilitar su lectura, se han eliminado aquellas columnas que incluían la misma respuesta para todos pacientes [Picor: sí; Malestar general: sí; Pápulas eritematosas: sí; Localización de las picaduras en extremidades inferiores: sí]

4.1.3. AÑO 2010

Durante 2010 se recogieron 42 casos de trombiculiasis, que desarrollaron el cuadro típico en los meses de septiembre, octubre y noviembre (Tabla 21). Todos los pacientes compartían el antecedente de haber estado en contacto con vegetación sobre todo en la zona de Lumbreras, aunque también en otras zonas de la Sierra del Camero Viejo (Ajamil de Cameros), y en la Sierra de la Hez (Ocón). El periodo de incubación osciló entre 3-14 h. Veintiséis de los afectados eran recolectores de setas (seis de ellos multiplicados), 3 eran cazadores, 12 visitaron la zona durante excursiones y 1 era trabajador forestal.

Todos presentaron picaduras en las extremidades inferiores (tobillos y hueso poplíteo, principalmente), y la mayoría de ellos en las extremidades superiores (n=29). Además, las picaduras se observaron en ingles (n=13), tronco (n=9), tronco y axilas (n=6), ingles y cintura (n=2); ingles, cintura y axilas (n=2), ingles y axilas (n=1) y axilas (n=1). Sólo 4 pacientes presentaron febrícula. Aunque el prurito remitió totalmente a los 3-8 días de la aparición de las picaduras, las lesiones cutáneas no desaparecieron hasta 13-21 días después. El tratamiento de los síntomas fue el mismo recomendado en años anteriores. Cuatro de los pacientes solicitaron tratamiento antihistamínico para combatir el intenso prurito, aunque ninguno presentó complicaciones. En 14 ocasiones, los pacientes iban acompañados de sus perros. Quince de los pacientes llevaban una indumentaria adecuada y 7 habían usado repelente.

Tabla 21. Datos de los casos humanos extraídos de las encuestas clínico-epidemiológicas realizadas durante 2010.

Fecha parasitación	PI (horas)	Fiebre	Localización picaduras		Actividad	Zona actividad	Con perro	Perro parasitado	Ropa adecuada	Repelente
			EESS	Otras						
sep-10	6	no	sí	Tronco, axilas	Caza	Sierra Cebollera	sí	sí	sí	sí
	10	no	sí	Ingles	Setas	Sierra Cebollera	no	-	no	no
	5	no	no	no	Caza	Ocón	no	-	no	no
	7	no	sí	Ingles, cintura	Setas	Ocón	no	-	sí	no
	9	no	sí	Ingles	Setas	Ocón	no	-	no	no
	4	no	sí	Tronco	Setas	Sierra Cebollera	sí	sí	no	no
	5	no	sí	Ingles	Paseo	Sierra Cebollera	no	-	no	no
	8	no	no	Tronco	Setas	Sierra Cebollera	no	-	sí	no
	10	no	sí	Ingles, cintura, axilas	Setas	Ajamil de Cameros	sí	sí	no	no
	6	no	sí	Tronco	Paseo	Sierra Cebollera	no	-	sí	sí
	14	no	no	Ingles	Setas	Sierra Cebollera	sí	sí	no	no
	7	no	no	Tronco	Setas	Sierra Cebollera	no	-	no	no
	3	no	sí	Tronco, axilas	Trabajo	La Pineda	no	-	sí	no

Fecha parasitación	PI (horas)	Fiebre	Localización picaduras		Actividad	Zona actividad	Con perro	Perro parasitado	Ropa adecuada	Repelente
			EESS	Otras						
	4	<38°C	sí	Ingles, cintura, axilas	Setas	La Pineda	no	-	sí	no
	6	no	sí	Ingles	Paseo	Sierra Cebollera	sí	dd	no	no
	8	no	no	Tronco	Paseo	Sierra Cebollera	sí	sí	no	no
oct-10	5	no	sí	Ingles, axilas	Setas	Ajamil de Cameros	no	-	no	no
	7	no	sí	Tronco	Setas	Ajamil de Cameros	no	-	no	no
	12	no	sí	no	Setas	Sierra Cebollera	no	-	sí	no
	10	no	no	Ingles	Setas	Sierra Cebollera	no	-	no	no
	3	no	sí	Tronco, axilas	Paseo	Sierra Cebollera	sí	no	no	no
	9	no	sí	no	Setas	Sierra Cebollera	no	-	no	no
	7	no	no	Ingles	Setas	Ajamil de Cameros	no	-	no	no
	6	<38°C	sí	no	Setas	Sierra Cebollera	sí	sí	sí	no
	13	no	no	Ingles	Setas	Sierra Cebollera	no	-	no	no
	5	no	no	Tronco	Paseo	Sierra Cebollera	sí	dd	no	no
	8	no	sí	no	Setas	Sierra Cebollera	no	-	sí	sí
	6	no	sí	Axilas	Setas	La Pineda	no	-	sí	sí

Fecha parasitación	PI (horas)	Fiebre	Localización picaduras		Actividad	Zona actividad	Con perro	Perro parasitado	Ropa adecuada	Repelente
			EESS	Otras						
	5	<38°C	sí	Ingles	Caza	Sierra Cebollera	sí	sí	sí	no
	7	no	no	Ingles	Paseo	Sierra Cebollera	no	-	no	no
	6	no	sí	no	Setas	Ajamil de Cameros	no	-	no	sí
	7	<38°C	sí	Tronco, axilas	Setas	La Pineda	no	-	no	no
	11	no	sí	Tronco	Paseo	Sierra Cebollera	sí	sí	sí	no
nov-10	9	no	no	Ingles	Setas	Sierra Cebollera	no	-	no	no
	5	no	sí	Ingles	Paseo	Sierra Cebollera	no	-	no	no
	5	no	sí	Tronco, axilas	Setas	La Pineda	no	-	sí	sí
	7	no	no	Tronco	Paseo	Sierra Cebollera	sí	sí	no	no
	10	no	sí	Ingles, cintura	Paseo	Sierra Cebollera	sí	sí	sí	no
	7	no	sí	Ingles	Setas	Sierra Cebollera	no	-	no	no
	8	no	no	no	Paseo	Sierra Cebollera	sí	dd	no	sí
	6	no	sí	Tronco, axilas	Setas	Sierra Cebollera	no	-	no	no
	14	no	sí	no	Setas	Sierra Cebollera	no	-	sí	no

PI: periodo de incubación; EESS: extremidades superiores; dd: dato desconocido. Con el objetivo de facilitar su lectura, se han eliminado aquellas columnas que incluían la misma respuesta para todos pacientes [Picor: sí; Malestar general: sí; Pápulas eritematosas: sí; Localización de las picaduras en extremidades inferiores: sí].

En la siguiente tabla (Tabla 22) se relaciona la localización de las picaduras de trombicúlidos con la actividad que realizaban los pacientes cuando resultaron parasitados en el total de casos recogidos en este estudio.

Tabla 22. Localización de las picaduras según la actividad desarrollada durante la parasitación en los pacientes recogidos en este estudio.

Actividad (n)	n (%)					
	EEII	EESS	Axilas	Ingles	Tronco	Cintura
Recolección de setas (39)	39 (100)	26 (66,7)	9 (23,1)	6 (15,4)	4 (10,2)	2 (5,1)
Paseo (30)	30 (100)	7 (23,3)	1 (3,3)	4 (13,3)	3 (10)	1 (3,3)
Trabajo (15)	15 (100)	7 (46,7)	4 (26,7)	3 (20)	3 (20)	1 (6,7)
Caza (7)	7 (100)	3 (42,8)	1 (14,3)	1 (14,3)	1 (14,3)	0 (0)
TOTAL	91(100)	43 (47,3)	15 (16,5)	14 (15,4)	11 (12,1)	4 (4,4)

n: número. EEII: extremidades inferiores. EESS: extremidades superiores.

Además, desde la finalización del estudio hasta el otoño de 2014 se ha seguido atendiendo a personas que han contactado con nosotros refiriendo picaduras de trombicúlidos. Así, se ha tenido constancia de casos de trombiculiasis en nuevas áreas, concretamente en el municipio de Munilla. En todos los casos los cuadros clínicos observados fueron similares a los recogidos durante el estudio y no aportaron ningún dato significativo.

4.2. DESCRIPCIÓN DEL CUADRO CLÍNICO

De acuerdo a los casos estudiados, la trombiculiasis se presenta en nuestro medio como una dermatitis estacional muy pruriginosa, de predominio en extremidades inferiores, en una determinada época del año (entre finales de verano y mediados de otoño), y siempre con el antecedente de contacto con la vegetación en zonas de riesgo. A la vista de los resultados, podemos definir como zonas de riesgo determinadas áreas de vegetación aledañas a Lumbreras (Parque Natural Sierra Cebollera), Canales de La Sierra y Villavelayo (Sierra de la Demanda), Ajamil de Cameros (Camero Viejo), Ocón (Sierra de la Hez) y Munilla (Figura 36).

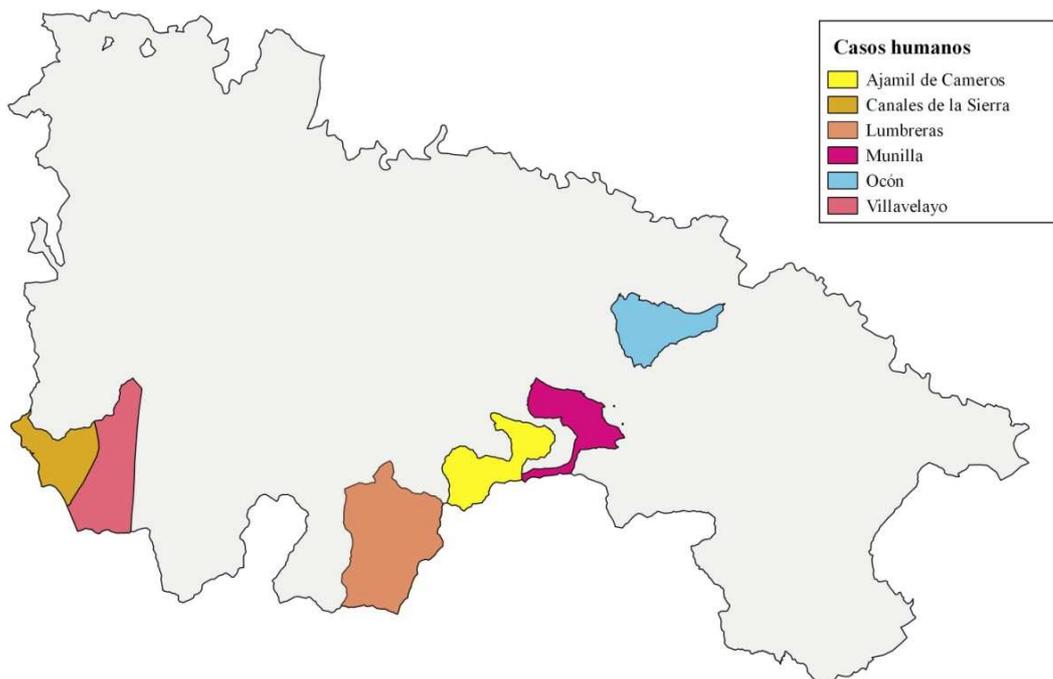


Figura 36. Mapa de La Rioja con los lugares donde los pacientes afectados de trombiculiasis han sido picados por larvas de trombicúlidos. Modificado de www.iderioja.larioja.org.

El primer signo de la trombiculiasis es la aparición de un intenso prurito en la piel, transcurridas 3 y 16 h de haber estado en una zona de riesgo, acompañado de pequeñas pápulas eritematosas (1-2 mm de diámetro) en el lugar de las picaduras, que van aumentando de tamaño progresivamente. Algunos de los pacientes pueden presentar cientos de picaduras en aquellas zonas del cuerpo que entran en contacto con la vegetación, o donde la piel es más fina o está oprimida por la ropa. Las lesiones aparecen agrupadas sobre todo en extremidades inferiores (preferiblemente en huecos poplíteos y tobillos), extremidades superiores (antebrazos y muñecas), axilas, ingles, y cintura. Otras zonas frecuentemente afectadas son los genitales externos, el hipogastrio, y las zonas laterales del tórax. (Figura 37). En las mujeres, las lesiones son además en frecuentes el tórax, en la banda bajo los pechos en contacto con la ropa interior.

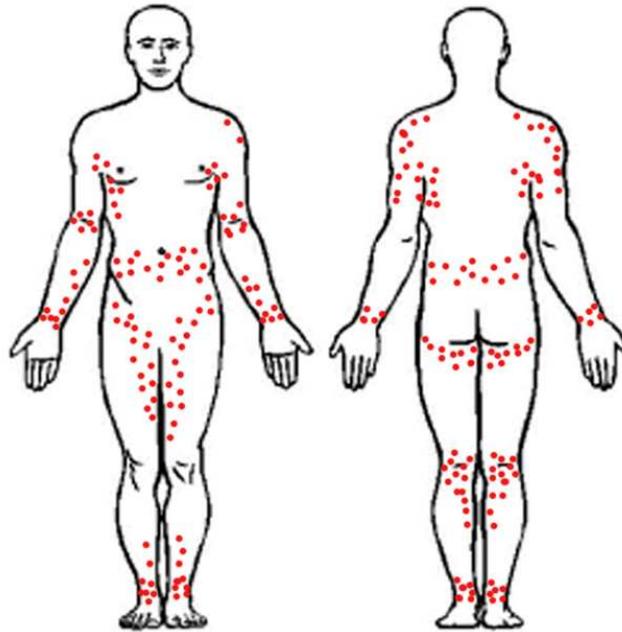


Figura 37. Representación esquemática de las áreas corporales en las que se encontraron las lesiones cutáneas en los pacientes de trombiculiasis. Aportación original.

La mayoría de los pacientes refieren un picor muy intenso, difícil de soportar, sobre todo al acostarse por la noche. Aunque los trombicúlidos se hayan desprendido de la piel en las primeras horas, las pápulas y el malestar permanecen entre 2 y 3 semanas, mientras que el picor desaparece en la primera semana. La trombiculiasis no se acompaña de otros signos clínicos aparte de las lesiones cutáneas y el picor, excepto en algunos pacientes que pueden presentar febrícula. En pacientes con exposición reiterada durante días se observan lesiones de rascado y eczematización secundaria.

A continuación se muestran las imágenes tomadas a diferentes pacientes incluidos en esta memoria (Figura 38).













Figura 38. Lesiones cutáneas observadas en pacientes con trombiculiasis. Aportación original.

5. CASOS CANINOS

5.1. INCORPORACIÓN AL ESTUDIO

Durante el periodo de estudio se han recopilado y estudiado un total de 22 perros con el diagnóstico de trombiculiasis.

5.1.1. AÑO 2008

En total se tuvo acceso a 5 casos durante septiembre y octubre de 2008 (Tabla 23). En todos los casos los propietarios eran pacientes afectados de trombiculiasis incluidos en este estudio. Uno de ellos correspondía a un perro de caza y los 4 restantes resultaron parasitados durante paseos por la zona de Lumbreras. Los dueños describían que, a las 3-6 h después de haber estado en contacto con la vegetación, los animales comenzaron con apatía acompañada por inapetencia ante la comida. Todos los perros estaban aletargados y tres de ellos mostraban una ligera descoordinación motora al levantarse, con dificultad para caminar (ataxia). Además, al menos 4 de ellos presentaron vómitos. Uno de los perros presentó fiebre de 38,7°C. En todos los casos los veterinarios encontraron trombicúlidos fuertemente adheridos a la piel de los perros, especialmente en el vientre y los huecos interdigitales (n=5), así como en las patas (n=3), la base de las orejas (n=3) y alrededor de los ojos (n=3). El tratamiento consistió en la pulverización de los animales con un spray antiparasitario de amplio espectro (Fenilpirazol 0,25%), la administración de cortico-esteroides y antibiótico, y sueroterapia. Dos de los perros fueron hospitalizados. La evolución fue buena en todos los casos, con una recuperación a las 48-72 h. Ninguno de ellos falleció.

Tabla 23. Datos de los casos caninos extraídos de las encuestas realizadas durante 2008.

Fecha parasitación	PI (horas)	Fiebre	Localización picaduras			Zona visitada	Ataxia	Vómitos	Hospitalización
			Orejas	Alrededor de ojos	Patas				
sep-08	3	no	no	sí	no	Sierra Cebollera	sí	sí	no
	5	38,7°C	sí	no	sí	Sierra Cebollera	no	sí	sí
oct-08	4	no	sí	sí	sí	Sierra Cebollera	sí	sí	sí
	3	no	sí	sí	no	Sierra Cebollera	sí	sí	no
	6	no	no	no	sí	Venta de Piqueras	no	no	no

PI: periodo de incubación. Con el fin de presentar un formato que facilite su lectura se han eliminado las columnas en las que el dato coincidía en todos los casos recogidos [Aletargamiento: sí; Inapetencia: sí; Parasitación en el vientre: sí; Parasitación en los huecos interdigitales: sí; Desparasitación y tratamiento: sí].

5.1.2. AÑO 2009

Se recogieron 6 casos de perros parasitados por trombicúlicos tras visitar la zona de Lumbreras en los meses de septiembre a noviembre de 2009 (Tabla 24). Los cuadros clínicos fueron semejantes a los del año anterior, con parasitaciones masivas en el vientre y huecos interdigitales (n=5), patas (n=4), orejas (n=4) y alrededor de los ojos (n=3). Todos ellos sufrieron modificación de la conducta y afectación del sistema digestivo en forma de inapetencia a las 2-6 h después de haber estado en contacto con la vegetación. Tres de ellos sufrieron vómitos. Además, 5 de los perros afectados presentaron ataxia. Los perros fueron tratados por sus veterinarios de la misma manera que el año anterior, siendo necesaria la hospitalización en 3 casos. A las 48-72 h todos los perros se habían recuperado totalmente. Ninguno de los perros falleció.

Tabla 24. Datos de los casos caninos extraídos de las encuestas realizadas durante 2009.

Fecha parasitación	PI (horas)	Fiebre	Localización picaduras			Zona visitada	Ataxia	Vómitos	Hospitalización
			Orejas	Alrededor de ojos	Patas				
sep-09	3	no	sí	sí	sí	La Pineda	sí	sí	sí
oct-09	5	no	no	no	no	Sierra Cebollera	sí	no	no
	4	no	sí	sí	sí	Sierra Cebollera	sí	sí	sí
nov-09	6	no	no	no	sí	Sierra Cebollera	no	no	no
	2	no	sí	no	no	Sierra Cebollera	sí	no	no
	4	no	sí	sí	sí	Sierra Cebollera	sí	sí	sí

PI: periodo de incubación. Con el fin de presentar un formato que facilite su lectura se han eliminado las columnas en las que el dato coincidía en todos los casos recogidos [Aletargamiento: sí; Inapetencia: sí; Parasitación en el vientre: sí; Parasitación en los huecos interdigitales: sí; Desparasitación y tratamiento: sí].

5.1.3. AÑO 2010

Entre los meses de septiembre y noviembre de 2010, se recogieron 11 perros afectados (Tabla 25). Al igual que en años anteriores, todos los animales compartían el antecedente de haber visitado la zona de Lumbreras. Los animales requirieron tratamiento veterinario y en 5 casos fue necesaria la hospitalización. El periodo de incubación osciló entre 3 y 8 h. La fiebre apareció en 2 de los perros (39 y 39,2°C, respectivamente). Todos presentaban un gran número de trombicúlicos adheridos al vientre y entre los dedos, además de en las patas (n=8), orejas (n=7) y alrededor de los ojos (n=5). En cuanto a la sintomatología, todos los dueños describieron pérdida de apetito y aletargamiento, vómitos en 8 casos y ataxia en 9 de ellos. Todos los perros evolucionaron favorablemente, recuperándose a las 36-72 h. Ningún perro falleció.

Tabla 25. Datos de los casos caninos extraídos de las encuestas realizadas durante 2010.

Fecha parasitación	PI (horas)	Fiebre	Localización picaduras			Zona visitada	Ataxia	Vómitos	Hospitalización
			Orejas	Alrededor de ojos	Patas				
sep-10	7	no	no	sí	sí	Sierra Cebollera	sí	sí	no
	5	no	no	no	sí	Sierra Cebollera	sí	no	sí
oct-10	6	no	sí	sí	no	Venta de Piqueras	sí	sí	no
	3	39,2°C	sí	sí	sí	Sierra Cebollera	sí	sí	sí
	8	no	no	no	sí	Sierra Cebollera	no	no	no
	5	no	sí	sí	no	Sierra Cebollera	sí	sí	sí
	6	no	no	no	sí	Sierra Cebollera	sí	sí	no
nov-10	4	no	no	sí	sí	La Pineda	no	no	no
	3	39°C	sí	sí	sí	Sierra Cebollera	sí	sí	sí
	6	no	no	no	no	Sierra Cebollera	sí	sí	no
	8	no	sí	sí	sí	Sierra Cebollera	sí	sí	sí

PI: periodo de incubación. Con el fin de presentar un formato que facilite su lectura se han eliminado las columnas en las que el dato coincidía en todos los casos recogidos [Aletargamiento: sí; Inapetencia: sí; Parasitación en el vientre: sí; Parasitación en los huecos interdigitales: sí; Desparasitación y tratamiento: sí]

Como curiosidad de la experiencia vivida con los perros afectados de trombiculiasis, me permito ilustrar el único caso en el que se pudo documentar la presencia de trombicúlidos alimentándose sobre un perro. El 27 de octubre de 2010 los dueños de un perro mestizo de 2 años, preocupados por sus graves signos de enfermedad, comentaron el estado del animal con personas de Villoslada de Cameros, las cuales les proporcionaron los dípticos editados por nuestro grupo. De este modo, los dueños se pusieron en contacto con nosotros en el teléfono facilitado en los mismos. El perro llevaba 24 h con vómitos, sin comer ni beber, aletargado y con actitud asustadiza. Los 2 días anteriores habían realizado salidas al campo por diversos parajes del municipio de Lumbreras. Dado que no conocían a ningún veterinario en la zona, se les acompañó a una de las clínicas con las que colaborábamos en este estudio. Debido al mal estado general del perro, se procedió rápidamente a su desparasitación, rociándolo con un spray antiparasitario de amplio espectro (Fipronil). Las larvas estaban fuertemente adheridas a la piel del perro, lo que dificultó su retirada (Figuras 39 y 40).



Figura 39. Larvas de trombicúlidos adheridas al vientre de un perro. Aportación original.



Figura 40. Larvas de trombicúlidos alrededor del ojo de un perro. Aportación original.

Se pudieron recuperar 19 trombicúlidos que fueron recogidos con la ayuda de cinta adhesiva transparente. Todos los ejemplares correspondían a larvas alimentadas de *Neotrombicula* spp. (Figura 41).



Figura 41. Larvas de *Neotrombicula* spp. retiradas de un ejemplar de perro. Aportación original.

Debido al deterioro sufrido por los ejemplares durante su retirada, y a que se encontraban totalmente adheridos a la cinta, no se pudo llevar a cabo ni la clasificación morfológica hasta especie ni su procesamiento mediante técnicas de biología molecular. El perro no requirió hospitalización y su evolución fue favorable, con una recuperación absoluta a los 3 días de la desparasitación.

