

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Dptº Patología Animal I (Sanidad Animal)

TRANSMISIÓN EXPERIMENTAL DE
Dipetalonema dracunculoides (COBBOLD, 1870)
POR *Rhipicephalus sanguineus* (LATREILLE, 1806)

Angeles Sonia Olmeda García

Septiembre, 1992

TESIS DOCTORAL

"Transmisión experimental de
Dipetalonema dracunculoides (Cobbold, 1870)
por **Rhipicephalus sanguineus** (Latreille, 1806)"

Memoria que presenta Dña.
Angeles Sonia Olmeda García
para optar al grado de Doctor
en Veterinaria

Madrid, 18 de septiembre de 1992

A mis padres

A Félix

Ahora que veo este trabajo casi concluído recuerdo con cariño muchos momentos, algunos agradables y otros difíciles, pero siempre, ligados a ellos están las personas que me ayudaron.

Tengo mucho que agradecer a mi director, el Prof. Dr. J.A. Rodríguez Rodríguez, sobre todo, el respeto con que acogió siempre mis iniciativas y por enseñarme que lo más importante de todo trabajo de investigación son las personas.

Al Prof. Dr. Rojo-Vázquez, por su interés y sus valiosos consejos que tanto me ayudaron no sólo al inicio de este trabajo, cuando era Director del Departamento de Patología Animal I, sino también en los últimos y siempre difíciles momentos.

A los profesores de la Unidad Docente de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, la Dra. Gómez, el Dr. Alunda y el Dr. Respaldiza por ayudarme siempre que los necesité.

A Mónica y Concha, mis primeras maestras en el laboratorio.

A Arantxa y Bea, consejeras y amigas.

A Concha Montes por la confianza que da saber que hay alguien con quien contar en cualquier momento.

A mis internos; a Roberto, que compartió mis primeras novatadas y a Raquel por ayudarme y sufrirme en tantas ocasiones.

A Juan, a Reme y a Antonio porque por ellos pude continuar mis estudios cuando un desafortunado accidente acabó con toda la colonia de garrapatas.

Por las veces que he necesitado el apoyo de un amigo: gracias Jorge.

Quiero agradecer muy especialmente a Lupe por su inestimable colaboración en la redacción de esta memoria.

A mis padres y a Félix, por todo.



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Opto. Patología Animal I
(Sanidad Animal)
Facultad de Veterinaria
U.C.M.

Avda. Puerta de Hierro, s/n
28040 - Madrid

Don José Alberto Rodríguez Rodríguez, Profesor Titular del Departamento de Patología Animal I (Sanidad Animal) de la Universidad Complutense de Madrid,

C E R T I F I C O :

Que el trabajo de tesis doctoral titulado "Transmisión experimental de *Dipetalonema dracunculoides* (Cobbold, 1870) por *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806)" de la que es autora la Licenciada en Veterinaria por la Universidad Complutense de Madrid Doña Angeles Sonia Olmeda García, ha sido realizada en las dependencias del Departamento de Patología Animal I (Sanidad Animal) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, bajo mi dirección y cumple las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor en Veterinaria.

De acuerdo con la normativa vigente, firmo el presente certificado, autorizando su presentación, como Director de la mencionada Tesis Doctoral, en Madrid a quince de septiembre de mil novecientos noventa y dos.

José Alberto Rodríguez

Prof. Dr. José Alberto Rodríguez Rodríguez



I. INTRODUCCIÓN

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. <u>El vector <i>Rhipicephalus sanguineus</i></u>	9
II.1.1. Origen	9
II.1.2. Posición taxonómica	10
II.1.3. Distribución geográfica	12
II.1.4. Espectro de hospedadores	13
II.1.5. Biología	14
II.1.6. Acción patógena	16
II.1.7. Capacidad vectorial	18
II.1.7.1. Infestación del vector	21
II.1.7.2. El desarrollo del parásito en el vector	23
II.1.7.3. La transmisión de la infestación	28
II.3. <u><i>Dipetalonema dracunculoides</i></u>	30
II.3.1. Posición taxonómica	30
II.3.2. Morfología	32
II.3.2.1. Adultos	32
II.3.2.2. Microfilarias	34
II.3.2.3. Estadio I	37
II.3.2.4. Estadio II	38
II.3.2.5. Estadio III	40
II.3.3. Desarrollo en el vector	41
II.3.3.1. Organogénesis	41
II.3.3.2. Períodos de desarrollo	43
II.3.3.3. Localización en el vector	44

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. <u>Mantenimiento del ciclo biológico de <i>R. sanguineus</i> en condiciones de laboratorio</u>	46
III.1.1. Fases no parásitas	47
III.1.2. Fases parásitas	47
III.1.2.1. Alimentación sobre conejos	47
III.1.2.2. Alimentación sobre perros	49

III.1.3. Parámetros estudiados	49
III.2. <u>Técnicas de estudio de D. dracunculoides en R. sanguineus</u>	50
III.2.1. Animal donador	50
III.2.2. Técnica de disección de garrapatas	52
III.2.2.1. Larvas y ninfas sin alimentar	53
III.2.2.2. Ninfas alimentadas y adultos	54
III.2.3. Morfología de los distintos estadios larvarios de D. dracunculoides	54
III.2.4. Desarrollo larvario de D. dracunculoides en R. sanguineus	56
III.2.4.1. En larvas	56
III.2.4.2. En ninfas	57
III.2.4.3. En adultos	58
III.3. <u>Transmisión experimental de D. dracunculoides por R. sanguineus</u>	59

IV. RESULTADOS

IV.1. <u>Mantenimiento de R. sanguineus en condiciones de laboratorio</u>	62
IV.1.1. Período de preoviposición	62
IV.1.2. Período de incubación	62
IV.1.3. Período de alimentación de larvas	63
IV.1.4. Período de ecdísis de larvas a ninfas.	64
IV.1.5. Período de alimentación de ninfas	64
IV.1.6. Período de ecdísis de ninfas a adultos	65
IV.1.7. Período de alimentación de hembras	66
IV.1.8. Duración del ciclo biológico.	67
IV.1.9. Influencia de la prealimentación en los períodos de alimentación	68
IV.1.10. Influencia de las reinfestaciones en los períodos de alimentación	69
IV.2. <u>Morfología de los distintos estadios larvarios de D. dracunculoides</u>	70
IV.2.1. Microfilarias hemáticas	70

IV.2.2. Estadios larvarios obtenidos de garrapatas	72
IV.2.2.2. Estadio I	72
IV.2.2.3. Estadio II	74
IV.2.2.4. Estadio III	76
IV.3. Desarrollo de <i>D. dracunculoides</i> en <i>R. sanguineus</i>	77
IV.3.1. Larvas	77
IV.3.2. Ninfas	78
IV.3.3. Adultos	81
IV.4. <u>Transmisión experimental de <i>D. dracunculoides</i> por <i>R. sanguineus</i></u>	82

V. DISCUSIÓN

V.1. <u>Ciclo biológico de <i>R. sanguineus</i></u>	85
V.2. <u>Morfología de los distintos estadios de <i>D. dracunculoides</i></u>	89
V.2.1. Microfilarias	89
V.2.2. Estadios larvarios obtenidos de la disección de garrapatas	91
V.2.2.1. Microfilarias	91
V.2.2.2. Estadio I	91
V.2.2.3. Estadio II	92
V.2.2.4. Estadio III	93
V.3. <u>Desarrollo de <i>D. dracunculoides</i></u>	94
V.3.1. En <i>R. sanguineus</i>	94
V.3.1.1. Larvas	94
V.3.1.2. Ninfas	95
V.3.1.3. Adultos	97
V.3.2. <u>Evolución.</u>	98
V.3.2.1. Microfilarias	98
V.3.2.2 Estadio I	99
V.3.2.3. Estadio II	99
V.3.2.4. Estadio III	99
V.3.3. Localización en el artrópodo	100
V.4. <u>Papel vectorial de <i>R. sanguineus</i> en la transmisión de <i>D. dracunculoides</i></u>	100

VI. CONCLUSIONES

VII. BIBLIOGRAFÍA

VIII. FOTOGRAFÍAS

IX. FIGURAS

X. TABLAS

XI. GRÁFICAS

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCION

Las enfermedades más importantes que aquejan al hombre y a sus animales domésticos son transmitidas por artrópodos. Entre estas enfermedades cabe citar: tripanosomosis, paludismo, piroplasmosis, leishmaniosis, filariosis, coccidiosis, rickettsiosis etc...

Los artrópodos constituyen el grupo animal con mayor éxito evolutivo, debido a su antigüedad, ubicuidad ecológica, elevado potencial biótico y capacidad genética. Son el grupo más numeroso, con algo más de 750.000 especies descritas (3/4 partes de las existentes en el mundo).

Los artrópodos preceden al ser humano en unos 400 millones de años, mientras que el origen de los patógenos es muy anterior. Aunque no podemos fijar el momento exacto del inicio de la relación entre los artrópodos y los patógenos pero la compleja sincronización que requieren nos hace pensar que ha necesitado de grandes adaptaciones a lo largo del tiempo.

Uno de los principales problemas a los que se enfrenta el patógeno es la forma de acceder a un nuevo hospedador. La solución más simple es el canibalismo. Sin embargo, retrasando la maduración de su forma infestante, el parásito puede ser diseminado en el medio ambiente con las heces y demás fluidos orgánicos durante largos periodos de tiempo (Chabaud et al., 1986).

En el momento que el parásito abandona al hospedador y se enfrenta al medio externo, sus probabilidades de supervivencia descienden. La intervención de un vector disminuye notablemente este riesgo y facilita la continuación y culminación de su ciclo biológico.

Una definición adecuada de vector podría ser la establecida por Rodhain (1985) como: **"todo artrópodo hematófago que asegura la transmisión de un patógeno, ya sea de forma biológica (con multiplicación y/o evolución del agente en su interior) o mecánica (sin modificación del agente), estableciendo contacto entre un vertebrado infectado/infestado y uno libre"**.

Un artrópodo puede ser considerado como vector principal o habitual de un agente determinado, cuando tras aislarlo repetidas veces de ejemplares capturados en la naturaleza y demostrarse su capacidad de transmisión experimental, posee caracteres ecológicos que le permitan establecer un contacto estrecho entre vertebrados reservorios y receptivos (Rodhain y Pérez, 1985).

El gran desconocimiento de la relación parásito-vector es debido, según Rodhain (1985), a la complejidad de los modelos experimentales a utilizar, a los pocos estudios realizados sobre la dinámica de poblaciones y ecología de los invertebrados, y a las escasas referencias sobre la respuesta inmune de los artrópodos.

Dentro de la multitud de artrópodos vectores, los ácaros constituyen el segundo grupo en importancia después de los dípteros. La distribución cosmopolita de las

garrapatas, así como su ciclo biológico hacen que sean consideradas como vectores potenciales de patógenos.

Las garrapatas, que acompañaron al hombre y animales domésticos en las grandes migraciones que tuvieron lugar a finales del siglo XIX y principios del XX, introdujeron nuevos agentes, que provocaron importantes epizootias tales como, la fiebre de Texas en América y Australia y la fiebre de la Costa Oriental en África.

La distribución de este tipo de enfermedades está condicionada por la de su vector.

En la infestación por garrapatas coinciden dos circunstancias de interés: su acción patógena *per se* y su papel vectorial. En cuanto a la acción patógena directa, las garrapatas pueden provocar pérdidas en la ganancia en peso y en la producción láctea de los animales, dependiendo sobre todo de tres factores:

1.- intensidad de la infestación: Norval en 1990 observó que un bovino infestado por una sola hembra de **Amblyomma hebraeum**, durante tres meses consecutivos, puede incrementar su peso en unos 20 Kg más que otro animal de idénticas características pero con una infestación de 6-11 hembras de la misma especie.

2.- especie implicada: para Sutherst (1983) cada hembra grávida de **Boophilus microplus** produce un déficit en la ganancia en peso de los animales parasitados de 0,6-1,5 g.

3.- resistencia del hospedador: En la producción animal tiene un papel primordial la selección de razas, debido a la demanda de productos animales. Estas razas

mejoradas suelen ser más receptivas a la infestación por garrapatas que las razas autóctonas. Drummond (1987) observó que, 40 hembras de *Amblyomma americanum* producían en 100 días pérdidas de hasta 26 Kg de peso de los vacunos europeos (*Bos taurus*), mientras que en cruces de *Bos taurus* x *Bos indicus* no se observaron alteraciones significativas.

La valoración de las pérdidas económicas producidas, tanto por la acción directa de las garrapatas como por los agentes que transmiten, es muy difícil y requiere estudios de larga duración y costes muy elevados. Así, en Estados Unidos las pérdidas han ascendido de 2,5 a 140 millones de dólares entre los años 1930 y 1985 (Drummond, 1987). Sin embargo, por importantes que parezcan estas cifras, no podemos olvidar que el papel principal de las garrapatas es su capacidad de transmitir enfermedades que provocan pérdidas por mortalidad o por disminución en la producción de sus hospedadores. La cuantía de estas pérdidas indirectas resulta difícil de precisar.

Como ejemplo diremos, que en África 175 millones de animales están actualmente expuestos a la cowdriosis, principal obstáculo en la producción animal. En el mismo continente, debido a la theileriosis, murieron en 1989 más de un millón de cabezas, el coste aproximado de las pérdidas económicas, los gastos en programas de investigación y control de las garrapatas, ascendió a 168 millones de dólares (Kariuki, D.P., 1991).

En América Latina, la anaplasmosis y la babesiosis producen pérdidas anuales evaluadas en 1,5 billones de dólares anuales (Kariuki, D.P., 1991).

La FAO, a través de distintas publicaciones (1961, 1987), ha destacado la necesidad de establecer un control eficaz contra las garrapatas. Desde principios de este siglo, la erradicación de las garrapatas y de las enfermedades que transmiten ha sido una de las grandes ambiciones de muchos gobiernos. La investigación básica y aplicada ha permitido la aplicación de nuevas soluciones en algunos países, sin embargo, los fracasos de otros destacan las dificultades financieras, sociales, legales, biológicas y geográficas de esta empresa.

Desafortunadamente, en España existen muy pocos datos sobre las pérdidas económicas producidas directa o indirectamente por las garrapatas, de ahí que las investigaciones realizadas sobre los ixódidos sean tan escasas.

Por otro lado, en nuestro país, los estudios experimentales relacionados con las filariosis caninas se han limitado a una sola especie, *Dirofilaria immitis*, debido a su gran patogenicidad. El gran desconocimiento del ciclo biológico y la acción patógena de *Dipetalonema dracunculoides*, una de las filarias del perro más prevalentes en nuestro país, nos indujo a comenzar este proyecto de Tesis Doctoral. Nuestro interés se centró en demostrar experimentalmente que *Rhipicephalus sanguineus* puede actuar como vector biológico de *D. dracunculoides*, iniciándonos en el estudio del papel vectorial de los ixódidos.

Los estudios epizootiológicos y biológicos *R. sanguineus* era una condición indispensable para conocer los mecanismos de transmisión de los distintos patógenos. Esto nos obligó a mantener esta especie en condiciones de laboratorio, durante varias generaciones.

El mantenimiento del ciclo biológico de ésta y otras especies nos está permitiendo en la actualidad investigar los mecanismos de transmisión por parte de las garrapatas de otros agentes, colaborando en una línea de investigación del Departamento financiada por el Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social, PM89-0029. Con estos estudios aclararemos alguna de las incógnitas planteadas en esta memoria.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

II.1. El vector *Rhipicephalus sanguineus*

II.1.1. Origen

El origen de las garrapatas, al final del período Paleozoico y principios del Mesozoico se estableció por los datos obtenidos de los escasos fósiles encontrados (Cupp, 1991) (Fig. 1).

En su origen, las garrapatas duras debieron presentar un aspecto muy semejante al de los géneros actuales más primitivos (***Ixodes*** y ***Haemaphysalis***).

Existe un escaso paralelismo entre el desarrollo de las garrapatas duras y sus hospedadores (Balashov, 1989).

En el Mesozoico tardío (período Cretáceo) aparecieron nuevos géneros como ***Aponoma***, ***Amblyomma*** e ***Hyalomma***.

Por último, hace aproximadamente 70 millones de años, en la era Cenozoica temprana (período Terciario), con la proliferación de las aves y los mamíferos, se originaron los géneros: ***Margaropus***, ***Boophilus***, ***Rhipicentor***, ***Anomalohimalaya***, ***Rhipicephalus***, ***Nosoma***, ***Cosmioma*** y ***Dermacentor*** (Cupp, 1991).

El ciclo biológico de los ixódidos primitivos debió estar constituido, como en la actualidad, por cuatro estadios de desarrollo, uno inmóvil, el huevo y tres móviles: larva, ninfa y adulto. Estos tres últimos se nutrían de sangre o de fluidos orgánicos. Su permanencia durante largos períodos de tiempo sobre el hospedador surgió ante la necesidad de buscar alimento fuera del nido.

Aunque en el pasado fue motivo de grandes controversias, hoy se acepta que la disminución del número de hospedadores es uno de los grandes logros de la adaptación parasitaria de los ixódidos. Para Hoogstraal (1978), las especies de uno o dos hospedadores surgieron como respuesta a los cambios medioambientales y al comportamiento de sus hospedadores.

II.1.2. Posición taxonómica

Las garrapatas duras son ácaros del Suborden **Metastigmata**, con un aparato bucal perfectamente adaptado al tipo de alimentación (Superfamilia **Ixodoidea**) y un marcado dimorfismo sexual basado principalmente en el desarrollo del escudo dorsal (Familia **Ixodidae**).

Nuttal y Warbuton (1911) clasificaron los nueve géneros de esta familia en cinco grupos según la disposición del surco anal y la longitud del rostro. En esta clasificación, **Rhipicephalus** pertenecería al grupo de garrapatas de

rostro corto (**Brevirostrata**), surco anal rodeando posteriormente el ano (**Metastrata**), primeras coxas hendidas, espiráculos en forma de coma y machos con placas anales y adanales.

Tendeiro (1962) consideró más adecuada la división de Neveu-Lemaire (1938), según la presencia o no de ojos y placas adanales, en 3 subfamilias (**Ixodinae**, **Rhipicephalinae** y **Amblyomminae**).

La clasificación de Hoogstraal (1985) (Fig. 2) es la síntesis de las anteriores. Se trata, básicamente, de los mismos grupos establecidos por Nuttal y Warbuton (1911), según la disposición del surco anal, aplicando la nomenclatura de las subfamilias propuestas por Neveu-Lemaire (1938).

La Subfamilia **Rhipicephalinae** consta de 8 géneros y 121 especies. Morel y Vassiliades (1962) consideraron que algunas especies del género **Rhipicephalus** (**R. sanguineus**, **R. sulcatus**, **R. pusillus**, **R. turanicus**, **R. guilhoni**, **R. rossicus** y **R. leporis**) podrían constituir un conjunto aparte, al que denominaron "grupo sanguineus".

En España han sido denunciadas cuatro especies de este género según recogen Cordero del Campillo et al. (1980): **R. pusillus**, **R. bursa**, **R. sanguineus** y **R. turanicus**. Esta última especie se encuentra actualmente en revisión (Tatchell y McCoster, 1987). La diferenciación de **R. turanicus** y **R. sanguineus** es a veces difícil (Zapatero Ramos y Rodríguez, 1977).

La diferenciación de las hembras se basa en la morfología de los escleritos del gonoporo; convexos y amarillentos en **R. sanguineus** y macizos y rojizos en **R. turanicus** (Morel, 1992, com. personal). Las placas estigmáticas de los machos se han utilizado para su clasificación, sin embargo en estudios recientes Sánchez Acedo et al. (1991) observaron gran variabilidad morfológica dentro de una misma especie.

R. sanguineus se caracteriza por poseer ojos aplanados, escudo dorsal con punteado fino y longitudinal. Los machos tienen estigmas respiratorios de cola no angulosa y placas anales largas. Las hembras poseen áreas porosas muy separadas, cola de los estigmas respiratorios curvados y gonoporo con escleritos atriales poco quitinizados (Gil Collado et al., 1979).

II.1.3. Distribución geográfica

R. sanguineus es originario de las regiones Paleártica y Mediterránea, distribuyéndose por toda la región sahariana y el Oriente próximo (Morel y Vassiliades, 1962).

Hoogstral (1956) la consideró como la especie de garrapata dura más cosmopolita. La gran capacidad de adaptación a los microclimas creados por el hombre (regadío, edificaciones etc..) (Gilot y Patou, 1982) permite entender la gran difusión de este artrópodo.

En España, *R. sanguineus* es la especie más común del perro, según Gil Collado (1938, 1948) y está distribuida por toda la península (Cordero del Campillo et al., 1980).

II.1.4. Espectro de hospedadores

Aunque su hospedador principal es el perro (*Canis familiaris*), *R. sanguineus* se puede encontrar parasitando a un gran número de mamíferos y aves (Hoogstraal, 1956).

En España, *R. sanguineus* ha sido denunciado como parásito de casi todos los animales domésticos, de gran número de animales silvestres (cánidos, félidos, lepóridos, roedores) y accidentalmente del hombre (Cordero del Campillo et al., 1980).

Aunque ya se habían citado infestaciones humanas (Gothe y Hamel y 1973, Burgdorfer et al., 1975) las denuncias se han incrementado en la última década (Dipeolu y Akinboade, 1982; Goddard, 1989; y Carpenter et al., 1990).

II.1.5. Biología

R. sanguineus es un parásito obligado en cuyo ciclo se alternan tres fases parásitas (alimentación de larvas, ninfas y adultos) con fases de vida libre que incluyen períodos de muda, puesta e incubación (Rodhain y Pérez, 1985) (Fig. 3).

Aunque se conoce desde hace tiempo, son escasos los estudios sobre la biología de **R. sanguineus** en condiciones de laboratorio.

La forma peridoméstica de **R. sanguineus** manifiesta una gran independencia de los factores climatológicos (Morel y Vassiliades, 1962).

Tras desprenderse del hospedador la hembra grávida cae al suelo y busca un lugar adecuado donde hacer la puesta. La temperatura es el factor determinante del inicio de la oviposición, que sólo tendrá lugar entre 15 y 40°C (Sweatman y Kousa, 1968). A 30°C se produce un sensible acortamiento de los períodos de preoviposición (3-6 días) para Nuttal (1915) y de oviposición (8-14) para Sweatman (1967).

El número de huevos por puesta depende, principalmente, del peso de la garrapata. Una hembra de 200 mg. pondrá unos 2.039 huevos de media y la puesta se incrementará en 11 huevos por cada mg. adicional (Sweatman, 1967).

Durante la oviposición el cuerpo de la hembra se va retrayendo paulatinamente, hasta una reducción del peso inicial de un 75% antes de morir (Sweatman, 1967).

Según Heath (1979), la eclosión de las larvas sólo puede tener lugar por encima de los 18°C y el tiempo mínimo de incubación (13-17 días) se alcanza en un rango de temperatura de 32 a 38°C. En los estudios de Nuttal (1915) a 30°C, las larvas tardaron en completar su desarrollo de 17 a 19 días. Hadani et al. (1969) y Heath (1979) trabajando a una temperatura de 28°C observaron tiempos de incubación de 15-16 días en el primer caso y de 19-24 en el segundo. Esta fase es muy resistente a la desecación pudiendo perder hasta el 70% de su contenido en agua sin que la larva muera.

El período de prealimentación es el tiempo que los diferentes estadios de desarrollo (larvas, ninfas y adultos) necesitan para que la cutícula se endurezca y puedan alimentarse. Los períodos de ayuno prolongados favorecen la alimentación (Turkahirwa, 1976). El período de prealimentación mínimo, para larvas y ninfas, es de 3 días (Nuttal, 1915 y Hadani et al., 1969) y de 7 para los adultos (Hadani et al., 1969).

Independientemente de que el hospedador utilizado sea lepórido (*Oryctolagus cuniculus* o roedor (*Meriones tristami*) (Nuttal, 1915 y Hadani et al., 1969, respectivamente) el período de alimentación de las fases inmaduras oscila entre 2-8 días para las larvas y 3-9 para las ninfas. A 28°C y HR del

80%, la muda de larvas a ninfas se completa en 6-11 días (Hadani et al., 1969).

El período requerido para que las larvas saciadas muden a ninfas (Heath, 1981) es inversamente proporcional al incremento de la temperatura. Así, entre 18 y 38°C los períodos se acortaron de 33 a 4 días.

Hadani et al. (1969), trabajando a 28°C y HR del 80 %, establecieron que la muda de ninfas-adultos se completaba en 14-18 días. Nuttal (1915) obtuvo períodos más cortos de 11-12 días a 30°C.

Las hembras necesitan alimentarse sobre conejo de 7 a 21 días (Nuttal, 1915 y Hadani et al., 1969). Neitz et al. (1972) establecieron que **Rhipicephalus theileri** es la especie que requiere mayores períodos de alimentación de adultos (26 días).

II.1.6. Acción patógena

La acción patógena de las garrapatas puede sintetizarse en los siguientes puntos (Hernández Rodríguez et al., 1988):

- Acción expoliadora
- Acción mecánica

- Acción tóxica
- Acción inoculadora

Acción expoliadora

La alimentación de la garrapata provoca, dependiendo de la intensidad de la infestación, importantes pérdidas en el hospedador. Se considera que, dependiendo de la especie, una hembra grávida es capaz de ingerir de 0,5 a 3 ml de sangre. Por ejemplo, una hembra de **Dermacentor andersoni**, de 7-10 mg. de peso, ingiere aproximadamente 4000 mg. de sangre (Cupp, 1991).

Acción mecánica

La picadura de la garrapata en la piel produce una solución de continuidad que puede ser aprovechada por otros agentes, patógenos oportunistas, moscas productoras de miasis, etc...

Acción tóxica

La saliva de las garrapatas contiene ciertas sustancias anticoagulantes y enzimas citolíticas (Kaufman, 1989). Las esterasas secretadas durante la alimentación provocan la degranulación de las células cebadas en el lugar de la picadura con el consecuente aumento de histamina e hialuronidasa. La vasodilatación y el aumento de permeabilidad capilar producen un edema inicial que puede terminar en inflamación local y necrosis de la zona.

La saliva de algunas especies (*Ixodes holocyclus*, *Dermacentor andersoni*) contiene una toxina paralizante. Hasta la fecha la única sustancia incriminada ha sido la holociclotoxina. Los síntomas varían desde incoordinación motora, irritación ocular, salivación y vómitos hasta trastornos respiratorios (Cupp, 1991).

Acción inoculadora

Una de las acciones patógenas más importantes es la capacidad de una garrapata infectada/infestada de transmitir el agente a un nuevo hospedador durante su alimentación.

II.1.7. Capacidad vectorial

La capacidad de un artrópodo para ser vector, según Rodhain (1985) depende de que este permita:

- ser infectado/infestado.
- asegurar el desarrollo del parásito en su interior.
- transmitir el parásito a un nuevo hospedador.

Estos fenómenos no dependen exclusivamente del vector. El estudio aislado de los factores que determinan el éxito del ciclo biológico en la

asociación parásito/vector/hospedador resulta imposible dado el alto grado de interrelación entre ellos.

Algunas características estructurales, fisiológicas, biológicas y de comportamiento de las garrapatas, han permitido a estos ectoparásitos obligados mantener y transmitir una gran variedad de patógenos (Hoogstraal, 1985).

Como recoge en su tratado Neveu-Lemaire (1938) ya desde principios de este siglo se consideraba a *R. sanguineus* como uno de los más importantes vectores. La estrecha convivencia del hombre y sus animales de compañía en nuestra sociedad ha incrementado el interés del estudio del papel de esta garrapata como transmisora de ciertas zoonosis.

Dado que la simple enumeración de los agentes que pueden ser transmitidos por *R. sanguineus* sería excesivamente larga, nos limitaremos a considerar aquellos más importantes o más relacionados con nuestro estudio.

R. sanguineus, además de transmisor experimental de algunos arbovirus: AHSV (virus de la peste equina africana) y CCHF (virus de la fiebre de Crimea-Congo), (Hess, 1988 y Watts et al., 1988), es considerado vector de algunos agentes productores de las fiebres manchadas: *Rickettsia rhipicephali* y *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia conorii* (Hoogstraal, 1956;

Burgdorfer et al., 1975; Peter et al., 1984 y Cupp, 1991) y **Coxiella burnetti** (Hoogstraal, 1956).

McKenzie (1984), tras aislar promastigotes de **Leishmania sp.** de **R. sanguineus** apuntó la probabilidad de que este actuara como vector.

También es capaz de transmitir transestádicamente (de un estadio evolutivo al siguiente) **Ehrlichia canis** y **E. platys** (Groves et al., 1975 y Simpson et al., 1991) y **Anaplasma marginale** (Parker y Wilson, 1979) y transováricamente (de una hembra grávida a su descendencia) **Babesia canis** (Shortt, 1936 cit. Soulsby, 1985) y **Haemobartonella canis** (Seneviratna et al., 1973).

En la transmisión de **Hepatozoon canis**, la garrapata infestada debe ser ingerida por el hospedador (Nordgreen y Craig, 1984).

Además de los protozoos anteriormente citados, algunos parásitos metazoos requieren completar su ciclo en un vector. Así, algunas filarias (**Cercophitifilaria roussilhoni**, **Dipetalonema grassi**, **Dipetalonema reconditum** y **Monanema nilotica**) necesitan desarrollarse en **R. sanguineus** para alcanzar su forma infestante (Bain et al., 1986; Bain et al., 1982a; Soulsby, 1987; Bain et al., 1985).

II.1.7.1. Infestación del vector

Para intentar esclarecer la capacidad vectorial de **R. sanguineus** como transmisor de filarias utilizaremos otros artrópodos-vectores como modelo debido a la escasez de estudios al respecto.

La infestación del vector va a depender de muchos factores. En primera instancia influye la microfilaremia del hospedador (Barthold y Wenk, 1986). La distribución de las microfilarias por diferentes zonas del organismo del hospedador y por vasos de distinto calibre constituye un mecanismo de adaptación del parásito al vector (Chabaud et al. 1986).

Algunas características del artrópodo, como la fisiología de la alimentación y la morfología de su aparato bucal, pueden influir decisivamente. Rodhain y Pérez (1985) diferenciaron los vectores dependiendo de que la sangre ingerida procediera de pequeños hematomas producidos por el aparato bucal o bien directamente de los vasos sanguíneos.

La distribución de las microfilarias va a depender a su vez de otros muchos factores:

- a) el calibre de los vasos que irrigan la zona donde el artrópodo se alimenta preferentemente. Petit (1985a y 1985b) clasificó las microfilarias según su localización en el torrente circulatorio en:

- microfilarias con capacidad para penetrar en pequeños capilares (ej: **Mansonella (Tetrapetalonema) mariae**)
- microfilarias que permanecen en vasos de más de 15 μm de calibre (ej: **Dipetalonema robini** y **Dipetalonema gracile**)

b) la periodicidad en el tiempo de las microfilarias. Chabaud et al. (1986) consideran dos tipos:

Periodicidad nictameral (nocturna o diurna). Chabaud et al. (1986) demostró que cuando el vector presenta una actividad nocturna, la microfilaremia aumenta en el hospedador durante las horas de sueño (dependiendo de la presión de CO_2 y de O_2 en los vasos). Si el vector no tiene ciclos diarios de actividad tampoco se observa modificación en la microfilaremia.

Periodicidad estacional. Barriga (1982) describió para en la infestación por **Dirofilaria immitis** un aumento en la microfilaremia durante los meses de verano (junio-septiembre).

c) quimiotactismo adaptativo. Chabaud et al. (1986) y Wirtz y Barthold (1986) citaron la existencia este fenómeno cuando comprobaron que la concentración de microfilarias en **Ornithodoros moubata** era superior a la de la sangre parasitada.

II.1.7.2. El desarrollo del parásito en el vector

Una vez en el vector sólo algunos parásitos consiguen completar su desarrollo con éxito. Es, por lo tanto, un momento clave en este tipo de ciclos.

La asociación parásito/artrópodo debe mantener un equilibrio que permita el desarrollo del primero sin producir un grave daño al segundo.

Los factores que van a influir en este tipo de asociación son múltiples. Unos dependen directamente de las características propias del vector, y otros (en menor grado) dependen de las condiciones medioambientales.

Así, por ejemplo, en una misma especie de vectores transmisores de ciertas filariosis, pueden existir estirpes o subespecies aisladas geográfica o ecológicamente que presenten mayor o menor sensibilidad frente a la infestación y evolución de las filarias (Kartman, 1953). Este mismo autor opina que hay una marcada variabilidad individual en la que la herencia juega un papel primordial.

Chen y Laurence (1985) y Kobayashi *et al.* (1986 a,b) opinan que la respuesta de un vector refractario a la infestación se manifiesta por un encapsulamiento y pigmentación de las microfilarias a las pocas horas de ser ingeridas.

Dependiendo del grado de adaptación, el parásito puede producir modificaciones en la fisiología del vector (alteraciones en la capacidad de vuelo, fecundidad, longevidad, etc.) (Molyneux y Jefferies, 1986; Ibrahim y Trips, 1987).

La hiperinfestación puede tener consecuencias fatales tanto para el vector como para el parásito. *Ornithodoros tartakowskyi* elimina el exceso de microfilarias de *Dipetalonema vitae* con la secreción de sus glándulas coxales (Iván Londoño, 1976b).

Fisiología del vector

La fisiología del vector condiciona definitivamente el desarrollo del parásito en el mismo. En el caso que nos ocupa existen barreras decisivas que a continuación pasamos a comentar.

. Cuando las microfilarias son ingeridas llegan al intestino medio del artrópodo (Fig. 4-1-) donde se enfrentan a la primera barrera que frena su desarrollo. Eichner et al. (1991) demostraron que era posible que *Onchocerca volvulus* se desarrollara en líneas refractarias de *Simulium* spp. mediante la inoculación intratorácica de las larvas.

Ham et al. (1991) obtuvieron resultados similares cuando administraron N-acetyl-D-glucosamina -antagonista de la lecitina- a **Aedes aegypti** refractarios a **Brugia pahangi**.

Sin embargo, parece ser que este factor inhibidor tan sólo es eficaz si el desarrollo no se ha iniciado. Nayar et al. (1988) no consiguieron que microfilarias de **Dirofilaria immitis**, transferidas por enema de un mosquito susceptible a uno refractario, evolucionasen. Si en lugar de microfilarias utilizaban larvas que hubieran iniciado su desarrollo, éstas atravesaban la pared intestinal para localizarse en los tubos de malpigio.

Bain y Brengues (1972) -cit. Chabaud et al. 1986- describieron la hiperplasia celular producida por **Wuchereria bancrofti** al atravesar la pared del intestino medio que facilita el paso a sucesivas larvas.

. La calidad de la dieta y el período de alimentación del vector también influyen en el desarrollo. Así, una dieta sintética no idónea para la cría de **Aedes aegypti** interfiere en el desarrollo del mosquito adulto, produciendo un retraso en la evolución de **Brugia pahangi** (Sneller y Dadd, 1981a,b).

El desarrollo de **Dirofilaria immitis** se ve favorecido por las alimentaciones repetidas al poco tiempo de la infestación, mientras que el desarrollo de **Brugia pahangi** se acelera cuanto más se distancia la alimentación del mosquito (Travi y Orihel, 1987).

