

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL

Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de Doctor en Ciencias Biológicas

“ECOEPIDEMIOLOGÍA DE *RICKETTSIA PARKERI*

EN EL DELTA DEL PARANÁ”

Valeria Carolina Colombo

Director: Pablo M. Beldomenico

Co-Director: Santiago Nava

Laboratorio de Ecología de Enfermedades, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral,

UNL-CONICET

- 2016 -

ÍNDICE

1. Abreviaturas y símbolos.....	3
2. Resumen y abstract.....	5
3. Agradecimientos.....	8
4. Introducción general	9
4.1 <i>Rickettsia parkeri</i> . Aspectos generales.....	9
4.2 <i>Amblyomma triste</i> . Aspectos generales.....	14
5. Objetivos	18
5.1 Objetivos generales.....	18
5.2 Objetivos específicos.....	18
6. Capítulo 1: Aportes a la ecología de <i>Amblyomma triste</i> en el Delta del Paraná.....	19
6.1 Introducción.....	20
6.2 Objetivos.....	20
6.3 Materiales y métodos	21
6.3.1 Área de estudio.....	21
6.3.2 Diseño de muestreo	22
6.3.3 Toma de muestras.....	25
6.3.4 Análisis de las muestras.....	27
6.3.5 Análisis de datos.....	27
6.4 Resultados.....	32
6.4.1 Comunidad de ectoparásitos de roedores sigmodontinos del Delta del Paraná.....	32
6.4.2 Factores extrínsecos e intrínsecos asociados a la abundancia de <i>Amblyomma triste</i> en sus hospedadores sigmodontinos	39
6.5 Discusión.....	53
6.5.1 Fauna ectoparasítica de roedores sigmodontinos del Delta del Paraná.....	53
6.5.2 Abundancia de estadios inmaduros de <i>Amblyomma triste</i> en dos especies de roedores sigmodontinos del Delta del Paraná	54
6.5.3 Factores del hospedador y del ambiente que influyen en la	

abundancia media de larvas y ninfas de <i>Amblyomma triste</i> en <i>Akodon azarae</i>	56
7. Capítulo 2: <i>Rickettsia parkeri</i> en roedores sigmodontinos del Delta del Paraná.....	64
7.1 Introducción.....	65
7.2 Objetivos.....	65
7.3 Materiales y métodos.....	66
7.4 Resultados.....	72
7.5 Discusión	77
8. Conclusiones generales.....	79
9. Bibliografía.....	84

1. ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

%	Porcentaje
A260	Absorbancia a 260 nm
A280	Absorbancia a 280 nm
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIC	Akaike information criteria
°C	Centígrado
cm	Centímetro
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético
Ej.	Ejemplo
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
Ig	Inmunoglobulina
g	Gramo
GR	Glóbulos rojos
GB	Glóbulos blancos
κ	Índice Kappa
kDa	Kilo Dalton
m	Metro
M	Molaridad
mA	Mili Ampere
min	Minuto
ml	Mililitro
mg	Milímetro
Mm	Milímetro
mmHg	Milímetros de mercurio
mM	Milimolar
NaAc	Acetato de sodio

ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
nM	Nanomolar
pb	Pares de bases
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial hidrógeno
pM	Picomolar
rpm	Revoluciones por minuto
QAIC	Quasi - Akaike information criteria
seg	Segundo
SDS	Dodecilsulfato sódico
TAE	Solución tampón tris-acético-EDTA
Tris-hcl	Tris(hidroximetil)aminometano-hidrocloruro
UV	Ultravioleta
μl	Microgramo
μl	Microlitro
μm	Micrómetro

2. RESUMEN

Rickettsia parkeri forma parte de los patógenos que integran el grupo de las fiebres manchadas transmitidas principalmente por garrapatas del “Grupo de *Amblyomma maculatum*”. En Argentina se detectaron casos humanos en las provincias de Córdoba y la Rioja transmitidos por *Amblyomma tigrinum*, y en Chaco, Entre Ríos y Buenos Aires por *Amblyomma triste*, jugando esta especie de garrapata un rol fundamental en la ecoepidemiología de este patógeno en la región. Poco se sabe tanto de la ecología de *R. parkeri* como de *A. triste*, a pesar de que conocer los aspectos ecológicos de ambos es fundamental a la hora de comprender la dinámica de la fiebre manchada producida por *R. parkeri* y así poder evaluar situaciones de riesgo para la salud pública. En la eco-región Delta e Islas del Paraná, los estadios inmaduros de *A. triste* se encuentran parasitando principalmente roedores sigmodontinos, mientras que los estadios adultos se encuentran en mamíferos silvestres de mayor tamaño así como en animales domésticos y humanos. En la presente tesis se estudió la fauna de los ectoparásitos de roedores sigmodontinos del Delta del Paraná, con énfasis en garrapatas. Por otro lado, se evaluó qué factores influyen en el parasitismo de los estadios inmaduros de *A. triste* en sus hospedadores sigmodontinos así como el rol de estos en la ecoepidemiología de *R. parkeri*.

Como resultados principales pueden mencionarse el hallazgo de diversas familias y especies de garrapatas, ácaros, pulgas y piojos que parasitan a los roedores silvestres del área de estudio, reportando primeros registros para las asociaciones *A. triste* - *Holochilus brasiliensis* e *Ixodes loricatus* – *H. brasiliensis*. Entre los factores ambientales estudiados se encontró que los estadios inmaduros de *A. triste* tienen una distribución estacional a lo largo del año con abundancias más elevadas en verano, y que esta distribución dependió de las condiciones ambientales dadas por la cantidad de precipitaciones, valores de temperatura mínima y déficit de saturación. La presencia de ganado fue otro de los factores que se asociaron positivamente a la abundancia de *A. triste* en roedores sigmodontinos; dependiendo la magnitud de esta asociación de la densidad de roedores en el caso de las larvas, así como también se encontraron mayores abundancias de larvas de *A. triste* en roedores en ambientes de bosques implantados ante la co-infestación con *I. loricatus*. Otro de los factores significativos hallados en el presente trabajo fue la co-infestación con otros ectoparásitos, tanto larvas como ninfas de *A. triste* se correlacionaron positivamente con la co-infestación con *I. loricatus*, siendo esta la interacción más relevante encontrada en el presente trabajo. También fueron significativas las asociaciones entre larvas de *A. triste* y pulgas y piojos. Factores intrínsecos al hospedador como la especie, sexo, condición corporal, largo del cuerpo y títulos de anticuerpos naturales también se encontraron asociados en

diferente medida a la abundancia de *A. triste*, siendo uno de los hallazgos más importantes en este aspecto la gran abundancia media de *A. triste* detectada en *Oxymycterus rufus*, convirtiéndolo en un hospedador muy relevante para el vector de *R. parkeri*.

En cuanto a la detección de *R. parkeri* a partir de tejidos de roedores sigmodontinos, si bien no pudo ser aislado ADN de *R. parkeri* a partir de las muestras analizadas, se detectaron individuos seropositivos a esta bacteria, siendo nuevamente *O. rufus* la especie que presentó los valores más elevados de seroprevalencia. También se encontró que aquellos roedores que tuvieron las mayores cargas de *A. triste* tuvieron una mayor probabilidad de ser seropositivos a *R. parkeri*.

El presente estudio permitió conocer cuáles son los factores ambientales, del hospedador y el efecto de la co-infestación con otros ectoparásitos que están asociados y podrían influir en la abundancia media de los estadios inmaduros de *A. triste* en los roedores sigmodontinos estudiados. También permitió conocer que la especie de roedor que actúa como principal hospedador de *A. triste* en el área de estudio es *O. rufus*, siendo además la especie que presentó los niveles más elevados de seroprevalencia de *R. parkeri*, pudiendo entonces cumplir un rol principal en la dinámica y distribución de este patógeno en el Delta del Paraná.

El hecho de conocer qué factores están implicados en las mayores abundancias de *A. triste* nos permite predecir qué zonas pueden ser más o menos propensas a la presencia de *A. triste*. Cabe destacar la importancia de considerar el efecto positivo que genera la presencia de ganado bovino sobre la abundancia de *A. triste* a la hora de planificar el asentamiento de explotaciones ganaderas en regiones donde está presente *R. parkeri*. Futuros estudios experimentales que evalúen la potencialidad de *O. rufus* como amplificador de *R. parkeri* y los mecanismos por los cuales representa un importante hospedador de *A. triste*, permitirán dilucidar aquellos aspectos de la interacción *A. triste* - *O. rufus* - *R. parkeri* que no han podido ser comprendidos mediante el presente estudio observacional.

Abstract

Rickettsia parkeri rickettsioses is a member of the Spot Fever Group. In Argentina, human cases were detected in Córdoba and La Rioja provinces transmitted by *Amblyomma tigrinum*, and in Chaco, Entre Ríos and Buenos Aires by *Amblyomma triste*, being this tick species very relevant in the ecoepidemiology of *R. parkeri* in the region. Very little is known about the ecology of *R. parkeri* and *A. triste* despite of their importance on the ecoepidemiology of this rickettsiosis. In the eco-region Delta y

Islas del Paraná, the immature stages of *A. triste* generally parasitizes sigmodontine rodents, while adult stages parasitizes bigger wild mammals as well as domestic animals, as cattle, and people. In the present thesis the ectoparasites of sigmodontine rodents of the Paraná Delta had been studied, specially their tick communities. Besides, the variables that could be associated with the abundance of *A. triste* immature stages in their sigmodontine hosts and the role of these rodents in the ecoepidemiology of *R. parkeri* were evaluated.

Different families and species of ticks, mites, lice and fleas were found parasitizing the wild rodents studied, while the associations *A. triste* – *Holochilus brasiliensis* and *Ixodes loricatus* – *H. brasiliensis* were not registered before. Regarding the environmental variables explored, season had a strong influence for both larvae and *A. triste* nymphs with the greatest records in summer. *A. triste* larvae burdens were also associated with levels of precipitations, minimum temperatures and saturation deficit. The presence of cattle was positive associated with *A. triste* burdens in rodents, but for larvae this association depended on rodent abundance. The same kind of association was found for rodents co-infested with *I. loricatus* in implanted forest. Co-infestation with other ectoparasites was another relevant variable in the ecology of *A. triste*; larvae and nymphs of *A. triste* were associated with burdens of *I. loricatus*, lice and fleas. Concerning host factors, host species, sex, body condition, body length and natural antibodies were correlated in different ways with *A. triste*, being one of the most relevant findings the association between *A. triste* burdens and rodent species, in which *Oxymycterus rufus* had the greatest burdens.

On the other hand, *R. parkeri* DNA was not successfully amplified from rodents tissues, but many individuals were found seropositive to *R. parkeri*, being again *O. rufus* the species with greater seroprevalence.

In the present study environmental and host variables, as well as co-infestation with other ectoparasites, were found to be correlated with immature stages of *A. triste* burdens. Besides, this study revealed that the main host of immature stages of *A. triste* in the study area is *O. rufus*, being this species the one with highest *R. parkeri* seroprevalence as well.

Summarizing, the knowledge of the factors that are associated with higher burdens of *A. triste* in their rodent hosts let us predict which areas are more or less prone to the development of *A. triste*. It is worth highlighting the positive association between *A. triste* burdens and the presence of cattle, fact that should be taken into account when planning to perform livestock production in *R. parkeri* endemic areas. Further studies that explore deeply the interaction between *A. triste* - *O. rufus* - *R. parkeri* are needed to better understanding *R. parkeri* ecology.

3. AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis directores de tesis y beca doctoral Pablo Beldomenico, Santiago Nava y Alberto Guglielmone por confiar, darme la oportunidad, el espacio, tiempo, conocimientos y apoyo durante estos casi 5 años.

Al CONICET por el apoyo económico mediante las dos becas que me otorgaron estos años sin la cuales no hubiera podido realizar mi doctorado.

A la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas de la UNL que me aceptaron como estudiante de doctorado de esta casa de estudios y siempre atendieron a todas mis dudas y necesidades.

Al Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (UNL-CONICET) y la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNL por brindarme el espacio físico y equipamiento necesarios siempre.

Al INTA Delta (Natalia Fracassi, Jerardo Mujica, Cristian Ortiz, Ignacio Gamietea) por brindarnos el espacio y apoyo logístico para desarrollar los muestreos de esta tesis.

A Marcela Lareschi, Ulyses Pardiñas y Carolina Thompson por recibirme siempre en sus lugares de trabajo y brindarme ayuda para la determinación de ectoparásitos, especies de roedores y técnicas de biología molecular.

Al Museo de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia por su donación para el dermestario.

A todos mis compañeros del LEcEn por su ayuda, mates, risas y oídos.

A Fernando Carmona, Pamela Colombo, Farofa Colombo Carmona, mi familia y amigos por el apoyo y amor.

4. INTRODUCCIÓN GENERAL

4.1 *Rickettsia parkeri*. Aspectos generales

Las rickettsias son bacterias del phylum *Proteobacteria*, subclase alfa-1 del orden *Rickettsiales*, familia *Rickettsiaceae* género *Rickettsia* (Weiss y Dasch, 1991; Dumler y col., 2001). El primero en encontrar y describir a esta bacteria fue el microbiólogo norteamericano Howard Ricketts, quien descubrió al agente causal de la fiebre manchada de las Montañas Rocosas, *Rickettsia rickettsii* en Estados Unidos (Ricketts, 1906). Estos microorganismos son cocobacilos Gram negativos de 0,6 a 1,2 µm de crecimiento intracelular obligado, parasitan el citoplasma de forma libre con un tropismo en general por las células endoteliales, generando daño endotelial con la consecuente vasculitis de pequeños y medianos vasos (Raoult y Roux 1997; Milstone y Dumler, 2009; Mansueto y col., 2012; Uchiyama, 2012). Son clasificadas como Gram negativas por las características de sus componentes de membrana pero no se tiñen correctamente con la mencionada tinción, pudiéndose poner de manifiesto mediante la tinción de Giménez, Giemsa y naranja de acridina (Raoult, 2010; Walker, 2010). No crecen en medios de cultivo convencionales, por lo que se utilizan animales de laboratorio, huevos embrionados o líneas celulares como Vero, HEL, L-929 o líneas celulares de artrópodos para su desarrollo (Kelly y col., 1991; Paddock y col., 2004, 2005; Kurtti y col., 2005; Milstone y Dumler 2009; Monje y col., 2014). Para su detección se utilizan algunas de sus proteínas mayores de superficie, como OmpA (190 kDa) y OmpB (135 kDa), por medio de técnicas serológicas (como la inmunofluorescencia indirecta) y reacción de polimerasa en cadena (PCR) (ej., Regnery y col., 1991; Eremeeva y col., 2003; Labruna y col., 2004; Paddock y col., 2004; Paddock y col., 2008a).

Filogenéticamente las rickettsias pueden clasificarse en el grupo de las bacterias que causan las fiebres manchadas (*Rickettsia conorii*, *Rickettsia massiliae*, *Rickettsia parkeri*, *R. rickettsii*, entre otras), grupo del tifus (*Rickettsia prowazekii* y *Rickettsia typhi*), grupo transicional (*Rickettsia akari*, *Rickettsia australis* y *Rickettsia felis*) y grupo ancestral (*Rickettsia belli* y *Rickettsia canadensis*) (Gillespie y col., 2007; Mansueto y col., 2012).

En Argentina fueron detectadas hasta la fecha 9 especies de rickettsias de las cuales *R. parkeri*, *R. rickettsii*, *R. massiliae*, *Candidatus "Rickettsia amblyommii"*, *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest

y *Candidatus* “*R. andeanae*” pertenecen al grupo de las fiebres manchadas y son transmitidas por garrapatas. Los registros de las distintas especies de rickettsias detectadas en Argentina incluyen localidades de las provincias de Jujuy, Salta, Chaco, Córdoba, Santiago del Estero, La Rioja, Entre Ríos, Santa Fe y Buenos Aires (Ripoll y col., 1999; Cicuttin y col., 2004; Eremeeva y col., 2006; Labruna y col., 2007a; Pacheco y col., 2007a; Nava y col., 2008b; Paddock y col., 2008b; García-García y col., 2010; Tomassone y col., 2010; Beeler y col., 2011; Cicuttin y col., 2014a,b; Monje y col., 2015a; Tarragona y col., 2015). Conocer la diversidad de las rickettsias de nuestro país permite comprender una arista de la situación actual de este patógeno. En la figura 1 se presenta un mapa de la Argentina con la distribución por provincia de todas las especies de rickettsias que han sido detectadas en nuestro país, ya sea por producir infección en humanos (*R. massiliae*, *R. parkeri*, *R. rickettsii*) y/o por su aislamiento a partir de su vector (*Rickettsia bellii*, *R. massiliae*, *R. parkeri*, *R. rickettsii*, *Candidatus* “*Rickettsia amblyommii*, *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest, *R. felis*, *Candidatus* “*Rickettsia andeanae*”, *Rickettsia* sp. strain El Tunal).

-*Rickettsia parkeri*

Rickettsia parkeri fue aislada por primera vez a partir de garrapatas de la especie *Amblyomma maculatum* colectadas de ganado bovino en Texas, Estados Unidos por Parker y col. (1939). Estos autores inocularon cobayos con el “agente maculatum” y los mismos desarrollaron síndrome febril. Años después fue identificado este agente como una nueva especie de rickettsia designada como *Rickettsia parkeri* (Lackman y col., 1949; Lackman y col., 1965). Su patogenicidad en el hombre fue demostrada en el mismo país a partir del 2004 (Paddock y col., 2004, 2008a; Whitman y col., 2007). Existen también evidencias de la presencia de *R. parkeri* en caninos domésticos de USA (Grasperge y col., 2012a).

En Brasil, *R. parkeri* cepa At24 fue detectada por primera vez en *Amblyomma triste* en el año 2007 en São Paulo (Silveira y col., 2007). Otras cepas filogenéticamente cercanas a *R. parkeri* que fueron detectadas en ese país son: la cepa NOD en garrapatas *Amblyomma longirostre*, *Amblyomma calcaratum*, *Amblyomma nodosum*, la cepa apPR en *Amblyomma parkeri* y la cepa COOPERI en *Amblyomma cooperi* (Labruna y col., 2004; Ogrzewalska y col., 2009; Pacheco y col., 2012; Ogrzewalska y col., 2012, Ogrzewalska y col., 2013). Hasta la fecha, no han sido registrados casos humanos de rickettsiosis producida por *R. parkeri* en Brasil.

En Bolivia, ADN de *R. parkeri* fue aislado a partir de especímenes de *Amblyomma tigrinum* que parasitaban caninos domésticos y a partir de muestras de sangre tomadas de los mismos caninos (Tomassone y col., 2010), sin haberse detectado casos humanos. En Perú fue detectada en *A. maculatum* colectadas de animales domésticos (perros, caballos y cerdos), sin detectarse casos humanos de rickettsiosis (Flores-Mendoza y col., 2013).

En Uruguay *R. parkeri* fue inicialmente confundida con *R. conorii* en pacientes con signología de fiebre manchada, evidencias de picadura de *A. triste* y serología positiva a *R. conorii* (Conti-Diaz y col., 1990; Diaz 2003). En 2004 se confirmó que, en realidad, eran casos de rickettsiosis producidas por *R. parkeri*, siendo el motivo de confusión la existencia de reacciones serológicas cruzadas (Venzal y col., 2004). A partir de ese momento casos de exposición a *R. parkeri* fueron confirmados en humanos por serología (Conti-Diaz y col., 2009) y el más reciente mediante amplificación de ADN rickettsial (Portillo y col., 2013).

En Argentina, el primer caso detectado de rickettsiosis por *R. parkeri* se diagnosticó en un hombre que practicaba actividades de apicultura en Otamendi, partido de Campana, provincia de Buenos Aires (Seijo y col., 2007). Luego de ser parasitado por una garrapata de la especie *A. triste* presentó la signología característica de la enfermedad y serología positiva a *R. rickettsii*, la cual fue considerada una reacción cruzada con *R. parkeri* dada la ubicación geográfica y presencia de *A. triste* en el área (Guglielmone y Nava, 2006; Seijo y col., 2007). Estudios posteriores a la detección de este caso, demostraron la presencia de *R. parkeri* en especímenes de *A. triste* del delta del Paraná y de áreas cercanas a Bahía de Samborombón, identificando a la cepa At 24 (Nava y col., 2008a; Cicuttin y Nava, 2013, Monje y col., 2014). Nuevos casos sospechosos y confirmados en humanos fueron diagnosticados en el delta del Paraná y en otras localidades de Buenos Aires (partidos de Verónica y General Lavalle), en Chaco y en Entre Ríos (Romer y col., 2011, 2014). Recientemente se detectaron casos humanos de fiebre manchada por *R. parkeri* en el Valle de Traslasierra (Córdoba) y Sierras de los Llanos (La Rioja) (Romer y col., 2014). Estos sitios no forman parte del área de distribución de *A. triste*, sin embargo, fueron detectadas garrapatas de la especie *A. tigrinum* positivas a *R. parkeri* en la misma área donde se produjeron los casos humanos (Romer y col., 2014). Hasta la fecha son 14 los casos de rickettsiosis por *R. parkeri* en humanos publicados en Argentina (Seijo y col., 2007; Romer y col., 2011; Romer y col., 2014).

Rickettsia parkeri forma parte de los patógenos que integran el grupo de las fiebres manchadas, cuyos signos clínicos en humanos comienzan una semana después de la picadura del vector e incluyen

síndrome febril, temperatura media de 39 - 40 °C, mialgias, cefalea y exantema no pruriginosos generalizado maculopapular o vesiculopapular con predominio en tronco y extremidades, escara y vasculitis en el sitio de inoculación con o sin linfadenopatía asociada; de evolución benigna y buena respuesta a tetraciclinas (Doxiciclina) aunque esta signología puede variar según el paciente (Chapman, 2006; Paddock y col., 2008a). En animales de laboratorio, como el cobayo, produce hipertermia, decaimiento y periorquitis leve de recuperación espontánea (Parker y col., 1939).

Considerando la amplia distribución de *A. triste* y *A. tigrinum* (Guglielmone y col., 2000, 2013; Guglielmone y Nava, 2006) y la detección de nuevos casos en regiones del país antes ignoradas, es de sospechar que la distribución de *R. parkeri* sea más amplia de lo que se conoce en la actualidad (Romer y col., 2014).

En nuestro país, además de la cepa At24, se detectó la cepa COOPERI a partir de *A. dubitatum* de una localidad de Santa Fe, la cual está relacionada filogenéticamente con *R. parkeri*, *Rickettsia africae* y *Rickettsia sibirica*, lo que le confiere una potencial patogenicidad (Parola y col., 2013; Monje y col., 2015a).

Poco se sabe sobre la ecología de *R. parkeri* más allá de lo relacionado con la ecología de sus vectores. Nieri-Bastos y col. (2013) realizaron un estudio experimental en donde encontraron que *R. parkeri* se transmite eficientemente de manera trans-estadial y trans-ovarica (transmisión vertical) en hasta 5 generaciones de *A. triste*, infectando tanto a larvas, ninfas como adultos. Los mismos autores detectaron un efecto deletéreo de *R. parkeri* en ninfas ingurgitadas: aquellas infectadas presentaron una mortalidad 5 veces mayor que aquellas no infectadas; lo que genera la sospecha de la existencia de hospedadores vertebrados amplificadores en la naturaleza (transmisión horizontal), ya que sin estos los linajes de *A. triste* infectados desaparecerían con el tiempo. Indicios del papel que pequeños mamíferos podrían cumplir como amplificadores de *R. parkeri* quedan evidenciados en el estudio que Wrigth y col. (2015b) desarrollaron con cobayos, encontrando que *Amblyomma americanum* puede contraer *R. parkeri* por co-alimentación con *A. maculatum*. Por otro lado, Wrigth y col. (2015a) también encontraron evidencias de transmisión vertical de *R. parkeri*, pero en este caso, en *A. maculatum*. Sin embargo, observaron que la mortalidad de larvas y ninfas infectadas fue menor que en aquellas no infectadas y que la tasa de eclosión de huevos infectados fue mayor que en no infectados, en oposición con lo hallado por Nieri-Bastos y col. (2013). Estas diferencias, sumado a que la prevalencia de *R. parkeri* en *A. maculatum* es mayor que en *A. triste*, podrían sugerir una mejor adaptación de *R. parkeri* a *A. maculatum* (Wrigth y col., 2015a), demostrando así la importancia de

conocer y comprender la ecología de los patógenos en sus diversos vectores, hospedadores y ambientes.

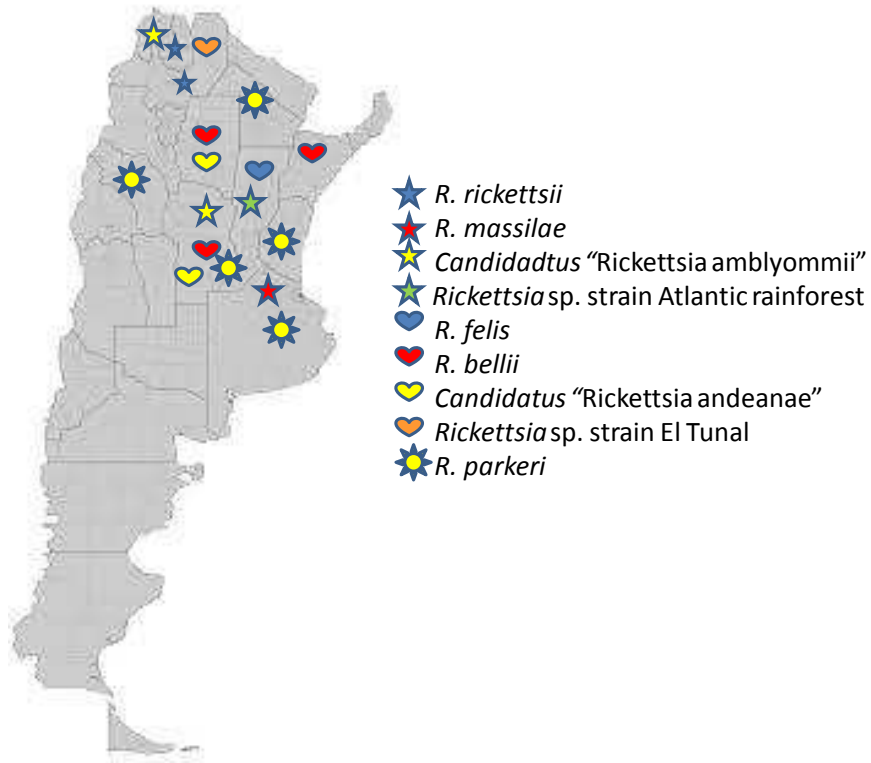


Figura 1 Distribución de las especies de rickettsias detectadas en la Argentina.

