

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS



Tesis para acceder al título de Doctora en Ciencias Veterinarias

**Estudio eco-epidemiológico de las garrapatas
(Acari: Ixodidae) del norte de Misiones, Argentina**

Autora: Vet. Daniela Lamattina

Instituto Nacional de Medicina Tropical, Ministerio de Salud de la Nación

Director: Dr. Santiago Nava

Laboratorio de Parasitología e Inmunología, Estación Experimental Agropecuaria Rafaela,
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA Rafaela) / Consejo Nacional de
Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

Co-Director: Dr. Pablo M. Beldoménico

Laboratorio de Ecología de Enfermedades, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICIVET
Litoral), Universidad Nacional del Litoral / Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y
Técnicas (CONICET)

«Ha llegado la hora de la mujer que comparte una causa pública y ha muerto la hora de la mujer como valor inerte y numérico dentro de la sociedad. Ha llegado la hora de la mujer que piensa, juzga, rechaza o acepta, y ha muerto la hora de la mujer que asiste, atada e impotente, a la caprichosa elaboración política de los destinos de su país, que es, en definitiva, el destino de su hogar. Ha llegado la hora de la mujer argentina, íntegramente mujer en el goce paralelo de deberes y derechos comunes a todo ser humano que trabaja, y ha muerto la hora de la mujer compañera ocasional y colaboradora ínfima. Ha llegado, en síntesis, la hora de la mujer argentina redimida del tutelaje social, y ha muerto la hora de la mujer relegada a la más precaria tangencia con el verdadero mundo dinámico de la vida moderna».

(Eva Perón habla a las mujeres, 12 de marzo de 1947).

Agradecimientos

Fue un verdadero privilegio tener a Santiago como director. A él, todo mi agradecimiento y admiración. Gracias por ayudarme a consolidar la satisfacción del esfuerzo continuo, persistente e incansable, y gracias por la generosidad para transferir conocimientos. En el mismo sentido, gracias a Pablo por delinear mis excitantes primeros pasos en el mundo de la investigación y contagiarme la curiosidad de niña que espero sentir toda la vida.

Otro gran agradecimiento es para mi familia. Mamá, Papá, Manita y Minino. Gracias por el apoyo en todas las formas imaginables, la confianza, el estímulo permanente. Y gracias a las abuelas y abuelos, tías y tíos, primas y primos, más cercanos o más lejanos, pero siempre presentes. A mis amigos de siempre, mis amigos de Mardel, Julina, mis amigos de Tandil, por tantos años felices. Tuve mucha suerte, nunca me faltó nada.

Siempre que una está lejos de su familia, los amigos se convierten en familia y sustento emocional. Gracias eternas a mi familia iguazuense, y acá es difícil establecer un orden. Especialmente a Marie y Marian, mis 'hermanos', Nil y Mari, mis 'papás', Mono, Negro, Dani, Eze, Mosqui, Flaca, Maru, Lu, Bide, Tiri, Martín, Pedro, y aquellos que forman parte de la más extensa familia del INMeT, con quienes hace más de cinco años comparto un promedio de 10 horas diarias de convivencia, Pame, Chiqui, Mara, Mile, Eli, Lori, Juli, Marian, Magui, Vicky, Ramón, Danny, Angie, Ariel, Pau, Pere, y podría seguir... A Daniel, gracias por defender este proyecto con la misma tenacidad siempre.

A los compañeros y amigos de Rafaela y Esperanza, Santa Fe, por la gran colaboración para la concreción de este trabajo, y por los alojamientos, risas y cariño: Eve, Patrich, Belenchu, Sebi, Cachito, el Dani, Nanu, Majo, Vale, Aye. A Gabriel Cicuttin por darme una enorme mano en el procesamiento de muestras de tejidos y a Pablo Teta por la ayuda en la determinación taxonómica de roedores y marsupiales.

A la Secretaría de Posgrado de la FCV-UNL por el asesoramiento, la información y la excelente predisposición.

A los compañeros de Iguazú por compartir conmigo la lucha social. Porque las dificultades de habitar un punto remoto del país se olvidan cuando se palpan logros, se convidan saludos y sonrisas, hielos, mates y tererés, y sobre todo manos.

Finalmente, a los responsables de 12 años (2003-2015) de crecimiento de la ciencia y tecnología de nuestro país, por el Ministerio de Ciencia y Tecnología, el Ministerio de Salud, las universidades nacionales públicas y gratuitas, los institutos de investigación, y luego de muchos etcéteras, por la creación del Instituto Nacional de Medicina Tropical en Puerto Iguazú en el año 2011.

ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS.....	iv
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Taxonomía, biología y ecología de garrapatas	5
1.1.1. Clasificación taxonómica	5
1.1.2. Caracteres morfológicos	6
1.1.3. Ciclo de vida	8
1.1.4. Distribución espacial y temporal de las garrapatas	12
1.2. Importancia sanitaria de las garrapatas.....	13
1.2.1. Garrapatas sobre hospedadores.....	15
1.3. Bacterias del orden Rickettsiales transmitidas por garrapatas.....	16
1.3.1. Bacterias de los géneros <i>Anaplasma</i> , <i>Ehrlichia</i> y <i>Rickettsia</i>	17
1.4. Las garrapatas de Argentina y del norte de la provincia de Misiones	23
1.5. Situación de las rickettsiosis en Argentina y la región	24
2. OBJETIVOS.....	28
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
3.1. Área de estudio	31
3.2. Colecta de muestras.....	32
3.2.1. Colecta de garrapatas sobre la vegetación	32
3.2.2. Colecta de garrapatas y muestras de tejidos sobre hospedadores	34
3.3. Determinación taxonómica de garrapatas.....	40
3.4. Análisis estadísticos.....	43
3.4.1. Caracterización espacial de la comunidad de garrapatas	43
3.4.2. Variación temporal de la comunidad de garrapatas	44
3.4.3. Modelos de parasitismo en mamíferos medianos	44
3.5. Detección de Rickettsiales en garrapatas y tejidos de los hospedadores.....	45
3.5.1. Extracción de ADN.....	46
3.5.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	47
3.5.3. Lectura de resultados	50
3.5.4. Purificación de productos de PCR, secuenciación y análisis de secuencias.....	50
4. RESULTADOS	51

4.1. Muestras colectadas	52
4.1.1. Garrapatas colectadas sobre <i>Nasua nasua</i> y <i>Didelphis aurita</i>	60
4.2. Análisis estadísticos.....	61
4.2.1. Caracterización espacial de la comunidad de garrapatas	61
4.2.2. Variación temporal de la abundancia de garrapatas	62
4.2.3. Modelos de parasitismo en mamíferos medianos	68
4.3. Detección de Rickettsiales en garrapatas y tejidos de hospedadores	73
4.3.1. Infección con Rickettsiales en garrapatas colectadas sobre la vegetación.....	74
4.3.2. Infección con Rickettsiales en garrapatas colectadas sobre hospedadores	75
4.3.3. Rickettsiales en tejidos.....	83
5. DISCUSIÓN.....	85
5.1. Garrapatas del norte de Misiones.....	86
5.2. Caracterización espacial.....	86
5.3. Variación temporal.....	89
5.4. Modelos de parasitismo en hospedadores.....	92
5.5. Detección de Rickettsiales.....	95
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	100
Referencias.....	105
ANEXO: Trabajos publicados en relación al estudio eco-epidemiológico de las garrapatas del norte de Misiones	131

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies del género <i>Anaplasma</i> de interés médico y veterinario, sus principales vectores y distribución	18
Tabla 2. Especies del género <i>Ehrlichia</i> de interés médico y veterinario, sus principales vectores y distribución	19
Tabla 3. Clasificación de especies del género <i>Rickettsia</i> de interés médico, sus principales vectores y distribución	21
Tabla 4. Número de garrapatas colectadas sobre hospedadores y sobre la vegetación, 2014-2016. Entre paréntesis, número de individuos infestados	57
Tabla 5. Garrapatas colectadas sobre aves en el Parque Nacional Iguazú, 2014-2016. I/E, Infestados/Examinados	59
Tabla 6. Prevalencia, abundancia media y límites de los intervalos de confianza de las garrapatas colectadas sobre <i>Nasua nasua</i> y <i>Didelphis aurita</i> . En paréntesis, número de individuos capturados y garrapatas colectadas	61
Tabla 7. Comparación por estación del número de garrapatas colectadas sobre la vegetación en el ambiente de selva, 2014–2016	63
Tabla 8. Variables explicatorias asociadas a la abundancia de <i>Amblyomma coelebs</i> y a la presencia de <i>Amblyomma brasiliense</i> , <i>Amblyomma ovale</i> y <i>Haemaphysalis juxtakochi</i> sobre <i>Nasua nasua</i> y <i>Didelphis aurita</i> , resultado de la simplificación de modelos lineales generalizados	70
Tabla 9. Resultados de PCR para amplificación de un fragmento del gen rickettsial gltA en garrapatas colectadas sobre hospedadores en el norte de Misiones. M, macho; H, hembra; N, ninfa; L, larva	76
Tabla 10. Resultados de PCR para amplificación de un fragmento de los genes 16S de <i>Ehrlichia</i> y <i>Anaplasma</i> y msp1 de <i>Anaplasma</i> en sangre de hospedadores capturados en el norte de Misiones	84
Tabla 11. Resultados de PCR para amplificación de un fragmento de los genes 16S de <i>Ehrlichia</i> y <i>Anaplasma</i> y msp1 de <i>Anaplasma</i> en órganos (hígado y bazo) de roedores capturados en el norte de Misiones	84

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Caracteres morfológicos de las garrapatas duras (Acari: Ixodidae), vista dorsal y ventral	7
Figura 2. Ciclo de vida de tres hospedadores en garrapatas ixódidas	9
Figura 3. Ciclo de vida de un hospedador en garrapatas ixódidas	10
Figura 4. Ciclo de vida de dos hospedadores en garrapatas ixódidas	11
Figura 5. Deslizamiento de paño de tela para colecta de garrapatas sobre la vegetación en tres ambientes del norte de la provincia de Misiones. A) Ambiente de selva. B) Agroecosistema. C) Ambiente urbano	32
Figura 6. Sitios de colecta de garrapatas de vida libre en el norte de la provincia de Misiones	34
Figura 7. Procesamiento de roedores capturados en el Parque Provincial Puerto Península, Misiones	36
Figura 8. Trampas tipo Tomahawk utilizadas para la captura de mamíferos medianos en el Parque Nacional Iguazú	36
Figura 9. Procesamiento de mamíferos medianos capturados en el Parque Nacional Iguazú, Misiones	38
Figura 10. Revisación de bovinos y perros en agroecosistemas del norte de Misiones	38
Figura 11. Sitios de colecta de garrapatas <i>Amblyomma ovale</i> mediante proyectos de investigación en el norte de Misiones	40
Figura 12. Diferencia de longitud de los escudos en ninfas a) <i>Amblyomma brasiliense</i> : longitud del escudo menor a 0,75mm y b) <i>Amblyomma incisum</i> : longitud del escudo mayor a 0,75mm	41
Figura 13. Comparación del grosor en orden creciente de las espinas de la coxa I (flecha) en larvas a) <i>Amblyomma coelebs</i> , b) <i>Amblyomma brasiliense</i> y c) <i>Amblyomma incisum</i>	42
Figura 14. A) Vista dorsal del capítulo de una hembra de <i>Ixodes schulzei</i> colectada sobre <i>Nectomys squamipes</i> en el Parque Nacional Iguazú. B) Vista ventral del capítulo de una hembra de <i>Ixodes schulzei</i> . C) Hipostoma de una hembra de <i>Ixodes schulzei</i> . D) Coxas I a IV de una hembra de <i>Ixodes schulzei</i>	53
Figura 15. Árbol de máxima verosimilitud a partir de secuencias parciales del gen 16S rARN de Ixodidae. En negrita, las secuencias obtenidas de garrapatas <i>Amblyomma</i>	

<i>brasiliense</i> , <i>Amblyomma coelebs</i> y <i>Amblyomma incisum</i> . Los números representan el soporte de bootstrap de 1000 repeticiones. Entre paréntesis, los números de acceso a GenBank	55
Figura 16. Ninfas de <i>Amblyomma</i> sp. parasitando un ejemplar <i>Didelphis aurita</i> en el Parque Nacional Iguazú	60
Figura 17. Distribución mensual de garrapatas <i>Amblyomma brasiliense</i> . a) Número de garrapatas sobre la vegetación. b) Abundancia media sobre <i>Nasua nasua</i>	64
Figura 18. Distribución mensual de garrapatas <i>Amblyomma coelebs</i> . a) Número de garrapatas sobre la vegetación. b) Abundancia media sobre <i>Didelphis aurita</i> . c) Abundancia media sobre <i>Nasua nasua</i>	65
Figura 19. Distribución mensual de garrapatas <i>Amblyomma ovale</i> . a) Número de garrapatas sobre la vegetación. b) Abundancia media sobre <i>Nasua nasua</i>	66
Figura 20. Distribución mensual de garrapatas <i>Haemaphysalis juxtakochi</i> . a) Número de garrapatas sobre la vegetación. b) Abundancia media sobre <i>Nasua nasua</i>	66
Figura 21. Distribución mensual de garrapatas <i>Rhipicephalus microplus</i> . a) Número de larvas sobre la vegetación. b) Abundancia media de adultos sobre bovinos	67
Figura 22. Distribución de los datos de a) Ninfas <i>Amblyomma coelebs</i> colectadas sobre <i>Nasua nasua</i> , b) Ninfas <i>A. coelebs</i> colectadas sobre <i>Didelphis aurita</i> , c) Larvas <i>A. coelebs</i> colectadas sobre <i>D. aurita</i> en el Parque Nacional Iguazú, 2015-2016	68
Figura 23. Efecto de (a) la estación, (b) el sitio y (c) el peso sobre la carga de ninfas de <i>Amblyomma coelebs</i> sobre <i>Nasua nasua</i> . 2hnas: Dos Hermanas; EstCat: Estación Cataratas	71
Figura 24. Efecto de (a) la estación, (b) el sitio y (c) el peso sobre la carga de ninfas de <i>Amblyomma coelebs</i> sobre <i>Didelphis aurita</i> . d) Promedio del efecto predicho del sitio sobre la carga de larvas de <i>A. coelebs</i> sobre <i>D. aurita</i>	72
Figura 25. Árbol de máxima verosimilitud a partir de secuencias parciales del gen de proteína de membrana externa A (ompA). En negrita, la secuencia obtenida de ADN extraído de garrapatas <i>Amblyomma ovale</i> . Los números representan el soporte de bootstrap de 1000 repeticiones	80
Figura 26. Árbol de máxima verosimilitud a partir de secuencias parciales del gen de enzima citrato sintasa (gltA). En negrita, la secuencia obtenida de ADN extraído de garrapatas <i>Amblyomma ovale</i> . Los números representan el soporte de bootstrap de 1000 repeticiones	82

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

a	Adulto
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AICc	Criterio de Información de Akaike ajustado para muestras pequeñas
ARN	Ácido ribonucleico
ca.	<i>circa</i> - aproximadamente
cf.	<i>confer</i> - comparar, confrontar. Se aproxima al taxón conocido con algunas diferencias
CIES	Centro de Investigaciones Biológicas Subtropicales
DE	Desvío Estándar
dsb	disulfide bond formation protein - proteína de formación de puentes disulfuro
EDTA	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid - Ácido Etilen Diamino Tetraacético
EE	Error Estándar
GLM	Generalised Linear Model - Modelo Lineal Generalizado
gltA	Enzima citrato sintasa
H	Hembra
CI95%	Intervalo de Confianza del 95%
j	Juvenil
M	Macho
msp1	major surface protein 1 - proteína mayor de superficie 1
msp5	major surface protein 5 - proteína mayor de superficie 5
ompA	outer membrane protein A - proteína de membrana externa A
ompB	outer membrane protein B - proteína de membrana externa B
pb	pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction - Reacción en Cadena de la Polimerasa
PNI	Parque Nacional Iguazú
PP	Parque Provincial Puerto Península
rpm	revoluciones por minuto
rtPCR	real time PCR - PCR en tiempo real
SENLAT	Escara del cuero cabelludo y linfadenopatía del cuello luego de la picadura de garrapata

RESUMEN

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue estudiar aspectos ecológicos y epidemiológicos de las garrapatas del norte de Misiones, donde el conocimiento sobre su ecología e importancia sanitaria es escaso. Se colectaron garrapatas sobre la vegetación, y garrapatas y tejidos de hospedadores durante dos años en ambientes de selva, urbanos y agroecosistemas. Se seleccionaron muestras para la detección de bacterias de los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia* y *Rickettsia*.

Se encontró una alta diversidad y baja equitabilidad de especies en ambientes de selva, siendo bajos los índices de similitud entre ambientes. El ambiente de selva fue propicio para especies de garrapatas nativas y desfavorable para especies exóticas establecidas en ambientes antropizados.

La abundancia de garrapatas en estadio de vida libre en ambientes de selva presentó patrones marcados de distribución estacional, algunas especies presentes en algunas estaciones y otras durante todo el año con picos de abundancia. En algunas especies como *Amblyomma coelebs*, *Amblyomma brasiliense* y *Amblyomma ovale*, podría haber un ciclo de una generación por año, pero más de una cohorte podría coexistir en sus poblaciones.

Se destacó la importancia de los mamíferos medianos como *Nasua nasua* y *Didelphis aurita* para el mantenimiento de estadios inmaduros de garrapatas en la zona estudiada. Tanto las variables ambientales como las del hospedador podrían modular las cargas parasitarias.

Un porcentaje alto de muestras de tejidos de hospedadores fue positivo a la amplificación de ADN de *Ehrlichia* y *Anaplasma*. Se detectó la presencia de *Rickettsia bellii* y *Rickettsia amblyommatis*, de patogenicidad desconocida, y del patógeno humano *R. parkeri* cepa Atlantic rainforest en *A. ovale*.

ABSTRACT

The objective of this work was to study ecological and epidemiological aspects of ticks in northern Misiones, where knowledge about their ecology and sanitary importance is scarce. Ticks on vegetation, ticks on hosts and host tissues were collected during two years in forest, urban environments and agroecosystems. Samples were selected for the detection of bacteria of the genera *Anaplasma*, *Ehrlichia* and *Rickettsia*.

High species diversity and low equitability was found in forest environments, with low similarity indices among environments. The forest environment was favorable for native tick species and unfavorable for exotic species which were established in anthropized environments.

The abundance of free-living ticks showed marked seasonal patterns in forest environments, with some species present in some seasons and others during all seasons presenting peaks of abundance. In some species such as *Amblyomma coelebs*, *Amblyomma brasiliense* and *Amblyomma ovale*, there could be a cycle of one generation per year, but more than one cohort could coexist in their populations.

The importance of medium mammals such as *Nasua nasua* and *Didelphis aurita* for the maintenance of immature tick stages in the studied area was highlighted. Both environmental variables and those belonging to hosts could modulate parasitic loads.

A high proportion of host tissue samples was positive to *Ehrlichia* and *Anaplasma* DNA amplification. The presence of *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommatis*, of unknown pathogenicity, and of the human pathogen *Rickettsia parkeri* strain Atlantic rainforest in *A. ovale* was detected.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Taxonomía, biología y ecología de garrapatas

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos obligados de anfibios, reptiles, aves y mamíferos. Poseen características que las diferencian de otros artrópodos y que contribuyen a su notable éxito como vectores de numerosos microorganismos. Por ejemplo, son únicas en cuanto a su longevidad ya que individuos de algunas especies pueden sobrevivir durante años esperando encontrar un hospedador adecuado. Las garrapatas son capaces de mantener una ingesta de sangre durante largos periodos sin digerir, consumiéndola lentamente, lo cual a su vez permite la penetración de microorganismos a sus tejidos (Sonenshine, 1991).

1.1.1. Clasificación taxonómica

Las garrapatas son artrópodos arácnidos de la subclase Acari, la cual se caracteriza por la fusión extrema de los segmentos corporales. El prosoma y el opistosoma están fusionados formando el idiosoma, mientras que el aparato bucal se encuentra en el gnatosoma o capítulo en las garrapatas (Figura 1). Dentro del superorden Parasitiformes, las garrapatas constituyen el orden Ixodida, que contiene a la superfamilia Ixodoidea, que a su vez está conformada por tres familias: Ixodidae, Argasidae y Nuttalliellidae (Krantz y Walter, 2009).

Las garrapatas duras (Ixodidae) poseen un escudo esclerotizado que cubre el dorso completo en los machos y la parte anterior del dorso en las hembras, ninfas y larvas (Figura 1). Por esta razón, los machos no son capaces de expandirse con la ingesta de sangre, a diferencia de las hembras y los estadios inmaduros, los cuales se ingurgitan y aumentan varias veces su tamaño a fuerza de síntesis de nueva cutícula antes de desprenderse del hospedador. Por su parte, las garrapatas blandas (Argasidae) presentan una cutícula plegada sobre sí misma, sin escudo, y la familia Nuttalliellidae es monoespecífica, es decir está integrada por una única especie, *Nuttalliella namaqua*, la cual tiene características propias de las dos familias anteriormente citadas (Sonenshine, 1991).

Las garrapatas de la familia Ixodidae se clasifican a su vez en dos grupos con diferencias biológicas y morfológicas marcadas: Prostriata representado por el género *Ixodes* y Metastriata por los géneros restantes. Las garrapatas del género *Ixodes* se caracterizan por poseer el surco anal anterior al ano, mientras que las pertenecientes al grupo Metastriata poseen el surco anal posterior al poro anal (Sonenshine, 1991).

1.1.2. Caracteres morfológicos

La Figura 1 muestra la anatomía externa de las garrapatas de la familia Ixodidae, identificando los principales caracteres morfológicos utilizados para la determinación taxonómica. El capítulo de las garrapatas contiene los quelíceros, los palpos y el hipostoma. En los laterales del escudo se encuentran los ojos simples, ausentes en algunos géneros.

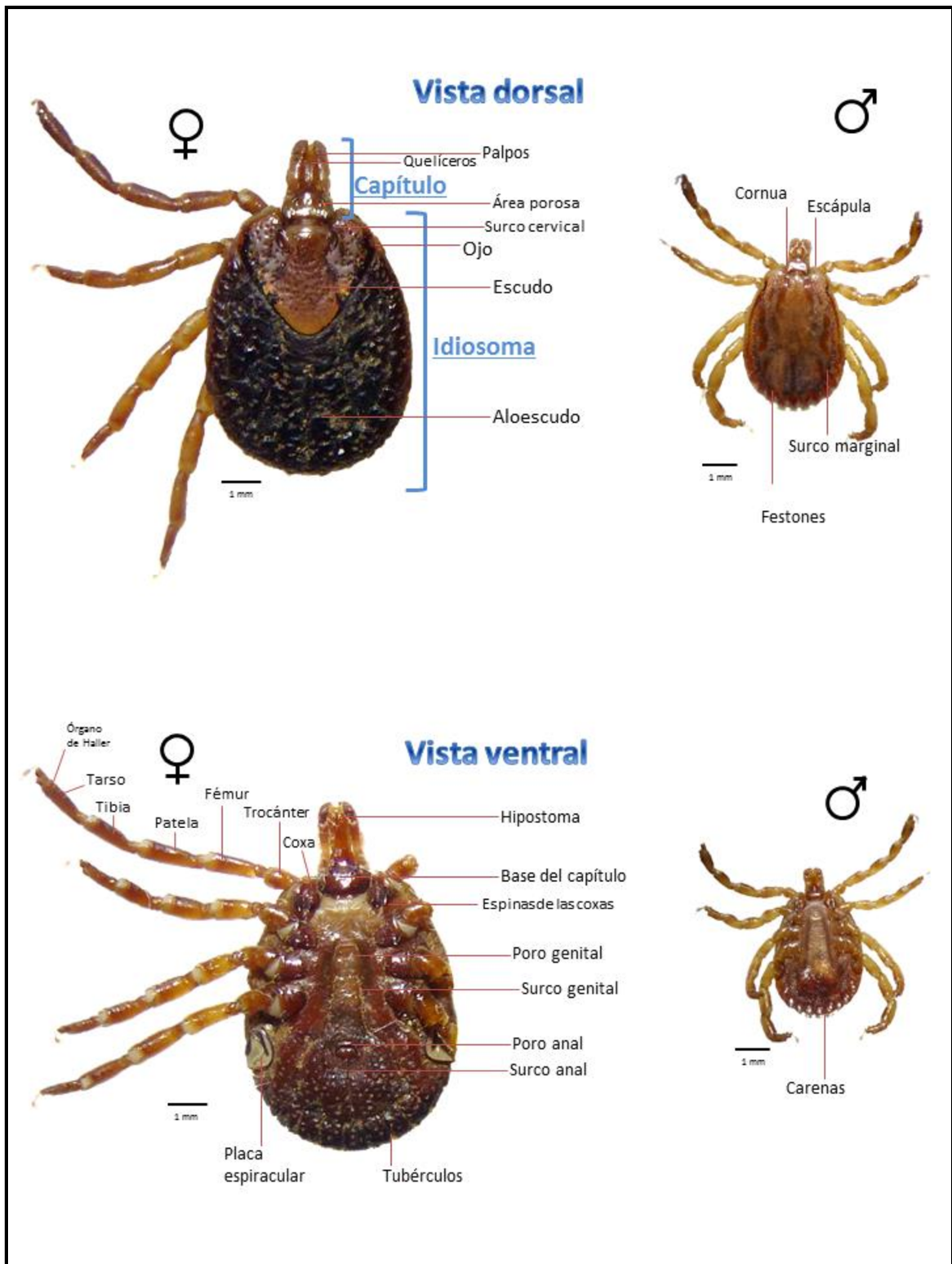


Figura 1. Caracteres morfológicos de las garrapatas duras (Acari: Ixodidae), vista dorsal y ventral.

Los estadios inmaduros (larvas y ninfas) de los ixódidos son similares a los adultos pero carecen de poros genitales y de dimorfismo sexual. Las larvas poseen solo tres pares de patas y un botón del cual se desarrolla el cuarto par de patas durante la muda a ninfas. En las larvas, el número y localización de las setas sobre el cuerpo se utilizan como caracteres morfológicos de los distintos géneros (quetotaxia).

Los argásidos poseen un tegumento granulado, corrugado, mamilado, coriáceo o con tubérculos, con o sin discos. Algunos géneros poseen además, estructuras diagnósticas como camerostoma, setas posthipostomales, postpalpales y ventrales, surcos postanales en su cara ventral (Barros-Battesti y col., 2006; Nava y col., 2017).

1.1.3. Ciclo de vida

Los argásidos poseen un estadio larval y varios estadios ninfales. La hembra fecundada pone pequeñas masas de huevos (hasta 500 huevos por puesta) luego de cada ingesta rápida de sangre. Este patrón de alimentación y mudas determina ciclos de múltiples hospedadores (Hoogstraal, 1985).

La mayor parte de los ixódidos cumple un ciclo de vida de tres hospedadores, donde luego de cada ingesta de sangre que puede durar varios días, las garrapatas se desprenden del hospedador y mudan en el ambiente para luego comenzar la búsqueda de otro hospedador. Las hembras adultas alimentadas se desprenden para depositar cientos de huevos en un medio estable. Las larvas emergen de los huevos, comienzan a dispersarse para localizar un hospedador, ascienden por la vegetación u otras superficies presentes en el ambiente y adoptan un comportamiento de búsqueda, extendiendo el primer par de patas para exponer los órganos de Haller (órganos con quimiorreceptores propios de las garrapatas, ubicados en los tarsos del primer par de patas). Cuando un hospedador transita un sitio con larvas y las contacta, estas se adhieren al mismo y luego de explorarlo, insertan su aparato bucal en la piel del hospedador para comenzar a alimentarse. Luego de varios días, las larvas ingurgitadas de sangre se desprenden del hospedador y caen para mudar a ninfas en el ambiente. Las ninfas buscan de igual forma otro hospedador para alimentarse durante días y desprenderse como ninfas ingurgitadas que mudan a adultos en el ambiente. Las hembras y machos adultos ascienden por la vegetación y exponen el primer par de patas en el mismo comportamiento de búsqueda de hospedador. Cuando uno pasa, los

adultos se adhieren y comienzan a alimentarse. La cópula se produce típicamente sobre el hospedador, con excepción de especies del género *Ixodes* y de algunas del género *Amblyomma*. Luego de la cópula, la hembra se ingurgita de sangre, se desprende del hospedador, cae al ambiente, busca un refugio y comienza la oviposición (Figura 2). Los machos generalmente permanecen sobre el hospedador para seguir alimentándose y copulando con otras hembras. Las hembras de los ixódidos, a diferencia de los argásidos, mueren luego de poner miles de huevos en una sola oviposición (Sonenshine, 1991).



Figura 2. Ciclo de vida de tres hospedadores en garrapatas ixódidas.

Las garrapatas adultas del grupo Prostriata pueden copular sobre la vegetación en lugar del hospedador, ya que los machos producen espermátides antes de alimentarse (Nava y col., 2017). Algunas especies de ixódidos tienen ciclos de uno o dos hospedadores. Esto significa, en el primer caso, que los estadios inmaduros

pueden alimentarse y mudar sin descender del hospedador, y únicamente la hembra ingurgitada se desprende para depositar los huevos en el ambiente (eg. *Rhipicephalus microplus*) (Nuñez y col., 1982) (Figura 3). En el segundo caso, las larvas permanecen prendidas al hospedador cuando mudan a ninfas, y son estas las que una vez alimentadas, se desprenden para mudar a adultos en el ambiente (eg. *Hyalomma dromedarii*) (Hoogstraal, 1956) (Figura 4).

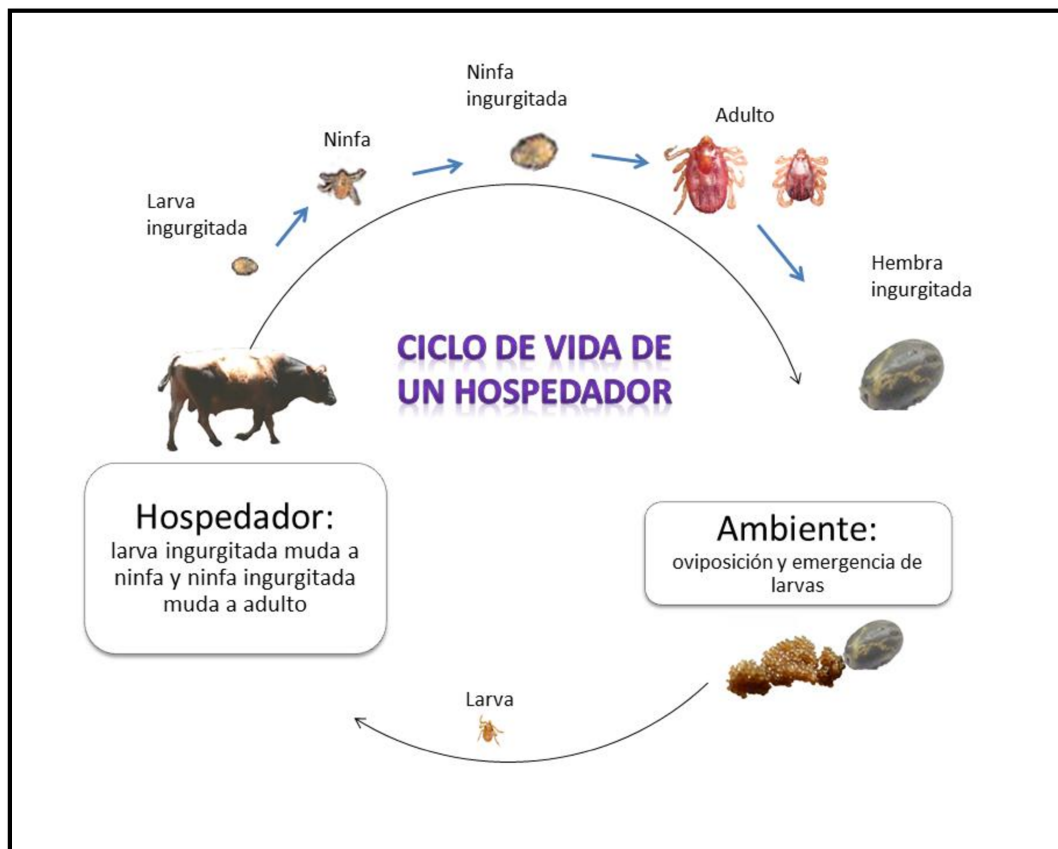


Figura 3. Ciclo de vida de un hospedador en garrapatas ixódidas.

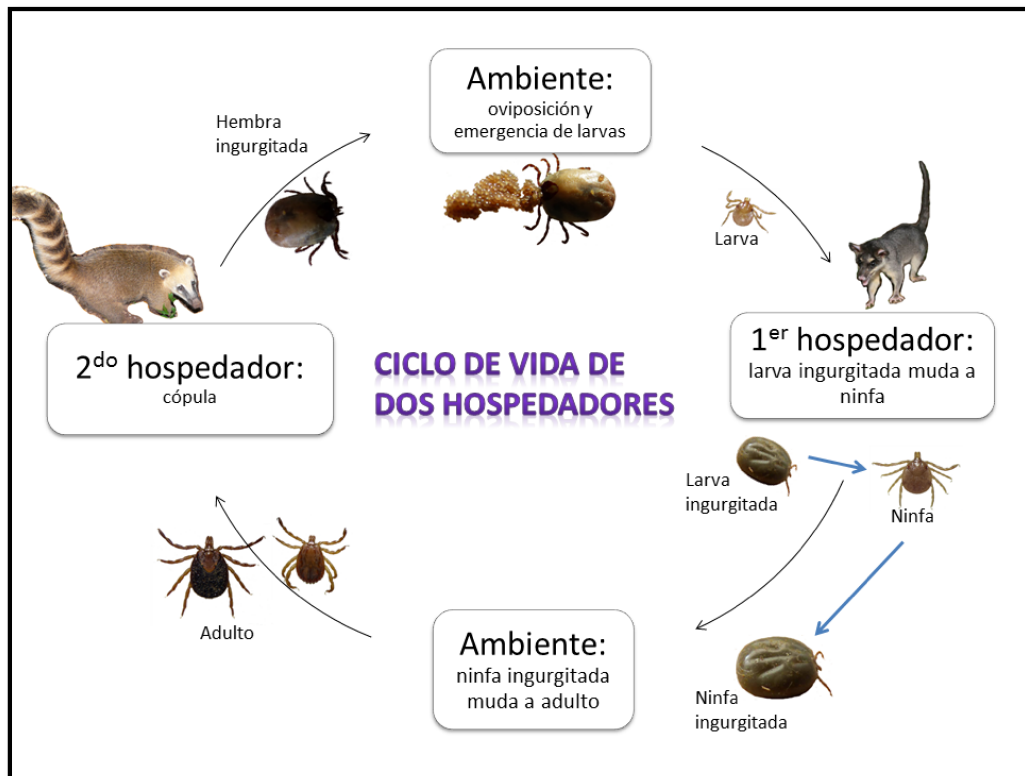


Figura 4. Ciclo de vida de dos hospedadores en garrapatas ixódidas.

La duración de los ciclos vitales de las garrapatas depende principalmente de la especie y las condiciones climáticas. En zonas de clima tropical, pueden desarrollarse varias generaciones por año, mientras que en regiones donde existen rangos de temperatura y humedad más amplios, los ciclos vitales pueden alargarse. En regiones templadas, el desarrollo es aún más lento, y cada vez que se desprenden del hospedador y caen en el ambiente, las garrapatas pueden entrar en una etapa de diapausa (retraso de la oviposición o de la muda), lo cual resulta en ciclos de vida de dos o más años (Sonenshine y col., 2002).

El ciclo de vida de las garrapatas determina su capacidad para transmitir patógenos de un hospedador a otro. Las garrapatas pueden infectarse con bacterias patógenas mediante la ingesta de sangre de un hospedador infectado o por transmisión vertical transovárica (el patógeno coloniza el tejido ovárico de la hembra e infecta a la prole) o transestadial (el patógeno permanece en la garrapata durante la muda e infecta al estadio siguiente), y transmitir estos agentes a nuevos

hospedadores (Reisen, 2002). Además, teniendo en cuenta que cada ciclo puede alargarse en el tiempo como respuesta a condiciones climáticas desfavorables, las garrapatas son capaces de constituir verdaderos reservorios de microorganismos patógenos, manteniéndolos durante largos períodos en el ambiente.

1.1.4. Distribución espacial y temporal de las garrapatas

La distribución espacial de todas las especies animales y vegetales se relaciona tanto a factores abióticos como bióticos. Cada especie se encuentra en ambientes que presentan determinadas características y rangos de esas variables que son adecuados para su supervivencia y reproducción. Del mismo modo, distintas especies de garrapatas pueden tener diferentes restricciones de hábitat de acuerdo a sus preferencias, y por lo tanto poseer diferentes capacidades para invadir nuevas áreas y diseminarse dentro de las mismas (Estrada-Peña, 2008).

Una amplia variedad de factores afectan los patrones de distribución de las garrapatas. Entre ellos, la temperatura de la superficie del suelo, la humedad relativa, el déficit de saturación, la composición de la vegetación, la abundancia, diversidad y distribución de los hospedadores, la configuración del paisaje (su conectividad, los usos del suelo, entre otros), la competencia entre distintas especies de garrapatas, actúan de forma conjunta determinando la idoneidad del ambiente para la ocupación y establecimiento de las mismas (Estrada-Peña, 2008).

La presencia y abundancia de garrapatas se asocian generalmente con factores ambientales que determinan momentos y nichos ecológicos más o menos adecuados para su supervivencia y desarrollo, y que son también responsables de los patrones de estacionalidad de los diferentes estadios de las garrapatas (Belozarov, 1982; Estrada Peña, 2008). Conocer y comprender el comportamiento de las poblaciones de garrapatas y su relación con ciertas características ambientales es necesario para evaluar el riesgo animal y humano de contraer enfermedades transmitidas por garrapatas (Knap y col., 2009). De este modo, la comprensión de la ecología de las garrapatas contribuye a la prevención y el control de patógenos transmitidos por garrapatas de importancia médica y veterinaria. Por lo tanto, este estudio propone

realizar un análisis ecológico de la comunidad de garrapatas en un gradiente de paisaje que presenta alteraciones antropogénicas diferenciales en la ecorregión del Bosque Atlántico de Argentina.

1.2. Importancia sanitaria de las garrapatas

Las garrapatas son relevantes desde una perspectiva sanitaria porque las mismas pueden actuar como vectores de microorganismos patógenos como protozoos, rickettsias, espiroquetas y virus que afectan a los animales domésticos, silvestres y al hombre, además de su potencial para provocar toxicosis, parálisis, irritación y alergia a sus hospedadores (Sonenshine y Roe, 2014). Por otro lado, las heridas en la piel causadas por las garrapatas suelen ser dolorosas, pueden atraer moscas productoras de miasis y desencadenar infecciones bacterianas secundarias de larga duración (Sonenshine y col., 2002).