. Los artrópodos evitan que la sangre ingerida contacte directamente con el epitelio intestinal mediante una cubierta denominada membrana peritrófica (Rodhain y Pérez, 1985). Hasta el momento, no se ha demostrado que todos los géneros de garrapatas elaboren dicha membrana, ya que sólo ha sido descrita por Coons et al. (1986) para algunos géneros (**Ornithodoros** e **Ixodes**).

En algunas ocasiones esta membrana peritrófica puede actuar como una barrera mas. Esto explicaría que el porcentaje de larvas de **Onchocerca volvulus** que se desarrollan en los simúlidos, sea inversamente proporcional al número de microfilarias ingeridas. Esta aparente contradicción fue aclarada por Chabaud et al. en 1986. la pared del intestino medio, cuando el mosquito se alimenta, experimenta una distensión que provoca la formación de una membrana peritrófica más gruesa cuanto mayor es la ingesta. Cuando la sangre contiene microfilarias, estas "golpean" la pared del intestino induciendo a la formación de una membrana peritrófica semejante a la producida tras una copiosa alimentación. Esta barrera mecánica va a retener las filarias dificultando su desarrollo en el vector.

. Si las larvas consiguen franquear dichas barreras van a atravesar la pared intestinal para buscar una célula diana donde iniciar la fase de desarrollo intracelular (Fig. 4.2).

En este período, el desarrollo del parásito puede ser independiente del metabolismo del vector. Este fenómeno es conocido como "seclusión" (Chabaud et al., 1986). Un ejemplo claro de seclusión es el desarrollo de las larvas de **Brenilia** sp. en las células del tejido graso independientemente del de **Aedes aegypti**.

También es posible lo contrario, tal es el caso de las larvas de **Molinema** sp. que participan de los cambios metabólicos de su vector, **Aedes tongoi**. Está demostrado que el desarrollo de dichas larvas en las células del tejido graso del mosquito no se completa si este no se alimenta tres veces consecutivas.

. El último paso del desarrollo de las filarias tiene lugar en el hemocelo del vector (Fig 4-3-). El posible papel de la hemolinfa como inhibidor del desarrollo de las filarias está en controversia. Irungu (1987) consiguió que larvas de **Brugia pahangi** se desarrollaran en medios de cultivo de células de intestino medio y hemolinfa. Nayar et al. (1988) y Eichner et al. (1991) demostraron que es posible el desarrollo de **Dirofilaria immitis** y **Onchocerca volvulus** inoculados intratorácicamente en **Aedes aegypti** y distintas especies de **Simulium**, respectivamente.

Por el contrario, Ham (1986) consiguió una resistencia de un 84% frente a **Onchocerca linealis** en mosquitos sensibles (**Simulium ornatum** y **Simulium lineatum**) al inocularles hemolinfa de mosquitos infestados.

. En las garrapatas no se conoce el papel que desempeña la hemolinfa en esta última etapa del desarrollo de las filarias. Sin embargo, está demostrado que los complejos cambios que experimenta durante la ecdísis son una condición indispensable para que las larvas que los parasitan alcancen el estadio infestante. Este fenómeno ha sido descrito por Spratt y Haycock (1988) en *Cercophitifilaria johstoni/Ixodes trichosuri*; y Bain et al. (1986); Petit et al. (1988) en *Cercophitifilaria russiloni/R. sanguineus*.

El desarrollo de algunas filarias en su vector depende en gran medida de la temperatura ambiental. Fortin y Slocombe (1981) demostraron que el tiempo de desarrollo de *D. immitis* en *Aedes triseriatus* disminuía de 29 a 8 días cuando la temperatura aumentaba de 18 a 30°C.

II.1.7.3. La transmisión de la infestación

Finalmente, el parásito intenta acceder a un nuevo hospedador.

Algunos parásitos se ven obligados a modificar el comportamiento del vector, como *Dicrocoelium dendriticum* hace con su segundo hospedador intermediario (hormigas del género *Formica*) (Soulsby, 1982).

En otras ocasiones, el parásito es depositado sobre la piel del hospedador, vehiculado por los fluidos orgánicos del vector (heces/*Rickettsia rickettsii*, líquido coxal/*Rickettsia conorii* o saliva/*Dirofilaria immitis*) y atraviesa activamente la epidermis. El virus de Crimea-Congo puede transmitirse sexualmente del macho de *Hyalomma truncatum* a la hembra y de esta a su descendencia (González et al., 1992).

Sin embargo, el aparato bucal y por lo tanto la picadura es la forma mas perfeccionada de transmisión de los parásitos en cuyo ciclo interviene un vector (Fig 4). Está demostrado que en estos casos el parásito experimenta un claro tropismo por las piezas bucales o las glándulas salivares (Lindsay, 1986). En *Brugia pahangi* la migración de larvas al *labium* es proporcional al número de las mismas en *A. aegypti*.

En determinadas condiciones, *O. tartakowskyi* es capaz de alimentarse sobre congéneres saciados. De esta manera, no sólo puede infestarse al ingerir microfilarias de *D. vitae*, sino también inocular la fase infestante a otras garrapatas, prolongando el período de persistencia del parásito en su vector (Iván Londoño, 1976a,b).

II.3. Dipetalonema dracunculoides

Dipetalonema dracunculoides es una especie parásita del perro y cánidos silvestres en Africa, Asia y Europa. Esta especie fue denunciada por primera vez en España por Ortega-Mora et al. en 1988, siendo considerada por Rojo-Vázquez et al. (1990) como la más prevalente en nuestro país.

Los trabajos existentes sobre el tema se refieren a la descripción de los vermes adultos (Fraga de Azevedo, 1943 y Gutiérrez et al. 1986) y su hallazgo en las cavidades torácica y abdominal de cánidos necropsiados (Lightner y Reardon, 1983) así como al diagnóstico diferencial de las microfilarias (Valcárcel et al., 1990).

Los conocimientos de la biología de **D. dracunculoides** en su hospedador invertebrado son escasos. Nelson (1963) encontró larvas de filarias en el interior de **Hippobosca longipennis** recogidas sobre un perro parasitado por **D. dracunculoides**. En 1972, Bain propuso como posible vector de esta especie a **R. sanguineus**, opinión compartida por algunos autores (Davabant, 1988 y Rodríguez Rodríguez et al., 1989).

II.3.1. Posición taxonómica

Chabaud y Bain (1976) consideraron que **Dipetalonema sensu lato** era una línea gondwaniana, originariamente parásita de carnívoros e

insectívoros africanos, que evolucionó antes de la separación de los continentes.

Según la clasificación de Anderson y Bain (1976), **Dipetalonema dracunculoides** (Cobbold, 1870) se encuentra incluida en:

Orden **Spirurida** (Chitwood, 1933)

Superfamilia **Filaroidea** (Weinland, 1858)

Familia **Onchocercidae** (Leiger, 1911)

Subfamilia **Onchocercinae** (Leiger, 1911)

Género **Dipetalonema** (Diesing, 1861)

Subgénero **Acanthocheilonema** (Chabaud y Bain, 1976)

Especie tipo **Dipetalonema (Acanthocheilonema) dracunculoides** (Anderson y Bain, 1976)

Bain et al (1982b) elevaron a rango de género a **Acanthocheilonema** con un gran número de especies que desde la región etiópica colonizaron las regiones Holártica y Oriental.

A pesar de lo expuesto anteriormente, mantendremos la nomenclatura de **D. dracunculoides** como propone Muller (1987), ya que, aunque la nueva terminología (**Acanthocheilonema dracunculoides**) es aceptada por la mayoría de los taxónomos, aún no está excesivamente difundida.

II.3.2. Morfología

Debido a la escasez de referencias acerca de algunos estadios larvarios de **D. dracunculoides** en el hospedador intermediario, hemos revisado los datos bibliográficos de otras filarias del mismo género.

II.3.2.1. Adultos

Desde que Cobbold describió la especie en 1870, muchos autores se han interesado por el estudio de la morfología de los adultos de **Dipetalonema dracunculoides** (Tabla 1).

Estos nematodos son blanquecinos y de cutícula finamente estriada tanto longitudinal (Raillet et al, 1912) como transversalmente (Fraga de Azevedo, 1943). Existe un claro dimorfismo sexual basado principalmente en el tamaño de ambos sexos oscilando entre 15 y 31 mm, los machos y 32 y 60 mm, las hembras.

La región anterior es redondeada con soportes quitinosos peribucales. La boca es simple, sin cápsula. Próximas a ella se encuentran 4 papilas submedianas y 2 pares de papilas laterales, las internas menos desarrolladas que las externas (Rioche, 1960; cit. Davadant, 1988).

El diámetro del cuerpo aumenta desde la región anterior a la zona media, alcanzando 126-310 μm de anchura máxima en los machos (Leger, 1911 -cit. Davadan, 1988- y Fraga de Azevedo, 1943) y 200-300 μm en las hembras (Leger, 1911; Raillet et al., 1912 cit. Nelson, 1963). La parte posterior es afilada.

El cuello es un estrechamiento del cuerpo que se encuentra a 155 μm de media de la región anterior (Fraga de Azevedo, 1943).

La mayoría de los autores (salvo Leger, 1911) coinciden en que la longitud total del esófago oscila entre 1940 y 2710 μm , estando dividido en una porción anterior muscular de 340-610 μm y una posterior glandular de 1486-2166 μm .

A una distancia de 200 a 290 μm del extremo cefálico puede observarse el anillo nervioso y a 481 μm se localizan las papilas cervicales (Fraga de Azevedo, 1943).

En la hembra, la vulva se abre como una pequeña depresión de la cutícula a la altura del esófago glandular, aproximadamente a 1250-2340 μm del extremo anterior del cuerpo.

La localización del ano en las hembras varía ostensiblemente según los diferentes autores, oscilando entre 235 y 657 μm del extremo posterior. En

los machos, la cloaca está a 140-282 μm del final del cuerpo, distribuyéndose a su alrededor las papilas genitales (preanales y post-anales).

El cuerpo del macho termina en un tirabuzón con cuatro vueltas, mientras que el de la hembra se encuentra curvado dorsalmente.

Las espículas del macho son desiguales: la menor, de 120-173 μm de longitud, presenta una quitinización no homogénea con una parte anterior dilatada y una posterior que termina en un garfio afilado. En la espícula mayor se diferencian tres porciones: una proximal quitinizada y cilíndrica, con un ensanchamiento inicial de 170 μm ; una parte media membranosa de 140 μm ; y una distal de 80 μm de longitud muy quitinizada y afilada (Fraga de Azevedo, 1943).

La terminación del cuerpo presenta dos pares de papilas caudales a 1-36 μm del extremo y dos proyecciones cónicas laterales (Leger, 1911).

II.2.2.2. Microfilarias

El aspecto de las microfilarias en general ha sido ampliamente descrito por Bain (1972).

Su cutícula es doble y las células subcuticulares de citoplasma fibrilar les confieren una gran movilidad. El interior está ocupado por una colonia celular.

La cabeza porta una espina subapical bordeando la boca que, probablemente, es accionada por dos células que se tiñen activamente con Azur II.

Sonin (1985) considera que existe un eje faríngeo a partir del cual se formará el esófago (ya que las microfilarias carecen de tubo digestivo).

El anillo nervioso se observa en el primer cuarto del cuerpo y el poro excretor en el primer tercio.

El cuerpo interno es una estructura irregular de aspecto refringente que se localiza en la mitad posterior del cuerpo. Detrás, alineadas cerca del poro anal pueden observarse las 4 células germinales (R_1 , R_2 , R_3 y R_4). En *Dipetalonema vitae* la R_1 se encuentra a unos 175 μm del extremo posterior y la R_4 a unos 50 μm .

Los órganos sensoriales están representados por pequeñas formaciones cromófilas, situadas dos en la región de la cabeza, denominadas anfidios y dos análogas en la cola o fasmidios.

A lo largo de la historia, muchos investigadores han estudiado las microfilarias de *D. dracunculoides* para establecer un diagnóstico diferencial con las de *Dirofilaria immitis*. Por ello la morfología de este estadio es, sin duda, la más conocida del ciclo biológico (Tabla 2).

Las diferencias que se observan en dicha tabla pueden deberse a las distintas técnicas utilizadas: extensión de sangre y tinción de Papanicolaou (Leger, 1911; Fraga de Azevedo, 1942) y Knott modificado (Marconcini y Macchioni, 1980; Ortega-Mora et al. 1989; Valcárcel et al., 1990).

Para facilitar su comparación, siempre que fue posible, hallamos la proporción existente (%) entre la distancia de las estructuras observadas al extremo anterior del cuerpo y la longitud total de la larva, según describe Fraga de Azevedo (1942).

La longitud total del cuerpo es de 145 a 340 μm y la anchura máxima oscila alrededor de 5 μm (salvo para Leger, 1911).

La región cefálica es redondeada y está bien definida. El anillo nervioso es una zona menos teñida localizada a una distancia de 29-61 μm del extremo anterior que representa un 20,5-22,8% de la longitud total de la microfilaria.

El poro excretor se abre a 44-85 μm del extremo cefálico (22-30%) y está unido al núcleo de la célula excéntrica por su citoplasma (36%).

El cuerpo interno es una estructura granulosa de 8,9-32 μm de longitud, constituida por 2-3 masas muy teñidas, unidas por zonas más estrechas. La distancia del cuerpo interno al extremo anterior oscila entre 77,8 y 149 μm (53,5-57,2%).

El poro anal se localiza a 112,8-230 μm del extremo cefálico (79,9-82,6%).

La cola es estrecha, puntiaguda y sin células, con una longitud de 8,15 a 31 μm .

Las microfilarias de *D. dracunculoides* no están envainadas. La cutícula presenta una fina estriación transversal- 17 estrías por cada 10 μm de superficie- (Rioche, 1960).

II.3.2.3. Estadio I

Para su descripción se tuvo en cuenta especialmente, la realizada por Bain en 1972 para el estadio I de *Dipetalonema vitae* - a partir de su hospedador invertebrado (*Ornithodoros tartakowskyi*).

El estadio I de *D. vitae* conserva la longitud de la microfilaria (245 μm) si bien duplica su diámetro (10 μm). Las células subtegumentarias son triangulares y están dispuestas en 4 columnas.

El poro excretor localizado a 75 μm del extremo anterior mantiene su contacto con el núcleo de la célula excéntrica a través del citoplasma, que es largo y radiado.

La célula germinal R_1 experimenta una división única. El resto (R_2 , R_3 y R_4), que en un principio se encontraban alineadas con el ano, se rodean de un citoplasma común. El tapón anal comienza a segregarse aproximadamente a 50 μm del extremo posterior.

Coincidiendo con la primera muda comienzan a diferenciarse el aparato digestivo y el esbozo genital.

El exuvie del estadio I puede mantenerse unido a la larva mediante dos finos ligamentos en el extremo anterior.

II.3.2.4. Estadio II

Siguiendo con la descripción de Bain (1972), el estadio II de *Dipetalonema vitae* tiene una longitud de 700 μm y una anchura de 25 μm . El

esófago, de 280 μm , está bien desarrollado pero no llega a contactar con la boca. Se divide en dos regiones, una anterior a la célula excéntrica, fina y con pocos núcleos y una posterior, de 130 μm , rica en células. La válvula esofágica es una zona fina con algunos núcleos que limitan el esófago y el intestino.

Los núcleos prerrectales, repletos de pequeñas células con citoplasma granuloso, sirven de puente entre el intestino y los tres núcleos rectales.

El tapón anal está estructurado en dos porciones, una zona refringente interna y una zona distal que sobresale al exterior, a 45 μm del final del cuerpo.

El poro excretor se abre a 110 μm del extremo anterior.

Inmediatamente antes de que se inicie la segunda muda, la cutícula del estadio II se desprende; las células ganglionares, próximas al anillo nervioso se dividen formando una masa ventral y dos laterales y la franja refringente del botón anal se hace denticulada. Finalmente se desprende la cutícula de la cola.

II.3.2.5. Estadio III

En 1963, Nelson describió por primera vez este estadio considerando su longitud total de 2400 μm , la anchura de 35 μm y la distancia del poro anal al extremo posterior del cuerpo de 85 μm ; mientras que Bain (1972) estableció la anchura en 25 μm .

La cabeza es redondeada y presenta 4 papilas dispuestas en dos círculos, uno labial externo y uno cefálico posterior, entre los cuales se localizan los anfidios.

La faringe, deprimida lateralmente, está en contacto con la boca y tiene una longitud de 7 μm . Su esclerificación aumenta progresivamente al aproximarse al esófago.

El anillo nervioso se encuentra a 130 μm del extremo anterior y próximas a él, las células ganglionares forman dos pequeñas masas, ventral y dorsal, y dos laterales de mayor tamaño.

El poro excretor, a 185 μm del orificio bucal, se pone en contacto con la célula excéntrica mediante un fino conducto. El esófago muscular tiene una longitud de 220 μm y el glandular de 900 μm . Las gruesas paredes del intestino no dejan, apenas, espacio a la luz intestinal. En cuanto al recto, de

32 μm de longitud, es algo más ancho que el intestino. El ano se abre a 98 μm del extremo posterior.

El esbozo genital se sitúa a 100 μm del límite entre la porción muscular y glandular del esófago en las larvas que darán lugar a hembras, mientras que en los machos se encuentra a 100 μm del límite entre el esófago y el intestino.

La cola es similar a la del adulto, tiene un lóbulo terminal con dos papilas y 2 lóbulos laterales.

II.3.3. Desarrollo en el vector

II.3.3.1. Organogénesis

El nacimiento de las microfilarias (formas muy poco evolucionadas) constituye un fenómeno adaptativo que permite a la hembra emitir un gran número de larvas, produciéndose posteriormente la organogénesis en el vector.

Bain (1972) hizo una detallada descripción de los cambios que debe sufrir una microfilaria hasta transformarse en larva infestante:

- la formación del recto depende de las células ectodérmicas R_2 , R_3 y R_4 . Estas células son también las responsables de la secreción del tapón anal. El

recto se une al intestino por un istmo estrecho y largo constituido por dos núcleos, dorsal y ventral. Este conjunto se denomina prerrecto.

Poco antes del inicio de la primera muda las células intestinales *comienzan su división, llenando la luz de productos metabólicos que no serán eliminados hasta que el intestino y el recto se pongan en contacto en la segunda muda.*

- en la microfilaria existen unos núcleos precursores del esófago dispuestos en torno a un eje cuticular que abarca desde el extremo anterior hasta el inicio del intestino. La formación del esófago comienza en la región posterior y es muy rica en células. El contacto entre la boca y el esófago se establece en la primera muda mediante un segmento muy quitinizado bordeado por dos grandes células.

En las larvas de estadio II y III, las células del esófago posterior experimentan muchas divisiones estableciéndose dos grupos, unas ovoides que bordean la luz que son las células esofágicas en sentido estricto y otras, dispuestas en la corteza, con numerosos núcleos que constituyen las glándulas esofágicas.

- el esbozo genital está constituido por cuatro células, dos posteriores y dos anteriores mas pequeñas que sufren una única división en el estadio I. En las larvas infestantes que darán lugar a hembras, éste migra hacia el esófago y en las que serán machos, hacia el intestino.

- el sistema excretor está constituido por en las microfilarias y larvas de estadio I por una sola célula excéntrica. En las larvas de estadio II se forman canales excretores y en las larvas de tercer estadio la célula excéntrica disminuye considerablemente de tamaño.

- el anillo nervioso es un conjunto formado por cuatro masas ganglionares; una ventral (de mayor tamaño), dos laterales y una dorsal.

- el sistema sensorial lo constituyen 2 anfidios, 4 papilas labiales externas y 4 papilas cefálicas posteriores.

- el sistema muscular, confiere movilidad a la larva y está formado por cuatro cordones musculares que se originan a partir de la célula R₁.

II.3.3.2. Períodos de desarrollo

Como en otros apartados de esta memoria, la escasez de datos en la especie que nos ocupa (*D. dracunculoides*) nos ha obligado a rebuscar información en otras especies y géneros de filarias considerando especialmente aquellas que requieren una garrapata como vector. (Tabla 3)

Bain (1972) estudiando el desarrollo de *Dipetalonema vitae*, encontró larvas de estadio I, a los 6 días post-infestación (p.i.), de estadio II en los días

10-12 p.i. y, por último, las larvas de estadio III el día 21 p.i.. Como puede observarse en la Tabla 3, entre los días 13-21 p.i. las larvas de los distintos géneros alcanzan el estadio infestante.

II.3.3.3. Localización en el vector

Larvas de estadio I y II

Tras atravesar la pared intestinal las filarias buscan su célula "diana". En los insectos suelen ser células de los tubos de malpigio, músculos torácicos o el cuerpo graso, mientras que en las garrapatas sólo se han descrito en el tejido subepidérmico y la musculatura (Tabla 3).

Larvas de estadio III

Cuando alcanzan la forma infestante, las larvas que se encuentran distribuidas por el hemocele del artrópodo llegan a la región de la cabeza.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III.1. Mantenimiento del ciclo biológico de *R. sanguineus* en condiciones de laboratorio

Comenzamos trabajando con distintos estadios de desarrollo de *R. sanguineus* de orígenes diversos (Ciudad Real, Cáceres, Almería, Málaga y Madrid). La identificación específica se realizó siguiendo las claves de Morel y Vassiliades (1962); Gil Collado et al. (1979) y Papadopoulos (1990).

Estas experiencias previas nos permitieron comprobar que la fase más apta para iniciar la línea de cultivo "in vitro" eran las hembras grávidas, ya que las larvas obtenidas de sus puestas constituían una población homogénea y no presentaban problemas para su adaptación a las condiciones de laboratorio.

Para este trabajo realizamos un estudio de *R. sanguineus* durante 6 generaciones. Consideramos primera generación a la descendencia de cada hembra grávida (recogida, en condiciones de campo) hasta la obtención en el laboratorio de una nueva hembra saciada.

III.1.1. Fases no parásitas

Las fases de vida libre del ciclo se mantuvieron en tubos de vidrio de 10 cc tapados con algodón hidrófilo en los que se introducía un papel de filtro plegado en zig-zag siguiendo la metodología descrita por Hueli (1979). Las fases no parásitas se mantuvieron en estufa (Selecta, MOD. 237) a 30°C, HR superior al 90% y completa oscuridad (Estrada-Peña com. personal). Con el fin de conseguir humedad a saturación, siempre se mantuvieron recipientes de agua destilada en el interior de la estufa.

III.1.2. Fases parásitas

III.1.2.1. Alimentación sobre conejos

Los lotes de garrapatas destinados al mantenimiento y estudio del ciclo biológico de **R. sanguineus** se alimentaron sobre conejo (**Oryctolagus cuniculus**) cruce de Gigante de California con Neozelandés.

Para la alimentación de las garrapatas se utilizaron bolsas de oreja ("ear bag") y collares isabelinos según la técnica de alimentación descrita por Bailey (1960) (Fotog. 1).

Las bolsas de oreja, rectangulares, de 13 x 8 cm y confeccionadas con tela de algodón, presentaban una abertura en cada extremo. El cierre superior, con cinta adhesiva de fibra (Velcro[®]), facilitaba la colocación, observación y recogida de las garrapatas. La parte inferior de la bolsa se mantenía cerrada por medio de cintas, asegurándola con esparadrapo a la base de la oreja (Fig.5).

Los collares isabelinos se fabricaron según el diseño de Watts (1972) modificado: en láminas de poliestireno de 0,6 mm de grosor se recortaba un anillo grueso cuyo diámetro interno fuera ligeramente superior al del cuello del conejo. El diámetro externo se fijaba según la longitud de las orejas de cada animal (aproximadamente a unos 17 cm del primero).

El borde interno se protegía con una gruesa lámina de algodón y esparadrapo con el fin de evitar lesiones en los animales. El collar presentaba un corte que unía el borde interno y el externo y que permitía su colocación en el conejo (Fig.6).

Diariamente se observaba cada animal y las garrapatas desprendidas del hospedador se recogían fácilmente invirtiendo la bolsa sobre un recipiente.

III.1.2.2. Alimentación sobre perros

Se fabricaron unas piezas de tejido de punto, adaptadas al cuello, cintura y metacarpo del animal mediante cintas elásticas (Fotog. 2), que se cerraba dorsalmente con una tira de cinta adhesiva de fibra (Velcro[®]).

Las garrapatas se depositaban sobre el lomo del perro. Una vez desprendidas se acumulaban en la zona del pecho, lo que facilitaba la recogida.

III.1.3. Parámetros estudiados

Diariamente se observaban todos los ejemplares anotándose los siguientes datos:

- **período de preoviposición:** tiempo requerido por cada hembra grávida para iniciar la puesta.
- **período de incubación:** tiempo necesario para que eclosione la primera larva. Evitamos toda manipulación de los huevos que pudiera alterar su desarrollo, por lo que la hembra permaneció siempre con la puesta.
- **período de prealimentación:** tiempo transcurrido desde la eclosión o muda de las garrapatas hasta que éstas se alimentan sobre el hospedador. En general seguimos los tiempos apuntados por Nuttal

(1915) si bien ensayamos de qué manera la variación de estos podía influir en la alimentación.

- **período de alimentación**, considerando:

. **período mínimo**: tiempo transcurrido desde que las garrapatas son depositadas sobre el hospedador hasta que se desprenden los primeros ejemplares saciados.

. **período máximo**: tiempo transcurrido desde que las garrapatas son depositadas sobre el hospedador hasta que se desprende el último ejemplar saciado.

- **período de muda**: tiempo comprendido entre la recogida de las garrapatas saciadas (larvas y ninfas) hasta que, tras la ecdísis, emerge un nuevo estadio evolutivo (ninfas y adultos, respectivamente).

- **período requerido para completar el ciclo biológico**: sumatorio de todos los tiempos anteriores, excluyendo siempre aquellos en los que pudiéramos influir directamente (períodos de prealimentación).

III.2. Técnicas de estudio de *D. dracunculoides* en *R. sanguineus*

III.2.1. Animal donador

La fuente de microfilarias (donador) fue un perro de raza Podenco procedente de una rehala de caza de Puerto Lápice (Ciudad Real). Al inicio del estudio el perro tenía 3 años de edad. Fue seleccionado por presentar una

elevada infestación natural por *D. dracunculoides* (1473 microfilarias por mililitro de sangre (mf/ml) en junio de 1989). La microfilaremia mensual desde mayo de 1989 hasta febrero de 1992, obtenida por la técnica de filtración (Difiltest[®]), queda recogida en la Gráfica 1.

Con el fin de descartar otros agentes que pudieran interferir en nuestro trabajo realizamos las siguientes pruebas:

1.- extensión de sangre y tinción con Giemsa para el diagnóstico de ciertas protozoosis hemáticas (hepatozoonosis y piroplasmosis, principalmente).

2.- extensión de sangre y determinación de la actividad enzimática de las microfilarias por la técnica de las fosfatasas ácidas (Chalifoux y Hunt, 1971) para el diagnóstico diferencial con otras filariosis.

3.- pruebas serológicas para la detección de anticuerpos:

. Inmunofluorescencia indirecta:

- frente a *Leishmania infantum* (realizada en el Dpto. de Patología Animal II de la Facultad de Veterinaria de Madrid).

- frente a *Rickettsia conorii* (realizada en la unidad docente de Patología Infecciosa y Epizootiología del Dpto. de Patología Animal I de la Facultad de Veterinaria de Madrid).

-ELISA: frente a *Borrelia burgdorferi* (CITE[®]).

4.- análisis coprológico: por el método de Telemann, se diluían las heces 1:5 v/v en ácido acético al 5%, homogeneizando y filtrando por malla de 150 μm de luz y centrifugando a 1500 rpm durante 3 minutos. El sedimento se observó por microscopía óptica. En el primer análisis realizado comprobamos una infestación mixta por **Uncinaria stenocephala**, **Toxocara canis** y **Toxascaris leonina** que remitió tras un tratamiento con dos dosis diarias de 100mg de Mebendazol (Telmin[®]) durante cinco días.

El control de ectoparásitos se realizó mediante baños con lindano y propoxur (Parasitiven[®]). Antes de alimentar lotes de garrapatas sobre el donador eliminábamos adecuadamente el antiparasitario mediante baños con agua jabonosa.

El habitáculo donde el perro permaneció confinado mientras las garrapatas se alimentaban sobre él, se limpiaba posteriormente con agua a presión y una solución al 5% de fenoles, cresoles y creosotas (Zotal[®]).

III.2.2. Técnica de disección de garrapatas

La disección de las garrapatas nos permitió la observación de los distintos estadios de desarrollo de **D. dracunculoides** en el vector.

La observación y disección de los ejemplares se realizó en un estereomicroscopio (Nikon SMZ1) con un transiluminador (INTRALUX 4000).

El material utilizado constaba de alfileres entomológicos, pinzas de iridectomía (Medicon 075510, 022009) y bisturí con hoja del número 11. En todas las disecciones se utilizó una solución tampón fosfato (PBS) de Ph de 7,2 a Tª ambiente.

El contenido intestinal, los músculos dorsoventrales, los órganos internos y la hemolinfa se teñían con azul de metileno al 1 por mil y observándolos entre porta y cubreobjetos a 100 y 400 A por microscopía óptica (Nikon Alphaphot YS).

III.2.2.1. Larvas y ninfas sin alimentar

En una placa de Petri con 10cc de PBS se sumergían todos los ejemplares. Con alfileres entomológicos desgarrábamos las cutículas para eliminarlas por filtración posterior.

El filtrado se recogía en un tubo de ensayo y se centrifugaba a 2500 rpm durante 10 minutos. Una vez desechado el sobrenadante se analizaba todo el sedimento.

En los casos en que tuvimos que trabajar con ejemplares muertos, se hidrataron durante 48h antes de la disección en PBS a temperatura ambiente.

III.2.2.2. Ninfas alimentadas y adultos

Las disecciones se realizaron según una modificación de la técnica descrita por Encinas Grandes (com. personal).

La garrapata se incluía en una gota de PBS con el escudo sobre el portaobjetos. El primer corte se iniciaba en el borde externo de la base del capítulo y terminaba en el estigma respiratorio. La operación se repetía en el lado opuesto y finalmente se unían los límites posteriores de ambos cortes mediante una sección transversal (Fig. 7).

Se abría y vaciaba el contenido intestinal. El hipostoma era seccionado longitudinalmente y las cutículas se retiraban.

III.2.3. Morfología de los distintos estadios larvarios de *D. dracunculoides*

Se estudiaron 369 filarias obtenidas de la disección de garrapatas (158 microfilarias, 70 larvas de estadio I, 48 de estadio II y 93 de estadio III) y 35

microfilarias hemáticas, procesadas por la técnica de Knott modificada, según describió Acevedo en 1981.

Las distintas medidas de las microfilarias y larvas de estadio I se realizaron a 40x con un micrómetro ocular. Los estadios II y III se inmovilizaron previamente con una solución al 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) en PBS (Lowrie et al., 1978), para dibujarlos mediante cámara clara adaptada a un microscopio (Leitz SM-LUX) y se midieron con un curvómetro de planos.

En algunos casos se determinaron los puntos de actividad de las fosfatasas ácidas en las microfilarias y en los estadios I y II según la técnica descrita por Chalifoux y Hunt en 1971.

En base a su morfología dividimos las larvas obtenidas de la disección de garrapatas en los siguientes grupos:

- microfilarias: muy semejantes a las hemáticas.
- estadio I: más largas y gruesas, con una expansión cuticular lateral.
- estadio II: móviles, muy superiores en longitud y anchura, con la vaina sólo visible en los extremos.
- estadio III: de gran tamaño, sin vaina y con dos expansiones laterales triangulares en el extremo caudal.

Las longitudes de cada estadio se agruparon en rangos de 10 μm en las microfilarias y larvas de estadio I, de 200 μm en las larvas de estadio II y de 400 μm en el estadio III.

III.2.4. Desarrollo larvario de *D. dracunculoides* en *R. sanguineus*

En este apartado pretendimos comprobar en qué estadios de *R. sanguineus* se desarrollaba *D. dracunculoides*.

Larvas, ninfas y adultos mantenidos, al menos durante una generación en condiciones de laboratorio, se infestaron alimentándolas sobre el donador.

III.2.4.1. En larvas

Al iniciar este apartado ya eramos conscientes de que probablemente la infestación sería letal para las larvas de *R. sanguineus*. Aún en el caso de que fuera factible, el desarrollo de *D. dracunculoides* en su interior, era improbable -dado el tamaño del estadio infestante- que éste pudiera albergarse en larvas o ninfas sin alimentar. Por ello supusimos que quizás el nematodo detuviera su desarrollo hasta que la ninfa se alimentara, en cuyo caso el estadio III sólo se observaría en ninfas saciadas o en adultos.

Se utilizaron un total de 1191 larvas de *R. sanguineus*. Se alimentaron *ad libitum* sobre el perro donador (Fig. 8) durante un tiempo medio de 6-7 días, transcurrido el cual e inmediatamente antes de la muda -entre 7 y 11 días después de la recogida- se disecaron las larvas muertas y el 30% (85) de las vivas. El 70% restante (199) permanecieron en la estufa hasta que mudaron a ninfas.

Tras el período de prealimentación (día 20 desde la recogida) se disecaron todas la ninfas muertas (26) y el 65 % de las vivas (113). El resto, se alimentaron sobre conejo. Cuando las 34 ninfas alimentadas mudaron a adultos fueron disecadas.

III.2.4.2. En ninfas

Las características de su ciclo biológico nos hicieron suponer que las ninfas jugaban el papel más importante en la transmisión de *D. dracunculoides*.

Se alimentaban durante 6-13 días sobre el perro donador (Fig. 9) hasta que, una vez saciadas, se desprendían. Se estudiaron un total de 726 ninfas, de las cuales 371 se disecaron antes de la muda y 355 después (181 hembras y 174 machos).

Desde la recogida (día 0) hasta 30 días después, se disecaron diariamente al menos 10 ejemplares (salvo los días 24, 27, 28, 40 y 50).

Para determinar cuántas de las microfilarias ingeridas evolucionaban a larvas infestantes, se disecaron 50 ninfas el día 0 y 48 el día 30 post-recogida (p.r).

III.2.4.3. En adultos

Aunque por las características de su ciclo biológico, el papel de los adultos de **R. sanguineus** en la adquisición/transmisión de **D. dracunculoides** debía ser bastante limitado, quisimos comprobar hasta que punto la ecdísis ninfa-adulto era necesaria para el desarrollo hasta estadio infestante del nematodo en el vector.

Para evitar el desfase del desarrollo larvario según el momento de la ingestión desprendimos manualmente las garrapatas adultas (Theis, 1968) a las 24h de iniciada la alimentación (Fig. 10).

En este apartado se disecaron 198 adultos (91 hembras y 107 machos) entre los días 0 y 30 (p.r).

III.3. Transmisión experimental de *D. dracunculoides* por *R. sanguineus*

Como trazadores (1 y 2) se utilizaron dos perros de raza Beagle, hembras, de 6 meses de edad. Desde su nacimiento se mantuvieron aisladas, en cheniles cerrados con mosquiteras en las ventanas que impidieran el contacto con posibles vectores. No obstante, mensualmente se realizaron análisis rutinarios de sangre por el método de filtración (DifilTest[®]) para confirmar la ausencia de microfilarias en sangre.