4.2 *Amblyomma triste*. Aspectos generales

Las garrapatas son artrópodos capaces de transmitir una importante variedad de microorganismos patógenos incluyendo protozoos, rickettsias, espiroquetas y virus, actuando como uno de los vectores más importantes de enfermedades para los seres humanos, ganado y animales de compañía; lo que implica importantes pérdidas económicas, productivas y sanitarias (Jongejan y Uilenberg 2004). En la relación de las garrapatas con sus hospedadores y el ambiente recae gran parte de la variabilidad del riesgo de transmisión de las enfermedades que estas transmiten. Diferentes factores, tanto de los hospedadores, del ambiente, del patógeno, de las garrapatas, así como la presencia de interacciones con otros ectoparásitos, generan situaciones más o menos favorables para la supervivencia de las garrapatas (Randolph, 2004; Lutermann y col., 2015). Un ejemplo de esto está representado por la transmisión por co-alimentación del virus de la encefalitis transmitida por garrapatas. En esta enfermedad la transmisión del virus de ninfas infectadas a larvas no infectadas mediante co-alimentación es fundamental para perpetuar la enfermedad, por eso es que los picos máximos de casos en humanos suceden en la época del año en la cual coinciden los valores más elevados de abundancia de larvas y ninfas concomitantes (Randolph y col., 2000; Danielova y col., 2002; Randolph, 2004). De esta forma, conocer la ecología de las garrapatas vectores de patógenos se torna fundamental a la hora de comprender la ecología y epidemiología de las enfermedades que estas transmiten.

Amblyomma triste pertenece a la familia Ixodidae, su distribución abarca desde Estados Unidos hasta Argentina con registros en México, Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, Brasil, Paraguay, Chile y Uruguay, preferentemente en ambientes ribereños en pastizales, pajonales y malezales tropicales y sub-tropicales (Guglielmone y col., 2003, 2013, 2014; Guzmán Cornejo y col., 2006; Mertins y col., 2010; Abarca y col., 2012). Presenta un ciclo de tres hospedadores en el cual los estadios inmaduros (larvas y ninfas) parasitan en la Argentina a roedores de la subfamilia Sigmodontinae como *Akodon azarae*, *Oligoryzomys nigripes*, *Oligoryzomys flavescens*, *Oxymycterus rufus*, *Scapteromys aquaticus*, *Calomys callosus*, *Necromys temchuki*; así como a otros roedores de la familia Caviidae (*Hydrochoerus hydrochaeris* y *Cavia aperea*) y al marsupial *Monodelphis dimidiata*. Mientras que *Blastocerus dichotomus*, *Sus scrofa*, *H. hydrochaeris* y animales domésticos como caballos, bovinos y perros, albergan a los estadios adultos (Figura 2), pudiendo afectar también a humanos (Nava y col., 2005, 2011; Guglielmone y Nava 2006; Guglielmone y col., 2006, 2013; Debárbora y col., 2012).

Filogenéticamente *A. triste* pertenece al “Grupo de *Amblyomma maculatum*”, en el cual se incluyen también a *A. maculatum* y *A. tigrinum* (Estrada-Peña y col., 2005).

Específicamente en la Argentina, se encuentra más frecuentemente en zonas de humedales en Buenos Aires, Corrientes, Entre Ríos y Formosa (Guglielmone y col., 2013). El límite norte en el cual fue detectada *A. triste* se encuentra en Colonia Pastoril (25°42`S, 58°12`O), Formosa, mientras que su límite sur se encuentra en la Reserva Natural Campos del Tuyú (36°15`S, 56°50`O), Buenos Aires (Figura 3). Guglielmone y col (2013) hipotetizaron que un posible hospedador en este sitio y probablemente más al sur, sea el Venado de las pampas (*Ozotoceros bezoarticus*). Dicho trabajo también puso en evidencia la complejidad de la ecología de *A. triste*, ya que fue encontrada en sitios inesperados mientras que en algunos sitios que parecían aptos para su desarrollo no fue hallada.

Nava y col. (2011) estudiaron aspectos de la ecología de *A. triste* en el delta del Paraná aportando datos de su dinámica estacional, encontrando que presenta un ciclo de vida de un año en el cual los estadios adultos de esta garrapata se encuentran en el ambiente desde el comienzo del invierno hasta mediados de verano con un pico de abundancia entre fines de invierno hasta mediados de primavera. Mientras que las larvas y ninfas colectadas principalmente de roedores sigmodontinos se encontraron desde principios de verano hasta fines de otoño con un pico de abundancia durante el verano.

Amblyomma triste presenta importancia para la salud pública ya que actúa como un eficiente vector de *R. parkeri* tanto en Argentina (Nava y col., 2008a; Romer y col., 2011; Monje y col., 2014; Romer y col., 2014) como en Uruguay y Brasil (Venzal y col., 2004, 2012; Pacheco y col., 2006; Silveira y col., 2007; Nieri-Bastos y col., 2013; Portillo y col., 2013). En Argentina casos humanos de fiebre manchada asociados con picaduras de *A. triste* fueron registrados en Buenos Aires, Chaco y Entre Ríos (Nava y col., 2008a; Romer y col., 2011), jugando así esta especie de garrapata un rol fundamental en la ecoepidemiología de este patógeno en la región. Si bien, los casos de rickettsiosis reportados en Argentina son escasos (Ripoll y col., 1999; Seijo y col., 2007; Paddock y col., 2008b; Garcia-Garcia y col., 2010; Romer y col., 2014) pueden representar sólo la punta visible del témpano ya que su incidencia puede estar siendo subestimada por ser mal diagnosticada o por falta de búsqueda de un diagnóstico confirmatorio. Asimismo, los constantes cambios a los que se enfrenta la humanidad (calentamiento global, cambio en el uso de la tierra, explosión demográfica, etc.) pueden determinar que estos patógenos emerjan, constituyéndose en un problema importante para la salud pública y de los animales domésticos (Jones y col.; 2008). Todo lo expuesto indica que son necesarios estudios que

permitan develar la distribución y dinámica de estos patógenos y sus vectores así como sus determinantes.



Figura 2 Adultos de *A. triste* (A) hembra y (B) macho (Nava y col., 2008a)

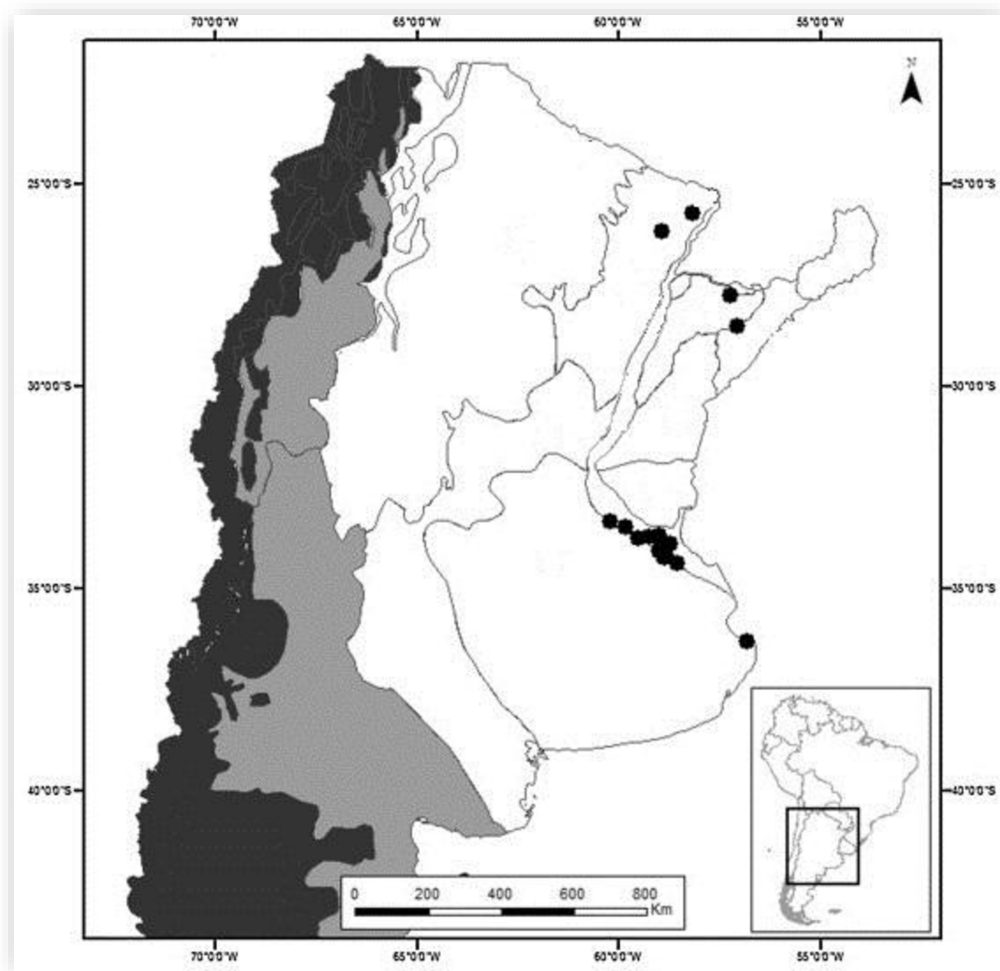


Figura 3 Distribución de los diferentes sitios donde *A. triste* fue colectada en la Argentina representados por puntos negros. (Guglielmo y col., 2013)

5. OBJETIVOS

Bajo la hipótesis que variaciones en el ambiente, en la comunidad de vectores y/o en el estado de los hospedadores influyen en la dinámica de infección de *Rickettsia parkeri*, se planteó el siguiente objetivo general:

5.1 Objetivos generales: Determinar qué factores extrínsecos (estacionalidad, temperatura, precipitaciones, humedad, tipo de vegetación, densidad de hospedadores, presencia de ganado) e intrínsecos del hospedador (especie, sexo, edad, condición corporal, etc.) están asociados a la prevalencia e intensidad de infección tanto de *Rickettsia parkeri*, como de su vector, la garrapata *Amblyomma triste*, en la zona del delta del Paraná con el fin de establecer las circunstancias que coadyuvan en la circulación del patógeno en su ciclo enzoótico.

5.2 Objetivos específicos: 1. Estudiar la fauna ectoparasítica, con énfasis en garrapatas, de roedores sigmodontinos del área de estudio.

2. A partir de especímenes de estadios inmaduros de *Amblyomma triste* obtenidos de roedores sigmodontinos capturados metódicamente en una localidad bonaerense del Delta del Paraná determinar la presencia, mediante el uso de modelos estadísticos multivariados, de asociaciones entre diversos factores de los hospedadores y del ambiente con la abundancia media de larvas y ninfas de *A. triste*.

3. A partir de muestras de tejidos de los mismos roedores mencionados en el objetivo específico “2”, detectar la presencia de *Rickettsia parkeri* mediante técnicas de biología molecular y evaluar, mediante el uso de modelos estadísticos, que factores están asociados a su prevalencia e intensidad de infección con el fin de comprender la participación de los roedores sigmodontinos en el ciclo de *R. parkeri*.

**6. CAPÍTULO 1: APORTES A LA ECOLOGÍA DE AMBLYOMMA
TRISTE EN EL DELTA DEL PARANÁ**

6.1 Introducción

La dinámica parásito-hospedador resulta de la interacción entre los parásitos, el ambiente y su hospedador (Hudson y col., 2002; Vaclav y col., 2008; Telfer y col., 2010; Cardon y col., 2011; Lutermann y col., 2015). Diferentes atributos de un hospedador, como su edad, condición corporal, sexo, tamaño corporal, especie, etc., pueden constituirlo en un individuo más o menos propenso a ser infestado por un determinado parásito (ej. Hughes y Randolph, 2001; Krasnov y col., 2005b; Brunner y Ostfeld 2008; Cardon y col., 2011). Al mismo tiempo, hospedadores que presentan características similares pueden estar influenciados por diferentes factores ambientales (tipo de vegetación, ambiente conservado o bajo la influencia de la actividad humana, variaciones de temperatura y humedad, etc.) o que se modifican a lo largo del año (temperatura, humedad, etc.), generando condiciones más o menos favorables para el desarrollo de los parásitos en sus hospedadores. Por otro lado, dentro de las comunidades parasitarias que se encuentran en un mismo hospedador, se generan interacciones entre los especímenes que influyen en la distribución y abundancia de las especies que la conforman (Lutermann y col., 2015). Conocer qué factores influyen en estas interacciones permite comprender mejor la ecología de las comunidades parasitarias y de las enfermedades que estos transmiten.

Como fue mencionado previamente en la introducción general, *A. triste* es el vector de *R. parkeri* en diversas provincias de nuestro país, incluida el área de estudio seleccionada para desarrollar la presente tesis en donde los roedores sigmodontinos son los hospedadores de los estadios inmaduros (larvas y ninfas) de *A. triste* y mamíferos de mayor tamaño (entre ellos animales domésticos como el ganado bovino) actúan como hospedadores de los estadios adultos. De este modo determinar cuáles son los factores que influyen en la interacción *A. triste* – hospedador – ambiente permitirá aportar información sobre la dinámica de *R. parkeri* en Argentina.

6.2 Objetivos

El objetivo del presente capítulo es sumar conocimiento sobre la comunidad de ectoparásitos de los roedores sigmodontinos del área de estudio y explorar la influencia de diversos factores (medio ambiente, del hospedador, co - infestación con otros ectoparásitos) en la relación entre *A. triste* y algunas especies de roedores sigmodontinos de la eco-región Delta e Islas del Paraná, como fue mencionado en los objetivos específicos 1 y 2 expuestos anteriormente.

6.3 Materiales y métodos

6.3.1 Área de estudio

Los datos se colectaron en la Estación Experimental Agropecuaria (E.E.A.) Delta del Paraná del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) (34° 11' S, 58° 50' O) ubicado en el partido de Campana, provincia de Buenos Aires, Argentina (Figura 4). El sitio fue seleccionado por ser epidemiológicamente relevante debido a 1) se ha demostrado la presencia de *R. parkeri* en humanos (Seijo y col., 2007) y en *A. triste* (Nava y col., 2008a; Monje y col., 2014), 2) por encontrarse en una posición cercana a los centros más densamente poblados del país y 3) ya que la actividad ganadera está siendo desplazada por la agricultura hacia este tipo de ecosistemas (eco-región Delta e Islas del Paraná), con la consecuente alteración del ambiente y el aumento de la frecuencia de contacto entre animales domésticos - silvestres - humanos - garrapatas.

El área está ubicada en la región baja del Delta del río Paraná, siendo la extensión sur de la Provincia fitogeográfica Paranaense del Dominio fitogeográfico Amazónico (Cabrera, 1994) y pertenece a la eco-región Delta e Islas del Paraná (Burkart y col., 1999). El sitio está caracterizado por una planicie deltaica con influencia fluvial dada por las crecientes estacionales del Río Paraná con un fuerte impacto de las crecidas ocasionadas por “El Niño”. Está formado en su mayoría por islas grandes fragmentadas por canales de navegación artificiales, con presencia de albardones que rodean bajos inundables temporal o permanentemente (Kandus, 1997; Malvárez, 1997). El suelo está predominantemente formado por limo arcilloso y arena fina (Bukart, 1957). La vegetación dominante está formada por gramíneas y bosques de *Erythrina crista-galli* y áreas de pajonales con el predominio de *Cortadeira* spp. y *Cynodon* spp. (Kandus y col., 2003). La actividad forestal es la más desarrollada con plantaciones de *Populus* spp. y *Salix* spp., aunque también se desarrolla la actividad ganadera de cría (Zoffoli y col., 2008), para lo cual se han construido diques para evitar el ingreso del agua. El área de muestreo también cuenta con bosques de *Quercus* spp. y *Carya* spp.

El clima es templado con una temperatura media anual de 16,7 °C y una media anual de precipitaciones de 1000 mm con una estación lluviosa indefinida (Kandus y Malvárez, 2004).

6.3.2 Diseño de muestreo

Los muestreos de especímenes biológicos se desarrollaron entre septiembre de 2010 y octubre de 2012 cada 5 semanas sumando un total de 22 campañas en 4 sitios diferentes dentro del área de estudio, separados por al menos 400 metros (Figura 5). Cada sitio estaba formado por 4 cuadrantes de 15 x 15 m (identificados con letras) separados por al menos 200 m entre sí, compuestos por 12 trampas de captura viva Sherman, 3 en cada esquina, y dos trampas de captura viva múltiple Ugglan en el centro del cuadrante (Myllymaki y col., 1971) (Figura 6), sumando un total de 224 trampas/noche en 16 cuadrantes totales (4 cuadrantes x 4 sitios). Como cebo se utilizó alimento balanceado para perro.

En cada sitio los cuadrantes de muestreo se ubicaron 2 en áreas forestadas y 2 en áreas no forestadas. Las primeras se caracterizaron por la presencia de bosques implantados de *Populus* spp. o *Salix* spp. con un estrato herbáceo muy variable en composición y cobertura formado por zonas cubiertas de hojarasca, de ciperáceas o ensambles de gramíneas (*Cynodon* spp., *Sorgum* spp., entre otras). Los sitios seleccionados dentro de las áreas no forestadas se caracterizaron por la presencia de cortaderas (*Cortadeira* spp.) y gramón (*Cynodon* spp.) en la intermata. Esta disposición de los cuadrantes permitió establecer una diferenciación por el tipo de *vegetación* en áreas forestadas o bosque vs área no forestada o pajonal.

El área de estudio contaba además con un rodeo de 21 vacas de cría de la raza Aberdeen Angus en una densidad de 1 vaca por hectárea aproximadamente. La mitad de los sitios de muestreo se dispusieron en sectores con presencia de ganado vacuno, mientras que la otra mitad no. Así, cada cuadrante de muestreo también se clasificó en: con *presencia de ganado* y sin *presencia de ganado* (Figura 7).



Figura 4 Ubicación geográfica del área de estudio en el partido de Campana, provincia de Buenos Aires, Argentina.

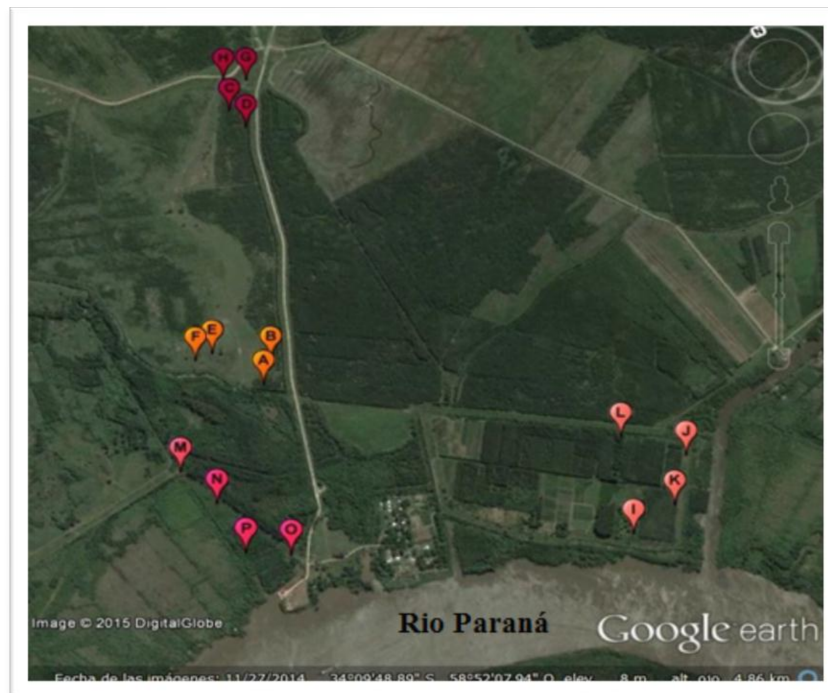


Figura 5 Ubicación de los cuadrantes de muestreo en sus 4 sitios. Cada color representa un sitio de muestreo formado por cuatro cuadrantes. Cada cuadrante fue representado por una letra (A – P).

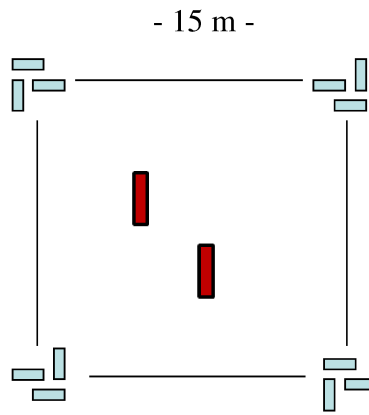


Figura 6 Disposición de las trampas de captura viva en sus cuadrantes. Cada cuadrante estaba formado por tres trampas Sherman en cada esquina y dos trampas Ugglan en el centro.

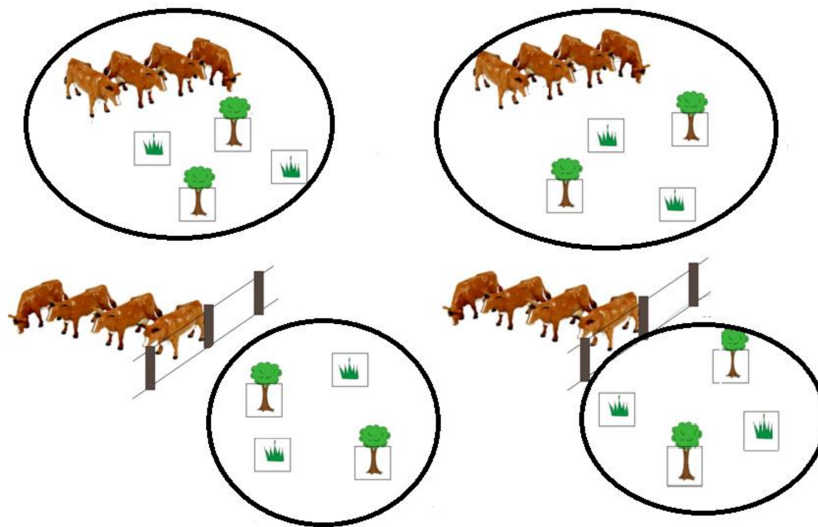


Figura 7 Esquema de los sitios de muestreo, representados por un círculo, los cuales estaban formados por 4 cuadrantes, representados por un cuadrado. La mitad de los sitios incluyó la presencia de ganado bovino, mientras que la otra mitad no. Al mismo tiempo, la mitad de los cuadrantes se ubicaron en áreas forestadas, representadas por el símbolo de un árbol, y la otra mitad en áreas no forestadas, representadas por el símbolo de pastizal.

6.3.3 Toma de muestras

Los roedores estudiados fueron capturados durante 3 noches de trampeo, cada mañana todas las trampas fueron revisadas en busca de individuos capturados los cuales fueron transportados a un laboratorio de campo donde se anestesiaron mediante la inhalación de isofluorano para ser luego eutanasiados por dislocación cervical bajo normas de bioseguridad y bienestar animal (Mills y col., 1995). La captura, sacrificio y transporte de roedores contó con el aval correspondiente otorgado por la Dirección de Flora y Fauna (núm. de disposición 48/12) y del Comité Asesor de Ética y Seguridad (CAES) de la Facultad de Cs Veterinarias de la UNL.

De cada individuo se registraron:

- Especie, determinada inicialmente en el campo según Massoia y Fornes (1969) y confirmada por morfología craneana bajo la supervisión del Dr. Ulyses Pardiñas en el Centro Nacional Patagónico (CENPAT-CONICET).
- Sexo, determinado mediante visualización de órganos sexuales.
- Edad, determinada según pelaje, medidas morfométricas y desarrollo de órganos sexuales.
- Peso, medido con una balanza analítica portátil con una precisión de 0,01g.
- Medidas morfométricas, con un calibre digital milimétrico se midieron largo de oreja y tarso, con una regla el largo del cuerpo y largo de cola.
- Condición corporal, mediante estimación por palpación del grado de cobertura muscular y grasa de la columna vertebral y de la pelvis, se asignó un puntaje del 1 al 10.
- Estado reproductivo, las hembras se clasificaron de la siguiente manera: “vagina no perforada”, “vagina perforada”, “gestante”, “en lactancia”. La gestación fue confirmada durante la necropsia, tomando nota del tercio de preñez, número y peso de embriones. Los machos se clasificaron según la posición de sus testículos en: “abdominales”, “semi-escrotales” y “escrotales”.
- Conteo de células sanguíneas, se realizó el recuento de glóbulos rojos (GR) y glóbulos blancos (GB) siguiendo la metodología desarrollada por Beldomenico y col. (2008).

De cada roedor se obtuvieron muestras de sangre con EDTA, pulmón, hígado, suero y paquete de células sanguíneas que se conservaron en nitrógeno líquido en tubos eppendorf individuales hasta ser

transportados al Laboratorio de Ecología de Enfermedades (LEcEn) del Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral (ICiVet-Litoral), UNL-CONICET, donde se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ o a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en el caso de las muestras de hígado. El resto del cadáver y los ectoparásitos colectados al momento de la manipulación de los roedores fueron conservados en etanol 96° para determinar su especie mediante taxonomía del cráneo en el caso de los roedores, y luego ser examinado bajo lupa binocular en busca de garrapatas y otros ectoparásitos.