Desde 2008 hasta el otoño de 2014 hemos tenido constancia de un gran número de casos de trombiculiasis canina de los cuales no se ha podido disponer de datos concretos. Aunque no se dispone de un número exacto, son muchas las muertes en perros a los que no se les administró tratamiento (especialmente perros de caza). Además, también se han producido casos fatales en perros en los que el tratamiento se inició más de 48 h después de las picaduras. De hecho, en octubre de 2009 tuvimos constancia del fallecimiento de un perro que sufrió la parasitación durante una jornada de caza en la zona de Lumbreras, y fue encontrado muerto 3 días después. Aunque el dueño describió que el animal presentaba “manchas naranjas” en el vientre y alrededor de los ojos, no tomó ninguna medida.

Respecto a las zonas en las que se han descrito los casos, además de en la zona de Lumbreras, a mediados de noviembre de 2011 fuimos informados de 4 perros y un cazador parasitados durante una cacería en los alrededores de Munilla. Uno de los perros falleció antes de recibir atención veterinaria, 2 mejoraron tras la desparasitación y el tratamiento con corticoides, pero el último continuaba inapetente a los 6 días. Por ello, se extrajo una muestra de sangre con EDTA para realizar una analítica que mostró las siguientes alteraciones: elevación de glucosa, urea, eosinófilos, granulocitos, neutrófilos y alteración del hematocrito. Además, en noviembre de 2012 fuimos informados de la muerte de 2 perros tras una jornada de caza en las inmediaciones de Ajamil de Cameros.

Por otro lado, en octubre de 2013 tuvimos acceso a 2 casos graves de trombiculiasis canina. Ambos animales (macho y hembra) fueron atendidos en la consulta veterinaria transcurridas 28 h desde la visita a la zona de Lumbreras. Uno de ellos presentaba vómitos desde 12 h antes y había comenzado a convulsionar. Además, estaba totalmente “desorientado”, babeando, quejándose e incapaz de mantenerse en pie. La otra perra presentaba fiebre de 40°C y ataxia. Como

primera medida se les roció con un spray antiparasitario (Fipronil) y se hospitalizaron. Aunque los dos perros estaban masivamente parasitados, dado su menor tamaño, la perra lo estaba más. Los trombicúlidos comenzaron a desprenderse a las 12 h de la pulverización, la cual se repitió diariamente hasta el alta hospitalaria. En el caso del perro se inició tratamiento con corticoesteroides. Debido a la edad de la perra (13 años) no se le administró dicho tratamiento para evitar el daño renal. Las analíticas de sangre fueron normales en ambos casos, tanto al ingreso como a las 24 h. Sin embargo, en el perro se observó una elevación de los neutrófilos a las 48 h. El perro permaneció aletargado hasta el segundo día de ingreso y fue al empezar a moverse cuando se hizo evidente una importante ataxia. Aunque fue mejorando paulatinamente, no recuperó totalmente la coordinación hasta 6 días después de haber sufrido la parasitación. Respecto a la perra, su evolución fue más lenta (9 días) y requirió un ingreso más largo debido a la ausencia de tratamiento antiinflamatorio.

En línea con lo explicado anteriormente, nos consta que en los últimos años se han producido numerosos casos de trombiculiasis caninas en el Valle del Najerilla, concretamente en los municipios de San Millán de la Cogolla (Lugar del Río), Brieva de Cameros, Ventrosa, Mansilla de la Sierra, Anguiano y Villavelayo. Corresponden en su mayoría a perros de caza con cuadros caninos graves que resultan fatales en una gran parte de los casos.

En la figura 42 se detallan los municipios en los que se han recogidos cuadros de trombiculiasis caninas.

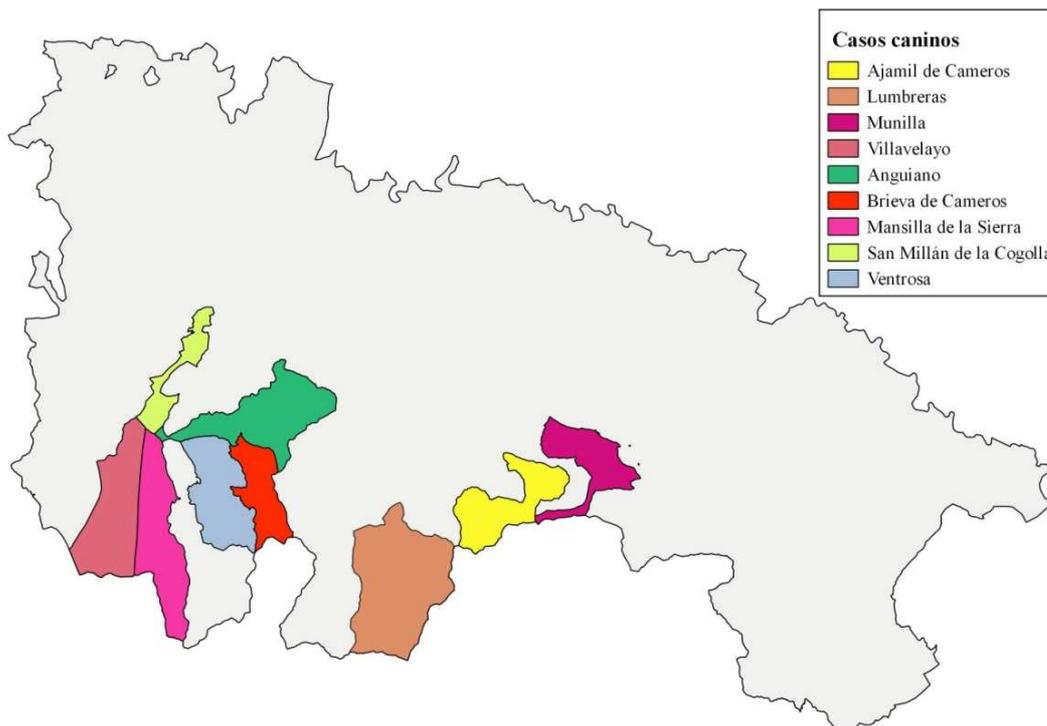


Figura 42. Mapa de La Rioja con los lugares donde se han recogido casos de trombiculiasis canina. Modificado de www.iderioja.larioja.org.

5.2. DESCRIPCIÓN DEL CUADRO CLÍNICO

El primer signo de alarma para los dueños fue el aletargamiento de los perros. Transcurridas 2-3 h desde el contacto con la vegetación, los animales mostraron inapetencia por el alimento y el agua. Los vómitos aparecieron aproximadamente 5 h más tarde. A su llegada a la consulta veterinaria, todos los animales presentaron parasitaciones masivas y apatía. La ataxia, que no siempre estuvo presente, apareció en las primeras 48 h. En todos los casos las zonas más parasitadas fueron el vientre y los huecos interdigitales, y en menor medida las patas, base de las orejas y alrededor de los ojos. Aunque los perros no se rascaban debido a su aletargamiento, la piel de las zonas picadas se mostraba eritematosa. La gravedad de los casos se relacionó directamente con el momento de inicio del tratamiento. Dado que los mecanismos patogénicos de la trombiculiasis canina no se conocen, actualmente los veterinarios administran un tratamiento empírico basado en la desparasitación de los perros, medidas de soporte, y la administración de corticoides y antibióticos por vía parenteral. Cerca de la mitad de los perros requirieron hospitalización al menos durante 24-48 h con

sueroterapia. A las 36-72 h del inicio del tratamiento la mayoría de los perros recuperaron el buen estado general, aunque este proceso puede durar hasta 10 días.

6. MAPA DE DISTRIBUCIÓN DE LOS TROMBICÚLIDOS Y LA TROMBICULIASIS EN LA RIOJA

Como resultados de los muestreos de larvas de trombicúlidos de vegetación, la retirada de las mismas de aves, y la aparición de casos humanos y caninos de trombiculiasis, se ha constatado la presencia de trombicúlidos en 12 municipios de La Rioja (figura 43).



Figura 43. Mapa de La Rioja con los lugares donde se han encontrado trombicúlidos en la vegetación (◆), retirados de aves (▲), casos humanos (●) y casos caninos (■) durante 2008-2010. Los casos recogidos en los años posteriores a este estudio se muestran en blanco. Modificado de www.iderioja.larioja.org.

DISCUSIÓN

Desde hace más de una década, el grupo de trabajo del que formo parte ha tenido conocimiento de afectación humana y canina por parasitación por trombicúlidos en la Comunidad Autónoma de La Rioja. Cada otoño observábamos pacientes que acudían a las consultas afectos de dermatitis leve-moderada-severa, que tenían como nexo común la realización de actividades profesionales o de ocio al aire libre, en la zona de La Pineda. Valorados en el antiguo Servicio de Medicina Interna y Enfermedades Infecciosas del Hospital de La Rioja, se plantearon diferentes hipótesis sobre su etiología. Los habitantes y trabajadores del monte de la zona pensaban que el problema podría estar relacionado con el contacto con alguna planta que les provocaba alergia. Durante unos años no se logró aclarar el origen del cuadro clínico. Para complicar más el escenario, los pacientes comentaban que cuando iban acompañados de sus perros, éstos desarrollaban un cuadro de afectación digestiva y neurológica en ocasiones fatal. Finalmente, al encontrar trombicúlidos parasitando masivamente a los perros afectos y consultar la bibliografía, se pudo poner nombre a la afección (Jiménez *et al.*, 2001). En aquel momento, y con las herramientas con las que contaba el equipo investigador, aquellos casos de trombiculiasis se atribuyeron a parasitación por *N. autumnalis*. Los cuadros clínicos humanos y caninos observados se correspondían con las escasas referencias bibliográficas existentes (Prosl *et al.*, 1985; Kuyvenhoven y Duijm, 1990; Kampen, 2000). En otoño de 2005 se atendió en nuestro Departamento a dos personas y a su perro, este último en estado de máxima gravedad, con el cuadro anteriormente mencionado. El diagnóstico fue de trombiculiasis, si bien se encontró *Rickettsia felis* en sangre mediante PCR. En España, éstos fueron los primeros casos confirmados de infección por *R. felis* en pacientes, que, curiosamente, sufrían un cuadro de dermatitis estacional relacionada con parasitación por trombicúlidos (Oteo *et al.*, 2006). No fue posible confirmar que esta rickettsia fuera transmitida por las larvas de trombicúlidos, ya que las personas y el perro habían sido también picados por pulgas. Con el tiempo, en la literatura aparecieron nuevas descripciones de casos humanos y caninos de trombiculiasis similares a las observadas en nuestro medio (Kampen, 2002; Smal *et al.*, 2004; Guarneri *et al.*, 2005; Seixas *et al.*, 2006). El problema fue en aumento, con noticias en la prensa e incluso interpelaciones al Gobierno de turno por el gran número de personas afectadas (Anexo V). Ante la problemática,

y con el espíritu de aclarar y conocer mejor la epidemiología y la clínica de la trombiculiasis y la biología del agente causal, se solicitó financiación al Gobierno Regional (Ayuda a proyectos de I+D+i, FOMENTA 2007/14 y Ayuda Predoctoral para la Formación del Personal Investigador, PREDOC 2008/29) poniéndose en marcha el proyecto que se presenta en esta memoria.

En este trabajo se recogen datos sobre el agente causal que, curiosamente, y tras el detallado estudio llevado a cabo y reflejado en esta memoria, no es *N. autumnalis*, sino una especie de cuya presencia no se tenía conocimiento previo en España y que nunca se había incriminado como causante de dermatitis estacional. También se aporta una completa descripción clínica de la dermatitis humana y del cuadro clínico que desarrollan los perros. Además, en esta memoria ha quedado patente la estacionalidad de las larvas de trombicúlidos y su correlación con el desarrollo de manifestaciones clínicas en humanos y perros. Al igual que se ha descrito en otras zonas del mundo, queda claro que no hay trombiculiasis en las épocas en las que las larvas de estos ácaros no están activas.

Durante los años 2008-2010 se ha observado que las larvas de trombicúlidos aparecen a mediados-finales de agosto, con un pico de abundancia entre finales de septiembre y mediados de octubre, y un descenso drástico cuando llegan las primeras nieves. El periodo de mayor abundancia de larvas se acompaña de la observación de la mayor parte de los casos clínicos. Además, esta época se corresponde con una gran afluencia de personas que acuden a la zona por la coincidencia con la celebración de romerías y la época de recolección de setas.

Actualmente, existe muy poca información respecto a la influencia de las condiciones meteorológicas y climáticas en la aparición y estacionalidad de las larvas. Ni siquiera existen suficientes estudios para tratar de explicar dicha relación en el caso del tifus de los matorrales. Es más, actualmente las publicaciones existentes al respecto muestran resultados poco consistentes (Li *et al.*, 2014). Sin embargo, se ha visto que las condiciones ambientales juegan un papel determinante y más inmediato en la desaparición de las larvas (Kampen, 2000). Así, un cambio acentuado en las condiciones meteorológicas (gran

descenso de las temperaturas) se puede relacionar directamente con la disminución de la población de larvas en la vegetación (Tsai y Yeh, 2013). Es importante remarcar que para poder explicar la estacionalidad de las larvas en un hábitat determinado son necesarios estudios ecológicos multifactoriales de larga duración. Schöler *et al.*, en 2006 publicaron los resultados de un estudio multifactorial sobre el hábitat de *N. autumnalis*. En él, aunque se investigaban un gran número de variables, no se pudo establecer ninguna relación significativa entre la aparición y desaparición de las larvas, y los factores ambientales registrados (Schöler *et al.*, 2006). Su conclusión fue que las larvas de *N. autumnalis* son extremadamente tolerantes a las condiciones ambientales del ecosistema que habitan, por lo que aparecen en fechas muy similares a lo largo de los años, independientemente de la climatología. En nuestro caso, tras revisar los datos registrados en la Estación Meteorológica de Villoslada de Cameros (la más cercana a La Pineda), se ha observado que el descenso drástico de las temperaturas hacia finales de otoño se acompaña de una disminución significativa de larvas en la vegetación.

Los muestreos de larvas de la vegetación se llevaron a cabo mediante dos técnicas, la de arrastre y la de captura directa. La técnica de arrastre permitió recoger, de forma estandarizada, las larvas presentes en un punto fijo durante los años del estudio y así averiguar cuándo se producían los picos de abundancia de trombicúlidos en nuestra región. Por otro lado, la técnica de captura directa contribuyó a definir su localización en la vegetación, y a incrementar el número de ejemplares disponibles para el estudio, constatando su presencia en zonas de La Rioja en las que previamente se desconocía. Dentro del Parque Natural Sierra Cebollera sabemos que, aunque La Pineda sea probablemente la zona con mayor abundancia de larvas, éstas estaban presentes en otras zonas del municipio de Lumbreras, como los alrededores de la Venta de Piqueras y el paraje de Valdecalvo. También se encontraron en Ajamil de Cameros, situado en la Sierra del Camero Viejo; en el área recreativa conocida como Fuente Tosca, del municipio de Ocón, al Norte de Sierra de La Hez; y en el municipio de Villavelayo, al Sur de la Sierra de la Demanda (Figura 43). Por el contrario, no se evidenció la presencia de trombicúlidos en la vegetación de Jalón de Cameros,

Laguna de Cameros, Ortigosa de Cameros, San Román de Cameros, Villoslada de Cameros, Soto en Cameros, Terroba, Santa Eulalia, Canales de la Sierra y Munilla. Dado el carácter puntual de dichos muestreos, y teniendo en cuenta la distribución parcheada de las larvas en la vegetación (Cohen, 2003), no puede descartarse la presencia de trombicúlidos en estas zonas.

Uno de los objetivos de este trabajo fue identificar la especie o especies de trombicúlidos presentes en nuestro medio. Para la clasificación morfológica de larvas se escogió una muestra representativa (en cuanto a fechas, zonas de la vegetación y especies de aves) de las poblaciones de trombicúlidos encontradas. De acuerdo a nuestros resultados, todas las larvas de trombicúlidos clasificadas morfológicamente pertenecían a la especie *N. inopinata* (Stekolnikov *et al.*, 2014) (Anexo VI). Dicha especie no había sido descrita previamente en España, aunque está ampliamente distribuida en Europa, incluyendo Francia, República Checa, Eslovaquia, Austria, Alemania, Inglaterra, Polonia, Bulgaria, estados de la antigua Yugoslavia, Ucrania, Hungría, Rumanía y Rusia (tabla 2) (Kudryashova, 1998; Małkol *et al.*, 2010; Stekolnikov *et al.*, 2014). Además, el hecho de identificar *N. inopinata* en la época y lugar donde se producían los casos de trombiculiasis, nos permitió incriminar por primera vez esta especie como agente causal de esta afección (Santibáñez *et al.*, 2011a; Santibáñez *et al.*, 2014; Stekolnikov *et al.*, 2014) (Anexo VI).

Dado que *N. autumnalis* ha sido considerado hasta la fecha como la causa más frecuente de trombiculiasis en Europa (Kampen, 2002; Mullen y O'Connor, 2002; Ripka y Stekolnikov, 2006), los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que los casos europeos podrían estar provocados por más de una especie del género *Neotrombicula*. Sin embargo, el papel etiológico se le ha atribuido durante años sin seguir suficientes criterios morfológicos, debido probablemente a la complejidad taxonómica de la familia Trombiculidae. Aunque *N. autumnalis* y *N. inopinata* están estrechamente relacionados, existen ciertos caracteres que hacen a estas especies claramente diferenciables al examinar detalladamente sus caracteres morfológicos. *N. inopinata* se diferencia de *N. autumnalis* por la presencia de 8 ó más setas en la primera y segunda fila de setas dorsales del idiosoma (rara vez posee 6 ó 7 setas en una de esas filas), mientras que

N. autumnalis presenta siempre 6 setas en ambas filas. Por tanto, el número de setas en esa zona es de 36–45 en *N. inopinata* frente a las 26–33 de *N. autumnalis*. Además, *N. inopinata* es ligeramente más grande que *N. autumnalis* (escudo mayor, y setas y patas más largas).

En España, *N. autumnalis* se describió por primera vez en informes faunísticos como parásito de roedores recogidos en Galicia y Navarra (Kepka, 1960; Pereira-Lorenzo, 1993; Imaz *et al.*, 2006). En 2001, nuestro equipo involucró esta especie como causante de dermatitis estacional asociada al Parque Natural Sierra Cebollera (Jiménez *et al.*, 2001). Debido a la coincidencia de la clínica observada en los pacientes, con los datos disponibles en la literatura médica, se asumió que los ácaros que provocaban esta afección correspondían a *N. autumnalis*. Desde entonces, todos los años se ha tenido conocimiento de casos de trombiculiasis humana y canina en dicha zona (nuestra zona de estudio) entre finales de verano y mediados de otoño. De hecho, ésta es la única zona de España en la que se han comunicado casos hasta la fecha (Santibáñez *et al.*, 2014). En 2001, Fernández-Soto, *et al.*, recogieron larvas sin alimentar de *N. autumnalis* de la vegetación en una zona limítrofe a nuestra área de estudio (“Puerto de Piqueras”). En el mismo estudio recogen además ejemplares de *Neotrombicula* spp. retirados de roedores en Salamanca (Fernández-Soto, *et al.*, 2001). Con estos antecedentes, los trombicúlidos recogidos en la zona de estudio se clasificaron en un primer momento como *N. autumnalis*, aunque sin evidencias taxonómicas. De acuerdo a nuestros resultados, cabe la posibilidad de que los ejemplares de *N. autumnalis* correspondieran en realidad a *N. inopinata*. Desafortunadamente, la falta de una base taxonómica ha sido con frecuencia la característica común en los estudios relativos a la trombiculiasis. Una publicación sobre larvas de *N. autumnalis* retiradas de un avetorillo común (*Ixobrychus minutes*) en Turquía no proporcionaba información sobre la clasificación taxonómica (Cakiroglu *et al.*, 2008) y, de acuerdo a un estudio posterior, la presencia de *N. autumnalis* no había sido confirmada en dicho país (Stekolnikov y Daniel, 2012). En otras ocasiones, algunos autores han basado la identificación de trombicúlidos en datos morfológicos inapropiados, de acuerdo a características comunes a larvas de varias familias de ácaros o a varios géneros de la familia Trombiculidae (Guarneri *et al.*, 2005), o ignorando actualizaciones en la taxonomía de trombicúlidos

(Kampen, 2002; Schöler *et al.*, 2006). A la vista de lo anterior, la mayoría de estudios referidos a *N. autumnalis* como agente causal de trombiculiasis deberían revisarse.

Dada la representatividad de las muestras analizadas en nuestra región, y la rigurosa clasificación morfológica llevada a cabo con ayuda del Dr. Stekolnikov (Universidad de San Petersburgo, Rusia), el papel de *N. inopinata* en la epidemiología de la trombiculiasis en La Rioja es evidente, aunque no se descarta que otras especies puedan también estar involucradas.

En este trabajo se ha constatado la parasitación por *N. inopinata* en 3 especies de aves potencialmente migratorias (petirrojo europeo, zorzal común y pinzón vulgar). Esta especie de trombicúlido ya había sido encontrada previamente en petirrojos y zorzales comunes (Literak *et al.*, 2008). La parasitación por *N. inopinata* en pinzones vulgares no ha sido documentada. Sin embargo, Literak *et al.* en 2001 describieron la presencia de *Neotrombicula* spp. en ejemplares de pinzón vulgar (Literak *et al.*, 2001). Este hecho señala la posibilidad de que las aves actúen como dispersoras de trombicúlidos (Varma, 1964; Proctor y Owens, 2000; Dietsch, 2008). Nuestro grupo ya había sugerido el papel de las aves en la epidemiología de enfermedades humanas y veterinarias en La Rioja (Palomar *et al.*, 2012). En España, sólo Varma en 1964 documentó la presencia de trombicúlidos en 1 avetorrillo común (*I. minutus*) y 1 colirrojo real (*Phoenicurus phoenicurus*) en Andalucía (Varma, 1964).

Con el objetivo de conocer el ciclo biológico de los trombicúlidos, se llevaron a cabo muestreos de tierra en La Pineda para la búsqueda de estadios post-larvarios de la familia Trombiculidae. Los hábitats de la mayoría de las especies en fases post-larvarias son desconocidos (Makol *et al.*, 2010), y la diversidad de especies de dicha familia está basada únicamente en el conocimiento de las fases larvarias (Moniuszko y Małkol, 2014). De acuerdo a la bibliografía existente (Schöler *et al.*, 2006), esperábamos que, en nuestro medio, dichos estadios habitasen en el suelo. De las 108 muestras de tierra analizadas, sólo se encontraron adultos en 3 de ellas. Así, al igual que se ha documentado en otros trabajos, dejamos constancia de la dificultad existente para estudiar los estadios post-larvarios en su hábitat natural

(Kudryashova, 1998; Schöler *et al.*, 2006; Shatrov y Kudryashova, 2006; Małol *et al.*, 2010).

Gracias a la colaboración establecida con la Dra. Makol (Universidad de Wrocław, Polonia) se confirmó que los ejemplares post-larvarios recogidos en La Pineda correspondían a adultos de la especie *N. inopinata*. Los ejemplares se encontraron entre mayo y julio de 2010. Estos datos concuerdan con lo establecido por otros autores que describen la emergencia de la fase adulta en primavera (Shatrov *et al.*, 2006).

Apenas existen descripciones que ayuden a la clasificación de estadios post-larvarios de trombicúlidos. Algunas referencias iniciales (Womersley, 1952; Daniel, 1961) resultan incongruentes en comparación con las claves taxonómicas que se han seguido en este trabajo (Crossley, 1960; Wohltmann *et al.*, 2007). La sistemática de la familia Trombiculidae a día de hoy presenta ambigüedades y es necesario llevar a cabo nuevos estudios basados no sólo en criterios morfológicos sino también en biología molecular.