Se utilizaron ninfas de segunda generación de un lote homogéneo (descendencia de una única hembra) alimentadas durante 6-7 días sobre el donador (Fig. 11).

Tras la ecdísis, los 93 adultos se dividieron en 3 lotes:

- lote A (28 hembras y 15 machos)
- lote B (28 hembras y 12 machos)
- lote C (6 hembras y 4 machos)

El día 37 (p.r) se disecaron los 10 ejemplares del lote C (Fig. 11), mientras que los lotes A y B fueron alimentados sobre los trazadores 1 y 2, respectivamente.

Todos los adultos de los lotes A y B recogidos tras la alimentación (día 44) fueron también disecados.

El trazador 2 fue sacrificado a los 6 meses (p.i.) según el método descrito por Aluja (1985) corroborando su infestación mediante la recogida de los adultos de *D. dracunculoides*.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

IV.1. Mantenimiento de *R. sanguineus* en condiciones de laboratorio

IV.1.1. Período de preoviposición

A pesar de la gran diferencia entre los períodos mínimo y máximo, el tiempo medio de preoviposición fue bastante homogéneo en todas las generaciones (4-5,8 días) aunque con tendencia al descenso (Gráf. 2.1).

En todas las generaciones varias hembras iniciaron la puesta un día después de desprenderse del hospedador. El período de preoviposición más largo fue de 19 días (5ª generación) ya que aunque una hembra de 2ª generación tardó 25 días en comenzar la oviposición su puesta no fue viable (Tabla 4.1.1).

IV.1.2. Período de incubación

Experimentó un incremento paulatino de la 1ª generación (16,4 días) a la 4ª (22,1 días), para luego descender hasta la 6ª generación (18 días) (Gráf. 2.2).

Los tiempos máximos y mínimos de incubación los presentó la segunda generación (9 y 35 días), (Tabla 4.1.2).

A pesar de la gran dispersión de datos, sólo las generaciones 1ª (16,4 días) y 4ª (22,1 días) se alejan algo más de la media global (19,1 días).

IV.1.3. Período de alimentación de larvas

La alimentación de las larvas se completó entre los 2 y 9 días para todas las generaciones.

Las primeras larvas saciadas se desprendieron del hospedador a los 2-5 días post-alimentación (p.a.) en la 1ª y 3ª generación. Entre 3 y 6 días (p.a.) necesitaron como mínimo las larvas de la 6ª generación y de 3 a 7 días (p.a.) las de 2ª, 3ª y 5ª (Tabla 4.1.3).

La media del tiempo mínimo de alimentación de las larvas experimentó un ligero incremento (3,3 días en la 1ª generación y 4,67 días en la 6ª generación), con una ligera inflexión en la 5ª (4,06 días), mientras que el tiempo máximo medio de alimentación de larvas se incrementó de forma irregular: 4,6 días (1ª generación) y 7,4 (4ª), para luego descender a 6,7 y 6 días (5ª y 6ª generación) (Gráf. 2.3).

IV.1.4. Período de ecdísis de larvas a ninfas

Las larvas saciadas de la 6ª generación fueron las que tardaron menos en completar la ecdísis (3 a 7 días). El desarrollo más lento lo mostraron las larvas de la 3ª generación que necesitaron entre 7 y 24 días. Estos valores tan dispares de las 3ª y 6ª generaciones (12,2 y 4,7 días, respectivamente) alteraron considerablemente la media (8,9 días). El resto de las generaciones, salvo la 5ª (6-21 días), presentaron mayor homogeneidad en los períodos de ecdísis de larva a ninfas, observándose mínimos de 6-7 días y máximos de 10-14 (Tabla 4.1.4; Gráf. 2.4).

IV.1.5. Período de alimentación de ninfas

El período mínimo de alimentación de las ninfas (4-5 días) fue bastante homogéneo en los lotes más precoces de cada generación, mientras que en los lotes más tardíos las primeras ninfas saciadas se desprendieron a los 6-7 días (p.a.), (Tabla 4.1.5).

El período máximo de alimentación fue más variable. Desde los 4 días, para un lote de la 2ª generación hasta los 16 días para otro de la 4ª generación.

En resumen, la media de los períodos mínimos de alimentación de ninfas de cada generación se aproximó bastante a la media (5,3 días); mientras que la media de los períodos máximos fue mucho mas variable (Gráf. 2.5).

IV.1.6. Período de ecdísis de ninfas a adultos

Los primeros adultos procedentes de ninfas saciadas de 4^a y 5^a generación, aparecieron a los 7 días (p.a.). Las ninfas de la 2^a y 6^a generación necesitaron para transformarse en adultos, como mínimo, 9 días y las de 1^a y 3^a generación, 12 días (Tabla 4.1.6).

El tiempo máximo de muda fue también extremadamente variable, llegando en la 4^a generación (22 días) a duplicar el tiempo empleado por la 6^a (11 días).

Excepto en la 3^a generación (15,2 días), en el resto fue posible observar una tendencia al acortamiento del período medio de muda de ninfas a adultos, desde 14,2 a 10 días (Gráf. 2.6).

IV.1.7. Período de alimentación de hembras

En la 2ª generación la primera hembra grávida se desprendió a los 7 días (p.a.). (Tabla 4.1.7.1). El tiempo máximo requerido para alimentarse (30 días) lo presentó una hembra de 4ª generación.

La media del período mínimo de alimentación de las hembras fue bastante homogénea (alrededor de 11 días), si bien presentó una tendencia ascendente de la 1ª a la 4ª generación (de 9,3 a 15,7 días) para descender después hasta la 6ª (8 días), (Gráf. 2.7.1).

El tiempo máximo de alimentación resultó más breve en la 2ª generación (9 días) y se prolongó hasta 30 días en un lote de la 4ª (Gráf. 2.7.).

En las tres primeras generaciones la media del tiempo máximo requerido para finalizar la alimentación de adultos se acortó aproximadamente 3 días (de 18 a 14,8 días) para ascender bruscamente a 26 días en la 4ª generación y descender a 18 días en la 6ª generación.

En la Tabla 4.1.7.2. relacionamos el número de hembras recogidas de cada lote con los tiempos máximos y mínimos de alimentación. Así se observó que la hembra más tardía (30 días de alimentación) fue la única de su lote que consiguió cerrar el ciclo, en cambio del lote más precoz (7-10 días de alimentación) se recogieron 16 hembras grávidas.

IV.1.8. Duración del ciclo biológico

La Tabla 4.1.8 recoge el tiempo medio mínimo requerido por cada generación de *R. sanguineus* para cerrar el ciclo en condiciones de laboratorio (sin tener en cuenta los períodos de prealimentación). Las hembras fueron capaces de concluir su ciclo en un tiempo medio de 66 días.

Los períodos de preoviposición, incubación, muda de larvas a ninfas, alimentación de ninfas, muda de ninfas a adultos y alimentación de adultos experimentan grandes variaciones sin manifestarse ninguna tendencia clara. Tan sólo el período mínimo de alimentación de larvas parece prolongarse progresivamente.

El desarrollo completo del ciclo indica que la 3ª y 4ª generaciones requirieron períodos de tiempo más prolongados para su desarrollo. La 1ª y 2ª generaciones presentaron similitud con la 5ª. Los períodos más largos se observaron, en particular, en la preoviposición, tiempo de ecdísis de ninfas a adultos y tiempo máximo de alimentación de adultos (Tabla 4.1.8).

El tiempo requerido para completar el ciclo se incrementó de la 1ª a la 4ª generación (de 61,7 a 73,6 días) para descender a 67,5 y 54,8 días en la 5ª y 6ª generación, respectivamente (Gráf. 2.8).

Los períodos de ecdísis, tanto de larvas a ninfas como de ninfas a adultos fueron mas lentos en la 3ª generación, y los períodos de incubación y tiempos máximos de alimentación de larvas, ninfas y adultos se retrasaron en la 4ª generación.

Queremos indicar que los datos de la 6ª generación deben ser tratados con precaución dado el bajo número de muestras estudiadas.

IV.1.9. Influencia de la prealimentación en los períodos de alimentación

Independientemente de la generación a la que pertenecieran, el tiempo que las larvas requirieron para alimentarse se hizo más breve (2 días) cuando el período de prealimentación fue de 5 a 11 días. El tiempo máximo de alimentación (9 días) se obtuvo con lotes de larvas que se mantuvieron entre 8 y 13 días de ayuno, (Tabla 4.1.9.1).

Los tiempos máximos y mínimos de alimentación de ninfas (16 y 3 días) se obtuvieron tras un período de prealimentación de 10 y 8 días, respectivamente, (Tabla 4.1.9.2).

A los 7 días de alimentación se recogieron las primeras hembras grávidas de dos lotes, con períodos de prealimentación de 5 y 12 días. La

hembra grávida que necesitó 30 días para alimentarse había permanecido en ayuno 13 días desde que alcanzara el estadio adulto. (Tabla 4.1.9.3).

No fue posible establecer ninguna relación clara entre la prealimentación y el período de tiempo que los distintos estadios de desarrollo necesitaron para alimentarse.

IV.1.10. Influencia de las reinfestaciones en los períodos de alimentación

Por último, intentamos relacionar los períodos de alimentación (máximos y mínimos) de los distintos estadios de desarrollo de las garrapatas con el número de alimentaciones en cada hospedador (Tabla 4.1.10).

Como puede observarse en la Tabla 4.1.10, la posible resistencia que los conejos desarrollan frente a las garrapatas no parece influir en los períodos de alimentación de las larvas.

El tiempo mínimo requerido por un lote de ninfas para alimentarse (4,8 días) se obtuvo en la segunda infestación del mismo hospedador, en tanto que el período máximo (14 días) se observó después de 6 reinfestaciones.

El período de alimentación de las hembras se prolongó durante 8 días hasta la 8ª reinfestación del mismo conejo. El tiempo máximo de alimentación

para una hembra (28 días) lo observamos en un conejo que había sido reinfestado 14 veces.

IV.2. Morfología de los distintos estadios larvarios de *D. dracunculoides*

La longitud total de los ejemplares de cada estadio está incluida en los siguientes rangos:

- microfilarias hemáticas: 240-258 μm (Gráf. 3.1);
- microfilarias obtenidas de la disección de garrapatas: 200-219 μm (Gráf. 3.2);
- estadio I: 280-299 μm (Gráf. 3.3);
- estadio II: 600-799 μm (Gráf. 3.4);
- estadio III: 1900-2999 μm (Gráf. 3.5).

Una vez establecidos los rangos de cada estadio, se estudiaron las filarias incluidas dentro de estos rangos, considerando el resto como fases intermedias.

IV.2.1. Microfilarias hemáticas

Las microfilarias hemáticas, procesadas por la técnica de Knott modificado, presentaron una colonia celular tan intensamente teñida en su

interior que dificultaba la observación de otras estructuras (Fotog. 3), (Fig. 12).

La longitud total osciló entre 246 y 258,5 μm y la anchura entre 4 y 6 μm (Tabla 4.2.1.1).

El poro excretor se encontraba a una distancia de 71-100 μm (33,7%) del extremo cefálico.

El cuerpo interno de contorno irregular y refringente de 17,5-25 μm estaba situado a unos 155 μm (56,83 %) del extremo anterior.

En el extremo posterior, muy estrecho y puntiagudo, la longitud media de la cola fue de 45 a 55 μm .

Dichas microfilarias, cuando se procesaron por el método de las fosfatasas ácidas, experimentaban un pequeño acortamiento, de 22,5-247,5 μm de longitud, (Tabla 4.2.1.2). En el extremo anterior se observó una ligera actividad enzimática, mientras que el poro excretor, el cuerpo interno y el poro anal se tiñeron muy intensamente.

IV.2.2. Estadios larvarios obtenidos de garrapatas

IV.2.2.1. Microfilarias

Estas larvas se tiñeron muy poco y en la mayoría de las ocasiones observamos alterada su morfología.

La longitud total obtenida fue de 200-217,5 μm y la anchura de 3-7,5 μm (Tabla 4.2.1.1).

La única estructura interna diferenciable y no en todas las ocasiones fue el poro excretor, situado de forma muy variable a 50-91,6 μm del extremo anterior.

La técnica de las fosfatasa ácidas no aportó nuevos datos al estudio morfológico de las microfilarias ya que estas no presentaron ningún patrón homogéneo de actividad enzimática.

IV.2.2.2. Estadio I

El estadio I presentaba el aspecto de una microfilaria rígida, intensamente teñida y rodeada totalmente, salvo en la región cefálica, de una expansión cuticular plana, transparente y con finas estrías transversales

(Fotog. 5), (Fig 12). La longitud total de este estadio osciló entre 280-296 μm , (Tabla 4.2.2.1.).

El cuello, a 12 μm del extremo anterior, aparecía como un *estrechamiento del cuerpo*.

Por transparencia, la porción central de la larva se observaba repleta de núcleos e intensamente teñida, con un grosor máximo de 6,2-11,2 μm .

La cutícula aparecía engrosada a ambos lados del cuerpo, desde la región del cuello hasta el extremo posterior, confiriendo a la larva distinto aspecto y grosor si esta se observaba dorsoventral (8,7-16,2 μm) o lateralmente (7,5-15 μm). En el extremo posterior la cutícula sobrepasaba unos 32-55 μm la cola de la larva teñida.

El esbozo de esófago estaba rodeado por multitud de núcleos. En esta zona eran más abundantes las células subcuticulares que presentaban un aspecto triangular.

El poro excretor se abría a 85-115 μm del extremo anterior e inmediatamente debajo se podía observar el núcleo de la célula excéntrica.

El intestino, el recto y el tapón anal no presentaban una definición nítida, ocupando el interior de la filaria una colonia celular.

En la mayoría de los casos resultaba difícil observar el poro anal pero podemos apuntar, en líneas generales, que la longitud de la cola fue de unos 99 μm .

La célula germinal R_1 , aparecía a 97-106,2 μm del extremo final del cuerpo, mientras que el resto de las células germinales se encontraban alineadas posteriormente. Sólo en una ocasión pudimos observar las cuatro células resultantes de la división de la R_1 a 100 μm del extremo posterior.

La última célula de la cola se observó a 23,32 μm del final del cuerpo.

La técnica de las fosfatasas ácidas (Tabla 4.2.2.2), produjo un ligero acortamiento de las larvas también en este estadio (245-260 μm). El único punto con actividad enzimática manifiesta fue el poro excretor, localizado a 68,7-87,5 μm del extremo anterior.

IV.2.2.3. Estadio II

Las larvas de estadio II, alcanzaron una longitud de 600 a 782 μm y grosor máximo de 20 a 43,7 μm (Tabla 4.2.3.1; Fotog. 5).

Algunas de ellas presentaban el soporte peribucal como una protuberancia redondeada de 5 μm en el extremo anterior.

El poro excretor aparecía como una masa de aspecto glandular, de 17,5-30 μm , situada a 57,5-142 μm del extremo anterior (Fig.12).

En el esófago, ya se hacían evidentes dos regiones de límites poco definidos. El recto, ocupado en su totalidad por el tapón anal, tenía 22 μm de longitud y la porción distal se exteriorizaba a través del poro anal. La longitud de la cola oscilaba entre 35-60 μm .

En algunas ocasiones en el extremo final del cuerpo, podían visualizarse los esbozos de las expansiones cuticulares cubiertos aún por la vaina.

A pesar de que la actividad enzimática estuvo circunscrita al poro excretor y al recto, la técnica de las fosfatasas ácidas permitió, en este estadio, la observación de muchas estructuras: la estriación transversal de la cutícula se hacía más evidente, la boca estaba en contacto estrecho con la faringe (anillo muy quitinizado), la primera porción del esófago era un tubo muy estrecho de 95 μm de longitud rodeado, a veces, por dos grandes masas entrecruzadas a 36 μm del extremo anterior que dificultaban su observación.

El límite del esófago con el intestino se observaba a 276 μm de la abertura oral.

El poro excretor, a 96,25-126,2 μm del extremo anterior, (Tabla 4.2.3.2) estaba constituido por tres zonas concéntricas: la primera, externa, de 15-23,7 μm de diámetro con una ligera actividad enzimática, internamente

una zona mucho mas teñida que permitía observar un punto refringente en su centro.

El recto, con una longitud entre 25-50 μm , presentaba aspecto bilobulado. La longitud de la cola era de 40-93 μm . En algunos casos el labio superior del ano era prominente.

IV.2.2.4. Estadio III

Como ya hemos indicado anteriormente, las larvas de estadio III no presentaban vaina, eran muy móviles y en el extremo caudal poseían ya las dos expansiones cuticulares características de los adultos (Fotog. 6b), (Fig 12).

Los ejemplares estudiados presentaron una longitud comprendida entre los 1900-2270 μm y una anchura de 20 a 45 μm , (Tabla 4.2.4).

En la región anterior se distinguían dos coronas de papilas alrededor de la boca (Fotog. 6a). La faringe de 7,5 μm estaba muy esclerosada.

El esófago, de 960-1325 μm de longitud, aparecía claramente dividido en una porción muscular tubular y estrecha y otra una glandular. El límite entre ambas estaba a 127-250 μm del extremo anterior. La porción glandular del

esófago presentaba una terminación bilobulada en contacto ya con el intestino.

Las paredes intestinales, muy gruesas, apenas permitían apreciar una estrecha luz que desembocaba en el recto, el cual se abría al exterior por el poro anal a 40-93 μm del extremo posterior, (Fotog. 6b).

El poro excretor se situaba a 125-155 μm del extremo anterior y el anillo nervioso a 135-155 μm .

IV.3. Desarrollo de *D. dracunculoides* en *R. sanguineus*

IV.3.1. Larvas

En general las larvas saciadas, recogidas tras su alimentación en el perro donador, presentaban escasa movilidad y aspecto reseco.

Los resultados recogidos en la Tabla 4.3.1 demuestran que el porcentaje de mortalidad de larvas alimentadas al cabo de los 7-11 días de la recogida fue muy elevado, llegando a superar el 75% (76,1).

El 8,6%(78) de las larvas muertas disecadas presentaron microfilarias mientras que la disección de 85 larvas vivas fue negativa.

De las 199 larvas vivas restantes que se transformaron en ninfas en condiciones de laboratorio, se disecaron las que murieron entre los días 11-20, y no se hallaron microfilarias. Por otro lado se realizó la disección a 113 ninfas vivas en las que el porcentaje de parasitación llegó a ser del 4,4%.

Las 60 ninfas restantes se alimentaron sobre conejo, 20 días después de que fueran recogidas como larvas saciadas. Tras su alimentación y muda, todos los ejemplares adultos (18 hembras y 16 machos) se disecaron sin recuperar ninguna microfilaria.

IV.3.2. Ninfas

Las disecciones diarias de ninfas cultivadas en condiciones de laboratorio, alimentadas después sobre el perro donador y su evolución posterior a adultos, reflejan un gran desfase del desarrollo de las filarias.

A continuación comentaremos la aparición de los distintos estadios de desarrollo en los sucesivos días de estudio, (Tablas 4.3.2.1a y 4.3.2.1b):

- las microfilarias: se observaron desde el mismo día de recogida hasta el día 21 (p.r).
- el estadio I temprano: no se recuperó ninguna larva de este tipo.

- el estadio I: se encontró en dos hembras, 14 días después de la alimentación.
- el estadio II temprano: apareció por primera vez en algunas de las ninfas disecadas el día 7 (p.r), llegando incluso a encontrarse en un macho el día 40 (p.r).
- el estadio II: tampoco se observaron larvas de este estadio en ninguna disección.
- el estadio III temprano: desde el día 6 hasta las últimas disecciones, se recogieron del hemocele larvas que sobrepasaban los 800 μm de longitud.
- el estadio III: aparecieron siempre en adultos y en las proximidades de las glándulas salivares. Estas larvas estuvieron presentes desde el día 13 (p.r) hasta el final del estudio.

A menudo, en el mismo adulto encontramos una infestación con larvas de estadio III coincidiendo con algunas de estadio III_t. En este sentido destacan los siguientes ejemplares (recogidos aunque no individualmente en la tabla 3.2.1):

- día 23: hembra parasitada por 1 larva de estadio III_t y 14 larvas de estadio III.
- día 26: macho parasitado por 3 larvas de estadio III_t y 24 larvas de estadio III.
- día 28: macho con 9 larvas de estadio III_t y 12 de estadio III.
- día 30: hembra con 3 larvas de estadio III_t y 13 de estadio III.

A lo largo del período de estudio (Tabla 4.3.2.2.) se observaron un total de 2450 larvas: 2258 microfilarias, 3 larvas de estadio I, 10 larvas de estadio II temprano, 70 larvas de estadio III temprano y 109 larvas de estadio III.

Los porcentajes de parasitación oscilaron desde el 44,5% en las ninfas hasta el 20% en adultos. La máxima parasitación se observó en una sola ninfa, disecada el día 6 (p.r) en la que se contabilizaron hasta 472 microfilarias.

En resumen, el 32,5% de la todas las garrapatas estudiadas contenían larvas de **D. dracunculoides** (Tabla 4.3.2.2).

La Tabla 4.3.2.3 recoge los porcentajes diarios de parasitación de ninfas alimentadas, hembras y machos, demostrando que este porcentaje no depende tanto del estadio de las garrapatas como del momento de la disección.

La evolución diaria del porcentaje de parasitación (Gráf. 4.1) experimentó un descenso paulatino desde los primeros días hasta el final de la experiencia.

IV.3.3. Adultos

De los 198 adultos (91 hembras y 107 machos) parcialmente alimentados (tan sólo 24 horas) sobre el perro donador, el 24,2% presentaban una infestación por larvas de *D. dracunculoides*: un 27,5 % de las hembras y un 21,5 % de los machos (Tabla 4.3.3.1).

El número total de larvas observadas (107) se recoge en las Tablas 4.3.3.1; 4.3.3.2a y 4.3.3.2b):

- microfilarias: no se observaron en ninguna de las disecciones
- estadio It: se recogieron 36 larvas entre los días 1 y 28
- estadio I: un total de 53 larvas de este estadio aparecieron ya en las disecciones realizadas inmediatamente después de la recogida de las garrapatas y se mantuvieron presentes casi hasta el final de la experiencia (día 26)
- estadio II: ya el día 3 se encontraron larvas de este tipo, llegando a recuperarse un total de 10.
- estadio II: sólo se recogieron 5 larvas de este tipo, entre los días 15 y 27 de las disecciones
- estadio III: en tres ocasiones (días 11, 21 y 13) se recuperaron dichas larvas de la disección de dos hembras y un macho, respectivamente.
- estadio III: en todo el período de estudio no pudo observarse ninguna larva de este estadio.

Al igual que ocurrió en las disecciones realizadas a ninfas infestadas, observamos que en un mismo ejemplar aparecían distintos estadios de desarrollo. Podemos destacar la infestación de un macho con 11 larvas (3 de estadio It y 8 de estadio I).

Es importante resaltar que las grandes oscilaciones observadas en el porcentaje de parasitación diario se deben probablemente al bajo número de muestras estudiado, (Tabla 4.3.3.3 y Gráf. 4.2).

IV.4. Transmisión experimental de *D. dracunculoides* por *R. sanguineus*

*Para conseguir el fin último de nuestro estudio debíamos demostrar la capacidad de los adultos de *R. sanguineus* (infestados como ninfas) de transmitir las larvas infestantes de *D. dracunculoides* a los perros "trazadores".*

Una vez recogidos que los ejemplares alimentados en el donador mudaron a adultos la disección demostró que el 30% del lote C (2 hembras y 1 macho) estaban infestados por larvas de estadio III. En total se recuperaron 7 larvas de este tipo.

Sin embargo las disecciones de los adultos de los lotes restantes (A y B) tras su alimentación sobre los trazadores corroboraron la inexistencia de larvas de estadio III.

La microfilaremia se hizo patente en el "trazador" 2 a los 69 días de la infestación y en el "trazador" 1 a los 76 días (Gráf. 5).

La necropsia demostró la presencia de adultos de **D. dracunculoides** en la cavidad peritoneal "trazador 2". Se recogieron un total de 11 vermes adultos; 6 hembras y 5 machos.

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

V.1. Ciclo biológico de *R. sanguineus*

A pesar de que la media del período de preoviposición de las distintas generaciones puede encuadrarse en los rangos aportados por distintos autores; Nuttal (1915) de 3 a 6 días, Hadani et al. (1969) de 4 a 9 y Sweatman (1967) de 8 a 14; nuestros datos, inferior y superior (1 y 19 días, respectivamente), sobrepasan con mucho estos límites. Esta gran dispersión pudiera justificarse en las primeras generaciones debido al diverso origen de las hembras (6 líneas diferentes en la 2ª generación y 3 en la 3ª). A partir de la 4ª generación todos los ejemplares presentaban un origen común por lo que los altos valores de la desviación estándar pudieran ser debidos a una gran variabilidad individual.

Hadani et al. (1969) obtuvieron períodos de incubación más cortos, a 28°C, que los observados, a 30°C, por Nuttal (1915) y los resultados obtenidos en nuestro trabajo. Estos datos contradicen la teoría de Heath (1979) que considera que entre 18 y 38°C un incremento de la temperatura produce un acortamiento del período de incubación.

El tiempo mínimo necesario para la alimentación de larvas de todas las generaciones fue bastante homogéneo (2-3 días) y se ajusta perfectamente a los valores propuestos por otros autores, independientemente del hospedador utilizado (Nuttal, 1915; Hadani et al., 1969). Sólo en la 4ª y 5ª generaciones

el tiempo máximo de alimentación (9 días) sobrepasó en 24 horas lo apuntado dichos autores.

En nuestras condiciones de estudio, el tiempo requerido por las larvas saciadas para mudar a ninfas fue extremadamente variable, no pudiendo establecerse ninguna relación entre los distintos valores de las sucesivas generaciones. Para Heath (1981), el período de muda a ninfas es inversamente proporcional a la temperatura, mientras que, nuestros tiempos medios de ecdísis (4,7-12,2 días) no sólo fueron mayores a los obtenidos por Nuttal (1915)(3-7 días) a la misma temperatura (30°C) sino que igualaron y en algunos casos (3ª generación) sobrepasaron los aportados por Hadani *et al.*, (1969) a 28°C (6-11 días).

El tratamiento estadístico de los resultados puso de manifiesto una variación estándar muy elevada lo que corrobora la gran variabilidad individual, especialmente en la 3ª generación.

El tiempo mínimo de alimentación de las ninfas (4-7 días) fue uno de los períodos más estables a lo largo de las distintas generaciones, el tiempo máximo de alimentación osciló entre los 10 y 16 días, siendo ambos datos superiores a los 3 y 9-7 días aportados por otros autores (Nuttal, 1915 y Hadani *et al.*, 1969).

El tiempo medio de muda de ninfas a adultos, fue mínimo en la 6ª generación (11,7 días), concordando con los 11-12 días aportados por Nuttal (1915). La 3ª generación presentó el tiempo medio más largo (15,2 días), si bien estaba incluido dentro de los rangos normales, de 14-18 días, propuestos por Hadani et al. (1969), con algunas inflexiones, el período de ecdísis ninf-adulto presentó una tendencia al acortamiento en las sucesivas generaciones (de 14,2 a 10 días).

Los tiempos mínimos de alimentación de hembras se mantuvieron dentro de los valores obtenidos por los autores anteriores (7-21 días). Las elevadas desviaciones estándar siguen indicando la gran variabilidad individual que parece existir. La media del período de alimentación mínimo de las hembras ascendió de la 1ª a la 4ª generación, alcanzando valores mínimos en la 6ª generación (8 días). No obstante este dato debe ser tratado con precaución ya que es el resultado de la observación de una única hembra.

Neitz et al., (1972) citan a *R. theileri* como la especie de este género de mayor período de alimentación de adultos (26 días). Sin embargo nosotros observamos, que si bien no es la norma, algunas hembras de *R. sanguineus* pueden mantenerse sobre el hospedador períodos de tiempo iguales e incluso mayores a los 26 días (tal es el caso de una hembra de la 4ª generación que necesitó un mes para alimentarse).

El número de hembras que se alimentaban a la vez tampoco influía sobre el tiempo de permanencia en el hospedador.

Según nuestros resultados el período de prealimentación no tiene ninguna influencia sobre el tiempo de alimentación.

El tiempo requerido para completar el ciclo biológico (sin tener en cuenta la prealimentación) se mantuvo siempre dentro de los rangos establecidos por Nuttal (1915) y Hadani et al., (1969).

La principal característica observada fue la marcada variabilidad individual. A pesar de que nuestras medias, en general, se aproximaron bastante a los datos de otros autores, nuestros límites los superaban ampliamente.

A la vista de nuestros resultados parece que existe un período de "aclimatación", siempre dentro de los límites normales, a las condiciones del laboratorio, que prolonga algunos períodos del ciclo biológico desde la 1ª hasta a la 4ª generación, para volver paulatinamente a los valores iniciales en generaciones sucesivas.

Los períodos mas estables a lo largo de todo el estudio fueron los períodos de alimentación de larvas y ninfas.

Por lo tanto, podemos afirmar que el mantenimiento de *R. sanguineus* en condiciones de laboratorio (a 30°C y con una HR del 90 %) durante 6 generaciones no produce variaciones indicativas en la duración de los distintos períodos de desarrollo estudiados. Factores, como el período de prealimentación, el número de hembras alimentadas o la alimentación repetida sobre un mismo hospedador, tampoco parecen influir decisivamente. Otros parámetros, como el porcentaje de alimentación, peso de los ejemplares alimentados o número y viabilidad de la puesta y en definitiva a la capacidad para culminar el ciclo biológico, sí pudieran verse afectados por los parámetros estudiados.

V.2. Morfología de los distintos estadios de *D. dracunculoides*

V.2.1. Microfilarias hemáticas

Las longitudes totales que nosotros observamos (240-259 μm) son notablemente superiores a las indicadas por Raillet et al (1912), Fraga de Azevedo (1942) y Rioche (1960); pero muy semejantes a las de Marconcini y Macchioni (1980), Ortega-Mora et al. (1989) y Valcárcel et al. (1990). Esto es debido, probablemente, a que mientras los primeros realizaron las medidas de las filarias en extensiones de sangre tras fijarlas y teñirlas, nosotros, al igual que el resto de los autores, las procesamos por la técnica de Knott modificada.

Una excepción a lo expuesto la constituyen los resultados aportados por Leger (1911), el cual tras la fijación y tinción con Giemsa obtuvo microfilarias con medidas superiores al resto de los autores.

Por otro lado, la actividad de las fosfatasas ácidas nos permite corroborar las características observadas mediante la técnica de Knott, con la tinción del poro excretor, el cuerpo interno y el poro anal, como describe Ortega-Mora et al., 1989. Con esta técnica, las microfilarias experimentan un acortamiento semejante al encontrado por otros autores tras la tinción de las larvas por métodos convencionales (salvo los datos de Leger, 1911).

Las estructuras estudiadas, una vez subsanado el error que conllevan las variaciones de tamaño, mediante la obtención de porcentajes, presentan localizaciones semejantes a las señaladas por Fraga Acevedo (1942), Rioche (1960) y Ortega-Mora, et al., (1989). La ligera variación entre nuestros datos y los del resto de los autores es, sin duda, la utilización de distinto punto de referencia al determinar la distancia desde el cuerpo interno hasta el extremo anterior de la larva.

La técnica de Knott que, por la acción de la formalina, mantiene completamente rectilíneas a las filarias, parece el método más sencillo y fiable para la determinación de su morfología. Las extensiones de sangre fijan las microfilarias en movimiento entre los glóbulos rojos, dificultando su medición.

La técnica de las fosfatasa s ácidas no parece aportar nuevos datos de las microfilarias hemáticas, si bien, permite confirmar la localización y morfología de estructuras ya observadas.

V.2.2. Estadios larvarios obtenidos de la disección de garrapatas

V.2.2.1. Microfilarias

La longitud (200-219 μm) de estas microfilarias experimenta un claro acortamiento al compararlas con las microfilarias obtenidas de la sangre del hospedador definitivo.

El hecho de que muchas de ellas aparezcan con la cutícula alterada o plegada, que la colonia celular interna no se tiña y que la única estructura observable sea el poro excretor, nos hace suponer que se trata de formas en degeneración. Comprobamos este hecho, confirmando que dichas larvas no presentaron ningún patrón fijo de actividad enzimática.

V.2.2.2. Estadio I

Con respecto al de la microfilaria, el estadio I experimenta un ligero incremento de longitud y un considerable aumento de grosor. La principal

característica diferencial entre la microfilaria y el estadio I es que este último, quiescente, presenta una expansión lateral a lo largo de toda su longitud excepto en la cabeza.

Al igual que en el estadio anterior, la colonia celular interna enmascara el resto de las estructuras y sólo es posible observar el poro excretor que conserva una distancia respecto del extremo anterior del cuerpo (115 μm) semejante a la de la microfilaria. Este poro excretor es el único con actividad a las fosfatasas ácidas.

V.2.2.3. Estadio II

Este estadio sigue los patrones descritos por Bain (1972) para **D. vitae**, experimentando un gran aumento de tamaño con respecto del estadio anterior. Hay que señalar que las medidas que aportó el autor para el estadio II de **D. vitae** (longitud de 700 μm , anchura de 25 μm , distancia del poro excretor al extremo cefálico de 110 μm) se encuentran comprendidas dentro de los límites que nosotros obtuvimos trabajando con **D. dracunculoides** (longitud 600-782 μm , anchura máxima del cuerpo de 20-44 μm y distancia del poro excretor al extremo cefálico de 57,5-142 μm). Este hecho dificulta la diferenciación entre ambas especies en esta fase de desarrollo.

El esófago, ya formado, comienza a estructurarse en dos porciones, una muscular (anterior) y una glandular (posterior) y se delimita con el intestino que desemboca en el recto (ocupado por el tapón anal).

La técnica de las fosfatasas ácidas es, en este caso, decisiva para establecer la morfología de órganos como el poro excretor, el esófago muscular y el recto.

V.2.2.4. Estadio III

En nuestros estudios hemos observado que la longitud media de estas larvas (2076 μm) es inferior a las establecidas por Nelson (1963) y Bain (1972) para el mismo estadio y especie. No obstante, hay que tener en cuenta, que algunos de nuestros ejemplares sobrepasaron los 2600 μm , valores superiores a los observados por el resto de los autores.

Por otro lado, la anchura máxima del cuerpo de la larva III (20-45 μm) coincide con los obtenidos por Bain, 1972. Dentro de nuestros rangos de longitud de faringe (7 μm) y esófago (960-1325 μm) están también incluidos los aportados por dicho autor. Sin embargo, encontramos el poro excretor más próximo al extremo anterior del cuerpo (125-155 μm) y el anillo nervioso más alejado (135-155 μm).

La longitud de la cola de nuestros ejemplares es también más corta que la descrita por otros autores.