Por otro lado, durante el transcurso de los muestreos, se colectaron garrapatas adultas del ambiente en su fase de vida libre y del ganado bovino en su fase parasítica para determinar su especie, confirmar la presencia de *A. triste* y evaluar la presencia de otras especies de garrapatas. Las garrapatas del ambiente se colectaron con un paño de tela de 1m x 1m deslizándolo sobre la vegetación de los alrededores de los cuadrantes de muestreo. Este procedimiento se realizó en cada sesión de muestreo por dos días a la misma hora. Estas garrapatas, al igual que las colectadas en los bovinos, fueron conservadas en etanol 96°.

En cuanto a los datos ambientales estudiados, se tomó registro de las siguientes variables:

Estación: la estacionalidad fue estudiada dividiendo el año en 4 estaciones según solsticios y equinoccios, y mediante la utilización de componentes sinusoidales que reflejen un ciclo anual (Beldomenico y col., 2008).

Datos macroclimáticos: precipitaciones, humedad y temperatura mínima, máxima y promedio durante el período relevante a la sesión o en períodos anteriores fueron obtenidos de la estación meteorológica iMETOS PRO del INTA Delta (S: $34^{\circ}10'25,7''$ O: $58^{\circ}51'58,1$).

Abundancia de hospedadores por cuadrante: para cada especie de roedores se tuvo una aproximación de la abundancia de cada cuadrante de trampeo utilizando el número de roedores capturados por cuadrante.

Presencia de ganado: al inicio del estudio se tomó registro de cuales cuadrantes se encontraban en presencia de ganado y cuáles no.

Tipo de vegetación: al inicio del estudio se tomó registro de cuales cuadrantes se encontraban en áreas de bosques implantados y cuáles no.

6.3.4 Análisis de las muestras

En el LEcEn (ICiVet-Litoral, UNL-CONICET), cada roedor fue inspeccionado bajo lupa binocular en busca de ectoparásitos. Se colectaron garrapatas, ácaros, piojos y pulgas, los cuales fueron conservados en tubos eppendorf con etanol 96° separados por taxa por individuo.

Las especies de garrapatas colectadas a partir de roedores, bovinos y del ambiente fueron determinadas según morfología siguiendo a Marques y col. (2004), Estrada-Peña y col. (2005) y Martins y col. (2014), y mediante la comparación con material de la colección presente en el INTA, E.E.A. Rafaela bajo la supervisión del Dr. Santiago Nava. Se determinaron también ácaros del orden Mesostigmata de acuerdo a Strandmann y Wharton (1958) y Furman (1972); pulgas según Johnson (1957), Smit (1987) y Linardi y Guimarães (2000), y piojos según Johnson (1972) y Durden y Musser (1994), bajo la supervisión de la Dra. Marcela Lareschi (CEPAVE, UNLP-CONCIET).

Uno de los factores del hospedador incluidos en los análisis del presente capítulo fue la concentración de *anticuerpos naturales* (ACn) de los roedores, los cuales fueron determinados mediante la técnica de hemaglutinación descrita por Racca y col. (2014). Estas determinaciones fueron realizadas por la Dra. Andrea Racca, inmunóloga del grupo de investigación.

6.3.5 Análisis de datos:

Para el objetivo descriptivo del presente capítulo se determinaron la prevalencia de ectoparásitos por especie hospedadora (número de roedores positivos a una determinada especie ectoparasítica sobre el total de roedores de una determinada especie examinados, multiplicado por 100), abundancia media de ectoparásitos (total de individuos de una determinada especie ectoparasítica sobre el total de roedores de una determinada especie examinados) y el índice Kappa (κ) en el cual 0 y 20 representan la máxima y mínima agregación respectivamente (Wilson y col., 2002).

Se evaluó también si las asociaciones observadas fueron registradas en estudios realizados previamente en el INTA Delta (ej. Mauri, 1966; Mauri y Capri, 1972; Lareschi y Sánchez López, 2000; Nava y col., 2004; Nava y col., 2011). Considerando que la definición de la eco-región Islas y Delta del Paraná según Burkart y col. (1999) incluye el estuario del río de La Plata, se verificó si las asociaciones encontradas en este estudio habían sido determinadas previamente en los trabajos de Lareschi (1996, 2010a) en Punta Lara (34°47'S, 58°01'O), Liljeström y Lareschi (2002) en Berisso (34°52'S, 57°53'O), Lareschi y col.

(2003) en Hudson (34°45'S, 58°06'O), Navone y col. (2009) entre Hudson (34°45'S, 58°06'O) y La Balandra (34°56'S, 57°42'O), localidades ubicadas en las costas del río de La Plata, más el trabajo de Nava y col. (2003) en las costas del Paraná en Ramallo (33°32'S, 59°52'O), todas de la provincia de Buenos Aires.

Considerando que la distribución de los parásitos sobre los hospedadores corresponde a una distribución binomial negativa, para evaluar la asociación de estos con diversos factores, se desarrolló un análisis estadístico multivariado utilizando Modelos Lineales Generalizados Mixtos (MLGM) con una respuesta binomial negativa utilizando el paquete *glmmADMB* del software estadístico R (R Foundation for Statistical Computing, <http://www.r-project.org>). Para controlar el efecto de la falta de independencia de las observaciones del mismo cuadrante de muestreo, se incluyó como factor al azar “Número de cuadrante”. Este tipo de análisis multivariado permitió examinar el efecto de una variable independiente determinada ajustando por el resto de las variables independientes del modelo, por ejemplo: se evaluó el efecto de los distintos tipos de vegetación sobre la abundancia de *A. triste* a iguales condiciones de sexo, edad, condición corporal, presencia de ganado, etc.

En un primer modelo (*Modelo 1*) se evaluó la presencia de asociación entre la carga de larvas (LL) y ninfas (NN) de *A. triste* (*A. triste* total) como variable dependiente y la especie de roedor muestreada como variable independiente, considerando para el análisis solo a *A. azarae* y *O. rufus* debido a ser las especies con el mayor número de capturas. Se incluyeron en el *Modelo 1* como posibles factores enmascaradores a:

- *Estación del año* (determinada por solsticios y equinoccios como primavera, verano, otoño e invierno)
- Presencia de *ganado bovino* (presente / ausente)
- Tipo de *vegetación* (área forestada / área no forestada)
- *Sexo* (macho/hembra)
- *Condición corporal* (estimada mediante un índice residual, ver página siguiente)
- *Largo de cuerpo*
- *Abundancia de piojos*
- *Abundancia de pulgas*
- *Abundancia de Ixodes loricatus*
- *ACn* (valores de titulación)
- *Año de muestreo* (1= Septiembre 2010 - Octubre 2011; 2= Noviembre 2011 – Octubre 2012)
- *Interacciones* consideradas de relevancia como especie x ACn, especie x año de muestreo, etc.

En una segunda etapa se evaluó la asociación entre la abundancia de *A. triste* en sus hospedadores y diversas variables del hospedador, del ambiente y la interacción con otros ectoparásitos. Para tal fin, se utilizaron un segundo y cuarto modelo en donde se consideró como variable respuesta la abundancia media de larvas (LL) (*Modelo 2*) y ninfas (NN) (*Modelo 4*) de *A. triste* obtenidas solo a partir de *A. azarae*, ya que fue la única especie de roedor capturado lo suficientemente abundante como para estudiar la cantidad de variables independientes de interés y sus interacciones.

En el *modelo 2* y *4* se evaluó el efecto de las siguientes variables independientes cuyas definiciones fueron abarcadas en la descripción del *modelo 1*: Factores Ambientales: *Año de muestreo*, *estación del año*, presencia de *ganado bovino*, tipo de *vegetación*.

Factores del hospedador: *Largo de cuerpo* (como estimador de edad y tamaño corporal), *sexo*, *condición corporal* (índice residual, ver párrafo siguiente), *estado reproductivo* (activo/inactivo, ver siguiente página), *GB*, *GR*, *ACn*.

Co-infestación con otros ectoparásitos: se incluyeron en el modelo conteos de: otro estadio de *A. triste* (Ej.: si larvas de *A. triste* es la variable dependiente, se incluyó a ninfas de *A. triste* como variable independiente), *I. loricatus* (la otra especie de garrapata presente en el área de muestreo), ácaros, piojos y pulgas.

Para estimar la *condición corporal* de los roedores estudiados se creó un índice residual ajustado para controlar aquellas distorsiones en el peso provocado por el estado reproductivo de “gestante” (Green, 2001). Este índice se calculó a partir de la regresión lineal entre *masa corporal* (variable respuesta) y *largo del cuerpo*, *estado de preñez* (factor de 4 niveles: no preñado (incluye machos) - preñez temprana – preñez en término medio – preñez avanzada) y *número de embriones* de la siguiente manera:

Índice residual = residuales (lm (peso ~ largo del cuerpo + estado de preñez + cantidad de embriones, data = data)).

La concentración de GB, GR y ACn fueron utilizados como estimadores de la condición fisiológica de los hospedadores. Niveles bajos de GR son indicativos de una capacidad aeróbica escasa, resultado de una nutrición insuficiente, un proceso de infección o de parasitismo (Beldomenico y col., 2008). Los valores de concentración de GB son considerados indicadores del grado de inversión en inmunidad celular (Beldomenico y col, 2008) y ACn como indicadores del nivel de inmunidad humoral (Racca y col., 2014).

Por otro lado, se incluyeron en el análisis aquellas interacciones de dos vías que se consideraron relevantes. Por ejemplo, se incluyó la interacción “sexo x ácaros”, en donde se evaluó si el efecto sobre la abundancia de *A. triste* en machos o en hembras varía ante una co-infestación con una mayor o menor carga de ácaros. El modelo inicial, que incluye todas las variables independientes y las interacciones de interés, fue reducido gradualmente mediante la eliminación de términos utilizando el criterio de AIC (Akaike Information Criteria) (Akaike, 1974), aquellos términos cuya eliminación generó el aumento del AIC en más de 2 unidades no fueron eliminados del modelo. En casos de sobredispersión se utilizó el criterio de QAIC (Quasi-Akaike Information Criteria) (Richards, 2008). Este criterio fue utilizado en la selección de modelos a lo largo de toda la tesis.

Por último, para evaluar el efecto del *estado reproductivo* (activo/inactivo) se creó un subset de datos que incluyó solo a aquellos individuos capturados en la época reproductiva (Octubre a Marzo). Se consideró como “activos” a aquellos roedores machos con testículos en posición escrotal y hembras con signos de estro (vagina perforada), de lactancia o preñez reciente o actual. Se consideró como “inactivos” a machos con testículos en posición semi escrotal o abdominal y hembras no perforadas y sin signos de preñez o lactancia. En cada modelo final se evaluó el efecto del estado reproductivo dentro de este subset.

Como parte del objetivo de la presente tesis, se consideró estudiar la asociación entre la abundancia media de LL y NN de *A. triste* en *A. azarae* con determinados factores abióticos como los niveles de precipitaciones (mm), temperatura del suelo (C°) y de déficit de saturación (DS, mmHg). Sin embargo, se encontró que estos factores presentaron un alto grado de correlación (Resultado del test de correlación de Pearson mayor a 0,9) con la variable *estación del año*, por lo que no pudieron ser incluidos conjuntamente en el mismo modelo y podrían, además, explicar la variabilidad de la abundancia media de LL y NN a lo largo del año. Es así que, de encontrarse asociación entre *estación del año* y LL y/o NN, se evaluó, mediante MLGM con una respuesta binomial negativa utilizando el mismo paquete, software y factor al azar que en los modelos anteriores, si las variables abióticas mencionadas podrían explicar esta asociación. Como primer paso se evaluó, mediante la comparación de modelos a través de valores de AIC, que temperatura (mínima, promedio o máxima) era la más apropiada para el modelo, siendo el modelo con temperatura mínima la que obtuvo el menor valor de AIC. Como segundo paso se obtuvieron valores promedio de temperatura mínima y de DS, así como valores totales de precipitaciones, de períodos formados de 1 semana cada uno, hasta 8 semanas para LL y 4 semanas para NN previas e incluyendo a la fecha de captura de los roedores. Se consideraron estos períodos de tiempo

según los datos de campo disponibles de incubación de huevos (53 días) y quitinización y búsqueda de un hospedador (Aprox 15 días) para LL, pre- muda de LL (15 días) y quitinización y búsqueda de un hospedador (Aprox 15 días) para NN (Nava y col., 2011).

De esta forma quedaron conformados 9 períodos (del 0 al 8) para LL y 5 períodos (del 0 al 4) para NN, cada uno con un valor promedio de temperatura mínima y DS y valor acumulado de precipitaciones. Cada uno de estos períodos se incluyó en un modelo diferente y se seleccionó aquel con el menor valor de AIC. Como último paso se evaluó un modelo (*Modelo 3* para LL y *Modelo 5* para NN) con los períodos de temperatura mínima, DS y precipitaciones seleccionados y estación del año y año de muestreo, con el fin de observar si en esta situación la variable estación del año perdía o mantenía su asociación con la abundancia media de LL y/o NN, lo que permitió explorar si esa asociación era en realidad explicada por las variables mencionadas o no.

El déficit de saturación (DS) utilizado se calculó a partir de la fórmula descrita por Randolph y Storey (1999):

$$DS = (1 - RH/100) \times 4.9463 \times e^{0.0621T}$$

RH: Humedad relativa promedio

T: temperatura diaria promedio

6.4 Resultados

6.4.1 Comunidad de ectoparásitos de roedores sigmodontinos del Delta del Paraná

Se capturaron un total de 782 roedores (familia Cricetidae, subfamilia Sigmodontinae) de las especies *Akodon azarae*, *Oxymycterus rufus*, *Oligoryzomys flavescens*, *Oligoryzomys nigripes*, *Scapteromys aquaticus*, *Deltamys kempfi* y *Holochilus brasiliensis*, en orden de abundancia decreciente. En la tabla 1 se presentan el número de capturas de cada especie de roedor, el rango y valor promedio de peso (g) y el largo de cuerpo (cm), la proporción de individuos machos y hembras, la proporción de juveniles (1), subadultos (2) y adultos (3). En la tabla 2 se presentan los rangos y valores promedio de recuento de eritrocitos (GR) y leucocitos (GB) por μl de sangre analizada de cada especie de roedor. Por último, en la tabla 3 se presentan el número de roedores capturados según *estación* (verano, otoño, invierno y primavera), según presencia o ausencia de *ganado bovino* en el sitio de muestreo, y según características de la *vegetación* (área forestada o no forestada).

Tabla 1: Número de especímenes de roedores capturados (N), rango y valor promedio del peso en gramos (g), largo de cuerpo en centímetros (cm), porcentaje (%) de individuos machos y hembras y porcentaje (%) de individuos según las diferentes edades (juveniles (1), subadultos (2) y adultos (3)). Roedores sigmodontinos capturados en la E.E.A. Delta del INTA entre septiembre de 2010 y octubre de 2012.

Especie	N	Peso (g)	Largo de cuerpo (cm)	Sexo (%)		Edad (%)		
				M	H	1	2	3
<i>Akodon azarae</i>	391	6,1 - 56,7 (21,7)	5,7-11,8 (9,8)	58,0	42,0	1,5	41,0	57,0
<i>Oxymycterus rufus</i>	201	17,5 – 110 (64,1)	4,7-24,2 (14,5)	57,0	43,0	6,5	22,7	70,8
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	82	6,7 – 28,9 (15,4)	6,4-11,9 (8,5)	64,3	35,7	4,8	48,8	46,4
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	45	7,7 – 46,5 (28,9)	6,4-21,2 (10,8)	64,7	35,3	2,0	35,3	62,7
<i>Scapteromys aquaticus</i>	37	36,4 – 127 (86,6)	11,1-20,5 (15,8)	51,3	48,7	2,5	28,2	69,2
<i>Deltamys kempfi</i>	9	13,2 - 20,5 (17,2)	8,8-10,9 (9,9)	66,6	33,3	0	77,7	22,2
<i>Holochilus brasiliensis</i>	3	89,8 – 191 (127,3)	15,3-20,4 (17,4)	66,6	33,3	0	33,3	66,6

Tabla 2.: Rango y valor promedio del recuento de eritrocitos (GR) y leucocitos (GB) por μl de sangre analizada por especie de roedor capturado. Roedores sigmodontinos capturados en la E.E.A. Delta del INTA entre Septiembre de 2010 y Octubre de 2012.

Especie	GR millones/ μl	GB / μl
<i>Akodon azarae</i>	0,8-19,5 (9,5)	1.150 - 40.000 (9.420)
<i>Oxymycterus rufus</i>	0,9-17,1 (8,6)	50 – 43.100 (10.200)
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	2,8-17,4 (9,4)	700 – 20.350 (7.185)
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	0,8-16,7 (7,8)	2.250 – 24.750 (8.789)
<i>Scapteromys aquaticus</i>	3,7-15,1 (8,1)	3.050 – 38.250 (10.360)
<i>Deltamys kempii</i>	3,9-8,5 (6,2)	3.350 – 12.650 (6.100)
<i>Holochilus brasiliensis</i>	5,6-8,8 (7,2)	10.100 – 10.200 (10.150)

Tabla 3. Número de especímenes capturados según estación (verano, otoño, invierno y primavera) y características del sitio de muestreo: con presencia o ausencia de ganado bovino y vegetación del tipo área forestada o no forestada. Roedores sigmodontinos capturados en la E.E.A. Delta del INTA entre Septiembre de 2010 y Octubre de 2012.

Especie	Estación				Ganado		Vegetación	
	Ver	Ot	Inv	Prim	SI	No	Forest.	No forest.
<i>Akodon azarae</i>	65	145	113	66	184	205	90	299
<i>Oxymycterus rufus</i>	46	52	39	64	90	111	44	157
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	9	49	16	7	51	30	30	51
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	9	16	12	8	13	32	25	20
<i>Scapteromys aquaticus</i>	5	17	6	9	17	20	3	34
<i>Deltamys kempii</i>	2	7	-	-	3	6	0	9
<i>Holochilus brasiliensis</i>	2	1	-	-	1	2	0	3

En las Tablas 4, 5 y 6 se presentan el número de roedores positivos a los distintos ectoparásitos colectados sobre el total de roedores capturados, el número total de parásitos por especie de roedor y valores de prevalencia, abundancia media y κ de los diversos ectoparásitos colectados. Los valores de κ mostraron características típicas de las poblaciones parásitas con una distribución agregada sobre los hospedadores.

Tabla 4. Se indica el número de roedores infestados / número de roedores capturados y estudiados, número total de parásitos, las prevalencias (%), las abundancias medias y el índice Kappa (κ) para el conjunto de las larvas y ninfas de cada especie de garrapata en cada especie hospedadora. Roedores sigmodontinos capturados en la E.E.A. Delta del INTA entre septiembre de 2010 y octubre de 2012.

	<i>A. a</i>	<i>O. r</i>	<i>O. f</i>	<i>O. n</i>	<i>S. a</i>	<i>D. k</i>	<i>H. b</i>
<i>A. triste</i>	131/391	71/124	10/34	8/26	4/7	2/9	2/3
Nº total	895	1412	138	22	17	2	32
Prevalencia	33,5	57,2	29,4	30,5	57,1	22,2	66,6
Abun. media	2,3	11,4	4,1	0,8	2,4	0,2	10,6
κ	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	<0,1	-	<0,1
<i>I. loricatus</i>	76/391	7/124	0/34	2/26	1/7	0/9	1/3
Nº total	201	13	0	2	1	0	1
Prevalencia	19,5	5,6	0	7,7	14,3	0	33,3
Abun. media	0,5	0,1	0	<0,1	0,1	0	0,3
κ	0,1	<0,1	-	<0,1	-	-	-

* *A. a* = *Akodon azarae*, *O. r* = *Oxymycterus rufus*, *O. f* = *Oligoryzomys flavescens*, *O. n* = *Oligoryzomys nigripes*, *S. a* = *Scapteromys aquaticus*, *D. k* = *Deltamys kempi*, *H. b.* = *Holochilus brasiliensis*

Tabla 5. Se indica el número de roedores infestados / número de roedores capturados y estudiados, número total de parásitos, las prevalencias (%), las abundancias medias y el índice Kappa (κ) para cada especie y/o género de ácaro en cada especie hospedadora. Roedores sigmodontinos capturados en la E.E.A. Delta del INTA entre septiembre de 2010 y octubre de 2012.

	<i>A. a</i>	<i>O. r</i>	<i>O. f</i>	<i>O. n</i>	<i>S. a</i>	<i>D. k</i>	<i>H. b</i>
<i>A. fahrenheitzi</i>	108/391	66/124	4/34	3/26	4/7	3/9	1/3
Nº total	232	247	8	4	11	4	1
Prevalencia	27,6	53,2	11,7	11,5	57,1	33,3	33,3
Abun. media	0,6	1,9	0,2	0,2	1,6	0,4	0,3
κ	0,4	0,3	0,1	0,5	2,1	<0,1	-
<i>A. sp. del grupo rotundus</i>	298/391	25/124	5/34	8/26	1/7	3/9	2/3
Nº total	1218	33	9	9	2	6	3
Prevalencia	76,2	20	14,7	30,7	14,3	33,3	66,6
Abun. media	3,1	0,3	0,3	0,3	0,3	0,6	1
κ	1,2	4,4	0,4	<0,1	-	3,6	-
<i>L. manguinhos</i>	4 /391	2/124	18/34	8/26	4/7	1/9	1/3
Nº total	5	2	65	20	45	11	21
Prevalencia	1,2	1,6	52,9	30,8	57,1	11,1	33,3
Abun. media	<0,1	<0,1	1,9	0,8	6,4	1,2	7
κ	<0,1	-	0,4	0,2	1,3	0,2	-
<i>L. paulistanensis</i>	13 /391	3/124	18/34	16/26	1/7	0/9	0/3
Nº total	17	4	48	59	1	0	0
Prevalencia	3,3	2,4	52,9	61,5	14,3	0	0
Abun. media	<0,1	<0,1	1,4	2,3	0,1	0	0
κ	<0,1	0,1	1,1	0,6	-	-	-

	<i>A. a</i>	<i>O. r</i>	<i>O. f</i>	<i>O. n</i>	<i>S. a</i>	<i>D. k</i>	<i>H. b</i>
<i>O. bacoti</i>	18/391	93/124	3/34	4/26	2/7	0/9	1/3
Nº total	22	1127	3	5	4	0	1
Prevalencia	4,6	75	8,8	15,4	28,6	0	33,3
Abun. media	<0,1	9,1	<0,1	0,2	0,6	0	0,3
κ	0,2	0,5	-	<0,1	<0,1	-	-
<i>Gigantolaelaps sp</i>	6/391	1/124	13/34	15/26	0/7	0/9	2/3
Nº total	7	1	21	39	0	0	7
Prevalencia	1,5	0,8	38,2	57,7	0	0	0,9
Abun. media	<0,1	<0,1	0,6	1,5	0	0	2,3
κ	<0,1	-	14,9	1,6	-	-	-
<i>Mysolaelaps sp</i>	6/391	3/124	19/34	4/26	0/7	0/9	0/3
Nº total	9	3	79	7	0	0	0
Prevalencia	1,5	2,4	55,8	0,1	0	0	0
Abun. media	<0,1	<0,1	2,3	0,3	0	0	0
κ	<0,1	<0,1	1,1	0,3	-	-	-

* *A. a* = *Akodon azarae*, *O. r* = *Oxymycterus rufus*, *O. f* = *Oligoryzomys flavescens*, *O. n* = *Oligoryzomys nigripes*, *S. a* = *Scapteromys aquaticus*, *D. k* = *Deltamys kempji*, *H. b.* = *Holochilus brasiliensis*

Tabla 6. Se indica el número de roedores infestados/ número de roedores capturados y estudiados, número total de parásitos, las prevalencias (%), las abundancias medias y el índice Kappa (κ) para cada género de pulgas y piojos en cada especie hospedadora. Roedores sigmodontinos capturados en la E.E.A. Delta del INTA entre Septiembre de 2010 y Octubre de 2012.

	<i>A. a</i>	<i>O. r</i>	<i>O. f</i>	<i>O. n</i>	<i>S. a</i>	<i>D. k</i>	<i>H. b</i>
<i>Polygenis sp</i>	130/391	93/124	8/34	11/26	4/7	3/9	2/3
N° total	209	390	12	21	15	7	7
Prevalencia	33,2	75	23,5	42,3	57,1	33,3	66,6
Abun. media	0,5	3,1	0,3	0,8	2,1	0,7	2,3
κ	0,6	0,8	0,4	0,8	1,4	0,3	-
<i>Craneopsylla sp</i>	96/391	40/124	2/34	1/26	4/7	2/9	0/3
N° total	181	64	3	3	7	16	0
Prevalencia	24,5	32,3	5,8	3,8	57,1	2,2	0
Abun. media	0,5	0,5	<0,1	0,1	1	1,7	0
κ	0,3	0,6	0,1	-	0,3	0,5	-
<i>Hoplopleura sp</i>	146 /391	97/124	19/34	19/26	0/7	8/9	1/3
N° total	2268	2000	212	273	0	26	12
Prevalencia	37	78,2	55,8	73,1	0	88,8	33,3
Abun. media	5,8	16,1	6,2	10,5	0	2,8	4
κ	0,1	0,6	0,4	0,2	-	0,9	0,2

* *A. a* = *Akodon azarae*, *O. r* = *Oxymycterus rufus*, *O. f* = *Oligoryzomys flavescens*, *O. n* = *Oligoryzomys nigripes*, *S. a* = *Scapteromys aquaticus*, *D. k* = *Deltamys kempi*, *H. b.* = *Holochilus brasiliensis*

Todas las garrapatas colectadas de los roedores pertenecieron a la familia Ixodidae y estuvieron representadas por larvas y ninfas de *A. triste* e *I. loricatus*. Las garrapatas colectadas del ambiente y del ganado bovino fueron identificadas como especímenes adultos de *A. triste*. También se colectaron ácaros del orden Mesostigmata de las familias Laelapidae (*Androlaelaps fahrenheitzi*, *Androlaelaps* sp. del grupo *rotundus*, *Laelaps manguinhosi*, *Laelaps paulistanensis*, *Mysolaelaps* sp. y *Gigantolaelaps* sp.) y Macronyssidae (*Ornithonyssus bacoti*). En cuanto a las pulgas colectadas se identificaron las familias Rhopalopsyllidae (*Polygenis* spp.) y Stephanocircidae (*Craneopsylla* sp.). Por último, se colectaron e identificaron piojos de la familia Hoplopleuridae (*Hoplopleura* sp.).