El análisis molecular de pequeños fragmentos de ARNr y ARNmt constituye una alternativa para la clasificación a nivel de especie de ácaros ectoparásitos (Potenza *et al.*, 2009). Los genes ARNr 12S y 16S, el *ITS* y el gen *COI* son marcadores utilizados comúnmente para estudios filogenéticos (Folmer *et al.*, 1994; Navajas y Fenton, 2000; Hebert *et al.*, 2003). En este trabajo, se planteó la búsqueda de un marcador molecular que permitiera la identificación genética de los trombicúlidos, como complemento a la clasificación taxonómica. Como se ha detallado en esta memoria, se testaron infructuosamente las muestras frente a una larga lista de parejas de cebadores. Dada la falta de estudios moleculares al respecto, se comenzó utilizando los ensayos de PCR que se realizaban de rutina en nuestro laboratorio (Black y Piesman, 1994; Zahler *et al.*, 1995; Beati y Keirans, 2001). En paralelo, y de acuerdo a las únicas secuencias nucleotídicas disponibles de la familia Trombiculidae, se utilizaron cebadores específicos para *L. pallidum* (Shao *et al.*, 2005). Ante los repetidos resultados negativos, se continuó el análisis utilizando cebadores descritos en estudios filogenéticos de ácaros (Navajas *et al.*, 1992; Folmer *et al.*, 1994; Söller *et al.*, 2001; Skerratt *et al.*, 2002; Dermauw *et*

al., 2009). Se lograron resultados positivos en 376 de 480 muestras analizadas con la pareja de cebadores LepF y LepR, que amplifica un fragmento de 658 pb del gen *COI* utilizado para estudios de “código genético del ADN” (Young *et al.*, 2012). En nuestro caso, todos los extractos de ADN se habían obtenido utilizando el mismo kit comercial y ajustando la concentración de ADN de acuerdo al protocolo optimizado para este ensayo. Ante el elevado porcentaje de resultados negativos, y en busca de una posible explicación, se decidió contactar con la Dra. Young (Instituto de Biodiversidad y Departamento de Biología de la Universidad de Guelph, Canadá), autora de correspondencia del artículo en el que se publicaron las secuencias de estos cebadores. Su experiencia con trombicúlidos había sido igual de infructuosa que la obtenida en este trabajo (comunicación personal). También la Dra. Makol, con la que se había colaborado para la clasificación morfológica de estadios post-larvarios, refería resultados negativos en 10-30% de las muestras al utilizar diferentes parejas de cebadores (comunicación personal). Los métodos de extracción usados en este estudio y los empleados por la Dras. Young y Makol son diferentes, y además, este fenómeno se ha visto en varios ensayos de PCR. Puesto que los métodos de extracción de ADN variaron en cada laboratorio y se emplearon distintos ensayos de PCR, el bajo rendimiento de estas pruebas podría estar relacionado con algún factor inherente al propio ácaro.

En nuestro caso, las secuencias nucleotídicas obtenidas mostraron máxima identidad (76,9 y 75,9%) con las del gen *COI* de *P. lucifer* (Insecta: Lycaenidae) y de *Neotrombicula microti* (Acari: Trombiculidae), respectivamente. Puesto que no existen secuencias de *N. inopinata* disponibles en GenBank y dado que hay pocas secuencias de Trombiculidae en general, parece probable atribuir estos resultados a un error metodológico del análisis de filogenia molecular conocido como “atracción de ramas largas”, según el cual *N. microti* tendría un código de barras de ADN muy divergente respecto al de otros miembros de su misma familia. Este error se produce cuando grupos que han evolucionado rápidamente son colocados erróneamente en la base de árboles filogenéticos. El método, que se rige por un sistema de puntuación, no es capaz de diferenciar un gran cambio repentino de una divergencia evolutiva ancestral. Los porcentajes de identidad similares de nuestras muestras con un lepidóptero y con un trombicúlido sugieren que la

familia Trombiculidae tiene una tasa de evolución acelerada, lo que podría justificar también los problemas de amplificación para este taxón (Young *et al.*, 2012 y comunicación personal de la Dra. Young).

Además de los ensayos de biología molecular dirigidos a la identificación genética de los trombicúlidos, se investigó la presencia de diversos géneros bacterianos asociados con artrópodos. Como se ha podido constatar en los muestreos mediante la técnica de captura directa llevados a cabo de la vegetación, los trombicúlidos comparten habitat con varias especies de garrapatas en nuestro medio (Portillo *et al.*, 2011; Palomar *et al.*, 2014) (Figura 21).

En los años 50, la mayoría de publicaciones acerca del posible rol de los trombicúlidos como vectores de enfermedad se referían a *N. autumnalis*, por ser la especie más conocida, a excepción de *Leptotrombidium*. Muchas de ellas, como la detección de *Rickettsia* spp. y *C. burnetii* en larvas de trombicúlidos de vegetación en Ucrania, Rusia y África (Vysotskaya y Sluger, 1953; Daniel, 1961; Kepka, 1965; Hoffmann, 1984), el hallazgo del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas en roedores parasitados por *Neotrombicula* spp. en Letonia y Eslovaquia (Grinbergs, 1959; Daniel, 1961), la infección accidental con fiebre Q de un trabajador de laboratorio tras manejar larvas de trombicúlidos de África Ecuatorial (Daniel, 1961) o la única descripción de la infección experimental por *C. burnetii* en *N. autumnalis* (Blanc *et al.*, 1952), aparecían como descripciones secundarias o incluso anecdóticas que apenas aportaban información científica (Kampen *et al.*, 2004). Desde mediados de la década de los 80 hasta los comienzos de la década del año 2.000, no hemos encontrado publicaciones acerca del posible papel de los trombicúlidos como vectores de bacterias o virus.

En este estudio, pese a que con la PCR de amplio espectro del gen ARNr 16S de bacterias se obtuvieron resultados positivos en el 26% de los lotes de larvas de vegetación testados, la secuenciación directa de los amplicones no permitió identificar ningún microorganismo. Conscientes de que podríamos haber intentado el clonaje de estos fragmentos génicos, centramos nuestros esfuerzos en la búsqueda de bacterias asociadas a artrópodos utilizando cebadores específicos para varios géneros bacterianos.

En nuestro estudio se logró amplificar un fragmento de la región central del gen *gltA* de *Rickettsia* spp. en 41 lotes de larvas de vegetación. En el *6th International Meeting on Rickettsiae and Rickettsial Diseases*, celebrado en Heraclion, se comunicaron datos preliminares al respecto (Santibáñez *et al.*, 2011b). El gen *gltA* se ha utilizado en muchas ocasiones como diana de PCR para el cribado de *Rickettsia*, seguida de ensayos más específicos de especie como los del gen *ompA* (Santibáñez *et al.*, 2013). Las 41 secuencias nucleotídicas de la región central de *gltA* se compararon con las disponibles en GenBank. El análisis de secuencias permitió agruparlas en 5 patrones. Por su carácter novedoso, 3 secuencias, con números de acceso KR337640-2, fueron depositadas en GenBank (Sección 3.3 de Resultados). Las 2 secuencias patrón restantes mostraron homología (100% identidad) con *R. conorii* o *R. heilonjiangensis*, respectivamente (Tabla 26).

Los detalles sobre porcentajes de identidad de nuestras secuencias con las de rickettsias validadas y con rickettsias previamente detectadas en ácaros de la familia Trombiculidae se resumen en la tabla 26. Brevemente, y de acuerdo a los criterios taxonómicos descritos por Raoult *et al.* (2005), una rickettsia validada es aquella que se ha aislado en cultivo puro, que presenta caracteres fenotípicos y genotípicos que permiten discriminarla, y de la cual una cepa tipo adaptada al cultivo celular se encuentra disponible para la comunidad científica y ha sido depositada en 2 colecciones de 2 países oficialmente reconocidos por el Centro Mundial de Datos sobre Microorganismos (Raoult *et al.*, 2005).

En Asia, son varios los grupos de autores que refieren haber detectado *Rickettsia* spp. en larvas de trombicúlidos retirados de roedores silvestres (Choi *et al.*, 2007; Tsui *et al.*, 2007). En uno de los estudios (Choi *et al.*, 2007), la especie o especies de trombicúlidos no se especifican, si bien su localización (Corea) hace pensar en *Leptotrombidium* spp. A este mismo género pertenecen los trombicúlidos analizados en Taiwán (Tsui *et al.*, 2007). En nuestro caso, las secuencias obtenidas mostraron porcentajes de identidad que oscilaron entre 82,3-100% con las detectadas por Choi *et al.* (nº de acceso en GenBank DQ792812 y DQ792806) (Choi *et al.*, 2007) (Tabla 26).

Recientemente en Europa, un estudio similar evidenció la presencia de *Rickettsia* spp. en larvas de trombicúlidos (*H. zachvatkini* y *K. storkani*) retiradas de roedores (Mit'ková *et al.*, 2015). Como curiosidad, mencionar que la especie *H.*

zachvatkini ha sido descrita parasitando micromamíferos en Galicia (Pereira-Lorenzo, 1993).

En nuestro caso, el hecho de no haber obtenido resultados positivos para el resto de genes de *Rickettsia* spp. analizados, y puesto que el gen *gltA* está muy conservado (Regneri *et al.*, 1991), abre la posibilidad de que estas secuencias puedan no corresponder a *Rickettsia* spp.

Tabla 26: Porcentajes de identidad de las secuencias nucleotídicas obtenidas en este estudio.

n° acceso en GenBank	Id %	Bacteria relacionada con máxima identidad en Genbank	Id %	<i>Rickettsia</i> validada con máxima identidad en Genbank	Id %	Bacteria detectada en Trombiculidae con máxima identidad en Genbank
KR337640	99,3	<i>Rickettsia</i> de <i>A. decempunctata</i> (AJ269522)	95,0	<i>Rickettsia asiatica</i> (AF394901)	93,3	<i>Rickettsia</i> sp. clon MG98-1 (DQ792812)
KR337641	98,3	<i>Rickettsia belli</i> (U59716)	98,3	<i>Rickettsia belli</i> (U59716)	86,6	<i>Rickettsia</i> sp. clon MG116-4 (DQ792806)
	100	<i>Rickettsia heilongjiangensis</i> (AF178034)	100	<i>Rickettsia heilongjiangensis</i> (AF178034)	99,3	<i>Rickettsia</i> sp. clon MG98-1 (DQ792812)
	100	<i>Rickettsia conorii</i> (AE006914)	100	<i>Rickettsia conorii</i> (AE006914)	100	<i>Rickettsia</i> sp. clon MG98-1 (DQ792812)
KR337642	90,4	<i>Rickettsia</i> endosimbionte de <i>Rh. crassipes</i> (JQ925545)	82,8	<i>Rickettsia felis</i> (CP000053)	82,3	<i>Rickettsia</i> sp. clon MG116-4 (DQ792806)

Id: identidad. A.: *Adalia*. Rh.: *Rhaphium*.

Por otra parte, en las larvas de vegetación no se logró detectar *A. phagocytophilum*, *Borrelia* spp., *C. burnetii*, *Bartonella* spp. ni *O. tsutsugamushi*. El número de larvas de trombicúlidos retiradas de aves en los que se investigó la presencia de bacterias fue muy escaso (n=11). No obstante, hay que mencionar que en estos ejemplares no se detectó *Rickettsia* spp., *A. phagocytophilum* ni *Borrelia* spp., siendo imposible realizar ensayos de PCR frente a *C. burnetii*, *Bartonella* spp. ni *O. tsutsugamushi* por no disponer de suficiente ADN.

Tan sólo hemos encontrado una publicación (Fernández-Soto *et al.*, 2001) que recoge datos acerca de la detección de *A. phagocytophilum* en larvas de *N. autumnalis* de vegetación en el “Puerto de Piqueras” que, como ya se ha mencionado anteriormente, es limítrofe a nuestra zona de estudio. La infección por *A. phagocytophilum* en larvas no alimentadas implicaría la transmisión transovárica de la bacteria, y esto nunca ha sido demostrado. En nuestra opinión los resultados son más que dudosos, y es muy posible que se trate de una contaminación. Tal y como sucedió con nuestras muestras, en las larvas de *Neotrombicula* spp. retiradas de una curruca capirotada (*Sylvia atricapilla*) en la República Checa no se evidenció la presencia de *A. phagocytophilum* (Literak *et al.*, 2008).

La enfermedad de Lyme, causada por bacterias del grupo *B. burgdorferi* s.l., es una de las enfermedades transmitidas por garrapatas más frecuentes en Europa (Portillo *et al.*, 2014). El hecho de que un alto porcentaje de pacientes con enfermedad de Lyme no recuerde haber sido picado por garrapatas (Strle *et al.*, 1996; Oteo *et al.*, 2000), hizo plantearse a varios grupos la cuestión de la posible implicación de los trombicúlidos europeos en la transmisión de este patógeno. Así, en Alemania, se detectó ADN de *Borrelia* spp. en larvas de *N. autumnalis* retiradas de musaraña gris (*Crocidura russula*) o alimentadas sobre roedores de laboratorio infectados con diferentes especies del grupo de *B. burgdorferi* s.l. (Kampen *et al.*, 2004). En 2008, se describió la presencia de diferentes borrelias en larvas de *Neotrombicula* spp. retiradas de aves en la República Checa (Literak *et al.*, 2008). El papel de *Neotrombicula* spp. como vector competente de borrelia continúa siendo una cuestión no resuelta hasta la fecha.

A excepción de las escasas referencias, en ocasiones citas indirectas, que durante los años 50-60 describían los trombicúlidos como reservorios de *C. burnetii* (Blanc *et al.*, 1952; Daniel, 1961; Kepka, 1965), no hemos encontrado publicaciones que describan la presencia de *C. burnetii* en estos ácaros, lo que se correlaciona con la ausencia de resultados positivos en nuestros ejemplares.

Son escasos los grupos que han investigado *Bartonella* spp. en trombicúlidos. La descripción en EE.UU. de una cepa de *Bartonella* sp. estrechamente relacionada con *Bartonella vinsonii* en ardillas grises (*Sciurus carolinensis*) (Bown *et al.*, 2002) dio pie al posterior cribado de sus ectoparásitos frente a esta bacteria. En consonancia con los resultados obtenidos en este trabajo, ningún trombicúlido (*Eutrombicula splendens*, *Myiatrombicula cynos* y *Neotrombicula whartoni*) mostró infección por *Bartonella* spp., aunque el microorganismo se encontró en pulgas y piojos (Durden *et al.*, 2004). Por otro lado, *Bartonella tamiae*, previamente aislada de pacientes en Tailandia (Kosoy *et al.*, 2008), fue identificada en *Leptotrombidium* spp. retirados de roedores silvestres en ese país (Kabeya *et al.*, 2010). El papel de los trombicúlidos como potenciales vectores de *Bartonella* spp. requiere más estudios.

Los trombicúlidos del género *Leptotrombidium* son los vectores demostrados de *O. tsutsugamushi* (Rajapakse *et al.*, 2011). Aparte de *Leptotrombidium* spp., ejemplares de trombicúlidos de las especies *N. japonica* sin alimentar recogidos de vegetación en Japón (Pham *et al.*, 2001) y *Eushoengastia koreaensis* retirados de roedores silvestres de Corea (Lee *et al.*, 2011) se han implicado como vectores de *O. tsutsugamushi*. En una publicación muy reciente, se investigó la presencia de *Rickettsia*, *Anaplasma/Ehrlichia*, *C. burnetii*, *Bartonella* y *O. tsutsugamushi* en *Leptotrombidium* spp. retirados de personas y animales en Japón, detectándose únicamente *O. tsutsugamushi* (Reeves *et al.*, 2015). Hasta la fecha, no existen publicaciones que relacionen trombicúlidos europeos con la presencia del agente causal del tifus de los matorrales. En nuestro caso, los ejemplares de vegetación testados frente a esta bacteria dieron resultados negativos.

Como resumen, podemos afirmar que hasta la fecha, el papel de los trombicúlidos como vectores competentes de microorganismos no está comprobado, excepto para el caso de *Leptotrombidium* spp. y *O. tsutsugamushi*.

Gracias a los datos clínico-epidemiológicos recogidos en este trabajo se ha podido realizar una descripción completa de la trombiculiasis humana. Aunque en ningún caso se han presentado complicaciones, esta dermatitis conlleva un importante malestar general asociado al intenso picor. Las características del cuadro clínico observado han sido similares a las descritas por otros autores (Kampen, 2000; Kampen, 2002; Chaccour, 2005; Guarneri *et al.*, 2005; Martens *et al.*, 2012). Sin embargo, existen datos discordantes con la serie publicada por Pogacnik y Kansky en 1998, en la que el periodo de incubación es de 24-48 h en comparación a las 3-16 h observadas en nuestros pacientes (Pogacnik y Kansky, 1998). No se han visto diferencias importantes entre las características clínicas de los casos recogidos durante los 3 años del estudio. Cabe destacar que el aspecto más variable es la localización de las picaduras, que está directamente relacionada con la zona de contacto con la vegetación. Las picaduras aparecieron en las extremidades inferiores en el 100% de los casos recogidos, dato lógico teniendo en cuenta que, independientemente de la actividad, las piernas son las partes del cuerpo más expuestas a la vegetación. Un buen ejemplo de la relación entre actividad realizada y localización de las picaduras es que el 66,7% de las personas que fueron picadas mientras recogían setas presentaban picaduras en las extremidades superiores, frente al 23,3% de los que fueron parasitados en esa zona mientras paseaban. El 46,7% de los trabajadores fueron picados en las extremidades superiores al realizar trabajos forestales, porcentaje similar al observado en cazadores (42,8%). En estos grupos las extremidades superiores son zonas muy expuestas, mientras que el resto de las zonas del cuerpo presentaban menos picaduras debido a que su indumentaria les protege mejor del contacto con la vegetación. El tipo de ropa usada por los recolectores de setas en comparación a la de trabajadores y cazadores podría explicar las diferencias en la distribución de las picaduras en el resto del cuerpo. Respecto al resto de las zonas del cuerpo, las picaduras se registraron en las axilas, ingles y tronco en el 16,5%, 15,4% y 12,1% de los pacientes incluidos en el estudio, respectivamente. Tan sólo el 4,4% de los encuestados presentaban picaduras en la cintura.

En nuestra experiencia, todos los casos de trombiculiasis se han producido siempre en personas con el antecedente de contacto directo con la vegetación. Por el contrario, Guarneri *et al.* (2005) describieron el caso de un paciente en el que

no se dio este contacto y que presentaba manifestaciones clínicas similares a las de otro paciente afecto de trombiculiasis, que había estado cazando con sus perros (Guarneri *et al.*, 2005). Los autores especularon que los trombicúlidos fueron transmitidos al paciente por el contacto directo con los perros infectados, ya que los animales solían sentarse sobre sus dueños, y las picaduras se localizaban en el abdomen y los muslos del paciente. Asimismo, Parcell *et al.* en 2013 comunicaron un caso de conjuntivitis causada por *N. autumnalis* en una anciana sin antecedente de contacto con la vegetación, sugiriendo que el trombicúlido provenía del gato de la paciente, si bien no aportaban ningún dato sobre el animal (Parcell *et al.*, 2013). Estos casos sugieren que el contacto estrecho con mascotas parasitadas constituiría una ruta inusual de transmisión de la trombiculiasis, haciendo posible la transmisión de los ácaros sin contacto directo con la vegetación. En ninguno de los casos recogidos en este trabajo se ha adquirido la trombiculiasis por esta vía. Además, no tenemos constancia de ninguna persona que haya sido picada tras mantener contacto directo con perros parasitados.

Debido a la inespecificidad de las manifestaciones clínicas de la trombiculiasis humana, la estacionalidad del cuadro y el antecedente del contacto con la vegetación en zonas de riesgo son primordiales para un correcto diagnóstico. Además, puesto que el agente causal rara vez se encuentra en la piel, esta afección puede confundirse fácilmente con picaduras de pulgas, chinches, mosquitos o incluso con la sarna (Kampen, 2000). Así, el diagnóstico diferencial debe incluir, además de lo anterior, las fitofotodermatitis y la hipersensibilidad a sustancias químicas (Kampen, 2002). Por tanto, una correcta anamnesis es imprescindible, ya que la trombiculiasis ha de ser tenida en cuenta siempre que aparezcan cuadros de dermatitis inespecíficos, al menos en nuestra región, durante el otoño.

El tratamiento de la trombiculiasis humana es básicamente sintomático, y consiste en la administración de lociones y/o fármacos que calmen el picor como antihistamínicos y corticoesteroides tópicos. En casos de infección secundaria asociada al rascado, puede requerirse el uso de antibióticos (Jones, 1987). Ninguno de los pacientes recogidos en este estudio precisó tratamiento antibiótico ni con corticoesteroides. A todos se les recomendó realizar baños de avena coloidal y el uso de ropa de algodón blanca como medidas de soporte. Asimismo,

se les prescribió antihistamínicos. También se recomendaba evitar el rascado de las lesiones, para prevenir eccemas e infección secundaria de las mismas. En ninguno de los casos se observó el desarrollo de infecciones sistémicas atribuibles a la transmisión de agentes biológicos.

En cuanto a la prevención, la parasitación puede minimizarse llevando una indumentaria adecuada (García-Álvarez *et al.*, 2013) y rociando los calcetines y perneras de los pantalones con repelente (Jones, 1987). Los más comunes, y que mejores resultados has mostrado son los sprays que contienen dietil-meta-toluamida (DEET) o permetrina (Breedon *et al.*, 1982; Kampen, 2000). Sin embargo, a la vista de los resultados obtenidos, los repelentes no son siempre efectivos. Aunque no resulte razonable, podría considerarse que la única manera de evitar las picaduras es evitar acudir a las zonas de riego en las épocas de actividad de las larvas. De hecho, se tiene constancia de que tanto trabajadores de la Consejería de Medio Ambiente de nuestra Comunidad Autónoma, como de empresas privadas que tienen que trabajar en La Pineda en la época de actividad de los trombicúlidos, llegaron a solicitar un cambio de destino. Los propios trabajadores argumentaban que ni una indumentaria adecuada ni el uso de repelentes les libraba de las parasitaciones. Además, los trabajadores forestales de la Comunidad Autónoma destinados a las zonas de riesgo defienden desde hace años que esta afección se considere enfermedad profesional y se tomen medidas al respecto.

Una vez producido el contacto con las larvas de trombicúlidos, se ha observado que una ducha o baño con agua caliente y jabón, tomada lo antes posible tras la exposición, es una medida de prevención importante. Tras la observación de los casos clínicos aquí incluidos se ha visto que la dermatitis se minimiza y el tiempo de recuperación se acorta, siendo este efecto mayor cuanto antes se realice dicha medida. Por eso, desde nuestro Departamento se recomienda que inmediatamente después de la exposición, las personas se duchen y laven la ropa que llevaban. De esta manera, parece que se evita que los trombicúlidos se adhieran a la piel y que los que estén ya adheridos se caigan, ya que necesitan entre 3 y 6 horas para anclarse firmemente (Kampen, 2002; Mullen y O'Connor, 2002).

Los casos clínicos caninos a los que hemos tenido acceso son mucho más graves que la dermatitis pruriginosa observada en humanos. Las referencias sobre la trombiculiasis en revistas de medicina veterinaria son escasas. Coincidiendo con la clínica observada en los casos recogidos en este estudio, la trombiculiasis canina se caracteriza por una parasitación masiva de los animales en las zonas de mayor contacto con la vegetación (Nuttall *et al.*, 1998; Smal *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2004; Guarneri *et al.*, 2005; Kavitha *et al.*, 2011; Giannouloupoulos *et al.*, 2012; Tudor, 2012). Los datos de las analíticas a las que hemos tenido acceso muestran signos de deshidratación, que se explican por la inapetencia de los animales ante la comida y bebida y los vómitos continuados.