V.3. Desarrollo de D. dracunculoides

V.3.1. En *R. sanguineus*

V.3.1.1. Larvas

A la vista de la elevada mortalidad y del mal aspecto que presentaban las larvas recogidas tras su alimentación sobre el perro donador, supusimos que las larvas que habían ingerido microfilarias con la sangre, no sobrevivían a los primeros días post-alimentación. Esta teoría fue demostrada con las disecciones realizadas entre los días 7 y 11 después de su recogida, ya que sólo se obtuvieron microfilarias de las larvas muertas.

En cambio, las disecciones realizadas al mismo lote de larvas tras la muda a ninfas, demostraron que la infestación no era tan letal como habíamos supuesto en un principio y que el 4% de éstas ninfas estaban infestadas con microfilarias. El hecho de que el día 20 post-alimentación, las microfilarias no hubieran evolucionado podía indicar dos cosas: que eran formas en degeneración o bien que las filarias necesitaban que las ninfas se alimentaran para continuar su desarrollo.

El no encontrar filarias en los adultos, que se infestaron en estadio de larvas, nos impidió confirmar este punto. Sin embargo consideramos, que si bien no podemos descartar que las larvas de *R. sanguineus* actúen como vectores de *D. dracunculoides*, sí podemos asegurar, a la vista de nuestros resultados, que su importancia epizootiológica como transmisores de esta filaria, es prácticamente nula, al contrario de lo observado por otros investigadores (Petit et al., 1988; Spratt y Haycock, 1988) trabajando con infestaciones de larvas de *R. sanguineus* con distintas especies de *Cercophitifilaria*.

V.3.1.2. Ninfas

Dado que sólo el 5% de las microfilarias ingeridas evolucionaron a larvas de estadio III, es de suponer que la mayor parte de las que aparecieron entre los días 0 y 21 (p.r), fueran formas en degeneración, como ya señalábamos en el apartado que dedicamos al estudio de su morfología.

Además, la escasez de estadios intermedios (I y II) observados a lo largo de la fase experimental parece indicar que con nuestra técnica de disección el acceso a su localización intracelular resulta imposible.

El distinto grado de desarrollo de las filarias, según el día de ingestión de las mismas, se puso de manifiesto cuando observamos larvas de estadio III_{lt} el día 6 (p.r).

En un principio, las larvas de estadio III_{lt} aparecían aisladamente, mientras que al final de la experiencia podíamos recuperar varias en un mismo individuo.

Sólo se encontraron larvas de estadio III en adultos que habían adquirido la infestación como ninfas. Este hecho nos hizo suponer que, probablemente, el momento clave en el desarrollo de la filaria fuera el paso de estadio III_{lt} a estadio III y que dependía de la ecdísis ninfa-adulto.

En cuanto al sexo de las garrapatas infestadas, en los porcentajes de parasitación estudiados para adultos de *R. sanguineus* infestados durante su alimentación como ninfas, no hubo diferencia entre los machos y las hembras. Las variaciones observadas son posiblemente debidas, tanto al bajo número de muestras de cada sexo analizadas diariamente como al día en que se realizaba la disección.

V.3.1.3. Adultos

Las disecciones de adultos de *R. sanguineus* que habían permanecido sólo 24 horas sobre el perro donador pretendían en primer lugar minimizar el solapamiento del desarrollo de las filarias en el vector y en segundo lugar, comprobar si era o no imprescindible la ecdísis a adulto para permitir que las larvas de *D. dracunculoides* se desarrollaran a larvas de estadio III infestantes.

Así pudimos comprobar que la larva de estadio I aparece al cabo de las 24 horas de iniciada la alimentación de la garrapata. El hecho de que este estadio se mantuvieron casi hasta el final de la experiencia indica que, algunas larvas nunca evolucionan o bien, que su desarrollo se hace de forma escalonada.

Las primeras larvas de estadio II debían aparecer antes del día 10, ya que la primera larva de estadio III se observó el día 11, aunque este punto no pudo ser demostrado.

El porcentaje de parasitación fue algo superior en las hembras (27,5 %) que en los machos (21,5 %), lo que nos hace suponer que estas son ligeramente más susceptibles a la infestación.

V.3.2. Evolución

V.3.2.1. Microfilarias

A la vista de nuestros resultados, se demuestra la predisposición individual de **R. sanguineus** como vector de esta filariosis a la que ya hizo referencia Kartman en 1953.

Se observaron microfilarias de **D. dracunculoides** en larvas y ninfas de **R. sanguineus** pero nunca en los adultos alimentados durante 24 horas. Sin embargo, disecciones realizadas en experiencias previas demostraron que adultos alimentados hasta la saciedad presentaban también microfilarias en su interior. Pero como ya hemos indicado, el estudio morfológico de las microfilarias obtenidas de las disecciones de garrapatas demostró que estas eran en su mayoría formas degeneradas. Por ello consideramos que la infestación de **R. sanguineus** por **D. dracunculoides** tiene un carácter autolimitante semejante al descrito por Chavaud et al. (1986) para **Onchocerca volvulus**: cuando el número de microfilarias ingeridas era bajo (adultos alimentados durante 24 h) todas ellas se desarrollaban; mientras que cuando la infestación era mayor en ninfas saciadas muchas de las larvas morían.

Las larvas de **R. sanguineus** no permiten el desarrollo de las microfilarias, las cuales degeneran en todos los casos, aún cuando lleguen a mudar a ninfas.

V.3.2.2 Estadio I

Pudimos recuperar larvas de estadio I ya en las primeras disecciones. Este hecho nos hace suponer que el desarrollo se inicia tras la ingestión de la microfilaria por la garrapata y que no requiere que ésta haya finalizado su alimentación; como indican Spratt y Haycock (1988) en **Cercophitifilaria johonstoni** para distintas especies del género **Ixodes**.

V.3.2.3. Estadio II

Con los datos obtenidos no podemos establecer el momento exacto de su aparición, aunque es de suponer que lo haga hacia el día 10. Si bien la primera larva de este estadio se recuperó el día 15 (p.r).

V.3.2.4. Estadio III

Las primeras larvas infestantes se recuperaron, en las proximidades de las glándulas salivares, tras la disección de las ninfas a los 14 días de la recogida y una vez que habían mudado a adultos.

A la vista de nuestros resultados se deduce que el paso de larva de estadio III₁ a estadio III es clave en el desarrollo de esta filaria, necesitando el estímulo de la ecdísis ninfa-adulto.

V.3.3. Localización en el artrópodo

Las microfilarias se ingieren con la sangre y una vez que están en el intestino medio, inician su desarrollo. La localización intracelular de las larvas no ha podido ser establecida con los medios a nuestro alcance, sin embargo, teniendo en cuenta trabajos de otros autores (Petit et al., 1988 y Spratt y Haycock, 1988) y el hecho de que necesiten de la muda del vector para finalizar su evolución, nos hace suponer que pudieran localizarse a nivel subepidérmico o muscular.

Las larvas de estadio III temprano son fácilmente visibles en la cavidad del cuerpo del artrópodo y las formas infestantes se encuentran en las proximidades de las glándulas salivares.

V.4. Papel vectorial de *R. sanguineus* en la transmisión de *D. dracunculoides*

Nuestros resultados confirman, experimentalmente, la hipótesis de Bain (1972) que propone a *R. sanguineus* como vector de *D. dracunculoides*.

El período de prepatencia que hemos observado para esta filariosis es similar al de la infestación por *Dipetalonema reconditum*; es decir, entre 2 y 3 meses (Farnell et al, 1978 y Lindemann et al, 1984).

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1ª. La duración de los diferentes períodos del ciclo biológico de *R. sanguineus* (previviposición, incubación, alimentación de larvas, ninfas y adultos; y ecdísis de larvas a ninfas y de ninfas a adultos) no se modifican al mantener esta especie durante 6 generaciones en condiciones de laboratorio.

2ª. Las microfilarias de *D. dracunculoides* pueden iniciar su desarrollo tanto en ninfas como en adultos de *R. sanguineus*.

3ª. Las larvas de estadio I de *D. dracunculoides* miden entre 280 y 299 μm de longitud y de 8,7 a 16 μm de anchura. Son envainadas, con una expansión cuticular que las rodea completamente, excepto en la cabeza. Sus órganos internos no están definidos.

Las primeras larvas de estadio I se encuentran en el intestino de las garrapatas a las 24 horas de iniciada su alimentación de estas.

4ª. Las larvas de estadio II de *D. dracunculoides* son envainadas, con una longitud de 600 a 782 μm y una anchura que oscila entre los 20 y los 44 μm . El aparato digestivo está completamente desarrollado: esófago, intestino y recto con el tapón anal.

5ª. Las primeras larvas infestantes aparecen en el hemocele a partir del día decimotercero después de transcurrido el periodo de alimentación y tras la ecdísis ninfa-adulto del vector. Este paso resulta indispensable para el desarrollo de las larvas de **D. dracunculoides** hasta alcanzar el estadio III.

6ª. Se ha confirmado experimentalmente la transmisión transestádica (ninja-adulto) de **R. sanguineus**, de perros infestados por **D. dracunculoides** a perros sanos.

7ª Aunque se necesitan estudios de mayor duración puede decirse que el período de prepatencia de la infestación de **D. dracunculoides** en el perro es de 69-76 días.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- ALUJA DE, A.S. (1985). *Necropsias en animales domésticos*. 1ª Ed. Compañía Editorial Continental, A.S. México.
- ACEVEDO, R.A.; THEIS, J.H.; KRAUS, J.F. & LONGHURST, W.M. (1981). Combination of filtration and histochemical stain for detection and differentiation of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum* in the dog. *Am. J. Vet. Res.* **42**: 537-540.
- ANDERSON, R.C. & BAIN, O. (1976). Keys to genera of the order *Spirurida*. Part 3. *Diplostriaenoidea*, *Aproctoidea* and *Filarioidea*. In Cl.H. *Keys to the Nematode Parasites of Vertebrates n° 3*. Commonwealth Agric. Bur. Farmhan Royal.
- BAILEY, K.P. (1960). Notes on the rearing of *Rhipicephalus appendiculatus* and their infection with *Theileria parva* for experimental transmission. *Bull. Epizoot. Dis. Afr.*, **8**: 33-43.
- BAIN, O. (1972) Recherches sur la morphogénèse des filaires chez l'hôte intermédiaire. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **47(2)**: 251-303.
- BAIN, O.; PETIT, G. & CHABAUD, A.G. (1986) Une nouvelle filaire, *Cercopithifilaria roussilhoni* n. sp., parasite de l'Athérure au Gabon, transmise par tiques; hypothèse sur l'évolution du genre. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **61 (1)**: 81-93.
- BAIN, O.; BAKER, M. & CHABAUD, A.G. (1982). Nouvelles données sur la lignée *Dipetalonema* (*Filarioidea*, *Nematoda*). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **57 (6)**: 593-620.
- BAIN, O.; AESCHLIMANN, A. & CHATELANAT, P. (1982). Présence chez des tiques de la région de Genève, de larves infestantes qui pourraient se rapporter à la filaire de chien *Dipetalonema grassii*. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **57 (6)**: 643-646.
- BAIN, O.; PETIT, G. & GUEYE, A. (1985). Transmission expérimentale de *Monanema nilotica* (El Bihari et coll., 1977). *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **60 (1)**: 83-89.
- BALASHOV, I.U.S. (1989). The coevolution of ixodid ticks and terrestrial vertebrates. *Parazitologija*, **23 (6)**: 457-68.
- BARRIGA, O. (1982). *Dirofilariasis*. In *Handbook series in Zoonoses. Section C: Parasitic Zoonoses*. M.G., Steele Editor. Vol II: 93-109.
- BARTHOLD, E. & WENK, P. (1986). Quantitative relations in the extrinsic development of *Dipetalonema vitae* (*Nematoda*, *Filarioidea*) in the vector

- tick *Ornithodoros moubata*. *Zeitschrift für Angewandte Zoologie*, **73**: 49-62.
- BURGDORFER, W.; ADKINS, T.R. JR. & PRIESTER, LE. (1975). Rocky Mountain spotted fever (tick-borne typhus) in South Carolina an educational program and tick/rickettsial survey in 1973 and 1974. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **24** (5): 866-72.
- CARPENTER, T.L.; McMEANS, M.C. & McHUGH CP. (1990). Additional instances of human parasitism by the brown dog tick (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.*, **27** (6): 1065-1066.
- COBBOLD, T.S. (1870). Description of a new Generic Type of Entozoon from the Aard Wolf (*Proteles*); with remarks on its affinities, specially in reference to the question of Parthenogenesis. *Proc. Zool. Soc. London*, **2**: 9-14.
- COONS, L.B.; ROSELL-DAVIS, R. & TARNOWSKI, B.I. (1986). Bloodmeal digestion in ticks. In *Morphology, Physiology and behavioral biology of ticks*. J.R., Sauer & J.A., Hair Editors. 1^o Ed. West. Sussex: 248-271.
- CORDERO DEL CAMPILLO, M. et al. (1980). *Índice-catálogo de Zooparásitos Ibéricos*. Serv. Púb. M^o Sanidad y Seg. Soc., Madrid. 579 pp.
- COURTNEY, C.H. (1989). Transmission and life cycle of Heartworm. *Proceedings of the California Heartworm Symposium. California Veterinarian* **3**: 9-11.
- CUPP, E.W. (1991). Biology of ticks. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Practice*, **21** (1): 1-26.
- CHABAUD, A.G. ; BAIN, O. (1976). La lignée *Dipetalonema*. Nouvel essai de classification. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **51** (3): 365-397.
- CHABAUD, A.; BAIN, O.; LANDAU, I & PETIT, G. (1986). La transmission des parasites par vecteur hématophages: richesse des phénomènes adaptatifs. *La vie des Sciences, Comptes Rendus, Série Générale*, **3** (5): 469-484.
- CHALIFOUX, L. & HUNT, R.D. (1971) Histochemical differentiation of *Dirofilaria immitis* and *Dipetalonema reconditum*. *J.A.V.M.A.* **158** (5): 601-605.
- CHEN, C.C. & LAURENCE, B.R. (1985) The encapsulation of the sheaths of microfilariae of *Brugia pahangi* in the haemocoel of mosquitoes. *J. Parasitol.*, **71** (6): 834-836.

- DAVADANT, A., (1988), Contribution a l'étude de l'infestation parasitaire du chien par *Dipetalonema dracunculoides*. Th. Doc. Vét., Toulouse. 149 pp.
- DIPEOLU, O.O. & AKINBOADE, O.A. (1982). Scavenging dogs and the spread of tick infestation in Nigeria. *Int. J. Zoon.*, **9**: 90-96.
- DRUMMOND, R.O. (1987). Economic aspect of ectoparasites of cattle in North America. *Proceeding of the MSD AGVET symposium*: 9-24.
- EBERHARD, M.L.; LOWRIE, R.C. & ORIHIL, T.C. (1979). Development of *Dipetalonema gracile* and *Dipetalonema caudispina* to the infective stage in *Culicoides hollensis*. *J. Parasitol.*, **65** (1): 89-95.
- EICHNER, M.; RENZ, A.; WAHL, G. & ENYONG, P. (1991). Development of *Onchocerca volvulus* microfilariae injected into *Simulium* species from Cameroon. *Med. Vet. Entomol.*, **5**: 293-297.
- FARNELL, D.R. & FAULKNER, D.R., (1978). Prepatent period of *Dipetalonema reconditum* in experimentally infected dogs. *J. Parasitol.*, **64** (3): 565-567.
- FORTIN, J.F. & SOLOCOMBE, J.O.D. (1981). Temperature requirements for development of *Dirofilaria immitis* in *Aedes triseriatus* and *Aedes vexans*. *Mosquito News*, **41**: 625-633.
- FRAGA DE AZEVEDO, J., (1943). On the presence for *Dipetalonema dracunculoides* (Cobbold 1870) among dogs in Portugal. Contribution to the Study of its morphology. *Ann. Inst. Med. Trop.*, **1** (1): 105-118.
- GIL COLLADO, J. (1938). Los ácaros (Ixodoideos) de España. *Broteria*, **7** (34): 99-109.
- GIL COLLADO, J. (1948). Acaros Ixodoideos de España. *Rev. San. Hig. Publ.*, **12**: 389-440.
- GIL COLLADO, J.; GUILLEN LLERA, J.L. & ZAPATERO RAMOS, L.M. (1979). Claves para la identificación de los ixodoidea españoles (adultos). *Rev. Iber. Parasitol.*, **39**: 107-118.
- GILOT, B. & PAUTOU, G. (1982). Evolution of populations of ticks (Ixodidae and Argasidae) in relation to artificialization of the environment in the French Alps. Epidemiologic effects. *Acta Trop. (Basel)*. **39** (4): 337-54.
- GODDARD, J. (1989). Focus of human parasitism by the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.*, **26** (6): 628-9.

- GONZALEZ, J.P.; CAMICAS, J.L.; CORNET, O.; FAYE, O. & WILSON, M.L. (1992). Sexual and transovarian transmission of Crimean-Congo haemorrhagic fever virus in *Hyalomma truncatum* ticks. *Res. Virol.*, **143**: 23-28.
- GOTHE, R. & HAMEL, H.D. (1973). Zur Ökologie eines deutschen Stammes von *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). *Z. Parasitenkd.*, **41**: 157-172.
- GROVES, M.G.; DENNIS, G.L.; AMYX, H.L. & HUXSOLL, D.L. (1975). Transmission of *Ehrlichia canis* to dogs by ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). *Am. J. Vet. Res.*, **36** (7): 937-940.
- HADANI, A.; CWILICH, R.; RECHAV, Y. & DINUR, Y. (1969). Some methods for the breeding of ticks in the laboratory. *Refu. Vet.*, **26**: 87-100.
- HAM, P.J. (1986) Acquired resistance to *Onchocerca linealis* infections in *Simulium ornatum* Meigen and *Simulium lineatum* Meigen following passive transfer of haemolymph from previously infected simuliids (Diptera, Simuliidae). *Parasitol.*, **92**: 269-277.
- HAM, P.J.; PHIRI, J.S. & NOLAN, G.P. (1991). Effect of N-acetyl-D-glucosamine on the migration of *Brugia pahangi* microfilariae into the haemocoel of *Aedes aegypti*. *Med. Vet. Entomol.*, **5**: 485-493.
- HEATH, A.C.G. (1979). The temperature and humidity preferences of *Haemaphysalis longicornis*, *Ixodes holocyclus* and *Rhipicephalus sanguineus* (Ixodidae): studies on eggs. *Int. J. Parasitol.*, **9**: 33-39.
- HEATH, A.C.G. (1981). The temperature and humidity preferences of *Haemaphysalis longicornis*, *Ixodes holocyclus* and *Rhipicephalus sanguineus* (Ixodidae): studies on engorged larvae. *Int. J. Parasitol.*, **11** (2): 169-175.
- HENDRIX, C.M.; BEMRICK, W.J. & SCHLOTTHAUER, J.C. (1980). Natural transmission of *Dirofilaria immitis* by *Aedes vexans*. *Am. J. Vet. Res.*, **41** (8): 1253-1255.
- HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ, S.; MARTÍNEZ CRUZ, M.S. & MORENO MARTÍNEZ, A. (1988). Parasitación por garrapatas. *Bovis* **24**: 31-51.
- HESS, W.R. (1988). African horse sickness. In *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*. 1^a ed. T. P. Monath Editor. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida: 1-18.
- HOOGSTRAAL, H. (1956). African Ixodoidea. I. Ticks of the Sudan (with special reference to Equatoria Province and with preliminary reviews of

the genera *Boophilus*, *Margaropus* and *Hyalomma*. U.S. Navy, Washington, D.C. 1101 pp.

- HOOGSTRAAL, H. (1978). Biology of ticks. In *Tickborne diseases and their vectors*. S.K.H., Wilde Editor. University of Edimburgh, Centre for Tropical Veterinary Med. Edimburgh: 3-14.
- HOOGSTRAAL, H. (1985). Ticks. In *Parasites, pest and predators*. S.M., Gaafar; W.E., Howard & R.E., Marsh Editors. Elsevier. Oxford & New York. 575 pp.
- HUELI, L.E. (1979). Estudios del ciclo biologico de *Hyalomma marginatum marginatum* Koch, 1844 (Acarina: Ixodidae) bajo condiciones estandar de laboratorio. *Rev. Ibér. Parasitol.*, **39**: 143-152.
- IBRAHIM, M.S. & TRIPS, M. (1987). The effect of *Brugia pahangi* infection on survival of susceptible and refractory of the *Aedes scutellaris* complex. *Med. Vet. Entomol.*, **1**: 329-337.
- IRUNGU, L.W. (1987). Studies on the in vitro exsheathment of *Brugia pahangi* microfilariae incubated with mosquito tissues and cells. *Insect Sci. Appl.*, **8** (1): 49-51.
- IVÁN LONDOÑO, M. (1976a). Behavior fo *Dipetalonema vitae* (Filarioidea) during escape from the vector tick, *Ornithodoros tartakowskyi* (Argasidae). *J. Parasitol.*, **62** (4): 596-603.
- IVÁN LONDOÑO, M. (1976b). Transmission of microfilariae and infective larvae of *Dipetalonema vitae* (Filarioidea) among vector ticks, *Ornithodoros tartakowskyi* (Argasidae), and loss of microfilariae in coxal fluid. *J. Parasitol.*, **62** (5): 786-788.
- KARTMAN, L. (1953). Factors influencing infection of the mosquito with *Dirofilaria immitis* (Leidy, 1856). *J. Parasitol.*, **39**: 27-78.
- KAUFMAN, W.R. (1989). Tick-host interaction: A synthesis of current concepts. *Parasitol. Today*, **5**(2): 46-56.
- KOBAYASHI, M.; OGURA, N. & YAMAMOTO, H. (1986). Studies on filariasis VIII: Histological observation on the abortive development of *Brugia malayi* larvae in the thoracic muscles of the mosquitoes, *Armigeres subalbatus*. *Jap. J. of Sanitary Zoology*, **37** (2): 127-132.
- KOBAYASHI, M; OGURA, N.; TSURUOKA, H.; CHIGUSA, Y. & MISHIMA, S. (1986). Studies of filariasis. VII: Histological observation on the encapsulated *Brugia malayi* larvae in the abdominal haemocoel of the

- mosquitoes, *Armigeres subalbatus*. *Jap. J. of Sanitary Zoology*, **37** (1): 59-65.
- LEGER, A. (1911). Filaire à embryons sanguinicoles de l'*Hyaena crouta* Exherbron. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, **9**: 629-631.
- LIGHTNER, L.K. & REARDON, M.J., (1983). *Dipetalonema dracunculoides* in dogs and spotted hyena (*Crouta crouta*) in the Turkana district of Kenya. *Proc. Helminthol. Soc. Wash.*, **50** (2): 333-335.
- LINDEMANN, B.A. & McCALL, J.W. (1984). Experimental *Dipetalonema reconditum* infections in dogs. *J. Parasitol.*, **70** (1): 167-168.
- LINDSAY, S.W. (1986). The migration of infective larvae of *Brugia pahangi* within the mosquito *Aedes aegypti*. *Parasitol.*, **92**: 369-379.
- LOWRIE, R.C.; EBERHARD, M.L. & ORIHEL, T.C. (1978). Development of *Tetrapetalonema marmosetae* to the infective stage in *Culicoides hollensis* and *C. furens*. *J. Parasitol.*, **64** (6): 1003-1007.
- MARCONCINI, A. & MACCHIONI, G. (1980). *Acanthocheilonema* (*Dipetalonema*) *dracunculoides* (Cobbold, 1870) nelle volpe (*Vulpes vulpes*) in Toscana. *Atti Sisvet*, **34**: 308.
- McKENZIE, K.K. (1984). A study of the transmission of canine leishmaniasis by the tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille), and an ultrastructural comparison of the promastigotes. Th. Doc. Ph. Oklahoma. 146 pp.
- MOLYNEUX, D.H. & JEFFERIES, D. (1986). Feeding behaviour of pathogen-infected vectors. *Parasitol.* **92**: 721-730.
- MOREL, P.C. & VASSILIADES, G. (1962). Les *Rhipicephalus* du groupe *sanguineus*: espèces africaines (Acariens: Ixodoidea). *Rev. Elev. Med. Vet. pays trop.* **15** (4): 343-385.
- MULLER, R. (1987). A *Dipetalonema* by any other name. *Parasitology Today*, **3** (12): 358-359.
- NAYAR, J.K.; KNIGHT, J.W. & BRADLEY, T.J. (1988). Further characterization of refractoriness in *Aedes aegypti* (L.) to infection by *Dirofilaria immitis* (Leidy). *Exp. Parasitol.*, **66**: 124-131.
- NEITZ, W.O.; BOUGHTON, F. & WALTERS HS. (1972). Laboratory investigations on the life-cycle of *Rhipicephalus theileri* (Bedford & Hewitt, 1925) (Ixodoidea: Ixodidae). *Onders. J. Vet. Res.*, **39** (2): 117-23.

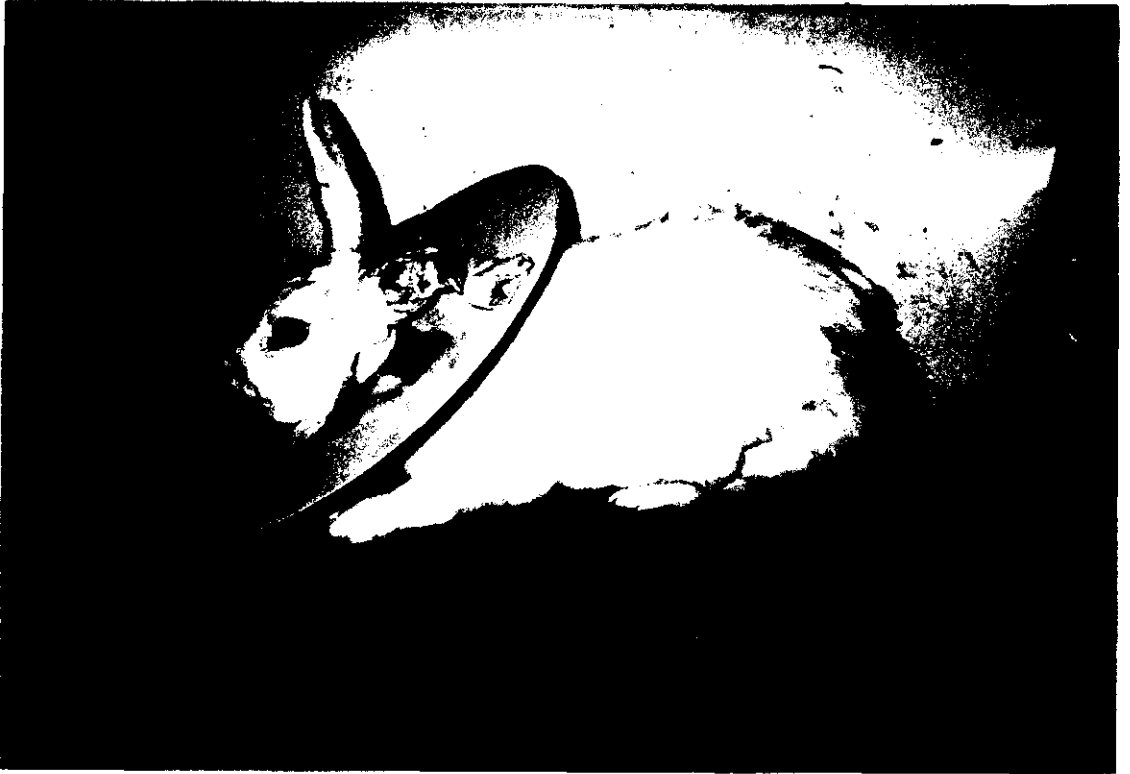
- NELSON, G.S. (1963). *Dipetalonema dracunculoides* (Cobbold, 1870), from the dog in Kenya: with a note on its development in the louse-fly, *Hippobosca longipennis*. *J. Helminthol.*, **37** (3): 235-240.
- NEVEU-LEMAIRE, M. (1938). *Traité d'Entomologie médicale et vétérinaire*. 1^a ed. Vigot Frères. Paris. 1339 pp.
- NORDGREN, R.M. & CRAIG, T.M. (1984). Experimental transmission of the Texas strain of *Hepatozoon canis*. *Vet. Parasitol.*, **16**: 207-214.
- NORVAL, R.A.I. (1990). The impact of pure infestation of *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma hebraeum* in the productivity of cattle and applications for tick control strategies in Africa. *Parassitologia*, **32**: 155-163.
- NUTTAL, G.H. (1915). Observation on the biology of Ixodidae. Part II. *Parasitol.*, **7**: 408-456.
- NUTTAL, G.H. & WARBURTON, C. (1911). *Ticks. A monograph of the Ixodoidea*. 1^a ed. University Press. Cambridge. 348 pp.
- ORTEGA-MORA, L.M & ROJO-VAZQUEZ, F.A. (1988). Sobre la presencia de *Dipetalonema dracunculoides* (Cobbold, 1870) en el perro en España. *Rev. Ibér. Parasitol.*, **48** (2): 187-188.
- ORTEGA-MORA, L.M.; GOMEZ-BAUTISTA, M. & ROJO-VAZQUEZ, F.A. (1989). The acid phosphatase activity and morphological characteristics of *Dipetalonema dracunculoides* (Cobbold, 1870) microfilariae. *Vet. Parasitol.*, **33**: 187-190.
- PAPADOPOULOS, B. (1990). *Les tiques des animaux domestiques et les hématozoaires qu'elles transmettent en Macedoine (Grèce)*. Th. Doc. Sci. Université de Neuchâtel. 248 pp.
- PARKER, R.J. & WILSON, A.J. (1979). The experimental transmission of *Anaplasma marginale* by the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* in Australia. *Aust. Vet. J.*, **55**: 606.
- PETER, O.; BURGDORFER, W.; AESCHLIMANN, A. & CHATELANAT, P. (1984). *Rickettsia conorii* isolated from *Rhipicephalus sanguineus* introduced into Switzerland on a pet dog. *Z. Parasitenkd.*, **70** (2): 265-70.
- PETIT, G. (1985a). Ingestion des hématozoaires par le vecteur. Analyse de quatre Filaires parasites d'un saïmiri. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, **60** (3): 247-297.

- PETIT, G. (1985b). Ingestion des hématozoaires par le vecteur. Analyse de quatre *Filaires parasites d'un saïmiri*. Deuxième partie. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.**, 60 (4): 455-497.
- PETIT, G.; BAIN, O.; CASSONE, J. & SEUREAU, C. (1988). La filaire *Cercophitifilaria roussilhoni* chez la tique vectrice. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.**, 63 (4): 296-302.
- PLACIDI, L.; LEDUC, P. & SANTUCCI, J., (1949). Un cas curieux de filariose canine. **Bull. Acad. Vet.**, 7: 297-298.
- RAILLET, A.; HENRY, A. & LANGERON, M. (1912). Le Genre *Achanthocheilonema* (Cobbold, 1870) et les Filaires Péritonéales des Carnivores. **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, 5: 292-395.
- RIOCHE, M., (1960). Présence de *Dipetalonema dracunculoides* (Cobbold 1870) chez le chien dans la région d'Alger. **Arch. Inst. Pasteur d'Alger**, 38: 386-387.
- RODHAIN, F. (1985). Transmission vectorielle: aspects actuels des recherches et perspectives. **Bull. de l'Institut Pasteur**, 83: 221-243.
- RODHAIN, F & PEREZ, C. (1985). *Précis d'entomologie médicale et vétérinaire. Notions d'épidémiologie des maladies à vecteurs*. S.A., Maloine Editor. Paris: 39-72.
- RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ, J.A.; OLMEDA GARCÍA, A.S.; VALCÁRCEL SANCHO, F. & GÓMEZ BAUTISTA, M. (1989). *Rhipicephalus sanguineus* (Lettrille, 1806) vector potencial de *Dipetalonema dracunculoides* (Cobbold, 1870). VI Congreso Nacional y I Congreso Ibérico de Parasitología. Cáceres: 229.
- ROJO VÁZQUEZ, F.A.; VALCÁRCEL, F.; GUERRERO, J. & GÓMEZ-BAUTISTA, M, (1990). Prevalencia de la dirofilariosis canina en cuatro áreas geográficas de España. **Med. Vet.**, 7 (5): 297-305.
- SANCHEZ ACEDO, C.; ESTRADA PEÑA, A.; QUILEZ CINCA, J.; FERRER DUFOL, M.; CAUSAPE VALENZUELA, A.C. (1991). Variabilidad morfológica en las placas adanales de los machos del género *Rhipicephalus* (Acarina:Ixodidae) en España. **SIGET 1**. Zaragoza: 21.
- SENEVIRATNA, P.; WEERASINGHE, N. & ARIYADASA, S. (1973). Transmission of *Haemobartonella canis* by the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Res. vet. Sci.**, 14: 112-114.
- SHORTT, H.E. (1936). Life-history and morphology of *Babesia canis* in the dog-tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Ind. J. med. Res.**, 23: 885-920.

- SIMPSON, R.M.; GAUNT, S.D.; HAIR, J.A.; KOCAN, K.M.; HENK, W.G. & CASEY, H.W. (1991). Evaluation of *Rhipicephalus sanguineus* as a potential biologic vector of *Ehrlichia platys*. *Am. J. Vet. Res.*, **52** (9): 537-1541.
- SNELLER V.P & DADD, R.H. (1981) *Brugia pahangi*: Growth improvement with lecithin in the diet of axenically reared hosts, *Aedes aegypti*. *Exp. Parasitol.*, **51**: 335-340.
- SNELLER, V.P. & DADD, R.H. (1981). *Brugia pahangi*: Development in *Aedes aegypti* reared axenically on a defined synthetic diet. *Exp. Parasitol.*, **51**: 169-174.
- SONIN, M.D. (1985). *Filariata of Animals and Man and Diseases caused by them. Part III*. Oxonian Press P.V.T.L.T.D. New Delhi: 173-175.
- SOULSBY, E.J.L. (1982). *Helminths, arthropods and protozoa of domesticated animals*. 7th ed. Bailliere Tindall & Cassell. London. 823 pp.
- SPRATT, D.M. & HAYCOCK, P. (1988). Aspects of the life history of *Cercopithifilaria johnstoni* (Nematoda: Filaroidea). *Int. J. Parasitol.* **18** (8): 1087-1092.
- SUTHERST, R.W. (1983). Management of arthropod parasitism in livestock. In *Ecology and epidemiology of ticks and tick-borne diseases*. Aciar Proceeding series, 17. Canberra: 108-407.
- SWEATMAN, G.K. (1967). Physical and biological factors affecting the longevity and oviposition of engorged *Rhipicephalus sanguineus* female ticks. *J. Parasitol.*, **53** (2): 432-445.
- SWEATMAN, G.K. & KOUSSA, M.G. (1968). Comparative changes in external respiration rates of engorged *Rhipicephalus sanguineus* female ticks with age and oviposition in different physical environments. *J. Parasitol.*, **54** (4): 641-656.
- TATCHELL, R.J. & McCOSKER, P.J. (1987). El control de las garrapatas y de las enfermedades que transmiten. Manual práctico de campo. Vol I. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. Roma: 49-50.
- TENDEIRO, J. (1962). Revisao sistematica dos ixodídeos portugueses. *Boletim pecuario* **30** (2): 42-43.
- THEIS, J.H. (1968). Mechanical removal of *Rhipicephalus sanguineus* from the dog. *J.A.V.M.A.*, **153** (4): 433-437.