Las garrapatas *A. triste* e *I. loricatus* fueron halladas sobre todas las especies hospedadoras evaluadas con la excepción de *O. flavescens* y *D. kempfi* que no presentaron *I. loricatus*. Las asociaciones *A. triste*-*H. brasiliensis* e *I. loricatus* - *H. brasiliensis* fueron registradas por primera vez en este estudio. Entre ellas se destaca la asociación de *A. triste* con *H. brasiliensis* ya que agrega un nuevo hospedador potencial como fuente de infección de *R. parkeri*. Entre los ácaros colectados e identificados *A. fahrenheitzi*, *Androlaelaps* sp. del grupo *rotundus* y *L. manguinhosi* fueron detectados sobre todas las especies de roedores muestreados. *Laelaps paulistanensis* y *O. bacoti* se colectaron sobre todas las especies hospedadoras, a excepción de *D. kempfi* y *H. brasiliensis* para el primero, y *D. kempfi* para el segundo respectivamente. Tanto *Gigantolaelaps* sp como *Mysolaelaps* sp fueron identificados hasta género, encontrando a ambos infestando todas las especies de roedores con excepción de *S. aquaticus* y *D. kempfi* para *Gigantolaelaps* sp para el primero y *S. aquaticus*, *D. kempfi* y *H. brasiliensis* para el segundo. En cuanto a pulgas y piojos, todas las especies de roedores muestreadas presentaron pulgas de los géneros *Polygenis* y *Craneopsylla* y piojos del género *Hoplopleura*, con la excepción de *H. brasiliensis* y *S. aquaticus* que no presentaron *Craneopsylla* sp. y *Hoplopleura* sp., respectivamente.

6.4.2 Factores extrínsecos e intrínsecos asociados a la abundancia de *Amblyomma triste* en sus hospedadores sigmodontinos

Del total de roedores capturados y estudiados, se detectaron un *O. rufus* y dos *A. azarae* con 500 y 100 LL de *A. triste*, respectivamente. Estos individuos fueron considerados valores extremos (outliers) debido a que los valores siguientes de cargas de LL de *A. triste* detectados en *O. rufus* y *A. azarae* fueron 173 y 39, respectivamente, por lo que no fueron considerados en el análisis. La eliminación de estos especímenes no implicó una modificación en el tipo de distribución de los datos (binomial negativa). Una posible causa de la existencia de cargas tan elevadas de LL de *A. triste* podría ser el contacto reciente de los roedores con un sitio de oviposición de *A. triste*, motivo que no estaría necesariamente relacionado con los factores del ambiente y hospedador estudiados en el presente trabajo.

En el *modelo 1* (Tabla 7) puede observarse que de todas las variables que se incluyeron inicialmente en el modelo como enmascaradores, solo *estación del año*, *ganado*, abundancia de *pulgas* y *ACn* presentaron una asociación positiva con la abundancia media de *A. triste* total. En referencia al objetivo final del modelo, se puede observar que los roedores de la especie *O. rufus* presentaron valores de abundancia media de *A. triste* mayores que *A. azarae* (Tabla 7), sugiriendo la presencia de un parasitismo diferencial entre *A. triste* y las dos especies de roedores sigmodontinos estudiadas.

Tabla 7: Modelo lineal generalizado mixto final (*Modelo 1*) que muestra la asociación entre la abundancia media de *Amblyomma triste* por hospedador y la especie de roedor estudiada junto con variables ambientales y del hospedador que pueden actuar como enmascaradores y modificadores de efecto.

Modelo 1:
 Respuesta= Abundancia de *Amblyomma triste*
 Variables Independientes = Especie + Estación del año + Presencia de ganado + Punto de rocío + Precipitaciones + Anticuerpos Naturales
 Factor al azar= "Número de cuadrante "

Término	Coefficientes	Error estandar	P
Intercepto	-2.582	0.463	2.6e-08 *
Especie <i>O.rufus</i> ^a	1.100	0.252	1.3e-05 *
Primavera ^b	2.463	0.278	< 2e-16 *
Verano ^b	2.660	0.277	< 2e-16 *
Invierno ^b	0.476	0.285	0.094
Ganado presente ^c	1.117	0.556	0.044*
Pulgas	0.116	0.037	0.001*
ACn	0.139	0.056	0.013*

Referencias: ^a *A. azarae*.
^b Otoño.
^c Ganado ausente.

Estimación de la sobredispersión del modelo:

$$\text{Sum (resid (modelo1, type="pearson") ^2) / df.residual (modelo1) = 0.96}$$

En el *modelo 2* (Tabla 8) observamos que las LL de *A. triste* se asociaron con todas las variables ambientales estudiadas, así como con *sexo* y *ACn* dentro de las variables del hospedador, y con todos los ectoparásitos excepto *ácaros* y *otro estadio de A. triste*.

Dentro de los *factores ambientales* estudiados, se encontró que la abundancia media de las LL de *A. triste* se modificó a lo largo de las *estaciones* del año, con los registros más bajos en otoño y los más altos en verano, aunque en el segundo año de muestreo se detectaron abundancias similares en primavera y verano (Tabla 8, Figura 8). Con respecto a la *presencia de ganado bovino*, se observó una asociación positiva en aquellos sitios *con* ganado, pero este efecto dependió de la *abundancia de roedores* (Tabla 8, Figura 9); cuando el número de roedores capturados fue bajo, la diferencia de abundancia de LL en los sitios con ganado fue marcadamente mayor que en aquellos sin ganado, pero esta diferencia fue decreciendo a medida que la abundancia de roedores aumentó (Figura 9). Por último, se observó que, en sitios con una *vegetación* del tipo “forestada”, la abundancia media de LL fue mayor en aquellos roedores que presentaron una co-infestación con *I. loricatus*; es decir, a mayor abundancia de *I. loricatus* mayor abundancia media de LL de *A. triste* pero solo en sitios forestados (Tabla 8, Figura 10).

En cuanto a los *factores del hospedador*, se observó que los especímenes de *A. azarae* de *sexo* hembra presentaron mayores abundancias de LL de *A. triste* que los machos, pero esta diferencia se observó solo en individuos parasitados con piojos; a mayor carga de piojos mayor abundancia de LL en hembras; en especial en aquellas sin pulgas (Tabla 8, Figura 11). Títulos de *ACn* estuvieron positivamente correlacionados con las LL de *A. triste* independientemente del resto de las variables (Tabla 8), a mayores títulos de *ACn* mayor fue la abundancia media de LL.

En relación a la *co-infestación con otros ectoparásitos* se observó una asociación entre la abundancia de pulgas y piojos con la abundancia de LL de *A. triste* (Tabla 8). Al aumentar la carga de pulgas aumentó la abundancia media de LL, pero al aumentar la carga de piojos se observó el efecto inverso (Tabla 8, Figura 11). Como se mencionó previamente, en hembras de *A. azarae* sin pulgas al aumentar la abundancia de piojos aumentó la abundancia de LL, sin embargo, al estar parasitadas con pulgas esta asociación se invirtió: en hembras con pulgas al aumentar el número de piojos la carga de LL de *A. triste* disminuyó (Figura 11). En *A. azarae* machos no se encontró asociación entre LL y carga de piojos, a menos que estuvieran parasitados con pulgas, en cuyo caso el sentido de la asociación fue negativo (Figura 11). *Ixodes loricatus* estuvo asociado positivamente a LL de *A. triste* solo en aquellos sitios con vegetación del tipo forestada (Tabla 8, Figura 10).

Tabla 8: Modelo lineal generalizado mixto final (*Modelo 2*) que muestra la asociación entre la abundancia media de LL de *Amblyomma triste* por hospedador (*Akodon azarae*) y variables ambientales, del hospedador y la interacción con otros ectoparásitos.

Modelo 2:			
Variable Respuesta = Abundancia de larvas de <i>Amblyomma triste</i>			
Variables Independientes = Sexo + Estación del año + Presencia de ganado + Abundancia de roedores + Abund. De <i>I. loricatus</i> + Anticuerpos Naturales + Piojos + Pulgas + Ganado*Abun. Roedores + Sexo*Piojos + Piojos*Pulgas + Vegetación* <i>I. loricatus</i> + Año de muestreo * Estación del año. Factor al azar= "Número de cuadrante "			
Termino	Coefficientes	Error estandar	P
Intercepto	-2.551	0.912	0.005*
Año muestreo ^a	-1.182	0.568	0.037*
Primavera ^b	0.225	0.923	0.807
Verano ^b	1.523	0.590	0.009*
Invierno ^b	-0.434	0.570	0.446
Sexo ^c	0.059	0.281	0.832
Ganado presente ^D	2.304	0.961	0.016*
Abund. Roed.	0.019	0.088	0.822
Vegetación ^E	-1.096	0.897	0.221
<i>I. loricatus</i>	0.090	0.108	0.401
ACn	0.233	0.082	0.006*
Piojos	0.160	0.062	0.011 *
Pulgas	0.206	0.099	0.037*
Ganado ^D *Abun. Roed.	-0.311	0.130	0.016*
Sexo ^c *Piojos	-0.162	0.062	0.010 *
Piojos*Pulgas	-0.052	0.021	0.008 *
Veget. ^E * <i>I. loricatus</i>	0.920	0.374	0.013*
Año m. ^a *Primavera	2.849	1.052	0.006*
Año m. ^a *Verano	1.568	0.755	0.037*
Año m. ^a *Invierno	-0.139	1.087	0.898
Referencias:			
^a Año de muestreo 1			
^b Estación: Otoño.			
^c Sexo: Hembra.			
^D Ganado: ausente.			
^E Vegetación: No forestado			

Estimación de la sobredispersión del modelo:

$$\text{Sum (resid (modelo 2, type="pearson") ^2) / df.residual (modelo 2) = 1.13}$$

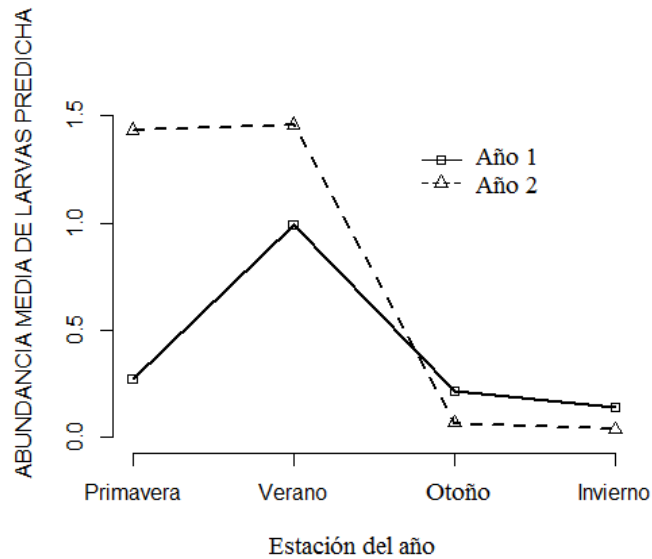


Figura 8 Predicción de la abundancia media de LL de *Amblyomma triste* mediante MLGM, sugiriendo un efecto de la variable *estación del año* en los dos años de muestreo (Predicción para un *Akodon azarae* macho en un sitio sin ganado bovino y no forestado. El resto de las variables se presentan en valores promedio o modales).

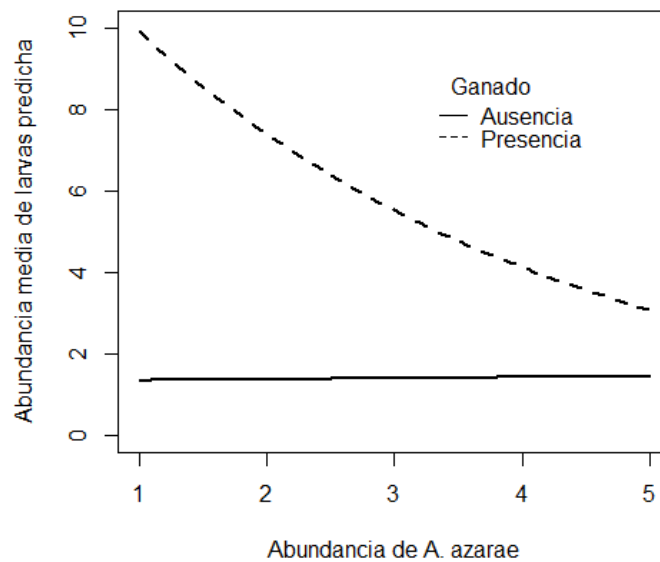


Figura 9 Predicción de la abundancia media de LL de *Amblyomma triste* mediante MLGM, sugiriendo un efecto de diferentes valores de abundancia de roedores en sitios con y sin ganado bovino (Predicción para un *Akodon azarae* macho en primavera en un sitio no forestado. El resto de las variables se presentan en valores promedio o modales).

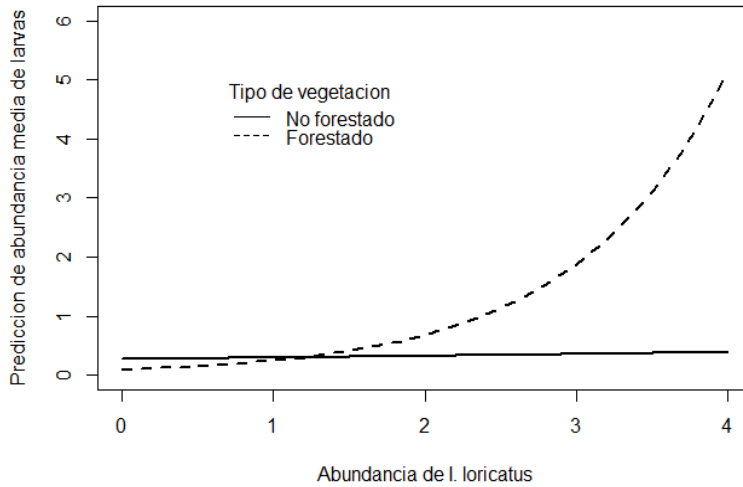


Figura 10 Predicción de la abundancia media de LL de *Amblyomma triste* mediante MLGM, sugiriendo la interacción entre el tipo de vegetación y la abundancia de *I. loricatus*. (Predicción para un *Akodon azarae* macho en un sitio sin ganado bovino en primavera. El resto de las variables se presentan en valores promedio o modales).

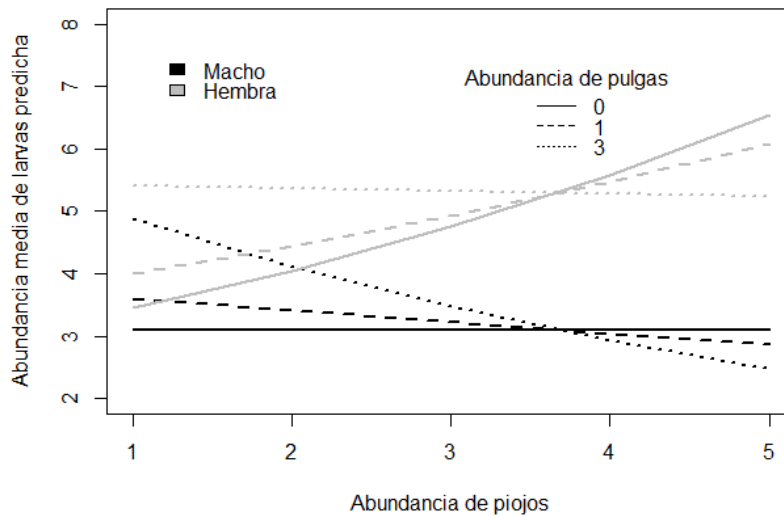


Figura 11 Predicción de la abundancia media de LL de *Amblyomma triste* mediante MLGM, sugiriendo una interacción entre la abundancia de piojos y pulgas, y la abundancia de piojos y el tipo de sexo. (Predicción para un *Akodon azarae* en un sitio con ganado bovino y no forestado en verano. El resto de las variables se presentan en valores promedio o modales).

Con respecto a las variables ambientales que fueron estudiadas como posibles variables explicativas de los cambios de abundancia de LL de *A. triste* entre las *estaciones del año* (Tabla 9), se encontró que para la variable *precipitaciones* el período de influencia sobre la abundancia media de LL de *A. triste* en *A. azarae* es 5 semanas antes de su fase parasítica, es decir, durante el período de incubación de huevos; para *temperatura mínima* fue la semana 2 y para el *DS* la 1, es decir, durante el período de quitinización y búsqueda de hospedador (Tabla 9). Todas las asociaciones observadas fueron positivas. Al incluir a estas variables en el *modelo 3 A*, que contiene a *estación del año* y *año de muestreo* como variables explicativas y abundancia media de LL de *A. triste* como variable respuesta (Tabla 9), se encontró que *estación del año* pierde su asociación con LL (Tabla 9). Esto demuestra que la variabilidad de la abundancia media de LL de *A. triste* explicada por la *estación del año* podría deberse a cambios en las condiciones ambientales, determinados por los valores de las *precipitaciones*, el *DS* y la *temperatura mínima*, que influyen en la fase de vida libre de las LL, aumentando o disminuyendo el número disponible de estas en el ambiente con el consecuente aumento o disminución de LL en sus hospedadores.

Tabla 9: Modelos lineales generalizados mixtos que muestran la asociación entre *estación del año* y abundancia de LL de *A. triste* (*Modelo 3 A*); la pérdida de asociación de *estación del año* y abundancia de LL de *A. triste* al incluir en el modelo a las variables *precipitaciones* acumuladas (mm) del período 5 (Prec. P. 5), *temperatura mínima* promedio (C°) del período 2 (Tmin. P. 2) y *DS* promedio (mmHg) del período 1 (Ds. P. 1) (*Modelo 3 B*); y por último, la asociación entre abundancia de LL de *A. triste* y las variables *precipitaciones* acumuladas (mm) del período 5, *temperatura mínima* promedio (C°) del período 2 y *DS* promedio (mmHg) del período 1 (*Modelo 3 C*).

Modelo 3 A

Variable Respuesta = Abundancia media de larvas de *Amblyomma triste*.

Variables Independientes = Estación del año * Año de muestreo.

Factor al azar = "Número de cuadrante"

	Coficiente	Error estándar	P
Intercepto	-1.557	0.610	0.011 *
Primavera ^a	0.639	0.963	0.507
Verano ^a	2.709	0.652	3.2e-05 *
Invierno ^a	0.537	0.485	0.269
Año muestreo ^b	-0.536	0.553	0.332
Primavera ^a * año ^b	2.136	1.149	0.063
Verano ^a * año ^b	0.287	0.786	0.715
Invierno ^a * año ^b	-0.878	1.049	0.403

Referencias: ^a Otoño ^b Año 1

Modelo 3 B

Variable Respuesta = Abundancia media de larvas de *Amblyomma triste*. *Variables Independientes* = Estación del año * Año de muestreo + Precipitaciones período 5 + Temp. mínima período 2 + DS período 1.

Factor al azar = "Número de cuadrante"

	Coficiente	Error estándar	P
Intercepto	-5.118	0.821	4.6e-10 *
Primavera ^a	0.458	0.846	0.588
Verano ^a	-0.224	0.729	0.758
Invierno ^a	0.265	0.543	0.625
Año muestreo ^b	-0.024	0.517	0.963
Prec. P. 5	0.055	0.012	1.1e-05 *
Tmin. P. 2	0.371	0.263	0.158
Ds. P. 1	0.581	0.264	0.028 *
Primavera ^a * año ^b	-0.090	1.049	0.931
Verano ^a * año ^b	0.135	0.745	0.856
Invierno ^a * año ^b	0.025	1.064	0.981

Referencias: ^a Otoño ^b Año 1

Modelo 3 C

Variable Respuesta = Abundancia media de larvas de *Amblyomma triste*

Variables Independientes = Precipitaciones período 5 + Temp. mínima período 2 + DS período 1.

Factor al azar = "Número de cuadrante"

	Coficiente	Error estándar	P
Intercepto	-4.884	0.694	2.0e-12 *
Prec. P. 5	0.057	0.009	6.6e-09 *
Tmin. P. 2	0.382	0.177	0.031 *
Ds. P. 1	0.527	0.176	0.002 *

En el *Modelo 4*, en el cual se evaluó la asociación de diversas variables con la abundancia media de NN de *A. triste*, se observó que las NN presentaron asociaciones con *presencia de ganado bovino*, *estación del año* y *precipitaciones* como variables ambientales, *condición corporal* y *largo de cuerpo* dentro de las variables del hospedador, y por último, con la abundancia de *I. loricatus* como *co-infestación* con otros ectoparásitos.

En cuanto a los *factores ambientales*, se encontró que la abundancia media de NN estuvo influenciada por la *estación del año* (Tablas 10, Figura 12) con los registros más bajos en otoño y los más altos en verano, siendo esta asociación influenciada por la abundancia de *I. loricatus* (Figura 13). En la figura 14 se graficaron las cargas totales de LL y NN de *A. triste* en *A. azarae* en cada campaña de muestreo, pudiéndose observar la coincidencia de los picos de abundancia de ambos estadios inmaduros de *A. triste* en los meses de verano. Con respecto a la *presencia de ganado bovino*, las NN presentaron mayores valores de abundancia en sitios con ganado independientemente del efecto de otras variables (Tabla 10).

De los *factores del hospedador* estudiados, se encontró que *largo de cuerpo* se correlacionó negativamente con la abundancia media de NN, pero solo en aquellos individuos co-infestados con *I. loricatus* (Tabla 10, Figura 13), cuanto más elevadas fueron las cargas de *I. loricatus* más marcada fue la correlación negativa observada. La *condición corporal* de *A. azarae* también se asoció negativamente con las NN de *A. triste*, pero nuevamente dependiendo de la abundancia de *I. loricatus* (Tabla 10, Figura 13), cuanto mayor la carga de *I. loricatus* menor abundancia de NN al mejorar la condición corporal del hospedador.

Por último, la abundancia media de NN presentó solo la asociación con *I. loricatus* en cuanto a la *co-infestación* con otros ectoparásitos, siempre interactuando con otras variables independientes. Al aumentar la abundancia de *I. loricatus* se encontraron mayores abundancias de NN de *A. triste* en especial en la estación primavera y en *A. azarae* de menor largo de cuerpo y peor condición corporal (Tabla 10, Figura 13).

De todas las variables estudiadas el *estado reproductivo*, *WBC*, *RBC*, *ácaros* y *otro estadio de A. triste* fueron las variables independientes que no presentaron asociaciones con LL ni NN de *A. triste*.

Tabla 10: Modelo lineal generalizado mixto final (*Modelo 4*) que muestra la asociación entre la abundancia media de NN de *Amblyomma triste* por hospedador, *Akodon azarae*, y variables ambientales, del hospedador y otros ectoparásitos.

Modelo 4:
 Respuesta = Abundancia de ninfas de *Amblyomma triste*
 Variables Independientes = Estación del año + Presencia de ganado +
 Abund. de *I. loricatus* + Condición corporal + Largo de cuerpo + *I.*
*loricatus**Cond. corporal + Estación año**I. loricatus* + *I. loricatus**Largo
 de cuerpo
 Factor al azar = “Número de cuadrante ”

Termino	Coefficientes	Error estandar	P
Intercepto	-4.814	3.208	0.133
Primavera ^a	2.674	0.856	0.002*
Verano ^a	3.266	0.734	8.6e-06*
Invierno ^a	2.546	0.693	0.0002*
Ganado ^b	11.820	5.062	0.019*
<i>I. loricatus</i>	0.106	0.072	0.138
Condición corporal	-0.018	0.323	0.954
Largo cuerpo	1.287	0.639	0.044*
<i>I. lori</i> * Cond. corp	-0.173	0.091	0.050*
Primavera ^a * <i>I. lori</i>	1.156	0.769	0.132
Verano ^a * <i>I. lori</i>	-1.118	0.520	0.032*
Invierno ^a * <i>I. lori</i>	-1.080	0.451	0.016*
<i>I. lori</i> * Largo cuerpo	-1.122	0.501	0.025*

Referencias:
^a Estación: Otoño.
^b Ganado: ausente.

Estimación de la sobredispersión del modelo:

$$\text{Sum (resid (modelo 4, type="pearson") ^2) / df.residual (modelo 4) = 0.7}$$

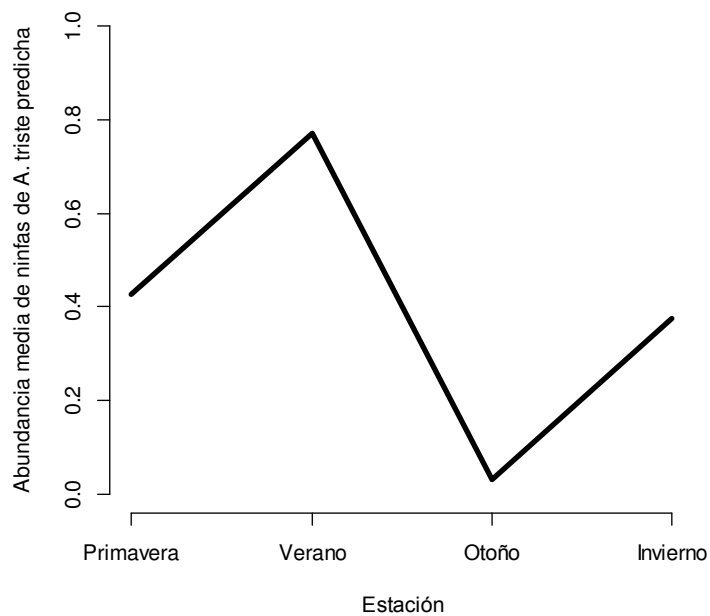


Figura 12 Predicción de la abundancia media de NN de *Amblyomma triste* mediante MLGM, sugiriendo el efecto de la variable *estación del año* (Predicción para un *Akodon azarae* en un sitio con ganado bovino. El resto de las variables se presentan en valores promedio o modales).