Los casos descritos en Europa en los que detectan trombicúlidos adheridos a la piel de los animales se atribuyen a *N. autumnalis* (Guarneri *et al.*, 2005; Tudor, 2012; Giannouloupoulos *et al.*, 2012). Sin embargo, los autores no hacen referencia a la clasificación morfológica de los ejemplares retirados. Por otro lado, en 2001 se describió el primer caso de trombiculiasis humana y canina en África (Heyne *et al.*, 2001), atribuyendo la causalidad a *L. subquadratum*.

En nuestro estudio sólo se tuvo acceso a los trombicúlidos retirados de un perro. Debido al estado de los mismos no se pudieron clasificar hasta especie, aunque de acuerdo a claves taxonómicas correspondían al género *Neotrombicula*. Basándonos en la epidemiología, parece lógico pensar que el agente causal en este caso fuera *N. inopinata*, puesto que la parasitación tuvo lugar en octubre en la zona de Lumbreras.

El tratamiento de la trombiculiasis canina es sintomático y empírico ya que no se conoce la fisiopatología de esta parasitación. Consiste en la administración de corticoesteroides y medidas de soporte (Smal *et al.*, 2004). Teniendo en cuenta que los perros resultan masivamente parasitados, el momento de la desparasitación resulta clave para la evolución favorable de los animales. El uso de fipronil ha mostrado buenos resultados en los casos aquí recogidos, así como ha quedado constatado en la literatura (Nuttall *et al.*, 1998; Seixas *et al.*, 2006). Dada la gravedad de los casos, la prevención en los casos caninos es de vital importancia. Deben de evitarse las actividades al aire libre con perros (paseo,

caza, etc.) durante las épocas de riesgo en las zonas en las que se ha descrito la trombiculiasis. Es la única medida eficaz.

Inicialmente los casos de trombiculiasis, tanto humanos como caninos, se asociaron únicamente al Parque Natural Sierra Cebollera, restringidos al municipio de Lumbreras. Los datos de este estudio han permitido ampliar la distribución de casos de trombiculiasis a otros municipios de La Rioja. Hasta el momento, tenemos constancia de casos humanos asociados a Lumbreras, Canales de la Sierra, Villavelayo, Ajamil de Cameros, Ocón y Munilla y de casos caninos en Lumbreras, Villavelayo, Ajamil de Cameros, Munilla, San Millán de la Cogolla, Brieva de Cameros, Ventrosa, Mansilla de la Sierra y Anguiano.

El número de pacientes incluidos en este trabajo es una pequeña representación del total de casos de trombiculiasis humana que ocurren cada otoño. En nuestra región la trombiculiasis saltó a los medios de comunicación en 2007 debido a la alarma social provocada por las picaduras de los trombicúlidos en cazadores y recolectores de setas. De hecho, como ya se ha señalado en esta memoria, el tema llegó a tratarse como pregunta parlamentaria, por considerarse un problema de Salud Pública. Antes de la realización de este trabajo, en las bases bibliográficas no existían descripciones sobre la trombiculiasis en España, y sólo se podían encontrar las realizadas por parte del equipo del antiguo Hospital de La Rioja y las aportaciones de un veterinario en Soria (José Luis Serrano Barrón), que había llamado la atención al respecto en una página *web* (<<http://argos.portalveterinaria.com/noticia/1412/articulos-archivo/neotrombicula-autumnalis:-un-parasito-a-tener-en-cuenta.html>>). La difusión que desde el comienzo del proyecto se hizo en nuestra región (Anexos I y II) ha propiciado un mayor conocimiento de la trombiculiasis en La Rioja, tanto para el personal sanitario como para la población general. Esto incrementó el número de afectados que contactó con nuestro Departamento. De hecho, en varias ocasiones han sido los propios afectados los que nos han comunicado sus casos, a través de la dirección de correo electrónico o del número de teléfono que se habilitaron con este fin. Asimismo, estas vías de contacto han servido de ayuda a los facultativos de las zonas donde la trombiculiasis está presente para resolver dudas sobre esta

afección. La difusión de los dípticos ha sido de utilidad para ayudar a personas de otras Comunidades Autónomas. Se han dado casos en personas de Cantabria o del País Vasco que acudían a sus centros de Atención Primaria con nuestro díptico. Ante el desconocimiento de sus médicos de cabecera, contactaban con nosotros para guiar el manejo de los pacientes. Además, varias páginas *web* de asociaciones de senderismo y de aficionados a la micología tienen enlaces que permiten descargarse estos documentos (<<http://www.setasysitios.com/setas-y-sitios/cuaderno-de-campo>>). En la actualidad, y una vez que se reconoce el cuadro, la mayoría de los casos son atendidos en Atención Primaria y no llegan a la Atención Especializada.

En resumen, en esta memoria se aportan datos concluyentes sobre la presencia de trombiculiasis humana y canina provocadas por una especie de trombicúlido no reconocido previamente en España ni asociado a trombiculiasis en ninguna parte del mundo. Existe una clara estacionalidad y zonas geográficas bien definidas que permiten establecer mecanismos de prevención frente a esta afección. En lo que concierne al papel de *N. inopinata* como vector de microorganismos, nuestros datos sugieren que, en principio, no transmiten ninguna infección de las que habitualmente vehiculan otros ácaros como garrapatas, con las que comparten nicho ecológico. De la difusión, conocimiento y nuevos estudios relacionados con el tema aquí presentado dependerá la disminución de los molestos casos humanos y de los potencialmente mortales casos caninos. En el momento actual sólo podemos aconsejar evitar adentrarse en la vegetación de las zonas en las que existe alto riesgo de parasitación. Esperamos que las nuevas técnicas de estudio, como la secuenciación masiva del microbioma del parásito, arrojen luz sobre su potencial implicación en la transmisión de agentes patógenos.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. La trombiculiasis es una ectoparasitosis que afecta a personas y perros, presente en zonas montañosas definidas de La Rioja.
2. Las personas que entran en contacto con *N. inopinata* desarrollan, en pocas horas, un cuadro muy molesto de dermatitis pruriginosa.
3. Los perros que sufren una parasitación masiva por trombicúlidos desarrollan un cuadro consistente en vómitos y ataxia que compromete su vida, llegando en ocasiones a un desenlace fatal.
4. Existe una clara estacionalidad en la presencia de larvas de *N. inopinata* y trombiculiasis.
5. En el medio estudiado, se han encontrado adultos de *N. inopinata* en muestras de tierra recogidas en primavera.
6. Los datos epidemiológicos avalan que el agente causal de la trombiculiasis en el medio estudiado son las larvas de *N. inopinata*.
7. El hallazgo de trombicúlidos en aves plantea un posible papel de éstas en la dispersión de dichos ácaros.
8. No se ha detectado la presencia de *Rickettsia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia* spp., *Coxiella burnetii*, *Bartonella* spp. y *Orientia tsutsugamushi* en larvas de *N. inopinata*.
9. La única medida preventiva eficaz frente a la trombiculiasis es evitar el contacto con la vegetación en los periodos y zonas de actividad de las larvas de trombicúlidos.
10. Dado el carácter emergente de la trombiculiasis en nuestro medio, se deben establecer estrategias preventivas, como la información a la población acerca del riesgo existente en las áreas donde están presentes los trombicúlidos.

Conclusions

1. Trombiculiasis is an ectoparasitosis affecting people and dogs that is present in well-defined mountainous areas of La Rioja.
2. People in contact with *N. inopinata* suffer from very disturbing pruriginous dermatitis after a few hours.
3. Dogs with massive parasitation by trombiculid mites develop clinical manifestations consisting of vomiting and ataxia that commit their lives, reaching sometimes an outcome fatal.
4. There is a clear seasonality in the presence of *N. inopinata* larvae and trombiculiasis.
5. In the studied area, adult specimens of *N. inopinata* were found in soil samples collected in spring.
6. The epidemiological data support that *N. inopinata* larvae are the etiological agents of trombiculiasis in the studied area.
7. The finding of trombiculid mites parasitizing birds suggests the potential role of birds in the dispersion of these mites.
8. The presence of *Rickettsia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia* spp., *Coxiella burnetii*, *Bartonella* spp. and *Orientia tsutsugamushi* has not been detected in *N. inopinata* larvae.
9. To avoid contact with vegetation in periods and areas of activity of trombiculid larvae is the only effective preventive measure against trombiculiasis.
10. Preventive strategies, such as information to the population about the risk existing in areas where trombiculid mites are present, should be established, given the emerging nature of the trombiculiasis in our environment.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Arlian LG. 2009. Chiggers and Other Disease-Causing Mites. En: Resh VH, Carde R, eds. Encyclopedia of Insects. 2ª ed. Amsterdam. Elsevier/Academic Press. 152-156.

Balcells ME, Rabagliati R, García P, Poggi H, Oddó D, Concha M, Abarca K, Jiang J, Kelly DJ, Richards AL, Fuerst PA. 2011. Endemic Scrub Typhus – like Illness, Chile. *Emerg Infect Dis.* 17(9): 1659-1663.

Beati L, Keirans JE. 2001. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. *J Parasitol.* 87: 32-48.

Belozerov V. 2010. Seasonal adaptations in the life cycles of mites and ticks: comparative and evolutionary aspects. En: Sabelis MW, Bruin J, eds. Trends in Acarology: Proceedings of the 12th International Congress. Dordrecht. 319-326.

Beltrán M, Valdivia C, Ponce-Ramírez R, Chambergo M. 2009. *Trombicula autumnalis* (isangos) en un jardín de niños de la selva peruana. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 26(1): 58-60.

Berlese A. 1905. Apparachio per raccogliere presto ed in gran numero piccoli Artropodi. *Redia.* 2: 85-89.

Black, WC, Piesman J. 1994. Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA.* 11; 91(21) 10034–10038.

Blacksell SD, Bryant NJ, Paris DH, Doust J, Sakoda Y, Day NPJ. 2007. Scrub typhus serologic testing with the indirect immunofluorescence method as a diagnostic gold standard: a lack of consensus leads to a lot of confusion. *Clin Infect Dis.* 44: 391-401.

Blanc G, Joyeux C, Bruneau J. 1952. Observations sur les larves de *Trombicula autumnalis* (Shaw) dans le centre de la France. Recherches sur leur role possible dans la transmission de la maladie de Derrick-Burnet (Q-Fever). *Arch. Inst. Pasteur Maroc.* 4: 314–325.

Bowman DD, Hendrix CM, Lindsay DS, Barr SC. 2008. Trombiculid mites: Chiggers. En: John Wiley & Sons, eds. *Feline Clinical Parasitology*. Iowa State University Press. 385-88.

Bown KJ, Ellis B, Birtles RJ, Durden L, Lello J, Begon M, Bennett M. 2002. New world origins for haemoparasites infecting United Kingdom grey squirrels (*Sciurus carolinensis*), as revealed by phylogenetic analysis of bartonella infecting squirrel populations in England and the United States. *Epidemiol Infect.* 129: 647-53.

Breeden GC, Schreck CE, Sorensen AL. 1982. Permethrin as a clothing treatment for personal protection against chigger mites (Acarina: Trombiculidae). *Am J Trop Med Hyg.* 31(3): 589-92.

Brennan JM, Goff ML. 1977. Keys to the genera of chiggers of western hemisphere (Acarina: Trombiculidae). *J Parasitol.* 77(3): 554-66.

Burns, DA. 2009. Diseases caused by arthropods and other noxious animals. En: Griffiths CEM, Burns DA, Breathnach SM., Cox NH, eds. *Rook's Textbook of Dermatology*. 8^a ed. University of Cumbria, Carlisle. Blackwell Publishing. 1-61.

Cakiroglu D, Pekmezci D, Meral Y, Gokalp G, Acici M. 2008. Trombiculidae larvae (*Neotrombicula autumnalis*) infestation in a Little Bittern (*Ixobrychus minutus*) in Turkey. *Parasitol Res.* 102: 1077-79.

Chaccour CJ. 2005. Trombiculiasis: reporte de dos casos y revisión de la literatura. *Dermatología Venezolana.* 43 (2): 18-21.

Chick A. 2011. The mounting of Mites (Acari) in Modified Dioni's. *Micscape Magazine*. <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/dec11ind.html>.

Choi YJ, Jang WJ, Kim JY, Ryu JS, Lee SH, Park KH, Paik HS, Koh YS, Choi MS, Kim IS. 2005. Spotted fever group and typhus group Rickettsioses in humans, South Korea. *Emerg Infect Dis.* 11:237-44.

Choi YJ, Lee EM, Park JM, Lee KM, Han SH, Kim JK, Lee SH, Song HJ, Choi MS, Kim IS, Park KH, Jang WJ. 2007. Molecular detection of various rickettsiae in mites (Acari: Trombiculidae) in southern Jeolla Province, Korea. *Microbiol Immunol.* 51(3): 307-312.

- Clark K, Hendricks A, Burge D.** 2005. Molecular identification and analysis of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in lizards in the southeastern United States. *Appl Environ Microbiol.* 71(5): 2616-2625.
- Crossley DA.** 1960. Comparative external morphology and taxonomy of nymphs of the Trombiculidae (Acarina). *The University of Kansas Science Bulletin.* 40: 135–321.
- Cunningham MW, Phillips L, Wellbourn C.** 2001. Trombiculiasis in the Florida black bear. *J Wildl Dis.* 37(3): 634-639.
- Daniel M.** 1961. The bionomics and developmental cycle of some chiggers (Acariformes, Trombiculidae) in the Slovak Carpathians. *Československá parasitologie.* 8: 31–118.
- Dermauw W, Leeuwen T, Vanholme B, Tirry L.** 2009. The complete mitochondrial genome of the house dust mite *Dermatophagoides pteronyssinus* (Trouessart): a novel gene arrangement among arthropods. *BMC genomics.* 10: 107.
- Dhiman RC.** 2014. Emerging vector-borne zoonoses: eco-epidemiology and public health implications in India. *Front Public Health.* 30; 2:168.
- Díaz JH.** 2010. Mite-transmitted dermatoses and infectious diseases in returning travelers. *J Travel Med.* 17(1): 21-31.
- Dietsch TV.** 2008. A relationship between avian foraging behavior and infestation by trombiculid larvae (Acari) in Chiapas, Mexico. *Biotropica.* 4 (2): 196-202.
- Durden L, Ellis B, Banks CW, Crowe JD, Oliver JH.** 2004. Ectoparasites of gray squirrels in two different habitats and screening of selected ectoparasites for bartonellae. *J Parasitol.* 90(3): 485-489.
- Elston DM.** 2006. What's eating you? Chiggers. *Cutis.* 77(6): 350-352.
- Faccini-Martínez AA, García-Álvarez L, Hidalgo M, Oteo JA.** 2014. Syndromic classification of rickettsioses: an approach for clinical practice. *Int J Infect Dis.* 28: 126-139.
- Fernández-Rubio F.** 1999. Artrópodos y salud humana. Editado por Gobierno de Navarra y Departamento de Salud.

Fernández-Soto P, Pérez-Sánchez R, y Encinas-Grandes A. 2001. Molecular detection of *Ehrlichia phagocytophila* genogroup organisms in larvae of *Neotrombicula autumnalis* (Acari: Trombiculidae) captured in Spain. *J Parasitol.* 87(6): 1482-1483.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol.* 3: 294-299.

García-Álvarez L, Palomar AM, Oteo JA. 2013. Prevention and prophylaxis of tick bites and Tick-Borne related diseases. *Am J Infect Dis.* 9(3): 104-116.

Ghorbani RP, Ghorbani J, Jain MK, Walker DH. 1997. A case of scrub typhus probably acquired in Africa. *Clin Infect Dis.* 25: 1473-1474.

Giannouloupoulos GD, Desilla LJ, Desilla ES, Papadopoulos I, Saridomichelakis MN. 2012. First report of *Neotrombicula autumnalis* infestation in a cat and a dog from Corfu (Greece) and in a cat from Limassol (Cyprus). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12: 1065-1067.

Goff ML, Loomis RB, Welbourn WC, Wrenn WJ. 1982. A Glossary of Chigger Terminology (Acari: Trombiculidae). *J Med. Entomol.* 19(3): 221-238.

Goldberg SR, Holshuh H J. 1992. Ectoparasite-induced lesions in mite pockets of the Yarrow's spiny lizard, *Sceloporus jarrovi* (Phrynosomatidae). *J Wildl Dis.* 28: 537-541.

Gómez-Puerta L, Olazabal J, López-Urbina MT, González AE. 2012. Trombiculiasis caused by chigger mites *Eutrombicula* (Acari: Trombiculidae) in Peruvian alpacas. *Vet Parasitol.* 190: 294– 296

Grinbergs AR. 1959. Krasnotelki *Trombicula zachvatkini* Schlug. kak vozmoznyj epidemioloceskiy faktor v Latvijskoj SSR. *Des. sovesc. po parazitolog. probl. i prirodnoocag. bolez. fasc.* 2: 59.

Guarneri F, Pugliese A, Giudice E, Guarneri C, Giannetto S, Guarneri B. 2005. Trombiculiasis: Clinical contribution. *Eur J Dermatol.* 15: 495-96.

Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Biol Sci.* 7: 270(1512):313-321.

- Heyne HEU, Coetzee L.** 2001. First report of a parasitic mite, *Leptotrombidium* (Hypotrombidium) *subquadratum* (Lawrence) (Acari: Trombiculidae: Trombiculinae), from dogs and children in the Bloemfontein area, South Africa. J S Afr Vet Assoc. 72(2):105-6.
- Hill C.** 2010. Genome analysis of Major Tick and Mite Vectors of Human Pathogens. NIH-NIAID-NHGRI Pathogens and Vectors Group. 1-17.
- Hoffmann G.** 1984. Milbenbefall bei Menschen und Haustieren (II). Pharm. Rundschau. 9(84): 48–53.
- Houck MA, Qin H, Roberts HR.** 2001. Hantavirus transmission: potential role of ectoparasites. Vector Borne Zoonotic Dis. 1(1): 75-79.
- Imaz A, Galicia D, Moraza ML, Stekolnikov AA.** 2006. Contribution to the knowledge of chigger mites (Acari: Trombiculidae) parasitizing *Apodemus sylvaticus* (L.) (Rodentia, Muridae) on the Iberian Peninsula. Acarología. 46: 53-64.
- Izzard L, Fuller A, Blacksell SD, Paris DH, Richards AL, Aukkanit N, Nguyen C, Jiang J, Fenwick S, Day NPJ.** 2010. Isolation of a novel *Orientia* species (*O. chuto* sp. nov.) from a patient infected in Dubai. J Clin Microbiol. 48: 4404-4409.
- Jensen W, Fall MZ, Rooney J, Kordick DL, Breitschwerdt EB.** 2000. Rapid Identification and Differentiation of *Bartonella* Species Using a Single-Step PCR Assay. J Clin Microbiol. 38(5): 1717-1722.
- Jensenius M, Fournier PE, Raoult D.** 2004. Rickettsioses and the international traveler. Clin Inf Dis. 39: 1493-1499.
- Jeong YJ, Kim S, Wook YD, Lee JW, Kim KII, Lee SH.** 2007. Scrub typhus: clinical, pathologic, and imaging findings. Radiographics. 27: 161-72.
- Jiménez S, Gastón I, Pérez A, Oteo JA.** 2001. A seasonal outbreak of human parasitization by chiggers in La Rioja (Northern Spain). Clin Microbiol Infect. Abstract. p16051.
- Jones JG.** 1987. Chiggers. Am Fam Physician. 36(2): 149-55.

Kabeya H, Colborn JM, Bai Y, Lerdtthusnee K, Richardson JH, Maruyama S, Kosoy MY. 2010. Detection of *Bartonella tamiae* DNA in ectoparasites from rodents in Thailand and their sequence similarity with bacterial cultures from Thai patients. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 10(5): 429-34.

Kampen H. 2000. Trombiculiden und Trombidiose. *Z. Allg. Med.* 76: 392-96.

Kampen H. 2002. Die Herbstmilbe *Neotrombicula autumnalis* und andere parasitische Laufmilben (Acari: Trombiculidae) als Verursacher von Hauterkrankungen in Mitteleuropa. *Biologiezentrum Linz/Austria.* 184: 461-76.

Kampen H, Schöler A, Metzen M, Oehme R, Hartelt K, Kimmig P, Maier WA. 2004. *Neotrombicula autumnalis* (Acari, Trombiculidae) as a vector for *Borrelia burgdorferi* s.l. *Exp Appl Acarol.* 33: 93-102.

Kavitha S, Nagarajan B, Enbavelan PA, Nambi AP. 2011. A rare case of *Neotrombicula autumnalis* dermatitis in a German shepherd puppy. *TNJVAS.* 7(5): 250-51.

Kelly DJ, Fuerst P, Ching WM, Richards AL. 2009. Scrub typhus: the geographic distribution of phenotypic and genotypic variants of *Orientia tsutsugamushi*. *Clin Infect Dis.* 48(3): 203-30.

Ken KM, Shockman SC, Sirichotiratana M, Lent MP, Wilson ML. 2014. Dermatoses associated with mites other than Sarcoptes. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery.* 33: 110-15.

Kepka O. 1960. Die Trombiculidae (Acari) der Iberischen Halbinsel. II. Mitteilung. *Zeitschr Parasitenk.* 20:191–206.

Kepka O. 1965. Die Herbstmilbe (*Neotrombicula autumnalis*). *Parasitenkunde.* 6: 12-13.

Kim DM, Won KJ, Park CY, Yu KD, Kim HS, Yang TY, Lee JH, Kim HK, Song HJ, Lee SH, Shin H. 2007. Distribution of eschars on the body of scrub typhus patients: A prospective study. *Am J Trop Med Hyg.* 76(5): 806-809.

Kim IS, Walker DH. 2011. Scrub Typhus. En: Guerrant RL, Walker DH, Weller PF, eds. *Tropical infectious diseases. Principles, Pathogens and Practice.* 3^a ed. Saunders Elsevier. 334-338.