Las garrapatas son consideradas junto con los mosquitos como los artrópodos vectores de agentes patógenos más importantes (Sonenshine y col., 2002). En todo el mundo, sin importar el tipo climático, en zonas tropicales, templadas y hasta en tundras, las garrapatas representan un serio problema médico y veterinario (Randolph, 2000). Por su parte, las enfermedades rickettsiales transmitidas por garrapatas son una causa importante de morbilidad y mortalidad en animales y humanos en todo el mundo (Parola y col., 2005; Renvoisé y col., 2009; Brites-Neto y col., 2015).

Mientras algunas enfermedades infecciosas transmitidas por garrapatas se conocen desde hace más de un siglo, un gran número de ellas han sido reportadas o estudiadas con mayor profundidad recientemente, posiblemente debido al desarrollo y expansión de técnicas de diagnóstico modernas y al crecimiento del número de grupos de investigación relacionados a esta temática. Las enfermedades infecciosas emergentes y re-emergentes son aquellas que han aparecido recientemente en una población, o que han existido, pero que están aumentando rápidamente en incidencia o rango geográfico (Morse, 2001). La emergencia/reemergencia es el resultado de interacciones dinámicas entre agentes infecciosos de rápida evolución y cambios en el ambiente, en el clima y en el comportamiento de los hospedadores, lo cual

proporciona a dichos agentes nuevos nichos ecológicos favorables (Morens y col., 2004).

La explosión demográfica humana de las últimas décadas y las transformaciones ambientales en pos de la productividad agroalimentaria resultaron en un mayor contacto entre las poblaciones humanas y animales y, por lo tanto, en un aumento del riesgo de emergencia de enfermedades infecciosas (Jones y col., 2008). De este modo, la alteración de los ecosistemas naturales transformó el comportamiento de poblaciones de garrapatas y hospedadores modificando el equilibrio ecológico y determinando el aumento y la emergencia/re-emergencia de enfermedades transmitidas por garrapatas (Morens y col., 2004).

Además de su importancia respecto a la salud pública y veterinaria, las garrapatas son capaces de provocar grandes pérdidas económicas a nivel mundial asociadas a infestaciones en animales domésticos. Respecto a la infestación del ganado bovino, las garrapatas transmiten y diseminan microorganismos patógenos, disminuyen la ganancia de peso y la producción de leche, reducen la calidad de los cueros y aumentan el costo dado por los métodos para su control y prevención y los tratamientos de enfermedades transmitidas por garrapatas (Jongejan y Uilenberg, 2004). El costo global asociado a las garrapatas y a las enfermedades transmitidas por garrapatas en el ganado bovino ha sido estimado hace tiempo en cifras que ascienden entre US\$ 13.9 mil millones y US\$ 18.7 mil millones (De Castro y col., 1997). Sin embargo, actualmente se desconoce el costo global real que insumen el control de garrapatas y las pérdidas de producción en el ganado. Por su parte, los costos para el control de las garrapatas y tratamiento de enfermedades transmitidas por garrapatas en perros domésticos son también de importancia económica considerable, particularmente en países donde los perros tienen, además de los roles tradicionales, un papel social y afectivo y grandes sumas de dinero se gastan para su cuidado (Uilenberg, 1995; Kiss y col., 2012).

Desde una perspectiva epidemiológica, las especies de garrapatas de la familia Ixodidae son las más relevantes en relación a su rol como parásitos de animales

silvestres, domésticos y humanos, y como importantes vectores de agentes patógenos (Estrada-Peña y Jongejan, 1999; Jongejan y Uilenberg, 2004).

1.2.1. Garrapatas sobre hospedadores

Las interacciones entre las garrapatas y sus hospedadores son importantes para comprender los ciclos de transmisión de patógenos (Estrada-Peña y col., 2013). Las garrapatas pueden utilizar dos estrategias para encontrar hospedadores: permanecer en sus hábitats a la espera de un vertebrado, como en el caso de muchas especies nidícolas de argásidos, o dejar sus hábitats para ir en busca de vertebrados. Estas últimas escalan la vegetación y emboscan a sus hospedadores, atraídas y activadas por vibraciones, olor, calor y moléculas como dióxido de carbono y amoníaco. La altura hasta la que escalan las garrapatas está determinada principalmente por su especificidad. Garrapatas que solo se alimentan sobre algunas pocas especies de hospedadores, generalmente relacionadas entre sí, son consideradas específicas de hospedador o especialistas, mientras que aquellas que se alimentan sobre un rango más amplio de hospedadores, los cuales muchas veces no están relacionados evolutivamente, son consideradas no específicas, oportunistas o generalistas (Sonenshine y col., 2002).

A su vez, la disponibilidad de hospedadores también juega un papel importante en la abundancia y distribución de garrapatas, y depende de factores ambientales como la estructura del paisaje y su nivel de fragmentación (Medlock y col., 2013). Los vertebrados pueden actuar como hospedadores primarios esenciales para el mantenimiento del parásito, o secundarios o accidentales, no esenciales pero que pueden contribuir a su amplificación. Un hospedador amplificador aumenta el número de parásitos y puede desarrollar enfermedad, mientras que un hospedador reservorio soporta el mantenimiento de los parásitos por períodos largos de tiempo, jugando un papel determinante en la infección de las garrapatas con microorganismos transmitidos por vectores, y generalmente no desarrolla enfermedad (Reisen, 2009).

Los macroparásitos, entonces, están sujetos a las condiciones del entorno y al ambiente generado por el hospedador (Hugot, 2006). La importancia de las

características ambientales en la adaptación de las garrapatas al hospedador está ampliamente documentada (Klompen y col., 1996; Cumming, 2002), pero los atributos individuales de los hospedadores como peso, tamaño corporal, edad y sexo también son factores relevantes que determinan la heterogénea distribución de los parásitos en sus poblaciones hospedadoras (Pacala y Dobson, 1988; Goodwin y col., 2001; Krasnov y col., 2004, 2005; Brunner y Ostfeld, 2008; Patterson y col., 2008; Esser y col., 2016). Debido a la gran variedad de factores que pueden influir en la presencia y la carga de las garrapatas sobre sus hospedadores, es importante analizar esos factores en su conjunto.

Los mamíferos de tamaño mediano *Nasua nasua* (Carnivora: Procyonidae) y *Didelphis aurita* (Didelphimorphia: Didelphidae) tienen hábitos alimenticios oportunistas y sus poblaciones pueden alcanzar altas densidades en áreas con disturbios antrópicos (Cáceres y Monteiro-Filho, 2001; Alves-Costa y col., 2004). Ambas especies son hospedadores habituales de diferentes especies de garrapatas en la región neotropical (Labruna y col., 2005; Guglielmono y col., 2011; Nava y col., 2017) y pueden actuar como reservorios o amplificadores de patógenos transmitidos por garrapatas (Herrera y col., 2008; Horta y col., 2009).

1.3. Bacterias del orden Rickettsiales transmitidas por garrapatas

Las bacterias del orden Rickettsiales son α -Proteobacterias Gramnegativas intracelulares obligadas que infectan células eucariotas. En la actualidad, este orden contiene tres familias: Anaplasmataceae, Rickettsiaceae y “*Candidatus* Midichloriaceae”. La primera incluye los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia*, *Aegyptianella* y *Wolbachia*, entre otros, mientras que la segunda contiene los géneros *Rickettsia* y *Orientia*, entre otros (Dumler y col., 2001; Thomas, 2016). Sin embargo, esta clasificación se encuentra en continua modificación a medida que se dispone de nueva información.

Las garrapatas pueden transmitir patógenos rickettsiales que causan enfermedades leves, graves o incluso fatales en animales y en el humano. La

transmisión ocurre mediante la inoculación de bacterias junto a las secreciones o excreciones de las garrapatas (Thomas, 2016).

El mantenimiento y transmisión de estos agentes patógenos se encuentran asociados a variables que condicionan la abundancia y distribución de los vectores y hospedadores. Factores climáticos, demográficos, elevación del suelo, uso del paisaje, la capacidad de los microorganismos de sobrevivir y multiplicarse dentro del vector, su transmisibilidad, la susceptibilidad y capacidad del vector para infectarse, sostener y transmitir patógenos a un hospedador susceptible, la facultad de los patógenos para evadir el sistema inmune del hospedador, la susceptibilidad y disponibilidad del hospedador o de determinadas poblaciones de hospedadores, la competencia del hospedador para actuar como reservorio y amplificador de microorganismos, son variables que afectan la propagación de los agentes patógenos (Reisen, 2009; Stuenkel et al., 2013; Thomas, 2016). Por lo tanto, la presencia de garrapatas no es suficiente por sí misma para representar un riesgo significativo de transmisión de patógenos asociados, pero la determinación de la abundancia de garrapatas y de la tasa de infección con microorganismos es necesaria para el análisis de dicho riesgo (Randolph, 2000).

1.3.1. Bacterias de los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia* y *Rickettsia*

Las bacterias del género *Anaplasma* han sido vastamente estudiadas, en especial las especies *Anaplasma phagocytophilum* por ser el agente causal de la anaplasmosis granulocítica humana y *Anaplasma marginale* por ser la causa primaria de la anaplasmosis bovina, ocasionando pérdidas económicas (Parola et al., 2005b; Kocan et al., 2010). La Tabla 1 muestra las especies del género *Anaplasma* de interés médico y veterinario (de la Fuente et al., 2005; Hornok et al., 2007; Raoult y Parola, 2007; Torina et al., 2010; Palomar et al., 2015).

Tabla 1. Especies del género *Anaplasma* de interés médico y veterinario, sus principales vectores y distribución.

Especie	Enfermedad	Vectores reconocidos o potenciales	Distribución
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	Anaplasmosis granulocítica humana	<i>Hyalomma</i> , <i>Ixodes</i> , <i>Rhipicephalus</i> , <i>Dermacentor</i> , <i>Amblyomma</i> spp.	Europa, América del Norte
<i>Anaplasma marginale</i>	Anaplasmosis bovina	<i>Rhipicephalus</i> , <i>Hyalomma</i> , <i>Dermacentor</i> spp., dípteros hematófagos	Todos los continentes
<i>Anaplasma centrale</i>	Anaplasmosis bovina	<i>Rhipicephalus</i> , <i>Haemaphysalis</i> spp.	África, Asia, Europa
<i>Anaplasma platys</i>	Trombocitopenia infecciosa cíclica canina	<i>Rhipicephalus</i> spp.	Todos los continentes
<i>Anaplasma bovis</i>	Enfermedad leve. Nofel (oreja) en África	<i>Amblyomma</i> , <i>Rhipicephalus</i> , <i>Hyalomma</i> spp.	África, América del Sur y del Norte, Asia, Europa
<i>Anaplasma ovis</i>	Anaplasmosis ovina y caprina	<i>Dermacentor</i> , <i>Haemaphysalis</i> , <i>Rhipicephalus</i> , <i>Ixodes</i> spp.	África, América del Norte, Asia, Europa

Anaplasma phagocytophilum parasita monocitos y granulocitos, principalmente neutrófilos, de una gran variedad de hospedadores incluyendo el humano, evadiendo un mecanismo inmune multifactorial del hospedador, para lo cual la saliva de la garrapata juega un papel importante tanto en la inhibición de la inmunidad como en el reclutamiento de granulocitos (Dumler y col., 2005; Chen y col., 2012; Stuen y col., 2013). Por su parte, *A. marginale* parasita eritrocitos, lo cual resulta en una anemia media a severa e ictericia en el ganado bovino (Kocan y col., 2010).

Las bacterias se transmiten de un estadio a otro en las garrapatas (transmisión transestadial) y cuando una garrapata adquiere un patógeno de un hospedador infectado y, sin haber completado su alimentación, se alimenta de otro hospedador no infectado para completar su alimentación, lo infecta (transmisión intraestadial), mientras que la transmisión transovárica no ha sido comprobada (Stitch y col., 1989; Stuen y col., 2013). Por esta razón, un vertebrado que actúe como reservorio es necesario para mantener algunos ciclos endémicos de transmisión. Debido a la transmisión transestadial y ausencia de transmisión transovárica, las larvas de garrapata se consideran libres de *Anaplasma* spp. A su vez, las garrapatas adultas, al haber llevado a cabo una ingesta de sangre adicional, tendrían el doble de probabilidad de adquirir la infección (Stuen y col., 2013).

Las bacterias del género *Ehrlichia* proliferan en fagosomas de monocitos y macrófagos de animales silvestres, domésticos y del humano, dando origen a estructuras en el citoplasma conocidas como mórulas (Olano, 2007). Dentro de los fagosomas, pueden presentar dos morfologías: cuerpos elementales o células de cuerpo denso y células reticuladas (Popov y col., 1998).

Las especies de mayor interés son *Ehrlichia chaffeensis*, causante de la ehrlichiosis monocítica humana y *Ehrlichia canis*, agente causal de la ehrlichiosis monocítica canina, esta última también detectada en humanos (Paddock y Childs, 2003; Perez y col., 2006). Hasta el momento, la transmisión transovárica de estos agentes en las garrapatas parece ser ineficiente (Parola y col., 2005b). Los principales vectores de *E. chaffeensis* y *E. canis* en América son *Amblyomma americanum* y *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato, respectivamente (Yabsley, 2010; Fourie y col., 2013). La Tabla 2 muestra las especies del género *Ehrlichia* de interés médico y veterinario que han sido reportadas en el mundo (Raoult y Parola, 2005; Allsopp y col., 2010; Brites-Neto y col., 2015; Guillemi y col., 2019).

Tabla 2. Especies del género *Ehrlichia* de interés médico y veterinario, sus principales vectores y distribución.

Especie	Enfermedad	Vectores reconocidos o potenciales	Distribución
<i>Ehrlichia ruminantium</i>	Hidropericardio en rumiantes	<i>Amblyomma</i> spp.	África
<i>Ehrlichia canis</i>	Ehrlichiosis canina	Grupo <i>Rhipicephalus sanguineus</i> , <i>Dermacentor</i> spp.	Todos los continentes
<i>Ehrlichia chaffeensis</i>	Ehrlichiosis monocítica humana	<i>Amblyomma</i> spp.	América del Sur y del Norte
<i>Ehrlichia ewingii</i>	Ehrlichiosis granulocítica canina, ehrlichiosis humana	<i>Amblyomma</i> , <i>Dermacentor</i> spp.	América del Norte
<i>Ehrlichia muris</i>	Ehrlichiosis en roedores	<i>Haemaphysalis</i> , <i>Ixodes</i> spp.	Asia
<i>Ehrlichia minasensis</i>	Ehrlichiosis bovina	<i>Rhipicephalus microplus</i>	América del Sur y del Norte

El género *Rickettsia* contiene la mayor cantidad de especies de interés médico del orden Rickettsiales, las cuales son transmitidas por una gran variedad de

artrópodos vectores. De acuerdo a las enfermedades que generan, las rickettsias se clasifican en dos grupos: grupo de las fiebres manchadas y grupo tifus. *Rickettsia canadensis* y *Rickettsia bellii* no corresponden a ninguno de los dos grupos por lo que se las considera de forma separada (Mehrej y col., 2009).

Las bacterias de este género tienen tropismo por las células endoteliales de mamíferos. Debido a que estas células no son fagocíticas especializadas, las rickettsias han desarrollado mecanismos de adherencia a la superficie celular para el inicio del proceso de invasión que involucra una familia de genes conocida como antígenos de superficie celular (*sca* por sus siglas en inglés). Estas bacterias promueven el daño a las células endoteliales a través de la acción de leucocitos, la secreción de citoquinas proinflamatorias, la expresión de adhesinas, entre otros, lo cual conduce a un aumento de permeabilidad de los vasos sanguíneos y linfáticos y al consecuente desequilibrio hemostático y fisiológico. Durante la infección, las rickettsias pueden propagarse hacia el hígado, los pulmones, el cerebro y otros órganos, pudiendo provocar trastornos en sus funciones y la muerte (Schroeder y col., 2016).

La Tabla 3 contiene las principales especies del género *Rickettsia* de interés médico dado por su potencial para producir enfermedad o su detección en muestras humanas o en especímenes de garrapatas que infestan humanos (Baxter, 1996; McLeod y col., 2004; Parola y col., 2005; Paddock y col., 2006; Renvoisé y col., 2009; Parola y col., 2013; Eremeeva y col., 2016; Karpathy y col., 2016; Shroeder y col., 2016).

Las bacterias del género *Rickettsia* se transmiten entre garrapatas por vía transovárica a la descendencia, transestadial de un estadio al siguiente y por coalimentación (garrapatas infectadas se alimentan de un hospedador en proximidad de garrapatas no infectadas que, de esta forma, adquieren la infección). Esta situación implica que no es necesario un hospedador vertebrado para asegurar el mantenimiento de las rickettsias en el medio, sino que las mismas pueden adaptarse a ciclos de vida que involucren hospedadores vertebrados e invertebrados (Sahni y col., 2013). Los humanos son considerados hospedadores terminales, ya que no son esenciales para la realización del ciclo de vida de las rickettsias (Schroeder y col., 2016).

Tabla 3. Clasificación de especies del género *Rickettsia* de interés médico, sus principales vectores y distribución.

Grupo	Especie	Enfermedad	Vectores reconocidos o potenciales	Distribución
Tifus	<i>Rickettsia typhi</i>	Tifus murino	<i>Xenopsylla cheopi</i> , <i>Ctenocephalides felis</i> (pulgas), <i>Polyplax spinulosa</i> (piojo)	Áreas costeras de todo el mundo
	<i>Rickettsia prowazekii</i>	Tifus epidémico	<i>Pediculus humanus corporis</i> (piojo)	América del Sur, Central y del Norte, África, Europa
Fiebres Manchadas	<i>Rickettsia aeschlimannii</i>	Fiebre manchada	<i>Amblyomma</i> , <i>Rhipicephalus</i> , <i>Hyalomma</i> , <i>Haemaphysalis</i> spp.	África, Asia, Europa, posiblemente América del Sur
	<i>Rickettsia africae</i>	Fiebre africana por picadura de garrapatas	<i>Amblyomma</i> , <i>Rhipicephalus</i> , <i>Hyalomma</i> spp.	África, América Central y del Norte, Asia
	<i>Rickettsia akari</i>	Viruela rickettsiósica	<i>Liponyssoides sanguineus</i> (ácaro)	Europa, América del Norte
	<i>Rickettsia amblyommatis</i>	Fiebre manchada	<i>Amblyomma</i> , <i>Dermacentor</i> , <i>Rhipicephalus</i> spp.	América del Sur, Central y del Norte
	<i>Rickettsia asiatica</i>	Patogenicidad desconocida	<i>Ixodes</i> spp.	Asia
	<i>Rickettsia australis</i>	Tifus de las garrapatas de Queensland	<i>Ixodes</i> spp.	Australia
	<i>Rickettsia conorii</i>	Fiebre manchada mediterránea, fiebre manchada israelí, fiebre Astrakhan, tifus indio transmitido por garrapatas	<i>Rhipicephalus</i> , <i>Haemaphysalis</i> spp.	África, Asia, Europa
	<i>Rickettsia felis</i>	Fiebre manchada transmitida por pulgas	<i>Ctenocephalides felis</i>	Todos los continentes
	<i>Rickettsia heilongjiangensis</i>	Fiebre manchada del Lejano Oriente	<i>Haemaphysalis</i> , <i>Dermacentor</i> spp.	Asia
	<i>Rickettsia helvetica</i>	Fiebre anéruptiva	<i>Ixodes</i> spp.	África, Asia, Europa
	<i>Rickettsia honei</i>	Fiebre manchada de la Isla Flinders	<i>Bothriocroton hydrosauri</i> , <i>Ixodes</i> , <i>Haemaphysalis</i> spp.	Australia, Asia
	<i>Rickettsia honei</i> cepa marmionii	Fiebre manchada australiana	<i>Haemaphysalis novaeguineae</i>	Australia
	<i>Rickettsia japonica</i>	Fiebre manchada japonesa	<i>Haemaphysalis</i> , <i>Ixodes</i> , <i>Dermacentor</i> spp.	Asia
<i>Rickettsia massiliae</i>	Fiebre manchada	<i>Rhipicephalus</i> , <i>Ixodes</i> spp.	América del Sur, Central y del Norte, África, Asia, Europa	
<i>Rickettsia monacensis</i>	Fiebre manchada	<i>Ixodes</i> spp.	África, Europa	

Tabla 3. Continuación				
Grupo	Especie	Enfermedad	Vectores reconocidos o potenciales	Distribución
Fiebres manchadas	<i>Rickettsia montanensis</i>	Patogenicidad desconocida	<i>Dermacentor, Amblyomma</i> spp.	América Central y del Norte
	<i>Rickettsia parkeri</i>	Fiebre manchada	<i>Amblyomma</i> spp., <i>Dermacentor</i> spp.	América del Sur, Central y del Norte
	<i>Rickettsia parkeri</i> cepa Atlantic rainforest	Fiebre manchada	<i>Amblyomma, Rhipicephalus</i> spp.	América del Sur
	<i>Rickettsia peacockii</i>	Patogenicidad desconocida	<i>Dermacentor</i> spp.	América Central y del Norte
	<i>Rickettsia raoultii</i>	SENLAT (Escara del cuero cabelludo y linfadenopatía del cuello luego de la picadura de garrapata)	<i>Dermacentor, Haemaphysalis</i> spp., <i>Amblyomma</i> spp.	África, Asia, Europa
	<i>Rickettsia rhipicephali</i>	Patogenicidad desconocida	<i>Rhipicephalus, Haemaphysalis, Dermacentor</i> spp.	América del Sur, Central y del Norte, África, Asia
	<i>Rickettsia rickettsii</i>	Fiebre manchada de las Montañas Rocosas, Fiebre manchada brasilera	<i>Dermacentor, Rhipicephalus, Amblyomma</i> spp.	América del Sur, Central y del Norte
	<i>Rickettsia sibirica</i>	Tifus de las garrapatas de Siberia, linfangitis asociada a rickettsia	<i>Hyalomma, Dermacentor, Haemaphysalis</i> spp.	África, Asia, Europa
	<i>Rickettsia slovacae</i>	SENLAT	<i>Dermacentor</i> spp.	África, Asia, Europa
	<i>Rickettsia tamurae</i>	Sugestiva de fiebre manchada	<i>Amblyomma testudinarium</i>	Asia
Sin clasificación	" <i>Candidatus Rickettsia andeanae</i> "	Patogenicidad desconocida	<i>Amblyomma, Ixodes</i> spp.	América del Sur, Central y del Norte
	" <i>Candidatus Rickettsia kellyi</i> "	Fiebre manchada	Desconocido	Asia
	<i>Rickettsia bellii</i>	Patogenicidad desconocida	<i>Amblyomma, Dermacentor, Haemaphysalis, Ixodes, Argas, Ornithodoros</i> spp.	América del Sur, Central y del Norte
	<i>Rickettsia canadensis</i>	Patogenicidad desconocida	<i>Haemaphysalis leporispalustris</i>	América Central y del Norte

1.4. Las garrapatas de Argentina y del norte de la provincia de Misiones

En Argentina han sido registradas hasta la actualidad 52 especies de garrapatas: 12 pertenecientes a la familia Argasidae (géneros *Ornithodoros*, *Otobius* y *Argas*) y 40 a la familia Ixodidae (géneros *Amblyomma*, *Haemaphysalis*, *Ixodes*, *Rhipicephalus* y *Dermacentor*) (Nava y col., 2017; Lamattina y col., 2018). Entre estas últimas, el 45% de las especies ha sido hallado parasitando humanos (18/40) y el 67,5% (27/40) ha sido hallado parasitando animales domésticos (Nava y col., 2017).

La provincia argentina de Misiones es reconocida por su alta riqueza biológica. Sin embargo, el conocimiento sobre la diversidad, ecología e importancia sanitaria de las garrapatas distribuidas en esta provincia es escaso, limitándose a registros someros de distribución geográfica y hospedadores (Boero 1957; Ivancovich y Luciani 1992; Mastropaolo y col., 2004; Guglielmone y Nava 2005, 2006, Welschen y col., 2012; Lamattina y col., 2014; Nava y col., 2017).

Los registros de garrapatas disponibles hasta el momento de comienzo de este estudio para el norte de la provincia de Misiones eran: *Amblyomma calcaratum* sobre *Tamandua tetradactyla* en Iguazú, *Amblyomma dubitatum* sobre vegetación en Península Andresito, *Amblyomma incisum* sobre vegetación en Puerto Bemberg, *Amblyomma ovale* sobre *Leopardus pardalis* en el Parque Nacional Iguazú (PNI), *R. sanguineus* s.l. sobre perros en Eldorado y *Amblyomma brasiliense* sobre vegetación en Uruzú – Ruta Provincial N°19 (Boero y Delpietro, 1971; Mastropaolo y col., 2004; Guglielmone y Mangold, 1984; Sinkoc y col., 1998; Nava y col., 2012; Welschen y col., 2012). A su vez, en el año 2014 se realizó la determinación de garrapatas colectadas sobre la vegetación en el PNI, la reserva privada San Sebastián de la Selva y la reserva privada y eco-lodge Surucuá, y de garrapatas colectadas sobre *Cerdocyon thous*, *Puma yagouaroundi*, *Procyon cancrivorus*, *Galictis cuja*, *Nasua nasua*, *Puma concolor*, *Panthera onca*, vacas y humanos en el PNI, el Parque Provincial Puerto Península (PP), la Ruta Nacional N°12 y el noreste de la provincia. Entre las garrapatas colectadas, se hallaron especímenes de las especies *Amblyomma coelebs*, *A. brasiliense*, *A. dubitatum*, *A. incisum*, *A. ovale*, *Haemaphysalis juxtakochi* y *R. microplus*, sumando nuevos registros y hospedadores a la zona (Lamattina y col., 2014).

1.5. Situación de las rickettsiosis en Argentina y la región

Las especies de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* frecuentemente reportadas en Argentina y la región son *Anaplasma marginale*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Ehrlichia canis* y *Ehrlichia chaffeensis*. *Anaplasma marginale* ha sido vastamente estudiada en la región, detectada por serología y amplificación de fragmentos de genes por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en sangre de bovinos con una distribución similar a la de la garrapata *R. microplus*, aunque no limitada a esta (Guglielmone, 1995; Torioni de Echaide y col., 1998; de la Fuente y col., 2004; Kocan y col., 2010; Zimmer y col., 2012). *Anaplasma platys* ha sido detectada mediante PCR a partir de sangre de perro en los estados brasileros de Paraná, Río Grande do Sul, Minas Gerais y Sao Paulo; en los departamentos de Salto y Bella Unión en Uruguay; en la provincia argentina de Buenos Aires y Ciudad Autónoma de Buenos Aires (Santos y col., 2009; Da Silva y col., 2012; Eiras y col., 2013; Lasta y col., 2013; Costa-Junior y col., 2013; Cicuttin y col., 2014a; Cicuttin y col., 2014b; Carvalho y col., 2017). Esta especie también fue identificada mediante PCR en especímenes de garrapatas *R. sanguineus* s.l. en Salta y Corrientes (Oscherov y col., 2011; Cicuttin y col., 2015). *Anaplasma phagocytophilum* fue reportada en sangre de perro en los estados de Río de Janeiro y Minas Gerais, Brasil, en sangre de aves rapaces y carroñeras en Sao Paulo, Brasil, y en especímenes de *R. sanguineus* s.l. en la provincia argentina de Corrientes (Oscherov y col., 2011; Machado y col., 2012; Santos y col., 2013; Silveira y col., 2015).

Ehrlichia canis fue detectada en sangre de perro en los estados de Sao Paulo, Paraná, Santa Catarina y Minas Gerais, Brasil, y en la provincia argentina de Buenos Aires; y en especímenes de *R. sanguineus* s.l. en la provincia de Formosa (Aguiar y col., 2008; Santos y col., 2009; da Costa Vieira y col., 2011; Da Silva y col., 2012; Aguiar y col., 2013; Eiras y col., 2013; Silveira y col., 2015; Cicuttin y col., 2015). En cuanto a *E. chaffeensis*, la bacteria fue reportada en sangre de *Blastocerus dichotomus* en una represa situada en los estados de Sao Paulo y Mato Grosso do Sul, Brasil, mientras que variantes genéticas de la misma se reportaron en garrapatas *Amblyomma parvum* en Santiago del Estero (Machado y col., 2006; Tomassone y col., 2008). Más recientemente, dos variantes de ehrlichias estrechamente relacionadas a *E. chaffeensis*

fueron detectadas en *A. tigrinum* en las provincias de Córdoba y San Luis, y denominadas *Ehrlichia* sp. cepa Córdoba y *Ehrlichia* sp. cepa San Luis, respectivamente (Cicuttin y col., 2017). Por su parte, *Ehrlichia* sp. cepa San Luis también fue detectada en *A. parvum* de la provincia de Santiago del Estero (Monje y col., 2018). Posiblemente, por la ubicación geográfica y el vector del hallazgo de Monje y col. (2018), esta cepa corresponda a la ehrlichia relacionada a *E. chaffeensis* informada por Tomassone (2008). Considerando el hecho de que diferentes variantes de *Ehrlichia* sp. estrechamente relacionadas a cepas de *bona fide E. chaffeensis* de Estados Unidos (Sacchi y col., 2012; Cicuttin y col., 2017; Monje y col., 2018) fueron detectadas en los últimos años en Brasil y Argentina, se torna evidente la necesidad de analizar con un enfoque filogenético y con marcadores moleculares polimórficos y bien representados si las variantes de *Ehrlichia* detectadas no solo en Argentina (Cicuttin y col., 2017; Monje y col., 2018; Guillemi y col., 2019) sino también en Sudamérica corresponden a *bona fide E. chaffeensis* o variantes endémicas de Sudamérica con características epidemiológicas potencialmente diferentes.

Por otro lado, se reportaron pacientes con anticuerpos contra *E. chaffeensis* en Palma Sola, Jujuy, Argentina y en Fuiz de Jora, Minas Gerais, Brasil (Ripoll y col., 1999; da Costa y col., 2006). No obstante, debido a que el único vector comprobado de esta bacteria se encuentra en Norteamérica y al potencial de distintas ehrlichias antigénicamente relacionadas para inducir anticuerpos que reaccionan de forma cruzada en pruebas serológicas, estos registros basados únicamente en evidencia serológica deben interpretarse cuidadosamente.

Las especies de *Rickettsia* detectadas en Argentina hasta el presente son *Rickettsia bellii* en *Amblyomma sculptum*, *A. ovale* y *H. juxtakochi* en Formosa y Chaco, en *Amblyomma tigrinum* en Santiago del Estero y en *Amblyomma neumanni* en Córdoba; *Rickettsia parkeri* sensu stricto en *Amblyomma triste* en Formosa y Buenos Aires y en *A. tigrinum* en Córdoba; *Rickettsia amblyommatis* en *A. neumanni* en Santiago del Estero, Salta, Tucumán, Jujuy y Córdoba, en *Amblyomma hadanii* en Salta y Jujuy y en *Amblyomma tonelliae* en Jujuy; "*Candidatus Rickettsia andeanae*" en *A. parvum* en Córdoba y Santiago del Estero y en *A. tigrinum* en Tucumán; *Rickettsia massiliae* en *R. sanguineus* s.l. en Ciudad Autónoma de Buenos Aires; *Rickettsia* sp.

cepa El Tunal en *A. tonelliae* en Salta (Labruna y col., 2007a; Nava y col., 2008; Tomassone y col., 2010; Cicuttin y col., 2014a; Romer y col., 2014; Saracho-Bottero y col., 2015; Tarragona y col., 2015; Mastropaolo y col., 2016; Sebastian y col., 2017; Monje y col., 2018, Saracho-Bottero y col., 2018).

Rickettsia bellii y *R. amblyommatis* no han sido asociadas a enfermedad en humanos ni animales, por lo que su patogenicidad es desconocida. La elevada tasa de infección con estos agentes rickettsiales hallada en garrapatas del género *Amblyomma* ha conducido a algunos autores a sugerir una posible coevolución simbiótica de estas especies (Labruna y col., 2004a).

En Argentina se notificaron casos fatales de rickettsiosis transmitida por garrapatas causados por *R. rickettsii* en el noroeste de la provincia de Jujuy (Paddock y col., 2008). Por otro lado, se han notificado casos no fatales de enfermedad humana por infección con *Rickettsia parkeri* sensu stricto principalmente en la región del Delta Paraná (este de Argentina); sin embargo, algunos casos han sido reportados en pacientes de las provincias de Córdoba y La Rioja (Romer y col., 2011; 2014). El único caso humano de infección por *R. massiliae* de Argentina se notificó en un paciente proveniente de Buenos Aires (este de Argentina) y fue diagnosticado en España (García-García y col., 2010).

Las rickettsiosis humanas transmitidas por garrapatas asociadas con la infección con un agente del grupo de las fiebres manchadas, descrito como *Rickettsia* sp. cepa Atlantic rainforest, se informaron en Brasil (Spolidorio y col., 2010; Silva y col., 2011; Krawczak y col., 2016a). Recientemente, esta cepa estrechamente relacionada con *Rickettsia africae*, *R. parkeri* s.s. y *Rickettsia sibirica*, se clasificó como una cepa de *R. parkeri*, y actualmente se denomina *R. parkeri* cepa Atlantic rainforest. Esta cepa forma un grupo con *R. parkeri* s.s., *R. parkeri* cepa NOD y *R. parkeri* cepa Parvitarsum (Nieri-Bastos y col., 2018). En Brasil, el agente causó una enfermedad febril aguda aunque no se registraron casos fatales (Spolidorio y col., 2010; Silva y col., 2011; Krawczak y col., 2016a), y el vector involucrado en su transmisión fue la garrapata *A. ovale*, una especie que pica a los humanos regularmente (Guglielmone y col., 2006; Szabó y col., 2013; Barbieri y col., 2014; Krawczak y col., 2016b). Aunque se han

encontrado especímenes de *Amblyomma aureolatum* y *R. sanguineus* s.l. infectados con *R. parkeri* cepa Atlantic rainforest, aún no se ha establecido su competencia como vectores; pero dado que *A. aureolatum* es una garrapata antropofílica reconocida, podría ser un vector alternativo para esta cepa (Medeiros y col., 2011; Barbieri y col., 2014). También se han hallado garrapatas *A. ovale* infectadas con *R. parkeri* cepa Atlantic rainforest en Colombia, Belice y posiblemente Nicaragua (confundida con *R. africae*) (Londoño y col., 2014; Lopes y col., 2016; Vogel y col., 2018).

Existe un solo registro de hallazgo de *R. parkeri* cepa Atlantic rainforest para Argentina (Monje y col., 2015), pero la especie de garrapata (*A. dubitatum*) y el área ecológica (margen del río Paraná, ecoregión del Chaco húmedo) donde esta rickettsia fue detectada, no está relacionada con las condiciones epidemiológicas descritas en Brasil donde se informaron casos de enfermedad humana por esta cepa (Szabó y col., 2013; Barbieri y col., 2014; Krawczak y col., 2016b). Por otro lado, la provincia de Misiones en el noreste de Argentina, que contiene los remanentes más extensos de selva atlántica en el país, presenta características ecológicas similares a las descritas para la cepa de *R. parkeri* en el área endémica de la selva atlántica del sur de Brasil. Además, la provincia de Misiones comparte límites fronterizos con los estados brasileiros de Paraná, Santa Catarina y Rio Grande do Sul, donde esta rickettsia se ha encontrado infectando garrapatas *A. ovale* (Barbieri y col., 2014; Krawczak y col., 2016b; Nieri-Bastos y col., 2016).

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue estudiar aspectos ecológicos (riqueza específica, diversidad, hospedadores, preferencias ambientales, dinámica estacional) y epidemiológicos (especies y estadios parásitos de animales silvestres, domésticos y humanos, tasas de infección con microorganismos patógenos) de las garrapatas en distintas unidades ambientales del norte de Misiones, para recabar información básica que conduzca a la generación de hipótesis eco-epidemiológicas a constatar en una etapa posterior.

Los objetivos específicos fueron los siguientes:

- 1) Determinar las especies de garrapatas presentes en distintos ambientes del norte de Misiones.
- 2) Describir la riqueza específica, diversidad y distribución estacional de la comunidad de garrapatas hallada en el norte de Misiones.
- 3) Determinar los hospedadores de los estadios adultos e inmaduros de las garrapatas establecidas en el norte de Misiones.
- 4) Determinar la tasa de infección con bacterias de los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia* y *Rickettsia* en las distintas especies de garrapatas halladas en el norte de Misiones.

3.MATERIALES Y MÉTODOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Área de estudio

La provincia de Misiones, en Argentina, alberga fragmentos de selva Paranaense, la ecorregión más extensa y biodiversa con el mayor número de endemismos del complejo de la ecorregión del Bosque Atlántico (Burkart y col., 1999; Plací y Di Bitetti, 2005). La Provincia Biogeográfica de la Selva Paranaense comprende el sudeste de Brasil, el noreste de Argentina y el este de Paraguay y está incluida dentro de la subregión Paraná de la región Neotropical (Morrone, 2006). Además, esta región en Argentina posee una fuerte actividad turística gracias a la variedad de áreas protegidas nacionales, provinciales, municipales y privadas. El PNI, ubicado en el norte de la provincia de Misiones, contiene uno de los remanentes más extensos y biodiversos de la Mata Atlántica (Plací y Di Bitetti, 2005). El PNI recibe hasta un millón y medio de turistas por año, y sus bordes contactan directamente con paisajes agrícolas-ganaderos.

La intensificación y expansión de la actividad agrícola-ganadera en los últimos 50 años dio lugar a grandes variaciones en las características ambientales de la región (Plací y Di Bitetti, 2005). Actualmente, el norte de la provincia de Misiones alberga más de 70 áreas protegidas nacionales, provinciales y municipales, que preservan extensos fragmentos de selva subtropical semi-decidual, y los límites establecidos que circunscriben estas áreas por lo general se encuentran en contacto directo con territorios destinados a la explotación agrícola-ganadera, sin contar con zonas que funcionen como un tampón para la transición entre ambos ambientes. Esto determina una alta tasa de contacto entre animales domésticos y silvestres y humanos.

En relación con lo antedicho, existen gradientes de áreas de selva protegidas hacia asentamientos urbanos que integran localidades de entre 225 (Cabure-í) y 41.000 habitantes (Puerto Iguazú) (Censo IPEC, 2010).

Varias especies de garrapatas se encuentran establecidas en el norte de la provincia de Misiones (Lamattina y col., 2014, Nava y col., 2017), pero su ecología es poco comprendida.