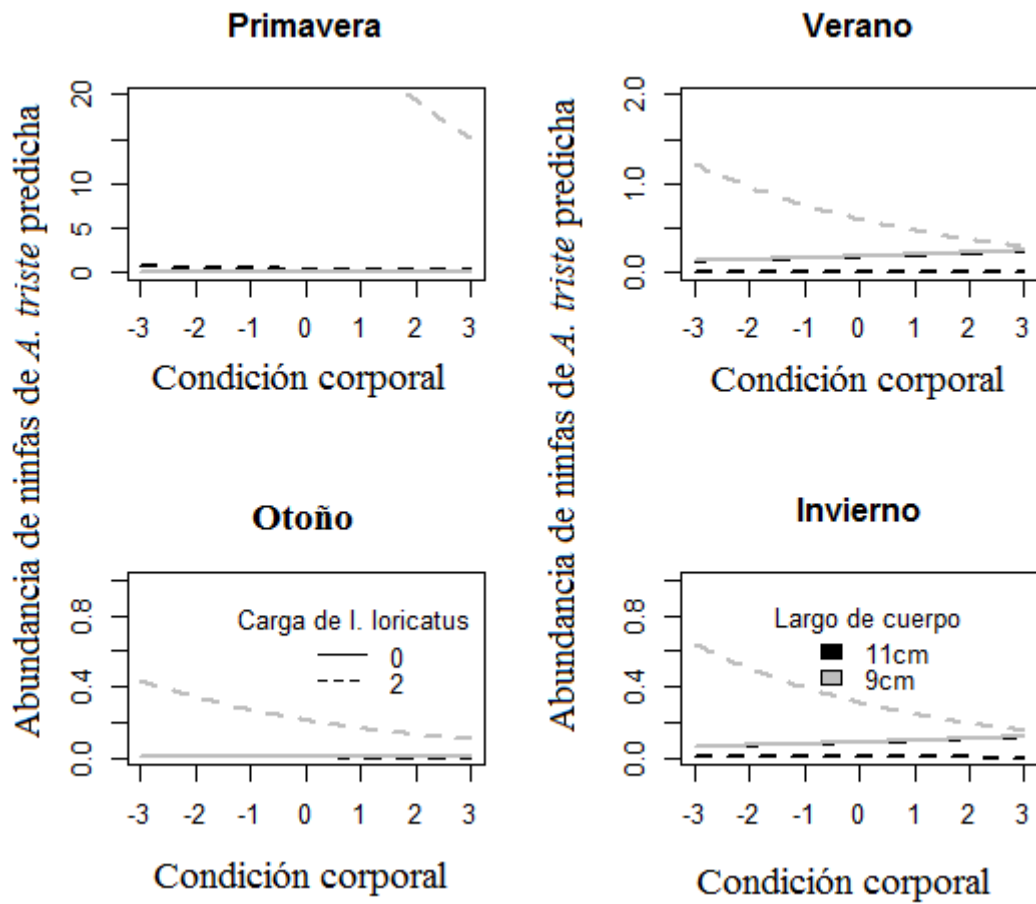


Figura 13 Predicción de la abundancia media de NN de *Amblyomma triste* mediante MLGM, sugiriendo la interacción entre *Ixodes loricatus* con estacionalidad, condición corporal y largo de cuerpo (Predicción para un *Akodon azarae* en un sitio sin ganado bovino. El resto de las variables se presentan en valores promedio o modales).

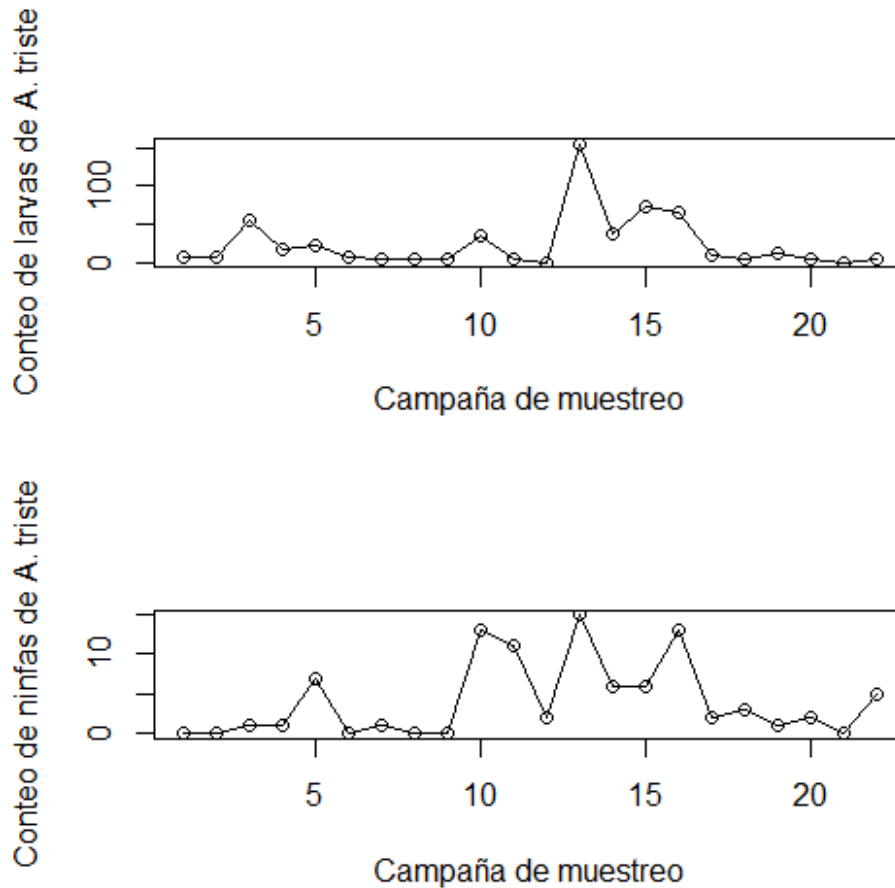


Figura 14 Conteo total de larvas y ninfas de *A. triste* en *A. azarae* por campaña de muestreo. La campaña 5 corresponde al mes de febrero, la 10 a agosto, la 15 a enero y la 20 a julio.

Al igual que para LL, se estudiaron tres variables ambientales como posibles variables explicativas de los cambios de abundancia de NN de *A. triste* entre las *estaciones del año* (Tabla 11). Sin embargo, a diferencia que para LL, al incluir en el modelo a aquellas variables ambientales en los períodos que mejor ajustaron en el modelo (*precipitaciones* en el período 3, *temperatura mínima* en el período 2 y *DS* en el período 1), la variable *estación del año* no perdió su asociación con abundancia media de NN (Tabla 11). Es decir, no podemos considerar en este caso que las variables estudiadas expliquen la asociación entre *estación del año* y NN.

Tabla 11: Modelos lineales generalizados mixtos que muestran la asociación entre *estación del año* y abundancia de NN de *A. triste* (*Modelo 5 A*); la persistencia de la asociación entre *estación del año* y abundancia de NN de *A. triste* al incluir en el modelo a las variables *precipitaciones* acumuladas (mm) del período 3 (Prec. P. 3), *temperatura mínima* promedio (C°) del período 2 (Tmin. P. 2) y *DS* promedio (mmHg) del período 1 (Ds. P. 1) (*Modelo 5 B*); y por último, la asociación entre abundancia de NN de *A. triste* y la variable *estación del año* luego de eliminar las variables enmascaradoras no significativas (*Modelo 5 C*).

Modelo 5 A

Variable Respuesta = Abundancia media de ninfas de *Amblyomma triste*.
Variables Independientes = Estación del año * Año de muestreo.
Factor al azar = "Número de cuadrante"

	Coefficiente	Error estándar	P
Intercepto	-4.445	1.083	4e-05 *
Primavera ^a	2.462	1.315	0.061
Verano ^a	3.311	1.227	0.007 *
Invierno ^a	2.909	1.087	0.007 *
Año muestreo ^b	0.988	1.227	0.420
Primavera ^a * año ^b	0.396	1.533	0.796
Verano ^a * año ^b	-0.970	1.422	0.495
Invierno ^a * año ^b	-2.040	1.531	0.182

Modelo 5 B

Variable Respuesta = Abundancia media de ninfas de *Amblyomma triste*. *Variables Independientes* = Estación del año * Año de muestreo + Precipitaciones período 3 + Temp. mínima período 2 + DS período 1.
Factor al azar = "Número de cuadrante"

	Coefficiente	Error estándar	P
Intercepto	-3.782	1.287	-0.003 **
Primavera ^a	2.751	1.342	0.040 *
Verano ^a	2.361	1.547	0.126
Invierno ^a	1.602	1.206	0.184
Año muestreo ^b	2.551	1.598	0.110
Prec. P. 3	-0.023	0.017	0.194
Tmin. P. 2	-0.954	0.374	0.010 *
DS. P. 1	0.976	0.330	0.003 *
Primavera ^a * año ^b	-0.571	1.648	0.728
Verano ^a * año ^b	-1.466	1.960	0.454
Invierno ^a * año ^b	-2.716	1.592	0.088

Referencias: ^a Otoño ^b Año 1

Modelo 5 C

Variable Respuesta = Abundancia media de ninfas de *Amblyomma triste*. *Variables Independientes* = Estación del año + Precipitaciones período 3 + Temp. mínima período 2 + DS período 1. *Factor al azar* = "Número de cuadrante"

	Coefficiente	Error estándar	P
Intercepto	-3.526	0.908	0.0001 *
Primavera ^a	2.801	0.794	0.0004 *
Verano ^a	2.066	0.762	0.0067 *
Invierno ^a	1.265	0.848	0.1358
Prec. P. 3	-0.005	0.010	0.6313
Tmin. P. 2	-0.570	0.327	0.0816
DS. P. 1	0.660	0.282	0.0196 *

Referencias: ^a Otoño

6.5 Discusión

6.5.1 Fauna ectoparasítica de roedores sigmodontinos del Delta del Paraná

De las siete asociaciones parásito-hospedador detectadas para *A. triste*, cinco coincidieron con las halladas por Nava y col. (2011) en el INTA Delta y por Nava y col. (2005) y Debárbora y col. (2012) en la provincia de Corrientes. A partir de este trabajo se registra por primera vez la asociación *A. triste*- *H. brasiliensis*. Con respecto a *I. loricatus*, Lareschi y Sánchez López (2000) observaron previamente la asociación de esta garrapata con *A. azarae*, *O. rufus* y *O. nigripes* (como *O. delticola*) en el INTA Delta y también en otras localidades del estuario del Río de La Plata, incluyendo a *O. flavescens* y *S. aquaticus* (Lareschi, 1996; Lareschi y col., 2003). La asociación *I. loricatus* - *H. brasiliensis* es un primer registro, en tanto que las asociaciones *I. loricatus* - *O. rufus* e *I. loricatus* - *S. aquaticus* no fueron previamente documentadas fuera de la eco-región Islas y Delta del Paraná.

En cuanto a los ácaros colectados, las asociaciones de *A. fahrenheitzi* con *O. rufus*, *O. nigripes* y *S. aquaticus*, *Androlaelaps* sp. del grupo *rotundus* con *A. azarae* y *O. rufus*, *L. manguihosi* con *O. nigripes* (como *O. delticola*) y *S. aquaticus*, *L. paulistanensis* con *O. rufus* y *O. nigripes* y, por último, *O. bacoti* con *A. azarae* y *O. rufus*, fueron registradas previamente en el INTA Delta por Mauri (1966) y Lareschi y Sánchez López (2000). Todas las asociaciones observadas para ácaros en este estudio tienen antecedentes para otras localidades en la eco-región Islas y Delta del Paraná (Lareschi, 1996; Liljesthröm y Lareschi, 2002; Nava y col., 2003; Lareschi y col., 2003; Lareschi, 2006; Lareschi 2010a), con la excepción de la observada entre *Androlaelaps* sp. del grupo *rotundus* con *H. brasiliensis* y *O. nigripes*.

Probablemente, los especímenes de *Androlaelaps* sp. del grupo *rotundus* colectados en este trabajo, pertenezcan a distintas especies del género *Androlaelaps* existiendo cierto grado de especificidad hospedatoria. Gettinger y Owen (2000) propusieron que *A. rotundus* en el Paraguay estaría formado por al menos tres especies que co-evolucionaron junto a sus hospedadores, hipótesis que fue avalada por la descripción de nuevas especies específicas de sus hospedadores y por la postulación del grupo *rotundus* (Lareschi y Gettinger 2009; Lareschi, 2010b, 2011; Lareschi y Velazco, 2013). También se encontraron diferencias morfológicas entre poblaciones de *A. fahrenheitzi* y de *O. bacoti* halladas en diferentes especies hospedadoras, lo que indicaría que, bajo el nombre de una única especie de ácaro están

representadas un complejo de especies (Nieri-Bastos y col., 2011; Lareschi y col., 2013). Lo mismo sucedería para *L. manguinhos* (Gettinger y col., 2011; Martins-Hatano y col., 2012) y *L. paulistanensis* (Gettinger, 1992). La combinación de estudios morfológicos y moleculares así como biológicos, son necesarios para confirmar la presencia de especies históricas, nuevas especies o la resurrección de otras tanto a nivel local como regional, así como para conocer sus aspectos evolutivos.

No se trataron en la presente discusión los resultados hallados sobre los ácaros *Gigantolaelaps* sp y *Mysolaelaps* sp, así como de los géneros de piojos y pulgas colectados ya que sus especies no fueron determinadas.

6.5.2 Abundancia de estadios inmaduros de *Amblyomma triste* en dos especies de roedores sigmodontinos del Delta del Paraná

Es sabido que las características de los hospedadores son importantes determinantes de las dinámicas poblacionales de las garrapatas, ya que pueden influir en las probabilidades de encuentro entre un hospedador y estas, así como también en el éxito del parasitismo (Brunner y Ostfeld, 2008). En el presente estudio se encontró que roedores de la especie *O. rufus* presentaron una mayor abundancia de *A. triste* en comparación con *A. azarae*. Ambas especies de roedores presentan características físicas y hábitos que las diferencian, pudiendo generar las diferencias halladas en la abundancia media de *A. triste*. Mientras que *O. rufus* presenta una alimentación principalmente insectívora y prefiere hábitats como pastizales altos y salinos, *A. azarae* es más bien una especie generalista en cuanto al tipo de hábitat por su alimentación omnívora y hábitos oportunistas (Cueto y col., 1995; Suarez y Bonaventura, 2001; Bonaventura, 2003; Gómez-Villafañe y col., 2012; Maroli y col., 2015). En un estudio reciente realizado en las cercanías del área de estudio se encontró que *O. rufus* presenta principalmente un desplazamiento horizontal a nivel del suelo, mientras que *A. azarae* se desplaza tanto horizontal como verticalmente, pudiendo subir hasta más de un metro en la vegetación desplazándose por encima de esta (Maroli y col., 2015). Diferencias de hábitos y conductas de los hospedadores pueden influir en su probabilidad de encuentro con las garrapatas (Fourie y Kok, 1992), por lo que se podría concluir que las diferencias de comportamiento mencionadas, así como otras aún desconocidas, podrían predisponer a *O. rufus* a una mayor exposición a los estadios inmaduros de *A. triste*.

Además de presentar diferentes características en cuanto a comportamiento, también existen diferencias físicas macroscópicas entre ambas especies. Una de ellas es el tamaño corporal, mientras que *O. rufus*

tuvo un promedio de largo de cuerpo de 14,5 cm, *A. azarae* presentó valores promedio de 9,8 cm. Estudios previos han demostrado que animales de mayor tamaño ofrecen nichos de superficie más extensa capaces de albergar un mayor número de parásitos (Anderson y Gordon, 1982; Hudson y col., 2002; Cardon y col., 2011). Esto concuerda con los resultados hallados en el presente estudio en donde *O. rufus* presenta mayor tamaño corporal y abundancia de ectoparásitos. Por otro lado, se ha encontrado que animales de menor tamaño utilizan prácticas antiparasitarias como el grooming con mayor frecuencia que aquellas de mayor tamaño (Mooring y col., 2000), este podría ser otro factor que esté influenciando en la distribución de *A. triste* hallada.

Por último, los animales de distintas especies presentan una mayor o menor resistencia a la infestación por garrapatas basada en diferencias principalmente celulares de la respuesta inmune. Estudios en hospedadores de *Rhipicephalus sanguineus* encontraron que, aquellas especies o razas resistentes a la infestación por garrapatas presentan un predominio de basófilos en la respuesta inmune local, mientras que en aquellos hospedadores no resistentes predominan neutrófilos y eosinófilos (Szabó y col., 1995; Ferreira y Silva, 1998; Ferreira y col., 2003; Veronez y col., 2010). Factores de este tipo podrían estar influyendo en la diferencia de abundancia de *A. triste* entre las especies de roedores estudiadas. Estudios que incluyan otras especies de roedores y consideren en conjunto diversos factores, en especial análisis más profundos de la respuesta inmune generada, son necesarios para dar luz a las diferencias halladas del parasitismo por *A. triste*.

Más allá de los motivos que hayan generado las diferencias de parasitismo, se puede concluir que *O. rufus* cumple un papel importante en la ecología de *A. triste* al comportarse como fuente de alimento de un mayor número de especímenes de *A. triste* en comparación a *A. azarae*.

6.5.3 Factores del hospedador y del ambiente que influyen en la abundancia media de larvas y ninfas de *Amblyomma triste* en *Akodon Azarae*.

En cuanto a los *factores de los hospedadores* estudiados, en estudios previos se halló que los roedores machos pueden presentar una reducción de la resistencia del sistema inmune innato y adquirido a la garrapata *Ixodes ricinus* debido al efecto de la testosterona, la cual puede generar una diferencia de parasitismo según el sexo del hospedador (Hughes y Randolph, 2001). Esta relación podría explicar por qué el parasitismo de roedores por garrapatas ixódidas en general es mayor en los machos (Hughes y Randolph 2001; Soliman y col., 2001; Krasnov y col., 2005a; Boyard y col., 2008; Harrison y col., 2010; Krasnov y col., 2012; Lutermann y col., 2015). Sin embargo, estudios del parasitismo de otras especies de garrapatas, como *I. loricatus* en *A. azarae*, no han encontrado esta diferencia entre sexos (Beldomenico y col., 2005; Colombo y col., 2014). En el presente trabajo encontramos un efecto del factor *sexo* solo en aquellos individuos infestados con piojos: en hembras infestadas con piojos se encontró mayor abundancia de LL de *A. triste* en comparación con machos con las mismas cargas de piojos, lo cual se contrapone con la hipótesis de la inmunosupresión en machos expuesta. Es importante destacar que el análisis uni-variable de la comparación de cargas de *A. triste* entre machos y hembras nos muestra una mayor carga en machos (abundancia media de LL en machos = 2.0, en hembras= 1.2); así el controlar los análisis por potenciales enmascaradores y efectos modificadores se vuelve importante al intentar conocer las características de las asociaciones parásito – hospedador lo más cercanas a la realidad posibles. Estudios experimentales son necesarios para poder comprender la interacción hallada en este estudio.

Los ACn son en su mayoría IgM que proveen de inmunidad humoral inespecífica independiente de estímulos antigénicos y son considerados estables a lo largo del tiempo (Ochsenbein y Zinkernagel, 2000). Esto les confiere el potencial de ser buenos indicadores de la inmunocompetencia en animales silvestres (Racca y col., 2014), sin embargo, hay muchos aspectos de la fisiología de los ACn por descubrir. Por ejemplo, mientras que la producción de anticuerpos es suprimida en situaciones de estrés crónico (Padgett y Glaser, 2003), Eberhardt y col. (2013) encontraron que, en carpinchos, la restricción prolongada de alimento aumenta los niveles de ACn y coccidios, siendo este un hallazgo contrario a lo esperado. Los autores proponen que ante situaciones de estrés el organismo invierte en inmunidad innata, la cual es más generalista a la hora de responder ante un antígeno. En la presente tesis, de los indicadores del estado inmunitario de los hospedadores estudiados, solo se encontró la asociación de títulos de ACn con la abundancia media de LL de *A. triste*, siendo esta asociación positiva. Es decir, a

mayores títulos de ACn mayor fue la abundancia media de LL. Si bien mayores niveles de parasitismo han sido asociados a un estado de depleción del sistema inmune (Krasnov y col., 2005a; Beldomenico y Begon, 2010; Anderson y col., 2013), a partir los hallazgos de Eberhardt y col. (2013) se podría postular que esta afirmación podría diferir en el caso de los ACn. Una posible explicación a lo hallado en la presente tesis sería que, aquellos animales que se encontraban en condiciones menos favorables (ej: menor disponibilidad de alimento), experimentaron mayores niveles de estrés con el consecuente aumento de ACn y cargas de *A. triste*. Sin embargo, no se puede afirmar esta asociación ya que no fueron medidos indicadores de estrés crónico en los hospedadores. Otra posible explicación a lo observado podría basarse en que ante el parasitismo de LL de *A. triste* el organismo aumenta la cantidad de ACn, sin embargo estos no son eficientes a la hora de combatir este tipo de parásitos. Estos hallazgos pretenden principalmente sentar bases para futuros estudios que evalúen con mayor profundidad esta relación y así comprender más exhaustivamente y con mayor precisión su significado.

La *edad* de los roedores de la misma especie está fuertemente correlacionada con su tamaño (Zullinger y col., 1984). Es por eso que utilizamos *largo de cuerpo* como un factor indicativo de tamaño y edad. A pesar que la edad de un hospedador es considerada un factor clave en las interacciones parásito – hospedador (Soliman y col., 2001; Hudson y col., 2002; Brunner y Ostfeld, 2008; Cardon y col., 2011), otros estudios en roedores silvestres no han podido encontrar asociación entre edad y abundancia de garrapatas (Beldomenico y col., 2005; Hawlena y col., 2006). En el presente trabajo, se halló una asociación negativa entre el *largo de cuerpo* y NN de *A. triste*, pero esta asociación dependió de la presencia de otro ectoparásito. La abundancia media de NN de *A. triste* decreció a medida que aumentó el largo del cuerpo/edad solo en aquellos roedores parasitados también con *I. loricatus*. Una causa probable de estos resultados es el diferente grado de madurez del sistema inmune que atraviesan los individuos a lo largo de su vida, es decir, animales de menor largo de cuerpo/edad poseen un sistema inmune que ha estado menos expuesto a parásitos que aquellos de mayor largo de cuerpo/edad, lo que los hace más susceptibles a infestarse con un mayor número y variedad de parásitos (Hudson y col., 2002). Así podría explicarse que animales de menor largo de cuerpo/edad hayan presentado mayores abundancias de NN de *A. triste* al estar parasitados con *I. loricatus*. Sin embargo, los hallazgos en relación al grado de infestación por parásitos en función del largo de cuerpo/edad son inconsistentes en la bibliografía existente, ya que también se ha encontrado que hospedadores de mayor tamaño/edad presentaron mayores cargas de parásitos (Beldomenico y col., 2004; Hawlena y col., 2006; Roulin y col., 2007; Vicente y col., 2007; Brunner y Ostfeld, 2008). Esto demuestra la complejidad de estas interacciones requiriendo más estudios que permitan su comprensión.

La *condición corporal* estuvo asociada negativamente con la abundancia de NN de *A. triste*, pero esta asociación dependió de la presencia de *I. loricatus*: a mayor carga de *I. loricatus* mayor el grado de correlación negativa entre condición corporal y NN de *A. triste*; es decir, al mejorar la condición corporal de los individuos, disminuyeron las cargas de NN, en especial en aquellos animales co-infestados con *I. loricatus*. Altas cargas de parásitos pueden causar un empeoramiento de la condición corporal debido al consumo de recursos del hospedador (Whiteman y Parker, 2004) o a la energía invertida en el sistema inmune (Sheldon y Verhulst, 1996), especialmente en aquellos casos donde otro parásito actúa sinérgicamente en el deterioro fisiológico (Marzal y col., 2008). Por otro lado, probablemente aquellos individuos con una condición corporal deficiente tengan además disminuidas sus capacidades de resistencia antiparasitaria (Nelson y col., 1975; Simon y col., 2003; Krasnov y col., 2005b). Estudios longitudinales y/o experimentales permitirían dilucidar la dirección causa-efecto de este fenómeno, así como evaluar la posibilidad de que forme parte de un proceso circular sinérgico donde ambos factores cumplen el rol de causa y efecto (Beldomenico y Begon, 2010).

En relación a los **factores ambientales** analizados, encontramos que las cargas de *A. triste* en *A. azarae* estuvieron fuertemente asociadas con la mayoría de las variables ambientales incluidas en el presente trabajo. Al analizar los resultados hallados es fundamental tener en cuenta que no se incluyó en el análisis a la abundancia poblacional de los adultos de *A. triste* de la cohorte anterior, adultos que dieron origen a las LL y NN estudiadas aquí. Respecto al efecto de la *estación* del año, se encontró que los picos de LL y NN ocurrieron en verano, con la excepción del segundo año de muestreo en donde la abundancia media de LL en primavera igualó a la encontrada en verano. Para NN se encontró asociación entre *estación del año* y cargas de *I. loricatus*, en la cual las mayores abundancias de NN en *A. azarae* parasitados con *I. loricatus* se dan en primavera, sin embargo dada la prevalencia de *I. loricatus* hallada en *A. azarae* (19,5%) consideramos lo observado para *A. azarae* no infestados con *I. loricatus* como de ocurrencia más frecuente, encontrando en estos animales un pico de NN en verano. Dos estudios previos, uno desarrollado en la misma área de estudio que la presente tesis y otro en Uruguay, encontraron picos de LL y NN de *A. triste* en verano (Venzal y col., 2008; Nava y col., 2011), lo cual concuerda con lo hallado. Por otro lado, en la misma área de estudio durante el mismo período de muestreo que el presente trabajo, se reportaron picos de *A. triste* adultas de vida libre en agosto y un pico menos elevado entre noviembre y diciembre, y de *A. triste* adultas colectadas de ganado bovino en agosto y noviembre (Monje y col., 2015b), lo que se corresponde con los picos de LL y NN en *A. azarae* encontrados en el presente estudio. La diferencia del patrón estacional de las LL entre el año 1 y 2 (abundancias similares entre primavera y verano en el segundo año) podría estar asociada a condiciones

ambientales diferenciales entre esos años (ej., temperatura, humedad, etc.) que favorecieron la ocurrencia de mayores abundancias de LL en primavera. De todas formas para poder realizar inferencias sobre este punto es necesario contar con los datos de abundancia de la cohorte anterior de *A. triste* adultas. En base a la información de otros autores disponible (Venzal y col., 2008; Nava y col., 2011) y a haber registrado tanto para LL como para NN resultados similares en los dos años de muestreo durante el verano, se puede concluir que la estación de abundancia máxima de los estadios inmaduros de *A. triste* es en verano.