- Kim JH, Roh JY, Kwon DH, Kim YH, Yoon KA, Yoo S, Noh SJ, Park J, Shin EH, Park MY, Lee SH.** 2014. Estimation of the genome sizes of the chigger mites *Leptotrombidium pallidum* and *Leptotrombidium scutellare* based on quantitative PCR and k-mer analysis. *Parasit Vectors.* 7(1): 279.
- Koh GCKW, Maude RJ, Paris DH, Newton PN, Blacksell SD.** 2010. Diagnosis of scrub typhus. *Am J Trop Med Hyg.* 82(3): 368-70.
- Kosoy M, Morway C, Sheff KW, Bai Y, Colborn J, Chalcraft L, Dowell SF, Peruski LF, Maloney SA, Baggett H, Sutthirattana S, Sidhirat A, Maruyama S, Kabeya H, Chomel BB, Kasten R, Popov V, Robinson J, Kruglov A, Petersen LR.** 2008. *Bartonella tamiae* sp. nov., a newly recognized pathogen isolated from three human patients from Thailand. *J Clin Microbiol.* 46(2): 772-75.
- Kudryashova NI.** 1998. Chigger mites (Acariformes, Trombiculidae) of East Palaearctics. Moscow KMK Sci Press.
- Kuyvenhoven JV, Duijm F.** 1990. Trombiculiasis, and epidemic of prurigo caused by mites. *Ned Tijdschr Geneesk.* 134(48): 2351-2353.
- Labruna MB, Whitworth T, Horta MC, Bouyer DH, McBride JW, Pinter A, Popov V, Gennari SM, Walker DH.** 2004. Rickettsia Species Infecting *Amblyomma cooperi* Ticks from an Area in the State of São Paulo, Brazil, Where Brazilian Spotted Fever Is Endemic. *J Clin Microbiol.* 42(1): 90-98.
- Lee HI, Shim SK, Song BG, Choi EN, Hwang KJ, Park MY, Park C, Shin EH.** 2011. Detection of *Orientia tsutsugamushi*, the causative agent of scrub typhus, in a novel mite species, *Eushoengastia koreaensis*, in Korea. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11(3): 209-214.
- Lei W, Wang X, Wang C, He H.** 2010. A survey of ectoparasites from wild rodents and *Anourosorex squamipes* in Sichuan Province, South-west China. *J. Ecol. Nat. Environ.* 2: 160-166.
- Leone F, Di Bella A, Vercelli A, Corneigliani L.** 2013. Feline trombiculosis: A retrospective study in 72 cats. *Vet Dermatol.* 24: 535-538.

Li T, Yang Z, Dong Z, Wang M. 2014. Meteorological factors and risk of scrub typhus in Guangzhou, Southern China, 2006-2012. *BMC Infect Dis.* 14(1): 139.

Lin PR, Tsai HP, Tsui PY, Weng MH, Kuo MD, Lin HC, Chen KC, Ji DD, Chu DM, Liu WT. 2011. Genetic typing, based on the 56-kilodalton type-specific antigen gene, of *Orientia tsutsugamushi* strains isolated from chiggers collected from wild-caught rodents in Taiwan. *Appl Environ Microbiol.* 77(10): 3398-3405.

Literák I, Honza M, Pinowska B, Haman A. 2001. Larvae of trombiculid mites (Acarina: trombiculidae) in wild birds in slovak and polish carpathians. *Acta Veterinaria Brno.* 70: 479-483.

Literak I, Kocianova E, Dusbabek F, Martinu J, Podzemny P, Sychra O. 2007. Winter infestation of wild birds by ticks and chiggers (Acari: Ixodidae, Trombiculidae) in the Czech Republic. *Parasitol Res.* 101: 1709-1711.

Literak I, Stekolnikov A, Sychra O, Dubska L, Taragelova V. 2008. Larvae of chigger mites *Neotrombicula* spp. (Acari: Trombiculidae) exhibited *Borrelia* but no *Anaplasma* infections: A field study including birds from the Czech Carpathians as hosts of chiggers. *Exp Appl Acarol.* 44: 307-314.

Little SE, Carmichael KP, Rakich PM. 1997. Trombidiosis-induced Dermatitis in White-tailed Deer (*Odocoileus virginianus*). *Vet Pathol* 34: 350-352.

Małol J, Cichoński J, Felska M, Kłosińska A, Łaydanowicz J, Łupicki D, Gabryś G. 2010. A new data on biology and taxonomy of *Neotrombicula inopinata* (Oudemans, 1909) and *Leptotrombidium rassicum* (Oudemans, 1902) (Acari: Actinotrichida: Trombiculidae). *Annales Zoologici.* 60: 419-27.

Martens H, De Mendonça MM, Den Bosch WV, van Genderen PJJ. 2012. A 'chigsaw' puzzle after a vacation in Brazil. *Neth J Med.* 70(7): 321-325.

Massung RF, Slater K, Owens JH, Nicholson WL, Mather TN, Solberg VB, Olson JG. 1998. Nested PCR assay for detection of granulocytic ehrlichiae. *J Clin Microbiol.* 36(4): 1090-1095.

McClain D, Dana AN, Goldenberg G. 2009. Mite infestations. *Dermatologic Therapy.* 22: 327-346.

- Méndez D, Freeman B, Spratt DM, Speare R.** 2010. Pathology of cutaneous trombidiosis caused by larval trombiculid mites in a wild Lesueur's tree frog (*Litoria wilcoxii*). *Aust Vet J.* 88(8): 328-330.
- Mit'ková K, Berthová L, Kalúz S, Kazimírová M, Burdová L, Kocianová E.** 2015. First detections of *Rickettsia helvetica* and *R. monacensis* in ectoparasitic mites (Laelapidae and Trombiculidae) infesting rodents in south-western Slovakia. *Parasitol Res.*
- Moniuszko H, Małkol J.** 2014. Chigger mites (Actinotrichida: Parasitengona, Trombiculidae) of Poland . An updated distribution and hosts. *Ann Parasitol.* 60 (2): 103-17.
- Moss P, Beeching NJ.** 2003. Arthropods and ectoparasites. En: Cohen J, Powderly WG, eds. *Infectious Diseases.* 2ª ed. Mosby-Elsevier. 128-39.
- Mullen GR, O'Connor BM.** 2002. Mites (Acari). En: Durden L, Mullen G, Medical, eds. *Veterinary Entomology.* Academic Press/Elsevier. Amsterdam. 449-516.
- Navajas M, Cotton D, Kreiter S, Gutierrez J.** 1992. Molecular approach in spider mites (Acari: Tetranychidae): preliminary data on ribosomal DNA sequences. *Exp Appl Acarol.* 15: 211-218.
- Navajas M, Fenton B.** 2000. The application of molecular markers in the study of diversity in acarology: A review. *Exp Appl Acarol.* 24: 751-774.
- Nutall T.** 2009. Pruritic dermatoses. En: Nutall T, Harvey RG, McKeever PJ, eds. *A colour handbook of skin diseases of the dog and cat.* Manson Publishing Ltd. United kingdom. 50-51.
- O'Callaghan MG, Carmichael IH, Finnie JW, Conaghty S.** 1994. Lesions associated with infestation of a yellow-footed rock wallaby (*Petrogale xanthopus xanthopus*) with larvae of *Odontacarus* (Leogonius) *adelaideae* (Womersley) (Acarina: Trombiculidae) in South Australia *J Wildl Dis.* 30(2): 257-259.
- Oliveira RP, Galvão MM, Mafra CL, Chamone CB, Calic SB, Silva SU, Walker DH.** 2002. *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides* spp. fleas, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 8(3): 317-319.

Osuga K, Kimura M, Goto H, Shimada K, Suto T. 1991. A case of Tsutsugamushi disease probably contracted in Africa. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 10: 95-96.

Oteo Revuelta JA, Blanco Ramos JR, Martínez de Artola V, Grandival García R, Ibarra Cucalón V, Dopereiro Gómez R. 2000. Migratory erythema (Lyme borreliosis). Clinicoepidemiologic features of 50 patients. *Rev Clin Esp.* 2:60-63.

Oteo JA, Portillo A, Santibáñez S, Blanco JR, Pérez-Martínez L, Ibarra V. 2006. Cluster of cases of human *Rickettsia felis* infection from Southern Europe (Spain) diagnosed by PCR. *J Clin Microbiol.* 44(7): 2669-2671.

Palomar AM, Santibáñez P, Mazuelas D, Roncero L, Santibáñez S, Portillo A, Oteo JA. 2012. Role of birds in dispersal of etiologic agents of tick-borne zoonoses, Spain, 2009. *Emerg Infect Dis.* 18(7):1188-1191.

Palomar AM, García-Álvarez L, Santibáñez S, Portillo A, Oteo JA. 2014. Detection of tick-borne '*Candidatus* Neohrlichia mikurensis' and *Anaplasma phagocytophilum* in Spain in 2013. *Parasit Vectors.* 31:7-57.

Parcell BJ, Sharpe G, Jones B, Alexander CL. 2013. Conjunctivitis induced by a red bodied mite, *Neotrombicula autumnalis*. *Parasite.* 20(25): 1-3.

Paris DH, Blacksell SD, Nawtaisong P, Jenjaroen K, Teeraratkul A, Chierakul W, Wuthiekanun V, Kantipong P, Day NP. 2011. Diagnostic accuracy of a loop-mediated isothermal PCR assay for detection of *Orientia tsutsugamushi* during acute scrub typhus infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 5(9): 1-7.

Paris DH, Shelite TR, Day NP, Walker DH. 2013. Unresolved problems related to scrub typhus: A seriously neglected life-threatening disease. *Am J Trop Med Hyg.* 89(2): 301-307.

Paris DH, Phetsouvanh R, Tanganuchitcharnchai A, Jones M, Jenjaroen K, Vongsouvath M, Ferguson DP, Blacksell SD, Newton PN, Day NP, Turner GD. 2012. *Orientia tsutsugamushi* in human scrub typhus eschars shows tropism

for dendritic cells and monocytes rather than endothelium. PLoS Negl Trop Dis. 6(1): 1466

Pereira-Lorenzo A. 1993. Chiggers (Acarina: Trombiculidae) parasitizing small mammals in Galicia (NW Spain). *Acarologia* 34: 323-329.

Perlman SJ, Hunter S, Zchori-Fein E. 2006. The emerging diversity of *Rickettsia*. *Proc Biol Sci.* 273(1598):2097-2106.

Pham XD, Otsuka Y, Suzuki H, Takaoka H. 2001. Detection of *Orientia tsutsugamushi* (Rickettsiales: rickettsiaceae) in unengorged chiggers (Acari: Trombiculidae) from Oita Prefecture, Japan, by nested polymerase chain reaction. *J Med Entomol.* 38(2):308-311.

Pogacnik M, Kansky A. 1998. Trombidiosis. *Acta dermatovenerológica.* 7 (3-4): 173-177.

Portillo A, Pérez-Martínez L, Santibáñez S, Santibáñez P, Palomar AM, Oteo JA. 2011. *Anaplasma* spp. in wild mammals and *Ixodes ricinus* from the north of Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11(1):3-8.

Portillo A, Santibáñez S, Oteo JA. 2014. Lyme Disease. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 32 (1): 37-42.

Potenza L, Cafiero MA, Camarda A, Salandra G, Cucchiari L, Dachà M. 2009. Characterization of *Dermanyssus gallinae* (Acarina: Dermanyssidae) by sequence analysis of the ribosomal internal transcribed spacer regions. *Vet Res.* 33: 611-18.

Proctor H, Owens I. 2000. Mites and birds: Diversity, parasitism and coevolution. *Trends Ecol Evol.* 15(9): 358-64.

Prosl H, Rabitsch A, Brabenetz. J. 1985. Trombiculid mite–*Neotrombicula autumnalis* (Shaw 1790)–in veterinary medicine. Nervous systems in dogs following massive infestation. *Tierarztl Prax.* 13: 57-64.

Raj SS, Krishnamoorthy A, Jagannati M, Abhilash KPP. 2014. Splenic Infarct Due to Scrub Typhus. *JGlob Infect Dis.* 6(2): 86-88.

Rajapakse, S, Rodrigo C, Fernando D. 2011. Scrub typhus: Pathophysiology, clinical manifestations and prognosis. *Asian Pac J Trop Med.* 5(4): 261-264.

Raoult D. 2010. *Orientia tsutsugamushi* (Scrub Typhus). En: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. Principles and Practice of Infectious Diseases. 7^a ed. Elsevier. 2529-2530.

Raoult D, Fournier PE, Ereemeeva M, Graves S, Kelly PJ, Oteo JA, Sekeyova Z, Tamura A, Tarasevich I, Zhang L. 2005. Naming of Rickettsiae and rickettsial diseases. Ann N Y Acad Sci. 1063: 1-12.

Reeves WK, Durden LA, Iwakami M, Vince KJ, Paul RR. 2015. Rickettsial Diseases and Ectoparasites from Military Bases in Japan. J Parasitol 101(2):150-155.

Regnery RL, Spruill CL, Plikaytis BD. 1991. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. J Bacteriol. 173(5): 1576-1589.

Renesto P, Gouvernet J, Drancourt M, Roux V, Raoult D. 2001. Use of *rpoB* Gene Analysis for Detection and Identification of *Bartonella* Species. J Clin Microbiol. 39(2): 430-437.

Rijpkema SG, Molkenboer MJ, Schouls LM, Jongejan F, Schellekens JF. 1995. Simultaneous detection and genotyping of three genomic groups of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Dutch *Ixodes ricinus* ticks by characterization of the amplified intergenic spacer region between 5S and 23S rRNA genes. J Clin Microbiol. 33(12): 3091-3095.

Ripka G, Stekolnikov A. 2006. First finding of the chigger *Blancaartia acuscutellaris* on a human host in Europe. Belgian J Entomol. 8: 147-151.

Rodkvamtook W, Gaywee J, Kanjanavanit S, Ruangareerate T, Richards AL, Sangjun N, Jeamwattanalert P, Sirisopana N. 2013. Scrub typhus outbreak, Northern Thailand, 2006-2007. Emerg Infect Dis. 19(5):774-777

Roux V, Fournier PE, Raoult D. 1996. Differentiation of spotted fever group rickettsiae by sequencing and analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA of the gene encoding the protein rOmpA. J Clin Microbiol. 34(9): 2058-2065.

- Rozendaal, JA.** 1997. Bedbugs, fleas, lice, ticks and mites. En: World Health Organization .Vector control: methods for use by individuals and communities. 236-283.
- Rungta N.** 2014. Scrub Typhus: Emerging cause of multiorgan dysfunction. *Indian J Crit Care Med.* 18(8): 489-491.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press. 2^a ed. New York.
- Santibáñez P, Palomar AM, Santibáñez S, Portillo A, Oteo JA.** 2011a. *Neotrombicula inopinata*: Agente causal de dermatitis estacional (trombiculidiasis) en España. XV Congreso de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Málaga, España.
- Santibáñez P, Palomar A, Santibáñez S, Portillo A and Oteo JA.** 2011b. Chiggers (Acari: Trombiculidae) infected with rickettsiae in Spain: Preliminary data. 6th International Meeting on Rickettsiae and Rickettsial diseases. Heraclión, Creta.
- Santibáñez S, Portillo A, Santibáñez P, Palomar AM, Oteo JA.** 2013. Usefulness of rickettsial PCR assays for the molecular diagnosis of human rickettsioses. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 31(5): 283-288.
- Santibáñez-Sáenz, P, Palomar-Urbina AM, Imaña-Rodríguez E, Oteo-Revuelta JA.** 2014. Pruritic dermatitis after hiking in the mountains. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 32(9):610-611.
- Schöler A, Maier WA, Kampen H.** 2006. Multiple environmental factor analysis in habitats of the harvest mite *Neotrombicula autumnalis* (Acari: Trombiculidae) suggests extraordinarily high euryoecious biology. *Exp Appl Acarol.* 39: 41-62.
- vd Schulenburg JH, Habig M, Sloggett JJ, Webberley KM, Bertrand D, Hurst GD, Majerus ME.** 2001. Incidence of male killing Rickettsia spp. (alpha proteobacteria) in the ten spot ladybird beetle *Adalia decempunctata* L. (Coleoptera: Coccinellidae). *Appl Environ Microbiol.* 67(1): 270-277.
- Schulert GS, Gigante J.** 2014. Summer penile syndrome: an acute hypersensitivity reaction. *J Emer Med.* 46 (1).

Seixas F, Travassos PJ, Pinto ML, Correia J, Pires MA. 2006. Dermatitis in a dog induced by *Straelensia cynotis*: A case report and review of the literature. *Vet Dermatol.* 17: 81-84.

Seong SY, Choi MS, Kim IS. 2001. *Orientia tsutsugamushi* infection: Overview and immune responses. *Microbes Infect.* 3: 11-21.

Shao R, Mitani H, Barker SC, Takahashi M, y Fukunaga M. 2005. Novel mitochondrial gene content and gene arrangement indicate illegitimate inter-mtDNA recombination in the Chigger mite, *Leptotrombidium pallidum*. *J Mol Evol.* 60: 764-773.

Shatrov AB. 1996. Some peculiarities of the life cycle and biology of chiggers in laboratory. *Entomol Rev.* 76: 1197-1208.

Shatrov AB. 2000. Trombiculid mites and their parasitism on vertebrate hosts. St. Petersburg University Publishers. St. Petersburg.

Shatrov AB, Kudryashova NI. 2006. Taxonomy, life cycles and the origin of parasitism in trombiculid mites. En: Morand S, Krasnov BR, Poulin R, eds. *Micromammals and Macroparasites Part II.* Springer. 119. 40-45.

Shatrov AB. 2009. Stylostome formation in trombiculid mites (Acariformes: Trombiculidae). *Exp Appl Acarol.* 49: 261-280.

Shatrov AB. 2011. Comparative and functional morphology of the mouthparts in larvae of *Parasitengona* (Acariformes). En: Moraes GJ, Proctor H, eds. *Acarology XIII: Proceedings of the International Congress.* Zoosymposia. 6: 1–304.

Shatrov AB, Stekolnikov AA. 2011. Redescription of a human-infesting European trombiculid mite *Kepkatrombicula desaleri* (Acari: Trombiculidae) with data on its mouthparts and stylostome. *Int J Acarol.* 37: 176-193.

Shatrov AB, Takahashi M, Noda S, y Misumi H. 2014. Stylostome organization in feeding *Leptotrombidium* larvae (Acariformes: Trombiculidae). *Exp Appl Acarol.* 64: 33-47.

Skerratt L, Campbell N, Murrell A, Walton S, Kemp D, Barker S. 2002. The mitochondrial 12S gene is a suitable marker of populations of *Sarcoptes scabiei* from wombats, dogs and humans in Australia. *Parasitol Res.* 88: 376-379.

Smal D, Jasmin P, Mercier P. 2004. Treatment of *Neotrombicula autumnalis* dermatitis in dogs using two topical permethrin-pyriproxyfen combinations. *J Small Anim Pract.* 45(2): 98-103.

Smith GA, Sharma V, Knapp JF, Shields BJ. 1998. The summer penile syndrome: seasonal acute hypersensitivity reaction caused by chigger bites on the penis. *Pediatr Emerg Care.* 14(2): 116-118.

Söller R, Wohltmann A, Witte H, Blohm D. 2001. Phylogenetic relationships within terrestrial mites (Acari: Prostigmata, Parasitengona) inferred from comparative DNA sequence analysis of the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene. *Mol Phylogenet Evol.* 18(1): 47-53.

Song G. 1999. Epidemiological progresses of hemorrhagic fever with renal syndrome in China. *Chin Med J (Engl).* 112(5): 472-477.

Steen CJ, Carbonaro PA, Schwartz RA. 2004. Arthropods in dermatology. *J Am Acad Dermatol.* 50: 819-44.

Stein A, Raoult D. 1992. Detection of *Coxiella burnetti* by DNA amplification using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 30(9): 2462-2466.

Stekolnikov AA, Santibáñez P, Palomar AM, Oteo JA. 2014. *Neotrombicula inopinata* (Acari: Trombiculidae) - a possible causative agent of trombiculiasis in Europe. *Parasit Vectors.* 7: 90.

Stekolnikov A, Daniel M. 2012. Chigger mites (Acari: Trombiculidae) of Turkey. *Zootaxa.* 3216: 1-104.

Strle F, Nelson JA, Ruzic-Sabljić E, Cimperman J, Maraspin V, Lotric-Furlan S, Cheng Y, Picken MM, Trenholme GM, Picken RN. 1996. European Lyme borreliosis: 231 culture-confirmed cases involving patients with erythema migrans. *Clin. Infect. Dis.* 23: 61-65.

Takahashi M, Misumi H, Urakami H. 2003. Life cycle of *Leptotrombidium pallidum* (Acari:Trombiculidae), one of the vector mites of scrub typhus in Japan. *Annu.Rep.Ohara Hosp.* 45: 19-30.

Takahashi M, Misumi H, Urakami H, Saito T, Misumi M, Matsumoto I, y Suzuki H. 2004. A new member of the trombiculid mite family *Neotrombicula*

nagayoi (Acari: Trombiculidae) induces human dermatitis. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 35: 113-118.

Tamura A, Ohashi N, Urakami H, Miyamura S. 1995. Classification of *Rickettsia tsutsugamushi* in a new genus, *Orientia* gen. nov., as *Orientia tsutsugamushi* comb. nov. Int J Syst Bacteriol. 45(3): 589-5891.

Traub R, Wisseman CL, Jones MR, O’Keefe JJ. 1975. The acquisition of *Rickettsia tsutsugamushi* by chiggers (trombiculid mites) during the feeding process. Ann N Y Acad Sci. 266: 91-114.

Tsai PJ, Yeh HC. 2013. Scrub typhus islands in the Taiwan area and the association between scrub typhus disease and forest land use and farmer population density: geographically weighted regression. BMC Infect Dis. 13: 191.

Tsui PY, Tsai KH, Weng MH, Hung YW, Liu YT, Hu KY, Lien JC, Lin PR, Shaio MF, Wang HC, Ji DD. 2007. Molecular detection and characterization of spotted fever group rickettsiae in Taiwan. Am J Trop Med Hyg. 77 (161): 883-890. Erratum in: Am J Trop Med Hyg. 2008. 79(1):140.

Tudor P. 2012. Trombiculidae harvest mites (*Neotrombicula autumnalis*) infestation in dog in winter season – a case report. Vet Med. 58 (4): 306-311.

Tullgren, A. 1918: Ein sehr einfacher Ausleseapparat für terricole Tierfaunen. Z Angew. Entomol 4: 149–150.

Tweeten KA, Muñoz-Bravo J. 2008. Qhapa, a pest causing skin irritations in Nor Yungas region of Bolivia, identified as a chigger mite, *Eutrombicula batatas*. Tropical Doctor 38(1): 63-64.

Valbuena G, Walker DH. 2012. Approaches to vaccines against *Orientia tsutsugamushi*. Front Cell Infect Microbiol. 2: 170.

Varma MG. 1964. Mites (Family Trombiculidae) Parasitizing Birds Migrating From Africa to Europe. Bull World Health Org. 31:411–416.

Vysotskaya SO, Sluger EG. 1953. Licinki krasnotelok-parazity gryzunov Leningradskoj oblasti. Parazitol sbornik 15: 345–352.

Watt G, Parola P. 2003. Scrub typhus and tropical rickettsioses. Curr Opin Infect Dis. 16(5): 429-436.

Webb L, Carl M, Malloy DC, Dasch G.A, Azad AF. 1990. Detection of murine typhus infection in fleas by using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol.* 28(3): 530-534.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol.* 173(2): 697-703.

White GB. 2003. Medical acarology and entomology. En: Gordon CC, Zumla AI, eds. *Manson's Tropical Diseases.* 22^a ed. Saunders-Elsevier. 1717-20.

Willems H, Thiele D, Frölich-Ritter R, Krauss H. 1994. Detection of *Coxiella burnetii* in cow's milk using the polymerase chain reaction (PCR). *J Vet Med.* 41: 580-587.

Witt LH, Linardi PM, Meckes O, Schwalfenberg S, Ribeiro RA, Feldmeier H, Heukelbach J. 2004. Blood-feeding of *Tunga penetrans* males. *Med Vet Entomol.* 18: 439-441.

Wohltmann A, Gabryś G, Małkol J. 2007. Acari: Terrestrial Parasitengona inhabiting transient biotopes. En: Gerecke R, ed. *Chelicerata: Araneae, Acari I.* Elsevier. Múnich. 158-240.

Womersley H. 1952. The scrub-typhus and scrub-itch mites (Trombiculidae, Acarina) of the Asiatic-Pacific region. *Records of the South Australian Museum.* 10: 1-673.