- TRAVI, B.L. & ORIHIEL, T.C. (1987). Development of *Brugia malayi* and *Dirofilaria immitis* in *Aedes aegypti*: effect of the host's nutrition. *Trop. Med. Parasitol.*, **38** (1): 19-22.
- TURKAHIRWA, E.M. (1976). The feeding behaviour of larvae, nymphs and adults of *Rhipicephalus appendiculatus*. *Parasitol.*, **72**: 65-74.
- VALCÁRCEL, F.; FERRÉ, I.; GÓMEZ-BAUTISTA, M & ROJO-VÁZQUEZ, F.A., (1990). Diagnóstico de laboratorio de la infestación por *Dirofilaria immitis* en el perro. *Med. Vet.*, **7** (6): 345-353.
- WATTS, B.P. JR.; POUND, J.M. & OLIVER, J.H. JR. (1972). An adjustable plastic collar for feeding ticks on ears of rabbits. *J. Parasitol.* **58** (6): 1105.
- WATTS, D.M.; KSIAZEK, T.G.; LINTHICUM, K.J. & HOOGSTRAAL, H. (1988). Crimean-Congo Hemorrhagic Fever. In: T. P. Monath (Editor) *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.: 177-222.
- WIRTZ, H.P. & BARTHOLD, E. (1986). Simplified membrane feeding of *Ornithodoros moubata* (Acarina: Argasidae) and quantitative transmission of microfilariae of *Dipetalonema vitae* (Nematoda: Filarioidea) to the ticks. *Zeitschrift für Angewandte Zoologie* **73**: 1-11.
- YATES, J.A.; LOWRIE, R.C. & EBERHARD, M.L. (1982). Development of *Tetrapetalonema llewellyni* to the infective stage in *Culicoides hollensis*. *J. Parasitol.*, **68** (2): 293-296.
- ZAPATERO RAMOS, L.M. & RODRIGUEZ, J.A. (1977). *Rhipicephalus sanguineus* y *Rhipicephalus turanicus* en España. I Reun. An. As. Parasitol. Españoles. Madrid: 66.

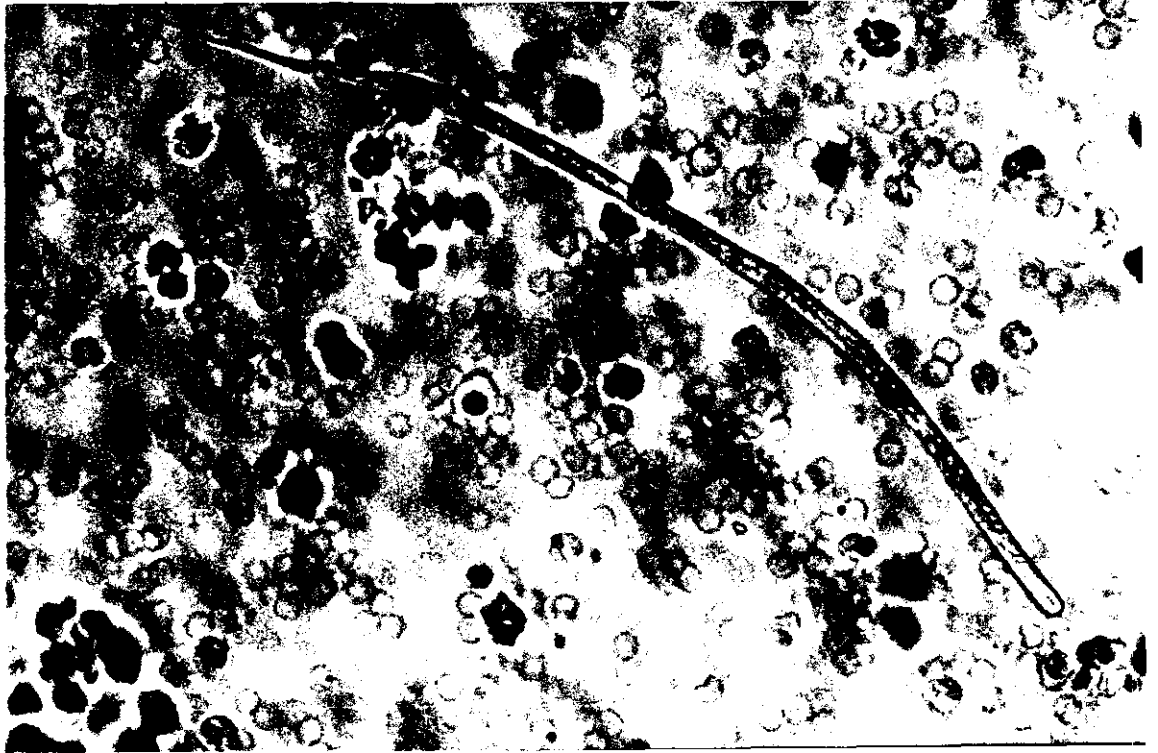
VIII. FOTOGRAFÍAS



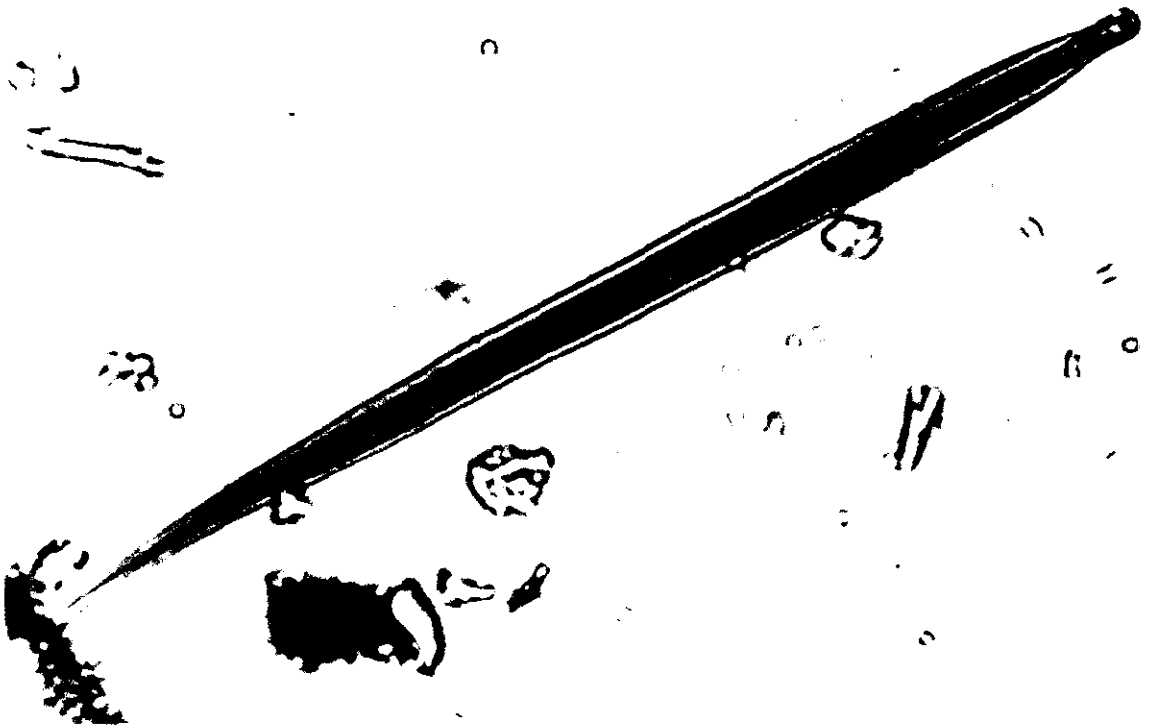
Fotografía 1. Técnica de alimentación de garrapatas sobre conejos.



Fotografía 2. Técnica de alimentación de garrapatas sobre perros.



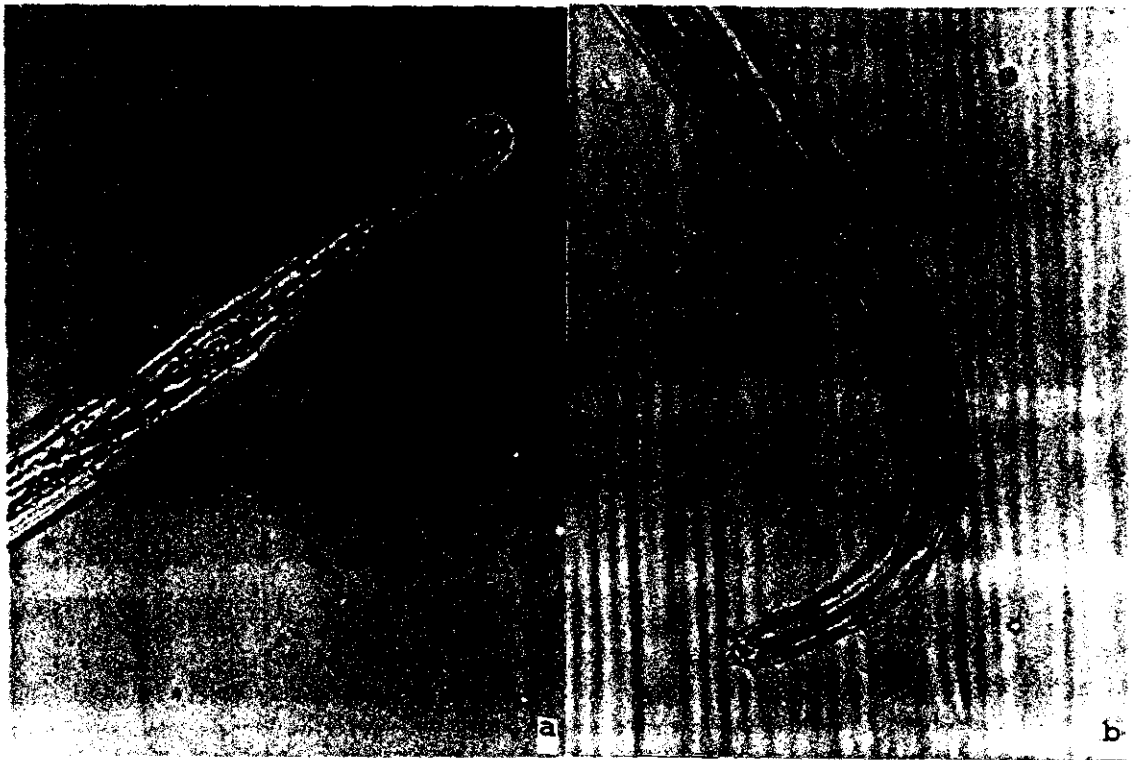
Fotografía 3. Microfilaria de *D. dracunculoides*. Técnica de Knott. 400A.



Fotografía 4. Estadio II de *D. dracunculoides*. Tinción con azul de metileno. 400A.



Fotografía 5. Estadio II de *D. dracunculoides*. 400A.



Fotografía 6. Estadio III de *D. dracunculoides*. 400A. (a= extremo anterior, b= extremo posterior).

IX. FIGURAS

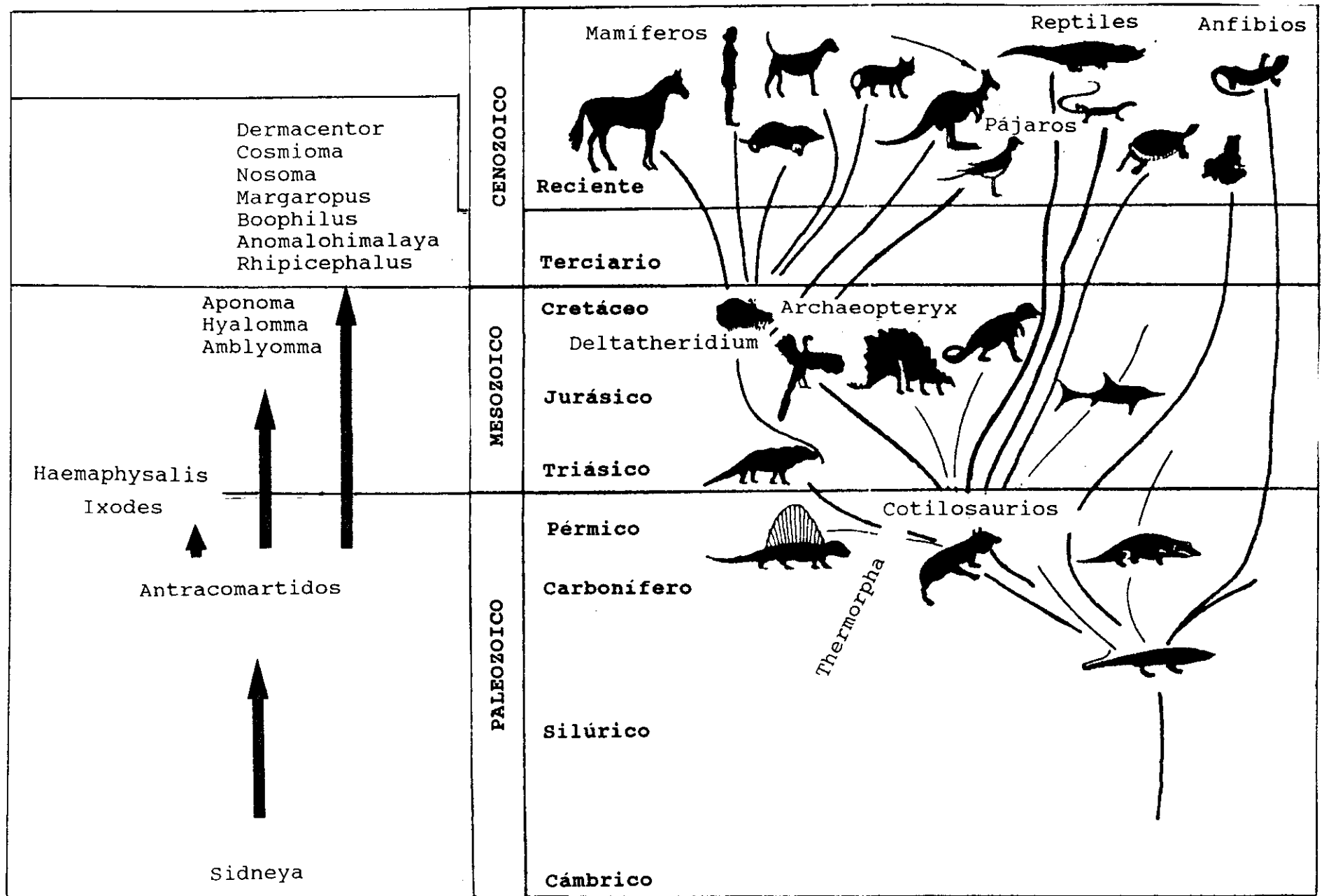


Figura 1. Evolución de ixódidos y vertebrados.

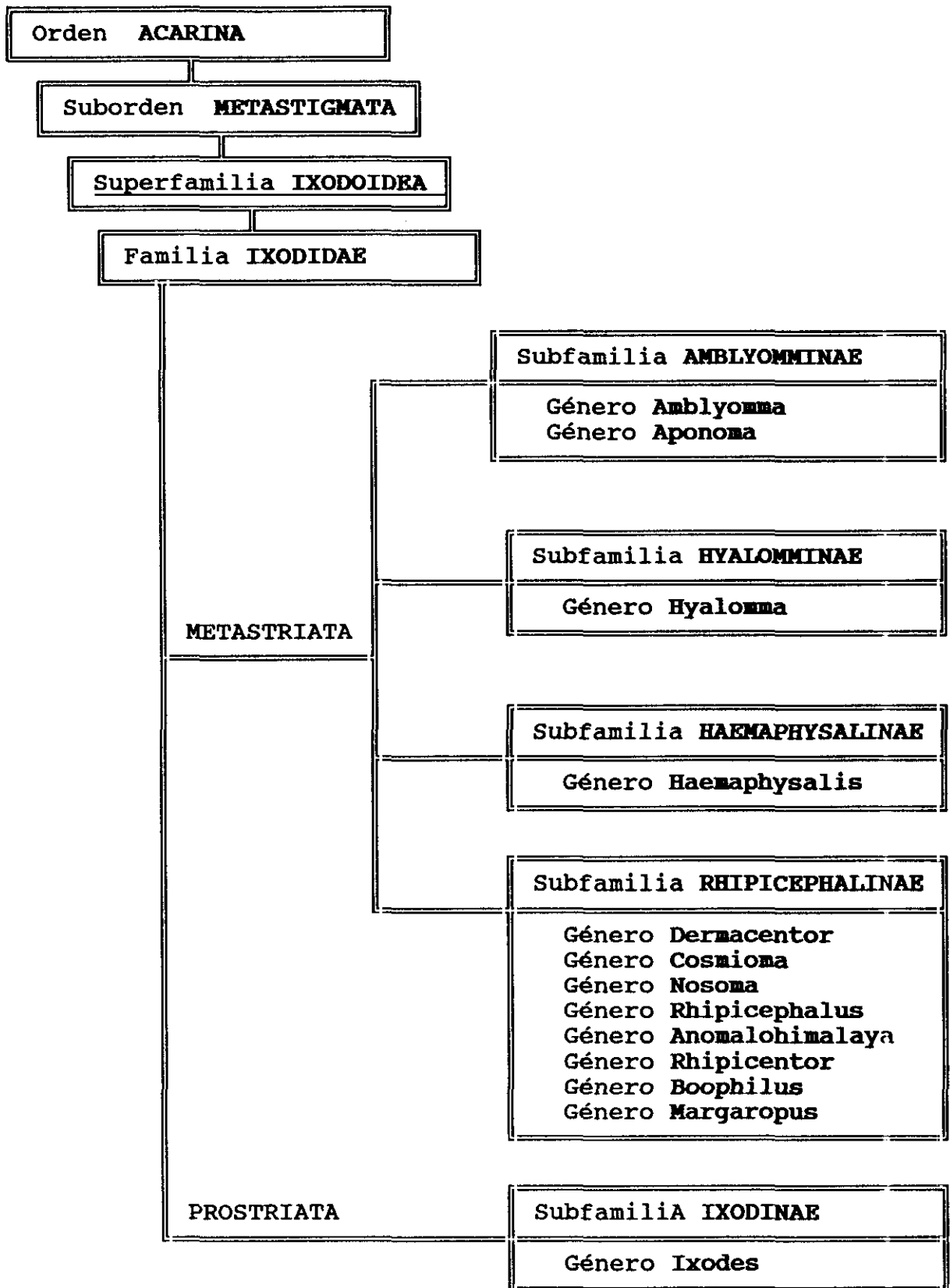
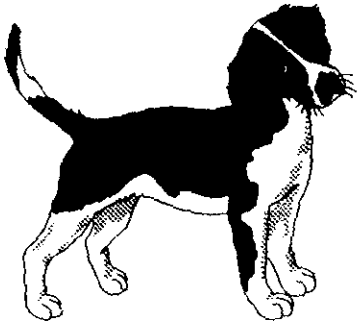


Figura 2. Posición taxonómica de los ixódidos
(Hoogstraal, 1985)

alimentación de larvas



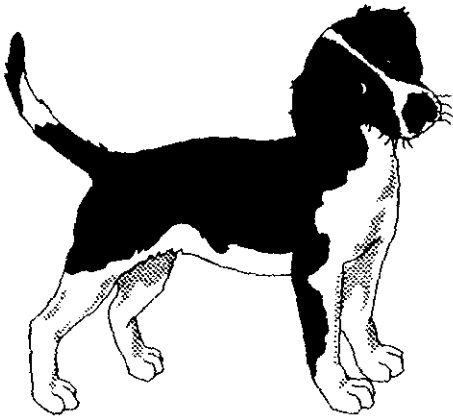
larvas saciadas



muda L.-N.



alimentación de ninfas



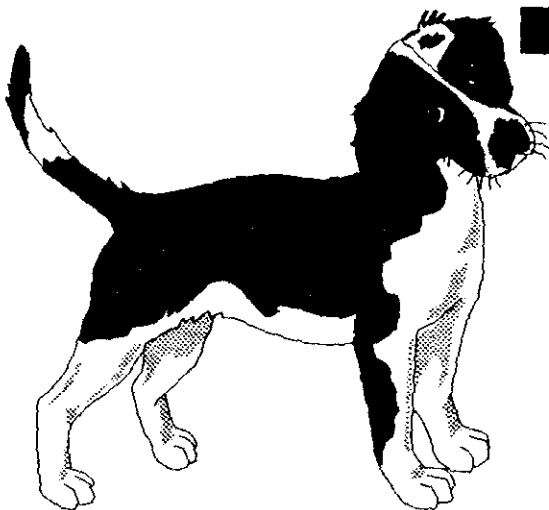
ninfas saciadas



muda N.-A.



alimentación de adultos



hembras grávidas

oviposición



incubación

eclosión

larvas

Figura 3.

Ciclo biológico de R. sanguineus.

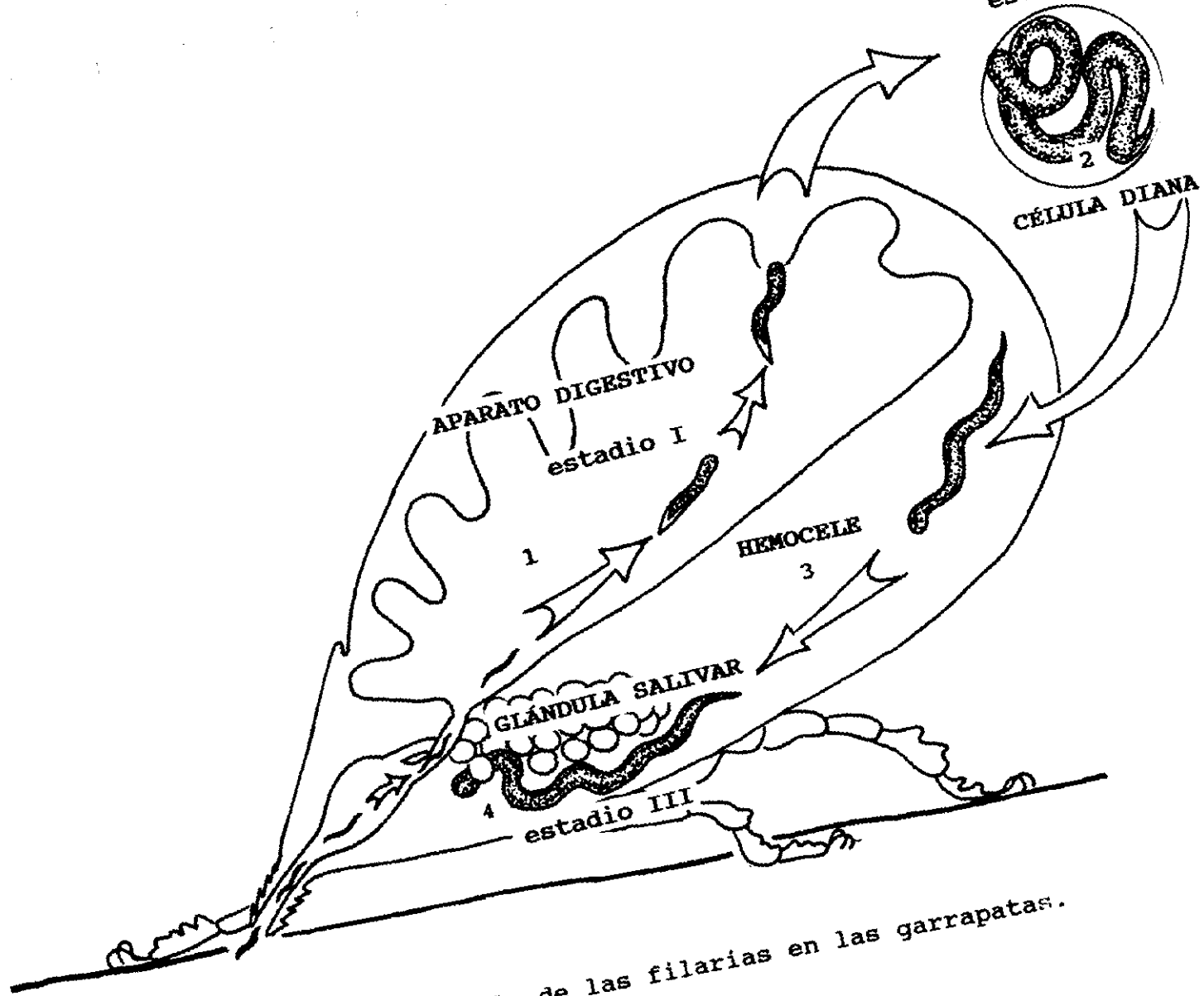


Figura 4.

Desarrollo de las filarias en las garrapatas.

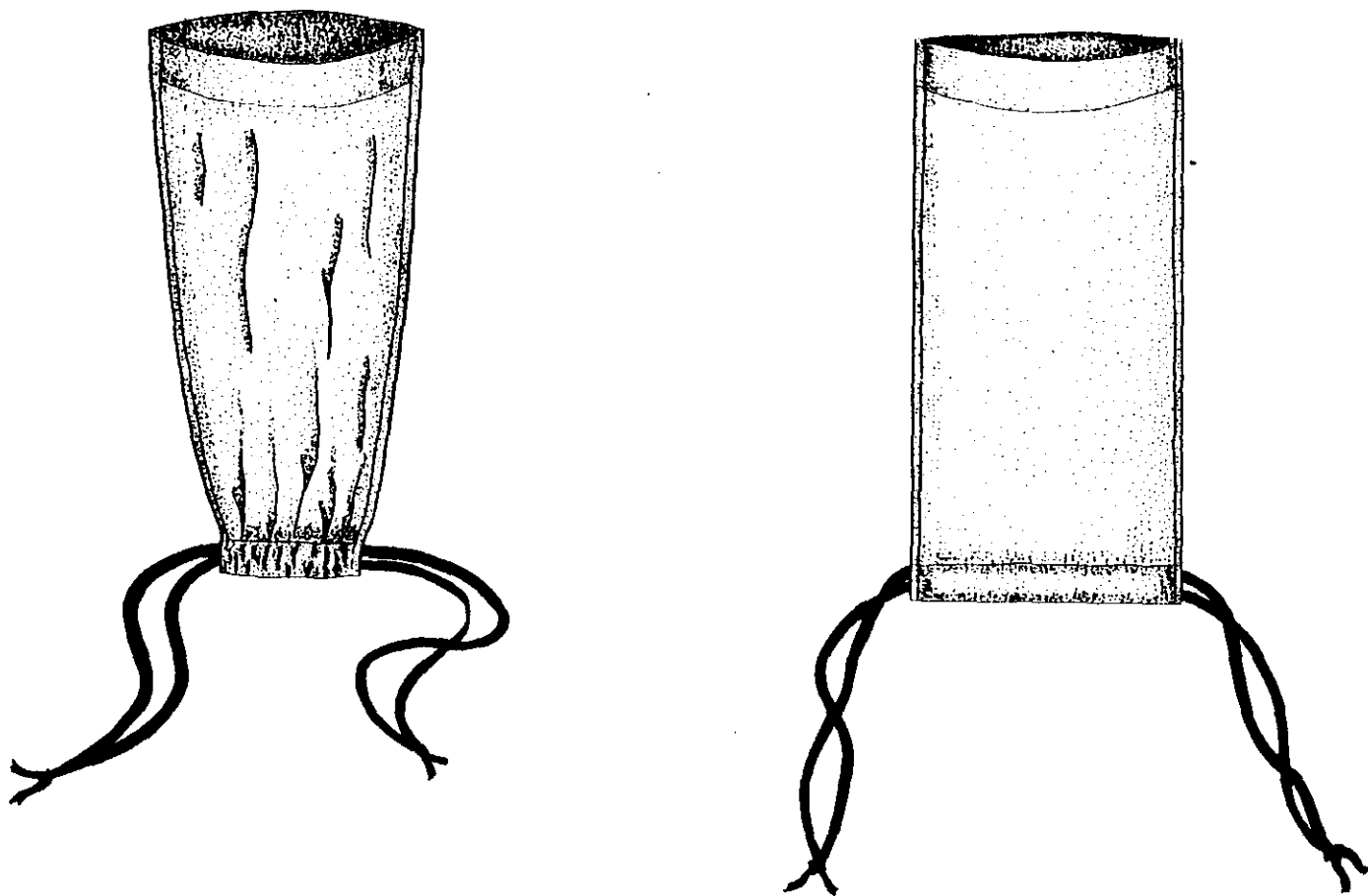


Figura 5. Bolsa de oreja.

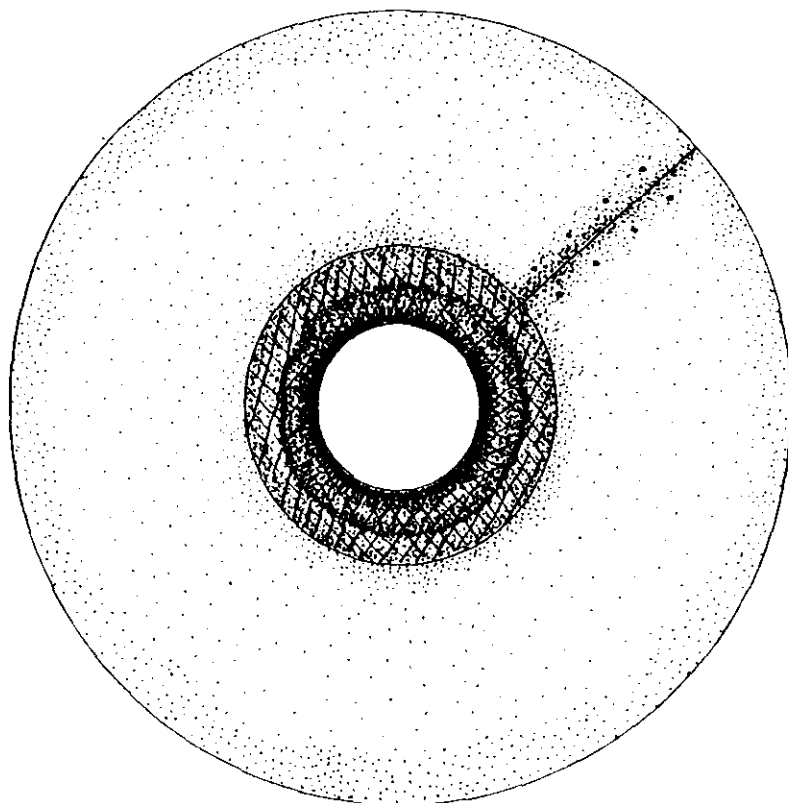


Figura 6. Collar isabelino.

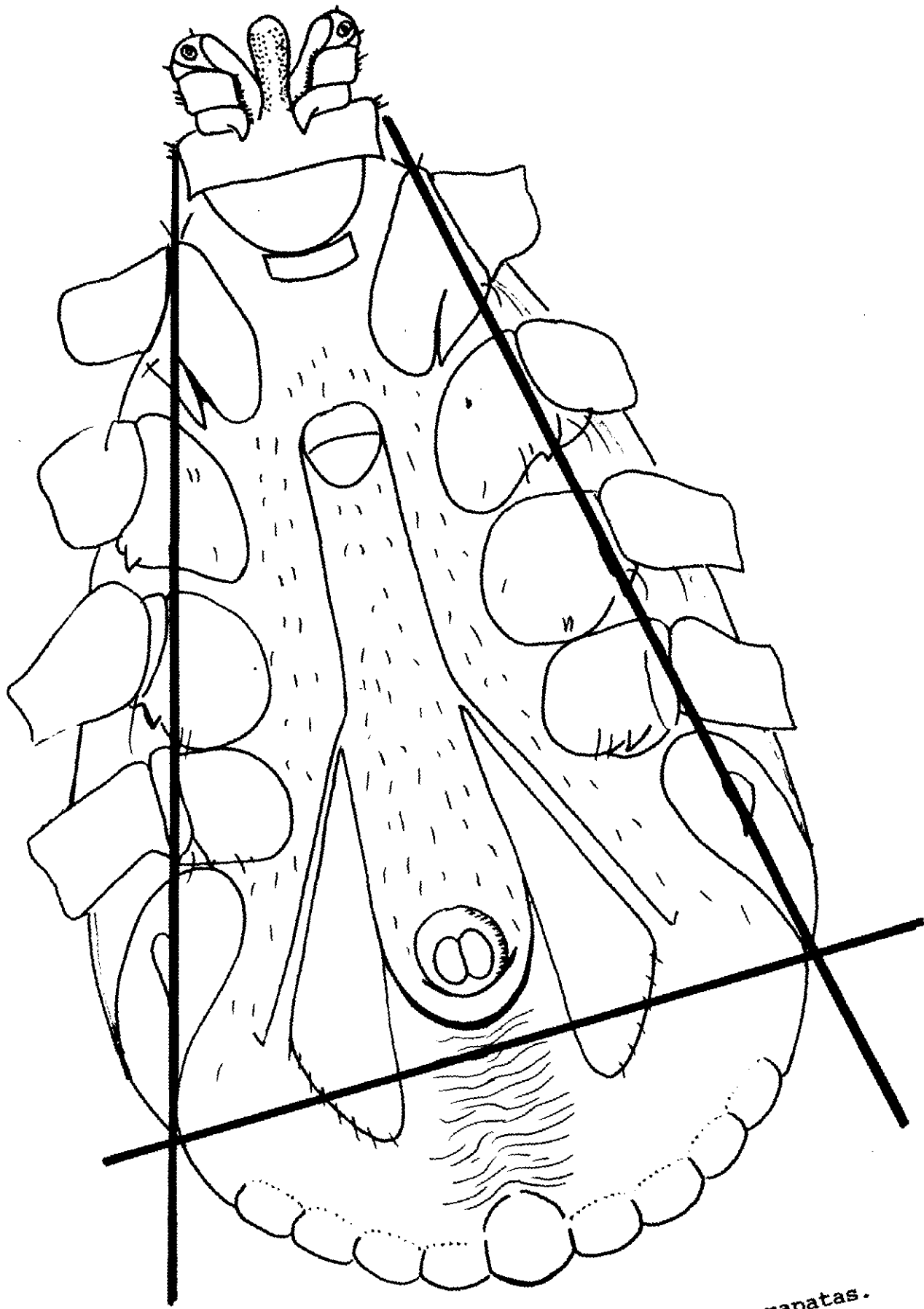


Figura 7.

Técnica de disección de las garrapatas.