Las garrapatas, en especial sus estadios inmaduros, son sensibles a la desecación y a valores extremos de temperatura. Estas corren riesgo de sufrir desecación durante el período de búsqueda de un hospedador mediante la pérdida de agua corporal directa a través de la cutícula y por medio de los espiráculos durante la respiración (Lees, 1946; Knülle y Wharton, 1982). Mientras que la temperatura influye en su actividad, supervivencia y ciclo de vida (Gray, 1982; Randolph, 2002), siendo las bajas temperaturas lo que más las afecta (Randolph and Storey, 1999; Sutherst y Bourne, 2006; Yoder y col., 2008). Un ejemplo de la influencia de la temperatura y humedad en la ecología de estos artrópodos es lo observado para las larvas de *Ixodes ricinus*, las cuales entran en un período de quiescencia en la vegetación ante condiciones ambientales de alta temperatura y baja humedad, culminando en la muerte de estas si las mencionadas condiciones ambientales se prolongan en el tiempo; en cambio si estas se tornan favorables entonces recuperan sus patrones normales de actividad de búsqueda (Randolph y Storey, 1999). Todo lo mencionado culmina en que un mayor o menor número de garrapatas encuentren un hospedador, reflejándose en los valores de abundancia media. En la presente tesis se encontró que los cambios de abundancia media de LL en las diferentes estaciones del año podrían ser explicados por la influencia de la *temperatura mínima*, el *DS* y las *precipitaciones*. Para las tres variables la correlación hallada con LL fue positiva. Al aumentar la *temperatura mínima* durante el período de quitinización y búsqueda de un hospedador aumentó la abundancia media de LL, lo cual tiene sentido ya que al aumentar la temperatura mínima aumenta la actividad de búsqueda de las LL culminando en un mayor encuentro de hospedadores. El *DS* es la medida del potencial de desecación del ambiente más utilizada en el estudio de la ecología de las garrapatas (ej., Fielden y Rechav, 1996; Randolph and Storey, 1999; Perret, 2000; Sutherst y Bourne, 2006), su aumento depende del aumento de la temperatura con humedad constante, temperatura constante con disminución de la humedad o aumento de la temperatura con disminución de la humedad. A valores elevados de *DS* aumenta el riesgo de desecación de las garrapatas disminuyendo el número en sus hospedadores. En la presente tesis se encontró que al aumentar el *DS* durante el período de quitinización y búsqueda aumentó la abundancia media de LL. Esto podría deberse a que el

aumento del DS sucedió debido al aumento de la temperatura con valores de humedad constantes y elevados sin llegar a valores críticos para la supervivencia de las LL, entonces su actividad aumentó favorecida por el aumento de la temperatura sin sufrir desecación. Por otro lado, estudios en *Amblyomma hebraeum* y *R. sanguineus* hallaron que su sobrevivencia comenzó a disminuir a valores de DS mayores a 7 y 5 mmHg, respectivamente (Fielden y Rechav, 1996; Sutherst y Bourne, 2006), siendo que el valor más elevado detectado en el transcurso del muestreo de la presente tesis fue de 7 mmHg. Vale la pena mencionar que los valores de DS detectados en el área de estudio fueron bajos en comparación a otras regiones como el norte de nuestro país donde se detectaron valores de hasta 16 mmHg (Nava y col., 2013), entonces puede suponerse que los valores máximos de DS registrados en este estudio no superaron el valor umbral a partir del cual comienza a tener un efecto deletéreo sobre la actividad y supervivencia de las LL. Futuros estudios experimentales que determinen el valor umbral de DS para *A. triste* permitirán comprender mejor los resultados hallados.

Diversos autores han estudiado el efecto de las *precipitaciones* en la ecología de las garrapatas encontrando resultados inconsistentes ya que se han detectado tanto correlaciones positivas como negativas con su abundancia, generalmente por utilizar esta variable como estimador de la humedad ambiental (ej., Mooring y col., 1994; Barandika y col., 2006; Leschnik y col., 2008; Alonso-Carné y col., 2015). En este capítulo se encontró que la abundancia media de LL de *A. triste* en el Delta del Paraná cuanto más abundantes son las precipitaciones durante el período de incubación de huevos mayor es la abundancia media de LL. Con la información disponible en la bibliografía actual y los datos analizados en la presente tesis no puede explicarse objetivamente el resultado encontrado. Estudios que consideren a las precipitaciones a un nivel microclimático y teniendo en cuenta el cambio potencial de comportamiento que pueden producir en los hospedadores y las garrapatas, afectando o favoreciendo su encuentro, son necesarios.

Estudios que evalúan el efecto de la *abundancia del hospedador* en la abundancia de garrapatas, indican que, cuanto mayor sea el número de hospedadores recolectando garrapatas del ambiente, menor la carga esperada en estos hospedadores (Sorci y col., 1997; Stanko y col., 2002; Brunner y Ostfeld, 2008). Por otro lado, al ser *A. triste* una garrapata de tres hospedadores puede inferirse que, al haber escasos hospedadores de los estadios inmaduros de *A. triste* se generarán escasas garrapatas adultas que infesten mamíferos de mayor tamaño. Contrariamente, la falta de hospedadores de los estadios adultos de *A. triste* dará como resultado poca abundancia de estadios inmaduros en roedores. Estudios en *I. scapularis* demostraron que la carga de LL y NN en roedores depende de la densidad del hospedador principal de sus estadios adultos, *Odocoileus virginianus* (Stafford, 1993; Kilpatrick y col., 2014). En la región del

Delta del Paraná, los hospedadores registrados de adultos de *A. triste* fueron *B. dichotomus*, *H. hydrochaeris*, bovinos, equinos y caninos (Nava y col., 2011). De los animales domésticos mencionados, el ganado bovino es el más frecuentemente parasitado (P.M. Beldomenico, datos no publicados). En el presente estudio se halló que la *presencia de ganado* bovino estuvo correlacionada positivamente con la abundancia de *A. triste* en *A. azarae*, tanto para LL como para NN. En el primer caso, el efecto del ganado dependió de la abundancia de roedores, mientras que para NN la correlación positiva con ganado no dependió de otras variables. Ante valores de captura de *A. azarae* bajos las cargas de *A. triste* LL en sitios con ganado fue elevado en comparación a sitios sin ganado; fenómeno que desapareció al aumentar el número de capturas de *A. azarae*, lo cual puede ser explicado por la dilución de LL en sus hospedadores a medida que el número de estos aumenta. Mientras que en aquellos sitios sin ganado la abundancia de *A. triste* fue prácticamente independiente de la abundancia de *A. azarae*, probablemente indicando escases de hospedadores de estadios adultos, siendo que en el área de estudio la abundancia de los hospedadores naturales de adultos de *A. triste*, *B. dichotomus* y *H. hydrochaeris*, es menor que la del ganado bovino (observación directa y por consulta a pobladores y trabajadores del INTA Delta). Sumado a esto, se detectó que el ganado bovino presente en el área de estudio estuvo parasitado por *A. triste* y que, mediante evidencias serológicas (inmunofluorescencia indirecta), estuvo expuesto a *R. parkeri*, aunque aún no es clara la participación en su ecología (Edwards y col., 2011; Monje y col., 2015b). Esto nos sugiere que el introducir ganado bovino en regiones donde se distribuye *A. triste* implicaría un aumento de esta garrapata en el ambiente, aumentando la disponibilidad del número de vectores y reservorios de *R. parkeri*.

Por último, la variable ambiental tipo de *vegetación* también se encontró significativamente asociada a la abundancia media de LL de *A. triste* en *A. azarae*, pero esta asociación dependió de la co-infestación con *I. loricatus*. Aquellos individuos parasitados con altas cargas de *I. loricatus* capturados en sitios de bosque implantado presentaron mayores cargas de LL que aquellos provenientes de sitios no forestados. La estructura de la vegetación puede afectar la abundancia de garrapatas (L'Hostis y col., 1995; Gray, 1998; Boyard y col., 2008; Kiffner y col., 2011), en Europa se encontró que la abundancia de *I. ricinus* dependió de la composición de la especie de árboles y la cobertura arbustiva (Tack y col., 2012) y que la reducción de estos últimos disminuyó la abundancia de *I. ricinus* (Tack y col., 2013). Estas observaciones fueron atribuidas a modificaciones del hábitat que pueden perjudicar a las garrapatas (Tack y col., 2013), o al uso diferencial del ambiente por parte de los hospedadores (Tack y col., 2012). En el presente trabajo, la densidad de *A. azarae* fue mayor en sitios no implantados (298 individuos vs 91), pero al ser incluida la variable tipo de vegetación en el modelo se pudo evaluar la abundancia de *A.*

triste en sitios implantados y no implantados a igual abundancia de roedores, por lo que no podrían atribuirse los resultados hallados a las diferentes cantidades de roedores capturados según el tipo de vegetación. Ciertas características en la composición herbácea en sitios forestados podrían generar condiciones que favorecen al encuentro de *A. triste* e *I. loricatus* con *A. azarae*, sin embargo los motivos por los cuales las abundancias de LL de *A. triste* fueron mayores en sitios de bosque implantado en aquellos roedores con mayores cargas de *I. loricatus* sigue sin poder ser explicado.

En cuanto a la **co-infestación** con otros ectoparásitos, es conocido que los parásitos interactúan de diversas formas sobre sus hospedadores, pudiéndose observar interacciones interespecíficas antagonistas como resultado de la competencia entre ellos y/o por inmunidad cruzada (Mideo, 2009; Ulrich y Schmid Hempel, 2012); o interacciones sinérgicas en donde la infestación por una especie de parásito es facilitada por la presencia de otra, ya sea por la depleción del sistema inmune general del hospedador (Beldomenico y Begon, 2010; Ulrich y Schmid-Hempel, 2012), un trade-off fisiológico o una inmunosupresión selectiva (Jolles y col., 2008; Ezenwa y Jolles, 2011; Pathak y col., 2012). En el presente capítulo se encontraron asociaciones positivas entre la abundancia media de *A. triste* con la abundancia de piojos, pulgas (para LL) e *I. loricatus* (para LL y NN), aunque todas las asociaciones dependieron de la interacción con otros factores. Estas correlaciones positivas pueden deberse a que ambos ectoparásitos podrían compartir los mismos factores de riesgo sobre el hospedador (Hellard y col., 2012), por ejemplo, es esperable que un individuo inmunosuprimido esté más predispuesto a ser infestado por diferentes tipos de parásitos, produciendo asociaciones aparentes entre estos que pueden en realidad ser explicadas por los diferentes estados de inmunocompetencia del hospedador. Los análisis desarrollados en este capítulo incluyeron, como posibles enmascaradores, factores de riesgo incluyendo indicadores de la condición fisiológica e inmunocompetencia, pero posiblemente no todos los existentes han sido considerados. No se consideró el comportamiento de los hospedadores siendo que, las actividades de búsqueda, ya sea de alimento como de congéneres del sexo opuesto, están correlacionadas positivamente con la probabilidad de entrar en contacto con parásitos (Fourie y Kok, 1992). Sin embargo, la consistencia de los resultados hallados en el presente capítulo sugieren que interacciones entre *A. triste* con otros ectoparásitos tiene lugar en *A. azarae*. Una evidencia de esto es la interacción entre estadios inmaduros de *I. loricatus* y *A. triste* encontrada en *A. azarae* (Colombo y col., 2015), en donde asociaciones en su mayoría positivas entre la abundancia de LL y NN de *I. loricatus* con *A. triste* fueron descriptas. Si bien no ha podido determinarse en la presente tesis el origen de estas interacciones, se resalta la importancia de incluir en los estudios ecológicos de ectoparásitos la influencia del resto de la comunidad ectoparasitaria, en especial teniendo en cuenta que los individuos

no suelen estar infestados por un solo tipo de ectoparásito. Futuros estudios que tengan además en cuenta factores que no fueron abordados en el presente estudio permitirán conocer los mecanismos que gobiernan estos fenómenos.

**7. CAPÍTULO 2: RICKETTSIA PARKERI EN ROEDORES
SIGMODONTINOS DEL DELTA DEL PARANÁ**

7.1 Introducción

Los roedores silvestres actúan eficientemente como reservorios o amplificadores de diversos patógenos, muchos de los cuales afectan al ser humano y son transmitidos por garrapatas (Ostfeld y col., 2014). Diversos estudios encontraron que los roedores son susceptibles a infectarse con diferentes especies de rickettsias. Por ejemplo, el carpincho (*Hydrochoerus hydrochaeris*) cumple un papel fundamental en la ecología de *R. rickettsii* en Brasil: es capaz de infectarse sin presentar signos clínicos, desarrollar por 10 días rickettsemia (demostrado tras la inoculación con sangre de carpincho infectado vía intraperitoneal en cobayos) y transmitir *R. rickettsii* a garrapatas *A. cajennense* no infectadas, comportándose así como un hospedador amplificador de la enfermedad (Souza y col., 2009). Otro roedor que fue hallado capaz de transmitir de manera experimental *R. rickettsii* a garrapatas (*A. cajennense*, *A. aureolatum* y *R. sanguineus*) no infectadas es el cobayo (Labruna y col., 2008).

Un estudio experimental desarrollado con diferentes cepas de ratones de laboratorio, evidenció la multiplicación de *R. parkeri* en diversos órganos, incluido el pulmón, órgano en el cual se encontró el mayor número de copias de ADN; así como también se demostró una diferencia en la susceptibilidad de infección de cada cepa de roedor estudiada (Grasperge y col., 2012b). Por otro lado, existen también evidencias de la transmisión de *R. parkeri* por co-alimentación de *A. americanum* infectadas a *A. maculatum* no infectadas alimentadas de manera conjunta en cobayos (Wright y col., 2015b). En el área del presente estudio Nava y col. (2011) identificaron como hospedadores de los estadios inmaduros de *A. triste*, especie de garrapata reconocida como vector de *R. parkeri* (Nava y col., 2008a), a roedores sigmodontinos y al cavideo *Cavia aperea*.

7.2 Objetivos

El objetivo del presente capítulo es explorar mediante técnicas de amplificación de ADN y serología la presencia o exposición de *Rickettsia parkeri* en roedores sigmodontinos del Delta del Paraná, conocer qué factores del hospedador y el ambiente están asociados a su prevalencia e intensidad de infección, y por último, discutir la participación de los roedores sigmodontinos en el ciclo de *R. parkeri*.

7.3 Materiales y métodos

Detección de *Rickettsia parkeri*:

Para evaluar la presencia de *R. parkeri* en roedores sigmodontinos presentes en el área de estudio, se seleccionaron aquellos roedores que fueron capturados durante el período de mayor abundancia de los estadios inmaduros de *A. triste* (noviembre a marzo) (Nava y col., 2011) alcanzando un total de 290 roedores de todas las especies capturadas descritas en el capítulo anterior (Tabla 1).

Extracción de ADN de órganos

ADN genómico de las muestras de pulmón de roedores fue extraído de manera individual utilizando la siguiente técnica: un trozo de 50 - 100 mg de pulmón se mezcló y trituró con 400 µl de Buffer de lisis (10 mM Tris-Cl, 100 mM EDTA, 0.5% SDS, pH 8.0). Luego se agregaron 20 µl de Proteinasa K (10 mg/ml, para lograr una concentración final de 200 µg/ml). La muestras se incubaron luego en cámara húmeda 50 – 55 °C durante 12 hs. Tras la incubación, las muestras se mantuvieron 3 min a 90 °C para inactivar la Proteinasa K. A continuación, se aplicó la técnica de extracción de fenol/cloroformo según Sambrook y Russell (2001): 400 µl de Fenol buferado y 400 µl de Cloroformo en cada muestra, luego se centrifugó 5 min 13000 rpm a 4 C°. Se recuperó la fase superior a la cual se le agregó 800 µl de Cloroformo, centrifugó 5 min 13000 rpm a 4 C°, se recuperó la fase superior a la cual se le agregaron 50 µl NaAc (3 M, pH 5,3) y 1 ml Etanol absoluto frio, se mezcló por inversión y luego estacionó a – 20 C° al menos 20 min. Luego se descartó el Etanol absoluto para agregar 1 ml de Etanol 70 % (lavado de pellet) y centrifugó 5 min 12.000 rpm a 4 C°, se descartó luego el Etanol 70% y se dejó el pellet secando. Finalmente se re-suspendió en 100 µl de Buffer TE (10 mM Tris HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) y almacenó a -20 °C. Cada set de extracción fue llevado a cabo con un control negativo que no contenía pulmón.

Las concentraciones de ADN y pureza de las extracciones se midieron por espectrometría con el SPECTROstar Nano MARS Data Analysis Software (BMG Labtech, Germany). Se consideró una extracción aceptable a aquellas con concentración igual o mayor a 100 ng/µl y una pureza igual o mayor a 1,8 – 2, medidos con un coeficiente de A260/A280 de absorbancia.

Amplificación de ADN rickettsial

Para evaluar la presencia de *R. parkeri* en las muestras de pulmón de roedores se utilizó PCR en tiempo real ya que es considerada la técnica de mayor sensibilidad para la detección de rickettsias en muestras de tejidos (Kidd y col., 2008; Zemtsova y col., 2015). Para confirmar el éxito de la extracción, integridad de ADN, evaluar la presencia de inhibidores y la dilución óptima, se llevó a cabo una PCR en tiempo real que amplifica un segmento de 285 pb del gen 18s, (Primer Forward CAA CTT TCG ATG GTA GTC GC y Reverse CGC TAT TGG AGC TGG AAT TAC); segmento altamente conservado y presente en todas las células eucariotas (Lodish y col., 2000; Monje y col., 2007). Esta PCR 18s se aplicó a un subconjunto de muestras de ADN diluidas en 1/25, 1/50, 1/100, 1/125 y 1/150 en agua bidestilada. Esta técnica se llevó a cabo utilizando 20 µl de la siguiente mix:

H₂O: 13,2 µl

Phire reaction buffer 5x: 4 µl

dNTP 25 nM: 0,16 µl

Primer 18's Forward (F) (20 pM/ µl): 0,4 µl

Primer 18's Revers (R) (20 pM/ µl): 0,4 µl

SYBR Green I (Invitrogen) 10 x: 0,8 µl

Phire Hot Start II DNA polymerase: 0,05 µl

ADN: 1 µl

Siguiendo el siguiente protocolo de termociclado: 3 min a 98°C seguido de 40 ciclos de 98°C 5 seg, 58 °C 20 seg y 72°C 20 seg, luego una lectura de 79°C 10 seg y un melting de 95°C 15 seg, 75°C 1 min y 94 °C 15 seg. A partir de los resultados obtenidos se determinó que, la dilución más adecuada para efectuar la detección de *R. parkeri*, fue **1/100**.

Para llevar a cabo esta y todas las PCR en tiempo real se utilizó un termociclador StepOne™ de Applied Biosystems, la enzima Phire Hot Start II DNA polymerase (Thermo Scientific), y un fluorocromo SYBR Green I (Invitrogen). Todas las PCR se realizaron utilizando un control positivo formado por ADN de *Rickettsia rhipicephali* obtenido a partir de cultivos de células Vero de garrapatas infectadas; así como

también se utilizó un control negativo constituido por todos los componentes de la mix excepto ADN y otro control negativo generado en cada extracción de ADN.

Como primer paso en la detección de *R. parkeri* a partir de muestras de pulmón de los roedores sigmodontinos capturados, se evaluó la presencia de un fragmento del gen *gltA* en muestras de ADN diluido en agua bidestilada 1/100 mediante PCR en tiempo real utilizando los primers **CS-5** y **CS-6** (Tabla 12) los cuales amplifican un fragmento de 150pb común a varias especies de rickettsias y es ampliamente utilizado en el diagnóstico de las mismas (Labruna y col., 2004). Estos primers han demostrado una sensibilidad de 1 y 100 copias del gen *gltA* de *R. rickettsii* y *R. bellii*, respectivamente (Labruna y col., 2004). Se utilizaron 20 µl de la siguiente mix:

H₂O: 13 µl

Phire reaction buffer 5x: 4 µl

dNTP 25 mM: 0,16 µl

Primer CS-5 F (20 pM/ µl): 0,4 µl

Primer CS-6 R (20 pM/ µl): 0,4 µl

SYBR Green I (Invitrogen) 10 x: 0,8 µl

Phire Hot Start II DNA polymerase: 0,05 µl

ADN 1/100 : 1 µl

Siguiendo el siguiente protocolo de termociclado: 98 °C 3 min, 50 ciclos de 98 °C 5 seg, 53 °C 20 seg, 60 °C 20 seg, 80 °C 10 seg, con un melting de 95 °C 15 seg, 70 °C 1 min, 95 °C 15 seg.

Convencionalmente, en aquellas muestras con resultados positivos a la amplificación de *gltA* se evalúa la presencia de un fragmento de 154 pb del gen *ompA*, el cual está presente solo en las rickettsias del grupo de las fiebres manchadas (Tabla 12). En el presente trabajo se decidió realizar en todas las muestras el diagnóstico de *R. parkeri* mediante la amplificación de *gltA* y *ompA*, independientemente del resultado obtenido en *gltA*, para evitar descartar del estudio posibles muestras positivas con resultados negativos a *gltA* (falsos negativos). Tanto para *gltA* como para *ompA*, aquellos individuos que presentaron valores de Ct (threshold cycles) menores a 37 con picos de melting concordantes con el del control positivo, fueron considerados *positivos* a Rickettsia spp. Aquellos que difirieron en +/- 1 unidad

en el pico de melting en comparación al control positivo fueron considerados como *sospechosos*. Para la amplificación del mencionado fragmento de *ompA* se utilizaron los primers descritos por Ereemeeva y col. (2003) RR **190.547** F y RR **190.701** R (Tabla 12) en 20 µl de la siguiente mix:

H₂O: 12, 3 µl

Phire reaction buffer 5x: 4 µl

dNTP 25 mM: 0,16 µl

Primer RR 190.547 F: 0,2 µl

Primer RR 190.701 R: 0,2 µl

SYBR Green I (Invitrogen) 10 x: 0,8 µl

Phire Hot Start II DNA polymerase: 0,05 µl

AND 1/100: 1 µl

Utilizando el siguiente protocolo de termociclado: 98 °C 3 min, 50 ciclos de 98 °C 5 seg, 57 °C 10 seg, 65 °C 20 seg, 78 °C 10 seg, con un melting de 95 °C 15 seg, 72 °C 1 min, 95 °C 15 seg.

Aquellas muestras de ADN que se consideraron positivas o sospechosas a la prueba de PCR en tiempo real fueron sometidas a electroforesis con el fin de conocer su peso molecular. Se utilizó con tal fin un gel de agarosa 2% en TAE 1x utilizando GelRed™ (Biotium, USA) como colorante, durante 40 min a 100 volts y 73 mA. Se sembraron 2 µl de cada muestra junto a 1 µl de buffer de carga. Se utilizó un marcador de peso molecular de 100 pb ADN Ladder en concentración 0,1 µg/ µl (Genbiotech) y el control positivo utilizado en la correspondiente PCR. Las bandas obtenidas fueron examinadas con un transiluminador UV.

A aquellas muestras sospechosas / positivas a la amplificación del fragmento *gltA* por PCR en tiempo real, se les realizó una PCR convencional utilizando los primers CS **78** y CS **323** (Tabla 12) que amplifican un fragmento de 350 pb del gen *gltA*. A aquellas muestras sospechosas / positivas a la amplificación del fragmento *ompA* por PCR en tiempo real, se les realizó una PCR convencional utilizando los primers RR **190.70** y RR **190.701** (Tabla 12) que amplifican un segmento de 590 pb del gen *ompA*, para intentar de esta forma amplificar un segmento más extenso que el logrado en la PCR tiempo real. En aquellas muestras que presentaron bajos niveles de ADN rickettsial en la mencionada PCR convencional, se realizó una PCR anidada utilizando los primers RR **190.107** y RR **190.602** (Tabla

12) utilizando como templado 1 µl del producto de amplificación de la primer PCR. Todas las PCR convencionales se desarrollaron en un termociclador Ivema T-18 thermocycler (Ivema Desarrollos, Argentina).

Las muestras positivas/sospechosas fueron purificadas utilizando el AccuPrep® PCR Purification Kit (Bioneer). El ADN obtenido fue secuenciado en el ImyZA (Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola, INTA, Castelar, Buenos Aires) y las secuencias obtenidas fueron analizadas con el programa SeqMan (Lasergen; DNA StarTAR's, Madison, Wis.) y comparadas con secuencias depositadas en el Gen Bank.

Todas las técnicas moleculares descriptas se desarrollaron en bajo la guía del Dr. Lucas Monje, biotecnólogo e investigador asistente del CONICET, quien forma parte del mismo grupo de trabajo.

Tabla 12: Secuencias, tamaño del fragmento amplificado y citas bibliográficas de los primers utilizados.