Wu G, Zhang Y, Guo H, Jiang K, Zhang J, Gan Y. 1996. The role of *Leptotrombidium scutellare* in the transmission of human diseases. *Chin Med J (Engl).* 109 (9): 670-673.

Young MR, Behan-Pelletier VM, Hebert PDN. 2012. Revealing the Hyperdiverse Mite Fauna of Subarctic Canada through DNA Barcoding. *PLoS ONE.* 7(11): 1-11.

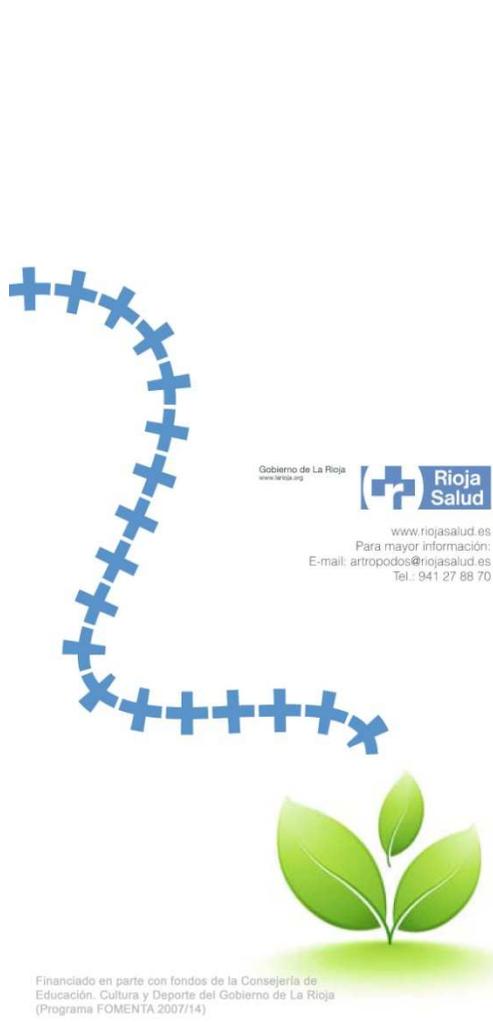
Yu Xue-jie, Tesh RB. 2014. The role of mites in the transmission and maintenance of hantaan virus (Hantavirus: Bunyaviridae). *J Inf Dis.* 210: 1-22.

Zahler M. Gothe R, Rinder H. 1995. Genetic evidence against a morphologically suggestive conspecificity of *Dermacentor reticulatus* and *D. marginatus* (Acari: Ixodidae). *Int J Parasitol.* 25 (12): 1413-1419.

Zeidner NS, Burkot RT, Massung R, Nicholson WL, Dolan MC, Rutherford JS, Biggerstaff BJ, Maupin GO. 2000. Transmission of the Agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis by *Ixodes spinipalpis* Ticks: Evidence of an Enzootic Cycle of Dual Infection with *Borrelia burgdorferi* in Northern Colorado. J Inf Dis. 80522: 616-619.

Zhang ZQ. 1998. Biology and ecology of Trombidiid mites (Acari: Trombidioidea). Exp Appl Acarol. 22: 139-55.

ANEXO I



Gobierno de La Rioja
www.larioja.org



www.riojasalud.es
Para mayor información:
E-mail: artropodos@riojasalud.es
Tel.: 941 27 88 70

Financiado en parte con fondos de la Consejería de Educación, Cultura y Deporte del Gobierno de La Rioja (Programa FOMENTA 2007/14)



Llegan los trombicúlidos

Descubre qué son, cómo prevenirlos y cómo actuar en caso de picadura

Gobierno de La Rioja
www.larioja.org





La Consejería de Salud del Gobierno de La Rioja, a través del Área de Enfermedades Infecciosas del Hospital San Pedro, ha lanzado esta campaña informativa y preventiva sobre las picaduras de los trombicúlidos. Estos ácaros, presentes principalmente en el Parque Natural de Sierra Cebollera y otras áreas montañosas del Camero Viejo, si bien no generan afecciones graves, pueden ocasionar molestias importantes. Por ello, este documento recoge los lugares y fechas en los que la existencia de estos ácaros es más frecuente, las características de su picadura, cómo prevenirla y su tratamiento en el caso de padecerla.

¿QUE SON LOS TROMBICÚLIDOS?

Son ácaros, de la familia de las arañas, que se caracterizan por su color rojo y por su pequeño tamaño, inferior a 1 milímetro. Habitan entre la vegetación de las zonas altas de montaña.

¿A QUIÉNES PUEDEN AFECTAR?

A las personas que realizan actividades al aire libre como caza, paseo, trabajo forestal, recogida de setas, etc. y a los animales que les acompañan.



¿DÓNDE SE ESCONDEN?

Se han detectado en la vegetación baja de algunas zonas boscosas del Parque Natural Sierra de Cebollera y en otras zonas montañosas de la comarca del Camero Viejo.



¿EN QUÉ FECHAS APARECEN?

Están presentes desde finales de agosto hasta mediados de noviembre.

¿CÓMO PODEMOS PREVENIR SU PICADURA?

- Evitando adentrarse en la vegetación fuera de los linderos de los caminos en las zonas de riesgo.
- Llevando una ropa adecuada: pantalón largo metido por dentro de los calcetines, manga larga...
- Usando repelentes de insectos sobre la ropa.

¿QUE PUEDEN CAUSARNOS?

En el hombre, las picaduras provocan cuadros de irritación con lesiones eritematosas (dermatitis) que generan mucho picor y



malestar general. En animales de compañía, como los perros, producen parasitaciones masivas con afectación del aparato digestivo y del sistema nervioso, que pueden llegar a causar la muerte.

Y SI NOS PICAN...

No se trata de una afección grave, pero resulta muy molesta. Las picaduras causan un intenso prurito (picor) y gran malestar general. Como recomendación general, se debe evitar el rascado excesivo de las lesiones con el fin de evitar infecciones secundarias. Respecto al tratamiento, aunque no se puede hablar de un procedimiento generalizado, lo indicado es el uso de antihistamínicos y/o corticoides, bajo prescripción médica. Por ello, los afectados deben ponerse en contacto con el Área de Enfermedades Infecciosas del Hospital San Pedro -Centro de Rickettsiosis y Enfermedades Transmitidas por Artrópodos Vectores del CIBIR- a través de su médico de Atención Primaria.



ANEXO II



Llegan los trombicúlidos

Descubre qué son, cómo prevenirlos y cómo actuar en caso de picadura

¿QUÉ SON?

Son ácaros, de la familia de las arañas, que se caracterizan por su color rojo y su pequeño tamaño, inferior a 1 milímetro.

¿A QUIÉNES PUEDEN AFECTAR?

A personas que realizan actividades al aire libre (caza, paseo, trabajo forestal, recogida de setas...) y a los animales que les acompañan, habitualmente perros.

¿DÓNDE SE ESCONDEN?

En la vegetación baja de zonas boscosas, principalmente del Parque Natural Sierra de Cebollera y otras zonas del Camero Viejo.

¿CUÁNDO?

Están presentes entre los meses de agosto y noviembre.

¿CÓMO PODEMOS PREVENIR SU PICADURA?

- Evitando adentrarse en la vegetación
- Llevando una ropa adecuada: pantalón largo, manga larga...
- Usando repelentes de insectos

¿QUÉ PUEDEN CAUSARNOS?

En el hombre, las picaduras provocan cuadros de irritación con lesiones eritematosas (dermatitis) que generan mucho picor y malestar general.

Y SI NOS PICAN...

No se trata de una afección grave, pero resulta muy molesta.

En caso de estar afectado, debe ponerse en contacto con el Área de Enfermedades Infecciosas del Hospital San Pedro
Tel.: 941 27 88 70
E-mail: artropodos@riojasalud.es

Gobierno de La Rioja
www.larioja.org



Financiado en parte con fondos de la Consejería de Educación, Cultura y Deporte del Gobierno de La Rioja (Programa FOMENTA 2007/14)

ANEXO III



Departamento de
Enfermedades Infecciosas

RECOGIDA DE CASOS HUMANOS



Nombre del paciente:

Fiebre/febrícula:

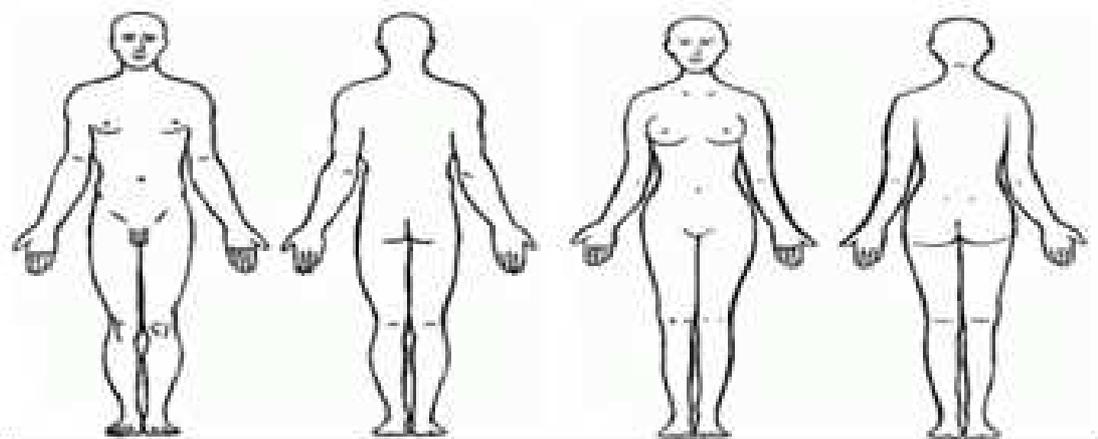
Exantema:

Malestar general:

Picor:

Picaduras de trombicúlidos: Sí / No

Localización de las picaduras:



Picaduras de otros artrópodos (garrapatas, pulgas,...):

Otros síntomas:

Lugar donde se mantuvo contacto con la vegetación:

Fecha y hora de contacto con la vegetación:

Inicio y duración de los síntomas:

Ropa adecuada para evitar picaduras: Sí / No

[Manga larga, pantalón largo, pernera dentro de calcetines, cabeza cubierta (García-Álvarez *et al.*, 2014)]

Usaba repelente: Sí / No

Cuál:

Picaduras en acompañantes: Sí / No

Cuántos:

Acompañado de perro: Sí / No

Resultó enfermo: Sí / No

ANEXO IV



RECOGIDA DE CASOS CANINOS



Clínica veterinaria:

Dueño:

A) Datos del perro:

Nombre:

Raza y sexo:

Edad:

B) Origen de la parasitación:

Fecha y hora:

Lugar:

C) Datos clínicos:

¿Sigue parasitado?: Sí / No

Zonas de parasitación:

Vómitos: Sí / No

Aletargamiento: Sí / No

Eritema: Sí / No

Ataxia: Sí / No

Otros síntomas:

Inicio y duración de los síntomas:

Tratamiento: Sí / No

Cuál:

Otras observaciones:

ANEXO V



EL HÁBITAT. Las larvas atacan en los bosques del Puerto de Piqueras. / M.H.



EL MONTE. La larva necesita lugares a más de 1.100 metros. / E.C.

La larva de un ácaro, que vive únicamente durante los meses de otoño, ataca a animales en la zona cercana al Puerto Piqueras

Un parásito en el bosque



Invisibles montañeros

A. GIL/A. SOTO LOGROÑO

Un equipo del Área de Enfermedades Infecciosas del Hospital San Pedro aisló y estudió en el año 2001 los molestos -en el caso de las personas- ácaros que viven en los suelos de zonas montañosas elevadas y poblada vegetación. Son microscópicos trombicúlidos que se adhieren a la piel de animales y personas por el simple tránsito y que fueron conocidos públicamente hace unas semanas tras una denuncia del Partido Riojano, cuando en un sólo fin de semana se atedó a cientos de animales por veterinarios y a varias personas en Urgencia por picaduras.

Se trata de misteriosos e indomables parásitos que pueblan los subsuelos de montes a partir de los 1.200 metros de altitud en matorrales y hierbas altas contra los que no se ha podido actuar, al menos de momento, pero sí estudiar. El jefe de servicio de la Unidad de Enfermedades Infecciosas, José Antonio Oteo, así lo explica: «Estuvimos varios años muy despistados». «Los guardas forestales de la zona de la Pineda, en Cebollera, no querían entrar porque siempre salían con manchas e irritaciones; no conseguíamos encontrar una explicación hasta que hallamos una larva del ácaro adherida a la piel de un paciente».

A partir de ahí fue todo más fácil, aunque tampoco sencillo: «Se trataba de un trombicúlido, pero apenas hay escasas referencias en Alemania, Ucrania y algún país de la antigua Unión Soviética». «De hecho, han sido nuestras investigaciones las que los han dado a conocer en España». «Si han sido descritos -añade Oteo- los deno-

minados tífus de los matorrales del sudeste asiático, que fueron una de las causas por las que EEUU perdió la guerra de Vietnam, pero no había muchas referencias en Europa».

El doctor Oteo cuenta que la investigación se centró en primer lugar en comprobar si estos microorganismos -sus larvas, que son las que parasitan- eran vectores de enfermedades. «Tuvimos un caso de *Rickettsia felis* -enfermedad bacteriana infecciosa causada por pulgas, piojos, garrapatas...-, algo que era muy raro en España y en Europa, pero finalmente comprobamos que se trataba de un paciente expuesto a pulgas, además de a estos ácaros, y que éstas eran la causa de la enfermedad».

Tranquilidad

Lo que el equipo de investigación prácticamente puede asegurar en la actualidad es que los trombicúlidos de la Pineda «no son vectores de enfermedades». «Son menos peligrosos que las garrapatas, si bien es cierto que no podemos evitarlos». Los parásitos aparecen en el otoño, desde octubre hasta los primeros hielos y nieves. «Los primeros fines de semana tras San Mateo se producen muchos casos porque, simplemente con pisar los matorrales, se adhieren a las piernas». El doctor Oteo no es partidario de tomar medidas drásticas ni cerrar los montes: «Son muy molestos, pero no peligrosos, y desde mi punto de vista, es mejor informar a los cazadores, excursionistas o buscadores de setas que dejarles en casa». El médico recomienda en este sentido acudir al monte «con botas altas, con los pan-



Picaduras causadas por el ácaro. / L.R.

JOSÉ A. OTEO
ENFERMEADES INFECCIOSAS



«Es mejor informar a cazadores y buscadores de setas que dejarles en casa»

talones por dentro y calcetines altos, pero no sólo por estos artrópodos, sino también para protegerse de otras picaduras».

En animales

Los ataques de estos trombicúlidos a personas se tratan con corticoides y sin hospitalización, aunque en el caso de los perros las consecuencias pueden ser mucho más graves: «Se han descrito alteraciones neurológicas, e incluso fallecimientos, suponemos que porque van desprotegidos de ropa y a ras de suelo». «Hay casos de animales -añade- con miles de picaduras de estos parásitos y entonces estamos ante otro problema».

Un equipo puntero en la investigación

A.G./A.S. LOGROÑO

El Área de Enfermedades Infecciosas del Hospital San Pedro es una de las que cuenta con más reconocimiento nacional e internacional. «Tratamos de autofinanciarnos en la medida de lo posible», explica el doctor José Antonio Oteo. Así ha ocurrido con varios programas de investigación sobre el sida y así está sucediendo con los trombicúlidos. «Fuimos los primeros en describir un caso de *rickettsia felis* como patógeno humano en toda el área mediterránea europea y hemos dado a conocer la trombiculidiasis en España con el caso de los ácaros de Cebollera».

El equipo de estudio de enfermedades transmitidas por artrópodos vectores ha obtenido una beca del 48.000 euros del Gobierno de La Rioja para conocer el alcance de la trombiculidiasis, mientras que está pendiente de obtener otra de la Universidad Carlos III de Madrid de 115.000 euros para estudiar las rickettsias: «Sería muy importante para nosotros -apunta Oteo- porque nos permitiría consolidar personal para ocuparse de estos temas».

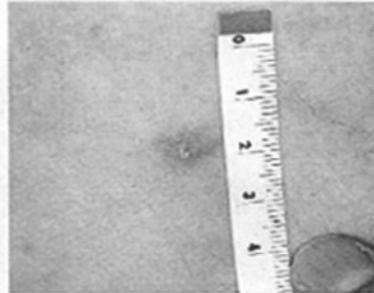
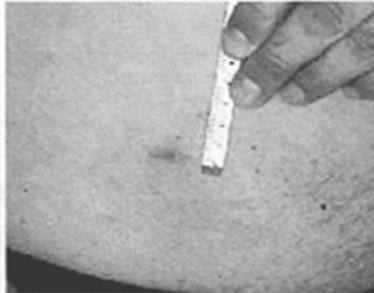
El PR pide el cierre temporal de un monte de Piqueras por una plaga de parásitos

Toledo dice que un veterinario atendió el lunes a 75 perros y Urgencias, a varias personas

A. GIL LOGROÑO

El diputado del Partido Riojano, José Toledo, reclamó ayer el cierre del monte La Pineda, en el puerto de Piqueras, por la proliferación de un ácaro de temporada que, sólo el pasado fin de semana, provocó que más de cien perros y varias personas tuvieran que ser atendidos de picaduras por parte de veterinarios y personal médico.

El ácaro, identificado por un veterinario soriano como *neotrombicula autumnalis*, es un parásito que habita en el suelo y subsuelo en zonas frondosas y a partir de 1.200 metros y se adhiere a la piel de forma masiva como un parásito. El monte de La Pineda, tanto en su vertiente soriana como riojana, reúne todos los requisitos ideales para este microorganismo y su presencia fue advertida ya hace cuatro años por guardas forestales: «Lo pusieron en conocimiento de las autoridades, pero no se ha hecho nada», denunció ayer



Arriba, picaduras recientes en personas y abajo, imágenes en microscopio de las larvas obtenidas por el veterinario soriano José Luis Barrón. /J.L. BARRÓN



Equipos de investigación intentando obtener muestras del ácaro en la zona de la sierra Cebollera. /L.R.

Un equipo del Área de Enfermedades Infecciosas de La Rioja aisló en el 2001 los molestos ácaros de Cebollera que se adhieren a la piel de senderistas y cazadores descartando la transmisión de enfermedades



Estás en: [larioja.com](#) > [Noticias La Rioja](#) > [Noticias Región](#) > [Sanidad detecta un incremento de ácaros y garrapatas, que se ceba con la sierra](#)

REGIÓN

Sanidad detecta un incremento de ácaros y garrapatas, que se ceba con la sierra

El responsable de enfermedades infecciosas del CIBIR achaca el aumento de estos animales al alza de las temperaturas, aunque rechaza que se trate de una plaga

11.11.10 - 00:15 - P. HIDALGO | LOGROÑO.

Comenta esta noticia | Tweet

+1 0

Compartir

Recomendar 4

1 votos

Haberlos, 'haylos' y en abundancia. Trombicúlidos, artrópodos, garrapatas, mosquitos y toda una suerte de bichitos han incrementado su presencia entre nosotros. No sólo en La Rioja, sino en todo el mundo occidental, causando serios problemas en Centroeuropa y en los antiguos países que integraban la Unión Soviética. Los animalitos del momento se llaman trombicúlidos, unos ácaros de la familia de las arañas que habitan entre la vegetación de las zonas altas de montaña entre finales de agosto y hasta que caen las primeras nieves. En nuestro territorio, proliferan en los bosques del Parque Natural de Sierra Cebollera (en los entornos de La Pineda y de la Venta de Piqueras), en las altitudes del Camero Viejo y entre las jaras de la sierra de la Demanda. Sus 'víctimas' habituales son los cazadores y los buscadores de setas, entre los que causan cuadros de irritación en la piel. En los animales de compañía, su picadura desemboca en parasitaciones masivas que pueden derivar en la muerte.

LOS TROMBICÚLIDOS

Qué. Son unos ácaros de la familia de las arañas, de color rojo y pequeño tamaño, que se esconden en la vegetación de las zonas altas de montaña.

Cuándo. Están presentes desde finales de agosto y hasta que caen las primeras nieves.

Efectos. Su picadura provoca cuadros de irritación con dermatitis en las personas y en las mascotas, parasitaciones masivas que pueden acabar en muerte.



El doctor José Antonio Oteo. :: JUSTO RODRÍGUEZ

NOTICIAS RELACIONADAS

► «Las pulgas de las mascotas también transmiten bacterias»

«Cuando comenzamos a investigarlos, hace bastantes años, parecía que su presencia se circunscribía a determinadas áreas del monte, pero están apareciendo nuevas manchas. No sabemos por qué ocurre esto, pero no se trata de un problema exclusivo de La Rioja, sino que sucede lo mismo en España y en otras zonas de Europa», señala el jefe del área de enfermedades infecciosas del CIBIR y del hospital San Pedro, José Antonio Oteo. En este centro de referencia para toda España en enfermedades transmitidas por artrópodos tienen constancia, a su vez, de que han aumentado las poblaciones de todo tipo de artrópodos, garrapatas o mosquitos «y que algunas patologías ligadas a estos últimos se están incrementando». De ahí que recientemente hayan recibido comunicación del primer caso en España de paludismo autóctono (en personas que no han viajado a una zona endémica ni viven cerca de un aeropuerto) detectado en Huesca y de contagios por el virus del Oeste del Nilo, que ataca al sistema nervioso, entre dos ciudadanos de Cádiz. «Hay que considerar que el último caso de paludismo que se diagnosticó en este país data de principios de los sesenta», contextualiza el doctor Oteo.

El experto en enfermedades infecciosas rechaza hablar de plaga, pero reconoce que «predomina de todo». No obstante, matiza que «en La Rioja lo tenemos controlado porque existe una vigilancia continua».

Las causas de esta explosión de bichitos parecen difusas, pero Oteo apunta algunas claves: «Carecemos de evidencias científicas, pero sabemos que a nivel mundial se han elevado un poco las temperaturas, lo que favorece que crezcan los censos de artrópodos en general. En cuanto a los mosquitos, por efecto de las lluvias torrenciales se crean charcas en las que nacen estos insectos. Antiguamente, éstas se desecaban, precisamente para evitar que estos se reprodujeran. También han cambiado otros hábitos como la fumigación, que ahora se realiza menos para contrarrestar sus efectos tóxicos».

El doctor insiste en que «el verdadero problema» radica en que estos animales conviven con nosotros y que «no los hemos erradicado». Si bien, admite que «hoy en día los virus y bacterias viajan en avión». «Los movimientos poblacionales por distintos motivos -viajes por turismo, negocios o la inmigración- podrían justificar algún caso puntual». Y retoma: «el peligro no son estos desplazamientos, sino el animal que habita en nuestros montes, y el monte no se puede quemar».

<http://www.larioja.com/v/20101111/rioja-region/sanidad-detecta-incremento-acaros-20101111.html>

ANEXO VI

RESEARCH

Open Access

Neotrombicula inopinata (Acari: Trombiculidae) – a possible causative agent of trombiculiasis in Europe

Alexandr A Stekolnikov^{1*}, Paula Santibáñez², Ana M Palomar² and José A Oteo²

Abstract

Background: For over a decade, the presence of trombiculid mites in some mountain areas of La Rioja (Northern Spain) and their association with seasonal human dermatitis have been recognized. This work aimed to establish the species identity of the agent causing trombiculiasis in the study area.

Methods: Trombiculid larvae (chigger mites) were collected from vegetation in the Sierra Cebollera Natural Park and in Sierra La Hez during an outbreak of human trombiculiasis in 2010. Three specimens collected from a bird were also examined. Identification was made using morphological and morphometric traits based on the most recent taxonomic sources. A comparison of those mites with specimens of the same species collected throughout Europe was performed by means of cluster analysis with multiscale bootstrap resampling and calculation of approximately unbiased p-values.