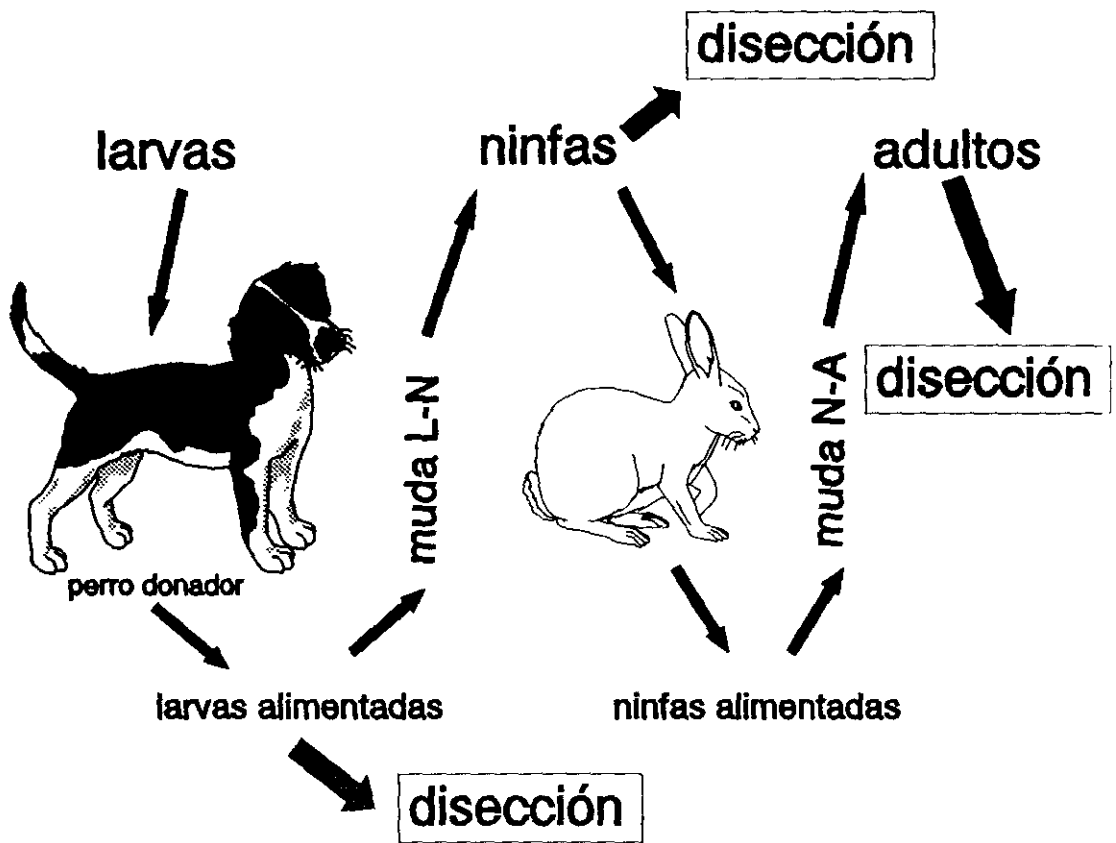


Figura 8.

Protocolo del estudio de desarrollo de *D. dracunculoides* en larvas de *R. sanguineus*.



Figura 9. Protocolo del estudio de desarrollo de *D. dracunculoides* en ninfas de *R. sanguineus*.

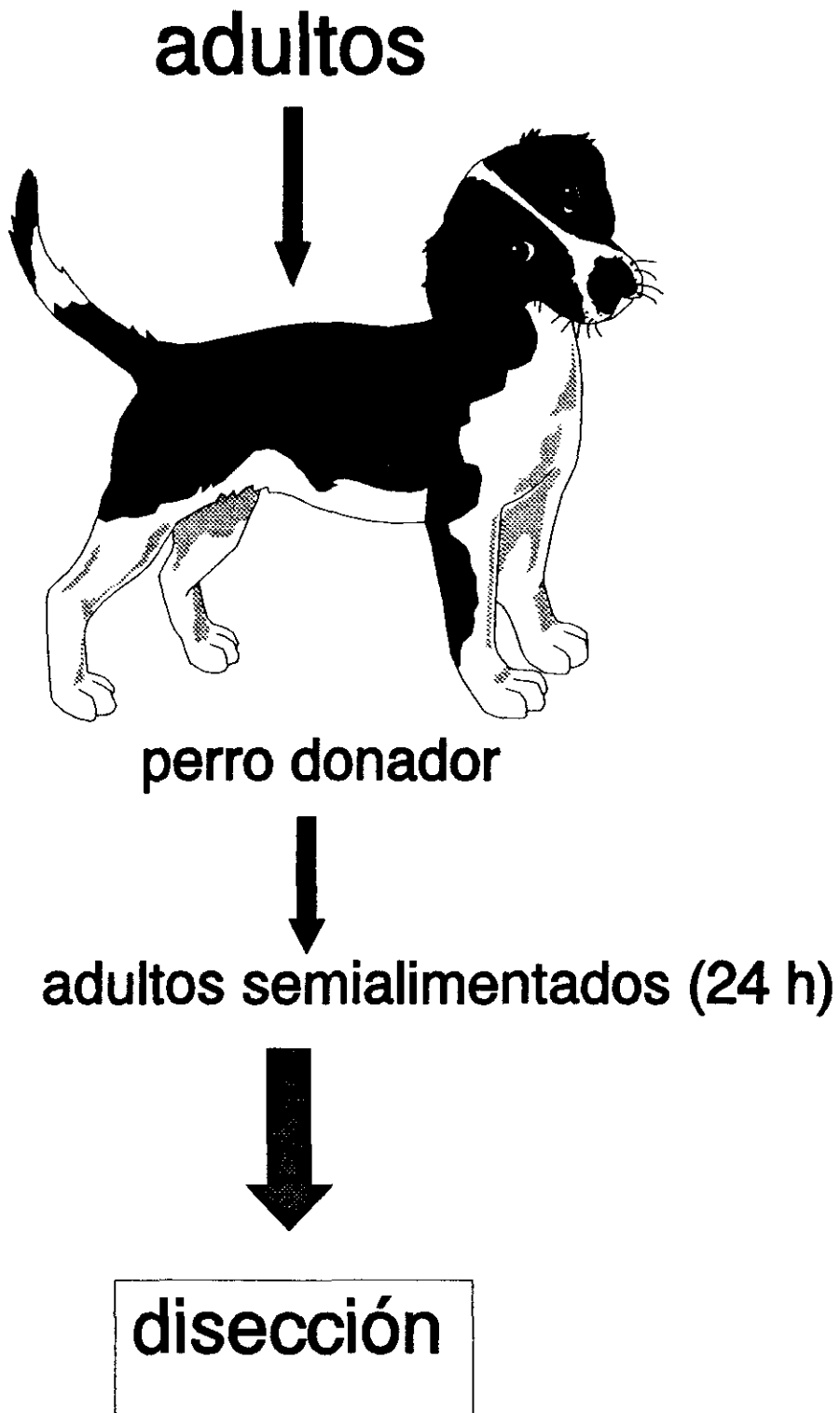


Figura 10. Protocolo del estudio de desarrollo de *D. dracunculoides* en adultos de *R. sanguineus*.

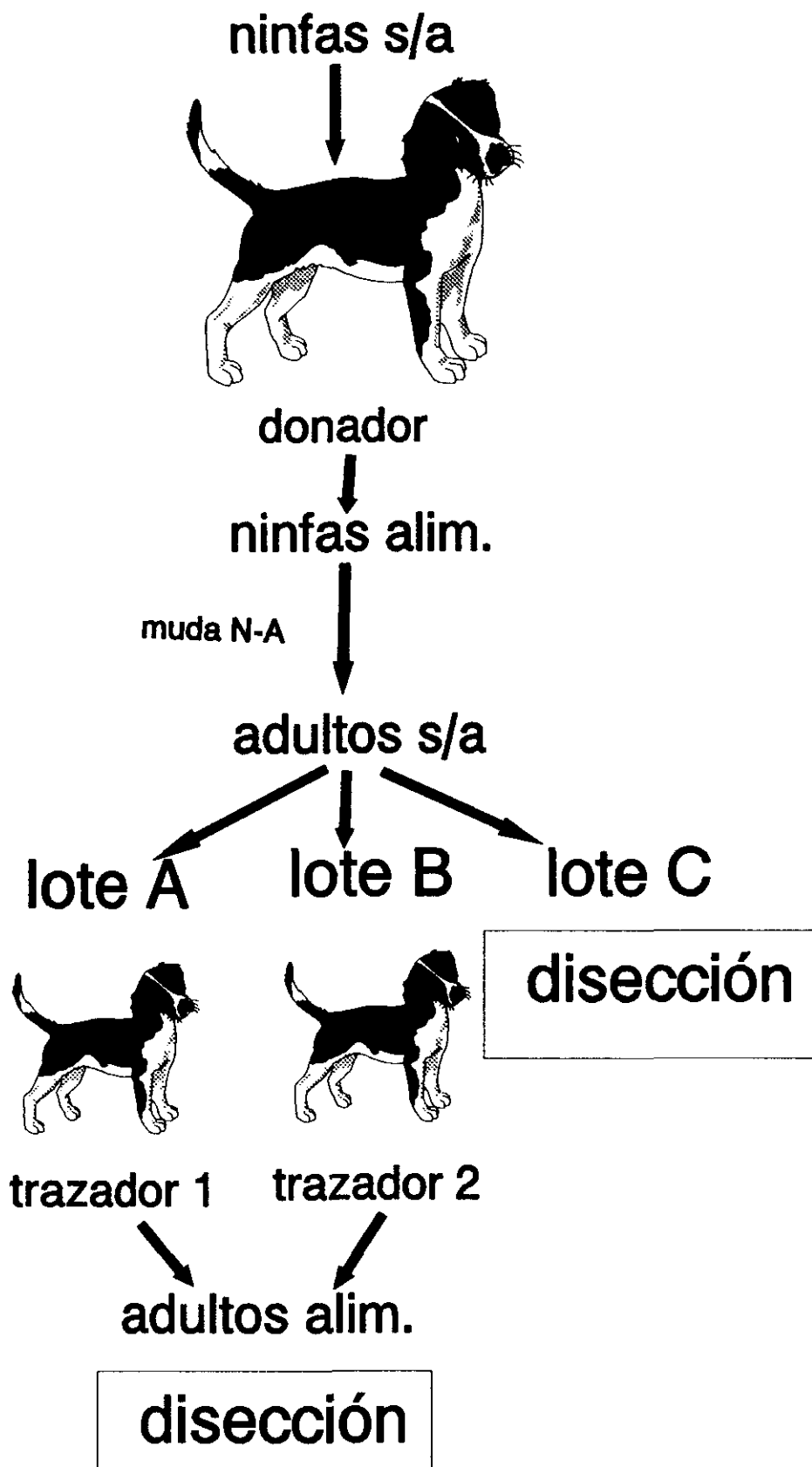


Figura 11. Protocolo del estudio de transmisión experimental de *D. dracunculoides* por *R. sanguineus*.

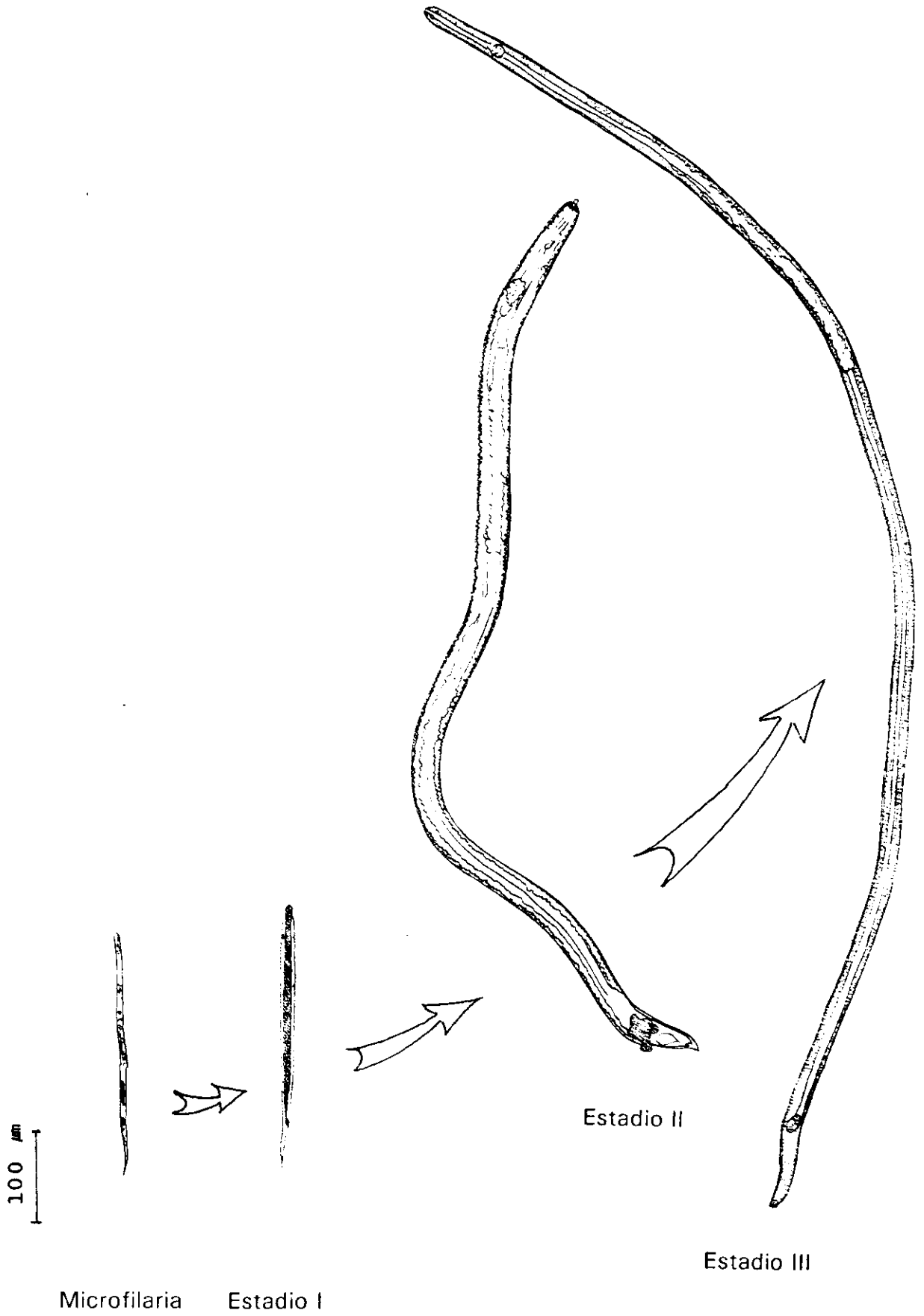


Figura 12. Desarrollo de las filarias en las garrapatas.

X. TABLAS

Tabla de abreviaturas

Long = longitud

Anch = anchura

Dist = distancia

A. nervioso = anillo nervioso

P = parte

MF = microfilarias

Botón cef = botón cefálico

Poro exc = poro excretor

C. int = cuerpo interno

Cav = cavidad

Ms = músculos

Loc = localización

T = tiempo

Med = media

Máx = máxima

Min = mínima

Nº dis = número de disecciones

E. gar = estadio de desarrollo
de las garrapatas

Gar. paras = número de
garrapatas parasitadas

E. It = estadio I temprano

E. I = estadio I

E. IIt = estadio II temprano

E. II = estadio II

E. IIIIt = estadio III temprano

E. III = estadio III

Morfología de adultos de *Dipetalonema dracunculoides*

μm	Leger, 1911		Raillet et al., 1912		Fraga de Azevedo, 1943		Rioche, 1960		Nelson, 1963		Marconcini & Macchioni, 1980	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♀	
Long. total	30000		24000-30000	32000-60000	15000-31000	41000-52000	23700-26500	44000-50000	21700-24000	38500-45200	45000	
Anch. máxima	310		160-210	260-300	126	222	137-141	253-275	140-160	200-280	270	
Papila cefálica			2 lat. 4 submed.		2 lat. y 4 submed							
Papila cervical					481							
Dist A nervioso- P. anterior	290		255-290		220		234-256	204-228	200-240	200-220		
E S O F A G O	Long. total	610		2100-2710		2227		2249	2235	1960-2170	1940-2160	
	muscular			500-610		395		384-462	353-395	360-410	340-400	
	glandular			1600-2100		1832		1486-2166	1693-2029	1560-1800	1600-2100	
Dist Vulva- P. anterior		2340		1300-1850		1250		1361-1555		1280-1600	1680	
Long. cola	282	657	235-282	440-520	180	340	163-179	405-503	140-180	240-395	285	
Long. espícula pequeña			160-163		160		157-173		120-148			
Long. espícula grande:			320-390		390		368-392,2		320-340			
P. proximal P. media P. distal					170 140 80		159,2-175,4 205,2-221					
Papilas caudales	1-36				2 pares							
Papilas genitales	4 prean. 1 postan.		4 prean. 1 postan.		3 prean. 1 postan.							

TABLA 1

Morfología de microfilarias de *Dipetalonema dracunculoides*

	Leger, 1911	Raillet, 1912	Fraga de Azevedo, 1942		Rioche, 1960		Marconcini & Macchioni, 1980		Ortega Mora et al., 1989		Valcárcel et al., 1990
	μm	μm	μm	%	μm	%	μm	μm	μm	%	μm
Long. total (Med.)	328-340	195-230	144,94-232,68 189		155,5-183,3 169,4		240-273 258	236-270	233-277 256,5		217,5-332, 5 263,51
Anch. máx (Med.)	8	5,5	5,26-7,41 6,46		3,7-5,9 4,8		4,5-5,5 5	4,5-4,8 4,6	4,5-6 5		3-7,5 5,04
Long. botón cef. (Med.)			3,16-9,28 7,08	3,8							
Dist A nervioso P. ant. (Med.)	120		29,46-52,12 40,8	21,75	34,6-42,6 38,6	22,79			43-61 52,2	20,55	
Dist Poro exc. P. ant. (Med.)	200		44,19-73,35 58,48	31,25	49,8-59,8 54,8	32,34			69-85 76,9	29,98	
Long. C. int (Med.)			8,89-24,28 16,40	8,85	15,1-18,5 16,8	9,92			15-32 23,4	9,12	
Dist C. int -P. ant. (Med.)			77,85-133,37 104,71	57,2	94,2-99 96,6	57,02			123-149 137,2	53,47	
Dist poro anal-P. ant. (Med.)	270		112,82-189,70 150,3	79,9	120,7-148,7 135,2	79,81			194-230 211,8	82,57	
Último núcleo (Med.)	17		8,15-18,75 11,62		8,5-11,5				212-266 235,6	8,15	
Long. cola sin núcleo (Med.)				6,15	10	5,9			10-31 21,1	8,22	
Técnica	Giemsa		MG-Giemsa				Fresco	Knott	Knott		Knott
N° mf			20						150		671

TABLA 2

Desarrollo de algunas filarias en sus vectores

Filaria	Vector	Loc. E. I Y E. II	T. aparición E. I	T. aparición E. II	T. aparición E. III	Autores
Cercophitifilaria roussilhoni	R.sanguineus		9-10 días p.a.	13 días p.a.	19 días p.a.	Bain et al., 1986
		tej. epidérmico	6 días p.a.		17-20 días p.a.	Petit et al., 1988
Tetrapetalonema llawellyni	Culicoides hollensis	músculos torácicos				Yates et al., 1982
Tetrapetalonema marmosetae	Culicoides furens C. hollensis	músculos torácicos				Lowrie et al., 1978
Dipetalonema gracile	C. hollensis	cav. abdom. y cuerpo graso				Eberhard et al., 1979
Dipetalonema vitae	Culicoides hollensis	cav. abdom. y cuerpo graso				Eberhard et al., 1979
	Ornithodoros tartakowskyi y O. moubata	Ms. dorso-ventrales y faríngeos	6 días p.a.	10-12 días p.a.	21 días p.a.	Bain, 1972
Dipetalonema reconditum	Ctenocephalides canis y C. felis, Pulex irritans etc	tejido graso				Sonin, 1985
Dirofilaria immitis	Aedes vexans, Culex quinquefasciatus	tubos de malpigio	24 h. p.a.	10 días p.a.	13 días p.a.	Courtney, 1989

TABLA 3

Período de preoviposición de *Rhipicephalus sanguineus* (días)

Generación	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	Med.
Máx.	15	25*	14	6	19	9	14,66
Mín.	1	1	1	1	1	1	1
Med.	5,76	4,32	5,15	4	5,04	4,46	4,78
Desv. Est.	2,28	4,19	4,05	1,72	4,14	1,76	
Nº	79	75	61	14	27	24	

TABLA 4.1.1

* Puesta no viable.

Período de incubación de *Rhipicephalus sanguineus* (días)

Generación	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	Med.
Máx.	24	35	33	31	23	24	28
Mín.	11	9	13	15	16	13	12,83
Med.	16,45	18,9	19,94	22,07	19,27	18	19,1
Desv. Est.	2,76	3,08	3,48	4,38	2	3,11	
Nº	71	63	35	14	22	20	

TABLA 4.1.2

Período de alimentación de larvas de
Rhipicephalus sanguineus (días)

Generación		1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	Med.
M í n i m o	Máx.	5	7	5	7	7	6	6,16
	Mín.	2	3	2	3	3	3	2,66
	Med.	3,31	4,04	4,27	4,63	4,06	4,67	4,16
	Desv. Est.	0,82	1,12	1	1,11	1,08	1,25	
	Nº	13	23	15	8	18	6	
M á x i m o	Máx.	6	8	8	9	9	7	7,83
	Mínima	3	3	2	6	5	5	4
	Med.	4,62	5,76	5,1	7,38	6,71	6	5,92
	Desv. Est.	0,74	1,11	1,51	0,86	1,36	0,82	
	Nº	13	21	10	8	17	6	

TABLA 4.1.3

Período de ecdísis de larvas a ninfas de
Rhipicephalus sanguineus (días)

Generación	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	Med.
Máx.	10	11	24	14	21	7	14,5
Mín.	6	6	7	6	6	3	5,66
Med.	7,93	8,89	12,17	8,83	10,75	4,75	8,88
Desv. Est.	1,33	1,65	5,49	2,79	3,61	1,79	
Nº	14	19	6	6	16	4	

TABLA 4.1.4

Período de alimentación de ninfas de
Rhipicephalus sanguineus (días)

	Generación	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	Med.
M í n i m o	Máx.	7	6	6	7	7	6	6,5
	Mín.	4	4	4	5	4	4	4,16
	Med.	4,9	5,18	5	6	5,5	5	5,26
	Desv. Est.	0,83	0,57	0,58	1	1,04	0,82	
	Nº	10	11	6	4	12	3	
M á x i m o	Máx.	14	13	11	16	10	13	12,83
	Mínima	6	4	7	7	5	6	5,83
	Med.	8,2	9	8,6	11,75	7,7	10,33	9,26
	Desv. Est.	2,18	3,16	1,62	3,27	1,9	3,09	
	Nº	10	11	5	4	10	3	

TABLA 4.1.5

Período de ecdísis de ninfas a adultos de
Rhipicephalus sanguineus (días)

Generación	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	Med.
Máx.	18	16	19	22	16	11	17
Mín.	12	9	12	7	7	9	9,33
Med.	14,25	12,8	15,2	12,5	11,75	10	12,75
Desv. Est.	1,71	1,83	3,19	5,68	2,99	1	
Nº	8	10	5	4	8	2	

TABLA 4.1.6

Período de alimentación de hembras de
Rhipicephalus sanguineus (días)

	Generación	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	Med.
M í n i m o	Máx.	11	16	14	22	16	8	14,5
	Mín.	8	7	10	9	9	8	8,83
	Med.	9,33	10,38	11,2	15,67	11,33	8	10,98
	Desv. Est.	1,25	2,83	1,6	5,31	3,3	0	
	Nº	3	8	5	3	3	1	
M á x i m o	Máx.	24	28	23	30	26	18	24,83
	Mín.	12	9	11	20	21	18	15,16
	Med.	18	17,14	14,8	26	24	18	19,18
	Desv. Est.	4,9	6,71	4,21	4,32	2,16	0	
	Nº	3	7	5	3	3	1	

TABLA 4.1.7.1

Relación entre el número de hembras grávidas recogidas
y los tiempos de alimentación (días)

Tiempo de Alim. de A.		Nº de ♀ grávidas
Mín.	Máx.	
25,2	30	1
12		2
14,7	19	3
12,3	20,3	4
15	25,5	5
12	22	6
9	18	7
10,7	23,7	8
9	24	9
16	21	11
9	26	12
7,5	15,5	13
7	10	16
9,5	13	17
9	20	19

TABLA 4.1.7.2

Ciclo biológico de *Rhipicephalus sanguineus* (días) *

Generación	1ª	2ª	3ª	4ª	5ª	6ª	Med.
Tiempo medio							
Preoviposición	5,7	4,3	5,1	4	5	4,4	4,7
Incubación	16,4	18,9	19,9	22	19,3	18	19,1
Alim. Mín. L.	3,3	4	4,3	4,6	4	4,7	4,15
Ecdísis L.-N.	7,9	8,9	12,2	8,8	10,7	4,7	8,9
Alim. Mín. N.	4,9	5,2	5	6	5,5	5	5,3
Ecdísis N.-A.	14,2	12,8	15,2	12,5	11,7	10	12,7
Alim. Mín. A.	9,3	10,4	11,2	15,7	11,3	8	11
Total	61,7	64,5	72,9	73,6	67,5	54,8	65,8

TABLA 4.1.8

* salvo períodos de prealimentación

Influencia del período de prealimentación
en el tiempo de alimentación de las larvas (días)

Prealimentación	Tiempo de Alimentación	
	Mín.	Máx.
1	5	7
2	4	5
3	4	7
4	4	6
5	2	7
6	2	8
7	3	8
8	2	9
9	3	7
10	4	6
11	2	6
12	3	7
13	5	9
14	3	8
16	3	6,5
17	3	6

TABLA 4.1.9.1

Influencia del período de prealimentación en el tiempo de alimentación de las ninfas (días)

Prealimentación	Tiempo de Alimentación	
	Mín.	Máx.
6	6	13
7	4	11
8	3	13
9	4	13
10	4	16
11	4	9
12	5	8
13	5	13
14	4	8
15	5	13
16	7	14
17	5	9
18	6	11
19	5	7
24	6	8
31	5	9
38	6	10

TABLA 4.1.9.2

Influencia del período de prealimentación en el tiempo de alimentación de los adultos (días)

Prealimentación	Tiempo de Alimentación	
	Mín.	Máx.
4	22	30
5	7	9
6	16	16
8	11	18
11	9	24
12	7	28
13	8	30
14	8	22
16	16	18
17	9	22
18	9	17
20	9	22
21	14	23
23	12	14
25	10	10
27	8	18
48	9	25
50	9	20
51	16	21
78	9	26

TABLA 4.1.9.3

Períodos de alimentación de *R. sanguineus* según el número de reinfestaciones en el hospedador (días)

Infestación	Alimentación Larvas		Alimentación Ninfas		Alimentación Adultos	
	Mín	Máx.	Mín	Máx.	Mín	Máx.
1	4	5,9	5,8	7		
2	3,8	6	4,8	10,3	8	9
3	7	8,3	5	8,2	13	16
4	3,3	5,5	5	7,7	8	15,4
5	3,5	5,3	5	9,3	10	22
6	3	4,5	5,5	9,8	9,3	21
7	4,3	8,3	7	14	10	22
8	4,5	6,5	6,5	10,5	8	18
9	3,3	6,3	6	14	10,5	15,5
10	5	7			12,5	23
11	4,7	6,3	6	10		
12			6	11,3	8,5	9
13	3,3	8			10	11
14			6	8	16	28
15	4,5	7,5				

TABLA 4.1.10

Morfología de las microfilarias de *D. dracunculoides*
(en fresco)

μm	Microfilarias hemáticas				Microfilarias de disección			
	Máx.	Min.	Med.	Desv. Est	Máx.	Min	Med	Des v. Est.
Long.	258,5	246	252,5	4,66	217,5	200	210,4	5,51
Anch.	6	4	5	0,54	7,5	3	4,8	0,72
Dist. P.exc.-P.ant.	100	70,8	85,4 (33,7%)	10,61	91,63	50	82,27 (39,1%)	13,41
Long. C.int.	25	17,5	22,4 (8,87%)	2,28				
Dist. C. int-P. ant.	156	152,3	154,8 (61,31%)	4,21				
Long. cola	55	45	48,4 (80,83%)	3,89				

TABLA 4.2.1.1

Morfología de las microfilarias hemáticas de *D. dracunculoides*
(técnica de las Fosfatasas Acidas)

μm	Máx.	Min.	Med.
Long.	247,5	222,5	232,1
Anch.	5	5	5
Dist. P.exc-P.ant.	77,5	70	74 (31,9%)
Long. C.interno	25	20	22,25 (9,58%)
Dist. C.int-P.ant.	147	130	139,2 (60%)
Long. cola	57,5	37,5	47,5 (79,45%)

TABLA 4.2.1.2

Morfología del estadio I de *D. dracunculoides* (en fresco)

μm	Máx.	Mín.	Med.	Desv. Est.
Long.	295,9	280	287,7	5,12
Anch. máxima total (frontal)	16,25	8,75	12,32	1,79
Anch. máxima total (lateral)	15	7,5	9,96	2,13
Anch. máxima cuerpo	11,25	6,25	8,32	1,27
Anch. cabeza	15	6,25	10,19	2,08
Anch. cuello	10	6	7,46	1,22
Long. vaina	55	32	42,21	5,25
Anillo N-P. Anterior	67,5	65	66,25	1,25
Long. esófago	90	90	90	
P. excretor-P. Anterior	114,94	84,96	93,4	
R ₁ -Cola	106,25	97,5	101,88	4,38
R ₂ -Cola	93,75	90	91,88	1,88
R ₃ -Cola	83,75	83,75	83,75	
R ₄ -Cola	72,5	72,5	72,5	
Long. cola	98,9	98,9	98,9	

TABLA 4.2.2.1

Morfología del estadio I de *D. dracunculoides*
(técnica de las Fosfatasa Acidas)

μm	Máx.	Mín.	Med.
Long.	260	245	254,8
Anch. máxima total (frontal)	14,4	12,5	13,3
Anch. máxima cuerpo	11,2	8,7	9,4
Long. vaina	40	30	33,7
P. excretor- P. Anterior	87,5	68,7	79,4

TABLA 4.2.2.2

Morfología del estadio II de *D. dracunculoides*
(en fresco)

μm	Máx.	Mín.	Med.	Desv. Est.
Long.	782	600,5	691,8	56,5
Anch. máxima cuerpo	43,7	20	26,21	5,7
Long. vaina	30	10	20,3	8,1
P. excretor-P. Anterior	142	57,5	88,7	27,3
Long. P. excretor	30	17,5	24,6	4,7
Long. cola	60	35	53	8,30
Anch. cuerpo P. anal	37,5	19	27,7	5,5

TABLA 4.2.3.1.

Morfología del estadio II de *D. dracunculoides*
(técnica de las Fosfatasa Acidas)

μm	Máx.	Mín.	Med.
Long.	692,5	653,6	657,4
Anch. máxima cuerpo	36,25	30	35
P. excretor-P. Anterior	126,2	96,25	107,1
Long. P. excretor	23,7	15	20,9
Long. cola	93	40	51,23
Anch. cuerpo P. anal	41,3	33,7	37,5

TABLA 4.2.3.2

Morfología del estadio III de *D. dracunculoides*

μm	Máx.	Mín.	Med.	Desv. Est.
Long.	2270	1900	2075,95	118,88
Anch. máx. cuerpo	45	20	27,72	4,18
Anch. cabeza	30	22,5	26,49	2,34
Long. esófago	1325	960	1091,43	114,17
Anch. poro anal	25	12,5	20,02	3,67
Long. cola	93	40	74,27	12,57

TABLA 4.2.4

Desarrollo de *D. dracunculoides* en larvas
infestadas de *R. sanguineus*

LARVAS ALIMENTADAS

N° total	Vivas	Vivas disecadas	Muertas	Muertas disecadas	% de mortalidad	% de parasitación		MF
						Vivas	Muertas	
1190	284	85	906	906	76.1	0	8.6	78

ECDÍISIS LARVA-NINFA

NINFAS

Vivas	Vivas disecadas	Muertas	Muertas disecadas	% de mortalidad	% de parasitación		MF	% de alimentación
					Vivas	Muertas		
199	113	26	26	13.1	4.4	0	0	56.6

ECDÍISIS NINFA-ADULTO

ADULTOS

Vivos	Vivos disecados	Muertos	Muertos disecados	% de mortalidad	% de parasitación		MF
					Vivas	Muertas	
34	34	0	0	0	0	0	0

TABLA 4.3.1

Desarrollo de *D. dracunculoides* en ninfas de *R. sanguineus* infestadas

Día	E. Gar.	Nº	G. Par.	MF	E. It	E. I	E. IIt	E. II	E. IIIIt	E. III
0	N.	50	45	880						
1	N.	19	14	126						
2	N.	23	13	86						
3	N.	31	14	133						
4	N.	24	9	20						
5	N.	25	10	69						
6	N.	24	7	486					1	
7	N.	25	9	108			3		1	
8	N.	33	12	24			3			
9	N.	24	11	76					2	
10	N.	40	10	84					1	
11	N.	14	5	6						
	♀	9	0							
	♂	5	4	2					2	
12	N.	19	3	42					1	
	♀	9	3	2			1			
	♂	13	4	4			2			
13	N.	10	2	1					1	
	♀	5	1	9						1
	♂	5	1	1						
14	N.	2	0							
	♀	12	4	1		3			1	
	♂	2	3	1					2	
15	N.	2	1	1						
	♀	5	2	6					1	
	♂	10	4	7					1	
16	N.	2	0							
	♀	10	4	9					4	
	♂	6	1	23						
17	♀	3	0							
	♂	7	3	10					1	

TABLA 4.3.2.1a

Desarrollo de *D. dracunculoides* en ninfas de *R. sanguineus* infestadas

Día	E. Gar.	Nº	G. Par.	MF	E. It	E. I	E. IIt	E. II	E. IIIIt	E. III
18	♀	5	1						1	
	♂	11	2	1					1	
19	N.	2	0							
	♀	13	3						5	
	♂	18	2	8						
20	♀	10	2	1					3	
	♂	8	4	4					4	4
21	♀	12	3						4	
	♂	13	2	27					7	
22	N.	2	0							
	♀	21	2						2	
	♂	10	0							
23	♀	12	1						1	14
	♂	6	1						1	
24	♀	1	1						1	
	♂	6	0							
25	♀	5	1							5
	♂	5	0							
26	♀	3	1						1	
	♂	7	0							
27	♂	3	1						3	24
28	♀	3	0							
	♂	3	1						9	12
29	♀	5	0							
	♂	5	0							
30	♀	26	3						3	41
	♂	22	0							
40	♀	1	1						1	1
	♂	4	1				1			
50	♀	11	2							
	♂	3	1						4	1

TABLA 4.3.2.1b

Larvas de *D. dracunculoides* obtenidas
de ninfas de *R. sanguineus* infestadas

	N.	♀	♂	TOTAL
Disecciones	371	181	174	726
G. parasitadas	165	35	35	235
% parasitación	44,5	19,3	20,1	32,5
MF	2142	28	88	2258
E. It	0	0	0	0
E. I	0	3	0	3
E. IIIt	6	1	3	10
E. II	0	0	0	0
E. IIIIt	7	32	31	70
E. III	0	63	46	109

TABLA 4.3.2.2

Porcentaje diario de parasitación en la infestación de ninfas de *R. sanguineus*.