Primer	Secuencia del Primer (5'→ 3')	Tamaño del fragmento (pb)	Referencia
gltA CS 5	GAGAGAAAATTATATATCCAAATGTTGAT	150	Labruna y col. (2004)
CS 6	AGGGTCTTCGTGCATTTCTT		
gltA CS78	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT	350	Labruna y col. (2004)
CS323	GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT		
ompA RR190.547	CCTGCCGATAATTATACAGGTTTA	158	Eremeeva y col. (2003)
RR190.701	GTTCCGTTAATGGCAGCAT		Roux y col. (1996)
ompA RR190.70	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA	592	Regnery y col. (1991)
RR190.701	GTTCCGTTAATGGCAGCAT		Roux y col. (1996)
ompA nested RR190.107	GCTTTATTCACCACCTCAAC	435	Kidd y col. (2008)
RR190.602	AGTGCAGCATTGCTCCCCCT		Regnery y col. (1991)

Adicionalmente, se realizó a modo de screening la evaluación de la presencia de anticuerpos dirigidos contra antígenos de *R. parkeri* en los roedores capturados. Con tal fin se puso a punto un protocolo de inmunofluorescencia indirecta (IFI) en colaboración con el Dr. Lucas Monje. El criterio de selección de los roedores a analizar fue en base a la cantidad y calidad de suero disponible. Se utilizaron placas de vidrio con el antígeno *R. parkeri* cepa At24 preparadas de acuerdo a Pacheco y col. (2007b). El antígeno utilizado, aislado a partir de cultivos de garrapatas *A. triste* infectadas provenientes del área de estudio, fue incubado con anticuerpos de conejo anti-IgG de roedor marcados con el fluoróforo isotiocianato de fluoresceína. Se utilizó azul de Evans 1/10000 como colorante de contraste. Las lecturas se realizaron en un microscopio de fluorescencia Olympus BX60, Japón a 400x de aumento. Debido a que el objetivo de las presentes serologías fue evaluar una eventual exposición de los roedores a *R. parkeri*, no se realizó la titulación de las mismas, se evaluó la presencia de fluorescencia en los sueros diluidos 1/64 en PBS Tween 0,05%, dilución a partir de la cual se considera una muestra positiva (Brouqui y col., 2004), y se utilizó solamente *R. parkeri* como antígeno. Como control negativo se utilizó un suero negativo a *Rickettsia* spp. previamente testado y como control positivo un suero positivo a *R. parkeri* conocido, ambos en dilución 1/64.

El análisis de los datos se realizó mediante MLGM (*Modelo 6*) con respuesta binomial (serología positiva vs negativa) utilizando el paquete *glmmADMB* del programa estadístico R (R Foundation for Statistical Computing, <http://www.r-project.org>). La variable dependiente de interés fue la seroprevalencia a *R. parkeri* y las variables independientes fueron: *especie* de roedor (se consideraron solo las especies que presentaron 10 o más resultados de serología y de las cuales se dispuso de datos del conteo de garrapatas completo: *A. azarae*, *O. rufus* y *O. nigripes*) y abundancia de *A. triste* (conteos de larvas y ninfas por individuo). Con el fin de evitar una interpretación de los resultados errónea por la presencia de factores potencialmente enmascaradores, se incluyeron en el *modelo 6*:

1. *Estacionalidad*: debido a que el vector de *R. parkeri*, *A. triste*, presenta un ciclo estacional (Nava y col., 2011), se incluyó en el modelo la variable “estación del año” clasificada según solsticios y equinoccios como primavera, verano, otoño e invierno.
2. *Presencia/ausencia de ganado*: teniendo en cuenta que los bovinos del área se encontraron parasitados con *A. triste* y fueron seropositivos a *R. parkeri* (Monje y col., 2015b) y, como se mencionó en el capítulo anterior, la presencia de ganado influye en la abundancia de *A. triste* en

roedores sigmodontinos, la presencia de ganado podría entonces ser un factor asociado a la seroprevalencia de *R. parkeri*.

3. *Año de muestreo*: Se evaluó si los resultados observados ocurrieron de igual manera en los dos años de muestreo.

También fue incluido en el modelo el término de interacción “*especie de roedor x carga de A. triste*”, en donde se evalúa la hipótesis de que el efecto que tiene la abundancia de *A. triste* sobre la seroprevalencia de *R. parkeri* difiere según la especie de roedor. Para controlar el efecto de la falta de independencia de las observaciones del mismo cuadrante de muestreo, se incluyó como factor al azar “*Número de cuadrante*”.

A partir del modelo inicial que incluyó todas las variables independientes, potenciales enmascaradores y la interacción considerada, se eliminaron aquellos términos cuya eliminación disminuyó el valor del AIC o lo incrementó en menos de 2 unidades (Akaike, 1974).

7.4 Resultados

A partir de todas las especies de roedores capturadas, se obtuvieron un total de 290 extracciones satisfactorias de ADN. El 98% resultaron negativas a la amplificación de los genes *gltA* y *ompA*, mientras que a partir del 2% (6 individuos) de las muestras se obtuvo un producto de amplificación similar al conseguido en el control positivo, por lo que se los consideró como “*sospechosos*” a *R. parkeri* (Figura 15). Los productos de las PCRs anidadas de los mencionados individuos sospechosos, fueron purificados y secuenciados, obteniendo secuencias compatibles con *R. rhipicephali*; especie de rickettsia utilizada como control positivo, por lo que fueron considerados productos de una contaminación durante el desarrollo de las PCR.

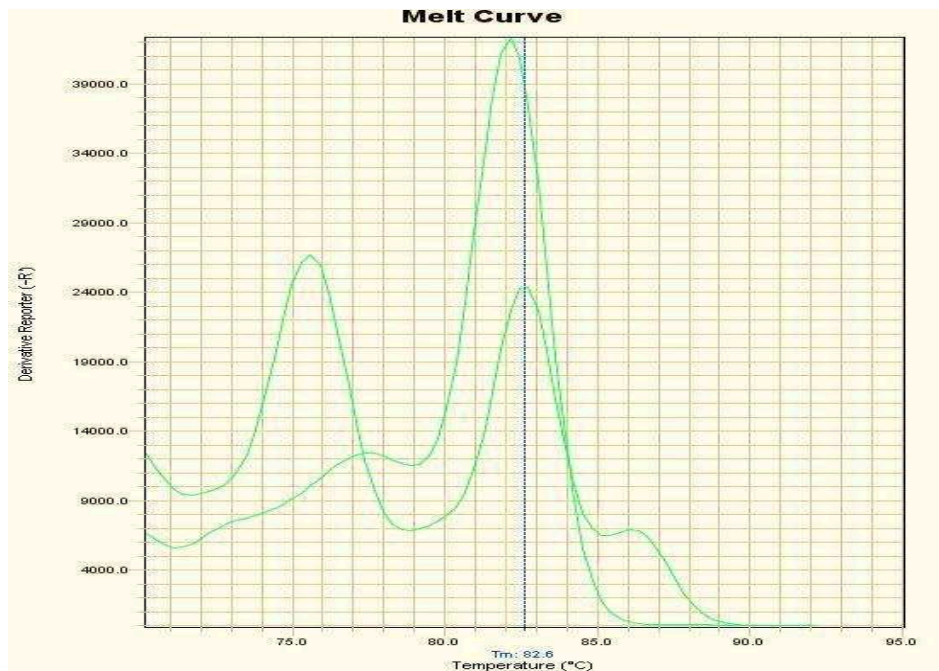


Figura 15 Curva de melting para un individuo *sospechoso* a la amplificación de un segmento del gen *ompA* de *Rickettsia parkeri* por PCR en tiempo real. La curva con pico más elevado representa al control + de *Rickettsia rhipicephali*. La curva con pico menos elevado y con un valor de melting similar al control + pertenece al ADN de pulmón de un individuo *sospechoso* a *Rickettsia parkeri*.

Con respecto a la detección de anticuerpos contra *R. parkeri* en el suero de los roedores capturados, en la tabla 13 se presentan los resultados de seroprevalencia obtenidos. De las 269 serologías realizadas el 32,7 % fueron positivas a *R. parkeri*.

De las especies de roedores estudiadas, *O. rufus* fue la que presentó una mayor probabilidad de presentar anticuerpos contra *R. parkeri* (Tabla 14). Esta especie presentó el doble (exponencial de 0,7) de la probabilidad de ser seropositivo a *R. parkeri* que *A. azarae* (Tabla 14). No se encontraron diferencias de seroprevalencia entre *O. nigripes* y *A. azarae* y *O. rufus* (Tabla 14, Figura 16).

En cuanto a la influencia de la abundancia media de *A. triste* sobre la seroprevalencia de *R. parkeri*, se encontró que, al aumentar en 1 espécimen la abundancia media de *A. triste* en los roedores sigmodontinos estudiados, aumenta en 1,02 (exponencial de 0,02) la probabilidad de seropositividad a *R. parkeri* (Tabla 14). Es decir, al aumentar la carga de *A. triste* en los roedores aumenta la probabilidad de que presenten anticuerpos contra *R. parkeri*.

Ninguna de las variables incluidas como enmascaradoras permaneció en el modelo final.

Tabla 13: Número total de roedores capturados, cantidad de roedores a los cuales se les realizó la prueba de IFI (Inmunofluorescencia indirecta) para la detección de anticuerpos contra *Rickettsia parkeri* y valores de seroprevalencia (%) de *Rickettsia parkeri* hallados. Datos de roedores capturados en la E.E.A. Delta del INTA entre septiembre de 2010 y octubre de 2012.

Especie	Número total de capturas	Nº individuos IFI	Seroprevalencia %
<i>Akodon azarae</i>	394	95	21
<i>Oxymycterus rufus</i>	202	121	36
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	84	9	11
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	51	18	22
<i>Scapteromys aquaticus</i>	39	20	75
<i>Deltamys Kempi</i>	9	3	66
<i>Holochilus brasiliensis</i>	3	2	50

Tabla 14: Modelo 6 final que muestra la asociación de la seroprevalencia de *Rickettsia parkeri* de los roedores sigmodontinos estudiados con las variables independientes especie y abundancia de los estadios inmaduros *Amblyomma triste* en sus hospedadores sigmodontinos.

Modelo 6:
 Respuesta= seroprevalencia de *R. parkeri*
 Variables independientes= Especie de roedor + abundancia de *A. triste*. Factor al azar= "Número de cuadrante "

Variable	Coeficiente	Error standar	Valor de P
Intercepto	-1.562	0.303	2.6e-07 *
Especie <i>O. nigripes</i> ^a	0.303	0.653	0.642
Especie <i>O. rufus</i> ^a	0.790	0.339	0.021*
Abundancia de <i>A. triste</i>	0.026	0.010	0.029*

Referencias: ^a *Akodon azarae*

Estimación de la sobredispersión del modelo:

Sum (resid (modelo 6, type = "pearson") ^2) / df.residual (modelo 6) = **0.67**

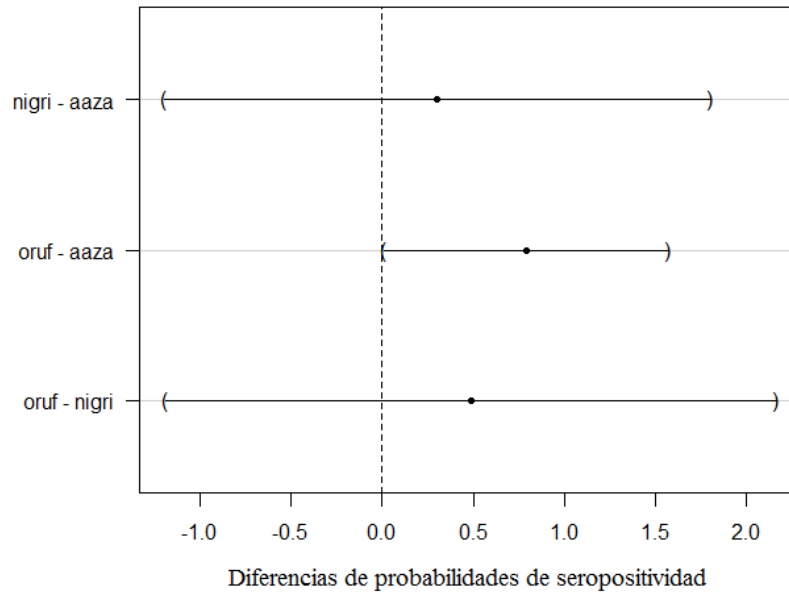


Figura 16 Gráfico de intervalo de confianza de 95% de Tukey que muestra las diferencias de probabilidad de seropositividad entre especies (**nigri**: *O. nigripes*, **aaza**: *A. azarae*, **oruf**: *O. rufus*). En aquellos intervalos que contienen al cero (nigri-aaza, nigri-oruf) no hay diferencias en la probabilidad de seropositividad a *R. parkeri* entre las especies comparadas, mientras que en aquellos que no contienen al cero (oruf-aaza) la probabilidad de presentar anticuerpos contra *R. parkeri* difiere entre las especies comparadas.

7.5 Discusión

En el presente trabajo no se logró detectar la presencia de ADN de *R. parkeri* en los roedores sigmodontinos analizados. Sin embargo, esto no necesariamente implica la ausencia de exposición ni de una posible participación de las especies de roedores estudiadas como amplificadores de *R. parkeri*. Grasperge y col. (2012b) detectaron, mediante PCR en tiempo real, la presencia de ADN de *R. parkeri* en pulmón de ratones de laboratorio inoculados experimentalmente por vía endovenosa, siendo este órgano el que presentó el mayor número de copias de ADN (en comparación con bazo, hígado y riñón); esto demuestra la capacidad de *R. parkeri* de multiplicarse en el mencionado órgano en roedores y la eficacia de su detección por la técnica utilizada. Sin embargo, no podemos ignorar el hecho de que la inoculación endovenosa no representa la vía natural de infección de *R. parkeri* en sus hospedadores. En otro experimento desarrollado por Moraru y col. (2013) se detectó en piel, sangre y bazo del roedor *Sigmodon hispidus* (Cricetidae) ADN de *R. parkeri* por PCR en tiempo real hasta 7 días post inoculación vía subcutánea. Si bien, nuevamente, no se utilizó la vía natural de infección de *R. parkeri*, pudo demostrarse que el período de rickettsemia y de detección del patógeno en tejidos en la especie de roedor estudiada duró solo 7 días. Más evidencias experimentales del período de rickettsemia de *R. parkeri* detectable en sus hospedadores vertebrados, fue también demostrado en la comadreja *Didelphis aurita*, siendo posible amplificar ADN rickettsial a partir de sangre de comadrejas infectadas solo el día 8 post-infección (Horta y col., 2010). El mismo fenómeno fue también registrado para otras especies de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas (Piranda y col., 2008; Horta y col., 2009; Souza y col., 2009; Rivas y col., 2015).

Si bien la prueba serológica utilizada en este trabajo es de baja especificidad debido a posibles reacciones cruzadas con otras especies de rickettsias (Ibrahim y col., 1999; Venzal y col., 2004; Milagres y col., 2013), consideramos que las seroprevalencias halladas fueron debidas a la exposición de los roedores a *R. parkeri*, ya que fue la única especie de rickettsia detectada en el área, sumado a la ubicación geográfica en donde se desarrolló el presente estudio y las especies de garrapatas presentes (Nava y col., 2008a; Romer y col., 2011; Monje y col., 2014). Los valores de seroprevalencia hallados, variaron según la especie de roedor y la abundancia de infestación con *A. triste*. La asociación encontrada entre la abundancia de *A. triste* y la seroprevalencia cobra sentido al ser esta especie de garrapata vector de *R. parkeri* en el área de muestreo, como se mencionó previamente. En el capítulo anterior se encontró que *O. rufus* presentó significativamente mayores cargas de *A. triste* que *A. azarae*,

esto sumado a ser la especie con mayor seroprevalencia a *R. parkeri* lo convierte en un posible actor principal en la ecoepidemiología de *R. parkeri* en el Delta del Paraná.

De esta forma podemos concluir que, si bien la presencia de serologías positivas a *R. parkeri* en los roedores sigmodontinos estudiados sugieren la exposición de los roedores al patógeno, no se ha podido confirmar mediante la amplificación de ADN rickettsial su presencia en pulmón, a pesar de que la técnica diagnóstica y el órgano blanco estudiados fueron adecuados a la hora de detectar ADN rickettsial en roedores. Los resultados negativos podrían deberse tanto a la ausencia de infección a nivel pulmonar como a la presencia de infección pulmonar a niveles no detectables por la técnica utilizada. Por otro lado, si los roedores muestreados estuvieron infectados con *R. parkeri* pero, al momento de la toma de muestras se encontraban ya recuperados de la infección, podría esta situación justificar el hecho de encontrar individuos seropositivos a *R. parkeri* pero negativos al aislamiento de ADN rickettsial. Otra posible explicación a la detección de roedores seropositivos a *R. parkeri* sin evidencias de presencia de ADN en pulmón, podría deberse a la multiplicación de *R. parkeri* a nivel dérmico en el sitio de alimentación de *A. triste*, ya que en diversos estudios se ha detectado ADN rickettsial en el tejido cutáneo del sitio de inoculación (Edwards y col., 2011; Moraru y col., 2013; Denison y col., 2014; Grasperge y col., 2014; Wright y col., 2015a), esto podría generar una respuesta inmune medible por técnicas serológicas sin implicar la multiplicación de *R. parkeri* en órganos internos.

8. CONCLUSIONES GENERALES

Amblyomma triste cumple un rol fundamental en la ecología de *R. parkeri* en la eco-región Islas y Delta del Paraná. Como fue demostrado en el trabajo de Nieri-Bastos y col. (2013) la transmisión interestadial y transovárica de *R. parkeri* en *A. triste* hace de esta especie de garrapata su vector y reservorio. Por lo tanto, el aumento de la abundancia de *A. triste* permitiría el aumento de la circulación de *R. parkeri*.

Mediante los estudios desarrollados en la presente tesis se puede deducir que la abundancia de los estadios inmaduros de *A. triste* en sus hospedadores sigmodontinos son influenciados por diversos factores. En cuanto a los *factores ambientales* estudiados se hallaron patrones de distribución estacionales, con predominio de larvas y ninfas de *A. triste* en verano. Estos patrones estacionales podrían ser en parte explicados por los cambios a lo largo del año del poder de desecación del ambiente (Déficit de saturación), de la temperatura mínima y de las precipitaciones, en el caso de las larvas de *A. triste*. Conocer las dinámicas estacionales de *A. triste* y los factores que le dan origen permite predecir cuales son las épocas del año con mayor abundancia del vector de *R. parkeri* en los roedores sigmodontinos

La *presencia de ganado* fue otro de los factores que favorecieron la abundancia de los estadios inmaduros de *A. triste*. A pesar que los hospedadores naturales de *A. triste* son mamíferos silvestres, esta garrapata ha demostrado la capacidad de adaptarse a nuevos hospedadores como los animales domésticos. En aquellos sitios con presencia de ganado se encontraron *A. azarae* con cargas más elevadas de *A. triste* que en sitios sin ganado. Sumado a esto, evidencias de seropositividad a *R. parkeri* en los bovinos que participaron del presente estudio indican la existencia de exposición al patógeno. Si tenemos en cuenta todo lo expuesto y consideramos que en los sistemas productivos ganaderos el ser humano introduce bovinos en densidades generalmente mayores a la de los hospedadores naturales de *A. triste*, la actividad ganadera en regiones endémicas de fiebre manchada daría lugar a un aumento en la abundancia de *A. triste* en el ambiente y, por ende, de *R. parkeri*.

El otro factor antropogénico evaluado fue el *tipo de vegetación* de los sitios. Si bien no se puede explicar por medio del presente estudio las causas de haber encontrado que aquellos *A. azarae* infestados con *I. loricatus* en sitios de bosques implantados estuvieron más parasitados con larvas de *A. triste*, se puede concluir que el tipo de manejo de la tierra podría influir en el encuentro de las garrapatas y sus hospedadores y/o establecer un estrato más apto para el desarrollo de este ectoparásito. Futuros estudios que tengan en cuenta en detalle las características de este tipo de producción (ej., especies y número de ejemplares a implantar, distancia entre ejemplares, características del estrato herbáceo, etc.) permitirán

ampliar el conocimiento sobre este punto. Conocer cómo influye este factor en la ecología de la interacción *A. triste* – hospedador permitirá generar información para tomar decisiones a la hora de planificar este tipo de actividades forestales con el fin de generar el ambiente menos propicio para el desarrollo de *A. triste*, vector de *R. parkeri*.

En cuanto a los *factores del hospedador* estudiados, cabe mencionar la relevancia de las diferencias de abundancia media de *A. triste* encontradas entre las especies de roedores estudiadas. *Oxymycterus rufus* fue la especie que presentó la mayor abundancia media así como prevalencia de *A. triste* al compararla con *A. azarae*, las dos especies de roedores más abundantes en el presente estudio. Diferencias en el uso del hábitat y características morfológicas conocidas entre ambas especies podrían ser causantes de las diferencias encontradas; así como también potenciales disimilitudes en la respuesta del sistema inmune y comportamiento anti-parasitario que son por el momento desconocidas. Otros factores del hospedador que se encontraron asociados a la abundancia de *A. triste* en *A. azarae* fueron los títulos de *anticuerpos naturales*, el *sexo*, la *edad/largo de cuerpo* y la *condición corporal*, las tres últimas en relación a la presencia de otro parásito. Para la variable *sexo*, las diferencias se encontraron según la carga de *piojos*, y en el caso de *largo de cuerpo* y *condición corporal* los resultados observados dependieron de la co-infestación con la garrapata *I. loricatus*. Nuevamente, conocer qué factores favorecen a un mayor parasitismo de *A. triste* en sus hospedadores sigmodontinos es fundamental para conocer la ecología de esta garrapata y considerar los riesgos de intervenir el ambiente de forma tal que afecte a las poblaciones de roedores sigmodontinos. Por ejemplo, actividades humanas que alteren el ambiente generando una modificación de las características de las poblaciones de roedores, como ser aumentando el número de *O. rufus* de la población o disminuyendo la condición corporal de sus integrantes, podrían generar condiciones más favorables para el desarrollo de los estadios inmaduros de *A. triste*, aumentando así el número de vectores de *R. parkeri* en el ambiente.

Las interacciones dentro de las comunidades ectoparasitarias han sido en general poco estudiadas. En el caso de la abundancia de los estadios inmaduros de *A. triste* en *A. azarae*, podemos decir que se encuentra correlacionada con la *co-infestación* con diversos ectoparásitos. Este tipo de asociaciones fueron principalmente positivas y bajo el efecto de interacciones, como se mencionó previamente, entre factores del hospedador y del ambiente para *I. loricatus*, y del hospedador para *piojos* y *pulgas*. Los mecanismos que median estas interacciones sinérgicas podrían basarse en “cooperaciones” entre la presencia de un parásito y el parasitismo de otro en un mismo hospedador a través de la depleción del sistema inmune general, de manera selectiva o como consecuencia de un trade-off fisiológico. La

presente tesis permitió generar información de base sobre la interacción entre ectoparásitos de *A. azarae* que debería ser tomada en cuenta a la hora de estudiar los factores asociados a la abundancia de un parásito y que podrá ser utilizada en estudios futuros y enfocados a conocer los mecanismos del mencionado fenómeno.

Si bien la mayoría de las especies de roedores estudiadas en el presente trabajo presentaron algún grado de infestación con *A. triste*, la asociación más relevante para la ecoepidemiología de *R. parkeri* fue la encontrada con *O. rufus*. Esta especie de roedor fue la que se encontró significativamente más parasitada con *A. triste* así como también la que presentó los valores de seroprevalencia de *R. parkeri* más elevados, sugiriendo una mayor exposición de esta especie al patógeno y cumpliendo así un importante rol en la alimentación de su vector. En el presente trabajo no se consiguió aislar ADN de *R. parkeri* a partir de los roedores muestreados, sin embargo, como fue discutido anteriormente, esto no necesariamente implica la ausencia de infección, ya que esta podría suceder a niveles no detectables por la técnica diagnóstica empleada, o la toma de muestras podría haberse realizado con posterioridad al período de multiplicación de *R. parkeri* en pulmón o que esta multiplicación suceda solo en el sitio de inoculación en piel. Podemos inferir que algunas de estas situaciones tienen lugar ya que los resultados de seroprevalencia hallados sugieren la existencia de circulación del patógeno entre las especies de roedores muestreadas. Por otro lado, si bien ha sido demostrado que *A. triste* además de funcionar como vector de *R. parkeri* es también su reservorio, gracias a su transmisión transovárica y transestadial, Nieri-Bastos y col. (2013) demostraron una mayor mortandad de ninfas de *A. triste* infectadas con *R. parkeri* en comparación a ninfas no infectadas. Lo que da lugar a considerar la existencia de hospedadores amplificadores que permitan mantener a *R. parkeri* en *A. triste* a lo largo de sucesivas generaciones. Otro posible papel como amplificadores de *R. parkeri* que potencialmente podrían desarrollar los roedores sigmodontinos es a través de la co-alimentación. Wrigth y col. (2015b) demostraron en cobayos que especímenes de *A. americanum* no infestados pueden contraer *R. parkeri* por co-alimentación con *A. maculatum* infestadas, así como Zemtsova y col. (2010) demostraron el mismo fenómeno de co-alimentación de *R. conorii israelensis* entre *R. sanguineus* en caninos domésticos. Si bien en el presente estudio no pudo ser confirmado que los roedores sigmodontinos estudiados cumplan el rol de amplificadores, ya sea mediante la multiplicación de *R. parkeri* en sus tejidos o mediante el rol como sustrato para la ocurrencia de co-alimentación entre *A. triste* infectadas con *R. parkeri* a no infectadas, se puede sugerir que los roedores sigmodontinos, y principalmente *O.*

rufus, participan en la ecología de *R. parkeri* en la región al alimentar a los estadios inmaduros de su vector, *A. triste*.