Results: All collected mites were identified as *Neotrombicula inopinata* (Oudemans, 1909). Therefore, this species is the most likely causative agent of trombiculiasis in Spain, not *Neotrombicula autumnalis* (Shaw, 1790), as it was generally assumed. No chigger was identified as *N. autumnalis* in the study area. *Neotrombicula inopinata* clearly differs from *N. autumnalis* in the presence of eight or more setae in the 1st and 2nd rows of dorsal idiosomal setae vs. six setae in *N. autumnalis*. Comparison of *N. inopinata* samples from different locations shows significant geographic variability in morphometric traits. Samples from Western and Eastern Europe and the Caucasus formed three separate clusters.

Conclusion: Since the taxonomical basis of many studies concerning *N. autumnalis* as a causative agent of trombiculiasis is insufficient, it is highly possible that *N. inopinata* may be hiding behind the common name of “harvest bug” in Europe, together with *N. autumnalis*.

Keywords: Harvest bug, Trombiculiasis, *Neotrombicula autumnalis*, *Neotrombicula inopinata*, Spain

Background

Nowadays, four chigger mite species are proven to attack humans in Europe causing trombiculiasis – *Neotrombicula autumnalis* (Shaw, 1790), *Kepkatrombicula desaleri* (Methlagl, 1928), *Blankaartia acuscutellaris* (Walch, 1922), and *Trombicula toldti* Winkler, 1953 [1]. The last one is a mite of unclear taxonomic position, which is still known solely from its type locality in Austria [2]. *Blankaartia acuscutellaris* is associated with reedy margins of water

bodies (rivers, lakes, swamps, etc.). This widespread species principally infests birds inhabiting such biotopes, and humans are occasional hosts [1]. *Kepkatrombicula desaleri* parasitizes ungulates and has only been recorded on humans by the author who originally described it [3]. Unlike most trombiculids, this species is characterized by the presence of a sucker disk in the apical part of the hypostome that allows it to feed successfully on large hosts [4].

Neotrombicula autumnalis has been reported as the most frequent causative agent of human trombiculiasis in Europe [5-10], and its role as “harvest bug” has been

* Correspondence: Alexandr.Stekolnikov@zin.ru

¹Zoological Institute, Russian Academy of Sciences, Universitetskaya Embankment 1, St. Petersburg 199034, Russia

Full list of author information is available at the end of the article

attributed without sufficient taxonomic criteria [11,12]. To date, the harvest bug's taxonomy remains unclear. Thus, Richards distinguished several forms of this species when designating the neotype of *N. autumnalis* [12]. Later, Kepka raised them to the subspecies level and equated two of them with the previously described taxa, *Neotrombicula inopinata* (Oudemans, 1909) and *Neotrombicula vernalis* (Willmann, 1942) [13]. Nowadays, both have been assigned the species rank [14-17]. Therefore, it is highly possible that the common name of "harvest bug" comprises more than one trombiculid species in Europe.

Neotrombicula autumnalis has been found in different locations in northern Spain [18-20]. Thus, cases of human and canine trombiculiasis have been recorded annually in La Rioja (North of Spain) from late summer to mid-autumn [21,22]. Dermatitis associated with chigger bites has repeatedly been a cause of public health concern in La Rioja, and in 2008 a study of trombiculiasis was financially supported by the Regional Government. One of the aims of this project was to correctly identify the chiggers present in this Region, since all cases had been ascribed to *N. autumnalis* despite no proper taxonomic identification ever having been carried out. Trombiculid larvae were collected in areas where the presence of mites and seasonal dermatitis cases in humans had been previously confirmed [21]. The collection of questing chiggers from vegetation allowed us to suggest the possible causative agent of trombiculiasis in the study area.

Methods

Collections

Chigger mites were collected during the scheduled samplings of a three-year study (2008-2010) by members of the Infectious Diseases Department, Center for Biomedical Research of La Rioja. A proportion of the chigger specimens collected on randomly-selected sample days were included in this study. According to the seasonality of human trombiculiasis in La Rioja, field collections were carried out from September to November 2010. Unfed trombiculid larvae ready to seek hosts were collected as follows:

1. The black-plate method, which is commonly used when collecting free trombiculid larvae from the ground, was combined with the flag technique, used to collect ticks on vegetation. Thus, a 20×40 cm black plastic plate with two strings at opposite corners was dragged over the ground. Chiggers were transferred into tubes containing distilled water with the aid of a brush.
2. By direct capture: chiggers on the upper surface of the leaves or on small dry branches were directly collected into tubes.

Additionally, three chiggers were removed with a swab from an *Erithacus rubecula* (L.) specimen captured during a bird ringing campaign carried out in the same area by Aranzadi Sciences Society and Abies Environment Resources Inc.

Chigger collection sites

Three sampling areas in La Rioja (North-West of the Central Iberian System, North of Spain) were chosen according to the proven existence of human and canine trombiculiasis:

1. La Pineda, 42° 06' 00" N, 2° 33' 00" W. It is located in Sierra Cebollera Natural Park, at 1,270-1,330 m above sea level (a.s.l.) (Figure 1). This location belongs to the municipal district of Lumbreras, 2.5 km away from the nearest village, San Andrés. Collections were made on 14th and 19th September, 4th and 11th November 2010 in a grove of *Pinus sylvestris* L. with undergrowth of *Erica vagans* L., *Ilex aquifolium* L., *Prunus spinosa* L., *Juniperus communis* L., and *Rubus fruticosus* L. Most chiggers were found on *Brachypodium* sp. at 15-40 cm above the ground (Figure 2) or on defoliated and dried branches of *P. spinosa* and *P. sylvestris* lying on the ground, at a height of 25-50 cm (Figure 3). Collection of chiggers from a bird was carried out in this location on 19th September, 2010.
2. Valdecalvo, 42° 07' 00" N, 2° 31' 30" W. It is located 4 km away from San Andrés and c. 2-3 km away from the previous location, at 1,400 m a.s.l. The vegetation has the same characteristics as described above for La Pineda. Sampling was performed on 4th November 2010.
3. Ocón, 42° 17' 15" N, 02° 14' 30" W. This place is located in the Sierra de La Hez (Leza-Jubera Basin). The collection site is located 2 km away from Ocón and c. 33 km away from previous locations, at 1,050 m a.s.l. Chiggers were collected on 7th October, 2010 in a *Quercus pyrenaica* Willd. grove with undergrowth of *Cytisus scoparius* (L.) Link, *Pteridium aquilinum* (L.) Kuhn, *Brachypodium* sp., and *Rubus fruticosus*.

For morphological comparison, *N. inopinata* samples representing widely separated parts of Europe and preserved as microscopic slides in different depositories were used (Figure 4):

1. Two specimens (Institut Royal des Sciences Naturelles de Belgique, Bruxelles) from *Glis glis* (L.), Belgium, Torgny, 49° 30' N, 5° 28' E, 1955, coll. A Fain.
2. Ten specimens [Zoological Institute RAS (ZIN), St. Petersburg, Russia] from *Prunella modularis* (L.),



Figure 1 Collection site in La Pineda.

- Sylvia atricapilla* (L.), and *E. rubecula*, Czech Republic, Nový Jičín, 49° 34' N, 17° 59' E, 31.07–15.08.2005, coll. I Literák [23].
3. Six specimens [Zoological Museum of Moscow University (ZMMU), Moscow, Russia] from *Myodes glareolus* (Schreber), Ukraine, Transcarpatia, Rakhiv Raion, Kvasivsky Menchul Mt., 48° 10' N, 24° 20' E, 8.09.1959, coll. SO Vysotzkaja, identified as *Neotrombicula germanica* (Willmann, 1952) [24].
 4. Ten specimens (ZMMU) from *M. glareolus*, Ukraine, Transcarpatia, Rakhiv Raion, coordinates unknown, 5.09.1959, coll. SO Vysotzkaja, identified as *N. germanica* [24].
 5. Nine specimens (ZMMU) from *M. glareolus*, Bulgaria, Pirin Mts, 41° 46' N, 23° 24' E, 21–22.10.1960, coll. L Hristov, identified as *N. germanica* [25].
 6. One specimen (ZMMU) from *M. glareolus*, Bulgaria, Vitosha Mts, 42° 34' N, 23° 17' E, 7.11.1960, coll. G Markov, identified as *N. germanica* [25].
 7. Ten specimens (ZIN) from *Sorex raddei* Satunin and *Apodemus (Sylvaemus)* sp., Russia, Kabardino-Balkaria,



Figure 2 Cluster of unfed chigger mites at the end of a grass stalk, La Pineda.



Figure 3 Cluster of unfed chigger mites on a dried branch of *Pinus sylvestris*, La Pineda.

Nalchik, 43° 26' 20" N, 43° 35' 47" E, 24.06.1996, coll. AA Stekolnikov.

8. Seven specimens (ZIN) from *Microtus* sp., Russia, North Ossetia-Alania, Alagir, 43° 02' N, 44° 13' E, 18.04.1976, coll. SN Rybin.
9. Nine specimens (ZIN) from *Cricetulus migratorius* (Pallas), *Apodemus (Sylvaemus)* sp., and *Chionomys gud* (Satunin), Russia, Dagestan, Mazada, 42° 11' 40" N, 46° 22' 26" E, 11–12.07.1988, coll. AB Shatrov.
10. One specimen (ZIN) from *Apodemus (Sylvaemus)* sp., Russia, Dagestan, 6 km E from Khnov, 41° 21' 29" N, 47° 31' 36" E, 22.06.1988, coll. AB Shatrov.

Preparation and examination

Specimens from La Rioja selected for this work were fixed in 70% ethanol; 87 specimens were then mounted

on microscopic slides in Faure-Berlese medium under uniform conditions. Clarified preparations were examined under a compound microscope MBI-3 (LOMO plc, St. Petersburg, Russia) with phase contrast optics. Measurements were made with an ocular micrometer and converted to micrometers. Digital photographs of mites were acquired with a Leica DM5000B microscope equipped with a DFC320 digital camera (Leica Microsystems Wetzlar GmbH), using differential interference contrast microscopy. All examined specimens are archived at ZIN (Nos 8250–8336).

Statistical evaluation

The bootstrapping cluster analysis was used to estimate relative morphometric closeness between *N. inopinata* collected in La Rioja and samples from other regions. The



Figure 4 Collection sites for *Neotrombicula inopinata*.

analysis was based on the following 17 characters: AW (distance between anterolateral scutal setae), PW (distance between posterolateral scutal setae), SB (distance between sensillary bases), ASB (distance from the level of sensillary bases to extreme anterior margin of scutum), PSB (distance from the level of sensillary bases to extreme posterior margin of scutum), P-PL (distance from the level of posterolateral scutal setae to extreme posterior margin of scutum), AP (distance from anterolateral to posterolateral scutal setae on one side), AM (length of anteromedian seta of scutum), AL (length of anterolateral setae of scutum), PL (length of posterolateral setae of scutum), H (length of humeral idiosomal setae), pa (length of leg I, including coxa), pm (length of leg II, including coxa), pp (length of leg III, including coxa), DS (number of dorsal idiosomal setae), VS (number of ventral idiosomal setae), and dmt (distance from the base of leg III tarsus to the base of mastitarsala). Leg lengths were divided by 10 in order to equalize the magnitude of their variation with other variables [26].

Specimens with data missing for any variable were excluded from the analysis. The single specimen from Vitoshka Mts was found to be an outlier and therefore was excluded. Lastly, the number of OTUs (Operational Taxonomic Units) was 12, and their sizes were as follows: La Pineda 10, Valdecalvo 5, Ocón 9, Torgny 2, Nový Jičín 10, Kvasivsky Menchul 6, Rakhiv Raion 10, Pirin 8, Nalchik 10, Alagir 7, Mazada 5, and Khnov 1. Mean values were calculated for each of them. Then the UPGMA clustering algorithm (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) applied to the matrix of Euclidean distances between 12 OTUs by the above 17 variables was used. The number of bootstrap replications in the analysis was 1000.

The computations were performed using pvclust module [27] in the “R” software environment ver. 2.14.1 [28]. The package provides AU (approximately unbiased) p-values [29,30] and BP (bootstrap probability) p-values. For a cluster with AU p-value > 0.95, the hypothesis that “the cluster does not exist” is rejected with significance level 0.05 and such clusters can be considered as strongly supported by data [31]. We can also conclude, from our experience [26], that AU p-values slightly lesser than the threshold may also characterize well-delineated clusters.

Results and discussion

All 87 examined specimens from La Rioja, including 84 collected from vegetation (54 in La Pineda, 15 in Valdecalvo, and 15 in Ocón) and 3 from the bird, were identified as *N. inopinata* (Oudemans, 1909) (Figures 5, 6 and 7). This species was described from Germany (Bremen) and later recorded also from England, France, Austria, Yugoslavia, Bulgaria, Ukraine, Russia (Northern Caucasus) [15], Romania [32], Hungary [33], Slovakia [34], Czech Republic [35], and Poland [36]. Here, we describe for

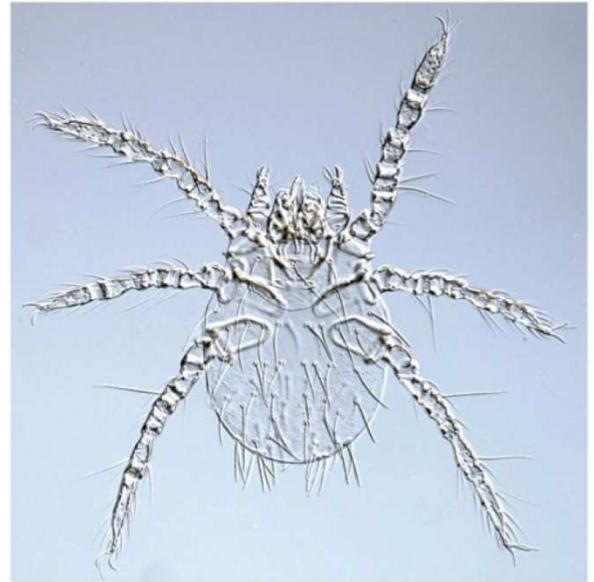


Figure 5 *Neotrombicula inopinata*, general view.

the first time *N. inopinata* from Spain. The identification was achieved using appropriate descriptions and figures [15]. This species is characterized by the nude galeal seta (situated on the hypostome lobe between the cheliceral blade and the palp on each side), branched setae on palpal



Figure 6 *Neotrombicula inopinata*, dorsal aspect of idiosoma.



Figure 7 *Neotrombicula inopinata*, ventral aspect of idiosoma.

femur and genu, nude dorsal and lateral setae on palpal tibia, branched ventral palpal tibial seta, three genualae and one microgenuala I (specialized nude setae on leg genu), presence of a long nude seta on the leg tarsus III (mastitarsala), two humeral setae (most anterior marginal dorsal idiosomal setae) and 36–45 other dorsal idiosomal setae arranged as (6–11)-(8–13)-(6–10)-(2–10)-(2–9)-(0–6), with typical variant 8-8-8(6)-4-6-2 (Figure 6). The characteristic traits of the genus *Neotrombicula* Hirst, 1925 are available from several sources [14,17,37].

The comparison of the sample from La Rioja with specimens from the other regions (Table 1) showed that the former was distinguished first of all by shorter dmt and, consequently, smaller m-t (ratio dmt/TaIII where TaIII is a length of leg III tarsus), by a lower number of ventral idiosomal (VS) (Figure 7) and therefore all idiosomal setae (NDV = DS + VS), and by shorter anteromedian seta of scutum (AM). That these differences represent intraspecific variation is evident from their comparison with the ranges of variation in other widely distributed *Neotrombicula* species [38-40]. Moreover, a concordance between morphometric and geographic distances among OTUs can be clearly seen from Figure 8, where three clusters with significant statistical support (AU p-values > 0.95) correspond to groups of geographically closest samples (three OTUs from Spain, two from Caucasus,

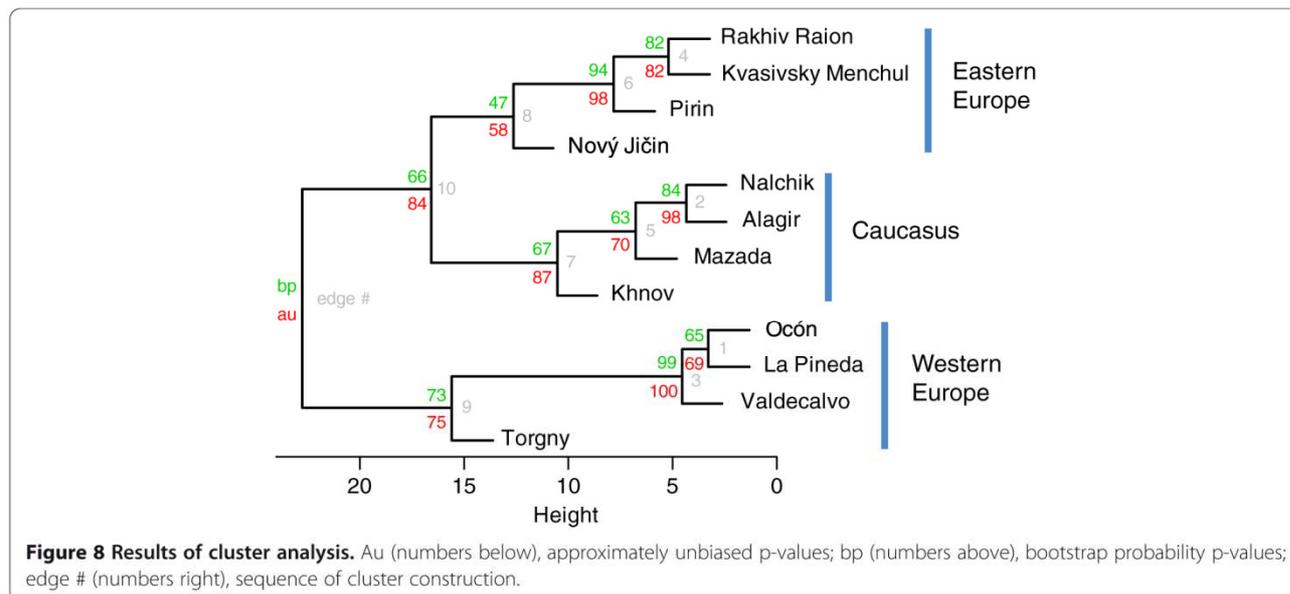
Table 1 Standard measurements of *Neotrombicula inopinata*

Variable	La Rioja (n = 24)		Other sites (n = 65)	
	Range	Mean	Range	Mean
AW	68–78	73	71–82	77
PW	82–93	88	86–104	95
SB	26–33	31	31–41	35
ASB	29–32	31	29–38	33
PSB	27–32	30	24–34	31
SD	56–63	60	54–69	64
P-PL	23–30	26	21–32	29
AP	27–33	30	25–36	31
AM	41–56	45	43–65	57
AL	38–46	43	40–49	45
PL	52–61	56	54–74	62
S	68–81	75	63–101	85
H	54–63	57	54–77	63
D _{min}	38–49	42	36–50	44
D _{max}	50–58	54	50–67	58
V _{min}	29–36	33	26–38	34
V _{max}	41–48	45	43–65	52
pa	310–337	324	274–331	300
pm	265–295	282	248–299	270
pp	306–335	320	277–342	310
lp	887–963	925	808–967	880
DS	36–44	38	36–45	40
VS	22–30	26	23–47	36
NDV	60–72	64	66–90	77
TaIII	77–86	82	67–85	76
dmt	9–15	11	11–21	17
m-t	0.109–0.177	0.139	0.138–0.288	0.220

and three from Ukraine plus Bulgaria). It is noteworthy that upper-level grouping of all 12 OTUs, although without the same support, follows the geographical (meridian) sequence of sample sites (Figure 4), creating three large clusters consisting of Western European, Eastern European, and Caucasian samples, respectively.

The fauna of trombiculids in Spain, based on collection of chiggers from small mammals, reptiles and birds included 18 species, according to Kepka [18,41], Varma [42], Pereira-Lorenzo [19], and Imaz *et al.* [20]. In particular, 10 trombiculid species were recorded on *Apodemus sylvaticus* (L.) from Navarra, a region bordering La Rioja [20]. The description of *N. inopinata* collected from vegetation in La Rioja has raised to 19 the number of trombiculid species in Spain:

Blankaartia acuscutellaris (Walch, 1922),



Hirsutiella billabeta Imaz, Galicia, Moraza et Stekolnikov, 2006,

H. zachvatkini (Schluger, 1948),

Xinjiangsha tarda (Schluger, 1957),

Neotrombicula autumnalis (Shaw, 1790),

N. inopinata (Oudemans, 1909),

N. hispanica Kepka, 1960,

N. japonica (Tanaka, Kaiwa, Teramura et Kagaya, 1930),

N. jordana Imaz, Galicia, Moraza et Stekolnikov, 2006,

N. vulgaris (Schluger, 1955),

Ericotrombidium hasei (Feider 1958),

Leptotrombidium europaeum (Daniel et Brelich, 1959),

L. silvaticum Hushcha et Schluger, 1967,

Brunehaldia bulgarica Vercammen-Grandjean et Kolebinova, 1966,

Cheladonta ikaensis (Sasa, Sawada, Kano, Hayashi et Kumada, 1951),

C. pannonica (Kepka 1956),

Helenicula olsufjevi (Schluger, 1955),

Schoutedenichia dipodilli Vercammen-Grandjean, 1958,

S. krampitzi (Willmann, 1955).

To collect chiggers from vegetation is of primary importance in order to find the agent causing human trombiculiasis. Chigger mites located on grass, shrubs or low tree branches are unfed larvae ready to attack their hosts. Chigger infestation in humans is very probable due to direct contact with these substrates during excursions, hiking or working. All human cases of trombiculiasis recorded in La Rioja have been diagnosed in people that had been in contact with the vegetation from Sierra Cebollera Natural Park during the season when the peak of abundance of *N. autumnalis* and related species is usually recorded in Europe [6,14,43]. Affected people do not

detect the presence of trombiculid mites. In fact, chigger bites are noticed later on, due to the associated intense itching. By then, the mites are detached and examination of the patients skin does not reveal any “harvest bug”. The association between chigger mites and human trombiculiasis in the study area is only based on epidemiological evidence. In accordance with this, collections of chiggers from vegetation have been made previously in Spain [21,44]. All collected chiggers have been identified as *N. autumnalis* but with insufficient taxonomic evidence. Since *N. autumnalis* is closely related to *N. inopinata*, the characteristics that distinguish these species should be examined in each case in order to confirm the identification. *Neotrombicula inopinata* clearly differs from *N. autumnalis* by the presence of eight or more setae in 1st and 2nd rows of dorsal idiosomal setae (Figures 5 and 6), rarely six or seven setae in one of these rows, while *N. autumnalis* always has six setae in both rows. Accordingly, the number of dorsal idiosomal setae is 36–45 in *N. inopinata* and 26–33 in *N. autumnalis*. Furthermore, *N. inopinata* is slightly larger than *N. autumnalis* (larger scutum, longer setae, and longer legs), but intervals for individual morphometric traits overlapped when our entire sample was compared to specimens of *N. autumnalis* collected throughout its geographic range [38].