3.2. Colecta de muestras

3.2.1. Colecta de garrapatas sobre la vegetación

El estudio se realizó en el norte de la provincia de Misiones, donde se identificaron tres hábitats con diferentes características: a) ambientes de selva naturales; b) agroecosistemas con parches de selva adyacentes; c) áreas verdes en ambientes urbanos (Figura 5). Las garrapatas ixódidas pueden encontrarse dispersas en el terreno pero suelen concentrarse en los senderos donde circulan activamente los animales y en los sitios donde los animales se detienen a comer o a dormir, donde su abundancia es mayor (Estrada-Peña y col., 2013).



Las garrapatas de vida libre se colectaron mensualmente sobre la vegetación desde septiembre de 2014 hasta agosto de 2016, en los siguientes ambientes:

- a) Ambiente de Selva Natural: se seleccionaron cuatro sitios correspondientes a ambientes de selva primaria en áreas protegidas del departamento Iguazú, en la provincia de Misiones. Tres de ellos se ubicaron en el PNI (25°41'S, 54°27'O) y fueron denominados Sendero Macuco (Macuco), ex-camping Ñandú (Ñandú) y Destacamento de Guardaparques Apepú (Apepú), mientras que el cuarto se ubicó en el PP (25°43'S, 54°32'O) (Figura 6). En cada sitio, tres senderos activos de animales fueron recorridos una vez al mes durante una hora cada uno, deslizando un paño blanco de 1x1,5 m sobre la vegetación, en busca de garrapatas en su etapa de vida libre. El paño se revisó cada 10 metros y se colectaron las garrapatas adheridas al mismo.
- b) Agroecosistemas: se seleccionaron cuatro sitios con sistemas de cría de ganado silvopastoril. Tres de ellos se localizaron en el noreste de la provincia, en el departamento de General Belgrano, y fueron denominados Jacobo (25°44'2"S, 53°57'21"O), Otto (25°42'54"S, 54° 2'47"O) y Werle (25°34'30"S, 54° 9'27"O), mientras que el cuarto se ubicó en la zona rural de la ciudad de Puerto Iguazú (25°39'42"S, 54°33'31"O), en el noroeste de la provincia de Misiones (Figura 6). En cada sitio se deslizó el paño de tela sobre la vegetación en parcelas de 20.000m² durante 30 minutos una vez al mes.
- c) Ambiente urbano: se seleccionaron cuatro sitios sin viviendas en zonas verdes de la ciudad de Puerto Iguazú. Tres de ellos contenían pequeñas parcelas de bosque nativo, mientras que el cuarto correspondía a un pastizal sin parches de bosque (Figura 6). En cada sitio, extensiones de 5.000 m² fueron muestreadas una vez al mes durante 30 minutos, deslizando el paño de tela sobre la vegetación.

Las diferencias en los tiempos de muestreo entre los distintos ambientes reflejaron las diferencias en la configuración del terreno y las áreas disponibles para la colecta de muestras, estimándose distancias recorridas similares en los tres ambientes. La diferencia entre las superficies muestreadas de los sitios urbanos y agroecosistemas se basó en la existencia de rastros de animales en entornos rurales que determinaron el recorrido de distancias mayores en 30 minutos, mientras que en los entornos

urbanos se deslizaron los paños de tela en prácticamente toda el área durante 30 minutos debido a la falta de senderos visibles de animales.

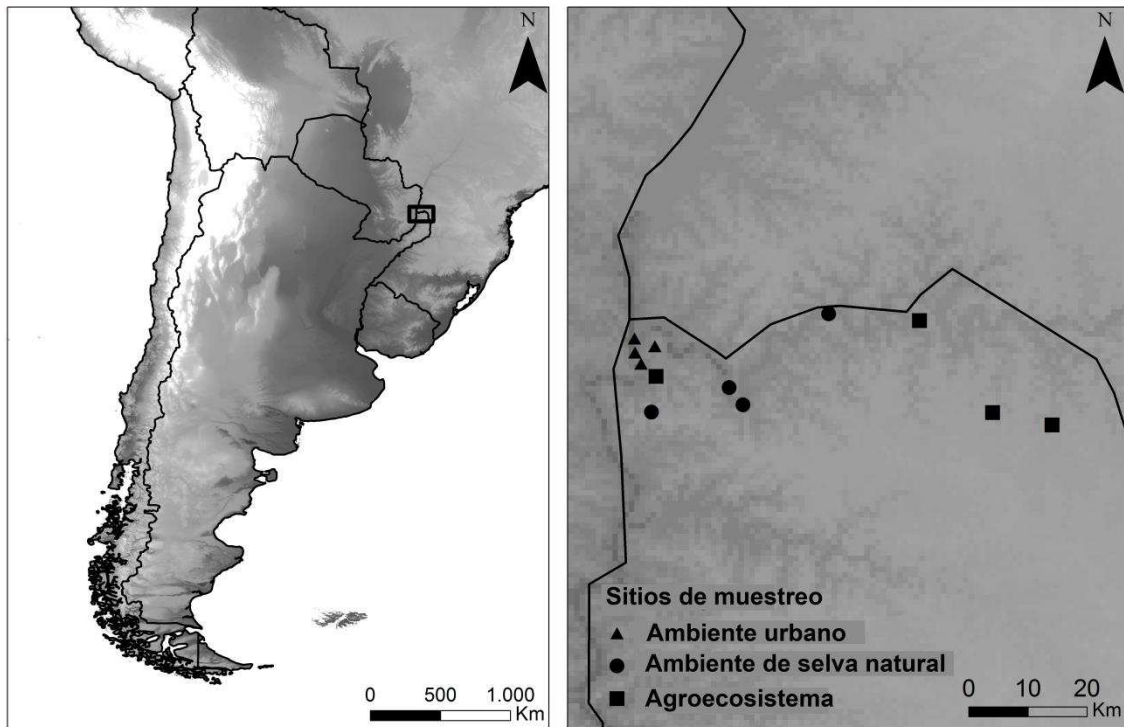


Figura 6. Sitios de colecta de garrapatas de vida libre en el norte de la provincia de Misiones.

3.2.2. Colecta de garrapatas y muestras de tejidos sobre hospedadores

Se realizaron seis campañas de captura de animales silvestres en febrero, junio, agosto y diciembre de 2015 y febrero y junio de 2016.

En cada sesión de captura se colocaron 150 trampas de captura viva tipo Sherman (24x9x8cm) en PP, dispuestas en tres transectas de 50 trampas con una separación de al menos 200m entre transectas y 2m entre trampas, y cebadas con alimento balanceado y manteca para la captura de roedores sigmodontinos.

En el PNI, las aves fueron colectadas mediante el uso de 12 redes de niebla (4 x 9m. y 6 x 12m.), siguiendo protocolos garantizando el bienestar general de las aves y de acuerdo a las normativas internacionales vigentes (Fair y col., 2010). Las redes de

niebla fueron activadas desde el amanecer hasta el atardecer, evitando activarlas durante horarios donde la temperatura ambiente fuese demasiado elevada, y fueron recorridas y controladas cada 15 minutos para evitar el estrés en las aves colectadas. El transporte de los animales de la red al lugar de sangrado se realizó mediante bolsas de tela de hilo de algodón que permiten la respiración apropiada de los individuos y disminuyen el estrés por captura. Las aves fueron sangradas de la vena yugular (mayoría de las especies) o vena braquial (colúmbidos), se examinaron con pinzas de punta roma en procura de garrapatas y se determinaron a nivel específico, y luego fueron liberadas.

Para la colecta de pequeños y medianos roedores, se distribuyeron 50 trampas de captura viva tipo jaula (40x15x15cm) en el PNI, colocadas en cinco transectas de 10 trampas con una separación de al menos 50m entre transectas y 2m entre trampas, cebadas con trozos de zanahoria y extracto de vainilla.

Las transectas y estaciones de muestreo permanecieron activadas durante 72 horas en cada sesión de muestreo, siendo revisadas cada doce horas. El procesamiento en el campo de los roedores cricétidos se realizó siguiendo el protocolo de bioseguridad descrito por Mills y col. (1995). Una vez capturados, estos roedores fueron sedados mediante la inhalación de una dosis baja de éter sulfúrico, se tomó su peso con una balanza electrónica OHAUS Traveler® con precisión de 0,1 g, y se extrajo rápidamente una muestra de sangre mediante punción cardíaca con jeringa de 1 ml y aguja 22G. Las muestras de sangre se colocaron en tubos con 20 µl de EDTA y se conservaron a -18°C. Los roedores se sacrificaron mediante dislocación cervical, se midieron su largo total, largo de cola, largo de pata posterior derecha y oreja, y se revisaron exhaustivamente en procura de garrapatas (Figura 7). Luego, se realizó la necropsia y se tomaron muestras de bazo e hígado, las cuales se colocaron en tubos con etanol 96° que se almacenaron a -18°C. Finalmente, los roedores fueron depositados individualmente en bolsas de nylon con alcohol 96% y transportados al laboratorio para examinarlos bajo lupa binocular para una búsqueda más exhaustiva de garrapatas. La determinación taxonómica de los roedores se realizó con la colaboración de especialistas en sistemática de dichos mamíferos.



Figura 7. Procesamiento de roedores capturados en el Parque Provincial Puerto Península, Misiones.

Para la captura de marsupiales y otros mamíferos medianos, entre ellos especímenes de *N. nasua* y *D. aurita*, se colocaron 14 trampas tipo Tomahawk (60x30x30cm) separadas entre sí por al menos 10m en distintos sitios con áreas totales de hasta 30.000m², cebadas con pescado (atún) y frutos sin semillas y trozados (Figura 8).



Figura 8. Trampas tipo Tomahawk utilizadas para la captura de mamíferos medianos en el Parque Nacional Iguazú

Al mismo tiempo, capturas con trampas tipo Tomahawk en el PNI se realizaron en sitios con impacto turístico variable. Las 14 trampas tipo Tomahawk fueron cebadas con rodajas de naranja sin semillas y banana y atún enlatado para capturar especímenes de mamíferos medianos, especialmente *D. aurita*, y se colocaron en dos áreas del PNI llamadas Centro de Investigaciones Ecológicas Subtropicales (CIES; 25°40'42"S, 54°26'57"O) y Apepú (25°33'53"S, 54°17'44"O). Estas mismas trampas cebadas con rodajas de banana se utilizaron para interceptar grupos de *N. nasua* en cinco sitios diferentes del PNI: Estación Cataratas (25°41'2"S, 54°26'55"O), Dos Hermanas (25°41'15"S, 54°26'43"O), CIES, Garganta (25°42'4"S, 54°26'40"O) y Viejo Hotel (25°40'55"S, 54°26'47"O). Las estaciones Cataratas, Dos Hermanas y Viejo Hotel son lugares de gran impacto turístico, donde el movimiento de personas y vehículos es permanente, mientras que CIES, Garganta y Apepú fueron considerados sitios de menor impacto turístico, ya que se reportó una menor presencia de turistas y vehículos, y son adyacentes a áreas sin acceso a personas no autorizadas. Para el caso de *N. nasua*, la campaña de febrero de 2016 no pudo llevarse a cabo y en su lugar, se realizó una campaña de captura más en junio de 2017. Los análisis estadísticos de las distribuciones espaciales y temporales de garrapatas se realizaron sin considerar esta última campaña de captura de coatíes.

Los especímenes de *N. nasua* capturados se sedaron con una dosis intramuscular de 10-15 mg/kg de ketamina 5% y 1-2 mg/kg de xilazina 2%, mientras que dosis de 20-25 mg/kg de ketamina 5% y 10 mg/kg de xilazina 2% se utilizaron para sedar a los individuos de *D. aurita* (West y col., 2007). Todos los animales capturados se pesaron, se midieron y se examinaron exhaustivamente en procura de garrapatas, y se les extrajo una muestra de sangre de no más de 3 ml con aguja 21G de la vena lateral de la cola (Figura 9). Las muestras de sangre fueron colocadas en tubos con 50 µl de EDTA y conservadas a -18°C.



Figura 9. Procesamiento de mamíferos medianos capturados en el Parque Nacional Iguazú, Misiones.

Las especies de aves fueron determinadas según Narosky e Yzurieta (2003) y su nomenclatura se modificó según Clements y col. (2016). Los pequeños roedores (Rodentia: Cricetidae) y comadrejas (Didelphimorphia: Didelphidae) fueron determinados por el Dr. Pablo Teta (Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia") y otros mamíferos capturados fueron determinados siguiendo a Canevari y Vaccaro (2007).

Además, una vez al mes, desde septiembre de 2014 hasta agosto de 2016, se seleccionaron al azar cinco perros y diez bovinos en los agroecosistemas y cinco perros en las áreas urbanas, los cuales fueron examinados cuidadosamente en busca de garrapatas adheridas (Figura 10).

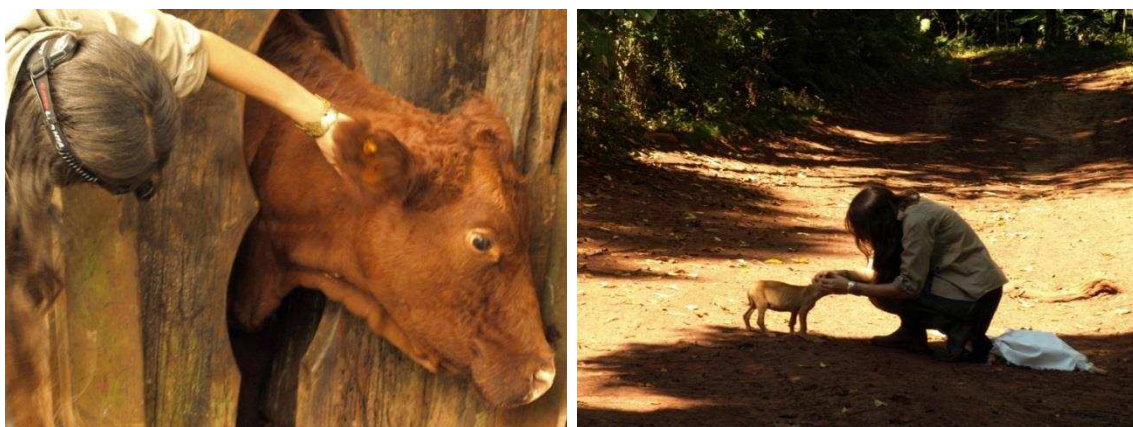


Figura 10. Revisación de bovinos y perros en agroecosistemas del norte de Misiones.

Las sesiones de muestreo de septiembre de 2015 y marzo y julio de 2016 no pudieron realizarse debido a condiciones meteorológicas adversas y daños al vehículo destinado a este fin. Sin embargo, el gran volumen de datos recogidos durante las 21 sesiones de muestreo realizadas ha sido suficiente para la realización de este estudio.

Ocasionalmente se colectaron garrapatas sobre animales atropellados en las rutas que atraviesan las áreas protegidas y se recibieron garrapatas donadas por investigadores y guardaparques inmediatamente después de realizar jornadas de trabajo en áreas protegidas. Estas garrapatas se incluyeron en los análisis de diversidad de especies y el análisis de la distribución temporal de los distintos estadios y especies, ya que no considerar su presencia en estos especímenes podría haber resultado en una subestimación de la diversidad de especies. Sin embargo, no fueron tenidos en cuenta para confeccionar los modelos de parasitismo en mamíferos medianos, ya que, al trabajar con abundancias de garrapatas, podrían haber conducido a errores por la posibilidad de conteos más bajos en animales muertos cuyas garrapatas tienden a desprenderse luego de determinado periodo de tiempo.

A las garrapatas *A. ovale* colectadas durante los dos años de muestreo se adicionaron especímenes de la misma especie colectados en años anteriores mediante otros proyectos de investigación para la detección de bacterias patógenas. Se analizaron de esta forma garrapatas de esta especie colectadas desde 2010 hasta 2017 en varios puntos de la provincia de Misiones. Los sitios de colecta incluyeron el PNI, PP, los Parques Provinciales Urugua-í (25°52'S, 54°11'O), Piñalito (26°29'S, 53°48'O), Cruce Caballero (26°27'S, 53°58'O) y Moconá (27°9'S, 53°54'W), y áreas rurales de las ciudades de Puerto Iguazú (25°39'37"S, 54°33'30"W), Andresito (25°44'2"S, 53°57'21"W), Libertad (25°56'38"S, 54°32'37"W) y Montecarlo (26°34'7"S, 54°47'54"W) (Figura 11).

Todas las actividades desarrolladas para este trabajo fueron aprobadas por el Comité Asesor de Ética y Seguridad (CAES) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Litoral (Código de aprobación: 194/14).

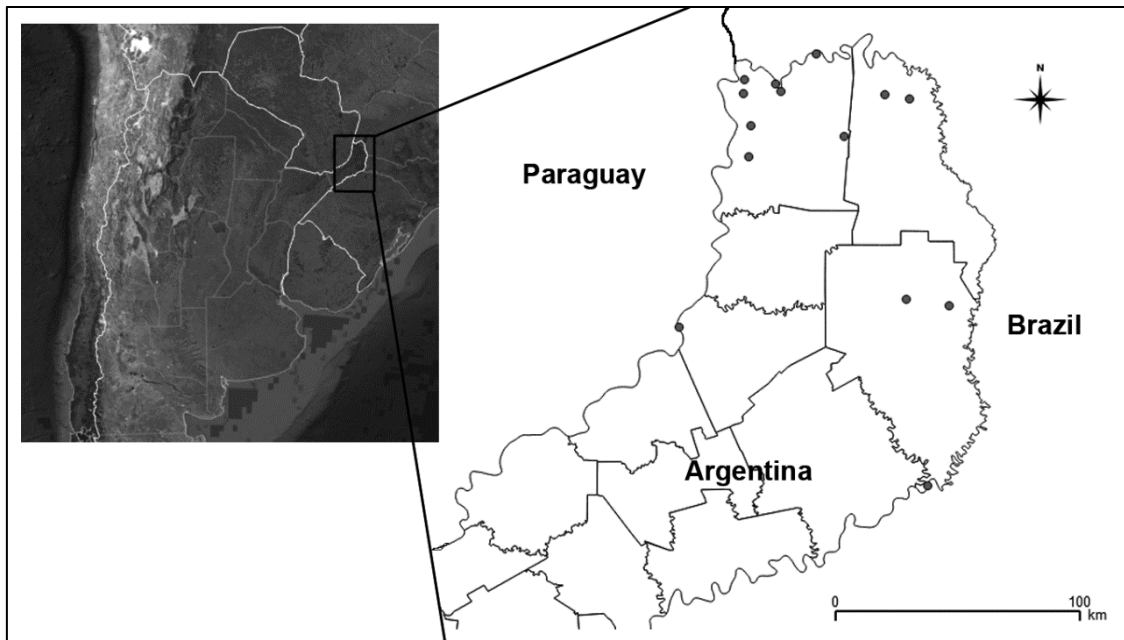


Figura 11. Sitios de colecta de garrapatas *Amblyomma ovale* mediante proyectos de investigación en el norte de Misiones.

3.3. Determinación taxonómica de garrapatas

Las garrapatas colectadas se colocaron en tubos con etanol 96°, los cuales se depositaron en el Instituto Nacional de Medicina Tropical en la ciudad de Puerto Iguazú a una temperatura de -18°C. Los especímenes fueron determinados considerando sus caracteres morfológicos, según Barros-Battesti y col. (2006), Barbieri y col. (2008), Martins y col. (2014) y Nava y col. (2017), y por comparación con material de laboratorio conocido, depositado en la colección de garrapatas del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Rafaela (INTA EEA Rafaela), Argentina. Para la observación de los especímenes se utilizó invariablemente una lupa binocular Zeiss Stemi DV4® con aumento de 8X a 32X, con el agregado de un ocular milimétrico. Dicho ocular fue necesario para realizar las mediciones de los escudos de las ninfas de *A. brasiliense* y *A. incisum*, ya que las mismas presentan caracteres morfológicos extremadamente similares, variando su morfología principalmente en la longitud de sus escudos, los cuales son menores a 0,75mm en *A. brasiliense* y mayores a 0,75mm en *A. incisum* (Martins y col., 2014) (Figura 12).

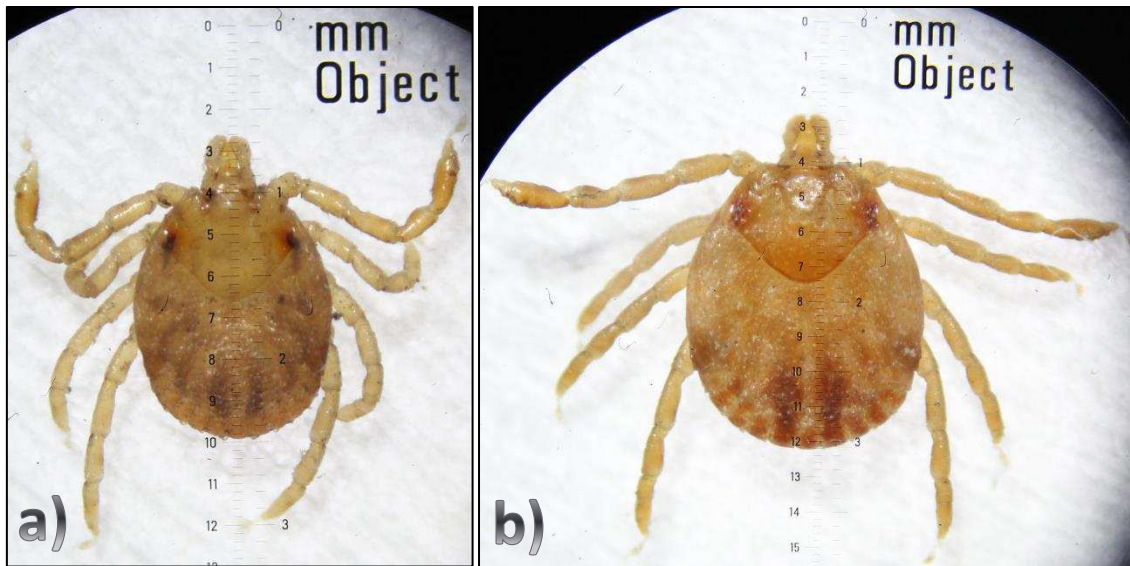


Figura 12. Diferencia de longitud de los escudos en ninfas a) *Amblyomma brasiliense*: longitud del escudo menor a 0,75mm y b) *Amblyomma incisum*: longitud del escudo mayor a 0,75mm.

La confirmación de las determinaciones de especímenes particulares se realizó mediante amplificación por PCR. En este sentido, la determinación taxonómica de especímenes representativos de *R. sanguineus* s.l. y de las larvas de *A. brasiliense*, *A. coelebs* y *A. incisum*, cuyos caracteres morfológicos son similares, se confirmó mediante el análisis de secuencias de un fragmento de 410 pb del gen mitocondrial 16S rRNA, el cual es usado extensivamente para la determinación a nivel específico en las garrapatas de la familia Ixodidae (Estrada Peña y col., 2005; Labruna y col., 2007b; Nava y col., 2009a; 2010). Las secuencias se obtuvieron a partir de especímenes representativos, utilizando el siguiente protocolo de PCR:

- un ciclo de desnaturalización inicial del ADN durante 1 min a 94°C
- un ciclo con desnaturalización a 94°C por 45 seg, hibridación a 47 °C por 45 seg y polimerización a 72°C durante 45 seg
- seis ciclos con un incremento sucesivo de la temperatura de hibridación de 0,3°C en el ciclo siguiente
- 28 ciclos con desnaturalización a 94°C por 45 seg, hibridación a 50°C por 45 seg y polimerización a 72°C durante 45 seg

- un ciclo de polimerización final de 7 min a 72°C.

La reacción se llevó a cabo con la enzima *Taq DNA Polymerase* (Promega®) y se utilizaron los cebadores: forward, 5'-CTGCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGTGG-3' (16S + 1); reverse, 5'-CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT- 3' (16S - 1) (Mangold y col., 1998). Los productos de PCR se purificaron con Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®), y la secuenciación se realizó en la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología del INTA Castelar. Las secuencias obtenidas se alinearon con BIOEDIT SEQUENCE ALIGNMENT EDITOR (Hall, 1999) utilizando el algoritmo CLUSTAL W (Thompson y col., 1994) y se compararon entre sí y con aquellas depositadas en GenBank usando el programa MEGA versión 5.0 (Tamura y col., 2011). Para el análisis de las diferencias en la composición de nucleótidos, se excluyeron las posiciones con “gaps” entre los pares de secuencias y se construyó una matriz de divergencia con el modelo de Tamura-Nei. Se analizaron las relaciones evolutivas empleando el método de Maximun Likelihood con el programa MEGA 5.0 (Tamura y col., 2011), con un muestreo repetitivo (bootstrap test) de 1000 repeticiones.

Finalmente, se determinaron diferencias morfológicas entre las larvas de las tres especies mencionadas, consistentes en el grosor de las espinas de la coxa I en orden creciente de *A. coelebs*, *A. brasiliense* y *A. incisum* (Figura 13).

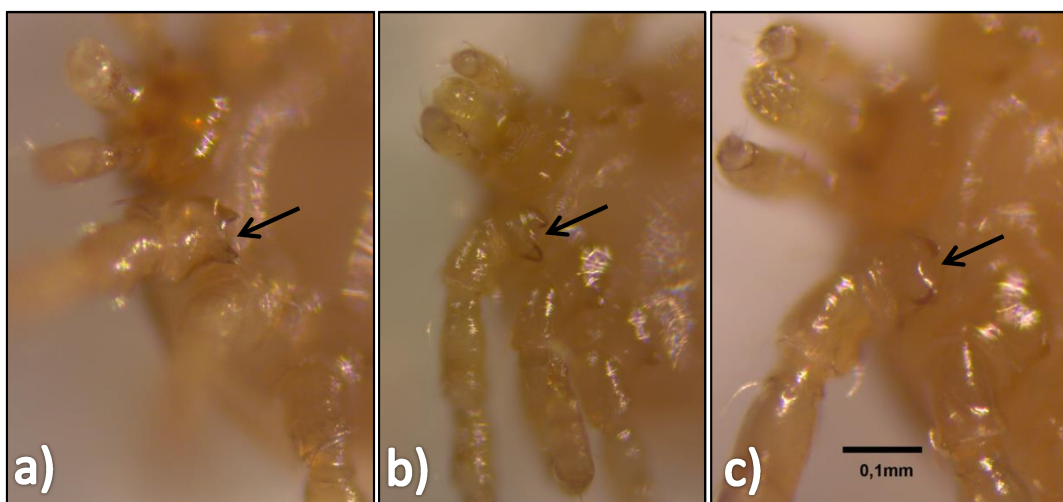


Figura 13. Comparación del grosor en orden creciente de las espinas de la coxa I (flecha) en larvas a) *Amblyomma coelebs*, b) *Amblyomma brasiliense* y c) *Amblyomma incisum*.

3.4. Análisis estadísticos

Se analizaron en forma separada la distribución espacial y temporal de las garrapatas colectadas sobre la vegetación y sobre hospedadores, y particularmente los factores asociados a los patrones de parasitismo hallados sobre las dos especies de mamíferos medianos con mayor tasa de captura y mayores prevalencias de infestación con garrapatas (*D. aurita* y *N. nasua*).

3.4.1. Caracterización espacial de la comunidad de garrapatas

Utilizando la plataforma iNEXT que utiliza el software R en línea (Chao y col., 2016), basada en las curvas de rarefacción y extrapolación con números de Hill para $q=0$ (determinación utilizada para analizar la riqueza de especies) (Chao y col., 2014), se obtuvo la estimación de cobertura del conjunto de datos de cada ambiente, con el fin de evaluar la completitud de las muestras y así comparar la diversidad de especies en muestras igualmente completas a pesar de tener diferentes tamaños muestrales.

Se utilizó la plataforma en línea SpadeR (Chao y col., 2015), la cual representa una interfaz amigable que utiliza el software R para la realización de cálculos estadísticos, con el fin de obtener el estimador de riqueza Chao1 (Chao 1984, Chao y Chiu 2016) para los ensambles de garrapatas hallados en cada ambiente:

$$Chao1 = S + \left(\frac{n-1}{n}\right) \left(\frac{f1(f1-1)}{2(f2+1)}\right)$$

Donde, para cada ensamble de garrapatas, S es el número total de especies observadas, n es el número total de muestras de garrapatas recogidas, $f1$ es el número de *singletons* (especies con un solo espécimen colectado) y $f2$ es el número de *doubletons* (especies con solo dos ejemplares colectados). De esta manera, se calculó de forma robusta el número especies esperado mediante un muestreo más exhaustivo, teniendo en cuenta las especies raras (con pocos individuos colectados) para estimar el número de especies no detectadas.

Con el fin de evaluar la incertidumbre para predecir a qué especie pertenecería un individuo elegido al azar de cada uno de los ensambles de garrapatas, se calculó el

índice de Shannon-Wiener, que tiene en cuenta la abundancia relativa de todas las especies encontradas en cada ambiente:

$$H_e' = - \sum p_{ie} * \ln p_{ie}$$

Donde H_e' es el índice de entropía de Shannon de cada ensamble de garrapatas e , y p_{ie} es la abundancia relativa de la especie i en el ensamble e .

Para evaluar la diversidad beta o disimilitud entre ambientes, se utilizó SpadeR para calcular medidas de similitud entre múltiples comunidades con el índice de Horn. Las comparaciones entre los datos de cada ensamble se hicieron seleccionando $q=1$ para incorporar el número de garrapatas de las distintas especies al análisis, sin enfocarse en especies dominantes, con un bootstrap de 1000 repeticiones.

3.4.2. Variación temporal de la comunidad de garrapatas

Se comparó la abundancia de cada especie y estadio de garrapatas colectadas sobre la vegetación en cada tipo de ambiente entre los dos años de muestreo, entre las estaciones climáticas y entre los meses de colecta. Se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney-Wilcoxon para comparar entre el primer y segundo año, y la prueba de Kruskal-Wallis para comparar entre las estaciones y los meses. Las mismas pruebas se utilizaron para comparar el número de garrapatas en su etapa de vida parasitaria (incluyendo los hospedadores humanos), y en este caso también se calculó la abundancia media y su distribución temporal en las especies de garrapatas más abundantes encontradas sobre las especies hospedadoras con mayor número de individuos revisados.

3.4.3. Modelos de parasitismo en mamíferos medianos

La media, la prevalencia y los intervalos de confianza, con un remuestreo (bootstrap) de 2000 repeticiones, se calcularon utilizando el software estadístico QP3.0 (Reiczigel y Rózsa, 2005) para cada especie y estadio de garrapata colectada sobre mamíferos medianos.

Para la descripción de la asociación entre las garrapatas colectadas y sus hospedadores, se construyeron modelos lineales generalizados (GLM) para analizar los

datos, utilizando el paquete MASS (Venables y Ripley, 2002) sobre la plataforma de R 3.4.1 (R Core Team, 2017). Con el objetivo de obtener resultados con mayor confianza y verosimilitud en relación al número de variables analizadas, se consideraron las especies de garrapatas con mayores prevalencias sobre las dos especies de mamíferos con mayor tasa de captura para la construcción de modelos. Se consideraron dos grupos de variables: I) Variables asociadas al hospedador: sexo, edad (especímenes de 3 a 12 meses de edad se consideraron juveniles/especímenes mayores a 12 meses de edad se consideraron adultos) y peso (kg) para *N. nasua* y sexo y peso para *D. aurita* (todos los especímenes capturados fueron adultos); II) Variables asociadas a factores externos: estación (invierno/primavera/verano/otoño) y sitio de captura determinado por el grado de perturbación antrópica (Alto disturbio: Estación Cataratas/Dos Hermanas/Viejo Hotel, Bajo disturbio: CIES/Garganta/Apepú). Posibles correlaciones entre variables explicatorias fueron testeadas para evaluar su inclusión en el análisis estadístico.

Se calcularon los parámetros de dispersión de los modelos globales y se evaluaron los factores de inflación de la varianza (VIF) de las variables de los modelos iniciales con el paquete car (Fox y Weisberg, 2011) para confirmar su permanencia en los modelos antes de comenzar el análisis. La selección de los modelos se realizó mediante una simplificación paso a paso de los términos utilizando el Criterio de Información de Akaike ajustado para muestras pequeñas (AICc), utilizando el paquete MuMIn para R (Barton, 2016). Las variables que no causaron una reducción de al menos dos unidades del AICc del modelo se eliminaron (Burnham y Anderson, 2002).

Finalmente, se utilizaron contrastes de Tukey para realizar comparaciones múltiples entre los diferentes niveles de las variables categóricas que fueron significativas en los modelos finales.

3.5. Detección de agentes Rickettsiales en garrapatas y tejidos de los hospedadores

Las garrapatas seleccionadas para la detección de bacterias de los géneros *Anaplasma*, *Ehrlichia* y *Rickettsia* fueron acondicionadas para su procesamiento. Se

lavarón todos los especímenes individualmente con una solución tamponada para eliminar el exceso de etanol, antes de introducirlos en los tubos para la extracción de ADN. Dentro de los tubos, las garrapatas fueron escindidas con hojas de bisturí estériles y/o trituradas mediante tips sellados y autoclavados.

Las muestras de sangre de mamíferos medianos y roedores sigmodontinos fueron descongeladas minutos antes de su procesamiento y 200 µl fueron utilizados para la extracción de ADN. Trozos de no más de 5 mm (25-50 mg) de órganos de roedores sigmodontinos (bazo e hígado) fueron seccionados con hojas de bisturí estériles antes de colocarlos en los tubos y se los dejó secar durante una hora para evaporar el etanol.

3.5.1. Extracción de ADN

El ADN de las garrapatas fue extraído mediante digestión proteolítica con la enzima proteinasa K, colocando cada espécimen o pool de dos a siete especímenes de la misma especie y estadio en una solución formada por:

- 340 µl de una solución preparada con TRIS (10 mM a pH 8), EDTA (100 mM) y NaCl (100 mM)
- 40 µl de SDS (sodio-dodecil fosfato) al 20 %
- 20 µl de proteinasa K, 500 µg/ml (Invitrogen®).

Las muestras permanecieron en contacto con la solución durante un tiempo mínimo de tres horas a 55°C y 350 rpm. Luego se agregaron 400 µl de solución de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico para desnaturalizar y precipitar las proteínas. Después de una centrifugación de cinco minutos a 14.000 rpm a temperatura ambiente (27°C aproximadamente), se trasvasó el sobrenadante a otro tubo. La precipitación del ADN se realizó con etanol absoluto, reposando a -18°C durante un mínimo de cuatro horas. Finalmente se vació el contenido de etanol de los tubos y el ADN extraído se reconstituyó en una solución amortiguadora TE (TRIS 10nM a pH 7,6; EDTA 0,1 mM).

El ADN de muestras de sangre y órganos de mamíferos fue extraído utilizando kits de extracción de ADN High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche®). Se adicionaron 40µl de proteinasa K y 200 µl de Binding Buffer (Roche®) a cada muestra de sangre, se homogeneizó y se incubó en baño seco a 70°C durante 10 minutos. Las muestras de órganos de roedores se incubaron con 40µl de proteinasa K y 200µl de Buffer Lisis Tissue (Roche®) a 55°C durante por lo menos una hora. Luego, se trasvasaron las muestras a las columnas de extracción y se centrifugaron a 8.000 xg durante un minuto. Se realizaron lavajes con Wash Buffer (Roche®) y la elución del ADN con 60 µl de Elution Buffer (Roche®) en el caso de muestras de sangre, y 200 µl del mismo buffer en el de muestras de órganos.

3.5.2. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para la detección de ADN de bacterias del género *Anaplasma*, las muestras de garrapatas colectadas sobre vegetación se sometieron a PCR convencional utilizando los cebadores external forward, 5'-GCATAGCCTCCGCGTCTTTC-3'; external reverse, 5'-TCCTCGCCTTGCCCTCAGA-3', que amplifican un fragmento de ca. 450-pb del gen msp5 que codifica la proteína mayor de superficie 5 (Torioni de Echaide y col., 1998). Se seleccionaron al azar especímenes representativos y se realizaron las PCR con el siguiente protocolo:

- un ciclo de desnaturalización inicial del ADN durante 3 min a 95°C
- 35 ciclos con desnaturalización a 95°C por 30 seg, hibridación a 65°C por 58 seg y polimerización a 72°C durante 30 seg
- un ciclo de polimerización final de 10 min a 72°C.

Para la detección de bacterias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* en garrapatas y tejidos de hospedadores seleccionados al azar, las muestras se sometieron a una PCR convencional amplificando un fragmento del gen de ARNr 16S de *Ehrlichia* y *Anaplasma* con los cebadores EHR16SD, 5'-GGTACCYACAGAAGAAGTCC-3'; EHR16SR, 5'-TAGCACTCATCGTTTACAGC-3', con el siguiente protocolo (Parola y col., 2000):

- un ciclo de desnaturalización inicial del ADN durante 5 min a 95°C

- 35 ciclos con desnaturalización a 95°C por 30 seg, hibridación a 55°C por 30 seg y polimerización a 72°C durante 90 seg
- un ciclo de polimerización final de 5 min a 72°C.

En el caso de sangre y órganos de hospedadores, se realizó una PCR convencional para la amplificación de un fragmento del gen *msp1a* de *Anaplasma*. Se emplearon los cebadores: 1, 5'-ACCTCCGAGTAGTCTACCTTCGTT-3'; 2, 5'-TGCATAAGCACGAGTCGTATGGAG-3', y el siguiente protocolo (Zimmer y col., 2010):

- un ciclo de desnaturalización inicial del ADN durante 5 min a 94°C
- 35 ciclos con desnaturalización a 95°C por 30 seg, hibridación a 59°C por 45 seg y polimerización a 72°C durante 80 seg
- un ciclo de polimerización final de 5 min a 72°C.

Para la detección de ADN de bacterias del género *Ehrlichia* en muestras de garrapatas y tejidos de hospedadores también se empleó una PCR convencional para amplificar un fragmento de 409-pb del gen *dsb* (proteína de formación de enlaces disulfuro). Se utilizaron los cebadores Dsb-330: 5'-GATGATGTCTGAAGATATGAAACA AAT-3'; Dsb-728: 5'-CTGCTCGTCTATTTTACTTCTTAAAGT-3' y el siguiente protocolo (Doyle y col., 2005):

- un ciclo de desnaturalización inicial del ADN durante 2 min a 95°C
- 35 ciclos con desnaturalización a 95°C por 15 seg, hibridación a 62°C por 30 seg y polimerización a 72°C durante 30 seg
- un ciclo de polimerización final de 5 min a 72°C.

Para la detección de ADN de bacterias del género *Rickettsia* en garrapatas colectadas sobre la vegetación, las muestras de ADN extraído se sometieron a PCR en tiempo real (rtPCR) utilizando los siguientes cebadores: CS-5, 5'-GAGAGAAAATTATATCCAAATGTTGAT-3'; CS-6, 5'-AGGGTCTTCGTGCATTCTT-3', que amplifican un fragmento de ca. 150-pb del gen *rickettsial* que codifica la enzima citrato sintasa (*gltA*) (Labruna y col., 2004b; Guedes y col., 2005). Se realizaron las rtPCR con el siguiente protocolo:

- un ciclo de desnaturalización inicial del ADN durante 3 min a 95°C

- 40 ciclos con desnaturalización a 95°C por 15 seg, hibridación a 48°C por 30 seg y polimerización a 72°C durante 30 seg
- un ciclo de polimerización final de 7 min a 72°C.