Día	N	♀	♂	Total
0	90			90
1	73,7			73,7
2	56,5			56,5
3	45,2			45,2
4	37,5			37,5
5	40			40
6	29,2			29,2
7	36			36
8	36,4			36,4
9	45,8			45,8
10	25			25
11	35,7	0	80	32,1
12	15,8	33,3	30,8	24,4
13	20	20	20	20
14	0	33,3	75	38,9
15	50	40	40	41,2
16	0	40	16,6	27,8
17		0	42,8	30
18		20	18,2	18,7
19		23,1	11,1	15,1
20		20	50	33,3
21		25	15,4	20
22		9,5	0	6,1
23		8,3	16,6	11,1
24		100	0	14,3
25		20	0	10
26		33,3	14,3	20
27		0	0	0
28		0	33,3	16,7
29		0	0	0
30		11,5	0	6,2
40		100	25	40
50		18,2	33,3	21,4

TABLA 4.3.2.3

Larvas de *D. dracunculoides* obtenidas de la infestación de adultos de *R. sanguineus*.

	♀	♂	Total
Disecciones	91	107	198
G. parasitadas	25	23	48
% parasitación	27,5	21,5	24,2
Nº E. It	32	4	36
Nº E. I	24	29	53
Nº E. II	4	6	10
Nº E. III	2	3	5
Nº E. IIII	2	1	3

TABLA 4.3.3.1

Desarrollo de *D. dracunculoides* en adultos de *R. sanguineus*.

Día		Nº DIS	MF	E. It	E. I	E. Ilt	E. II	E. IIIlt	E. III	Total
0	♀	6			1					1
	♂	8		3						1
1	♀	3		7						2
	♂	1			1					1
2	♀	4		6	6					2
	♂	1								0
3	♀	4		5	2	1				3
	♂	1		0						0
4	♀	5			1	1				2
	♂	6			1					1
5	♀	6			2					1
	♂	6		1	1	1				3
6	♀	2								0
	♂	2				1				1
7	♀	1		2		1				1
	♂	3			1					1
8	♀	3				1				1
	♂	2				1				1
9	♀	3		1						1
	♂	2								0
10	♀	3								0
	♂	2			2					2
11	♀	1						2		1
	♂	2								0
12	♀	0								
13	♀	2								0
	♂	8			3	2		1		1
14	♀	2			1					1
	♂	3			3					2
15	♀	2			1					1
	♂	3			1		2			1
16	♀	1								0
	♂	1		1	1		1			1

TABLA 4.3.3.2a

Desarrollo de *D. dracunculoides* en adultos de *R. sanguineus*.

Día		Nº DIS	MF	E. It	E. I	E. Itt	E. II	E. IIIIt	E. III	Total
17	♀	0								
	♂	2		3	8					
18	♀	1		1	4					1
	♂	5			3		1			4
19	♀	5			1	5				1
	♂	8			1					1
20	♀	5								0
	♂	6								0
21	♀	4			1			1		1
	♂	6			1					1
22	♀	5								0
	♂	5				1				1
23	♀	2								0
	♂	4								1
24	♀	3								0
	♂	1								0
25	♀	5		1	1					0
	♂	5								0
26	♀	2			2					1
	♂	8								
27	♀	6					1			1
	♂	4								0
28	♀	4		2						0
	♂	6								0
29	♂	3								0
30	♀	1								0
	♂	3								0

TABLA 4.3.3.2b

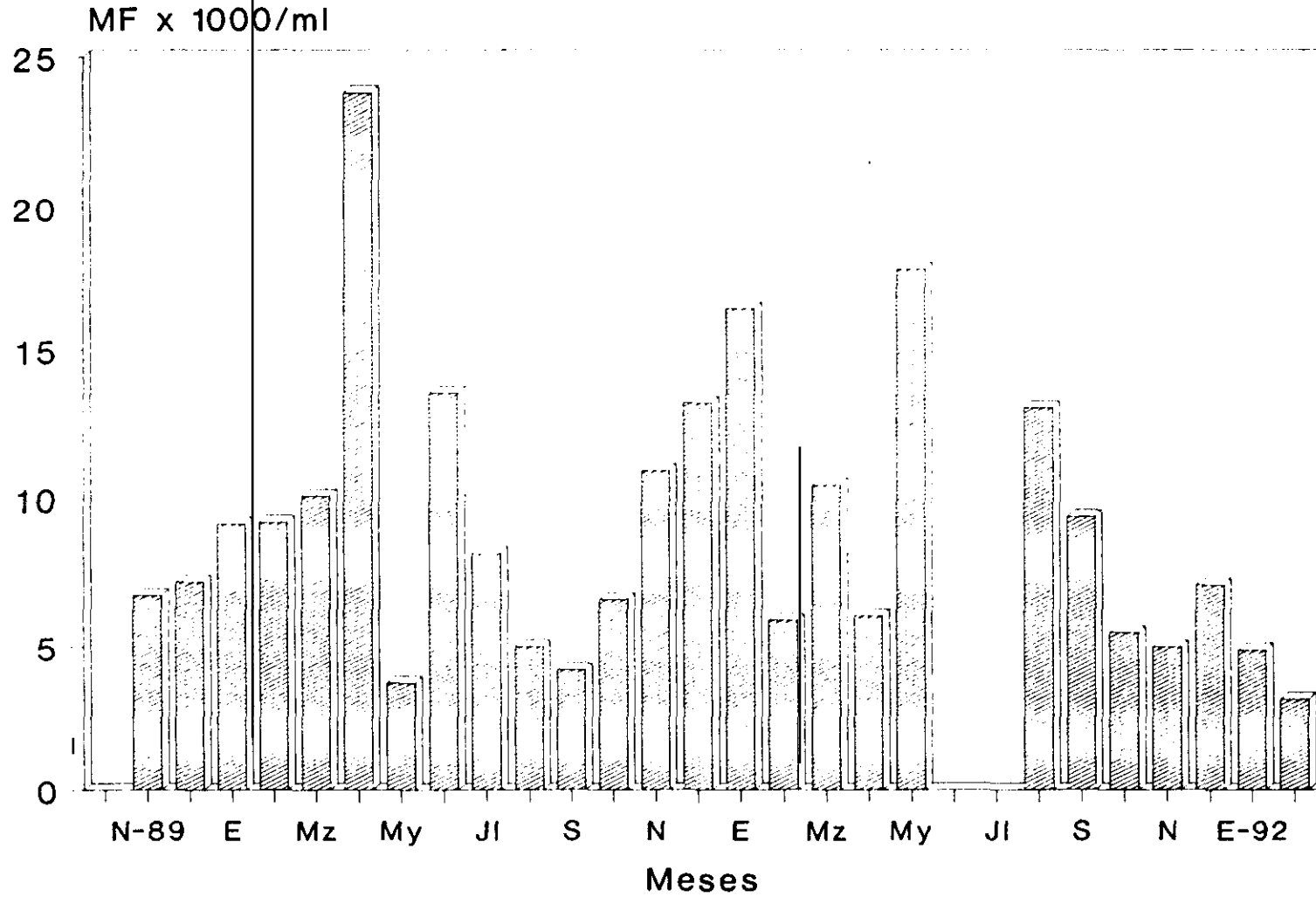
Porcentaje diario de parasitación en la infestación de adultos de *R. sanguineus*.

Día	♀	♂	Total
0	16,6	12,5	14,3
1	66,6	100	75
2	50	0	40
3	75	0	60
4	40	16,6	27,3
5	16,6	50	33,3
6	0	50	25,5
7	100	33,3	50
8	33,3	50	40
9	33,3	0	20
10	0	100	40
11	100	0	33,3
12			
13	0	12,5	10
14	50	66,6	60
15	50	33,3	40
16	100	0	50
17		50	50
18	100	80	83,3
19	20	100	33,3
20	0	0	0
21	25	16,6	20
22	0	20	10
23	0	0	0
24	0	0	0
25	40	0	20
26	50	0	10
27	16,6	0	10
28	25	0	10
29	0	0	0
30	0	0	0

TABLA 4.3.3.3

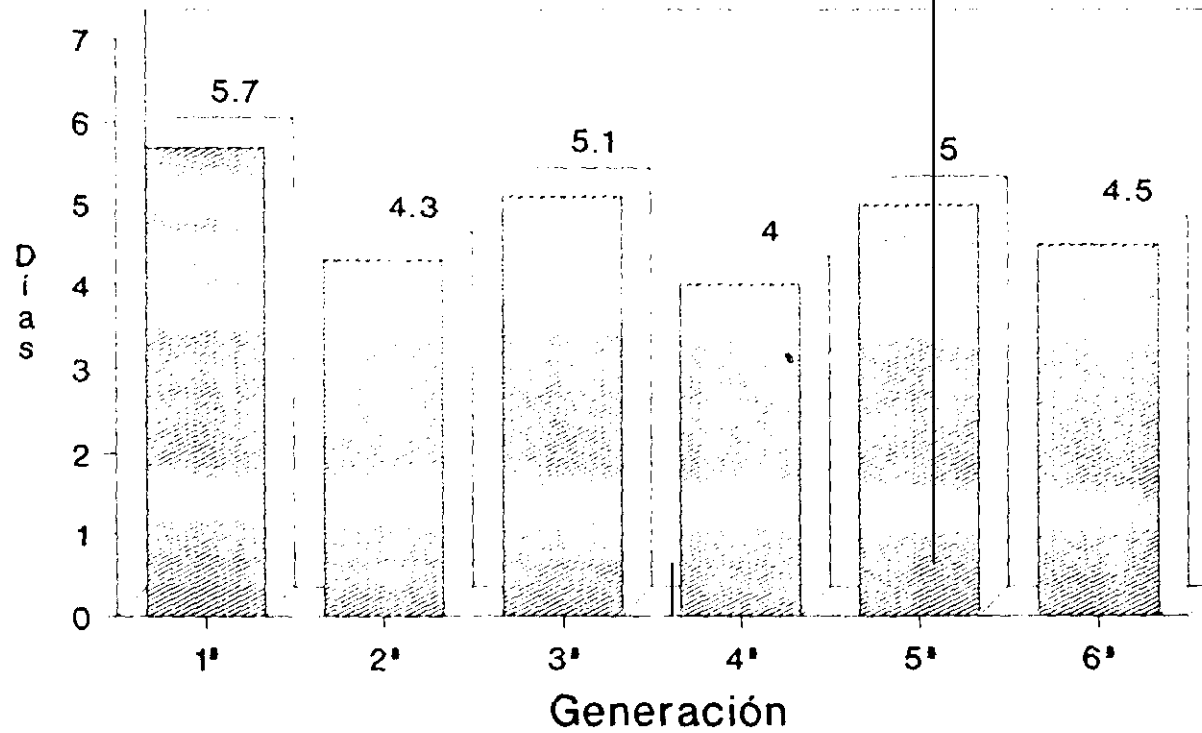
XI. GRÁFICAS

Microfilaremia del perro donador



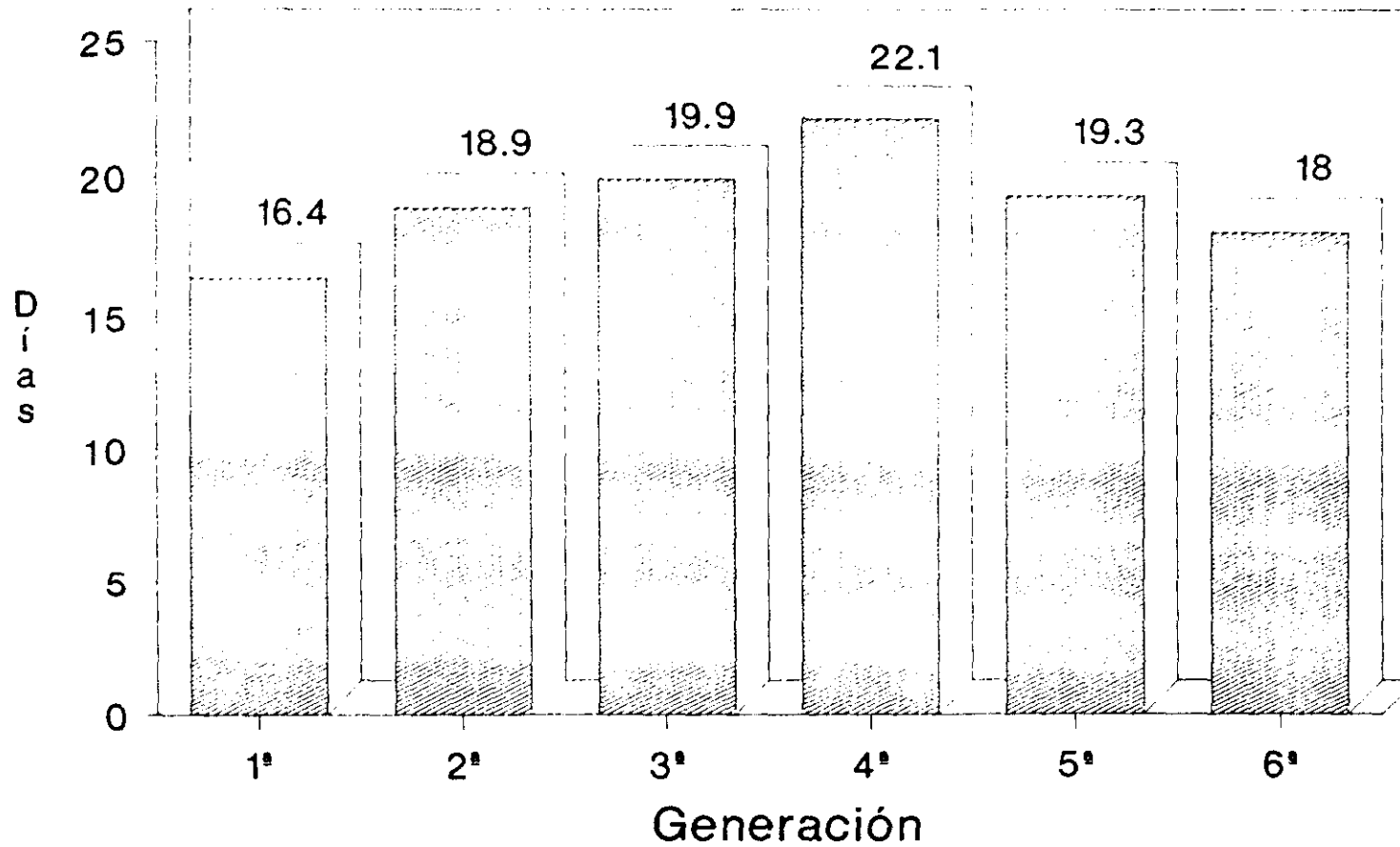
Gráfica 1

Período de preoviposición de *R. sanguineus*



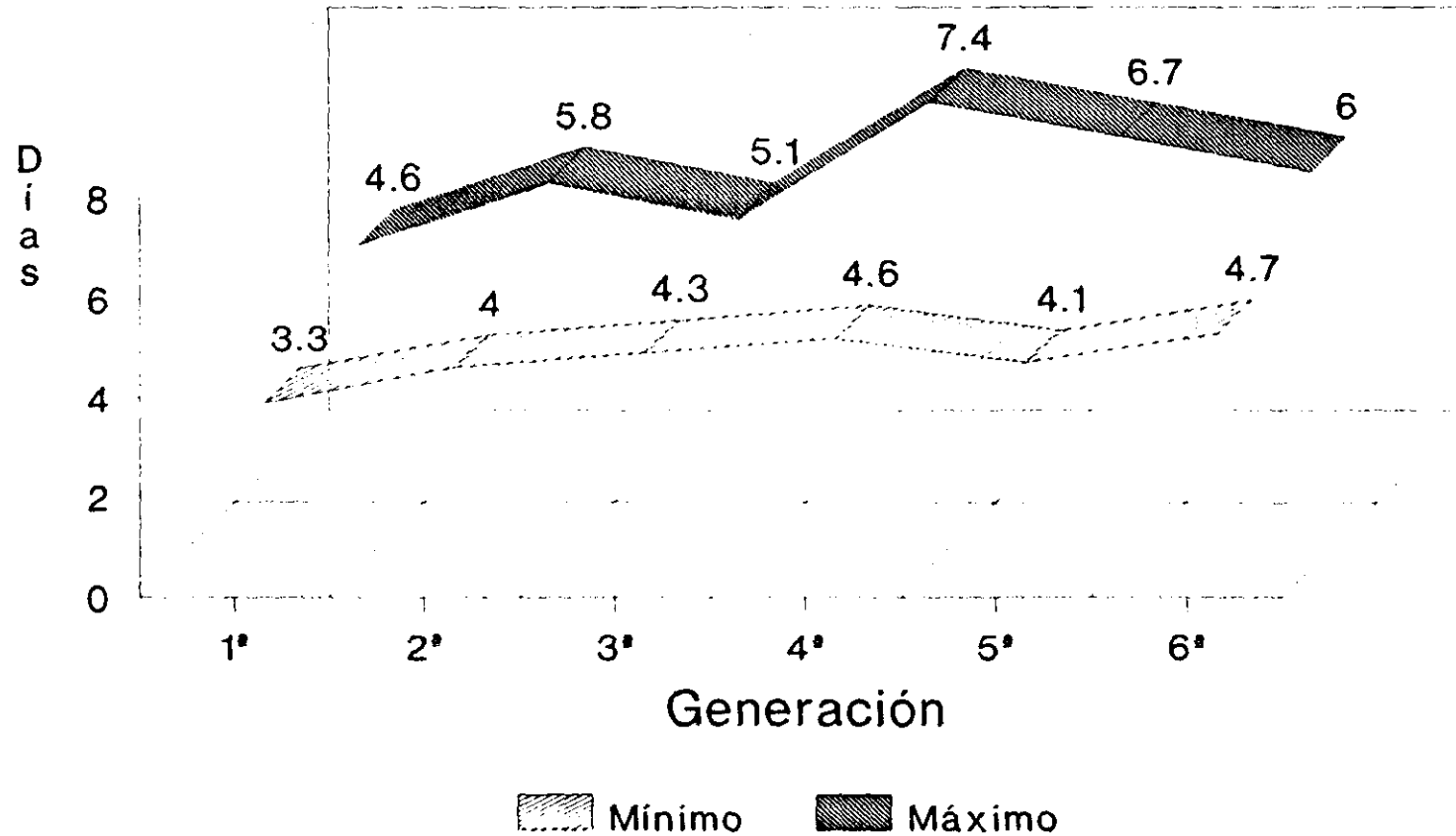
Gráfica 2.1

Período de incubación de R. sanguineus



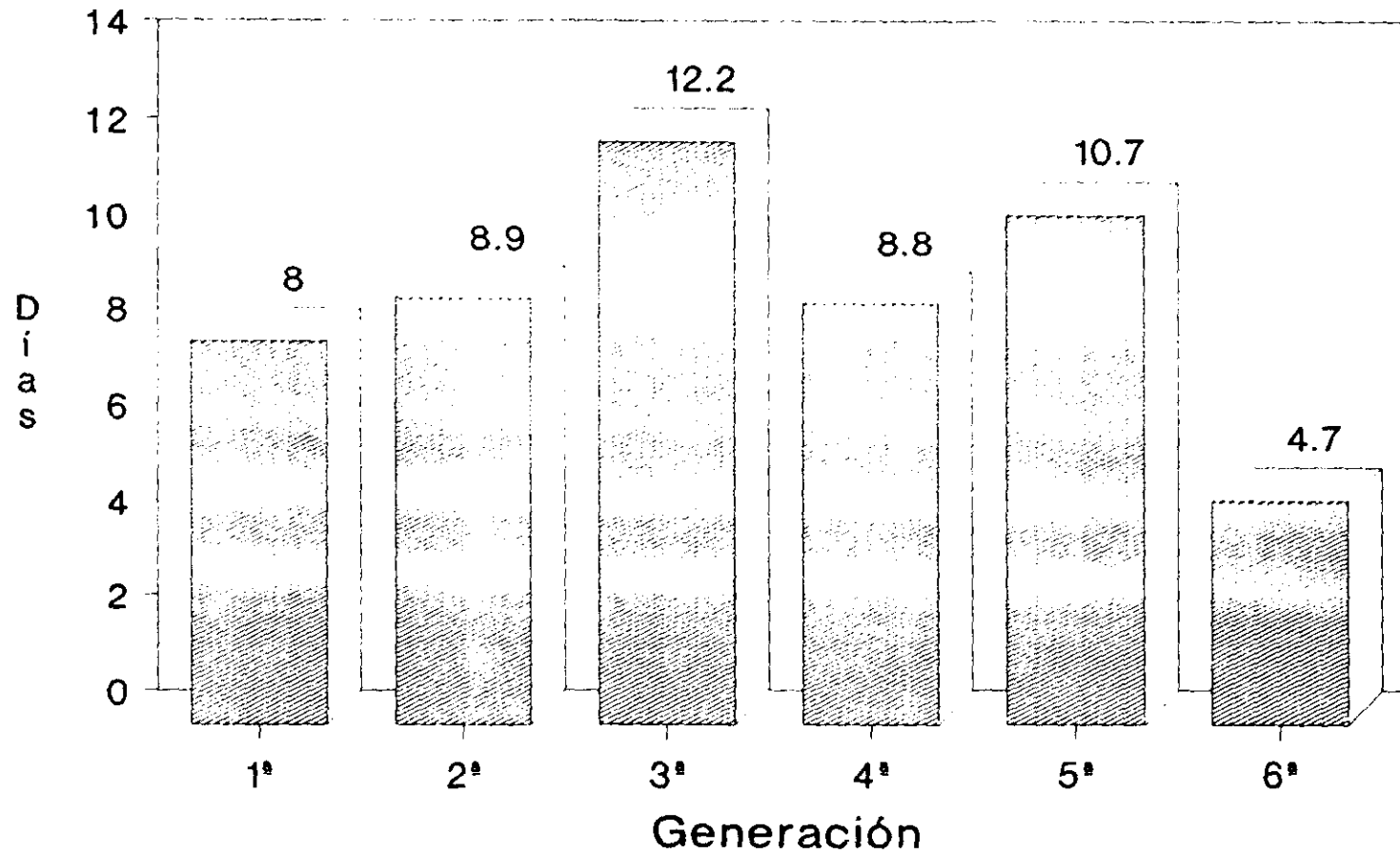
Generación
Gráfica 2.2

Período medio de alimentación de larvas de *R. sanguineus*



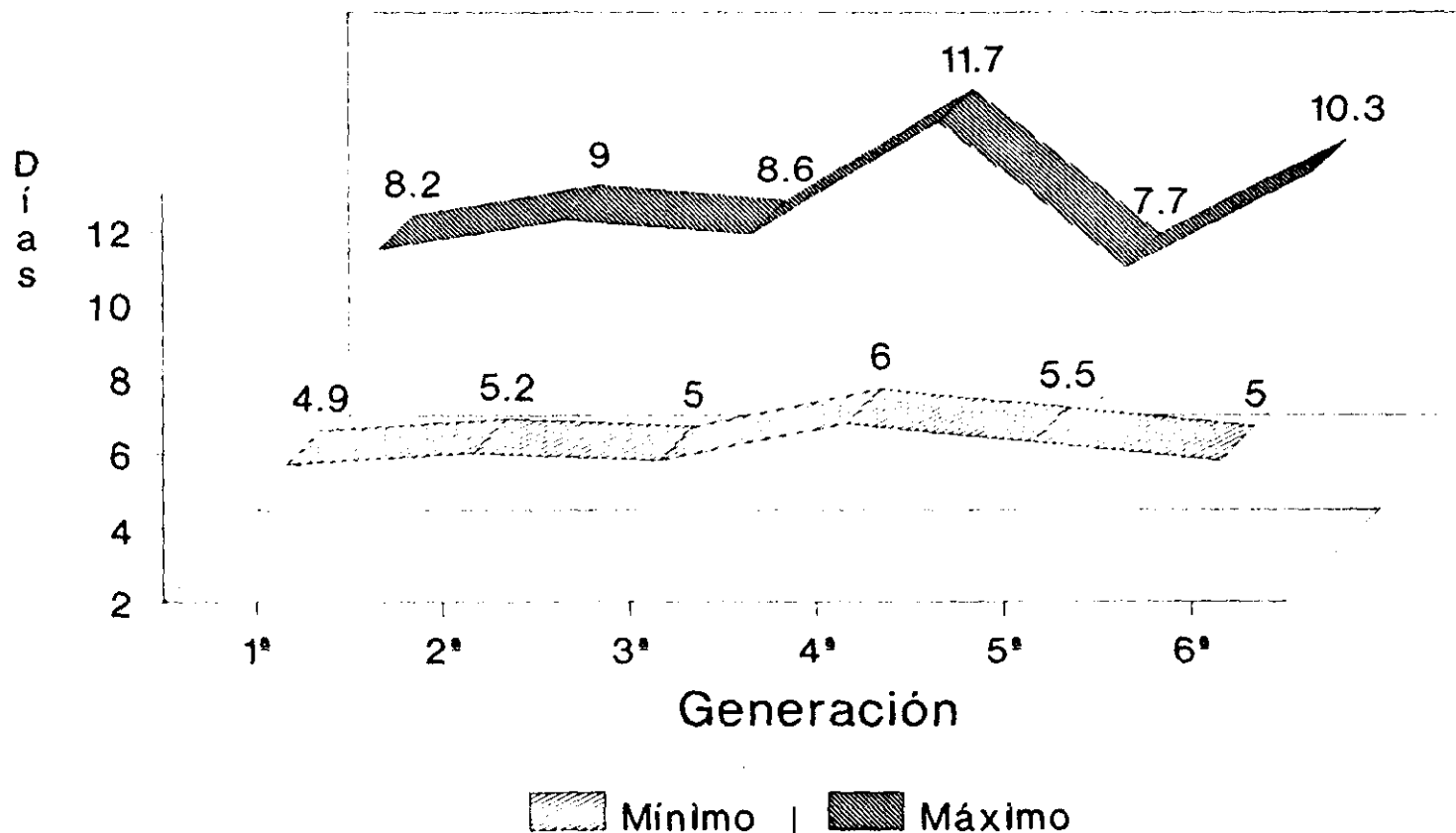
Gráfica 2.3

Período de ecdísis de larvas a ninfas de R. sanguineus



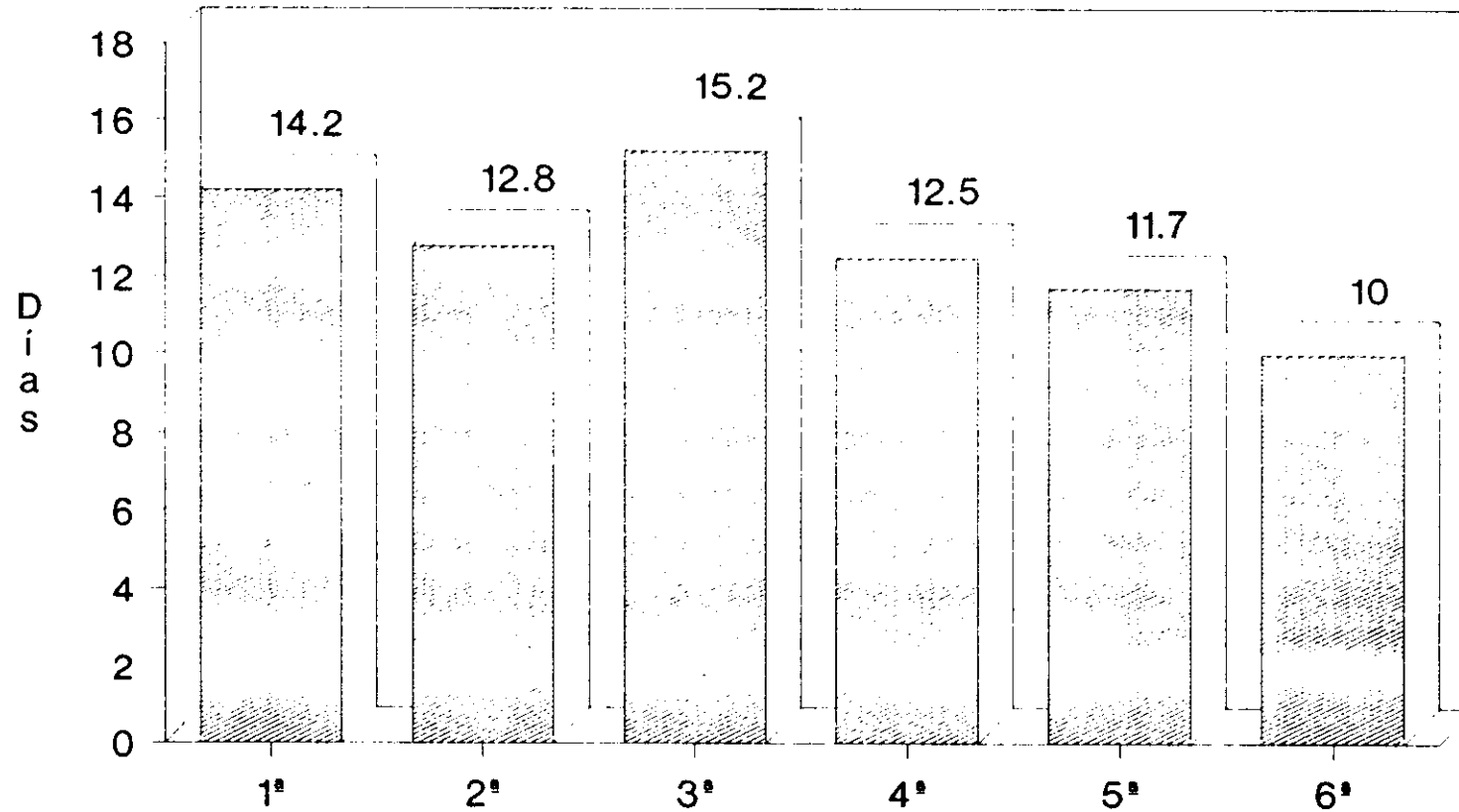
Generación
Gráfica 2.4

Período medio de alimentación de ninfas de R. sanguineus



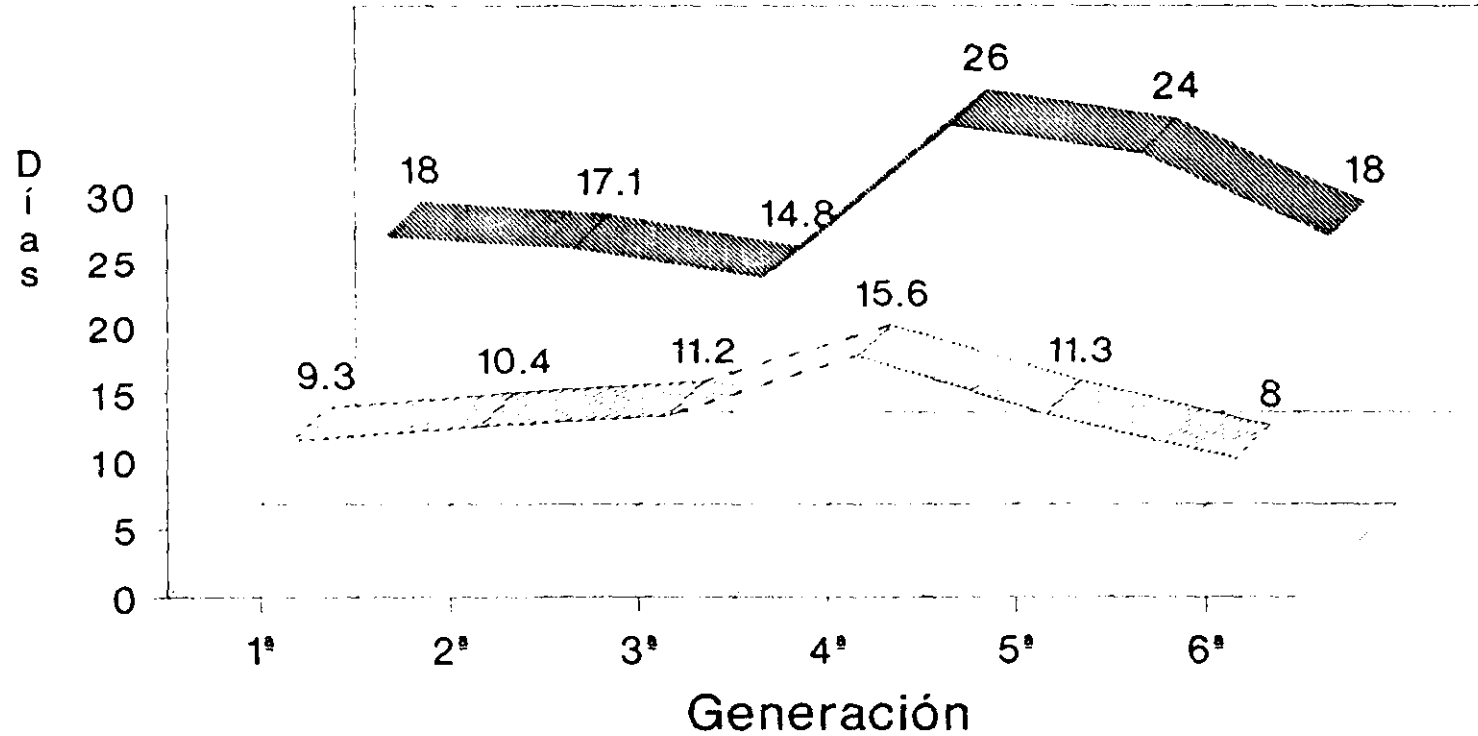
Gráfica 2.5

Período de ecdísis de ninfas a adultos de R. sanguineus



Generación
Gráfica 2.6

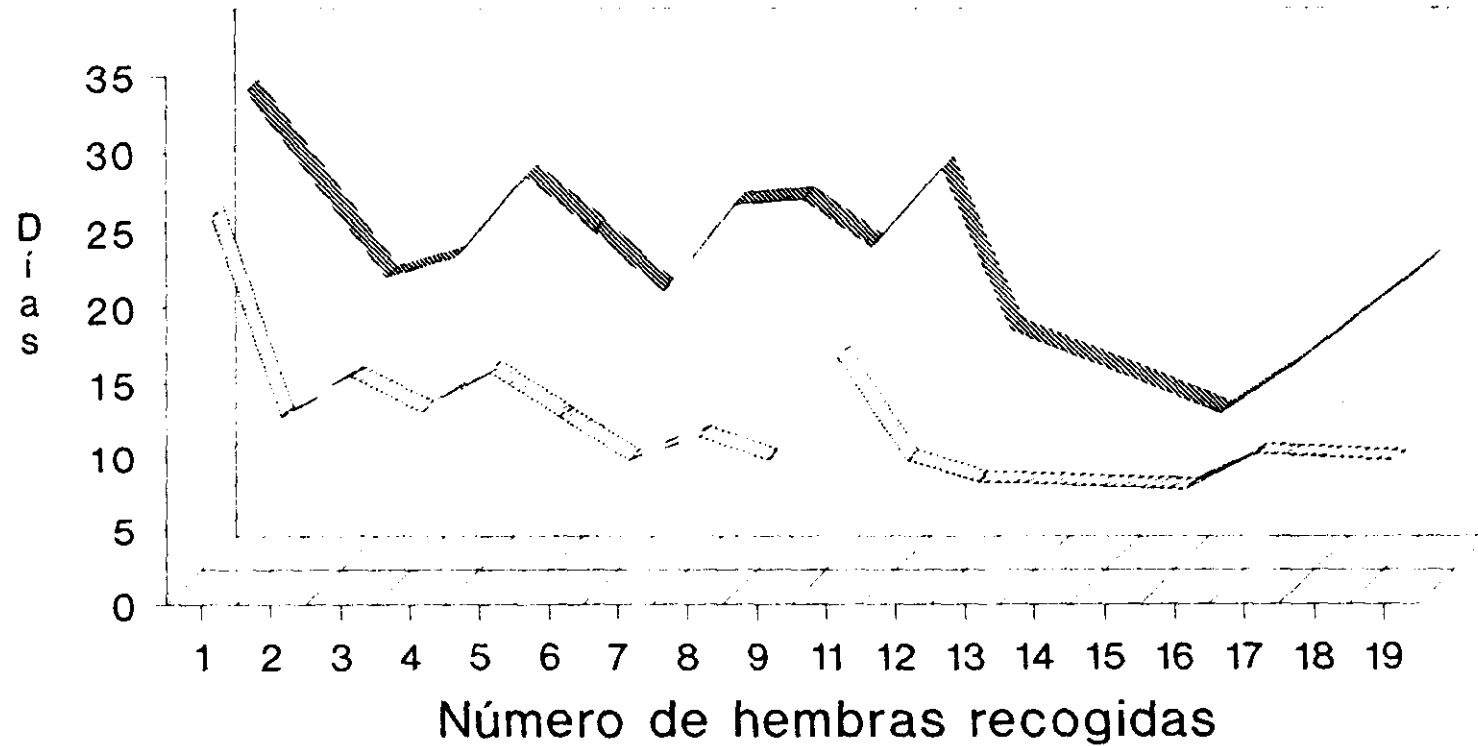
Período medio de alimentación de hembras de R. sanguineus