It should be noted that taxonomical basis of many studies concerning trombiculiasis is inadequate or nonexistent. A notable case was the record of *N. autumnalis* on a little bittern from Turkey [45], where no taxonomic evidence was provided. In fact, the existence of this species in Turkey is not confirmed [17]. Occasionally, when authors try to support their identifications by morphological data, these are surprisingly inappropriate. For example, Guarneri

et al. [46] provided some descriptions in order to justify their record of *N. autumnalis* in Italy. Their method included traits common to larvae of several mite families, such as three pairs of legs with three claws, paired eyes, hooked chelicerae, segmented palps, and some of the typical traits shared by many chigger mite genera such as pentagonal scutum with five setae and two sensilla, nude galeal seta, and tricuspid palpal claw. Kampen [9] treated *N. inopinata* and *N. vernalis* as “subspecies or ecotypes” of *N. autumnalis* following old papers of Kepka [13,47], ignoring all subsequent development of chigger mite taxonomy. Schöler *et al.* [10] stated that the only species involved in their investigation is *N. autumnalis*. Nevertheless, only outdated references [13] and no information about the identification process are included. In the light of these facts, most published data concerning *N. autumnalis* as the causal agent of trombiculiasis should be considered as doubtful. A confirmation of the role of this species in human trombiculiasis, based on new collections and appropriate examination, is required.

In Spain, human trombiculiasis has been only described in the study area [21], and no cases have been reported from the remainder of the country. According to our data, *N. inopinata* is the only chigger species on vegetation during the seasonal outbreak of trombiculiasis. Therefore, it is the only candidate for the causative agent of trombiculiasis in this territory. However, we cannot conclude that *N. inopinata* is the only mite of medical and veterinary importance in northern Spain. To date, no other trombiculid species has been found in La Rioja, although additional chigger collections from birds and small mammals may increase the trombiculid fauna of the region, especially with the species previously recorded in Navarra [20]. Thus, it is highly probable that *N. autumnalis* parasitizes small mammals in the study area, although its role as causative agent of trombiculiasis is unclear. The different height of locations where unfed chiggers wait for their hosts (e.g. vegetation, low tree branches or forest floor), could result in the different host spectra of diverse trombiculid species [39,48]. According to our results, since *N. autumnalis* has not been collected from vegetation, it would be unlikely to attack humans or large animals, whereas *N. inopinata* would have a privileged position to infest humans. The identification of engorged trombiculid mites that have developed their stylostomes, directly removed from humans or domestic animals is essential to define the etiological agent of trombiculiasis.

Conclusion

Neotrombicula inopinata is the most likely causative agent of trombiculiasis in northern Spain, rather than *N. autumnalis*, the species usually regarded as the main human-attacking chigger mite in Europe. Taking into consideration that *N. inopinata* is widely distributed in

Europe, this species could be hidden behind the common name of “the European harvest bug” together with *N. autumnalis*, or even exceed the latter in medical and veterinary importance.

Competing interests

The authors declare they have no competing interests.

Authors' contributions

Collected material, made photographs of the collection site and chigger clusters: PS, AMP, JAO. Prepared and identified material, made measurements and microphotographs, performed statistical evaluation, analyzed the data: AAS. Wrote the paper: AAS, PS, AMP, JAO. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Acknowledgements

We are grateful to David Mazuelas (Abies Environment Resources Inc.), Óscar Gutiérrez (Aranzadi Sciences Society), Naina I Kudryashova (ZMMU), Andrey B Shatrov (ZIN), and Ivan Literák (University of veterinary and pharmaceutical sciences, Brno, Czech Republic) who provided us with materials. We wish to express our appreciation to Dr Lesley Bell-Sakyi (The Pirbright Institute, UK) for reviewing the English language of this manuscript. We also thank two anonymous reviewers for useful comments. This research was supported by a grant from the Russian Foundation for Basic Research No. 12-04-00354-a (AAS) and by a grant from the Government of La Rioja (FOMENTA 2007/14) (PS, AMP, JAO).

Author details

¹Zoological Institute, Russian Academy of Sciences, Universitetskaya Embankment 1, St. Petersburg 199034, Russia. ²Center of Rickettsioses and Arthropod-borne Diseases at the Infectious Diseases Department, Hospital San Pedro—Center for Biomedical Research of La Rioja, Logroño, Spain.

Received: 13 November 2013 Accepted: 25 February 2014

Published: 3 March 2014

References

- Ripka G, Stekolnikov AA: First finding of the chigger mite *Blankaartia acuscutellaris* (Acari Trombiculidae) on a human host in Europe. *Belg J Entomol* 2006, **8**:147–151.
- Winkler A: Neue Ergebnisse in der Trombidioseforschung. I. Mitteilung. *Hautarzt* 1953, **4**:135–138.
- Methlagl A: Über die Trombidiose in den Österreichischen Alpenländern. *Denkschr Österr Akad Wiss Math-Naturwiss Kl* 1928, **101**:213–250.
- Shatrov AB, Stekolnikov AA: Redescription of a human-infesting European trombiculid mite *Kepkatrombicula desalerei* (Acari: Trombiculidae) with data on its mouthparts and stylostome. *Int J Acarol* 2011, **37**(Suppl 1):176–193.
- Poulsen PA: *Studies on Trombicula autumnalis Shaw and trombidiosis in Denmark*. Aarhus: Universitetsforlaget i Aarhus; 1957.
- Kepka O: Die Trombiculinae (Acari, Trombiculidae) in Österreich. *Zeitschr Parasitenk* 1964, **23**:548–642.
- Daniel M: Trombiculosis – a serious problem of urbanized areas. *Meditzinskaya Parazitologiya Parazit Bolezni* 1983, **5**:52–57 [In Russian].
- Daniel M, Rosický B: Rozšíření trombiculózy v Praze a přilehlých rekreačních oblastech [Dissemination of trombiculiasis in Prague and the surrounding recreational areas]. *Českosl Epidemiol Mikrobiol Imunol* 1985, **34**:144–148.
- Kampen H: Die Herbstmilbe *Neotrombicula autumnalis* und andere parasitische Laufmilben (Acari, Trombiculidae) als Verursacher von Hauterkrankungen in Mitteleuropa. In *Denisia 0006: diverse (2002): Amöben, Bandwürmer, Zecken... Parasiten und parasitäre Erkrankungen des Menschen in Mitteleuropa*. Edited by Aspöck H. Linz: Oberösterreichisches Landesmuseum, Biologiezentrum; 2002:461–476. http://www.landeshmuseum.at/pdf_frei_remote/DENISIA_0006_0461-0476.pdf.
- Schöler A, Maier WA, Kampen H: Multiple environmental factor analysis in habitats of the harvest mite *Neotrombicula autumnalis* (Acari: Trombiculidae) suggests extraordinarily high euryoecious biology. *Exp Appl Acarol* 2006, **39**:41–62.

11. Hirst S: On the "Harvest bug" (*Microtrombidium Autumnalis*, Shaw). *J Econ Biol* 1915, **10**:73–77.
12. Richards WS: The variation of the British harvest mite (Trombiculidae, Acarina). *Parasitology* 1950, **40**:105–117.
13. Kepka O: Zur Taxonomie der Formen von *Neotrombicula autumnalis* (Shaw, 1790) (Acarı, Trombiculidae). *Zeitschr Zool Syst Evol* 1964, **2**:123–173.
14. Kolebinova MG: *Acariformes, Trombidioidea, Trombiculidae, Leeuwenhoekiiidae*. Sofia: Aedibus Academię Scientiarum Bulgaricae; 1992 [In Bulgarian].
15. Kudryashova NI: *Chigger mites (Acariformes, Trombiculidae) of East Palaearctics*. Moscow: KMK Scientific Press; 1998 [In Russian].
16. Stekolnikov AA: A revision of the chigger mite species group *vulgaris* (Trombiculidae: *Neotrombicula*). *Parazitologiya* 1999, **33**:387–403 [In Russian].
17. Stekolnikov AA, Daniel M: Chigger mites (Acarı: Trombiculidae) of Turkey. *Zootaxa* 2012, **3216**:1–104.
18. Kepka O: Die Trombiculidae (Acarı) der Iberischen Halbinsel. II. Mitteilung. *Zeitschr Parasitenk* 1960, **20**:191–206.
19. Pereira-Lorenzo A: Chiggers (Acarina: Trombiculidae) parasitizing small mammals in Galicia (NW Spain). *Acarologia* 1993, **34**:323–329.
20. Imaz A, Galicia D, Moraza ML, Stekolnikov AA: Contribution to the knowledge of chigger mites (Acarı: Trombiculidae) parasitizing *Apodemus sylvaticus* (L.) (Rodentia, Muridae) on the Iberian Peninsula. *Acarologia* 2006, **46**:53–64.
21. Jiménez S, Gastón I, Pérez A, Oteo JA: A seasonal outbreak of human parasitization by chiggers in La Rioja (Northern Spain). *Clin Microbiol Infect* 2001, **7**(s1):348.
22. Oteo JA, Portillo A, Santibáñez S, Blanco JR, Pérez-Martínez L, Ibarra V: Cluster of cases of human *Rickettsia felis* infection from Southern Europe (Spain) diagnosed by PCR. *J Clin Microbiol* 2006, **44**:2669–2671.
23. Literak I, Stekolnikov AA, Sychra O, Dubska L, Taragelova V: Larvae of chigger mites *Neotrombicula* spp. (Acarı: Trombiculidae) exhibited *Borrelia* but no *Anaplasma* infections: a field study including birds from the Czech Carpathians as hosts of chiggers. *Exp Appl Acarol* 2008, **44**:307–314.
24. Schluger EG, Vysotzkaja SO: On the fauna of chigger mites (Acariformes, Trombiculidae) from the Transcarpathian Region. *Parazitologiya* 1970, **4**:153–165 [In Russian].
25. Sosnina EF, Visockaja SO, Markov GN, Hristov L: Beitrag zur Arthropodenfauna auf Kleinsäuger in Bulgarien. *Zool Anz* 1969, **183**:370–378.
26. Stekolnikov AA: *Leptotrombidium* (Acarı: Trombiculidae) of the world. *Zootaxa* 2013, **3728**:1–173.
27. Suzuki R, Shimodaira H: Package 'pvclust'. Hierarchical clustering with p-values via multiscale bootstrap resampling. Ver 1.2-2. 2011. <http://cran.r-project.org/web/packages/pvclust/index.html>.
28. R Core Team: *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2013. <http://www.r-project.org>.
29. Shimodaira H: An approximately unbiased test of phylogenetic tree selection. *Syst Biol* 2002, **51**:492–508.
30. Shimodaira H: Geometry of multiscale bootstrap resampling. In *2nd International symposium on information geometry and its applications: December 12-16, 2005, Tokyo*; 2005. <http://www.stat.tu-tokyo.ac.jp/~infogeo/abst/HidetoshiSHIMODAIRA.pdf>.
31. Suzuki R, Shimodaira H: Pvclust: an R package for hierarchical clustering with p-values. 2006. <http://www.is.titech.ac.jp/~shimo/prog/pvclust/>.
32. Solomon L: Contribution à la connaissance de l'acaroparasitofaune des petits mammifères de Dobroudja. *Travaux Mus Hist Nat G Antipa* 1968, **8**:671–692.
33. Haitlinger R: Acarina of small mammals in Hungary. *Polskie Pismo Entomol* 1979, **49**:553–566.
34. Kováčik J: Roztočie čel'ade Trombiculidae (Acarina) drobných zemných cicavcov Vihorlatu. *Zborn Východoslov Múz Košiciach, Prír Vedy* 1983, **23**:183–189.
35. Daniel M, Pejcoch M, Kaluz S: Acarina: Prostigmata (Trombiculidae). *Folia Fac Scient Nat Univ Masarykianae Brunensis, Biol* 1995, **92**:71–74.
36. Mąkol J, Cichoń J, Felska M, Kłosińska A, Łaydanowicz J, Łupicki D, Gabryś G: A new data on biology and taxonomy of *Neotrombicula inopinata* (Oudemans, 1909) and *Leptotrombidium ruscicum* (Oudemans, 1902) (Acarı: Actinotrichida: Trombiculidae). *Ann Zool* 2010, **60**:419–427.
37. Vercammen-Grandjean PH: *The chigger mites of the Far East (Acarina: Trombiculidae and Leeuwenhoekiiidae)*. Washington, DC: US Army Medical Research and Development Command; 1968.
38. Stekolnikov AA: New data on fauna and systematics of chiggers of the *autumnalis* group (Trombiculidae: *Neotrombicula*). *Parazitologiya* 1997, **31**:527–542 [In Russian].
39. Stekolnikov AA: Variability of chigger mites of the *talmiensis* group, genus *Neotrombicula* Hirst, 1925 (Acarı, Trombiculidae) in the areas of sympatry in the Western Caucasus. *Entomol Obozr* 2002, **81**:761–777 [In Russian].
40. Stekolnikov AA, Klimov PB: A revision of chiggers of the *minuta* species-group (Acarı: Trombiculidae: *Neotrombicula* Hirst, 1925) using multivariate morphometrics. *Syst Parasitol* 2010, **77**:55–69.
41. Kepka O: Die Trombiculidae (Acarı) der Iberischen Halbinsel. I. Mitteilung. *Zeitschr Parasitenk* 1960, **19**:548–552.
42. Varma MGR: Mites (family Trombiculidae) parasitizing birds migrating from Africa to Europe. *Bull World Health Org* 1964, **31**:411–416.
43. Elton C, Keay G: The seasonal occurrence of harvest mites *Trombicula autumnalis* Shaw on voles and mice near Oxford. *Parasitology* 1936, **28**:110–114.
44. Fernández-Soto P, Pérez-Sánchez R, Encinas-Grandes A: Molecular detection of *Ehrlichia phagocytophila* genogroup organisms in larvae of *Neotrombicula autumnalis* (Acarı: Trombiculidae) captured in Spain. *J Parasitol* 2001, **87**:1482–1483.
45. Cakiroglu D, Pekmezci D, Meral Y, Gokalp G, Acici M: Trombiculidae larvae (*Neotrombicula autumnalis*) infestation in a Little Bittern (*Ixobrychus minutus*) in Turkey. *Parasitol Res* 2008, **102**:1077–1079.
46. Guarneri F, Pugliese A, Giudice E, Guarneri C, Giannetto S, Guarneri B: Trombiculiasis: clinical contribution. *Eur J Dermatol* 2005, **15**:495–496.
47. Kepka O: Die Herbstmilbe (*Neotrombicula autumnalis*). *Angew Parasitol* 1965, **6**(Suppl 12):1–13.
48. Stekolnikov AA, Literák I, Čapek M, Havlíček M: Chigger mites (Acarı: Trombiculidae) from wild birds in Costa Rica, with a description of three new species. *Folia Parasitol* 2007, **54**:59–67.

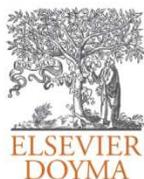
doi:10.1186/1756-3305-7-90

Cite this article as: Stekolnikov et al.: *Neotrombicula inopinata* (Acarı: Trombiculidae) – a possible causative agent of trombiculiasis in Europe. *Parasites & Vectors* 2014 **7**:90.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica

www.elsevier.es/eimc



Diagnóstico a primera vista

Dermatitis pruriginosa tras paseo por la montaña

Pruritic dermatitis after hiking in the mountains

Paula Santibañez-Sáenz, Ana M. Palomar-Urbina, Elena Imaña-Rodríguez y José A. Oteo-Revuelta*

Centro de Rickettsiosis y Enfermedades Transmitidas por Artrópodos Vectores, Departamento de Enfermedades Infecciosas, Hospital San Pedro-CIBIR, Logroño, La Rioja, España

Descripción clínica del caso

Mujer de 29 años sin antecedentes de interés que el 17 de octubre de 2013 acude a consultas externas de enfermedades infecciosas para evaluación de lesiones cutáneas muy pruriginosas de 4 días de evolución. En la anamnesis refería contacto con animales (es propietaria de 2 perros) y paseo reciente (domingo 13 de octubre) en contacto estrecho con la vegetación, por un pinar del Parque Natural Sierra Cebollera (La Rioja). Cuatro de las 7 personas que la acompañaban en la excursión (3 adultos y un bebé) presentaban un proceso similar, aunque mucho más leve. Los 3 perros que les habían acompañado estaban afectados de un cuadro de ataxia muy severa, vómitos y dificultad respiratoria.

La misma noche del paseo comenzó con prurito generalizado, observando a la mañana siguiente la aparición de pequeños «granitos rojos» muy pruriginosos en ingles y corvas que iban aumentando de tamaño. No refería fiebre u otra clínica de afectación general y no había observado artrópodos (garrapatas o pulgas) en su cuerpo o ropa. Presentaba buen estado general, observándose pápulas eritematosas en tobillos, huecos poplíteos, ingles, genitales externos, hipogastrio, axilas y zona lateral del tórax (fig. 1). No se observaron otros signos clínicos.

Evolución

Ante la clínica referida, con afectación de 5 de las 7 personas del grupo, incluidos los 3 perros, y el antecedente epidemiológico de paseo en la época otoñal en una zona con abundancia de trombicúlidos, se realizó el diagnóstico de trombiculiasis. Se invitó a la paciente a la toma de antihistamínicos, rechazándolos por encontrarse en periodo de lactancia. Se prescribieron baños con avena coloidal y uso de ropa blanca de algodón, con disminución progresiva del prurito. También se recomendó lavado con agua muy caliente de la ropa que utilizó en la excursión.

Comentario final

Teniendo en cuenta el cuadro clínico, la época del año y el contacto con la vegetación del Parque Natural Sierra Cebollera (42° 06' 00" N, 2° 33' 00" W), se diagnosticó a la paciente de trombiculiasis¹.

La trombiculiasis o trombidiosis es una dermatitis causada por las picaduras de las larvas de ácaros de la familia *Trombiculidae*². Las larvas forman cúmulos que se pueden observar como puntos rojos, principalmente en los extremos apicales de plantas herbáceas o en el ramaje seco situado en suelo boscoso (fig. 2). Denominadas en la literatura anglosajona *chiggers* o *harvest mites*, parasitan a un amplio rango de vertebrados, incluyendo aves, reptiles y mamíferos, entre ellos el hombre³. Presentan un ciclo biológico curioso. Solamente actúan como parásitos en su fase larvaria, mientras que en la fase adulta son depredadores de vida libre que viven enterrados en el suelo y se alimentan de artrópodos, sus huevos y restos vegetales. Las larvas (3 pares de patas) salen de los huevos depositados sobre la hojarasca del suelo y trepan por la vegetación baja, donde esperan al hospedador. Para que el desarrollo continúe, la larva se alimenta a través del estilostoma de fluidos tisulares y restos celulares. Una vez repleta, se suelta del hospedador y continúa el ciclo en el suelo, mudando a ninfa (4 pares de patas), y esta a adulto. Cuando se dan las condiciones apropiadas las hembras depositan los huevos sobre la tierra, comenzando así el siguiente ciclo, que se completa en un año⁴.

La dermatitis resulta de la combinación de las enzimas digestivas secretadas por el ácaro y la respuesta inmunitaria del paciente. Esta respuesta parece estar determinada por el efecto irritante de la saliva de los ácaros y una hipersensibilidad adquirida a antígenos salivares³. Aunque la respuesta más habitual es el prurito intenso, pueden producirse reacciones más severas, que se acompañan de fiebre, e infecciones secundarias asociadas al rascado de las lesiones. En el caso que aquí se describe, las lesiones cutáneas aparecieron en las zonas de más fácil acceso para las larvas, así como en las zonas en las que la piel es más fina o está oprimida por la ropa. La enfermedad de los perros que acompañaban a la paciente reforzó el diagnóstico de trombiculiasis. Presentaban una parasitación masiva por larvas de trombicúlidos que les provocó un cuadro

* Autor para correspondencia.
Correo electrónico: jaoteo@riojasalud.es (J.A. Oteo-Revuelta).



Figura 1. Pápulas eritematosas.



Figura 2. Cúmulo de larvas en planta herbácea.

neurrológico y digestivo grave, muy conocido en la zona aunque poco documentado.

Desde hace más de una década se tiene constancia de la presencia de trombicúlidos en determinadas zonas del Parque Natural Sierra Cebollera y de su asociación con la dermatitis estacional humana⁵. Entre finales de verano y mediados de otoño se diagnostican cada año numerosos casos de trombiculiasis humana y canina, siempre relacionados con el contacto directo con la vegetación baja de dichas zonas.

En Europa, la especie de trombicúlido que se ha considerado como causante de esta dermatitis estacional ha sido *Neotrombicula autumnalis*. De hecho, había sido aceptada como la especie presente en La Rioja. Sin embargo, una apropiada clasificación taxonómica realizada recientemente por nuestro grupo ha permitido involucrar a *Neotrombicula inopinata* como el agente causal de la trombiculiasis en esta región¹.

En otras zonas del mundo los trombicúlidos son vectores de rickettsiosis como la fiebre de los matorrales, causada por *Orientia tsutsugamushi*. En Europa no se ha podido demostrar su papel como vectores de agentes infecciosos^{6,7}.

Para evitar la parasitación por trombicúlidos, se deben tomar las mismas precauciones que se recomiendan para evitar las picaduras de garrapatas, con las que comparten hábitat: ropa adecuada que cubra la mayor parte del cuerpo, no salirse de los caminos en la montaña en la época de actividad del artrópodo, etc.⁸.

Las picaduras de ácaros deben ser tenidas en cuenta siempre que aparezca una erupción cutánea sin filiación. El conocimiento de la diversidad de los ácaros que parasitan al hombre en una zona determinada es importante para identificar la etiología de estos casos.

Bibliografía

1. Stekolnikov A, Santibáñez P, Palomar AM, Oteo JA. *Neotrombicula inopinata* (Acari: Trombiculidae) — a possible causative agent of trombiculiasis in Europe. *Parasit Vectors*. 2014;7:90. doi: 10.1186/1756-3305-7-90.
2. Goff ML, Loomis RB, Welbourn WC, Wrenn WJ. A glossary of chigger terminology (Acari: Trombiculidae). *J Med Entomol*. 1982;19:221–38.
3. Burns DA. Diseases caused by arthropods and other noxious animals. En: Burns T, Breathnach S, Cox N, Griffiths C, editores. *Rook's Textbook of Dermatology*. 7th ed Malden, Massachusetts, USA: Blackwell Publishing, Inc; 2008. p. 1555–618.
4. Shatrov AB, Kudryashova NI. Taxonomy, life cycles and the origin of parasitism in trombiculid mites. En: Morand S, Krasnov BR, Poulin R, editores. *Micromammals and Macroparasites Part II*. Springer; 2006. p. 119–40.
5. Jiménez S, Gastón I, Pérez A, Oteo JA. A seasonal outbreak of human parasitization by chiggers in La Rioja (Northern Spain). *Clin Microbiol Infect*. 2001;7 Supl 1:348.
6. Kampen H, Schöler A, Metzgen M, Oehme R, Hartelt K, Kimmig P, et al. *Neotrombicula autumnalis* (Acari, Trombiculidae) as a vector for *Borrelia burgdorferi* sensu lato? *Exp Appl Acarol*. 2004;33:93–102.
7. Oteo JA, Portillo A, Santibáñez S, Blanco JR, Pérez-Martínez L, Ibarra V. Cluster of cases of human *Rickettsia felis* infection from Southern Europe (Spain) diagnosed by PCR. *J Clin Microbiol*. 2006;44:2669–71.
8. García-Álvarez L, Palomar AM, Oteo JA. Prevention and prophylaxis of tick bites and tick-borne related diseases. *Am J Infect Dis*. 2013;9:104–16.