También se utilizó una PCR convencional para la amplificación de un fragmento de ca. 830-pb del gen *gltA* en muestras de ADN de garrapatas y tejidos de hospedadores, utilizando los cebadores CS-239: 5'-GATGATGTCTGAAGATATGAAACA AAT-3', y CS-1069: 5'-CTGCTCGTCTATTTTACTTCTTAAAGT-3', siguiendo el mismo protocolo de ciclado descrito para rtPCR (Labruna y col., 2004b).

Las muestras positivas a la amplificación del gen *gltA* fueron sometidas a una PCR adicional para amplificar un fragmento de ca. 550-pb del gen *ompA*, que codifica una proteína de membrana externa específica de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas. Se utilizaron los cebadores Rr190.70p: 5'-ATGGCGAATATTTCTCCAAAA-3' y Rr190.602n: 5'-AGTGCAGCATTCGCTCCCCT-3', con el siguiente protocolo (Regnery y col., 1991):

- un ciclo de desnaturalización inicial del ADN durante 5 min a 95°C
- 35 ciclos con desnaturalización a 95°C por 40 seg, hibridación a 58°C por 30 seg y polimerización a 65°C durante 45 seg
- un ciclo de polimerización final de 10 min a 72°C.

Las muestras positivas a la amplificación del gen *ompA* fueron nuevamente testeadas para la amplificación de un fragmento de ca. 800-pb del gen *ompB*, que también codifica un antígeno de superficie específico de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas. Se emplearon los cebadores 120-M59: 5'-CCGCAGGGTTGGTAACTGC-3' y 120-807: 5'-CCTTTTAGATTACCGCCTAA-3', y el siguiente protocolo (Roux y Raoult, 2000):

- un ciclo de desnaturalización inicial del ADN durante 3 min a 95°C
- 40 ciclos con desnaturalización a 95°C por 30 seg, hibridación a 50°C por 30 seg y polimerización a 68°C durante 90 seg
- un ciclo de polimerización final de 7 min a 68°C.

Todas las reacciones se llevaron a cabo con la enzima *Taq DNA Polymerase* (Promega®) y se utilizaron controles negativos y positivos de amplificación. Como controles positivos, dependiendo el caso, se utilizó ADN de *R. massiliae*, *R. parkeri* s.s., *E. canis* y *A. marginale*.

3.5.3. Lectura de resultados

La lectura rápida de resultados de las amplificaciones se realizó mediante corrida electroforética en gel de agarosa (1,5% de agarosa en buffer TAE) preparado con tintura fluorescente intercalante para ácidos nucleicos GelRed.

En cada pocillo del gel se sembraron 8 µl de las muestras amplificadas y se realizó la corrida a 90 V durante 30-45 min. En cada gel se sembraron también los controles positivos y negativos de amplificación y el marcador de peso molecular (ladder). La lectura se realizó mediante un transiluminador de luz ultravioleta MaestroGen®.

3.5.4. Purificación de productos de PCR, secuenciación y análisis de secuencias

Los productos de PCR positivos se purificaron con Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®). Las secuencias obtenidas fueron sometidas a alineamientos múltiples con BioEdit Sequence Alignment Editor (Hall, 1999), utilizando el algoritmo Clustal W (Thompson y col., 1994). La elección del mejor modelo de sustitución nucleotídica se realizó con ModelTest (Posada y Crandall, 2008). Se analizaron las relaciones evolutivas empleando el método de Maximum Likelihood con el programa MEGA 5.0 (Tamura y col., 2011). Las diferencias en la composición de nucleótidos se analizaron excluyendo las posiciones con “gaps” entre los pares de secuencias y la fiabilidad de las filogenias se evaluó mediante el procedimiento de bootstrap con 1000 repeticiones.

4.RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Muestras colectadas

Se colectaron 12.697 garrapatas de vida libre sobre la vegetación, de las cuales 11.990 correspondieron a ambientes de selva y 707 a agroecosistemas.

Sobre hospedadores, se colectaron 1.953 especímenes en ambientes de selva, 970 en agroecosistemas y 107 en ambientes urbanos, y 317 garrapatas pertenecientes a los tres ambientes fueron colectadas infestando seres humanos. En entornos de selva, se capturaron 419 animales silvestres, mientras que en agroecosistemas se examinaron 105 perros y 210 bovinos. En los sitios urbanos se revisaron 105 perros. Cabe destacar que ninguno de los perros examinados había recibido tratamientos acaricidas, mientras que los bovinos recibían tratamientos ocasionales (no sistemáticos) con ivermectina o amitraz.

En ambientes de selva, se encontraron diez especies de garrapatas sobre 32 especies de animales: *A. brasiliense*, *A. coelebs*, *A. incisum*, *Amblyomma longirostre*, *A. ovale*, *A. dubitatum*, *A. calcaratum*, *H. juxtakochi*, *Haemaphysalis leporispalustris*, e *Ixodes schulzei*. Se colectaron especímenes de seis especies de garrapatas en fase de vida libre: *A. brasiliense*, *A. coelebs*, *A. incisum*, *A. longirostre*, *A. ovale* y *H. juxtakochi*. En los agroecosistemas se encontraron tres especies de garrapatas sobre tres especies hospedadoras: *A. ovale* y *R. sanguineus* sensu stricto sobre perros y *R. microplus* sobre bovinos y perros.

Ixodes schulzei es una especie neotropical descrita a partir de hembras colectadas sobre el roedor sigmodontino *Nectomys squamipes* (nombrado como *Neotomys squammipes*) (Aragão y Fonseca, 1951) (Figura 14). Hasta el momento, solo han sido descritos la hembra y estadios inmaduros, mientras que el macho de esta especie es aún desconocido. Todos los registros de *I. schulzei* pertenecen a los estados brasileiros de Paraná, Santa Catarina, Minas Gerais, São Paulo y Rio de Janeiro (Aragão y Fonseca, 1951; Labruna y col., 2003; Arzuay col., 2005; Onofrio y col., 2013). Esta especie, junto a *Ixodes amarali*, *Ixodes loricatus* e *Ixodes luciae*, pertenecen al “grupo *Ixodes loricatus*”. En este estudio, se hallaron dos hembras adultas de *I. schulzei* sobre

N. squamipes en el PNI, determinando el primer registro de esta especie en Argentina y expandiendo así su rango de distribución.

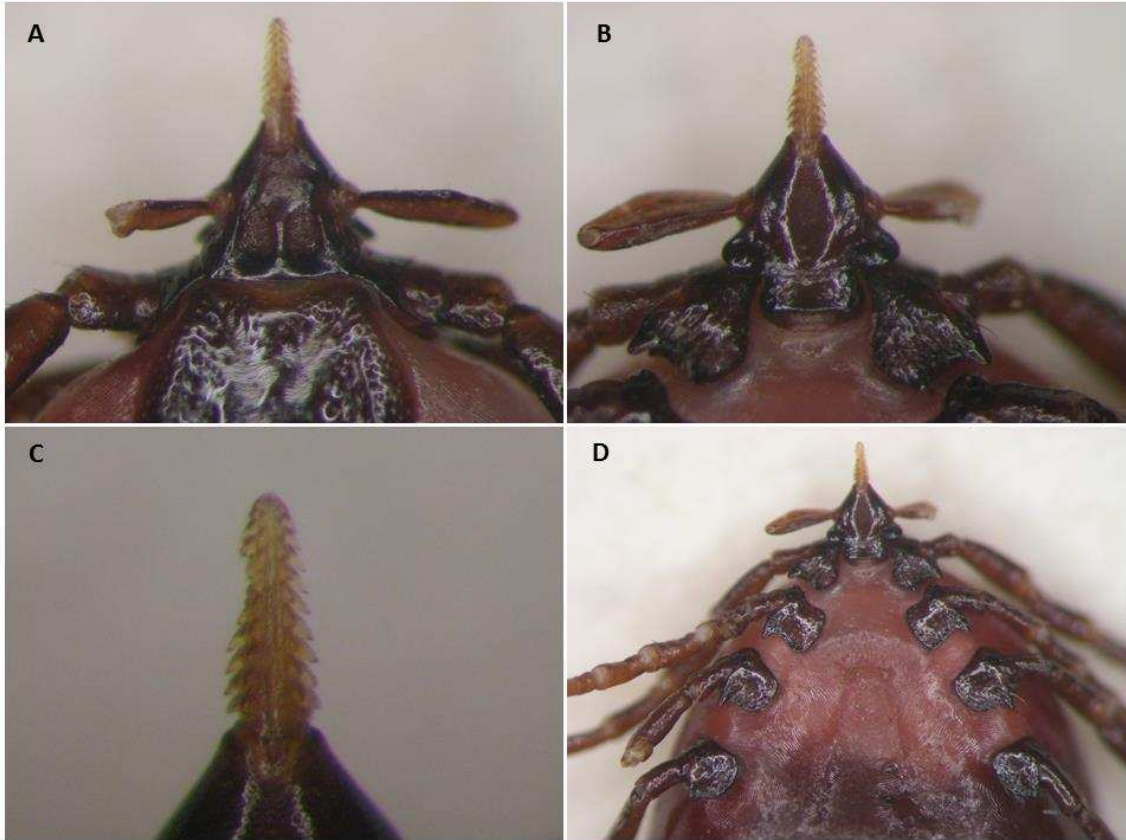


Figura 14. A) Vista dorsal del capítulo de una hembra de *Ixodes schulzei* colectada sobre *Nectomys squamipes* en el Parque Nacional Iguazú. B) Vista ventral del capítulo de una hembra de *Ixodes schulzei*. C) Hipostoma de una hembra de *Ixodes schulzei*. D) Coxas I a IV de una hembra de *Ixodes schulzei*.

El taxón *R. sanguineus* está representado por más de una especie, y está dividido en dos clados en el Nuevo Mundo: el “linaje tropical” representado por poblaciones tropicales y subtropicales, y el “linaje templado” representado por poblaciones del sur de América del Sur (Moraes-Filho y col., 2011; Nava y col., 2012). Las garrapatas del grupo *R. sanguineus* analizadas en este trabajo pertenecen al linaje templado, ahora determinadas como *R. sanguineus* s.s. (Nava y col., 2018). Las

secuencias del gen 16S obtenidas de especímenes representativos presentaron más del 98% de similitud con *R. sanguineus* s.s de Francia.

A su vez, en el agroecosistema se encontraron tres especies de garrapatas en etapa de vida libre: *A. brasiliense*, *A. ovale* y *R. microplus*. En ambientes urbanos no se colectaron garrapatas de vida libre sobre la vegetación, mientras que sólo se encontraron garrapatas *R. sanguineus* s.s. sobre perros y humanos.

Como se describió en la sección "Materiales y métodos", la determinación morfológica de las larvas de *A. incisum*, *A. brasiliense* y *A. coelebs* se confirmó mediante el análisis de secuencias del gen 16S rRNA. La comparación filogenética de las secuencias obtenidas de las larvas de *A. incisum* (número de acceso en GenBank: KM519939), *A. brasiliense* (KM519941) y *A. coelebs* (KM519936) con las de estas tres especies disponibles en GenBank confirmó las determinaciones *a priori* basadas en caracteres morfológicos (Figura 15). Las similitudes entre las secuencias de cada taxón fueron superiores al 98%.

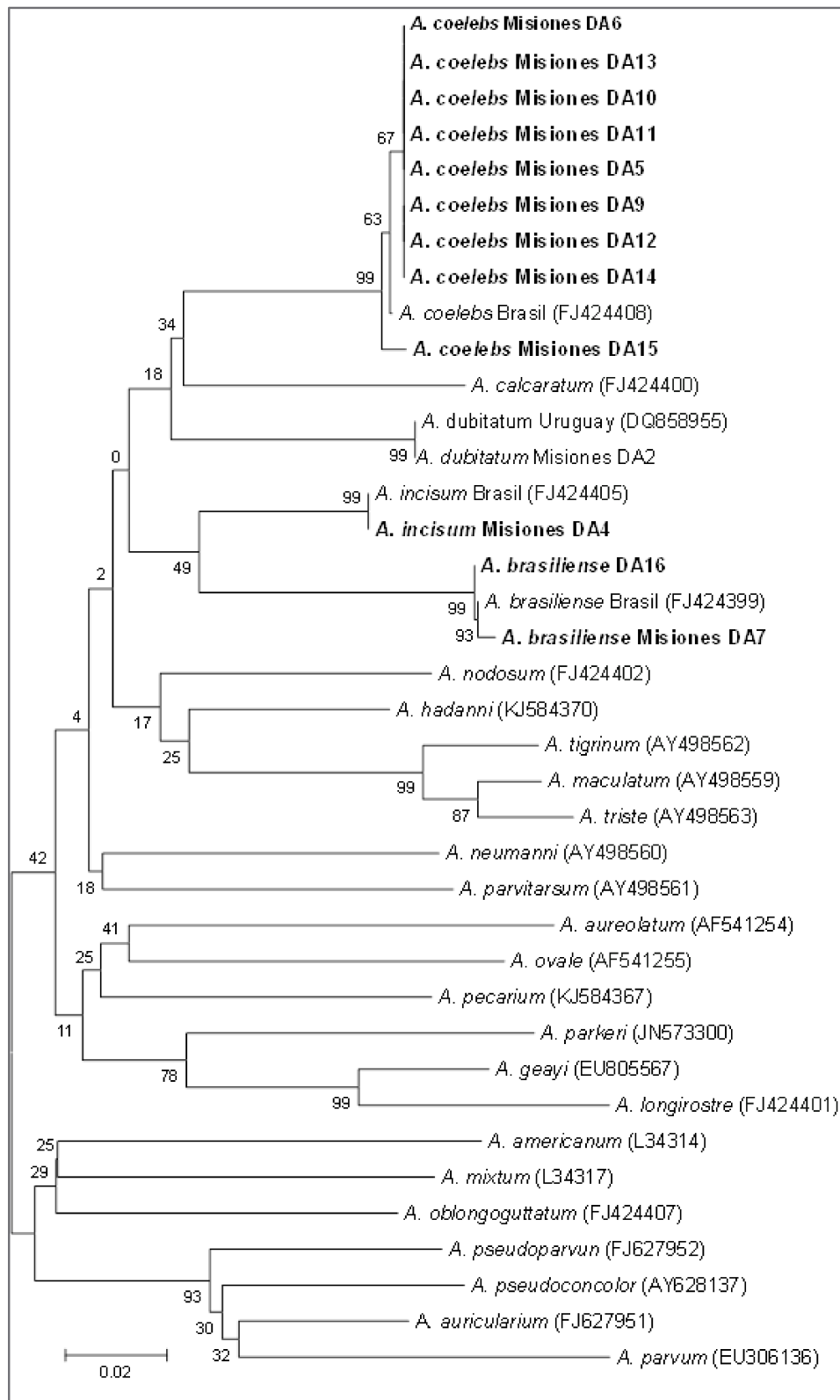


Figura 15. Árbol de máxima verosimilitud a partir de secuencias parciales del gen 16S rARN de Ixodidae. En negrita, las secuencias obtenidas de garrapatas *Amblyomma brasiliense*, *Amblyomma coelebs* y *Amblyomma incisum*. Los números representan el soporte de bootstrap de 1000 repeticiones. Entre paréntesis, los números de acceso a GenBank.

El número de garrapatas de cada especie colectada sobre la vegetación durante los dos años de muestreo, además de la prevalencia en cada especie hospedadora capturada, se presenta en las Tablas 4 y 5. La especie más abundante sobre la vegetación en ambientes de selva fue *A. coelebs*, tanto sobre vegetación como sobre hospedadores, representando el 82,9% del total de los especímenes recogidos sobre la vegetación y el 83,2% en los hospedadores. En los agroecosistemas, *R. microplus* fue la especie más abundante, con 99,3% (larvas) de todas las garrapatas colectadas sobre la vegetación y 95,1% (todas las etapas parasitarias) sobre los hospedadores. En ambientes urbanos, no se encontraron especímenes en la vegetación, y *R. sanguineus* s.s. fue la única especie de garrapata colectada sobre hospedadores.

Tabla 4. Número de garrapatas colectadas sobre hospedadores y sobre la vegetación, 2014-2016. Entre paréntesis, número de individuos infestados.

Hospedadores	Examinados	Infestados	<i>Amblyomma brasiliense</i>			<i>Amblyomma calcaratum</i>	<i>Amblyomma coelebs</i>			<i>Amblyomma incisum</i>			<i>Amblyomma dubitatum</i>	<i>Amblyomma longirostre</i>		
			Larvas	Ninfas	Adultos	Adulto	Larvas	Ninfas	Adultos	Larvas	Ninfas	Adultos	Ninfa	Larvas	Ninfas	Adultos
Didelphimorphia																
<i>Didelphis aurita</i>	36	34	1 (1)	2 (2)			221 (20)	519 (34)		1 (1)						
<i>Didelphis albiventris</i>	1	1					17 (1)	35 (1)								
<i>Monodelphis americana</i>	1	0														
<i>Philander frenatus</i>	3	0														
<i>Cryptonanus chacoensis</i>	1	0														
Carnivora																
<i>Nasua nasua</i>	80	74	1 (1)	15 (13)	1 (1)		183 (23)	310 (65)								
<i>Cerdocyon thous</i>	2	2														3 (1)
<i>Leopardus pardalis</i>	2	2					4 (2)	2 (1)								
<i>Eira barbara</i>	2	2					36 (1)	59 (2)								
<i>Puma concolor</i>	1	1														
<i>Puma yagouaroundi</i>	1	1														
Perros	210	74														
Pilosa																
<i>Tamandua tetradactyla</i>	2	2		4 (1)		1 (1)										6 (1)
Rodentia																
<i>Dasyprocta azarae</i>	9	9	10 (3)	3 (3)			89 (7)	67 (9)								
<i>Akodon cf. A. montensis</i>	19	3														
<i>Oligoryzomys cf. O. nigripes</i>	5	1														
<i>Sooretamys angouya</i>	1	0														
<i>Nectomys squamipes</i>	4	1														
<i>Oxymycterus cf. O. misionalis</i>	1	0														
Lagomorpha																
<i>Sylvilagus brasiliensis</i>	3	3														3 (2)
Artiodactyla																
<i>Mazama americana</i>	2	2	8 (1)	3 (2)			2 (1)									
Bovinos	210	198														
Perissodactyla																
<i>Tapirus terrestris</i>	2	2		1 (1)	74 (1)			4 (1)	52 (1)			14 (1)				
Aves																
	237	20						6 (5)								12 (8)
Humanos		73	25 (8)	6 (6)			150 (30)	100 (54)	3 (3)	13 (3)	14 (12)			1 (1)		7 (6)
Vegetación			275	598	298		9145	640	26	635	148	37				1

Tabla 4 (continuación)

Hospedadores	Examinados	Infestados	<i>Amblyomma ovale</i>			<i>Haemaphysalis juxtakochi</i>			<i>Haemaphysalis leporispalustris</i>	<i>Ixodes schulzei</i>	<i>Rhipicephalus microplus</i>			<i>Rhipicephalus sanguineus</i> s.s.	
			Larvas	Ninfas	Adultos	Larvas	Ninfas	Adultos	Adultos	Adultos	Larvas	Ninfas	Adultos	Ninfas	Adultos
Didelphimorphia															
<i>Didelphis aurita</i>	36	34	21 (2)	1 (1)		1 (1)	2 (1)								
<i>Didelphis albiventris</i>	1	1													
<i>Monodelphis americana</i>	1	0													
<i>Philander frenatus</i>	3	0													
<i>Cryptonanus chacoensis</i>	1	0													
Carnivora															
<i>Nasua nasua</i>	80	74	7 (5)	1 (1)	52 (21)	27 (9)	15 (12)								
<i>Cerdocyon thous</i>	2	2			3 (1)										
<i>Leopardus pardalis</i>	2	2													
<i>Eira barbara</i>	2	2													
<i>Puma concolor</i>	1	1			4 (1)										
<i>Puma yagouaroundi</i>	1	1			1 (1)										
Perros	210	74			38 (17)								4 (3)	43 (23)	74 (37)
Pilosa															
<i>Tamandua tetradactyla</i>	2	2													
Rodentia															
<i>Dasyprocta azarae</i>	9	9	2 (1)			2 (2)									
<i>Akodon</i> cf. <i>A. montensis</i>	19	3	5 (2)	2 (1)											
<i>Oligoryzomys</i> cf. <i>O. nigripes</i>	5	1		1 (1)											
<i>Sooretamys angouya</i>	1	0													
<i>Nectomys squamipes</i>	4	1							2 (1)						
<i>Oxymycterus</i> cf. <i>O. misionalis</i>	1	0													
Lagomorpha															
<i>Sylvilagus brasiliensis</i>	3	3							2 (1)						
Artiodactyla															
<i>Mazama americana</i>	2	2					9 (2)	1 (1)							
Bovinos	210	198									66 (24)	182 (114)	670 (198)		
Perissodactyla															
<i>Tapirus terrestris</i>	2	2			3 (2)			1 (1)							
Aves															
	237	20	1 (1)			5 (2)									
Humanos															
		73			2 (2)		1 (1)						1 (1)		1 (1)
Vegetación															
			2	5	24	78	63	20			702				

Tabla 5. Garrapatas colectadas sobre aves en el Parque Nacional Iguazú, 2014-2016. I/E, Infestados/Examinados

Orden	Familia	Especie	I/E	<i>Amblyomma coelebs</i> Ninfas	<i>Amblyomma longirostre</i> Larvas	<i>Amblyomma ovale</i> Larvas	<i>Haemaphysalis juxtakochi</i> Larvas
Accipitriformes	Accipitridae	<i>Rupornis magnirostris</i>	0/2				
Columbiformes	Columbidae	<i>Leptotila verreauxi</i>	0/9				
Strigiformes	Strigidae	<i>Megascops choliba</i>	0/1				
Caprimulgiformes	Caprimulgidae	<i>Nyctidromus albicollis</i>	0/1				
	Trochilidae	<i>Thalurania furcata</i>	0/1				
		<i>Thalurania glaucopis</i>	0/9				
		<i>Amazilia versicolor</i>	0/9				
		<i>Phaethornis eurynome</i>	0/2				
Trogoniformes	Trogonidae	<i>Trogon rufus</i>	0/2				
Coraciiformes	Alcedinidae	<i>Chloroceryle americana</i>	0/1				
	Momotidae	<i>Baryphthengus ruficapillus</i>	1/2	1		1	
Piciformes	Picidae	<i>Celeus flavescens</i>	0/1				
		<i>Picumnus temminckii</i>	0/2				
	Ramphastidae	<i>Pteroglossus castanotis</i>	0/1				
Psittaciformes	Psittacidae	<i>Pionus maximiliani</i>	0/1				
Passeriformes	Thamnophilidae	<i>Dysithamnus mentalis</i>	0/3				
		<i>Automolus</i>					
	Furnariidae	<i>leucophthalmus</i>	1/3			2	
		<i>Dendrocolaptes</i>					
		<i>platyrostris</i>	0/1				
		<i>Dendrocincla fuliginosa</i>	1/8			1	
		<i>Philydor atricapillus</i>	1/1				1
		<i>Philydor rufum</i>	0/1				
		<i>Xenops minutus</i>	0/3				
		<i>Sittasomus griseicapillus</i>	0/8				
	Tyrannidae	<i>Platyrinchus mystaceus</i>	1/4			1	
		<i>Myiornis auricularis</i>	0/1				
		<i>Mionectes rufiventris</i>	0/3				
		<i>Cnemotriccus fuscatus</i>	0/10				
		<i>Poecilotriccus plumbeiceps</i>	0/1				
		<i>Pitangus sulphuratus</i>	0/4				
		<i>Corythopsis delalandi</i>	0/5				
		<i>Leptopogon</i>					
		<i>amaurocephalus</i>	1/10			1	
	Pipridae	<i>Chiroxiphia caudata</i>	1/5				1
		<i>Pipra fasciicauda</i>	1/23			3	
	Tityridae	<i>Schiffornis virescens</i>	0/1				
	Vireonidae	<i>Vireo olivaceus</i>	0/1				
	Corvidae	<i>Cyanocorax chrysops</i>	0/11				
	Turdidae	<i>Turdus albicollis</i>	3/8			4	
		<i>Turdus rufiventris</i>	3/12		4		
		<i>Turdus amaurochalinus</i>	0/4				
		<i>Turdus leucomelas</i>	4/22	1		3	5
	Parulidae	<i>Basileuterus culicivorus</i>	0/6				
		<i>Myiothlypis leucoblephara</i>	0/1				
	Thraupidae	<i>Trichothraupis melanops</i>	1/12			1	
		<i>Dacnis cayana</i>	0/3				
		<i>Tersina viridis</i>	0/3				
		<i>Tachyphonus coronatus</i>	1/2				1
	Emberizidae	<i>Arremon flavirostris</i>	0/1				
	Cardinalidae	<i>Habia rubica</i>	0/2				
	Icteridae	<i>Cacicus haemorrhous</i>	0/2				
	Fringillidae	<i>Chlorophonia cyanea</i>	0/2				
		<i>Euphonia violácea</i>	0/4				
		<i>Euphonia pectoralis</i>	0/1				
		<i>Euphonia chlorotica</i>	0/1				

4.1.1. Garrapatas colectadas sobre *Nasua nasua* y *Didelphis aurita*

Un total de 493 garrapatas pertenecientes a las especies *A. brasiliense* (n=15), *A. coelebs* (n=424), *A. ovale* (n=29) y *H. juxtakochi* (n=25) fueron colectadas sobre 93 especímenes de *N. nasua*. A su vez, 552 garrapatas pertenecientes a las especies *A. brasiliense* (n=3), *A. coelebs* (n=524), *A. ovale* (n=22) y *H. juxtakochi* (n=3) fueron colectadas sobre 26 especímenes de *D. aurita* (Figura 16) (ver Tabla Anexo 1).



Figura 16. Ninfas de *Amblyomma* sp. parasitando un ejemplar *Didelphis aurita* en el Parque Nacional Iguazú.

Amblyomma coelebs representó el 90,72% de todas las garrapatas colectadas sobre estos hospedadores. La media y la prevalencia de los diferentes estadios de todas las especies de garrapatas encontradas sobre *N. nasua* y *D. aurita* y sus respectivos intervalos de confianza se detallan en la Tabla 6.

Tabla 6. Prevalencia, abundancia media y límites de los intervalos de confianza de las garrapatas colectadas sobre *Nasua nasua* y *Didelphis aurita*. En paréntesis, número de individuos capturados y garrapatas colectadas.

Especie hospedadora (n)	Especie de garrapata	Estadio (n)	Prevalencia	Intervalo de Confianza (95%)	Abundancia Media	Intervalo de Confianza (BCa) (95%)
<i>Nasua nasua</i> (93)	<i>Amblyomma brasiliense</i>	Larvas (1)	0,01	0,0006 - 0,0573	0,01	0,00 - 0,03
		Ninfas (18)	0,16	0,0964 - 0,2516	0,19	0,11 - 0,30
		Adultos (1)	0,01	0,0006 - 0,0573	0,01	0,00 - 0,03
	<i>Amblyomma coelebs</i>	Larvas (191)	0,29	0,2030 - 0,3920	2,05	1,01 - 4,35
		Ninfas (397)	0,83	0,7375 - 0,8940	4,27	3,25 - 5,78
	<i>Amblyomma ovale</i>	Larvas (7)	0,05	0,0215 - 0,1219	0,08	0,02 - 0,15
		Ninfas (1)	0,01	0,0006 - 0,0573	0,01	0,00 - 0,03
		Adultos (39)	0,19	0,1220 - 0,2893	0,42	0,24 - 0,71
	<i>Haemaphysalis juxtakochi</i>	Larvas (28)	0,11	0,0574 - 0,187	0,3	0,09 - 1,06
		Ninfas (19)	0,16	0,0964 - 0,2516	0,2	0,12 - 0,32
<i>Didelphis aurita</i> (26)	<i>Amblyomma brasiliense</i>	Larvas (1)	0,04	0,0020 - 0,1881	0,04	0,00 - 0,12
		Ninfas (2)	0,08	0,0139 - 0,2460	0,08	0,00 - 0,19
	<i>Amblyomma coelebs</i>	Larvas (215)	0,69	0,4945 - 0,8458	8,27	3,19 - 23,23
		Ninfas (442)	1	0,8715 - 1,0000	17	10,50 - 26,69
	<i>Amblyomma ovale</i>	Larvas (21)	0,08	0,0139 - 0,2460	0,81	0,00 - 2,92
		Ninfas (1)	0,04	0,0020 - 0,1881	0,04	0,00 - 0,12
	<i>Haemaphysalis juxtakochi</i>	Larvas (1)	0,04	0,0020 - 0,1881	0,04	0,00 - 0,12
		Ninfas (2)	0,04	0,0020 - 0,1881	0,08	0,00 - 0,23

4.2. Análisis estadísticos

4.2.1. Caracterización espacial de la comunidad de garrapatas

Las curvas de extrapolación mostraron que el aumento del número de individuos en las muestras no aumentaría el número de especies o la completitud de las muestras. Las estimaciones de cobertura muestral de las muestras de referencia de cada conjunto se encontraron en el rango de 0,9986 a 1. La riqueza de especies del conjunto de garrapatas de ambientes de selva, estimada mediante Chao1, fue de 10,33, superior a la encontrada en agroecosistemas y ambientes urbanos, donde el estimador fue de 3 y 1, respectivamente.

Se obtuvieron los índices de Shannon-Wiener para los ensambles de garrapatas de vida libre de cada ambiente. En el ambiente de selva, el índice fue 0,647

(DE=0,00004), en los agroecosistemas 0,046 (DE=0,0003) y en el medio urbano fue 0 (cero). Para los ensambles de garrapatas de vida parasítica, los índices obtenidos fueron 0,72 (DE=0,0002) en el ambiente de selva, 0,222 (DE=0,0004) en agroecosistemas, y 0 (cero) en ambientes urbanos.

El resultado de la comparación de las abundancias relativas (Horn) de las distintas especies entre los tres ambientes, con un bootstrap de 1000 repeticiones, para los ensambles de garrapatas de vida parasítica, fue un estimador de similitud de 0,0355 (EE=0,0049, IC95%=0,0259-0,045) y un promedio de similitud de pares de ensambles de 0,028. El índice de similitud entre el ambiente de selva y agroecosistema fue 0,043 (EE=0,004, IC95%=0,034-0,051), mientras que entre el agroecosistema y el ambiente urbano fue 0,041 (EE=0,011, IC95%=0,02-0,063). El índice de Horn entre el ambiente de selva y el urbano fue 0 (cero). Para las garrapatas en estadio de vida libre, se obtuvo un índice de similitud de 0,0338 (EE=0,0147, IC95%=0,005-0,0627) entre los ensambles de selva y de agroecosistema.

4.2.2. Variación temporal de la abundancia de garrapatas

Las comparaciones entre años utilizando la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para todas las especies de garrapatas colectadas sobre la vegetación y sobre los hospedadores revelaron que no hubo diferencias significativas entre el primer y segundo año de muestreo ($p > 0,05$).

Las diferencias en la abundancia de las garrapatas entre las estaciones climáticas (verano vs. otoño vs. invierno vs. primavera) utilizando la prueba de Kruskal-Wallis no fueron significativas para casi todas las especies de garrapatas colectadas sobre los hospedadores, con la excepción de larvas de *A. incisum* (se encontraron diferencias entre las abundancias en primavera y verano versus la abundancia en otoño, $p=0,02$, presentando un pico en otoño) y ninfas y adultos de *R. sanguineus* s.s. ($p=0,02$ y $p=0,005$, respectivamente). Esta última especie fue colectada únicamente sobre hospedadores y mostró una diferencia significativa en la carga de ninfas en otoño e invierno contra la carga parasitaria en verano, y una diferencia muy marcada en las cargas de adultos en otoño e invierno contra las de primavera y el verano. Por el

contrario, las comparaciones por estación del número de garrapatas mostraron diferencias significativas para todas las especies colectadas sobre la vegetación en el ambiente de selva ($p < 0,05$), excepto para *A. longirostre* con un solo individuo colectado (Tabla 7).

Tabla 7. Comparación por estación del número de garrapatas colectadas sobre la vegetación en el ambiente de selva, 2014–2016 *.

Especie	Estadio	Verano	Otoño	Invierno	Primavera
<i>Amblyomma brasiliense</i>	Larvas	A	A-B	B	B
	Ninfas	A	A-B	B-C	C
	Adultos	A	A-B	B-C	C
<i>Amblyomma coelebs</i>	Ninfas	A-B	B-C	C	A
<i>Amblyomma incisum</i>	Larvas	A	B-C	A-B	A
<i>Amblyomma ovale</i>	Adultos	A-B	A	A	B
<i>Haemaphysalis juxtakochi</i>	Larvas	A	A-B	A-B	B
	Ninfas	A-B	B-C	C	A
	Adultos	A	A	B	A-B

*Medias con una letra común no presentaron diferencias significativas ($p > 0,05$).

Aunque estuvieron presentes durante todo el año, las larvas de *A. brasiliense* colectadas sobre la vegetación presentaron picos de abundancia en verano y otoño, las ninfas en invierno y los adultos en primavera. Las larvas y ninfas de *A. coelebs* estuvieron presentes durante todas las estaciones, aunque las larvas mostraron mayores abundancias en primavera y verano, mientras que las ninfas fueron más abundantes durante el invierno. Las larvas de *A. incisum* colectadas sobre la vegetación mostraron picos en otoño e invierno, mientras que las ninfas fueron más abundantes sólo en invierno. Se encontraron larvas de *A. ovale* sobre la vegetación en verano y otoño, ninfas en otoño e invierno y adultos principalmente en primavera. Las larvas de *H. juxtakochi* fueron más abundantes en otoño y verano, las ninfas en invierno y los adultos en primavera. Los patrones de estacionalidad de estas especies de garrapatas se muestran en las Figuras 17 a 21.

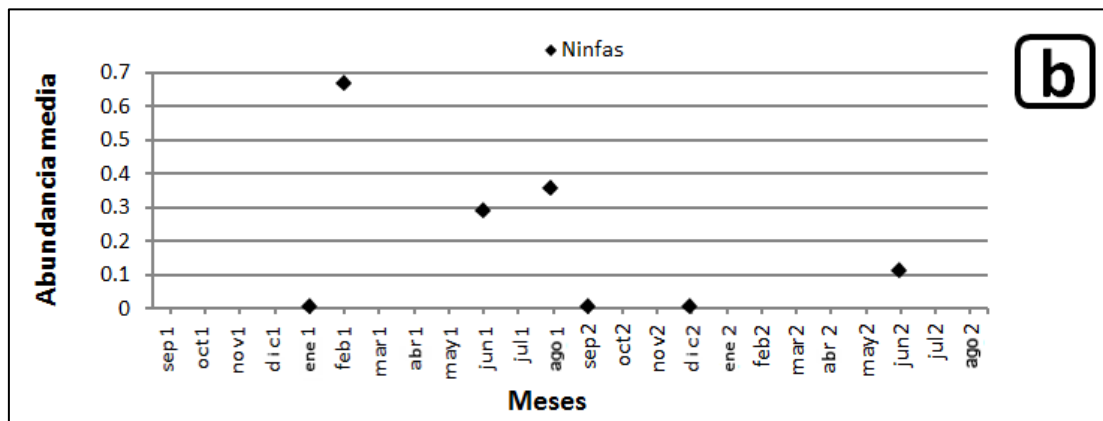
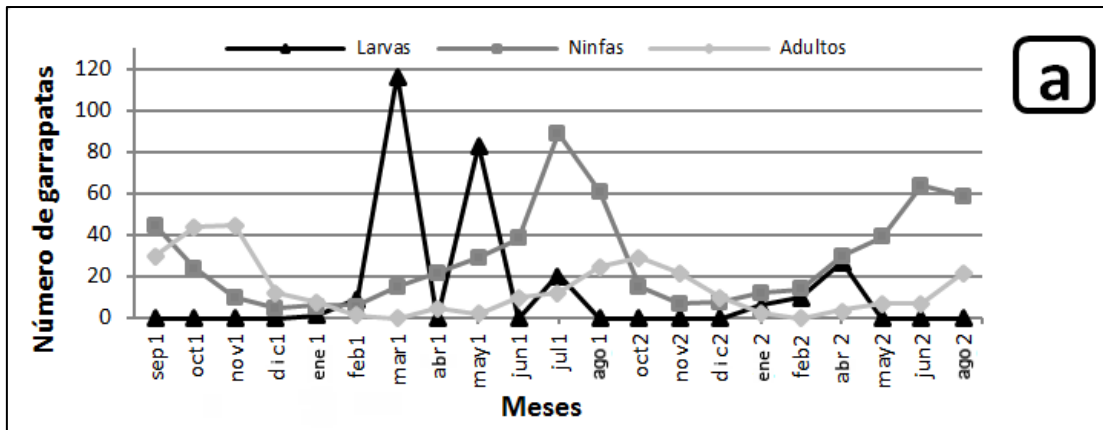


Figura 17. Distribución mensual de garrapatas *Amblyomma brasiliense*. a) Número de garrapatas sobre la vegetación. b) Abundancia media sobre *Nasua nasua*.