▨ Mínimo ▨ Máximo

Gráfica 2.7.1

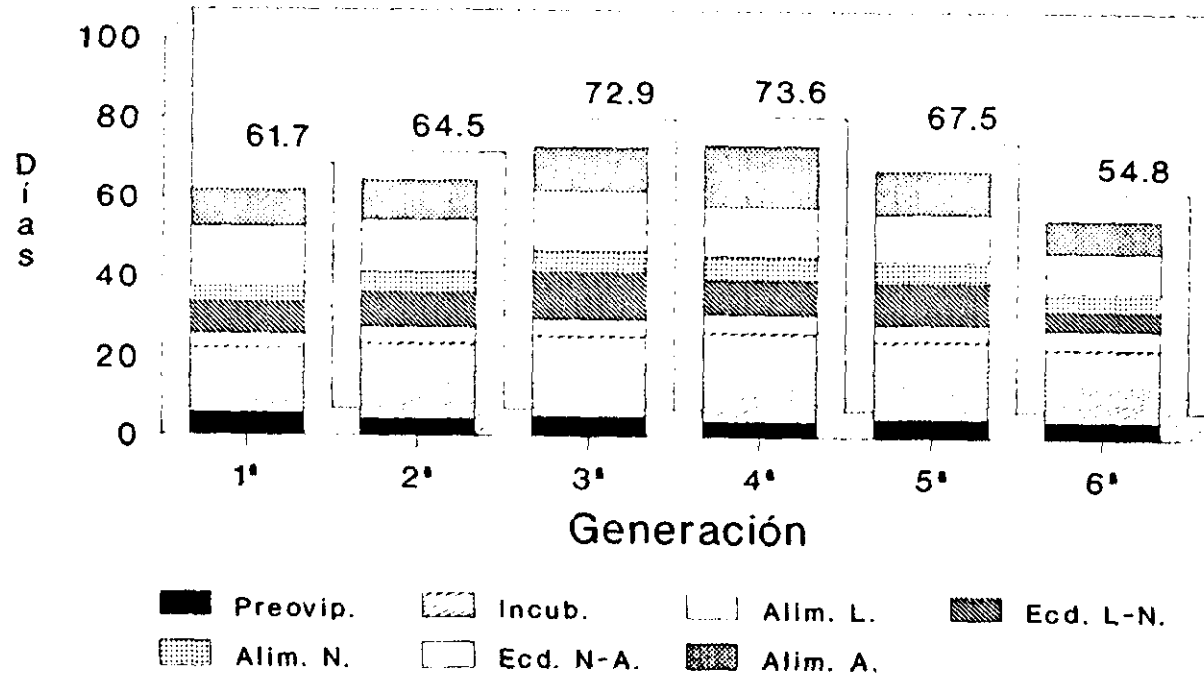
Relación número de hembras / tiempo de alimentación



▨ Mínimo ▨ Máximo

Gráfica 2.7.2

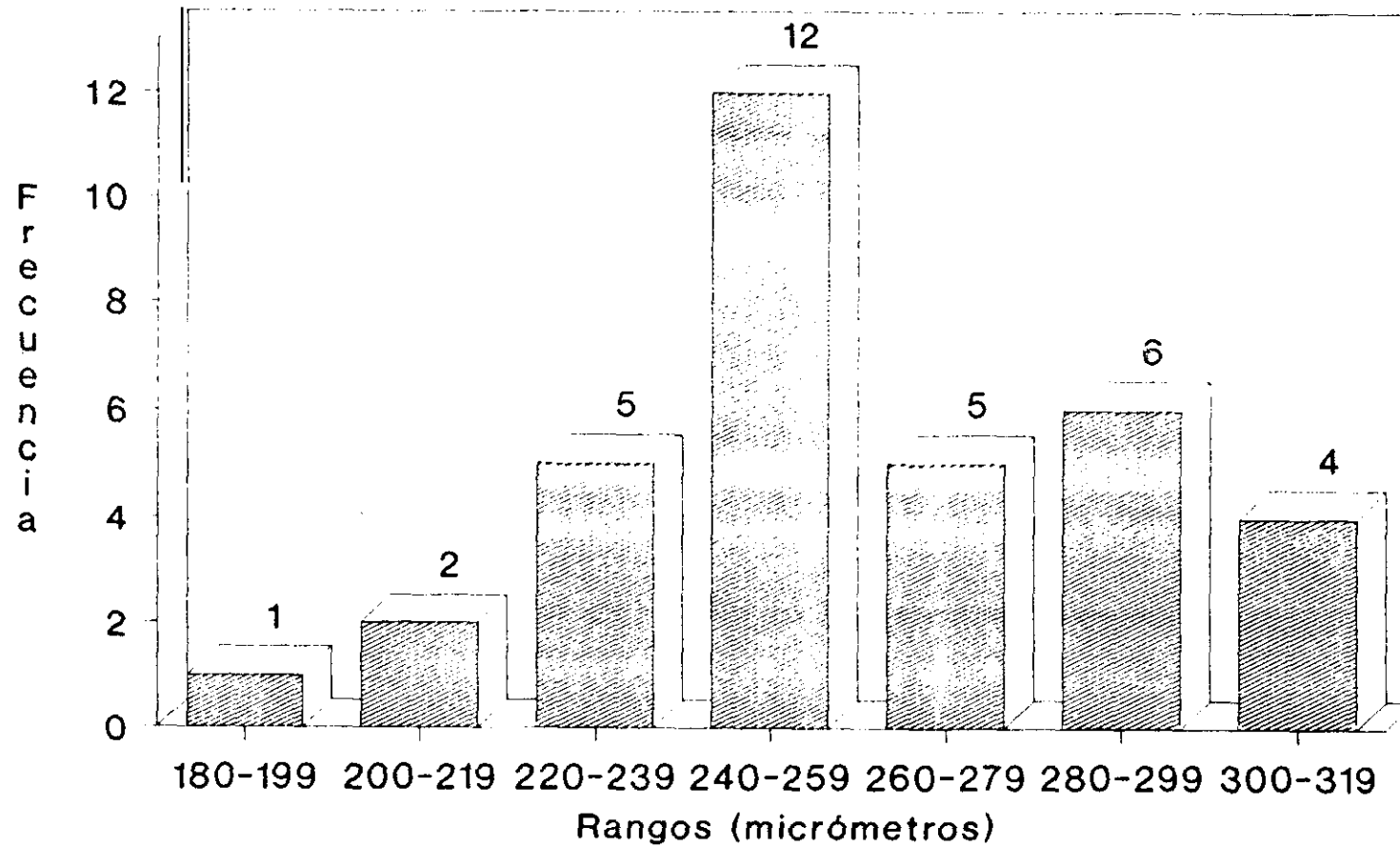
Duración mínima del ciclo biológico de R. sanguineus (*)



(*) Excepto períodos de prealimentación

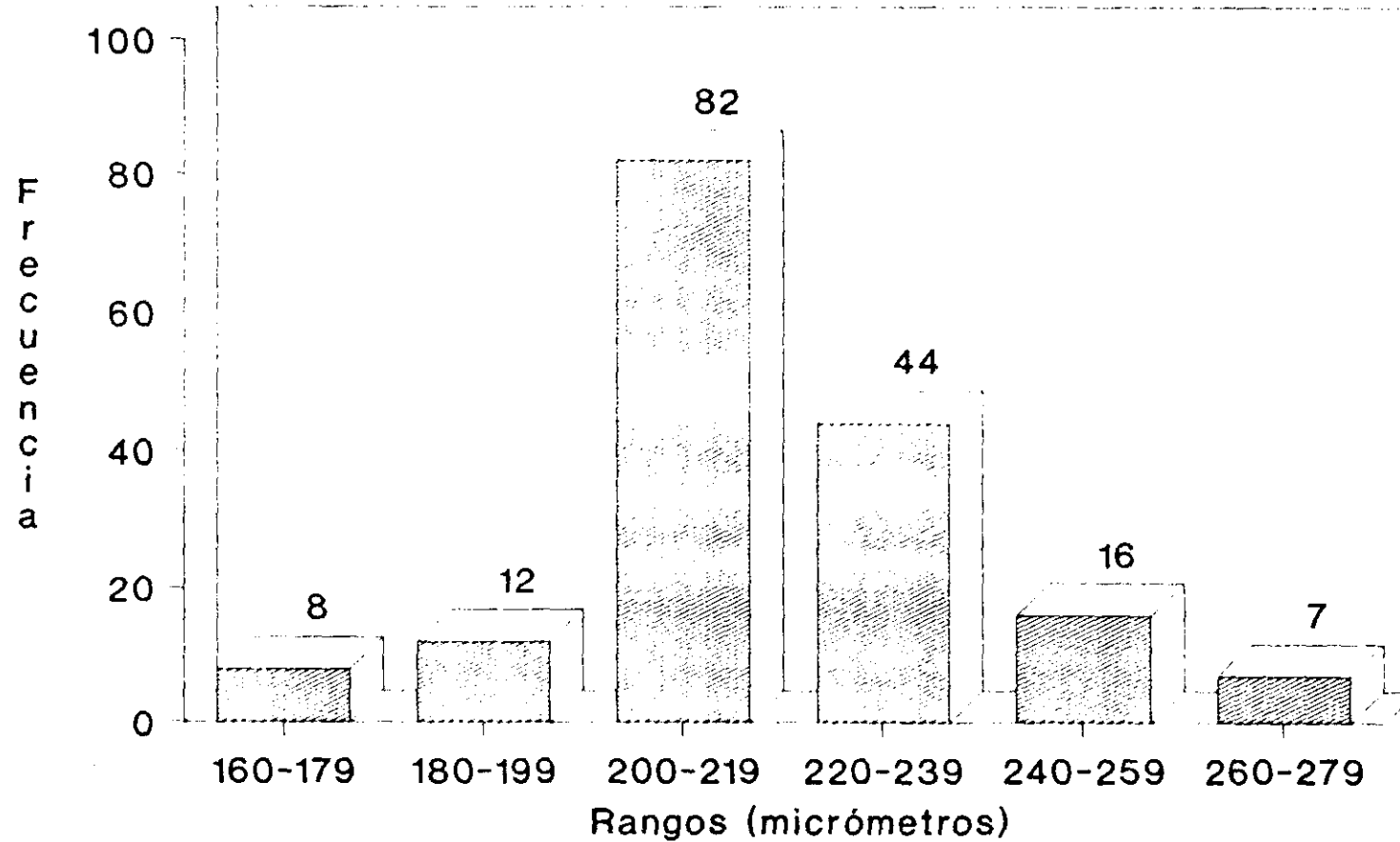
Gráfica 2.8

Long. de las microfilarias hemáticas de D. dracunculoides



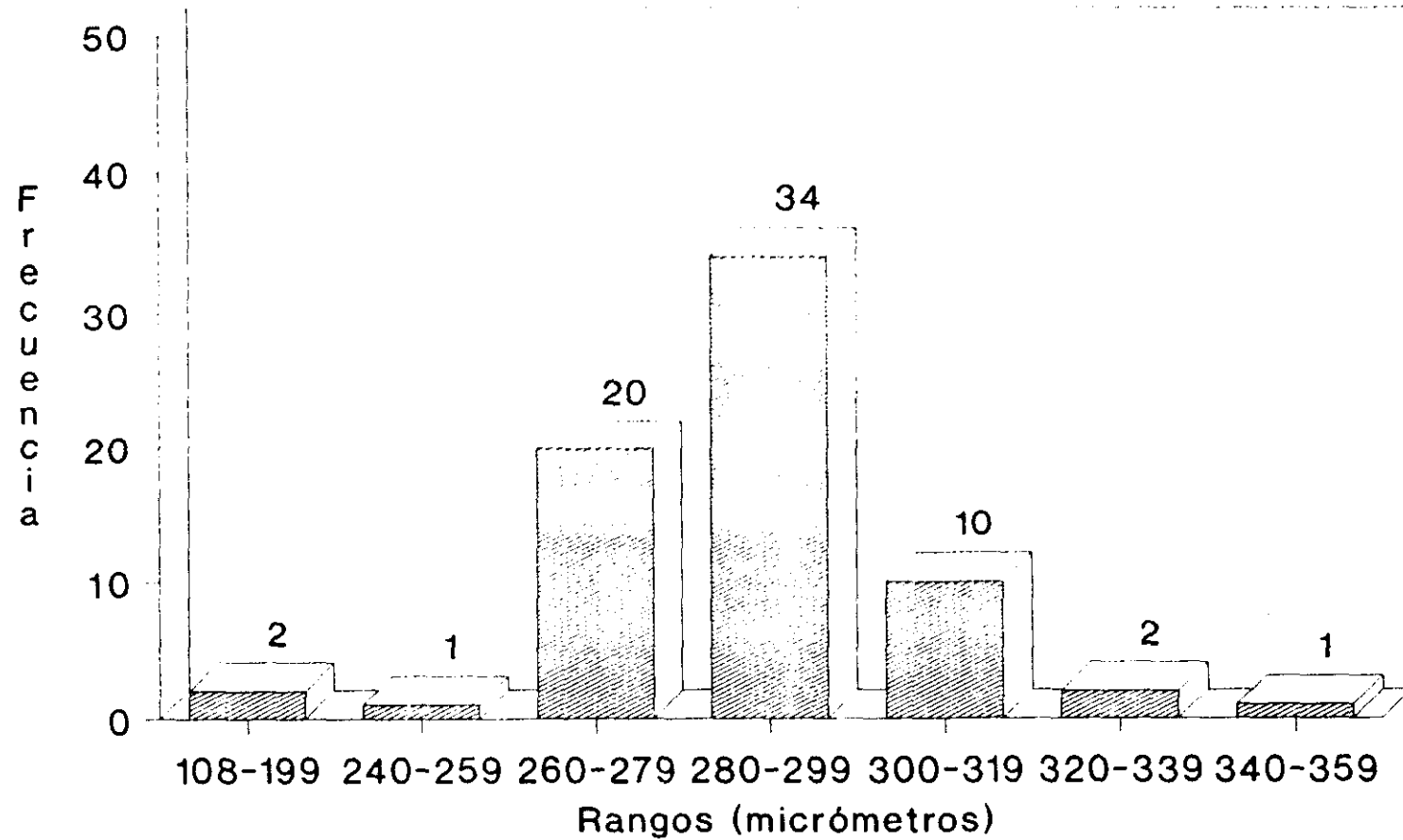
Gráfica 3.1

Long. de las microfilarias recogidas en R. sanguineus



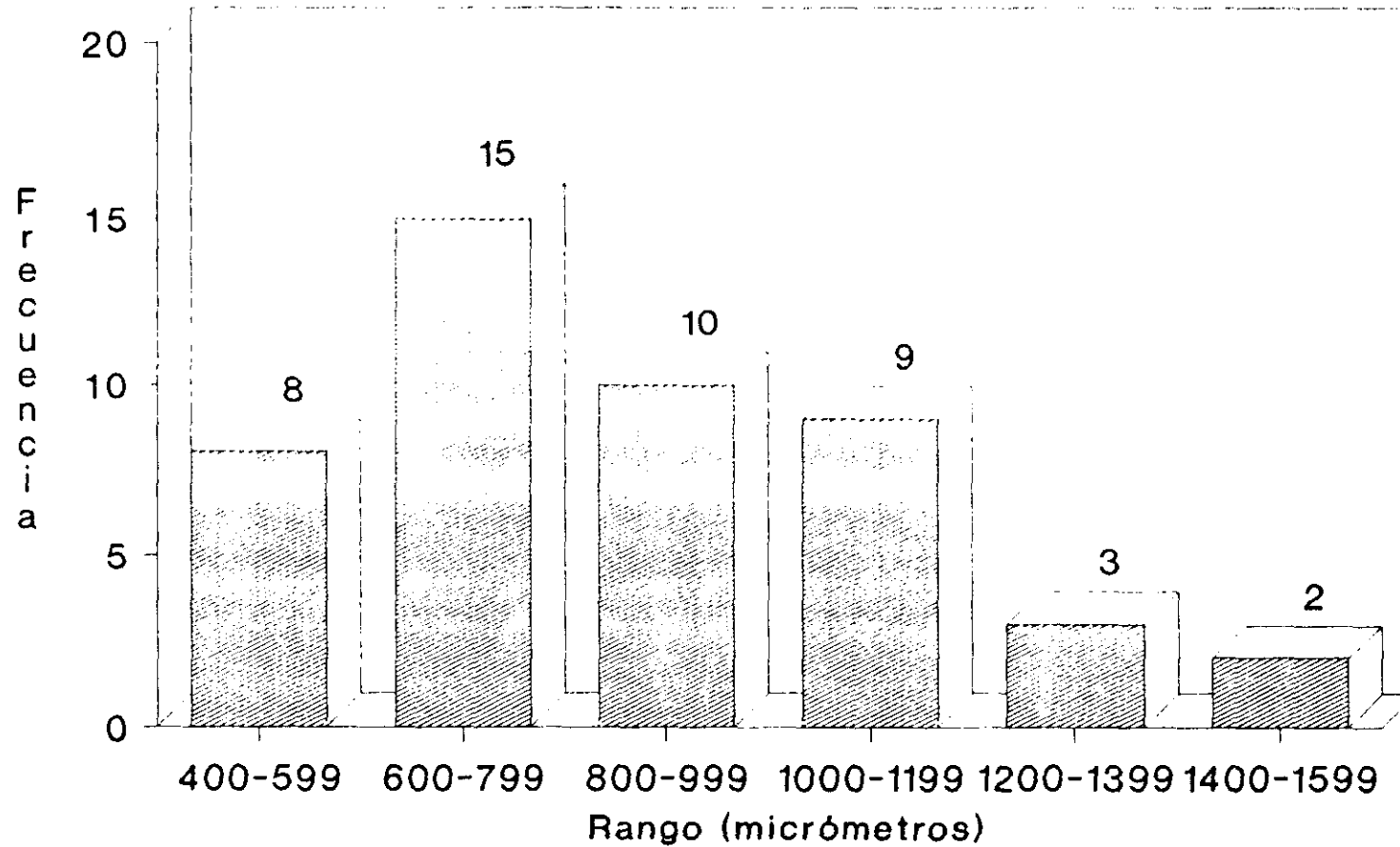
Gráfica 3.2

Long. del estadio I de *D. dracunculoides*



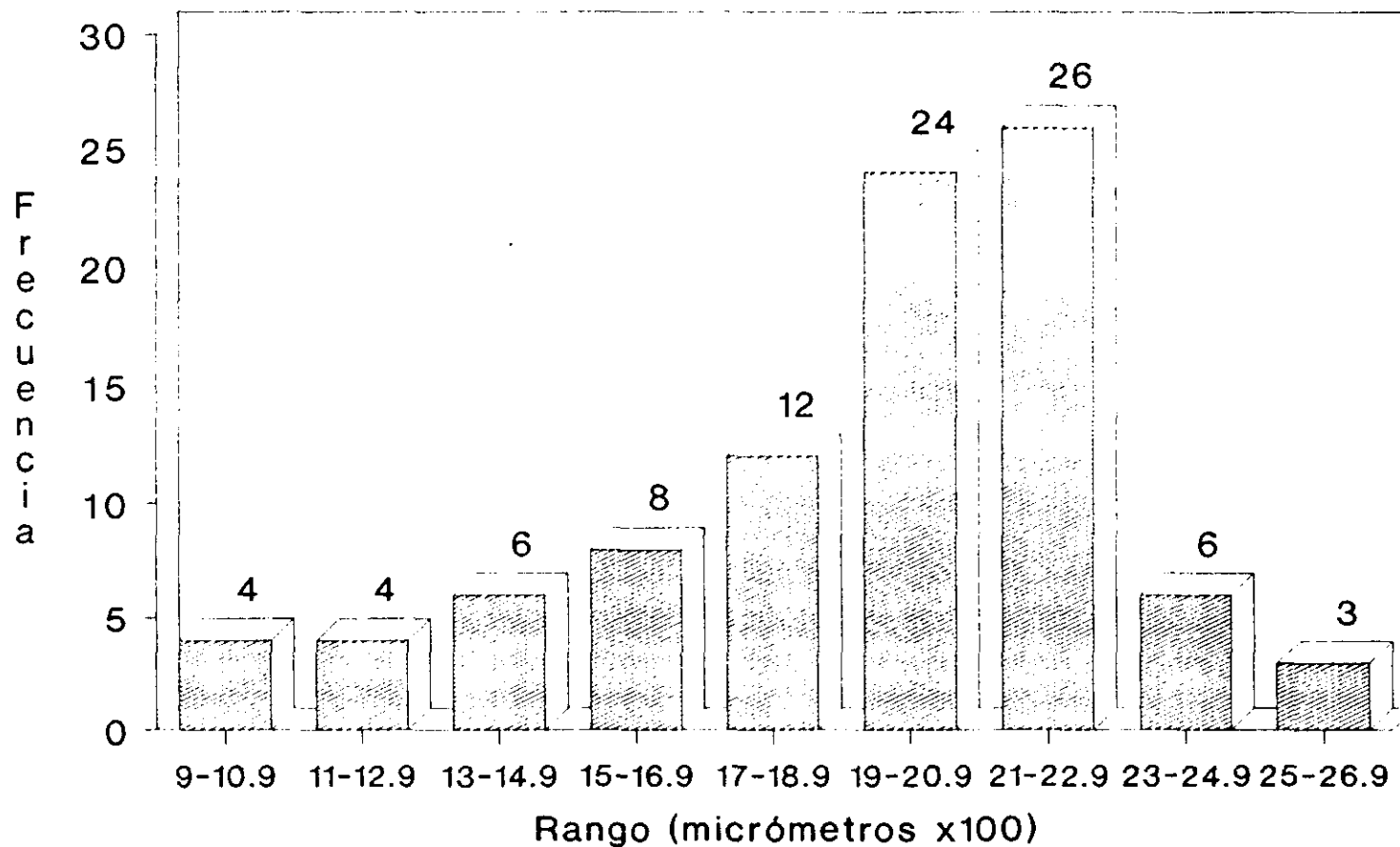
Gráfica 3.3

Long. del estadio II de *D. dracunculoides*



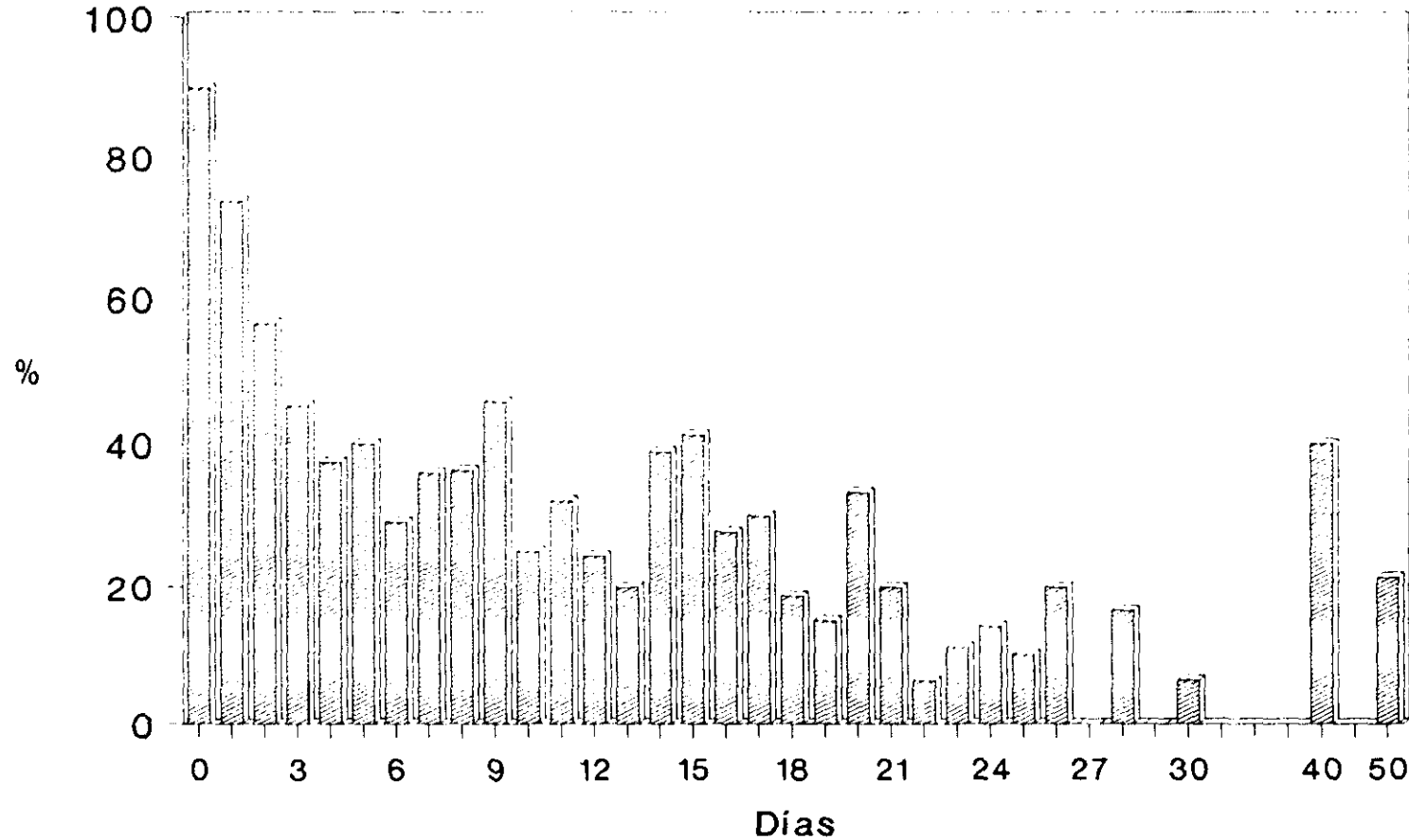
Gráfica 3.4

Long. del estadio III de D. dracunculoides



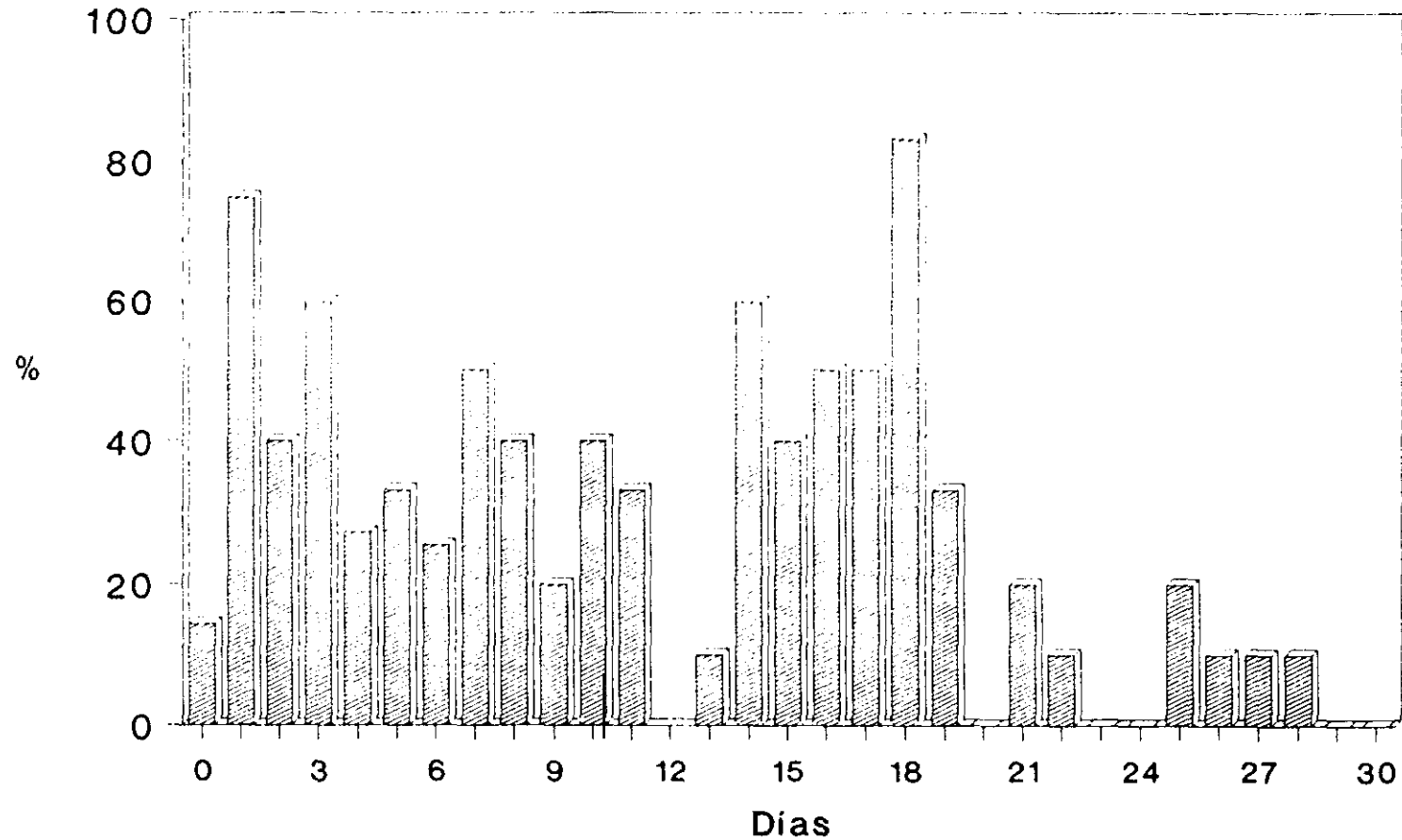
Gráfica 3.5

Porcentaje diario de parasitación en ninfas infestadas de R. sanguineus



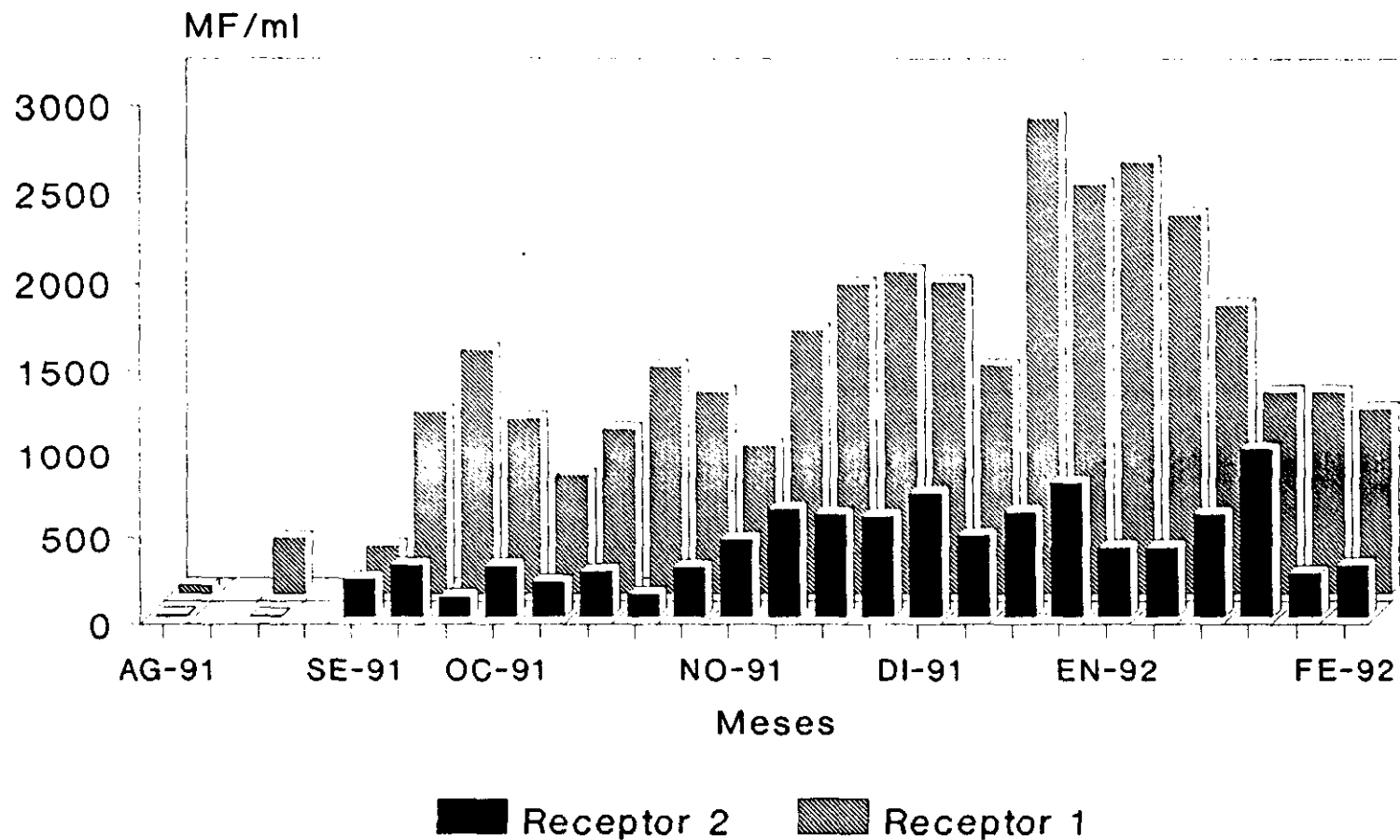
Gráfica 4.1

Porcentaje diario de parasitación en adultos infestados de R. sanguineus



Gráfica 4.2

Evolución de la microfilaremia en los perros receptores



Gráfica 5