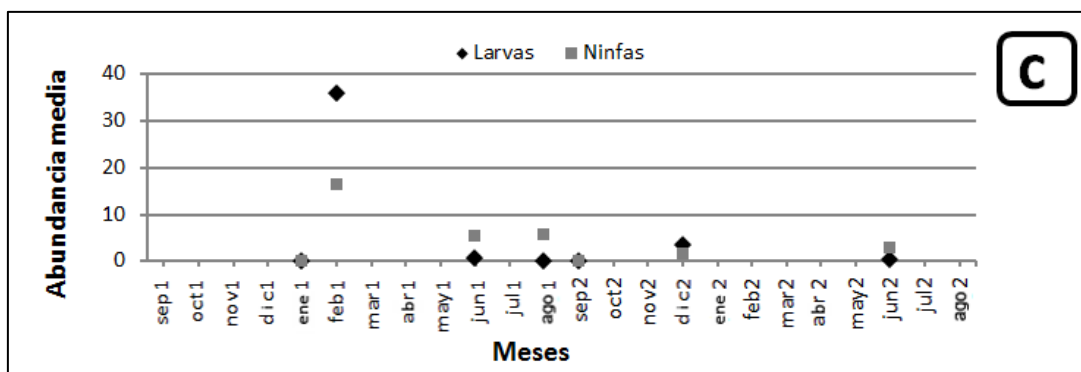
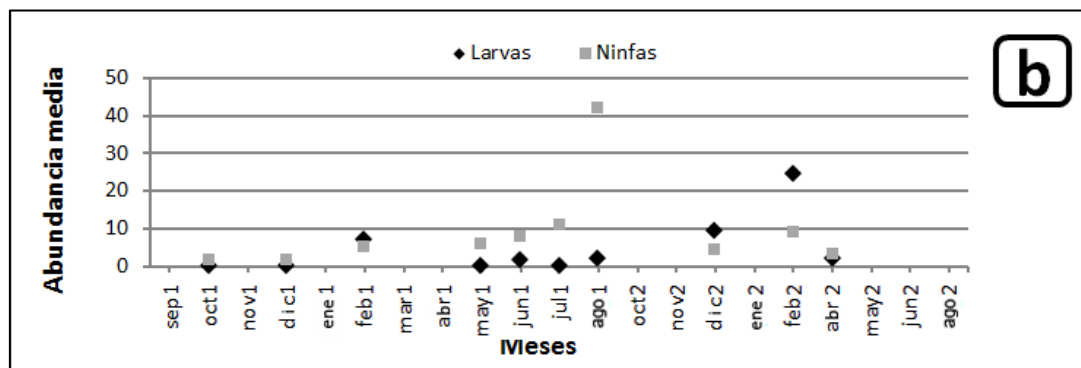
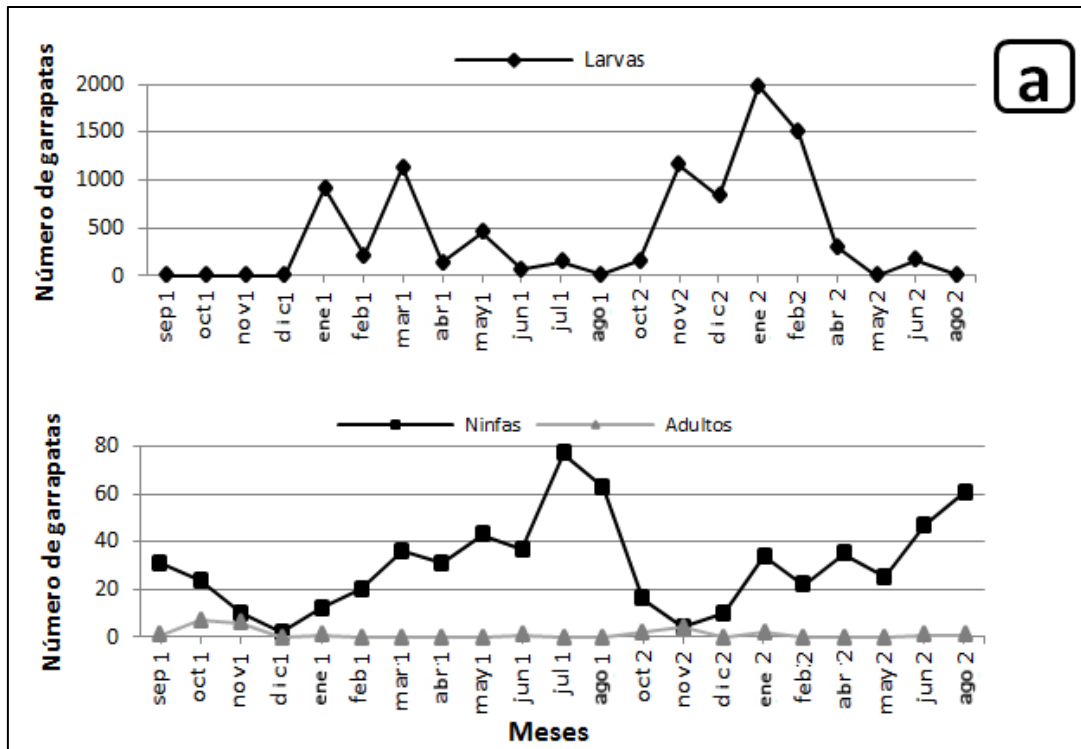


Figura 18. Distribución mensual de garrapatas *Amblyomma coelebs*. a) Número de garrapatas sobre la vegetación. b) Abundancia media sobre *Didelphis aurita*. c) Abundancia media sobre *Nasua nasua*.

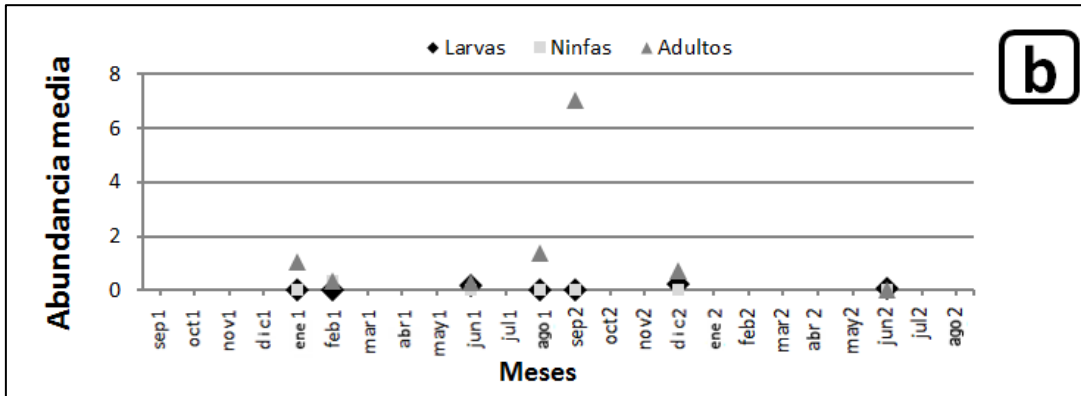
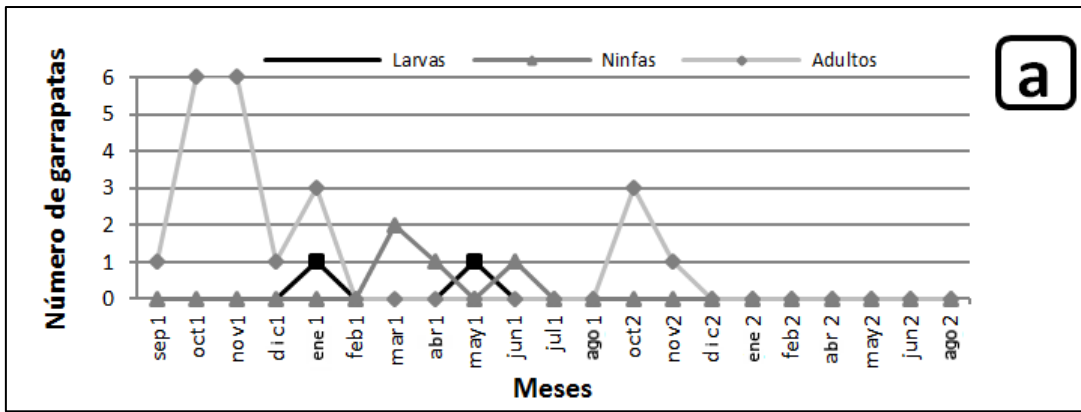


Figura 19. Distribución mensual de garrapatas *Amblyomma ovale*. a) Número de garrapatas sobre la vegetación. b) Abundancia media sobre *Nasua nasua*.

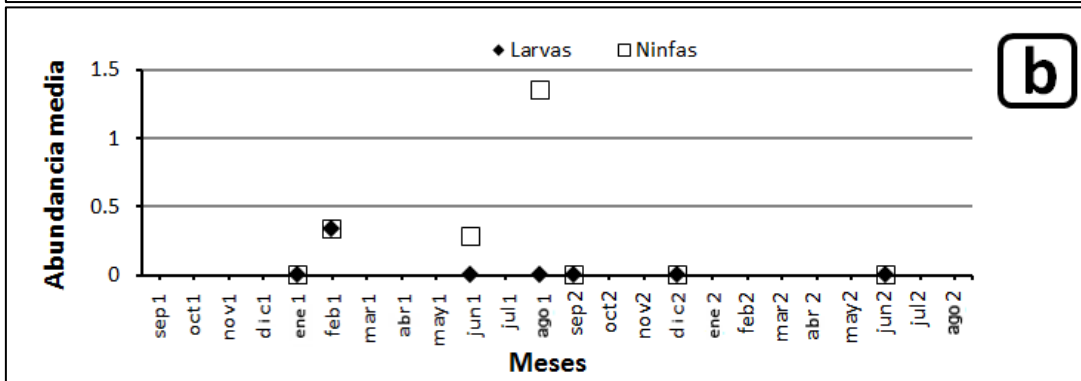
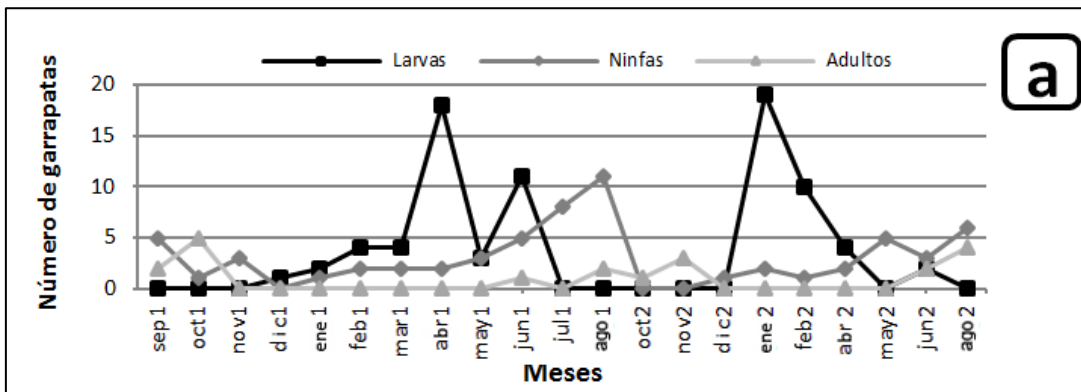


Figura 20. Distribución mensual de garrapatas *Haemaphysalis juxtakochi*. a) Número de garrapatas sobre la vegetación. b) Abundancia media sobre *Nasua nasua*.

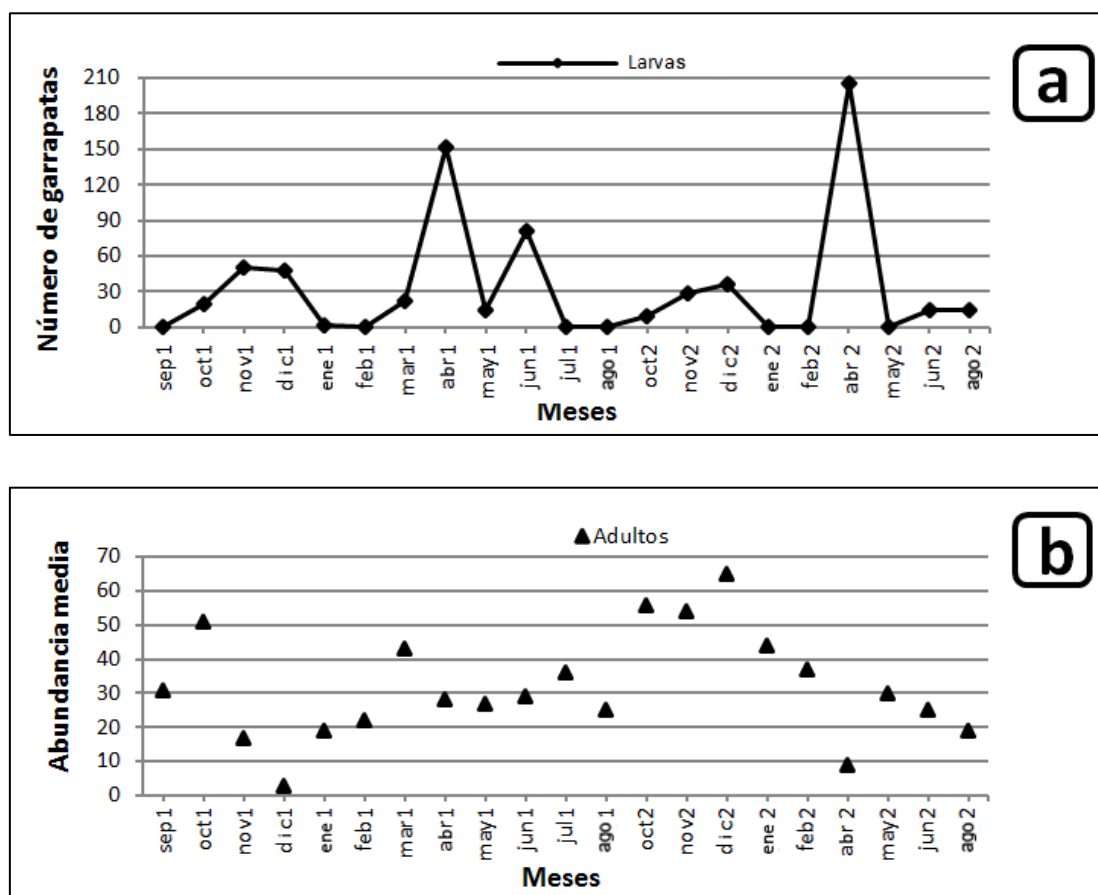


Figura 21. Distribución mensual de garrapatas *Rhipicephalus microplus*. a) Número de larvas sobre la vegetación. b) Abundancia media de adultos sobre bovinos.

El número de adultos de *A. brasiliense* y *A. coelebs* fueron los únicos que mostraron una diferencia significativa entre los meses de colecta ($p=0,049$ y $p=0,047$, respectivamente). Las Figuras 17 a 21 grafican las variaciones mensuales de las especies de garrapatas más abundantes colectadas sobre la vegetación y su contraste con las variaciones en las abundancias medias de las mismas especies sobre sus principales hospedadores. Debido a que *N. nasua*, *D. aurita* y el ganado bovino fueron los hospedadores más comúnmente examinados, y tanto la prevalencia como la abundancia media de algunas especies de garrapatas fueron las más altas en estas especies hospedadoras, las mismas fueron tenidas en cuenta para comparar los picos estacionales del número de garrapatas sobre la vegetación y sobre sus hospedadores.

4.2.3. Modelos de parasitismo en mamíferos medianos

Los conteos de parásitos generalmente poseen una distribución agregada (usualmente Poisson), con pocos hospedadores albergando altas cargas parasitarias, mientras que las mayores frecuencias corresponden a individuos con bajas cargas. En esta sección, al tratarse de conteos de ectoparásitos sobre hospedadores, fue esperable que la distribución de los datos no correspondiera a una distribución normal (Figura 22), por lo que se modelaron funciones no lineales de la media para el análisis estadístico de asociaciones.

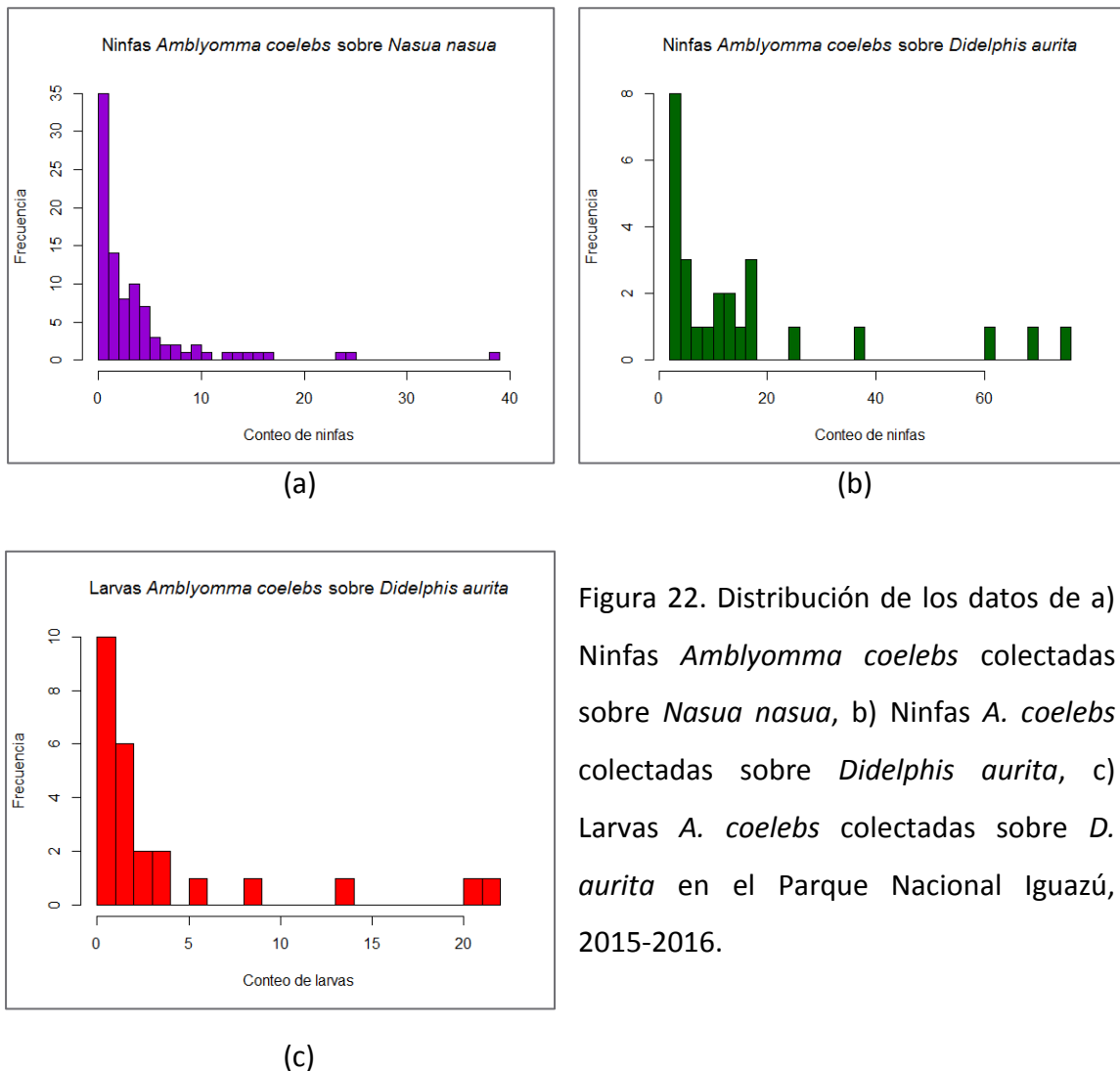


Figura 22. Distribución de los datos de a) Ninfas *Amblyomma coelebs* colectadas sobre *Nasua nasua*, b) Ninfas *A. coelebs* colectadas sobre *Didelphis aurita*, c) Larvas *A. coelebs* colectadas sobre *D. aurita* en el Parque Nacional Iguazú, 2015-2016.

En primer lugar, se contruyeron modelos con respuesta Poisson y se comprobó la sobredispersión calculando la sumatoria de los residuos de Pearson y dividiéndola por los grados de libertad. Al existir sobredispersión en el conjunto de datos, se optó

por la distribución binomial negativa que utiliza también una función de enlace logarítmico, pero que modela un parámetro adicional de dispersión. Se generó entonces un GLM con respuesta binomial negativa y función de enlace logarítmica para explicar la carga de ninfas de *A. coelebs* colectadas sobre *N. nasua*. Debido a que la prevalencia de ninfas de *A. brasiliense*, larvas de *A. coelebs*, larvas y adultos de *A. ovale*, y larvas y ninfas de *H. juxtakochi* sobre *N. nasua* fue inferior al 30% a lo largo de los muestreos, se utilizaron GLM con respuesta binomial para analizar variables asociadas a la presencia de estas garrapatas en lugar de su carga parasitaria. Las larvas y adultos de *A. brasiliense* y ninfas de *A. ovale* se encontraron infestando un solo individuo hospedador, por lo que no se corrieron modelos para estos estadios. Con respecto a *D. aurita*, se realizaron GLM con respuesta binomial negativa para explicar la carga de larvas y ninfas de *A. coelebs*. La prevalencia de las garrapatas restantes en *D. aurita* fue inferior al 10%, lo que dificultó la construcción de modelos estadísticos.

Los altos valores de los VIF en los modelos binomiales que evaluaron la presencia de ninfas de *A. brasiliense*, larvas de *A. ovale* y larvas y ninfas de *H. juxtakochi* sobre *N. nasua*, forzaron la eliminación de un término antes de comenzar los análisis, ya que dicho término presentó una alta colinealidad con otras variables dentro del modelo. En el caso de las larvas de *A. ovale*, se eliminó la variable estación (VIF=15,39), mientras que en los modelos cuyas variables dependientes fueron las ninfas de *A. brasiliense* y las larvas y ninfas de *H. juxtakochi*, la variable explicatoria eliminada fue el sitio (VIF=7,46; VIF=8,37; VIF=6,81, respectivamente). Las variables más fuertemente correlacionadas fueron la estación y el sitio.

Los modelos que explicaron las cargas de las ninfas de *A. coelebs* sobre *N. nasua* y sobre *D. aurita* finalmente contuvieron tres variables explicatorias significativas: estación, sitio y peso (Tabla 8).

Tabla 8. Variables explicatorias asociadas a la abundancia de *Amblyomma coelebs* y a la presencia de *Amblyomma brasiliense*, *Amblyomma ovale* y *Haemaphysalis juxtakochi* sobre *Nasua nasua* y *Didelphis aurita*, resultado de la simplificación de modelos lineales generalizados.

Especie hospedadora	Especie de garrapata	Estadio	Variables explicatorias					Δ AICc*	Familia del modelo
			Estación	Sitio	Sexo	Edad	Peso		
<i>Nasua nasua</i>	<i>Amblyomma coelebs</i>	Larvas		x				37,337	Binomial
		Ninfas	x	x			X	2,409	Binomial negativo
	<i>Amblyomma brasiliense</i>	Ninfas	x			x		5,467	Binomial
	<i>Amblyomma ovale</i>	Larvas				x		2,55	Binomial
		Adultos				x		2,519	Binomial
	<i>Haemaphysalis juxtakochi</i>	Larvas	x					18,457	Binomial
<i>Didelphis aurita</i>	<i>Amblyomma coelebs</i>	Ninfas	x					6,364	Binomial
		Larvas			x			1,741	Binomial negativo
		Ninfas	x	x			x	1,8	Binomial negativo

* Δ AICc es el incremento del AICc del modelo cuando un solo término es eliminado.

La carga de ninfas sobre *N. nasua* fue significativamente menor durante la primavera que durante el otoño, verano e invierno ($p < 0,001$ en todos los casos), y fue significativamente mayor en especímenes capturados en Garganta que en Dos Hermanas ($p < 0,001$), y también más abundante en CIES que en Dos Hermanas ($p = 0,004$). Un mayor peso se asoció con mayores cargas de ninfas de *A. coelebs* ($p = 0,024$) sobre *N. nasua* (Figura 23).

En el caso de la infestación por *A. coelebs* en *D. aurita*, la carga de ninfas fue significativamente mayor en invierno que en otoño, primavera y verano ($p < 0,001$ en todos los casos), y fue significativamente mayor en los animales capturados en CIES que en Apepú ($p = 0,002$), y mayores cargas se asociaron con un mayor peso corporal de *D. aurita* ($p = 0,011$) (Figura 24).

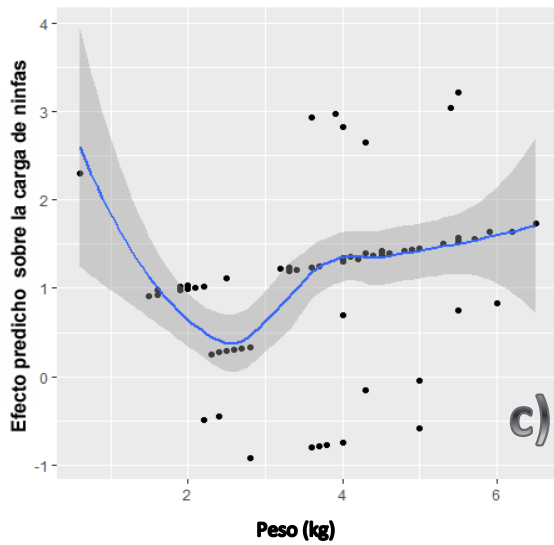
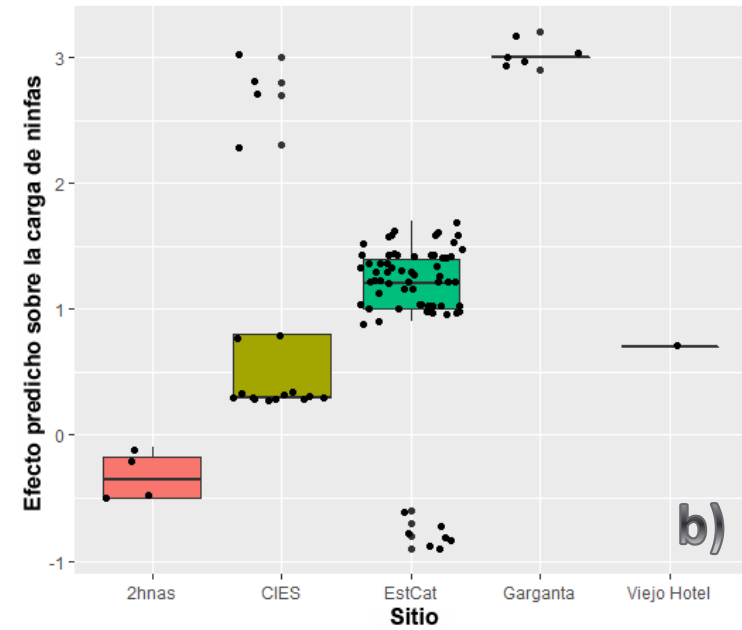
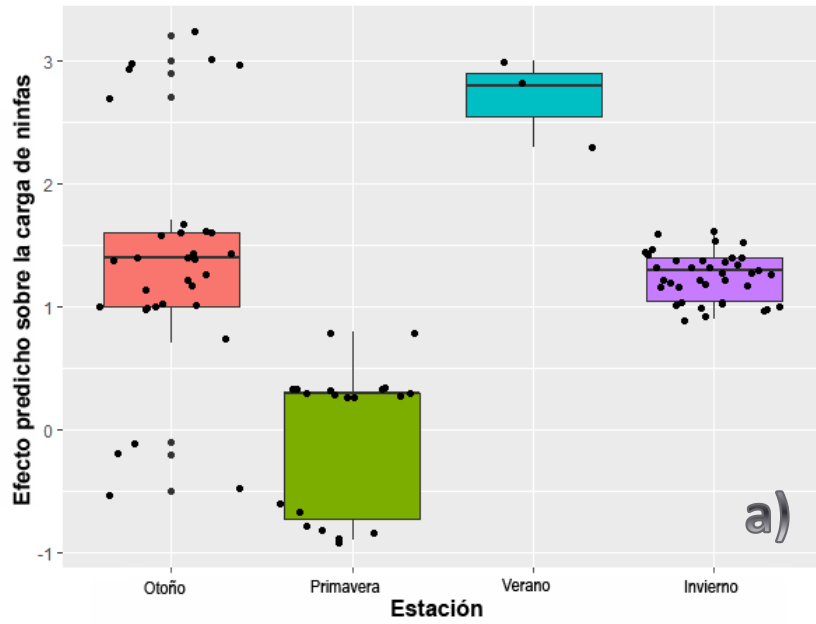


Figura 23. Efecto de (a) la estación, (b) el sitio y (c) el peso sobre la carga de ninfas de *Amblyomma coelebs* sobre *Nasua nasua*. 2hnas: Dos Hermanas; EstCat: Estación Cataratas.

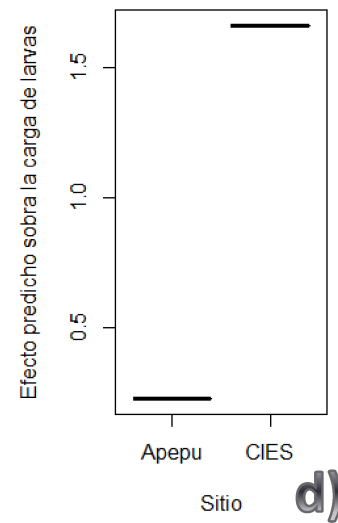
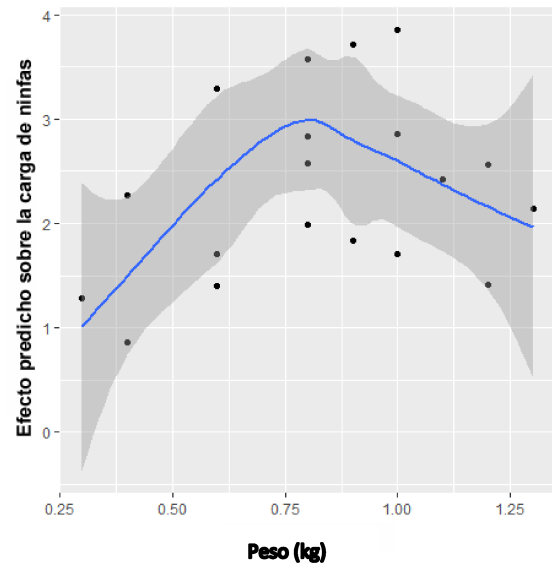
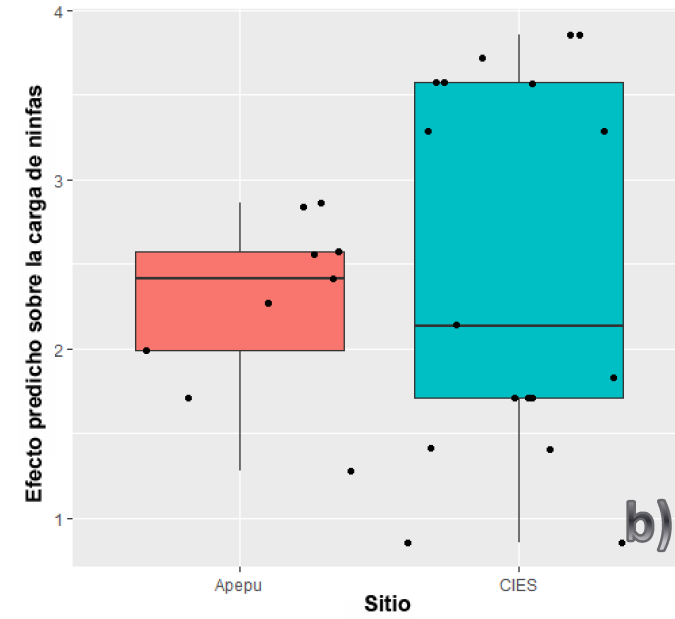
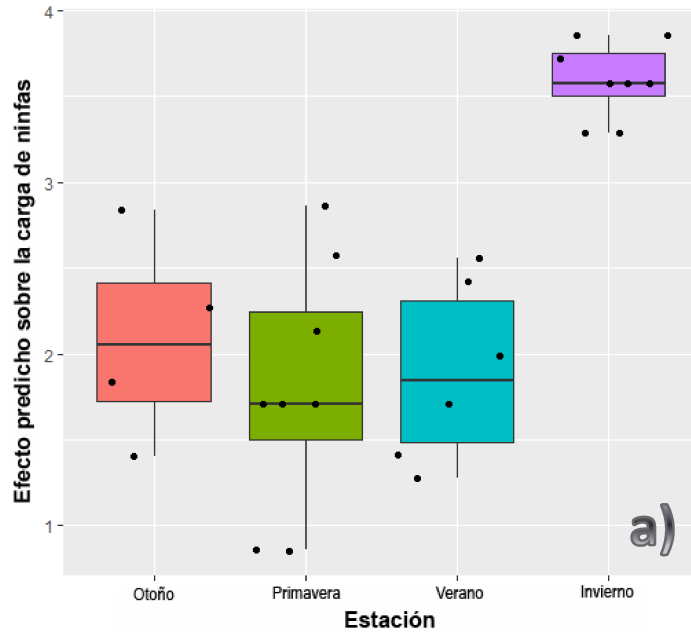


Figura 24. Efecto de (a) la estación, (b) el sitio y (c) el peso sobre la carga de ninfas de *Amblyomma coelebs* sobre *Didelphis aurita*. d) Promedio del efecto predicho del sitio sobre la carga de larvas de *A. coelebs* sobre *D. aurita*.

La presencia de larvas de *A. coelebs* sobre *N. nasua* se asoció con el sitio donde se capturaron los hospedadores. Se hallaron diferencias significativas en los sitios de mayor y menor impacto turístico: se encontró una prevalencia significativamente menor en los hospedadores capturados en Estación Cataratas (alto grado de disturbio antrópico) que en los hospedadores capturados en CIES ($p < 0,001$) y Garganta ($p = 0,0218$). Para analizar la carga de larvas *A. coelebs* sobre *D. aurita*, no se tuvo en cuenta el valor extremo de 115 larvas encontradas sobre un único individuo hospedador porque este valor no permitía correr el modelo global. Una vez eliminado este valor, la carga de larvas de *A. coelebs* sobre *D. aurita* se asoció al sitio, siendo significativamente más abundante sobre especímenes capturados en CIES que en Apepú ($p = 0,021$), al igual que las ninfas de *A. coelebs*.

La presencia de larvas y ninfas de *H. juxtakochi* sobre *N. nasua* se asoció con la estación, mostrando una menor prevalencia en otoño que en primavera ($p = 0,042$) y en verano ($p = 0,034$) en el caso de las larvas, y una prevalencia significativamente más alta en otoño en el caso de las ninfas ($p = 0,007$). La presencia de ninfas de *A. brasiliense* sobre *N. nasua* se asoció con la estación y la edad del hospedador. La prevalencia fue mayor durante el otoño ($p = 0,045$) y en hospedadores adultos ($p = 0,061$).

La presencia de larvas de *A. ovale* sobre *N. nasua* se asoció con la edad de los hospedadores, mostrando una mayor prevalencia en especímenes juveniles ($p = 0,059$), mientras que la presencia de garrapatas adultas se asoció con el sexo del hospedador, siendo su prevalencia significativamente mayor sobre los machos que sobre las hembras ($p = 0,035$).

El $\Delta AICc$ (diferencia entre el AICc de dos modelos comparados entre sí luego de la eliminación de un término) de los modelos finales con el AICc más bajo, resultante de la eliminación del último término, se muestran en la Tabla 8.

4.3. Detección de agentes Rickettsiales en garrapatas y tejidos de hospedadores

Se analizaron un total de 263 garrapatas colectadas sobre la vegetación de las especies *A. brasiliense* ($n = 101$), *A. coelebs* ($n = 100$), *A. incisum* ($n = 29$), *A. ovale* ($n = 32$) y

A. longirostre (n=1). A su vez, se analizaron 30 especímenes de *A. ovale*, 35 de *R. sanguineus* s.s. y uno de *A. aureolatum* colectados sobre 48 perros revisados en las zonas urbanas de Puerto Iguazú y zonas rurales de los departamentos General Belgrano y San Pedro, 92 especímenes de *A. ovale* colectados sobre 41 *N. nasua*, dos especímenes de *A. ovale* colectados sobre *Akodon* cf. *A. montensis*, nueve garrapatas *A. ovale* colectadas sobre dos *D. aurita*, dos garrapatas *A. ovale* colectadas sobre un *D. azarae*, 16 especímenes de *A. longirostre* colectados sobre 14 aves, nueve *A. ovale* colectadas sobre cuatro *C. thous*, 16 *A. ovale* colectadas sobre cinco *P. concolor*, 22 *A. ovale* colectadas sobre seis *P. onca* y un espécimen de *A. ovale* hallado sobre un *P. yagouaroundi*, totalizando 235 garrapatas colectadas sobre hospedadores y analizadas mediante PCR.

Por otro lado, se analizaron muestras de sangre de 54 *N. nasua*, 15 *D. aurita*, un *D. azarae*, diez *Akodon* cf. *A. montensis*, dos *N. squamipes*, tres *Oligoryzomys* cf. *O. nigripes* y un *S. angouya*, y muestras de tejidos (hígado y bazo) de 16 *Akodon* cf. *A. montensis*, dos *N. squamipes*, cinco *Oligoryzomys* cf. *O. nigripes*, un *S. angouya* y un *Oxymycterus* cf. *O. misionalis*.

4.3.1. Infección con Rickettsiales en garrapatas colectadas sobre la vegetación

Todas las muestras de ADN extraído de garrapatas fueron negativas a la amplificación de un fragmento del gen *dsb* de *Ehrlichia* y *msp5* de *Anaplasma* mediante técnicas de PCR.

Con respecto a las garrapatas colectadas sobre la vegetación en el ambiente de selva, tres muestras de ADN de la especie *A. ovale* [prevalencia mínima (número de pools positivos sobre el total de garrapatas analizadas): 9,4%] colectadas en el PP resultaron positivas a la detección de *R. bellii*, amplificando un fragmento del gen rickettsial *gltA* mediante PCR, pero no del gen *ompA* específico de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas.

Las muestras de ADN de las garrapatas *A. coelebs* y del espécimen *A. longirostre* colectados sobre la vegetación fueron negativas a la amplificación mediante PCR de todos los genes propuestos en este estudio.

4.3.2. Infección con Rickettsiales en garrapatas colectadas sobre hospedadores

Todas las muestras de ADN de las garrapatas colectadas sobre hospedadores fueron negativas a la amplificación de un fragmento del gen 16S de *Ehrlichia* y *Anaplasma* mediante PCR convencional.

Los resultados obtenidos para todas las muestras de garrapatas colectadas sobre hospedadores procesadas mediante PCR se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Resultados de PCR para amplificación de un fragmento del gen rickettsial gltA en garrapatas colectadas sobre hospedadores en el norte de Misiones. M, macho; H, hembra; N, ninfa; L, larva.

Sitio	Especie	n, Estadio	Hospedador	PCR gltA	Especie
General Belgrano	<i>A. ovale</i>	1M	Perro	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	2M	Perro	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	1H	Perro	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	2H	Perro	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	1H	Perro	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	1H-1M	Perro	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	1M	Perro	Positivo	<i>Rickettsia bellii</i>
	<i>A. ovale</i>	1M	Perro	Positivo	<i>Rickettsia bellii</i>
	<i>A. ovale</i>	1M	Perro	Positivo	<i>Rickettsia bellii</i>
	<i>A. ovale</i>	1H	Perro	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	1H-1M	Perro	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	1H	Perro	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	1H	Perro	Negativo	
Puerto Iguazú	<i>R. sanguineus</i>	1M	Perro	Negativo	
	<i>R. sanguineus</i>	1H	Perro	Negativo	
	<i>R. sanguineus</i>	1M	Perro	Negativo	
	<i>R. sanguineus</i>	1N	Perro	Negativo	
	<i>R. sanguineus</i>	1H	Perro	Negativo	
	<i>R. sanguineus</i>	1N	Perro	Negativo	
	<i>R. sanguineus</i>	1M	Perro	Negativo	
	<i>R. sanguineus</i>	1M	Perro	Negativo	
	<i>R. sanguineus</i>	1M	Perro	Negativo	
	<i>R. sanguineus</i>	1M	Perro	Negativo	
	<i>R. sanguineus</i>	1M	Perro	Negativo	
	<i>R. sanguineus</i>	1M	Perro	Negativo	
	<i>R. sanguineus</i>	1M	Perro	Negativo	
	<i>R. sanguineus</i>	1M	Perro	Negativo	
	<i>R. sanguineus</i>	1H	Perro	Negativo	
	<i>R. sanguineus</i>	1H	Perro	Negativo	
	<i>R. sanguineus</i>	2M	Perro	Negativo	
	<i>R. sanguineus</i>	1H	Perro	Negativo	
	<i>R. sanguineus</i>	2N	Perro	Negativo	
	<i>R. sanguineus</i>	1H-1M	Perro	Negativo	
	<i>R. sanguineus</i>	1H-1M	Perro	Negativo	
	<i>R. sanguineus</i>	1H-1M	Perro	Negativo	
	<i>R. sanguineus</i>	1H-1M	Perro	Negativo	
	<i>R. sanguineus</i>	1N-1M	Perro	Negativo	
	<i>R. sanguineus</i>	2H-2M	Perro	Negativo	
	<i>R. sanguineus</i>	1H	Perro	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	1H	Perro	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	3M	Perro	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	1M	Perro	Negativo	

Tabla 9. Continuación

Sitio	Especie	n, Estadío	Hospedador	PCR gltA	Especie
Puerto Iguazú	<i>A. ovale</i>	1M	Perro	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	1H	Perro	Positivo	<i>Rickettsia bellii</i>
	<i>A. ovale</i>	2H	Perro	Positivo	<i>Rickettsia bellii</i>
	<i>A. ovale</i>	1H	Perro	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	1M	Perro	Positivo	<i>Rickettsia bellii</i>
Parque Provincial Piñalito	<i>A. ovale</i>	1H-1M	Perro	Positivo	<i>Rickettsia amblyommatis</i>
Parque Nacional Iguazú	<i>A. ovale</i>	2M	<i>Nasua nasua</i>	Positivo	<i>Rickettsia bellii</i>
	<i>A. ovale</i>	1H-6M	<i>Nasua nasua</i>	Positivo	<i>Rickettsia bellii</i>
	<i>A. ovale</i>	1H-1M	<i>Nasua nasua</i>	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	2M	<i>Nasua nasua</i>	Positivo	<i>Rickettsia bellii</i>
	<i>A. ovale</i>	2M	<i>Nasua nasua</i>	Positivo	<i>Rickettsia bellii</i>
	<i>A. ovale</i>	1M	<i>Nasua nasua</i>	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	2M	<i>Nasua nasua</i>	Positivo	<i>Rickettsia bellii</i>
	<i>A. ovale</i>	1M	<i>Nasua nasua</i>	Positivo	<i>Rickettsia bellii</i>
	<i>A. ovale</i>	1H-4M	<i>Nasua nasua</i>	Positivo	<i>Rickettsia bellii</i>
	<i>A. ovale</i>	1H	<i>Nasua nasua</i>	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	2H-3M	<i>Nasua nasua</i>	Positivo	<i>Rickettsia bellii</i>
	<i>A. ovale</i>	3H-4M	<i>Nasua nasua</i>	Positivo	<i>Rickettsia bellii</i>
	<i>A. ovale</i>	1N	<i>Nasua nasua</i>	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	2L	<i>Nasua nasua</i>	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	1M	<i>Nasua nasua</i>	Positivo	<i>Rickettsia bellii</i>
	<i>A. ovale</i>	1H-1M	<i>Nasua nasua</i>	Positivo	<i>Rickettsia bellii</i>
	<i>A. ovale</i>	1L	<i>Nasua nasua</i>	Positivo	<i>Rickettsia bellii</i>
	<i>A. ovale</i>	2L	<i>Nasua nasua</i>	Positivo	<i>Rickettsia bellii</i>
	<i>A. ovale</i>	1H-1M	<i>Nasua nasua</i>	Positivo	<i>Rickettsia bellii</i>
	<i>A. ovale</i>	1H	<i>Nasua nasua</i>	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	1M	<i>Nasua nasua</i>	Positivo	<i>Rickettsia bellii</i>
	<i>A. ovale</i>	1H-1M	<i>Nasua nasua</i>	Positivo	<i>Rickettsia bellii</i>
	<i>A. ovale</i>	1L	<i>Nasua nasua</i>	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	1L	<i>Nasua nasua</i>	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	2H-3M	<i>Nasua nasua</i>	Positivo	<i>Rickettsia bellii</i>
	<i>A. ovale</i>	2M	<i>Nasua nasua</i>	Positivo	<i>Rickettsia bellii</i>
	<i>A. ovale</i>	1N	<i>Nasua nasua</i>	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	1M	<i>Nasua nasua</i>	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	2H-3M	<i>Nasua nasua</i>	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	1H-1M	<i>Nasua nasua</i>	Positivo	<i>Rickettsia parkeri</i> cepa Atlantic rainforest
	<i>A. ovale</i>	1H	<i>Nasua nasua</i>	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	1M	<i>Nasua nasua</i>	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	1H-1M	<i>Nasua nasua</i>	Negativo	
<i>A. ovale</i>	1M	<i>Nasua nasua</i>	Negativo		
<i>A. ovale</i>	1H-1M	<i>Nasua nasua</i>	Negativo		
<i>A. ovale</i>	1H	<i>Nasua nasua</i>	Negativo		
<i>A. ovale</i>	1H	<i>Nasua nasua</i>	Negativo		

Tabla 9. Continuación

Sitio	Especie	n, Estadio	Hospedador	PCR gItA	Especie
Parque Nacional Iguazú	<i>A. ovale</i>	1H	<i>Nasua nasua</i>	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	2M	<i>Nasua nasua</i>	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	2H-3M	<i>Nasua nasua</i>	Positivo	<i>Rickettsia bellii</i>
	<i>A. ovale</i>	5M	<i>Nasua nasua</i>	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	5L	<i>Didelphis aurita</i>	Positivo	<i>Rickettsia bellii</i>
	<i>A. ovale</i>	4L	<i>Didelphis aurita</i>	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	2L	<i>Dasyprocta azarae</i>	Positivo	<i>Rickettsia bellii</i>
	<i>A. longirostre</i>	2L	<i>Automolus leucophthalmus</i>	Negativo	
	<i>A. longirostre</i>	2L	<i>Pipra fasciicauda</i>	Negativo	
	<i>A. longirostre</i>	1L	<i>Dendrocincla fuliginosa</i>	Negativo	
	<i>A. longirostre</i>	2L	<i>Turdus albicollis</i>	Positivo	<i>Rickettsia bellii</i>
	<i>A. longirostre</i>	1L	<i>Turdus albicollis</i>	Negativo	
	<i>A. longirostre</i>	1L	<i>Cnemotriccus fuscatus</i>	Negativo	
	<i>A. longirostre</i>	1L	<i>Platyrinchus mystaceus</i>	Negativo	
	<i>A. longirostre</i>	1N	<i>Philydor atricapillus</i>	Negativo	
	<i>A. longirostre</i>	1N	<i>Chiroxiphia caudata</i>	Negativo	
	<i>A. longirostre</i>	1N	<i>Turdus leucomelas</i>	Negativo	
	<i>A. longirostre</i>	1N	<i>Trichothraupis melanops</i>	Negativo	
	<i>A. longirostre</i>	1L	<i>Leptopogon amaurocephalus</i>	Negativo	
	<i>A. longirostre</i>	1N	<i>Baryphthengus ruficapillus</i>	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	1L	<i>Tachyphonus coronatus</i>	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	3H	<i>Cerdocyon thous</i>	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	1H	<i>Cerdocyon thous</i>	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	1H-2M	<i>Cerdocyon thous</i>	Positivo	<i>Rickettsia bellii</i>
	<i>A. ovale</i>	2M	<i>Cerdocyon thous</i>	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	2H	<i>Panthera onca</i>	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	2H-3M	<i>Panthera onca</i>	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	2H-3M	<i>Panthera onca</i>	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	2H-3M	<i>Panthera onca</i>	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	2H	<i>Panthera onca</i>	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	1H-2M	<i>Panthera onca</i>	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	1H-1M	<i>Puma concolor</i>	Negativo	
	<i>A. ovale</i>	1H-2M	<i>Puma concolor</i>	Negativo	
<i>A. ovale</i>	2H-3M	<i>Puma concolor</i>	Negativo		
<i>A. ovale</i>	1M	<i>Puma concolor</i>	Negativo		
<i>A. ovale</i>	2H-3M	<i>Puma concolor</i>	Positivo	<i>Rickettsia bellii</i>	
<i>A. ovale</i>	1M	<i>Puma yagouaroundi</i>	Negativo		
Puerto Península	<i>A. ovale</i>	2N	<i>Akodon cf. A. montensis</i>	Positivo	<i>Rickettsia bellii</i>

Un total de 33 muestras de ADN extraídas de pools de garrapatas *A. ovale* fueron positivas a la amplificación del gen rickettsial gItA (prevalencia mínima: 18%, sobre 183 garrapatas *A. ovale* procesadas). Un pool de ADN de una hembra y un

macho *A. ovale* colectados sobre un perro en el Parque Provincial Piñalito fue positivo a la amplificación de un fragmento de los genes *gltA* y *ompA* (prevalencia mínima: 0,5%). La secuencia obtenida del gen *ompA* se alineó con más del 99% de similitud con secuencias de *R. amblyommatis* de Brasil (KP686067), Colombia (MF034496) y Argentina (DQ517292) (Figura 25).

Por su parte, un pool consistente en una hembra y un macho *A. ovale* colectados sobre un individuo hospedador *N. nasua* en el PNI fue positivo a *gltA* y *ompA* (prevalencia mínima: 0,5%), y la secuencia de este último producto de PCR (Número de acceso en GenBank: MH247927) se alineó en 100% con secuencias de *R. parkeri* cepa Atlantic rainforest depositadas en GenBank (Número de acceso: KX137902) (Figura 25), confirmado luego por la amplificación de un fragmento del gen *ompB* (Número de acceso en GenBank: MH247926), cuya secuencia también presentó un 100% de similitud con secuencias de esta cepa depositadas en GenBank (Número de acceso: KX034218).

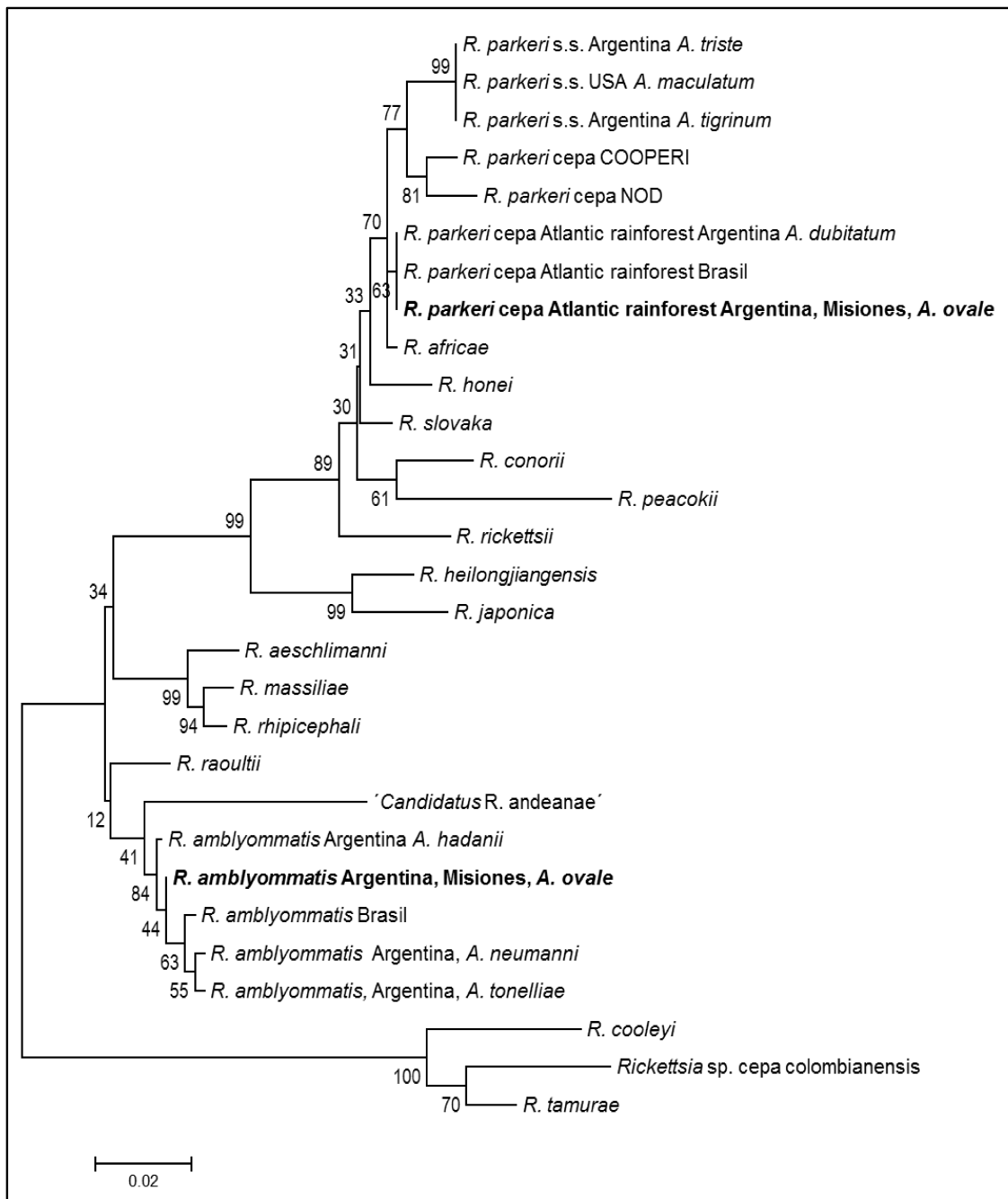


Figura 25. Árbol de máxima verosimilitud a partir de secuencias parciales del gen *ompA* de *Rickettsia*. En negrita, la secuencia obtenida de ADN extraído de garrapatas *Amblyomma ovale*. Los números representan el soporte de bootstrap de 1000 repeticiones. El modelo usado fue GTR+G (General Time Reversible con distribución Gamma).

Los restantes 31 pools positivos a la amplificación de un fragmento del gen rickettsial *gltA* resultaron negativos a la amplificación del gen *ompA*. Dos de estas muestras (ADN de seis garrapatas *A. ovale*) fueron purificadas y secuenciadas (Números de acceso en GenBank: MH282857 y MH282858), y las secuencias se alinearon con secuencias de *R. bellii* depositadas en GenBank (Números de acceso: AY375161 y AY362703), por lo que se infiere que las 29 muestras positivas que no fueron secuenciadas también corresponden a esta especie (prevalencia mínima en *A. ovale*: 15,3%; prevalencia mínima en *A. longirostre*: 6,3%) (Figura 26).

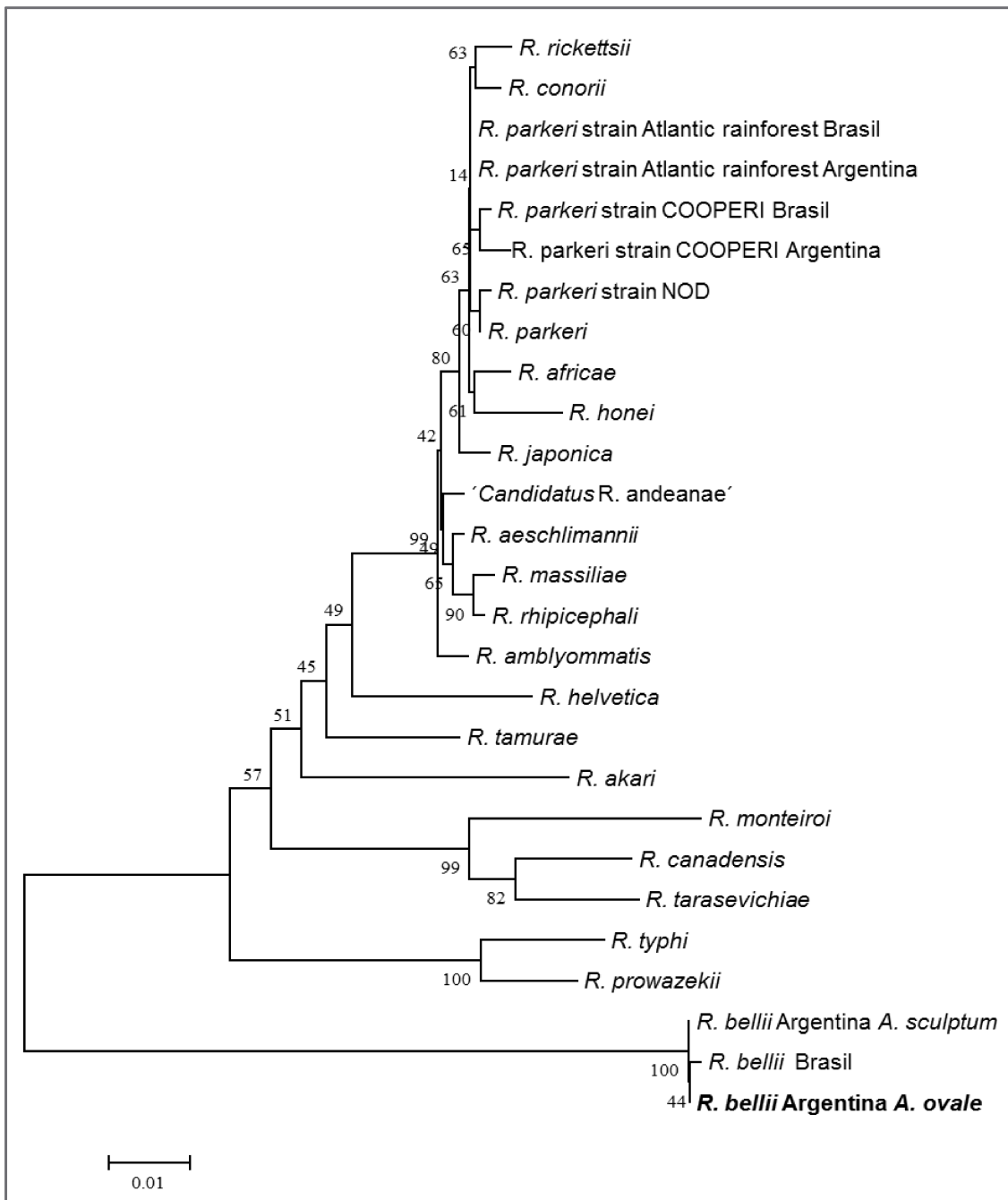


Figura 26. Árbol de máxima verosimilitud a partir de secuencias parciales del gen *gltA* de *Rickettsia*. En negrita, la secuencia obtenida de ADN extraído de garrapatas *Amblyomma ovale*. Los números representan el soporte de bootstrap de 1000 repeticiones. El modelo usado fue GTR+G (General Time Reversible con distribución Gamma).

4.3.3. Rickettsiales en tejidos

Las muestras de ADN extraídos de sangre y órganos de hospedadores resultaron negativas a la amplificación de los genes *gltA* y *dsb*.

Los resultados de PCR para amplificación de un fragmento de los genes 16S de *Ehrlichia* y *Anaplasma* y *msp1a* de *Anaplasma* en sangre y órganos de hospedadores capturados en el norte de Misiones se muestran en las Tablas 10 y 11.

Un total de dos muestras de sangre de *Oligoryzomys* cf. *O. nigripes* (66,7%), 45 de *N. nasua* (83,3%), una muestra de órganos de *Oxymycterus* cf. *O. misionalis* (100%) y dos de *N. squamipes* (100%) fueron positivas a la amplificación de un fragmento del gen 16S de *Ehrlichia* y *Anaplasma*. Todas las muestras positivas fueron sometidas a una PCR convencional para la amplificación del gen *msp1a* de *Anaplasma* y *dsb* de *Ehrlichia*: una muestra de sangre de *Oligoryzomys* cf. *O. nigripes* (50% de los positivos a 16S), 25 de *N. nasua* (55,6% de los positivos a 16S), y una muestra de órganos de *Oxymycterus* cf. *O. misionalis* (100%) resultaron positivas a *msp1a*. Todas las muestras resultaron negativas a la amplificación de un fragmento del gen *dsb*.

Tabla 10. Resultados de PCR para amplificación de un fragmento de los genes 16S de *Ehrlichia* y *Anaplasma* y msp1 de *Anaplasma* en sangre de hospedadores capturados en el norte de Misiones.

Sitio	Hospedador (n)	N° positivos PCR 16S <i>Ehrlichia/Anaplasma</i>	N° positivos PCR msp1 <i>Anaplasma</i>
Parque			
Provincial	<i>Oligoryzomys</i> cf. <i>O. nigripes</i> (3)	2	1
Puerto	<i>Akodon</i> cf. <i>A. montensis</i> (11)	0	-
Península	<i>Sooretamys angouya</i> (1)	0	-
Parque	<i>Nectomys squamipes</i> (2)	0	-
Nacional	<i>Didelphis aurita</i> (15)	0	-
Iguazú	<i>Dasyprocta azarae</i> (1)	0	-
	<i>Nasua nasua</i> (54)	45	25

Tabla 11. Resultados de PCR para amplificación de un fragmento de los genes 16S de *Ehrlichia* y *Anaplasma* y msp1 de *Anaplasma* en órganos (hígado y bazo) de roedores capturados en el norte de Misiones.

Sitio	Hospedador (n)	N° positivos PCR 16S <i>Ehrlichia/Anaplasma</i>	N° positivos PCR msp1 <i>Anaplasma</i>
Parque			
Nacional	<i>Oxymycterus</i> cf. <i>O. misionalis</i> (1)	1	1
Iguazú	<i>Nectomys squamipes</i> (2)	2	0
Parque			
Provincial	<i>Akodon</i> cf. <i>A. montensis</i> (16)	0	-
Puerto	<i>Oligoryzomys</i> cf. <i>O. nigripes</i> (5)	0	-
Península	<i>Sooretamys angouya</i> (1)	0	-

5. DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

5.1. Garrapatas del norte de Misiones

La presencia de muchas de las especies de garrapatas encontradas había sido reportada con anterioridad para la zona (Boero y Delpietro, 1971; Ivancovich y Luciani, 1992; Nava y col., 2012; Lamattina y col., 2014).

En este estudio se registraron por primera vez infestando humanos en la provincia de Misiones las especies *A. dubitatum*, *A. incisum*, *A. ovale*, *A. brasiliense*, *A. coelebs*, *H. juxtakochi*, *R. microplus* y *R. sanguineus*, y se amplió el registro de hospedadores de *A. brasiliense*, *A. coelebs*, *A. ovale* y *H. juxtakochi*.

Se hallaron tres especies de garrapatas infestando perros (Tabla 2). En las zonas de agroecosistema, la especie dominante fue *A. ovale*, mientras que en el ambiente urbano solo se hallaron especímenes *R. sanguineus* s.s.

Sobre bovinos solo se colectaron especímenes de *R. microplus*, lo cual contrasta con los hallazgos en el Noroeste Argentino y en el delta del Paraná, donde las vacas son hospedadores comunes de *A. tonelliae*, *A. sculptum* y *Amblyomma neumanii* en las provincias biogeográficas de Chaco y Yungas, de *A. parvum* en la provincia biogeográfica del Chaco, y de *A. triste* en las provincias biogeográficas de Chaco y Pampa (Nava y col., 2017). La ausencia de especies del género *Amblyomma* colectadas sobre bovinos en este estudio sugiere que estos hospedadores no representan un recurso de relevancia para el desarrollo de estas garrapatas en el norte de la provincia de Misiones.

5.2. Caracterización espacial

Se colectaron sobre la vegetación y sobre hospedadores un total de 16.044 garrapatas pertenecientes a 12 especies en tres ambientes distintos del norte de la provincia de Misiones, Argentina, durante los dos años de toma de muestras activa.

Los estadios inmaduros de la mayor parte de las especies halladas presentaron menor especificidad de hospedador que los adultos, en concordancia con Nava y

Guglielmone (2013) y Esser y col. (2016). Por ejemplo, los adultos de *A. ovale* se encontraron casi exclusivamente sobre carnívoros, mientras que las formas inmaduras se colectaron sobre marsupiales didélfidos, roedores, carnívoros y aves paseriformes, es decir, los inmaduros se asociaron a especies hospedadoras sin relación evolutiva cercana. De la misma forma, los adultos de *A. coelebs* y *A. brasiliense* se colectaron casi exclusivamente sobre *Tapirus terrestris*, mientras que los estadios inmaduros fueron más generalistas en cuanto a sus especies hospedadoras. El humano actuaría como un hospedador ocasional de diferentes especies de ixódidos, en concordancia con Guglielmone y col. (2006).

En cuanto a las aves capturadas, la mayor proporción correspondió a aves paseriformes (81,4%), y entre estas, el género *Turdus* presentó la mayor prevalencia de infestación con garrapatas (21,7%).

Los estimadores de cobertura de las muestras de cada ambiente demostraron que cerca del 100% de los individuos de las poblaciones de cada ensamble estarían representados por las especies halladas en este estudio. El estimador de riqueza específica de Chao1 correspondiente al ambiente de selva fue el único que mostró una pequeña diferencia con la riqueza de especies hallada en dicho ambiente, debido al gran número de singletons y doubletons. Los estimadores del agroecosistema y el ambiente urbano fueron equivalentes a la cantidad de especies halladas en este estudio. Las diferencias entre la riqueza específica de los ambientes de selva, agroecosistema y urbano podrían explicarse teniendo en cuenta la riqueza de especies y la abundancia relativa de cada especie. Los valores obtenidos mostraron una considerable diversidad de especies en el ambiente de selva acompañado por una baja equitabilidad, ya que se encontró una alta proporción de especies raras, es decir representadas por un bajo número de individuos.

El índice de similitud de biodiversidad de Horn entre los tres ensambles de garrapatas de vida libre y entre los dos ensambles de garrapatas en su fase de vida parasítica fue bajo. Los ambientes de selva y agroecosistema por un lado, y el agroecosistema y urbano por el otro, además de ser ambientes contiguos (inclusive contienen parches de vegetación con estructuras similares), comparten algunos de los

hospedadores de ixódidos reportados en este estudio, como *D. aurita* y *N. nasua* en el primer caso y perros en el segundo. Por lo tanto, es de esperar que sus índices de similitud sean más altos que el resultante de comparar la biodiversidad del ambiente de selva y el urbano. Sin embargo, las amplias diferencias observadas entre los distintos ambientes indica que el establecimiento de algunas especies de garrapatas en un ambiente dado no dependería únicamente de la presencia de hospedadores adecuados, sino que la permisividad de estos ambientes respondería a factores relacionados con otras características ambientales como las condiciones de microclima y la composición de la vegetación. En cualquier caso, los resultados obtenidos en este estudio indican que el ambiente de selva es un hábitat más propicio que el agroecosistema y el urbano para muchas especies de garrapatas nativas, pero también es más desfavorable para *R. sanguineus* s.s. y *R. microplus*, las cuales son especies exóticas establecidas exitosamente en ambientes modificados por actividades humanas, donde sus principales hospedadores, caninos y bovinos respectivamente, prevalecen.

La urbanización y fragmentación del hábitat han sido analizadas como barrera para la expansión de la distribución geográfica de diversas especies de garrapatas (Estrada-Peña y col., 2008). Estos factores tienen una influencia dominante en la abundancia de hospedadores y por ende, en la abundancia de garrapatas de vida libre. A su vez, la conectividad entre paisajes de condiciones ambientales y climáticas similares es central en el mantenimiento de poblaciones de garrapatas, ya que condiciona la habilidad de las mismas para acceder a dichos hábitats, afectando la capacidad de colonizar y persistir en ellos. El movimiento de poblaciones de hospedadores entre distintos ambientes es también clave para entender las diferencias en la composición y abundancia de las distintas especies de garrapatas. Estudios a campo han demostrado que entre parches ambientales de condiciones similares, aquellos con mayor presencia de hospedadores adecuados estuvieron correlacionados con altas densidades de garrapatas *I. ricinus*. Sin embargo, parches de hábitat situados a mayores distancias de estos parches de alta abundancia y movimiento de hospedadores, tendieron a presentar poblaciones de garrapatas reducidas o ausentes, aún con condiciones climáticas y ambientales similares (Estrada-

Peña y col., 2008). Como se mencionó anteriormente, en este estudio las zonas de agroecosistema y de ambiente urbano contienen o se encuentran adyacentes a parches de selva remanente, presentando condiciones climáticas similares y especies de hospedadores y de vegetación compartidas. Sin embargo, la diversidad de especies de garrapatas en estos ambientes fue marcadamente menor a la del ambiente de selva natural, lo cual puede estar asociado, entre otros factores ya señalados, al bajo nivel de conectividad entre los sitios de diferentes ambientes.

5.3. Variación temporal

Con respecto a la distribución temporal del número de garrapatas, no se encontraron diferencias significativas entre el primer y el segundo año de muestreo. La ausencia de diferencias entre los dos años de muestreo puede considerarse un indicador de la ausencia de efecto de la metodología utilizada para la colecta sobre la abundancia de las distintas especies de garrapatas colectadas.

Los hallazgos sugieren que, en algunas especies como *A. coelebs*, *A. brasiliense* y *A. ovale*, podría haber un ciclo de una generación por año, pero más de una cohorte podría coexistir dentro de las poblaciones, ya que especímenes de diferentes estadios se encontraron durante todo el año tanto sobre la vegetación como sobre los hospedadores. Estos resultados concuerdan con los hallazgos realizados en otras especies como *I. ricinus* en el sudoeste de Escocia (Walker, 2001), *A. neumanni* en el noroeste de la provincia de Córdoba, Argentina (Nava y col., 2009b) y *A. dubitatum* en la provincia de Corrientes, Argentina (Debarbora y col., 2014). Otras especies, como *H. juxtakochi*, presentarían ciclos de una sola generación por año.

Las garrapatas en estadio de vida libre halladas en ambientes sin modificación antrópica presentaron patrones bien marcados de distribución estacional, con diferencias significativas entre las estaciones en la abundancia de todas las especies encontradas. *Amblyomma brasiliense* presentó un patrón característico en todos sus estadios, con diferencias significativas entre el verano y el invierno, una diferencia que también se observó para las ninfas de *A. coelebs* y las ninfas y adultos de *H. juxtakochi*. En el caso de las larvas de *A. incisum* y adultos *A. ovale*, se observó una diferencia

significativa principalmente entre el otoño y la primavera, mientras que las larvas de *H. juxtakochi* presentaron diferencias significativas solo entre el verano y la primavera.

En un estudio realizado en São Paulo, Brasil (Szabó y col. 2009), las ninfas de *A. incisum* presentaron un pico de abundancia en primavera, los adultos en invierno y verano, y las larvas estuvieron presentes solo en otoño e invierno. Las larvas de *A. brasiliense* fueron más abundantes durante el otoño, las ninfas y los adultos fueron menos abundantes en otoño y en verano, respectivamente. Los adultos de *A. ovale* fueron más abundantes en primavera y verano (Szabó y col., 2009). En el presente estudio, las ninfas de *A. incisum* fueron más abundantes durante el invierno y los adultos estuvieron presentes durante todo el año sin mostrar diferencias significativas entre las estaciones. Todos los estadios de *A. brasiliense* se comportaron de manera similar a lo descrito por Szabó y col. (2009), así como los adultos de *A. ovale*. Esto sugiere que, en entornos similares a este (dos estudios de la Selva Atlántica), también se espera que la dinámica temporal y espacial de las diferentes especies de garrapatas sea similar, aunque con divergencias debido a la asociación con factores externos, como informaron otros autores, por ejemplo, para *Amblyomma maculatum* (Barker y col., 2004) e *Ixodes scapularis* (Ogden y col., 2005) en Estados Unidos.

Con respecto a la distribución temporal de las garrapatas *A. coelebs*, los estadios inmaduros fueron colectados durante todo el año, mientras que la colecta de adultos estuvo representada por pocos individuos durante los meses de primavera. Si bien existen reportes sobre hallazgos de especímenes *A. coelebs* durante todas las estaciones del año en distintos países de América Central y del Sur, no existe información sobre aspectos ecológicos de esta especie, por lo que este es el primer estudio que contempla sus variaciones temporales (Fairchild y col., 1966; Jones y col., 1972; Guglielmone y col., 2006; Martins y col., 2013; Garcia y col., 2015). Por su parte, no se cuenta con información sobre la dinámica temporal de los estadios inmaduros de *A. ovale*, mientras que en este estudio se reporta la colecta de larvas *A. ovale* sobre la vegetación en verano y otoño, y de ninfas en otoño e invierno.

La ausencia de diferencias significativas en la distribución temporal de las garrapatas en su fase de vida parasítica puede deberse a la heterogeneidad de los

hospedadores silvestres examinados, ya que los registros provienen de animales capturados y atropellados, sobre los cuales la carga parasitaria puede subestimarse (Piesman, 1991; Sobrino y col., 2012). Por el contrario, la distribución estacional de *R. sanguineus* s.s. fue significativamente diferente entre las estaciones, con un aumento de su abundancia en verano para ninfas y en primavera y verano para adultos. Esto se encuentra en concordancia con una gran cantidad de trabajos que comprobaron que la oviposición exitosa, la eclosión de huevos y la muda larval y ninfal son poco probables en esta especie a bajas temperaturas (Dantas-Torres, 2010).

En los gráficos de las Figuras 17 a 21, que muestran la comparación entre las distribuciones temporales de las garrapatas encontradas sobre la vegetación y sobre sus hospedadores, pueden observarse picos aparentes de mayor abundancia que se corresponden entre la vegetación y los hospedadores principales. Las ninfas de *A. brasiliense* mostraron un mayor número sobre la vegetación y una mayor abundancia media sobre *N. nasua* en verano, al igual que las larvas de *A. coelebs*, cuya abundancia media sobre *D. aurita* también fue mayor en verano. Por el contrario, las ninfas *A. coelebs* tuvieron un mayor número sobre la vegetación y una mayor abundancia media sobre *D. aurita* durante el invierno. Los adultos de *A. ovale*, por otro lado, presentaron picos de abundancia absoluta sobre la vegetación y de abundancia media sobre *N. nasua* en primavera. Los picos de mayor número de larvas de *H. juxtakochi* sobre la vegetación y sobre *N. nasua* ocurrieron durante el verano, mientras que los de las ninfas ocurrieron en invierno. La abundancia de garrapatas colectadas sobre hospedadores frecuentemente muestra fluctuaciones estacionales (Brunner y Ostfeld, 2008; Oorebeek y Kleindorfer, 2008; Nava y col., 2009c). Si bien las diferencias entre estaciones para las abundancias de garrapatas colectadas sobre hospedadores no fueron significativas en este estudio, es posible que las variables ambientales que fluctúan entre estaciones (como la humedad relativa y la temperatura) también afecten las cargas parasitarias sobre dichos hospedadores en el norte de Misiones.

Se detectaron tanto adultos como garrapatas de estadios inmaduros de *R. microplus* sobre los hospedadores, pero solo se consideraron los adultos para el análisis de la abundancia media mensual. Los adultos de *R. microplus* estuvieron presentes todo el año sobre bovinos sin fluctuar demasiado entre temporadas. El

patrón de estacionalidad observado para *R. microplus* (ver Figura 21) sugiere que esta especie tiene al menos cuatro generaciones por año en el área de estudio.

5.4. Modelos de parasitismo en hospedadores

El análisis de las garrapatas colectadas sobre hospedadores permitió evaluar la influencia de variables relacionadas con el hospedador y el ambiente para explicar la presencia y carga parasitaria de diferentes especies de garrapatas sobre dos especies de mamíferos ubicuos de tamaño medio en la región del Bosque Atlántico de Argentina, a saber, *D. aurita* y *N. nasua*. Los modelos demostraron que la magnitud de la influencia de ambos tipos de variables difiere entre las distintas especies y estadios de garrapatas en su fase de vida parasítica.

Con respecto al sitio de captura del hospedador, se asoció una mayor carga parasitaria de *A. coelebs* con los hospedadores que circulan en el área del CIES y Garganta, en contraste con los hospedadores que circulan en Estación Cataratas y Dos Hermanas. Los primeros dos sitios son los más alejados del área de mayor presencia turística del PNI, mientras que los dos últimos se encuentran en el epicentro de esta zona, donde circulan diariamente personas y vehículos, y donde se ubican los restaurantes para turistas. *Nasua nasua* y *D. aurita* tienen una dieta omnívora y generalmente se alimentan de residuos de origen antrópico, como ocurre en el área turística del PNI (Cáceres y Monteiro-Filho, 2001; Alves-Costa y col., 2004). De acuerdo con Costa y col. (2009), cuando no hay escasez de alimentos, los grupos de *N. nasua* no viajan largas distancias, y según Cáceres y Monteiro-Filho (2001), *D. aurita* tiene un rango de hábitat muy pequeño de hasta 3 hectáreas. Esto implicaría que los animales que circulan en el epicentro turístico del PNI, donde hay abundante suministro de alimentos a partir de desechos humanos y de árboles frutales, no se trasladarían largas distancias hacia otras áreas. Un rango de hábitat más reducido podría implicar una menor tasa de encuentros entre parásitos y hospedadores y conducir a una menor carga de garrapatas en estos hospedadores (Calabrese y col., 2011). Además, la presencia de grandes mamíferos como *P. onca*, *P. concolor*, *T. terrestris* y *Mazama americana*, hospedadores principales de los estadios adultos de las especies de garrapatas halladas en este trabajo (Nava y col., 2017), es menos frecuente en estas

áreas con mayor grado de disturbio antrópico, lo que podría ocasionar una menor abundancia de garrapatas en el ambiente. Es posible inferir, entonces, que ambos factores podrían afectar las cargas parasitarias de especies como *A. coelebs*, las cuales serían menores en animales que circulan en áreas donde el movimiento turístico es intenso. Se puede señalar que, en áreas de alto impacto turístico, los ejemplares de *N. nasua* y *D. aurita* tendrían todo a favor: menos presión de grandes depredadores, fácil acceso a alimentos de origen humano y menores cargas parasitarias.

La variable estación fue importante para explicar la carga de ninfas de *A. coelebs* y la presencia de larvas y ninfas de *H. juxtakochi* sobre *N. nasua*. Existen estudios previos en los cuales la estación fue la variable con la mayor capacidad para predecir las cargas de garrapatas (Goodwin y col., 2001; Brunner y Ostfeld, 2008). En este sentido, la fluctuación estacional del número de garrapatas de los diferentes estadios parasíticos de las especies consideradas en este trabajo es usual en áreas pertenecientes a la selva atlántica (Szabó y col., 2009). En este estudio, las ninfas de *A. coelebs* y *H. juxtakochi* presentaron picos de abundancia en invierno, mientras que las larvas de *H. juxtakochi* fueron más abundantes en verano. Estos resultados están en línea con los obtenidos mediante los modelos matemáticos de parasitismo.

Además de los hospedadores, la abundancia y presencia de los diferentes estadios de garrapatas dependen de factores ambientales como la humedad relativa, la temperatura y el déficit de saturación (Estrada-Peña, 2008), los cuales fluctúan estacionalmente. Por lo tanto, es esperable descubrir patrones estacionales en garrapatas colectadas sobre sus hospedadores en el norte de Misiones, donde se presentan diferencias en las precipitaciones, temperatura y humedad del ambiente en las distintas estaciones (<https://www.smn.gob.ar/estadisticas>).

Un mayor peso corporal estuvo asociado a mayores cargas de ninfas de *A. coelebs* tanto sobre *N. nasua* como sobre *D. aurita*. Se estima que el peso de los hospedadores puede afectar las cargas parasitarias por influencia de la cantidad de recurso disponible para los parásitos (Patterson y col., 2008). Los resultados obtenidos para las ninfas de *A. coelebs* van en esta dirección, y son consistentes con un estudio elaborado por Harrison y col. (2010), quienes descubrieron un efecto positivo de la

masa corporal sobre la carga de larvas de *I. ricinus* sobre los roedores *Apodemus sylvaticus* en el norte de Irlanda.

Nasua nasua es un hospedador habitual de adultos de *A. ovale* (Magalhaes-Matos y col., 2017). La prevalencia de adultos de *A. ovale* fue mayor sobre *N. nasua* machos que sobre hembras. Esto podría explicarse por el hecho de que los coatíes forman grupos estructurados por hembras adultas, juveniles y/o cachorros y eventualmente algunos machos adultos, mientras que los machos adultos usualmente son solitarios (Beisiegel, 2001). Los individuos de *N. nasua* que viven en grupos típicamente muestran comportamiento de acicalamiento entre individuos, durante el cual se remueven ectoparásitos. Esta situación no ocurre en los machos solitarios. Además, la remoción de ectoparásitos podría ser dependiente del tamaño de las garrapatas, ya que solamente los adultos *A. ovale* presentaron diferencias en sus abundancias entre sexos. Esta hipótesis es consistente con un estudio desarrollado por Gompper (2004) sobre garrapatas infestando *Nasua narica* en Panamá. A su vez, la mortalidad de las garrapatas debida al acicalamiento o a la resistencia adquirida por los hospedadores podría ser dependiente de la densidad de las mismas, la última debida a la activación de mecanismos de inmunidad adquirida mediados por células, los cuales muchas veces dependen de la densidad de parásitos (Ogden y col., 2002). En este caso, las poblaciones de *A. ovale* podrían verse también auto-reguladas por mecanismos activados frente a altas cargas parasitarias. En definitiva, diferentes especies hospedadoras también pueden tener hábitos de acicalamiento más o menos frecuentes, y distinta capacidad para expresar resistencia innata o adquirida hacia las garrapatas, lo cual condicionaría la proporción de garrapatas que sobreviven a su etapa de vida parasítica.

Con respecto a las diferencias en los valores de AIC arrojados, en algunos casos el $\Delta AICc$ de los modelos simplificados fue menor a dos unidades. Por ejemplo, en el caso de las cargas de ninfas de *A. coelebs* sobre *D. aurita*, mantener la variable peso en el modelo dio como resultado un $\Delta AICc$ de 1,8, mientras que sacar esta variable provocó que el $\Delta AICc$ aumentara a 2,671. La diferencia es muy pequeña y se debería evaluar si es correcto eliminar la variable peso del modelo cuando tiene un efecto significativo ($p=0,011$). Posiblemente, el consenso de dos unidades de $\Delta AICc$ para

mantener o eliminar variables debería ser más flexible en casos como este, donde la variable en cuestión también influye significativamente en la carga de ninfas *A. coelebs* en otro modelo de hospedador (*N. nasua*). Algo similar sucedió con las larvas de *A. coelebs*. El $\Delta AICc$ para el sitio fue de 1,741 en el modelo de *D. aurita*, pero esta variable demostró ser importante para explicar la presencia de larvas sobre *N. nasua*, por lo que se consideró su conservación en el modelo.

Algunas variables que disminuyeron en más de dos unidades el AICc del modelo, como la edad para la presencia de ninfas *A. brasiliense* y larvas de *A. ovale*, tenían un valor de p superior a 0,05. Sin embargo, estas variables fueron importantes en los modelos para mantener su AICc bajo, por lo que se debería considerar la aceptación de un nivel de significancia de 0,09 para estudios como este, en los que se encuentran variables significativas para explicar la presencia de especies de ectoparásitos con niveles muy agregados e incluso a veces distribuciones infladas en ceros.

5.5. Detección de agentes Rickettsiales

En este estudio no se hallaron muestras positivas a bacterias del género *Ehrlichia* en ninguna de las muestras analizadas. Como se mencionó anteriormente, los hallazgos de ehrlichias en garrapatas en Argentina corresponden a *E. canis* en la provincia de Formosa, reportes de *E. chaffeensis* en Santiago del Estero y Corrientes, *Ehrlichia* sp. cepa San Luis y *Ehrlichia* sp. cepa Córdoba en las provincias homónimas, y *Ehrlichia* sp. cepa San Luis en Santiago del Estero (Tomassone y col., 2008; Cicuttin y col., 2015; Cicuttin y col., 2017; Monje y col., 2018; Guillemi y col., 2019). Trabajos recientes demostraron que existen diferencias en la competencia vectorial entre los linajes “tropical” y “templado” de las garrapatas del grupo *R. sanguineus* para transmitir *E. canis* en Sudamérica. Mientras que las del linaje “tropical” constituyen vectores altamente competentes, las del linaje “templado” no lo son (Moraes-Filho y col., 2013; 2015; Cicuttin y col., 2015). En este trabajo, todos los especímenes del grupo *R. sanguineus* analizados pertenecieron al linaje “templado”, determinado como *R. sanguineus* s.s. por Nava y col. (2018), por lo que la ausencia de infección con *E. canis* en estos especímenes está en concordancia con lo reportado por otros autores.

Un porcentaje alto de las muestras de tejidos de hospedadores analizadas fueron positivas a la amplificación de un fragmento del gen 16S de *Ehrlichia* y *Anaplasma* y de un fragmento del gen msp1a de *Anaplasma*. Estos resultados sugieren la presencia de bacterias de este género en tejidos de *Oligoryzomys* cf. *O. nigripes*, *N. nasua* y *Oxymycterus* cf. *O. misionalis*, siendo necesaria la continuidad de este estudio para alcanzar una determinación a nivel específico más precisa y estimar su real importancia veterinaria y para la salud pública.

En la actualidad, una gran variedad de genes rickettsiales han sido propuestos para definir el género y especie, entre ellos: 16S rRNA, *gltA*, *ompA*, *ompB* y *sca4*. En particular, el uso de los genes *gltA* y *ompB* permiten una discriminación confiable de las especies de *Rickettsia* de los grupos tifus y fiebres manchadas, mientras que *ompA* permite una mejor caracterización entre las rickettsias del grupo de las fiebres manchadas (Roux y col., 1996; 1997). Estos tres genes se utilizaron en este estudio para la caracterización de las especies del género *Rickettsia*.

La amplificación de un fragmento del gen *gltA* sumado a la falta de amplificación de los genes *ompA* y *ompB* a partir del ADN extraído de garrapatas sugirió la presencia de rickettsias que no pertenecen al grupo de las fiebres manchadas, lo cual fue confirmado mediante el análisis de las secuencias y la identificación de las bacterias como *R. bellii*. Estas bacterias han sido halladas infectando una gran variedad de especies de garrapatas distribuidas por todo el Nuevo Mundo (Pinter y Labruna, 2006; Labruna y col., 2007a; McIntosh y col., 2015; Erster y col., 2015), y este estudio demuestra que esta especie también se distribuye ampliamente entre especies de garrapatas y animales silvestres y domésticos en Argentina.

Este trabajo proporciona evidencia sobre la infección de *A. ovale* con *R. parkeri* cepa Atlantic rainforest en Argentina. El nexo epidemiológico entre *A. ovale*, la cepa *R. parkeri* de la selva atlántica y los casos humanos de rickettsiosis ha sido establecido en Brasil en áreas donde los perros domésticos usualmente se infestan con *A. ovale* cuando acceden a zonas con parches remanentes de selva atlántica (Barbieri y col., 2014). Estas zonas comparten características ambientales con la provincia de Misiones,

donde existen viviendas en áreas rurales en contacto cercano con áreas forestales remanentes, y los perros tienen acceso permanente al bosque donde se infestan con garrapatas *A. ovale*, que son luego transportadas a los hogares. Por lo tanto, el ciclo de transmisión de *R. parkeri* cepa Atlantic rainforest observada en Brasil podría extrapolarse a Argentina. El escenario eco-epidemiológico de las garrapatas en la provincia de Misiones se parece incluso más al de Brasil considerando que, en ambas locaciones, las poblaciones de *A. ovale* también suelen encontrarse infectadas con *R. bellii* (Labruna y col., 2004a; Szabó y col., 2013).

Debido a que los especímenes infectados con *R. parkeri* cepa Atlantic rainforest en este estudio fueron colectados alimentándose sobre un hospedador, no es posible establecer la transmisión transtadial del patógeno, ni la capacidad vectorial de las garrapatas. Como señalan Kahl y col. (2002), las garrapatas colectadas sobre hospedadores que contienen patógenos pueden ser vectores o no, porque casi todos los artrópodos hematófagos que se alimentan de hospedadores reservorios pueden ingerir algunos microorganismos con la sangre. Por esta razón, los reportes de asociaciones crudas entre patógenos y garrapatas ingurgitadas o extraídas alimentándose de hospedadores solo han favorecido la confusión sobre las relaciones entre las garrapatas, sus hospedadores y los patógenos transmitidos por garrapatas (Estrada-Peña y col., 2013). Sin embargo, en el caso de *R. parkeri* cepa Atlantic rainforest, estos factores han sido estudiados experimentalmente y comprobados por investigadores en Brasil, demostrando que *A. ovale* puede mantener y transmitir esta rickettsia por vía transtadial y transovárica por al menos dos generaciones, y que larvas, ninfas y adultos de esta especie son vectores competentes (Krawczak y col., 2016b). Por lo tanto, la información clínica y epidemiológica disponible hasta el momento implican a las garrapatas *A. ovale* como vectores y reservorios de *R. parkeri* cepa Atlantic rainforest en Brasil, despertando la alerta al hallar este patógeno circulando en garrapatas *A. ovale* o sus hospedadores en una zona de características ambientales y climáticas similares en Misiones, donde no existen datos oficiales sobre casos humanos de rickettsiosis asociadas a escara (la presencia de todas las especies de *Rickettsia* halladas en este trabajo representa su primer registro en la provincia de Misiones).

Debido a que *A. ovale* es hallada frecuentemente sobre humanos en Sudamérica (Guglielmo y col., 2006), es posible que esté actuando como el vector principal de *R. parkeri* cepa Atlantic rainforest en la región. Un total de ocho garrapatas de la especie *A. ovale* fueron halladas parasitando humanos durante este estudio y otros proyectos de investigación, luego de recorridas de senderos en ambientes de selva. Teniendo en cuenta que solamente 32 garrapatas *A. ovale* en estadio de vida libre fueron colectadas sobre la vegetación mediante arrastre de paño de tela, junto a los ocho especímenes colectados sobre humanos en el mismo ambiente (40 en total), la proporción de garrapatas de esta especie que logró eficazmente adherirse a humanos es muy alta (20,0%). Cabe destacar que los investigadores fueron revisados poco después de terminado el trabajo de campo y las garrapatas fueron removidas inmediatamente.

Con respecto a las tasas de infección con *R. bellii* halladas en este estudio, se encontró una diferencia cercana al doble de infección entre garrapatas *A. ovale* colectadas sobre la vegetación y sobre hospedadores. Es posible que los hospedadores vertebrados actúen como amplificadores de estas rickettsias, como ocurre con otras especies como *R. rickettsii* en *Hydrochoerus hydrochaeris* (Souza y col., 2009).

A su vez, se observó una tasa relativamente baja de infección con *R. parkeri* cepa Atlantic rainforest y *R. amblyommatidis* en comparación a las tasas de infección con *R. bellii*. Algunos autores han sugerido que la infección con una especie de *Rickettsia* en una población puede minimizar o incluso inhibir la transmisión de otra especie debido a algún “fenómeno de interferencia” cuyos mecanismos aún no han sido esclarecidos (Burgdorfer, 1988; Macaluso y col., 2002; Labruna y col., 2004a; Sakai y col., 2014; Rivas y col., 2015; Wright y col., 2015; Levin y col., 2018). Es posible que exista competencia interespecífica entre *R. bellii* y otras especies de *Rickettsia* en el norte de Misiones, lo cual explicaría la baja tasa de infección con *R. parkeri* cepa Atlantic rainforest. En este sentido, la infección con un posible simbionte desplazaría a la especie patógena, minimizando la exposición potencial de humanos a rickettsias patógenas transmitidas por una de las especies de garrapatas –*A. ovale*– más antropofílicas de la región.

Las tasas de infección con bacterias del género *Rickettsia* variaron ampliamente entre especies de hospedadores y de garrapatas. Algunos autores han sugerido un posible efecto de dilución de los patógenos asociado a la densidad y diversidad de reservorios competentes. En este sentido, la probabilidad de una garrapata de encontrar un individuo hospedador que sea un reservorio competente dependería, entre otras variables, de la densidad relativa de estas especies (Keesing y col., 2006). En la práctica, esta hipótesis podría ser probada solo en algunos casos, ya que no tiene en cuenta múltiples variables que afectan la diversidad, abundancia, tasa de infección, capacidad vectorial y de reservorio, entre otras, que deben ser cuantificadas para precisar el efecto real de la dilución. Por lo tanto, aún teniendo en cuenta que una alta abundancia de reservorios no competentes podría disminuir la tasa de infección de los vectores, otros factores (como la afinidad por hospedadores humanos) podrían favorecer los ciclos de transmisión de patógenos en ciertas circunstancias (Randolph y Dobson, 2012).

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El objetivo de este trabajo fue estudiar aspectos ecológicos y epidemiológicos de las garrapatas en distintas unidades ambientales del norte de la provincia de Misiones, una zona donde no existía este tipo de información hasta el presente. Con este fin, se realizaron dos años de colecta de muestras mensuales, estacionales y ocasionales. La información recabada permitió realizar el análisis de la riqueza específica, los hospedadores, las dinámicas espaciales y temporales de las especies de garrapatas del norte de Misiones, y detectar bacterias rickettsiales que circulan en la región.

Este estudio demuestra que la estructura del paisaje y su conectividad serían factores importantes para entender tanto la abundancia de hospedadores favorables al mantenimiento y expansión de las poblaciones de especies de garrapatas nativas y exóticas, como las diferencias en la abundancia y diversidad de las mismas entre los distintos ambientes analizados.

Por otra parte, se demostró que algunas especies están presentes solo en algunas estaciones del año y otras están presentes durante todo el año con picos de abundancia estacionales. Además, la información colectada sugiere que las condiciones climáticas y ambientales son propicias para que ninguna especie de garrapata establecida en el norte de Misiones tenga la necesidad de realizar diapausas en ningún momento del año.

Dado el contacto íntimo y prolongado entre las garrapatas y los hospedadores, y el periodo de tiempo aún más largo de las garrapatas en su fase de vida libre, no está claro si el rango de distribución de las garrapatas está limitado principalmente por factores relacionados a los hospedadores o a factores abióticos del ambiente. Cuanto menos específica es la relación parásito-hospedador, es menor la probabilidad de que el hospedador sea un factor limitante de la distribución. Este estudio demostró que algunas especies de garrapatas están presentes en una variedad de ambientes en mayor número que otras, y que presentan distintas distribuciones temporales con picos estacionales. Esta información podría ser de utilidad para estrategias de vigilancia y prevención de enfermedades transmitidas por garrapatas, ya que brinda la

posibilidad de identificar zonas y momentos de mayor riesgo de infestación por garrapatas.

Finalmente, se destacó la importancia de los mamíferos medianos para el mantenimiento de estadios inmaduros de las garrapatas que se encuentran en la región de la selva atlántica de Argentina. Dependiendo de los estadios y las especies de garrapata, tanto las variables ambientales (por ejemplo, el grado de disturbio antrópico) como las del hospedador podrían modular las cargas parasitarias. Dado el elevado nivel de interacciones entre dos mamíferos medianos como *N. nasua* y *D. aurita* y los humanos en áreas protegidas y en sitios de asentamientos humanos cercanos a las áreas protegidas del bosque atlántico en la provincia de Misiones, estos hospedadores podrían desempeñar un papel importante en los ciclos enzoóticos de patógenos zoonóticos transmitidos por garrapatas. Estos hechos destacan la relevancia de evaluar las múltiples variables que pueden tener un impacto en la presencia y carga de garrapatas sobre hospedadores silvestres.

El conocimiento sobre el uso de hospedadores y la dinámica temporal y espacial de la abundancia de garrapatas es necesario para comprender el riesgo de transmisión de patógenos transmitidos por garrapatas. De hecho, las estrategias de control de garrapatas deberían basarse en la información existente sobre la distribución espacial y temporal y las preferencias climáticas y de hospedadores de las garrapatas. En este sentido, este trabajo proporciona información sobre todos estos temas para las garrapatas presentes en ambientes con diferente grado de disturbio antropogénico en la ecorregión de la Selva Atlántica de Argentina.

Según la información obtenida, existen rickettsias patógenas y de patogenicidad aún desconocida circulando en distintos ambientes en la provincia de Misiones. Es posible que también existan casos humanos de rickettsiosis transmitidas por garrapatas que se originan por el estrecho contacto con ambientes naturales de selva debido a las actividades humanas. Estas circunstancias definen una alta tasa de exposición de los trabajadores rurales y del monte, los habitantes de espacios periurbanos y los turistas de todo el mundo a la infestación con garrapatas antropofílicas como *A. ovale*, lo que determina un alto riesgo de transmisión de

bacterias como *R. parkeri* cepa Atlantic rainforest y destaca la necesidad de estudios adicionales sobre la eco-epidemiología de las garrapatas y su relevancia para la salud pública en la provincia de Misiones. También es necesario desarrollar estrategias para incrementar el conocimiento público sobre el riesgo de picaduras de garrapatas e infecciones con patógenos, e informar sobre los métodos de protección contra las garrapatas.

El conocimiento sobre las rickettsiosis humanas por parte de los médicos clínicos en Misiones es limitado y esta rickettsia en particular produce síntomas leves, por lo que es posible que los casos en humanos estén siendo subdiagnosticados. Las instituciones de salud pública involucradas en el diagnóstico y tratamiento de estas enfermedades deben tener en cuenta la posibilidad de que se presenten casos de rickettsiosis causados por esta cepa.

En todo caso, el conocimiento de las características ecológicas y epidemiológicas de las garrapatas y rickettsias es el primer escalón para mejorar el diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades transmitidas por garrapatas. A medida que el conocimiento sobre el comportamiento, la distribución y los requerimientos de las distintas especies de garrapatas aumenta, es necesario integrar la información para llegar a conclusiones concretas que permitan generar tácticas de regulación de las poblaciones de garrapatas. Para este fin, los programas disponibles para el modelado matemático de los datos constituyen herramientas cómodas, accesibles y flexibles.

Este estudio mostró que los casos de infecciones rickettsiales no están distribuidos de forma homogénea en las poblaciones de garrapatas. Infecciones experimentales utilizando modelos animales con estos agentes de patogenicidad desconocida son necesarias.

Los patrones espaciales y temporales están íntimamente ligados a los ciclos de transmisión de enfermedades transmitidas por garrapatas, y al contar con bases de datos abundantes y sistemáticas, es posible detectar estos patrones. En estudios futuros, se considera ampliar el muestreo a toda la provincia, agregar a los modelos información remota proporcionada por imágenes satelitales y volcar resultados en

salidas cartográficas. De esta forma, se contará con datos y herramientas que permitirán evaluar riesgos de exposición a mordeduras de garrapata en un escenario de permanentes modificaciones del paisaje.

Líneas de investigación propuestas no abordadas en este estudio:

- ✓ Diseño y evaluación de métodos de control para *R. microplus* adaptados a las condiciones ecológicas y de manejo de la provincia de Misiones.
- ✓ Estudio de la epidemiología de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *A. marginale* en la provincia de Misiones.
- ✓ Determinación de la circulación de rickettsias en humanos mediante pruebas serológicas, con el fin de definir el impacto sanitario potencial de estos patógenos en la provincia de Misiones.
- ✓ Ajustar métodos de diagnóstico para bacterias de los géneros *Ehrlichia* y *Anaplasma* tanto en garrapatas como en vertebrados.
- ✓ Determinar con mayor precisión el rol de los mamíferos silvestres como reservorios o como amplificadores de bacterias transmitidas por garrapatas.

Referencias

- Aguiar DM, Hagiwara MK, Labruna MB. 2008. In vitro isolation and molecular characterization of an *Ehrlichia canis* strain from São Paulo, Brazil. *Braz J Microbiol.* 39: 489-493.
- Aguiar DM, Zhang X, Melo ALT, Pacheco TA, Meneses AMC, Zanutto MS, Horta MC, Santarém VA, Camargo LMA, McBride JW, Labruna MB. 2013. Genetic diversity of *Ehrlichia canis* in Brazil. *Vet Microbiol.* 164: 315-321.
- Allsopp BA. Natural history of *Ehrlichia ruminantium*. *Vet Parasitol.* 167: 123-135.
- Alves-Costa CP, Da Fonseca GA, Christófaro C. 2004. Variation in the diet of the brown-nosed coati (*Nasua nasua*) in southeastern Brazil. *J Mammal.* 85: 478-482.
- Aragão H, Fonseca FD. 1951. Notas da ixodologia: I. Duas novas espécies do gênero *Ixodes* e um novo nome para *Haemaphysalis kochi* Aragão, 1908 (Acari. Ixodidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 49: 567-574.
- Arzua M, Onofrio VC, Barros-Battesti DM. 2005. Catalogue of the tick collection (Acari, Ixodida) of the Museu de História Natural Capão da Imbuia, Curitiba, Paraná, Brazil. *Rev Bras Zool.* 22: 623-632.
- Barbieri FS, Brito LG, Labruna MB, Barros-Battesti DM, Camargo LMA, Famadas KM. 2008. Description of the larva of *Amblyomma ovale* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) by light and scanning electron microscopy. *Syst Appl Acarol.* 13: 109-119.
- Barbieri ARM, Filho JM, Nieri-Bastos FA, Souza Jr JC, Szabó MPJ, Labruna MB. 2014. Epidemiology of *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest in a spotted fever-endemic area of southern Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.* 5: 848–853.
- Barker RW, Kocan A, Ewing SA, Wettemann RP, Payton ME. 2004. Occurrence of the Gulf Coast Tick (Acari: Ixodidae) on wild and domestic mammals in north-central Oklahoma. *J Med Entomol.* 41: 170–178.

- Barros-Battesti DM, Arzua M, Bechara GH. 2006. Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: um Guia Ilustrado para Identificação de Espécies. Integrated Consortium on Ticks and Tick-borne Diseases-ICTTD/Butantan. São Paulo. p. 223.
- Barton K. 2016. MuMIn: Multi-Model Inference. R Package Version 1.15.6. <https://CRAN.R-project.org/package=MuMIn>.
- Baxter JD. 1996. The typhus group. Clinics in dermatology. 14: 271-278.
- Beisiegel BM. 2001. Notes on the coati, *Nasua nasua* (Carnivora: Procyonidae) in an Atlantic Forest area. Braz J Biol. 61: 689–692.
- Belozerov VN. 1982. Diapause and biological rhythms in ticks. En: Obenchain FD, Galun R, Physiology of ticks: current themes in tropical science. p 469-500. Pergamon Press, Elsevier. Oxford.
- Boero JJ. 1957. Garrapatos de la República Argentina (Acarina-Ixodoidea). Universidad Nacional de Buenos Aires Departamento Editorial. Buenos Aires. p. 113.
- Boero JJ, Delpietro H. 1971. *Amblyomma calcaratum* Neumann 1899 (Acarina-Ixodidae): Nueva especie para la fauna argentina. Rev Med Vet Buenos Aires. 52: 339-341.
- Brites-Neto J, Roncato Duarte KM, Martins TF. 2015. Tick-borne infections in human and animal population worldwide. Vet World. 8: 301-315.
- Brunner JL, Ostfeld RS. 2008. Multiple causes of variable tick burdens on small-mammal hosts. Ecology. 89: 2259-2272.
- Burgdorfer W. 1988. Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain spotted fever and scrub typhus. Biology of rickettsial diseases. 1: 33-50.
- Burkart R, Bárbaro NO, Sánchez RO, Gómez DA. 1999. Eco-regiones de la Argentina. Programa Desarrollo Institucional Ambiental. APN, Sec Rec Nat y Des Sust de la Nación. Buenos Aires.

- Burnham KP, Anderson DR. 2002. Model Selection and Multimodel Inference: a Practical Information-Theoretic Approach. Springer, New York. p. 488.
- Cáceres NC, Monteiro-Filho EL. 2001. Food habits, home range and activity of *Didelphis aurita* (Mammalia, Marsupialia) in a forest fragment of southern Brazil. *Stud Neotrop Fauna Environ.* 36: 85-92.
- Calabrese JM, Brunner JL, Ostfeld RS. 2011. Partitioning the aggregation of parasites on hosts into intrinsic and extrinsic components via an extended Poisson-gamma mixture model. *PloS one.* 6: e29215.
- Canevari M, Vaccaro O. 2007. Guía de Mamíferos del Sur de América del Sur. Ed. LOLA. Buenos Aires.
- Carvalho L, Armua-Fernandez MT, Sosa N, Félix ML, Venzal JM. 2017. *Anaplasma platys* in dogs from Uruguay. *Ticks Tick Borne Dis.* 8: 241-245.
- Chao A. 1984. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scandinavian Journal of Statistics.* 11: 265–270.
- Chao A, Chiu CH. 2016. Species richness: estimation and comparison. *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online.* p. 1-26.
- Chao A, Gotelli NJ, Hsieh TC, Sander EL, Ma KH, Colwell RK, Ellison AM. 2014. Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: a framework for sampling and estimation in species diversity studies. *Ecol Monogr.* 84: 45–67.
- Chao A, Ma KH, Hsieh TC, Chiu CH. 2015. Online Program SpadeR (Species-richness Prediction and Diversity Estimation in R). Program and User's Guide. http://chao.stat.nthu.edu.tw/wordpress/software_download/softwarespader_online
- Chao A, Ma KH, Hsieh TC. 2016. iNEXT (iNterpolation and EXTrapolation) Online: Software for Interpolation and Extrapolation of Species Diversity. Program and User's Guide. http://chao.stat.nthu.edu.tw/wordpress/software_download/inext-online.

- Chen G, Severo MS, Sohail M, Sakhon OS, Wikel SK, Kotsyfakis M, Pedra JHF. 2012. *Ixodes scapularis* saliva mitigates inflammatory cytokine secretion during *Anaplasma phagocytophilum* stimulation of immune cells. *Parasit Vectors*. 5:229.
- Cicuttin GL, Brambati DF, Eugui JIR, Lebrero CG, De Salvo MN, Beltrán FJ, Dohmen FEG, Jado I, Anda P. 2014a. Molecular characterization of *Rickettsia massiliae* and *Anaplasma platys* infecting *Rhipicephalus sanguineus* ticks and domestic dogs, Buenos Aires (Argentina). *Ticks Tick Borne Dis*. 5: 484-488.
- Cicuttin GL, Vidal P, De Salvo NM, Beltrán FJ, Gury Dohmen FE. 2014b. Detección molecular de *Rickettsia massiliae* y *Anaplasma platys* en garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* y caninos domésticos del municipio de Bahía Blanca (Argentina). *Rev Chilena Infectol*. 31: 563-568.
- Cicuttin GL, Tarragona EL, De Salvo MN, Mangold AJ, Nava S. 2015. Infection with *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in two lineages of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) from Argentina. *Ticks Tick Borne Dis*. 6: 724-729.
- Cicuttin GL, De Salvo MN, Nava S. 2017. Two novel *Ehrlichia* strains detected in *Amblyomma tigrinum* ticks associated to dogs in peri-urban areas of Argentina. *Comp Immunol Microbiol Inf Dis*. 53: 40-44.
- Clements JF, Schulenberg TS, Iliff MJ, Roberson D, Fredericks TA, Sullivan BL, Wood CL. 2016. The eBird/Clements checklist of birds of the world: v2016.
- Costa EMJ, Mauro RA, Silva JSV. 2009. Group composition and activity patterns of brown-nosed coatis in savanna fragments, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Braz J Biol*. 69: 985–991.
- Costa-Júnior LM, Rembeck K, Passos LMF, Ribeiro MFB. 2013. Factors associated with epidemiology of *Anaplasma platys* in dogs in rural and urban areas of Minas Gerais State, Brazil. *Prev Vet Med*. 109: 321-326.

- Cumming GS. 2002. Comparing climate and vegetation as limiting factors for species ranges of African ticks. *Ecology*. 83: 255-268.
- da Costa PSG, Valle LMDC, Brigatte ME, Greco DB. 2006. More about human monocytotropic ehrlichiosis in Brazil: serological evidence of nine new cases. *Braz J Inf Dis*. 10: 7-10.
- da Costa Vieira RF, Biondo AW, Guimarães AMS, Santos APD, Santos RPD, Dutra LH, de Paiva Diniz PPV, de Morais HA, Messick JB, Labruna MB, Vidotto O. 2011. Ehrlichiosis in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*. 20: 01-12.
- da Silva GCF, Benitez ADN, Giroto A, Taroda A, Vidotto MC, Garcia JL, de Freitas JC, Headly SA, Vidotto O. 2012. Occurrence of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in household dogs from northern Paraná. *Rev Bras Parasitol Vet*. 21: 379-385.
- Dantas-Torres F. 2010. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasit Vectors*. 3: 26–36.
- De Castro JJ, James AD, Minjauw B, DiGiulio G, Permin A, Pegram RG, Chizyuka HGB, Sinyangwe P. 1997. Long-term studies on the economic impact of ticks on Sanga cattle in Zambia. *Exp Appl Acarol*. 21: 3–19.
- De la Fuente J, Passos LM, Van Den Bussche RA, Ribeiro MF, Facury-Filho EJ, Kocan KM. 2004. Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* isolates from Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol*. 121: 307-316.
- De la Fuente J, Naranjo V, Ruiz-Fons F, Höfle U, Fernandez de Mera IG, Villanúa D, Almazán C, Torina A, Caracappa S, Kocan KM, Gortázar C. 2005. Potential vertebrate reservoir hosts and invertebrate vectors of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in central Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 5: 390-401.
- Debárbora V, Mangold AJ, Oscherov EB, Guglielmone AA, Nava S. 2014. Study of the life cycle of *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae) based on field and laboratory data. *Exp Appl Acarol*. 63: 93–105.

- Doyle CK, Labruna MB, Breitschwerdt EB, Tang YW, Corstvet RE, Hegarty BC, Bloch KC, Li P, Walker DH, McBride JW. 2005. Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor TaqMan real-time polymerase chain reaction of the *dsb* gene. *J Mol Diagn.* 7: 504-510.
- Dumler JS, Barbet AF, Bekker CPJ, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR. 2001. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 51: 2145-2165.
- Dumler JS, Choi KS, Garcia-Garcia JC, Barat NS, Scorpio DG, Garyu JW, Grab DJ, Bakken JS. 2005. Human Granulocytic Anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerg Infect Dis.* 11: 1828-1834.
- Eiras DF, Craviotto MB, Vezzani D, Eyal O, Baneth G. 2013. First description of natural *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* infections in dogs from Argentina. *Com Immunol Microbiol Infect Dis.* 36: 169-173.
- Eremeeva ME. 2016. Molecular Epidemiology of Rickettsial Diseases. En: Thomas S, *Rickettsiales Biology, Molecular Biology, Epidemiology and vaccine development.* p. 23-57. Springer International Publishing. Switzerland.
- Erster O, Roth A, Avni Z, King R, Shkap V. 2015. Molecular detection of *Rickettsia bellii* in *Amblyomma rotundatum* from imported red-footed tortoise (*Chelonoides carbonaria*). *Ticks Tick Borne Dis.* 6: 473-477.
- Esser HJ, Foley JE, Bongers F, Herre EA, Mille MJ, Prins HHT, Jansen PA. 2016. Host body size and the diversity of tick assemblages on Neotropical vertebrates. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 5: 295-304.

- Estrada-Peña A, Jongejan F. 1999. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. *Exp Appl Acarol.* 23: 685-715.
- Estrada-Peña A, Venzal JM, Mangold AJ, Cafrune MM, Guglielmone AA. 2005. The *Amblyomma maculatum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae: Amblyomminae) tick group: diagnostic characters, description of the larva of *A. parvitarsum* Neumann, 1901, 16S rDNA sequences, distribution and hosts. *Syst Parasitol.* 60: 99-112.
- Estrada-Peña A. 2008. Climate, niche, ticks, and models: what they are and how we should interpret them. *Parasitol Res.* 103: S87-S95.
- Estrada-Peña A, Gray JS, Kahl O, Lane RS, Nijhof AM. 2013. Research on the ecology of ticks and tick-borne pathogens—methodological principles and caveats. *Front Cell Infect Microbiol.* 3: 29.
- Fair J, Paul E, Jones J. 2010. Guidelines to the Use of Wild Birds in Research. Ornithological Council. Washington, D.C. p. 215.
- Fairchild GB, Kohls GM, Tipton VJ. 1966. The ticks of Panama (Acarina: Ixodoidea). En: Wenzel RL, Tipton VJ, Ectoparasites of Panama. P. 167-219. Field Museum of Natural History. Chicago, Illinois.
- Fourie JJ, Stanneck D, Luus HG, Beugnet F, Wijnveld M, Jongejan F. 2013. Transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* ticks feeding on dogs and on artificial membranes. *Vet Parasitol.* 197: 595-603.
- Fox J, Weisberg S. 2011. An {R} Companion to Applied Regression. URL: Snd ed. Sage, Thousand Oaks CA. <http://socserv.socsci.mcmaster.ca/jfox/Books/Companion>.
- Garcia MV, Matias J, Aguirre ADA, Csordas BG, Szabó MP, Andreotti R. 2015. Successful feeding of *Amblyomma coelebs* (Acari: Ixodidae) nymphs on humans in Brazil: skin reactions to parasitism. *J Med Entomol.* 52: 117-119.

- García-García JC, Portillo A, Núñez MJ, Santibáñez S, Castro B, Oteo JA. 2010. Case report: a patient from Argentina infected with *Rickettsia massiliae*. *Am J Trop Med Hyg.* 82: 691–692.
- Gompper ME. 2004. Correlations of coati (*Nasua narica*) social structure with parasitism by ticks and chiggers. En: Sánchez-Cordero V, Medellín RA, Contribuciones mastozoológicas en homenaje a Bernardo Villa. p. 527–534. Instituto de Biología e Instituto de Ecología, UNAM, México, D.F.
- Goodwin BJ, Ostfeld RS, Schaubert EM. 2001. Spatiotemporal variation in a Lyme disease host and vector: black-legged ticks on white-footed mice. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 1: 129-138.
- Guedes E, Leite RC, Prata MC, Pacheco RC, Walker DH, Labruna MB. 2005. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 100: 841-845.
- Guglielmone AA, Mangold AJ. 1984. Hallazgo de *Amblyomma incisum* Neumann, 1906 en la Argentina. *Vet Arg.* 1: 592.
- Guglielmone AA, Nava S. 2006. Las garrapatas argentinas del género *Amblyomma* (Acari: Ixodidae): distribución y hospedadores. *RIA.* 35: 133-153.
- Guglielmone AA, Beati L, Barros-Battesti DM, Labruna MB, Nava S, Venzal JM, Mangold AJ, Szabó MPJ, Martins JR, González-Acuña D, Estrada-Peña A. 2006. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. *Exp Appl Acarol.* 40: 83–100.
- Guglielmone AA, Nava S, Diaz MM. 2011. Relationships of South American marsupials (Didelphimorphia, Microbiotheria and Paucituberculata) and hard ticks (Acari: Ixodidae) with distribution of four species of Ixodes. *Zootaxa.* 3086: 1-30.
- Guillemi EC, Orozco MM, Argibay HD, Farber MD. 2019. Evidence of *Ehrlichia chaffeensis* in Argentina through molecular detection in marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). *Int J Parasitol (Parasites and Wildlife).* 8: 45-49.

- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser.* 41: 95-98.
- Harrison A, Scantlebury M, Montgomery WI. 2010. Body mass and sex-biased parasitism in wood mice *Apodemus sylvaticus*. *Oikos.* 119: 1099–1104.
- Harrus S, Waner T. 2011. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. *Vet J.* 187: 292-296.
- Herrera HM, Lisboa CV, Pinho AP, Olifiers N, Bianchi RC, Rocha FL, Mourao GM, Jansen AM. 2008. The coati (*Nasua nasua*, Carnivora, Procyonidae) as a reservoir host for the main lineages of *Trypanosoma cruzi* in the Pantanal region, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 102: 1133-1139.
- Hoogstraal H. 1956. African Ixodoidea. Volumen I. Ticks of the Sudan (with special reference to Equatoria Province and with Preliminary Reviews of the Genera *Boophilus*, *Margaropus*, and *Hyalomma*). Ed. U.S Govt. Printing Office. DC, USA. p. 1101.
- Hoogstraal H. 1985. Argasid and Nuttalliellid ticks as parasites and vectors. *Adv Parasitol.* 24: 135-238.
- Hornok S, Elek V, de la Fuente J, Naranjo V, Farkas R, Majoros G, Földvári G. First serological and molecular evidence on the endemicity of *Anaplasma ovis* and *A. marginale* in Hungary. *Vet Microbiol.* 122: 316-322.
- Horta MC, Moraes-Filho J, Casagrande RA, Saito TB, Rosa SC, Ogrzewalska M, Matushima ER, Labruna MB. 2009. Experimental infection of opossums *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 9: 109-118.
- Hugot JP. 2006. Coevolution of macroparasites and their small mammalian hosts: cophylogeny and coadaptation. En: Morand S, Krasnov BR, Poulin R, *Micromammals and Macroparasites.* p. 257-276. Springer, Tokyo.

- Instituto Provincial de Estadística y Censos de Misiones (IPEC). 2010. Censo Nacional de Población, Hogares y Viviendas, Argentina. <http://www.ipecmisiones.org/censo-2010>.
- Ivancovich JC, Luciani CA. 1992. Las garrapatas de Argentina. Monogr Asoc Arg Parasitol Vet. 95.
- Jones EK, Clifford CM, Keirans JE, Kohls GM. 1972. Ticks of Venezuela (Acarina: Ixodoidea) with a key to the species of *Amblyomma* in the Western Hemisphere. Brigham Young University Science Bulletin: Biological Series. 17: 1.
- Jones KE, Patten NG, Levy MA, Storeygard, A, Balk D, Gittleman JL, Daszak P. 2008. Global trends in emerging infectious diseases. Nature. 451: 990-993.
- Jongejan F, Uilenberg G. 2004. The global importance of ticks. Parasitology. 129: S3—S14.
- Kahl O, Gern L, Eisen L, Lane RS. 2002. Ecological research on *Borrelia burgdorferi* sensu lato: terminology and some methodological pitfalls. En: Gray JS, Kahl O, Lane RS, Stanek G, Lyme Borreliosis: Biology, Epidemiology and Control. p. 29–46. CABI Publishing. New York.
- Karpathy SE, Slater KS, Goldsmith CS, Nicholson WL, Paddock CD. 2016. *Rickettsia amblyommatis* sp. nov., a spotted fever group *Rickettsia* associated with multiple species of *Amblyomma* ticks in North, Central and South America. Int J Syst Evol Microbiol. 66: 5236-5243.
- Keesing F, Holt RD, Ostfeld RS. 2006. Effects of species diversity on disease risk. Ecol Lett. 9: 485–498.
- Kiss T, Cadar D, Spînu M. 2012. Tick prevention at a crossroad: new and renewed solutions. Vet Parasitol. 187: 357-366.
- Klompen JSH, Black IV WC, Keirans JE, Oliver JH. 1996. Evolution of ticks. Annu Rev Entomol. 41: 141-161.

- Knap N, Durmiši E, Saksida A, Korva M, Petrovec M, Avšič-Županc T. 2009. Influence of climatic factors on dynamics of questing *Ixodes ricinus* ticks in Slovenia. *Vet Parasitol.* 164: 275-281.
- Kocan KM, de la Fuente J, Blouin EF, Coetzee JF, Ewing SA. 2010. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet Parasitol.* 167: 95-107.
- Krantz GW, Walter DE. 2009. A manual of acarology. Texas Tech University Press. Lubbock. p. 807.
- Krasnov BR, Shenbrot GI, Khokhlova IS, Degen AA. 2004. Flea species richness and parameters of host body, host geography and host "milieu". *J Animal Ecol.* 73: 1121-1128.
- Krasnov BR, Morand S, Hawlena H, Khokhlova IS, Shenbrot GI. 2005. Sex-biased parasitism, seasonality and sexual size dimorphism in desert rodents. *Oecologia.* 146: 209-217.
- Krawczak FS, Muñoz-Leal S, Guztzasky AC, Oliveira SV, Santos FCP, Angerami RN, Moraes-Filho J, de Souza Jr JC, Labruna MB. 2016a. *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest infection in a patient from a spotted fever-endemic area in southern Brazil. *Am J Trop Hyg.* 95: 551–553.
- Krawczak FS, Binder LC, Oliveira CS, Costa FB, Moraes-Filho J, Martins TF, Sponchiado J, Melo GL, Gregori F, Polo G, Oliveira SV, Labruna MB. 2016b. Ecology of a tick-borne spotted fever in southern Brazil. *Exp Appl Acarol.* 70: 219–229.
- Labruna MB, Da Silva MNJ, De Oliveira MDF, Barros-Battesti DM, Keirans JE. 2003. New records and laboratory-rearing data for *Ixodes schulzei* (Acari: Ixodidae) in Brazil. *J Med Entomol.* 40: 116–118.
- Labruna MB, Whitworth T, Bouyer DH, McBride J, Camargo LMA, Camargo EP, Popov V, Walker DH. 2004a. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the State of Rondonia, Western Amazon, Brazil. *J Med Entomol.* 41: 1073-1081.

- Labruna MB, Whitworth T, Horta MC, Bouyer DH, McBride JW, Pinter A, Popov V, Gennari S, Walker DH. 2004b. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of Sao Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. J Clin Microbiol. 42: 90-98.
- Labruna MB, Jorge RS, Sana DA, Jácomo ATA, Kashivakura CK, Furtado MM, Ferro C, Perez SA, Silveira L, Santos Jr TS, Marques SR, Morato RG, Nava A, Adania CH, Teixeira RHF, Gomes AAB, Conforti VA, Azevedo FCC, Prada CS, Silva JCR, Batista AF, Marvulo MFV, Morato RLG, Alho CJR, Pinter A, Ferreira PM, Ferreira F, Barros-Battesti DM. 2005. Ticks (Acari: Ixodida) on wild carnivores in Brazil. Exp Appl Acarol. 36: 149-163.
- Labruna MB, Pacheco RC, Nava S, Brandão PE, Richtzenhain LJ, Guglielmone AA. 2007a. Infection by *Rickettsia bellii* and *Candidatus "Rickettsia amblyommii"* in *Amblyomma neumanni* ticks from Argentina. Microbial ecology. 54: 126-133.
- Labruna MB, Onofrio VC, Beati L, Arzua M, Bertola PB, Ribeiro AF, Barros-Battesti DM. 2007b. Redescription of the female, description of the male, and several new records of *Amblyomma parkeri* (Acari: Ixodidae), a South America tick species. Exp Appl Acarol. 49: 243-260.
- Lamattina D, Tarragona EL, Costa SA, Guglielmone A, Nava S. 2014. Ticks (Acari: Ixodidae) of northern Misiones Province, Argentina. Syst Appl Acarol. 19: 393-398.
- Lamattina D, Venzal JM, Tarragona EL, Mangold AJ, Nava S. 2018. *Amblyomma yucumense* Krawczak, Martins & Labruna, 2015 (Acari: Ixodidae) in Argentina. Syst Appl Acarol. 23: 799-802.
- Lasta CS, Santos APD, Messick JB, Oliveira ST, Biondo AW, Vieira RFDC, Dalmolin ML, González FHD. 2013. Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs in Southern Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 22: 360-366.

- Levin ML, Schumacher LB, Snellgrove A. 2018. Effects of *Rickettsia amblyommatis* infection on the vector competence of *Amblyomma americanum* ticks for *Rickettsia rickettsii*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 18: 579-587.
- Londoño AF, Díaz FJ, Valbuena G, Gazi M, Labruna MB, Hidalgo M, Mattar S, Contreras V, Rodas JD. 2014. Infection of *Amblyomma ovale* by *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest, Colombia. *Ticks Tick Borne Dis.* 5: 672–675.
- Lopes MG, Junior JM, Foster RJ, Harmsen BJ, Sanchez E, Martins TF, Quigley H, Marcili A, Labruna MB. 2016. Ticks and rickettsiae from wildlife in Belize, Central America. *Parasit Vectors.* 9: 1–7.
- Macaluso KR, Sonenshine DE, Ceraul SM, Azad AF. 2002. Rickettsial infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) inhibits transovarial transmission of a second *Rickettsia*. *J Med Entomol.* 39: 809-813.
- Machado RZ, Duarte JMB, Dagnone AS, Szabó MPJ. 2006. Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). *Vet Parasitol.* 139: 262-266.
- Machado RZ, André MR, Werther K, de Sousa E, Gavioli FA, Alves Junior JRF. 2012. Migratory and carnivorous birds in Brazil: reservoirs for *Anaplasma* and *Ehrlichia* species?. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12: 705-708.
- Magalhaes-Matos PC, Moraes MFD, Valim JRA, Castro GNS, Santos PN, Manier BSML, Fonseca AH. 2017. Ticks (Acari: Ixodidae) and lice (Phthiraptera: Trichodectidae) infesting freelifving coatis (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766) with sylvatic and synanthropic habits in the Atlantic rainforest of Southern Brazil. *Syst Appl. Acarol.* 22: 779–784.
- Mangold AJ, Bargués MD, Mas-Coma S. 1998. Mitochondrial 16S rRNA sequences and phylogenetic relationships of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). *Parasitol Res.* 84: 478–484.

- Martins TF, Venzal JM, Terassini FA, Costa FB, Marcili A, Camargo LM, Barros-Battesti DM, Labruna MB. 2014. New tick records from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. *Exp Appl Acarol.* 62: 121-128.
- Martins TF, Labruna MB, Mangold AJ, Cafrune MM, Guglielmone AA, Nava S. 2014. Taxonomic key to nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) in Argentina, with description and redescription of the nymphal stage of four *Amblyomma* species. *Ticks Tick Borne Dis.* 5: 753–770.
- Mastropaolo M, Aprile G, Solis G, Beldomenico PM, Peralta JL, Guglielmone AA. 2004. Primer registro de *Amblyomma dubitatum* Neumann 1899 (Acari: Ixodidae) en la provincia de Misiones (Argentina). *Revista FAVE.* 3: 67-70.
- Mastropaolo M, Tarragona EL, Silaghi C, Pfister K, Thiel C, Nava S. 2016. High prevalence of “*Candidatus Rickettsia amblyommii*” in *Amblyomma* ticks from a spotted fever endemic region in north Argentina. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 46: 73-76.
- McIntosh D, Bezerra RA, Luz HR, Faccini JLH, Gaiotto FA, Giné GAF, Albuquerque GR. 2015. Detection of *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma longirostre* (Acari: Ixodidae) from Bahia state, Northeast Brazil. *Braz J Microbiol.* 46: 879-883.
- McLeod MP, Qin X, Karpathy SE, Gioia J, Highlander SK, Fox GE, McNeill TZ, Jiang H, Muzny D, Jacob LS, Hawes AC, Sodergren E, Gill R, Hume J, Morgan M, Fan G, Amin AG, Gibbs RA, Hong C, Yu X, Walker DH, Weinstock GM. 2004. Complete genome sequence of *Rickettsia typhi* and comparison with sequences of other rickettsiae. *J Bacteriol.* 186: 5842-5855.
- Medeiros AP, Souza APD, Moura ABD, Lavina MS, Bellato V, Sartor AA, Nieri-Bastos FA, Richtzenhain LJ, Labruna MB. 2011. Spotted fever group *Rickettsia* infecting ticks (Acari Ixodidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 106: 926–930.

- Medlock JM, Hansford KM, Bormane A, Derdakova M, Estrada-Peña A, George JC, Golovljova I, Jaenson TGT, Jensen JK, Jensen PM, Kazimirova M, Oteo JA, Papa A, Pfister K, Plantard O, Randolph SE, Rizzoli A, Santos-Silva MM, Sprong H, Vial L, Hendrickx G, Zeller H, Van Bortel W. 2013. Driving forces for changes in geographical distribution of *Ixodes ricinus* ticks in Europe. *Parasit Vectors*. 6:1.
- Merhej, V., El Karkouri, K., & Raoult, D. (2009). Whole genome-based phylogenetic analysis of Rickettsiae. *Clin Microbiol Infect*. 15: 336-337.
- Mills JN, Yates TL, Childs JE, Parmenter RR, Ksiazek TG, Rollin PE, Peters CJ. 1995. Guidelines for working with rodents potentially infected with hantavirus. *J Mammal*. 76: 716-722.
- Monje LD, Nava S, Eberhardt AT, Correa AI, Guglielmone AA, Beldomenico PM. 2015. Molecular detection of the human pathogenic *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest in *Amblyomma dubitatum* ticks from Argentina. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 15: 167–169.
- Monje LD, Fernandez C, Percara A. 2018. Detection of *Ehrlichia* sp. strain San Luis and *Candidatus* Rickettsia andeanae in *Amblyomma parvum* ticks. *Ticks Tick Borne Dis*. 10: 111-114.
- Moraes-Filho J, Marcili A, Nieri-Bastos FA, Richtzenhain LJ, Labruna MB. 2011. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. *Acta Trop*. 117: 51-55.
- Moraes-Filho J, Soares JB, da Silva Krawczak F, Lado P, Labruna MB. 2013. Estudio de la competencia vectorial de *Ehrlichia canis* por cuatro poblaciones de *Rhipicephalus sanguineus*. *Act Med Costarricense*. 55: 93.
- Moraes-Filho J, Krawczak FS, Costa FB, Soares JF, Labruna MB. Comparative evaluation of the vector competence of four south American populations of the *Rhipicephalus sanguineus* group for the bacterium *Ehrlichia canis*, the agent of Canine Monocytic Ehrlichiosis. *PLoS ONE*. 10: e0139386.

- Morens DM, Folkers GK, Fauci AS. 2004. The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature*. 430: 242-249.
- Morrone JJ. 2006. Biogeographic areas and transition zones of Latin America and the Caribbean Islands based on panbiogeographic and cladistic analyses of the entomofauna. *Ann Rev Entomol*. 51: 467-494.
- Morse SS. 2001. Factors in the Emergence of Infectious Diseases. En: Price-Smith AT, Plagues and Politics. Global Issues Series. p 8-26. Ed. Palgrave Macmillan, London.
- Narosky T, Yzurieta D. 2003 *Aves de Argentina y Uruguay: Guía para la Identificación*. Vazquez Mazzini Editores, Buenos Aires.
- Nava S, Elshenawy Y, Eremeeva ME, Sumner JW, Mastropaolo M, Paddock CD. 2008. *Rickettsia parkeri* in Argentina. *Emerg Infect Dis*. 14: 1894.
- Nava S, Guglielmone AA, Mangold AJ. 2009a. An overview of systematics and evolution of ticks. *Front Biosci*. 14: 2857-2877.
- Nava S, Estrada-Peña A, Mangold AJ, Guglielmone AA. 2009b. Ecology of *Amblyomma neumanni* (Acari: Ixodidae). *Acta Trop*. 111: 226-236.
- Nava S, Mangold AJ, Guglielmone AA. 2009c. Seasonal distribution of larvae and nymphs of *Amblyomma tigrinum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol*. 166: 340-342.
- Nava S, Venzal JM, Labruna MB, Mastropaolo M, González EM, Mangold AJ, Guglielmone AA. 2010. Hosts, distribution and genetic divergence (16S rDNA) of *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol*. 51: 335-351.
- Nava S, Mastropaolo M, Venzal JM, Mangold AJ, Guglielmone AA. 2012. Mitochondrial DNA Analysis of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) in the Southern Cone of South America. *Vet Parasitol*. 190: 547-555.

- Nava S, Guglielmone AA. 2013 A meta-analysis of host specificity in Neotropical hard ticks (Acari: Ixodidae). *Bull Entomol Res.* 103: 216–224.
- Nava S, Venzal JM, González-Acuña D, Martins TF, Guglielmone AA. 2017. Ticks of the Southern Cone of America. Diagnosis, Distribution, and Hosts with Taxonomy, Ecology and Sanitary Importance. Academic Press. London. p. 348.
- Nava S, Beati L, Venzal JM, Labruna MB, Szabó MPJ, Petney T, Saracho-Bottero MN, Tarragona EL, Dantas-Torres F, Santos Silva MM, Mangold AJ, Guglielmone AA, Estrada-Peña A. 2018. *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806): Neotype designation, morphological re-description of all parasitic stages and molecular characterization. *Ticks Tick Borne Dis.* 9: 1573-1585.
- Nieri-Bastos FA, Horta MC, Barros-Battesti DM, Moraes-Filho J, Ramirez DG, Martins TF, Labruna MB. 2016. Isolation of the pathogen *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest from its presumed tick vector, *Amblyomma ovale* (Acari Ixodidae), from two areas of Brazil. *J Med Entomol.* 53: 977–981.
- Nieri-Bastos FA, Marcili A, De Sousa R, Paddock C, Labruna MB. 2018. Phylogenetic evidence for the existence of multiple strains of *Rickettsia parkeri* in the New World. *Appl Environ Microbiol.* 84 e02872-17.
- Nuñez JL, Cobeñas MEM, Moltedo HL. 1982. *Boophilus microplus*: la garrapata común del ganado vacuno. Ed. Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina. p. 184.
- Ogden NH, Casey ANJ, Lawrie C, French NP, Woldehiwet Z, Carter SD. 2002. IgG responses to salivary gland extract of *Ixodes ricinus* ticks vary inversely with resistance in naturally exposed sheep. *Med Vet Entomol.* 16: 186–192.
- Ogden NH, Bigras-Poulina M, O’Callaghan CJ, Barker IK, Lindsay LR, Maarouf A, Smoyer-Tomic KE, Waltner-Toews D, Charron D. 2005 A dynamic population model to investigate effects of climate on geographic range and seasonality of the tick *Ixodes scapularis*. *Int J Parasitol.* 35: 375–389.

- Ollano JP. 2007. Human ehrlichiosis. En: Raoult D, Parola P, Rickettsial diseases. New York, CRC Press. p. 379.
- Onofrio VC, Nieri-Bastos FA, Sampaio JS, Soares JF, Silva MJJ, Barros-Battesti DM. 2013. Noteworthy records of *Ixodes schulzei* (Acari: Ixodidae) on rodents from the State of Parana, Southern Brazil. Rev Bras Parasitol Vet. 22: 159–161.
- Oorebeek M, Kleindorfer S. 2008. Climate or host availability: what determines the seasonal abundance of ticks?. Parasitol Res. 103: 871-875.
- Oscherov EB, Milano AMF, Lobo B, Anda P, Escudero R. 2011. Detection of *Anaplasma platys* and other pathogens in ectoparasites from urban hosts in Northeast Argentina. Rev Ibero-Latinoam Parasitol. 70: 42-48.
- Pacala SW, Dobson AP. 1988. The relation between the number of parasites/host and host age: population dynamics causes and maximum likelihood estimation. Parasitol. 96: 197-210.
- Paddock CD, Childs JE. 2003. *Ehrlichia chaffeensis*: a prototypical emerging pathogen. Clin Microbiol Reviews. 16: 37-64.
- Paddock CD, Koss T, Eremeeva ME, Dasch GA, Zaki SR, Sumner JW. 2006. Isolation of *Rickettsia akari* from eschars of patients with rickettsialpox. Am J Trop Med Hyg. 75: 732-738.
- Paddock CD, Fernandez S, Echenique GA, Sumner JW, Reeves WK, Zaki SR, Remondégui CE. 2008. Rocky Mountain spotted fever in Argentina. Am J Trop Med Hyg. 78: 687-692.
- Palomar AM, Portillo A, Santibáñez P, Mazuelas D, Roncero L, García-Álvarez L, Santibáñez S, Gutiérrez O, Oteo JA. Detection of tick-borne *Anaplasma bovis*, *Anaplasma phagocytophilum* and *Anaplasma centrale* in Spain. Med Vet Entomol. 29: 349-353.

- Parola P, Roux V, Camicas JL, Baradji I, Brouqui P, Raoult D. 2000. Detection of ehrlichiae in African ticks by polymerase chain reaction. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 94: 707-708.
- Parola P, Paddock CD, Raoult D. 2005a. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin Microbiol Rev.* 18: 719-756.
- Parola P, Davoust B, Raoult D. 2005b. Tick-and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Vet Res.* 36: 469-492.
- Parola P, Paddock CD, Socolovschi C, Labruna MB, Mediannikov O, Kernif T, Abdad MY, Stenos J, Bitam I, Fournier PE, Raoult D. 2013. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin Microbiol Rev.* 26: 657-702.
- Patterson BD, Dick CW, Dittmar K. 2008. Parasitism by bat flies (Diptera: Streblidae) on neotropical bats: effects of host body size, distribution, and abundance. *Parasitol Res.* 103: 1091-1100.
- Perez M, Bodor M, Zhang C, Xiong Q, Rikihisa Y. 2006. Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. *Ann N Y Acad Sci.* 1078: 110-117.
- Piesman J. 1991. Experimental acquisition of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, by larval *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) during partial blood meals. *J Med Entomol.* 28: 259-262.
- Pinter A, Labruna MB. 2006. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. *Ann N Y Acad Sci.* 1078: 523-529.
- Plací G, Di Bitetti M. 2005. Situación ambiental en la Ecorregión del Bosque Atlántico del Alto Paraná (Selva Paranaense). Una visión de biodiversidad para la Ecorregión del Bosque Atlántico del Alto Paraná: Diseño de un Paisaje para la

Conservación de la Biodiversidad y Prioridades para las Acciones de Conservación, p. 197–225. World Wildlife Fund, Washington, DC.

Popov VL, Han VC, Chen SM, Dumler JS, Feng HM, Andreadis TG, Tesh RB, Walker DH. 1998. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. *J Med Microbiol.* 47: 235-251.

Posada D, Crandall KA. 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics.* 14: 817-818.

R Core Team. 2017. R: A Language and Environment for Statistical Computing. URL. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org>

Randolph SE. 2000. Ticks and tick-borne disease systems in space and from space. *Adv Parasitol.* 47: 217-243.

Randolph SE, Dobson ADM. 2012. Pangloss revisited: a critique of the dilution effect and the biodiversity-buffers-disease paradigm. *Parasitology.* 139: 847-863.

Raoult D, Parola P. 2007. Rickettsias diseases. Informa Healthcare. London. 379 p.

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

Reiczigel J, Rózsa L. 2005. Quantitative Parasitology 3.0. Budapest. Distributed by the authors.

Reisen WK. 2002. Epidemiology of vector-borne diseases. *Medical and Veterinary Entomology.* p. 19-34. Academic Press, Boston, MA.

Reisen WK. 2009. Epidemiology of vector-borne diseases. En: Mullen GR, Durden LA, *Medical and Veterinary Entomology.* p. 18-32. Academic Press, Boston, MA.

Renvoisé A, Mediannikov O, Raoult D. 2009. Old and new tick-borne rickettsioses. *Int Health.* 1: 17-25.

- Ripoll CM, Remondegui CE, Ordonez G, Arazamendi R, Fusaro H, Hyman MJ, Paddock CD, Zaki SR, Olson JG, Santos-Buch CA. 1999. Evidence of rickettsial spotted fever and ehrlichial infections in a subtropical territory of Jujuy, Argentina. *Am J Trop Med Hyg.* 61: 350–354.
- Rivas JJ, Moreira-Soto A, Alvarado G, Taylor L, Calderón-Arguedas O, Hun L, Corrales-Aguilar E, Morales JA, Troyo, A. 2015. Pathogenic potential of a Costa Rican strain of '*Candidatus Rickettsia amblyommii*' in guinea pigs (*Cavia porcellus*) and protective immunity against *Rickettsia rickettsii*. *Ticks Tick Borne Dis.* 6: 805-811.
- Romer Y, Seijo AC, Crudo F, Nicholson WL, Varela-Stokes A, Lash RR, Paddock CD. 2011. *Rickettsia parkeri* rickettsiosis, Argentina. *Emerg Infect Dis.* 17: 1169.
- Romer Y, Nava S, Govedic F, Cicuttin G, Denison AM, Singleton J, Kelly AJ, Cato CY, Paddock CD. 2014. *Rickettsia parkeri* rickettsiosis in different ecological regions of Argentina and its association with *Amblyomma tigrinum* as a potential vector. *Am J Trop Med Hyg.* 91: 1156-1160.
- Roux V, Fournier PE, Raoult D. 1996. Differentiation of spotted fever group rickettsiae by sequencing and analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA of the gene encoding the protein rOmpA. *J Clin Microbiol.* 34: 2058–2065.
- Roux V, Rydkina E, Ereemeeva M, Raoult D. 1997. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. *Int J Syst Bacteriol.* 47: 252–261.
- Roux V, Raoult D. 2000. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB). *Int J Syst Evol Microbiol.* 50: 1449-1455.
- Sacchi ABV, Duarte JMB, André MR, Machado RZ. 2012. Prevalence and molecular characterization of Anaplasmataceae agents in free-ranging Brazilian marsh

- deer (*Blastocercus dichotomus*). *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 35: 325-334.
- Sahni SK, Narra HP, Sahni A, Walker DH. 2013. Recent molecular insights into rickettsial pathogenesis and immunity. *Future Microbiol.* 8: 1265-1288.
- Sakai RK, Costa FB, Ueno TE, Ramirez DG, Soares JF, Fonseca AH, Labruna MB, Barros-Battesti DM. 2014. Experimental infection with *Rickettsia rickettsii* in an *Amblyomma dubitatum* tick colony, naturally infected by *Rickettsia bellii*. *Ticks Tick Borne Dis.* 5: 917-923.
- Santos F, Coppede JS, Pereira AL, Oliveira LP, Roberto PG, Benedetti RB, Zucoloto LB, Lucas F, Sobreira L, Marins M. 2009. Molecular evaluation of the incidence of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys* and *Babesia* spp. in dogs from Ribeirão Preto, Brazil. *Vet J.* 179: 145-148.
- Santos HA, Thomé SM, Baldani CD, Silva CB, Peixoto MP, Pires MS, Vitari GLV, Costa RL, Santos TM, Angelo IC, Santos LA, Faccini JLH, Massard CL. 2013. Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil. *Parasit Vectors.* 6: 348.
- Saracho Bottero MN, Tarragona EL, Nava S. 2015. Spotted fever group rickettsiae in *Amblyomma* ticks likely to infest humans in rural areas from northwestern Argentina. *Medicina (B Aires).* 75: 391-395.
- Saracho-Bottero MN, Tarragona EL, Sebastian PS, Venzal JM, Mangold AJ, Guglielmone AA, Nava S. 2018. Ticks infesting cattle and humans in the Yungas Biogeographic Province of Argentina, with notes on the presence of tick-borne bacteria. *Exp Appl Acarol.* 74: 107-116.
- Schroeder C, Chowdhury I, Narra H, Patel J, Sahni A, Sahni S. 2016. Human Rickettsioses: Host Response and Molecular Pathogenesis. En: Thomas S, *Rickettsiales Biology, Molecular Biology, Epidemiology and vaccine development.* p. 399-446. Springer International Publishing, Switzerland.

- Sebastian PS, Tarragona EL, Bottero MNS, Mangold AJ, Mackenstedt U, Nava S. 2017. Bacteria of the genera *Ehrlichia* and *Rickettsia* in ticks of the family Ixodidae with medical importance in Argentina. *Exp Appl Acarol.* 71: 87-96.
- Silva N, Eremeeva ME, Rozental T, Ribeiro GS, Paddock CD, Ramos EAG, Favacho ARM, Reis MG, Dasch GA, de Lemos ERS, Ko AI. 2011. Eschar-associated spotted fever rickettsiosis, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 17: 275–278.
- Silveira JA, Valente PC, Paes PR, Vasconcelos AV, Silvestre BT, Ribeiro MF. 2015. The first clinical and laboratory evidence of co-infection by *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in a Brazilian dog. *Ticks Tick Borne Dis.* 6: 242-245.
- Sinkoc AL, Brum JGW, Moraes W, Crawshaw P. 1998. Ixodidae parasitos de animais silvestres na região de Foz de Iguaçu, Brasil e Argentina. *Arq Inst Biol (Sao Paulo).* 65: 29–33.
- Sobrino R, Millán J, Oleaga Á, Gortázar C, de la Fuente J, Ruiz-Fons F. 2012. Ecological preferences of exophilic and endophilic ticks (Acari: Ixodidae) parasitizing wild carnivores in the Iberian Peninsula. *Vet Parasitol.* 184: 248-257.
- Sonenshine DE. 1991. *Biology of ticks. Volumen 1.* Oxford University Press. New York. p. 447.
- Sonenshine DE, Lane RS, Nicholson WL. 2002. Ticks (Ixodida). En: Gary M y Lance D, *Medical and veterinary entomology.* p. 517-558. Ed. Elsevier Science, UK.
- Sonenshine DE, Roe RM. 2014. *Biology of Ticks. Volumen 1.* Oxford University Press. Oxford.
- Souza CE, Moraes-Filho J, Ogrzewalska M, Uchoa FC, Horta MC, Souza SS, Borba RCM, Labruna MB. 2009. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. *Vet Parasitol.* 161: 116-121.

- Spolidorio MG, Labruna MB, Mantovani E, Brandão PE, Richtzenhain LJ, Yoshinari NH. 2010. Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 16: 521–523.
- Stich RW, Kocan KM, Palmer GH, Ewing SA, Hair JA, Barron SJ. 1989. Transstadial and attempted transovarial transmission of *Anaplasma marginale* by *Dermacentor variabilis*. *Am J Vet Res.* 50: 1377-1380.
- Stuen S, Granquist EG, Silaghi C. 2013. *Anaplasma phagocytophilum* -a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. *Front Cell Infect Microbiol.* 3: 31.
- Szabó MPJ, Labruna MB, Garcia MV, Pinter A, Castagnolli KC, Pacheco RC, Castro MB, Veronez VA, Magalhaes GM, Vogliotti A, Duarte JM. 2009. Ecological aspects of the free-living ticks (Acari: Ixodidae) on animal trails within Atlantic rainforest in south-eastern Brazil. *Ann Trop Med Parasitol.* 103: 57–72.
- Szabó MPJ, Nieri-Bastos FA, Spolidorio MG, Martins TF, Barbieri AM, Labruna MB. 2013. In vitro isolation from *Amblyomma ovale* (Acari Ixodidae) and ecological aspects of the Atlantic rainforest *Rickettsia*, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. *Parasitology.* 140: 719–728.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol.* 28: 2731-2739.
- Tarragona EL, Cicuttin GL, Mangold AJ, Mastropaolo M, De Salvo MN, Nava S. 2015. *Rickettsia* infection in *Amblyomma tonelliae*, a tick species from the *Amblyomma cajennense* complex. *Ticks Tick Borne Dis.* 6: 173-177.
- Thomas S, Alexander W, Gilligan J, Rikihisa Y. 2016. The Importance of Rickettsiales Infections. En: Thomas S, Rickettsiales. p. 3-21. Springer, Cham.

- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl Acid Res.* 22: 4673-4680.
- Tomassone L, Nuñez P, Gürtler RE, Ceballos LA, Orozco MM, Kitron UD, Farber M. 2008. Molecular detection of *Ehrlichia chaffeensis* in *Amblyomma parvum* ticks, Argentina. *Emerg Infect Dis.* 14: 1953.
- Tomassone L, Nuñez P, Ceballos LA, Gürtler RE, Kitron U, Farber M. 2010. Detection of “*Candidatus Rickettsia* sp. strain Argentina” and *Rickettsia bellii* in *Amblyomma* ticks (Acari: Ixodidae) from Northern Argentina. *Exp Appl Acarol.* 52: 93-100.
- Torioni de Echaide S, Knowles DP, McGuire TC, Palmer GH, Suarez CE, McElwain TF. 1998. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. *J Clin Microbiol.* 36: 777-782.
- Uilenberg G. 1995. International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. *Vet Parasitol.* 57: 19-41.
- Venables WN, Ripley BD. 2002. *Modern Applied Statistics with S.* Springer, New York.
- Vogel H, Foley J, Fiorello CV. 2018. *Rickettsia africae* and novel rickettsial strain in *Amblyomma* spp. ticks, Nicaragua, 2013. *Emerg Infect Dis.* 24: 385–387.
- Walker AR. 2001. Age structure of a population of *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) in relation to its seasonal questing. *Bull Entomol Res.* 91: 69–78.
- Welschen NM, Tarragona EL, Nava S, Guglielmone AA. 2012. Confirmación de la presencia de *Amblyomma Brasiliense* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae) en la Argentina. *FAVE.* 11: 65-69.
- West G, Heard D, Caulkett N. 2007. *Zoo animal and wildlife immobilization and anesthesia.* Blackwell Publishing. Iowa. p. 718.

- Wright CL, Sonenshine DE, Gaff HD, Hynes WL. 2015. *Rickettsia parkeri* transmission to *Amblyomma americanum* by cofeeding with *Amblyomma maculatum* (Acari: Ixodidae) and potential for spillover. J Med Entomol. 52: 1090-1095.
- Yabsley MJ. 2010. Natural history of *Ehrlichia chaffeensis*: vertebrate hosts and tick vectors from the United States and evidence for endemic transmission in other countries. Vet Parasitol. 167: 136-148.
- Zimmer PA, Ruybal P, Torioni de Echaide S, Späth E, Pérez A, Farber M. 2010. Variabilidad genética de *Anaplasma marginale* en el Noroeste de Entre Ríos. XVIII Reunión Científico Técnica de la Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico (AAVLD). Mercedes, Corrientes. p. 92.

ANEXO 1. Número de garrapatas colectadas sobre *Nasua nasua* y *Didelphis aurita* en el Parque Nacional Iguazú. j: juvenil; a: adulto; H: hembra; M: macho.

Especie hospedadora	Estación	Sitio	Edad	Sexo	Peso (kg)	<i>Amblyomma brasiliense</i>			<i>Amblyomma coelebs</i>		<i>Amblyomma ovale</i>				<i>Haemaphysalis juxtakochi</i>					
						Larvas	Ninfas	Machos	Larvas	Ninfas	Larvas	Ninfas	Hembras	Machos	Larvas	Ninfas				
<i>Nasua nasua</i>	Verano	CIES	j	H	0,6				1	7			1				1			
			a	H	5,4				39	17					18		1			
				a	H	4				58	25				1	1				
	Otoño	Estación Cataratas	a	H	5,5						6				1		2			
			a	H	4						2									
			a	H	4,5			1			4	2								
			a	H	4,5			2			5	5			1					
			j	H	1,6							1								
			j	H	2,5							1	2							
			j	H	1,6							5								
			j	H	2							4								
			j	H	2							6							2	
			a	H	1,9							8								
			a	H	4,5							1					2		1	
			a	H	4,3					1		2								
			a	M	5,5							14								
			Invierno	Estación Cataratas	a	M	5						4							
					a	H	3,3						1							
					a	M	3,7							2						
	a	H			3,4							2								
	a	H			3,7							4								
	a	H			4,2					1		3							1	
	a	M			4,6					1		9				1	6		1	
	a	H			4							4				1	1			
	j	H			2							3								
	j	M			2,2							2						2		
	a	M			5,5							1	13					2		
	a	H			3,3													1		
	a	M			4								1							
	a	M			3,4															
	a	H			3,4								16					2		
	a	H			3,4								1							
	a	M	4,2						1		6					1				
	a	M	4,4								2									
	a	M	5,3								8			1	4		1			
	Primavera	Estación Cataratas	a	M	5						2					1				
j			H	2,8								1								
a			H	3,8																
a			M	3,7								1								
a			H	3,6																
a			H	2,8																
a			H	4									2				1			
a			M	5,5												3	1			
a		M	6												1	1				
j		M	2,4								2						1			
j		H	2,6								1						1			
j		M	2,8								2				1		1			
j		H	2,5								15						2			
J		M	2,3								1					1				
J		M	2,7								5						1			
J		H	2,6								3				1	2				
J	M	2,3								5						1				
J	M	2,5								4			1							
J	H	2,6								4										
J	H	2,5								12						1				

Tabla Anexo 1.
(continuación)

Especie hospedadora	Estación	Sitio	Edad	Sexo	Peso (kg)	<i>Amblyomma brasiliense</i>			<i>Amblyomma coelebs</i>		<i>Amblyomma ovale</i>				<i>Haemaphysalis juxtakochi</i>				
						Larvas	Ninfas	Machos	Larvas	Ninfas	Larvas	Ninfas	Hembras	Machos	Larvas	Ninfas			
<i>Nasua nasua</i>	Invierno	Estación Cataratas	a	M	5,7					1									
			a	H	4,6						4								
			j	H	2				1										
			j	M	2,1														
			j	H	1,9														
			j	H	1,5														
			j	H	1,6													1	
			j	H	1,9						1	1	1	1					
			a	M	4,9						1		2						
			a	M	4,8														
			j	M	2							1	3					1	
			j	M	2														
			a	H	4,2														
			a	H	4														
			a	H	4,9														
			a	H	4,5														
			a	H	3,4							4	7						
	a	M	6,2								1								
	a	H	3,6							1	5								
	Otoño	Dos Hermanas		a	H	5													
				j	M	2,2													
				j	M	2,4													
				a	H	4,3													
				a	M	5,9								5					
				a	M	5,5								3					
		Estación Cataratas		a	H	4,1													
				j	H	1,9													2
				a	H	4,1													1
				a	H	4,1													
a				H	4,1														
a				H	3,2						1		2						
CIES Garganta		a	M	6,5															
		a	H	3,3															
		a	H	4,3															
		a	M	3,9					1		2	15					2		
		a	H	3,9					2		2	11					1		
		a	M	5,5								1							
Verano	Viejo Hotel		a	H	3,9						3	24							
			a	H	3,6						1	1	39				1	1	
			a	H	4														
			a	M	1,2								14	4					
			a	M	0,9								3	1					
			a	H	0,6								2	3				2	
	Otoño	Apepú		a	M	0,4						2	16						
				a	H	0,8								2					
				a	H	1								6	76				
				a	M	0,8								2	69				
				a	M	0,9								2	38				
				a	H	0,8								2	62				
Invierno	CIES		a	H	1														
			a	H	1														
			a	M	0,8														
			a	M	0,9														
			a	H	0,8														
			a	H	1						1								
	Primavera	CIES		a	H	0,8													
				a	H	0,6													
				a	H	0,6											1		
				a	H	0,6													
				a	M	0,4										17			
				a	H	1													
Verano	Apepú		a	H	1,3														
			a	H	1														
			a	M	1														
			a	H	0,4														
			a	M	1														
			a	M	0,3														
Primavera	Apepú		a	M	1,2														
			a	M	0,8														
			a	H	0,6														
			a	H	1,1														
			a	H	0,8														
			a	M	1														

ANEXO 2: Trabajos publicados en relación al estudio eco-epidemiológico de las garrapatas del norte de Misiones

- ~ Lamattina D, Nava S. 2016. Ticks infesting humans in northern Misiones, Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*. 76: 89-92.
- ~ Lamattina D, Venzal JM, Guglielmone AA, Nava S. 2016. *Ixodes schulzei* Aragão & Fonseca, 1951 in Argentina. *Systematic and Applied Acarology*. 21: 865-867.
- ~ Lamattina D, Venzal JM, Costa SA, Arrabal JP, Flores S, Berrozpe PE, González-Acuña D, Guglielmone AA, Nava S. 2018. Ecological characterization of a tick community across a landscape gradient exhibiting differential anthropogenic disturbance in the Atlantic Forest ecoregion in Argentina. *Medical and veterinary entomology*. <https://doi.org/10.1111/mve.12295>
- ~ Lamattina D, Costa SA, Arrabal JP, Venzal JM, Guglielmone AA, Nava S. 2018. Factors associated with hard tick (Acari: Ixodidae) parasitism in medium-sized mammals in the Atlantic Rainforest region of Argentina. *Ticks and tick-borne diseases*. 9: 1451-1458.
- ~ Lamattina D, Tarragona EL, Nava S. 2018. Molecular detection of the human pathogen *Rickettsia parkeri* strain Atlantic rainforest in *Amblyomma ovale* ticks in Argentina. *Ticks and tick-borne diseases*. 9: 1261-1263.