El hecho de conocer qué factores están implicados en las mayores abundancias de *A. triste* nos permite saber qué zonas pueden ser más o menos propensas a la circulación de *R. parkeri*. Cabe destacar la importancia de considerar la influencia positiva que genera la presencia de ganado bovino sobre *A. triste* a la hora de planificar el asentamiento de explotaciones ganaderas en regiones donde está presente *R. parkeri*, así como al manipular con fines productivos el medio ambiente, lo que puede generar alteraciones en el equilibrio entre especies de roedores generando el aumento de algunas especies con la disminución de otras. Modificaciones en el ambiente que afecten a la abundancia de *A. azarae* (especie de roedor más abundante en el área de estudio) podrían tener como consecuencia el aumento de *O. rufus*, aumentando así la disponibilidad del hospedador más eficiente para estadios inmaduros de *A. triste* con el posible consecuente aumento de la circulación de *R. parkeri*. Futuros estudios experimentales que evalúen la potencialidad de *O. rufus* como amplificador de *R. parkeri* y los mecanismos por los cuales representa un importante hospedador de *A. triste*, permitirán dilucidar aquellos aspectos de la interacción *O. rufus* – *R. parkeri* que no han podido ser comprendidos mediante el presente estudio observacional.

9. BIBLIOGRAFÍA

- Abarca, K.; López, J.; Acosta-Jamett, G.; Lepe, P.; Soares, J.F.; Labruna, M.B. (2012) *A third Amblyomma species and the first tick-borne rickettsia in Chile*. J. Med. Entomol. 49: 219–222.
- Acosta, J.; Urquijo, L.; Díaz, A.; Sepúlveda, M.; Mantille, G.; Heredia, D.; Castañeda, E. (2006) *Brote de Rickettsiosis en Necoclí, Antioquia, febrero-marzo de 2006*. Inf. Quinc. Epidemiol. Nac. 11:177-92.
- Akaike, H. (1974) *A new look at the statistical model identification*. IEEE Trans. Automat. Contr. AC-19, 716–723.
- Alonso-Carné, J.; García-Martín, A. y Estrada-Peña, A. (2015) *Assessing the statistical relationships among water-derived climate variables, rainfall, and remotely sensed features of vegetation: implications for evaluating the habitat of ticks*. Exp. App. Acarol. 65:107-124.
- Anaya, E. (2004) *Prevenção e controle das rickettsioses no Peru*. In *Consulta de especialistas OPAS/OMS sobre rickettsioses nas Américas*. Relatório final: 40–43. Organização Panamericana da Saúde. Rio de Janeiro, Brasil.
- Anderson, R.M. y Gordon, D.M. (1982) *Processes influencing the distribution of parasite numbers within host populations with special emphasis on parasite-induced host mortalities*. Parasitology. 85:373–398
- Anderson, K., Ezenwa, V.O., Jolles, A.E. (2013) *Tick infestation patterns in free ranging African buffalo (Syncercus caffer): effects of host innate immunity and niche segregation among tick species*. Int. J. Parasitol. 2:1–9
- Angerami, R.N.; da Silva, A.M.; Nascimento, E.M.; Colombo, S.; Wada, M.Y.; dos Santos, F.C.; Mancini, D.M.; De Oliveira, R.C.; Katz, G.; Martins, E.C. y Da Silva, L.J. (2009) *Brazilian spotted fever: two faces of a same disease? A comparative study of clinical aspects between an old and a new endemic area in Brazil*. Clin. Microbiol. Infect. 15:207-8.
- Azad, A.F. (1990) *Epidemiology of murine typhus*. Annu. Rev. Entomol.35: 553–570.
- Barandika, J.F.; Berriatua, E.; Barral, M.; Juste, R.A.; Anda, P. y García-Pérez, A.L. (2006) *Risk factors associated with ixodid tick species distributions in the Basque region in Spain*. Med. Vet. Entomol. 20:177-188.
- Battesti, D.M.B.; Arzua, M. y Bechara, G. H. (2006) *Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies*. Vox/ICTTD-3/Butantan. p. 223.

- Beeler, E.; Abramowicz, K.F.; Zambrano, M.L.; Sturgeon, M.M.; Khalaf, N.; Hu, R. y Eremeeva, M.E. (2011). *A Focus of Dogs and Rickettsia massiliae*–Infected *Rhipicephalus sanguineus* in California. AM. J. TROP. MED. HYG. 84: 244-249.
- Beldomenico, P.M. (2007) PhD thesis: University of Liverpool.
- Beldomenico, P. y Begon, M. (2010) *Disease spread, susceptibility and infestation intensity: vicious circles?* Trends Ecol. Evol. 25:21–27.
- Beldomenico, P.M.; Baldi, C.J.; Orcellet, V.M.; Peralta, J.L.; Venzal, J.M.; Mangold, A.J., Guglielmone, A.A. (2004) *Ecological aspects of Ixodes parvicinus Keirans & Clifford, 1985 (Acari: Ixodidae) and other tick species parasitizing sigmodontin mice (Rodentia: Muridae) in the northwestern Argentina.* Acarol. 44:15–21
- Beldomenico, P.; Lareschi, M.; Nava, S.; Mangold, A.J.; Guglielmone, A.A. (2005) *The parasitism of immature stages of Ixodes loricatus (Acari: Ixodidae) on wild rodents in Argentina.* Exp. Appl. Acarol. 36:139–148.
- Beldomenico, P. M.; Telfer, S.; Gebert, S.; Lukomski, L.; Bennett, M. y Begon, M. (2008). *The dynamics of health in wild field vole populations: a haematological perspective.* J. Anim. Ecol. 77: 984-997.
- Boyard, C.; Vourch, G.; Barnouin, J. (2008) *The relationships between Ixodes ricinus and small mammal species at the woodland–pasture interface.* Exp. App. Acarol. 44:61–76.
- Brouqui, P.; Bacellar, F.; Baranton, G.; Birtles, R. J.; Bjoersdorff, A.; Blanco, J. R., Caruso, G.; Cinco, M.; Fournier, P.E.; Francavilla, E.; Jensenius, M.; Kazar, J.; Laferl, H.; Lakos A.; Lotric F.S.; Maurin, M.; Oteo, J.A. ; Parola, P.; Perez-Eid, C.; Peter, O.; Postic, D.; Raoult, D.; Tellez, A.; Tselentis, Y. y Wilske, B. (2004) *Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe.* Clin. Microbiol. Infect. 10:1108-1132.
- Brunner, J.L. y Ostfeld, R.S. (2008) Multiple causes of variable tick burdens on small-mammal hosts. *Ecology.* 89: 2259–2272.
- Burkart, R.; Bárbaro, N.; Sánchez, R.O. y Gómez, D.A. (1999) *Eco-regiones de la Argentina.* APN, Prodia, Buenos Aires, 43 pp.
- Cabrera, A. (1994) *Enciclopedia Argentina de agricultura y jardinería*, TomoII, Fascículo 1: *Regiones fitogeográficas Argentinas.* ACME, Buenos Aires.
- Cardon, M.; Loot, G.; Grenouillet, G.; Blanchet, S. (2011) Host characteristics and environmental factors differentially drive the burden and pathogenicity of an ectoparasite: a multilevel causal analysis. J. Anim. Ecol. 80:657–667
- Cernigoi, B.; Seijo, A.; Deodato, B.; Curcio, D.; Espinosa, B. *Seroprevalencia de anticuerpos Anti - Rickettsia en dos poblaciones de Argentina.* 2° Congreso Argentino de Zoonosis y 1° Argentino

y Latinoamericano de Enfermedades Emergentes. Buenos Aires, Abril 1998. Libro de Resúmenes, A-21, p 43.

- Chapman, A.S.(2006) *Diagnosis and management of tickborne rickettsial diseases: Rocky Mountain spotted fever, ehrlichioses, and anaplasmosis*, United States. *A Practical Guide for Physicians and Other Health-Care and Public Health Professionals*. MMWR. 55:1–27.
<http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5504a1.htm>
- Cicuttin, G.L.; Rodríguez, M.; Jado, I.; Anda, P. (2004) *Primera detección de Rickettsia massiliae en la Ciudad de Buenos Aires. Resultados preliminares*. Rev. Arg. Zoonosis.1:8-10
- Cicuttin, G. y Nava, S. (2013) *Molecular identification of Rickettsia parkeri infecting Amblyomma triste ticks in an area of Argentina where cases of rickettsiosis were diagnosed*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 108: 123–125.
- Cicuttin, G. L.; Vidal, P.; De Salvo, M.N.; Beltrán, F. J. y Gury Dohmen, F. E. (2014a). *Detección molecular de Rickettsia massiliae y Anaplasma platys en garrapatas Rhipicephalus sanguineus y caninos domésticos del municipio de Bahía Blanca (Argentina)*. Rev. Chil. Infectol. 31: 563-568.
- Cicuttin, G.L.; Brambati, D.F.; Eugui, J.I.R.; Lebrero, C.G.; De Salvo, M.N.; Beltrán, F.J.; Gury Dohmen, F.E.; Jado, I. y Anda, P. (2014b) *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.
- Colombo, V.C.; Lareschi, M.; Monje, L.D.; Nava, S.; Antoniazzi, L.R.; Beldomenico, P.M.; Guglielmone, A.A. (2013) *Garrapatas (Ixodida) y ácaros (Mesostigmata) parásitos de roedores sigmodontinos del delta del Paraná, Argentina*. Revista FAVE - Ciencias Veterinarias. 12:39-50.
- Colombo, V.C.; Guglielmone, A.A.; Monje, L.D.; Nava, S.; Beldomenico, P.M. (2014) *Seasonality of immature stages of Ixodes loricatus (Acari: Ixodidae) in the Parana Delta, Argentina*. Ticks Tick Borne Dis. 5:701–705.
- Colombo, V.C.; Nava, S.; Antoniazzi, L.R.; Monje, L.D.; Racca, A.L.; Guglielmone, A. A. y Beldomenico, P.M. (2015). *Ecology of the interaction between Ixodes loricatus (Acari: Ixodidae) and Akodon azarae (Rodentia: Criceridae)*. Parasitol. Res. 114:3683-3691.
- Conti-Diaz, I.A.; Rubio, I.; Somma-Moreira, R.E.; Perez-Bormida, G. (1990) *Lymphatic cutaneous rickettsiosis caused by Rickettsia conorii in Uruguay*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 32:313-8
- Conti-Diaz, I.A.; Moraes-Filho, J.; Pacheco, R.C.; Labruna, M.B. (2009) *Serological evidence of Rickettsia parkeri as the etiological agent of rickettsiosis in Uruguay*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo. 51:337-9.
- Cox, F.E. (2001) *Concomitant infections, parasite s and immune responses*. Parasitology. 122: S23–S38.

- Cragun, W.C.; Bartlett, B.L.; Ellis, M.W.; Hoover, A.Z.; Tyring, S.K.; Mendoza, N.; Vento, J.T.; William, L.N.; Eremeeva, M.E.; Olano, J.P.; Ronald, P.R.; Rapini, P.; Paddock, C.D. (2010) *The expanding spectrum of eschar-associated rickettsioses in the United States*. Arch. Dermatol. 146:641-8.
- Danielova, V.; Holubova, J.; Pejoch, M. y Daniel, M. (2002). *Potential significance of transovarial transmission in the circulation of tick-borne encephalitis virus*. Folia Parasit. 49:323–325.
- Debárborá, V.N.; Nava, S.; Cirignoli, S.; Guglielmone, A.A.; Poi, A.S.G. (2012) Ticks (Acari: Ixodidae) parasitizing endemic and exotic wild mammals in the Esteros del Ibera wetlands, Argentina. Syst. Appl. Acarol. 17: 243–250.
- Del Fiol, F.S.; Junqueira, F.M.; Rocha, M.C.P.; Toledo, M.I.; Barberato Filho, S.A. (2010) *Febre maculosa no Brasil*. Rev. Panam. Salud Publica. 27:461-6
- Demma, L.J.; Traeger, M.S.; Nicholson, W.L.; Paddock, C.D.; Blau, D.M.; Eremeeva, M. E.; Dasch, G.A.; Levin, M.L.; Singleton, J.; Sherif, R.Z.; Cheek, J.E.; Swerdlow, D.L. y Mc Quiston, J.H. (2005). *Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona*. New Engl. J. Med.353: 587-594.
- Denison, A. M.; Amin, B. D.; Nicholson, W. L. & Paddock, C. D. (2014) *Detection of Rickettsia rickettsii, Rickettsia parkeri, and Rickettsia akari in skin biopsy specimens using a multiplex real-time polymerase chain reaction assay*. Clin. Infect. Dis. p. e1358
- Diaz, I.A. (2003) *Rickettsiosis caused by Rickettsia conorii in Uruguay*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 990:264-6
- Dobler, G. y Pfeffer, M. (2012) *Spotted fever rickettsiae and rickettsioses in Germany*. En: *Arthropods as Vectors of Emerging Diseases* (Ed.: Mehlhorn, H.) Springer, Berlin Heidelberg. p. 361-376
- Dumler, J.S.; Barbet, A.F.; Bekker, C.P.; Dasch, G.A.; Palmer, G.H.; Ray, S.C.; Rikihisa, Y.; Rurangirwa, F.R. (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 “HGE agent” as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51:2145–2165
- Dumler, J.S. y D.H. Walker. (2005) *Rocky Mountain spotted fever-changing ecology and persisting virulence*. N. Engl. J. Med. 353: 551–553.
- Dumler, J.S. (2010) *Fitness and freezing: vector biology and human health*. J.Clin.Investig.120:3087–3090.

- Durden, L.A. y Musser, G.G. (1994) *The sucking lice (Insecta, Anoplura) of the world: a taxonomic checklist with records of mammalian hosts and geographical distributions*. B. Am. Mus. Nat. Hist. 218: 1-90.
- Eberhardt, A.; Costa, S.; Marini, R.; Racca, A.; Baldi, C.; Robles, R.; Moreno, P.; Beldomenico, P. (2013) *Parasite load and physiological trade-offs in stressed capybaras*. Plos One. 8:e70382.
- Edwards, K.T.; Goddard, J.; Jones, T.L.; Paddock, C.D. & Varela-Stokes, A.S. (2011) *Cattle and the natural history of Rickettsia parkeri in Mississippi*. Vector-Borne Zoonotic Dis. 11:485-491.
- Elchos, B.N.; Goddard, J. (2003) *Implications of presumptive fatal Rocky Mountain spotted fever in two dogs and their owner*. J. Am. Vet. Med. Assoc. 223:1450-1452.
- Eremeeva, M.E.; Dasch, G.A. y Silverman, D.J. (2003). *Evaluation of a PCR assay for quantitation of Rickettsia rickettsii and closely related spotted fever group rickettsiae*. J. Clin. Microbiol. 41: 5466-5472.
- Eremeeva, M.E.; Bosserman, E.A.; Demma, L.J.; Zambrano, M.L.; Blau, D.M.; Dasch, G.A. (2006) *Isolation and identification of Rickettsia massiliae from Rhipicephalus sanguineus ticks collected in Arizona*. Appl. Environ. Microbiol. 72: 5569-5577.
- Estrada-Peña, A.; Venzal, J.M.; Mangold, A.J.; Cafrune, M.M.; Guglielmone, A.A. (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.
- Ezenwa, V.O. y Jolles, A.E. (2011) *From host immunity to pathogen invasion: the effects of helminth coinfection on the dynamics of microparasites*. Integr. Comp. Biol. 51:540–551.
- Ferreira, B.R. y Silva, J.S. (1998) *Saliva of Rhipicephalus sanguineus tick impairs T-cell proliferation and IFN-gamma-induced macrophage microbicidal activity*. Vet. Immunol. Immunopathol. 64: 267–293.
- Ferreira, B.R.; Szabó, M.J.; Cavassani, K.A.; Bechara, G.H. y Silva, J.S. (2003) *Antigens from Rhipicephalus sanguineus ticks elicit potent cell-mediated immune responses in resistant but not in susceptible animals*. Vet. Parasitol. 115: 35-48.
- Fielden, L.J. y Rechav, Y. (1996) *Survival of six species of African ticks in relation to saturation deficits*. Exp. App. Acarol. 20:625-637.
- Flores-Mendoza, C.; Florin, D.; Felices, V.; Pozo, E.J.; Graf, P.C.; Burrus, R.G. y Richards, A.L. (2013) *Detection of Rickettsia parkeri from within Piura, Peru, and the first reported presence of*

Candidatus Rickettsia andeanae in the tick *Rhipicephalus sanguineus*. Vector Borne Zoonotic Dis. 13:505-508.

- Fourie, L.J. y Kok, O.B. (1992) *The role of host behaviour in tick-host interactions: a domestic host-paralysis tick model*. Exp. Appl. Acarol. 13:213–225.
- Furman, D. P. (1972) *Laelapid mites (Laelapidae: Laelapinae) of Venezuela*. Brigham Young Univ. Sci. Bull. Biol. Ser. 17:1-58.
- García-García, J.C.; Portillo, A.; Núñez, M.J.; Santibáñez, S.; Castro, B. y Oteo, J.A. (2010) *A patient from Argentina infected with Rickettsia massiliae*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 82:691-692.
- Gettinger, D. (1992) *Host specificity of Laelaps (Acari: Laelapidae) in central Brazil*. J. Med. Entomol. 29: 71-77.
- Gettinger, D. y Owen, R.D. (2000) *Androlaelaps rotundus Fonseca (Acari: Laelapidae) associated with akodontine rodents in Paraguay: a morphometric examination of a pleioxenous ectoparasite*. Rev. Bras. Parasitol. 60: 425-434.
- Gettinger, D.; Dick, C.W. y Owen, R.D. (2011) *Host associations between laelapine mites (Mesostigmata: Laelapidae) and palustrine rodents in Paraguay: a study of host specificity and cryptic species*. Syst. Appl. Acarol. 11:145-159.
- Gillespie, J.J.; Beier, M.S.; Rahman, M.S.; Ammerman, N.C.; Shallom, J.M.; Purkayastha, A.; Sobral, B.S. y Azad, A.F. (2007). *Plasmids and rickettsial evolution: insight from Rickettsia felis*. Plos One, 2: e266, p.17
- Gómez Villafaña, I.E.; Miño, M.; Cavia, R.; Hodara, K.; Courtalón, P.; Suárez, O. y Busch, M. (2005) *Guía de Roedores de la provincia de Buenos Aires. LOLA (Literature of Latin America)*. Buenos Aires, Argentina. p. 100.
- Grasperge, B.J.; Wolfson, W. y Macaluso, K.R. (2012a) *Rickettsia parkeri infection in domestic dogs, Southern Louisiana, USA*. Emerg. Infect. Dis. 18:995-997.
- Grasperge, B.J.; Reif, K.E.; Morgan, T.D.; Sunyakumthorn, P.; Bynog, J.; Paddock, C. D. y Macaluso, K.R. (2012b). *Susceptibility of inbred mice to Rickettsia parkeri*. Infect. Immun. 80: 1846-1852.
- Grasperge, B.J.; Morgan, T.W.; Paddock, C.D.; Peterson, K.E. & Macaluso, K.R. (2014) *Feeding by Amblyomma maculatum (Acari: Ixodidae) enhances Rickettsia parkeri (Rickettsiales: Rickettsiaceae) infection in the skin*. J. Med. Entomol. 51: 855-863.
- Gray, J.S. (1998) *The ecology of ticks transmitting Lyme borreliosis*. Exp. Appl. Acarol. 22, 249–258.

- Green, A. (2001) *Mass/length residuals: measures of body condition or generators of spurious results*. Ecology. 82:1473–1483.
- Guglielmone, A.A.; Mangold, A.J.; Luciani, C.E y Viñabal, A.E. (2000) *Amblyomma tigrinum (Acari: Ixodidae) in relation to phytogeography of central-northern Argentina with notes on hosts and seasonal distribution*. Exp. Appl. Acarol. 24: 983–989.
- Guglielmone, A.A.; Estrada Peña, A.; Keirans, J.E.y Robbins, R.G. (2003) *Ticks (Acari:Ixodida) of the Neotropical Zoogeographic Region*. International Consortium on Ticks and Tick-Borne Diseases (ICTTD-2), Atalanta, Houten, Países Bajos, 173 pp.
- Guglielmone, A.A. y Nava, S. (2006) *Las garrapatas argentinas del género Amblyomma (Acari: Ixodidae): Distribución y hospederos*. RIA. 35:133-153.
- Guglielmone, A.A.; Beati, L.; Barros-Battesti, D.M.; Labruna, M.B.; Nava, S.; Venzal, J. M.; Mangold, A.J.; Szabó, P.J.; Martins, J.R.; González-Acuña, D. y Estrada-Peña, A. (2006). *Ticks (Ixodidae) on humans in South America*. Exp. App. Acarol. 40: 83-100.
- Guglielmone, A.A.; Nava, S.; Mastropaolo, M.; Mangold, A.J. (2013) *Distribution and genetic variation of Amblyomma triste (Acari:Ixodidae) in Argentina*. Ticks Tick Borne Dis. 4: 386–390.
- Guglielmone, A.A.; Robbins, R.G.; Apanaskevich, D.A.; Petney, T.N.; Estrada-Peña, A. y Horak, I. (2014) *The hard ticks of the world*. Springer, Dordrecht, Países Bajos, p. 738
- Guzmán Cornejo, C.; Pérez, T.M.; Nava, S.; Guglielmone, A.A. (2006) *Confirmation of the presence of Amblyomma triste Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) in Mexico*. Syst. Appl. Acarol. 11, 47–50.
- Ibrahim, I.N.; Okabayashi, T.; Lestari, E.W.; Yanase, T.; Muramatsu, Y.; Ueno, H. & Morita, C. (1999) *Serosurvey of wild rodents for rickettsioses (spotted fever, murine typhus and Q fever) in Java Island, Indonesia*. Eur. J. Epidemiol. 15: 89-93.
- Ishikura, M.; Watanabe, M.; Nakayama, T.; Matsuura, K.; Morita, O. & Uchida, T. (1992) *Seroepidemiology of spotted fever group rickettsiae in small field rodents in Japan*. Microbiol. Immunol. 36: 649-653.
- Harrison, A.; Scantlebury, M.; Montgomery, W.I. (2010) *Body mass and sex-biased parasitism in wood mice Apodemus sylvaticus*. Oikos. 119:1099–1104.
- Hawlana, H.; Abramsky, Z.; Krasnov, B.R. (2006) *Ectoparasites and age-dependent survival in a desert rodent*. Oecologia 148:30–39.

- Hellard, E.; Pontier, D.; Sauvage, F.; Poulet, H.; Fouchet, D. (2012) *True versus false parasite interactions: a robust method to take risk factors into account and its application to feline viruses*. Plos. One. 7: e29618.
- Horta, M.C.; Moraes-Filho, J.; Casagrande, R.A.; Saito, T.B.; Rosa, S.C.; Ogrzewalska, M.; Matushima, E.R & Labruna, M. B. (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.
- Horta, M.C.; Sabatini, G.S.; Moraes-Filho, J.; Ogrzewalska, M.; Canal, R.B.; Pacheco, R.C.; Martins, T.F.; Matushima, E.R & Labruna, M.B. (2010) *Experimental infection of the opossum *Didelphis aurita* by *Rickettsia felis*, *Rickettsia bellii*, and *Rickettsia parkeri* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense* and *Amblyomma dubitatum**. Vector Borne Zoonotic Dis. 10: 959-967.
- Hudson, P.; Rizzoli, A.; Grenfell, B.; Heesterbeek, H.; Dobson, A. (2002) *The ecology of wildlife diseases*. Oxford University Press, Oxford, Inglaterra. p. 216.
- Hughes, V.L. y Randolph, S.E. (2001) *Testosterone depresses innate and acquired resistance to ticks in natural rodent hosts: a force for aggregated distributions of parasites*. J. Parasitol. 87:49–54.
- Johnson, P.T. (1957). *A classification of the siphonaptera of south America: with descriptions of new species*. Entomological Society of Washington, Estados Unidos de Norteamérica. p. 298.
- Johnson, P.T. (1972) *Sucking lice of Venezuelan Rodents with remarks on related species (Anoplura)*. Brigh. Young. Univ. Scie., Bull. Biol. Ser. 17: 1 61.
- Jolles, A.E.; Ezenwa, V.O.; Etienne, R.S.; Turner, W.C.; Olf, H. (2008) *Interactions between macroparasites and microparasites drive infestation patterns in free-ranging African buffalo*. Ecology. 89:2239–2250.
- Jones, K.E.; Patel, N.G.; Levy, M.A.; Storeygard, A.; Balk, D.; Gittleman, J. L. y Daszak, P. (2008) *Global trends in emerging infectious diseases*. Nature, 451: 990-993.
- Jongejan, F. y Uilenberg G. (2004) *The global importance of ticks*. Parasitology. 129 S1-S12.
- Jordan, J.M.; Woods, M.E.; Olano, J.; Walker, D.H. (2008) *The absence of Toll-like receptor signaling in C3H/HeJ mice predisposes them to over whelming rickettsial infection and decreased protective *Th1* responses*. Infect.Immun.76:3717–3724.
- Jordan, J.M.; Woods, M.E.; Soong, L.; Walker, D.H. (2009) *Rickettsiae stimulate dendritic cells through toll-like receptor 4, leading to enhanced NK cell activation in vivo*. J. Infect. Dis.199:236–242.

- Kandus, P. (1997) *Análisis de Patrones de vegetación a escala regional en el Bajo Delta del Río Paraná (Argentina)*. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires, Argentina. 235 pp.
- Kandus, P. y Malvárez, A. (2004) *Vegetation patterns and change analysis in the lower delta islands of the Paraná River (Argentina)*. *Marshlands*. 24, 620-632.
- Kandus, P.; Malvárez, A.; Madanes, N. (2003) *Estudio de las comunidades de plantas herbáceas de las islas bonaerenses del Bajo Delta del Río Paraná (Argentina)*. *Darwiniana*. 41, 1-16.
- Kelly, P.J.; Raoult, D. y Mason, P.R. (1991) *Isolation of spotted fever group rickettsias from triturated ticks using a modification of the centrifugation-shell vial technique*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 85: 397-398.
- Kidd, L.; Maggi, R.; Diniz, P.P.V.P.; Hegarty, B.; Tucker, M. y Breitschwerdt, E. (2008) *Evaluation of conventional and real-time PCR assays for detection and differentiation of spotted fever group Rickettsia in dog blood*. *Vet. Microbiol*. 129:294-303.
- Kiffner, C.; Vor, T.; Hagedorn, P.; Niedrig, M.; Rühle, F. (2011) *Factors affecting patterns of tick parasitism on forest rodents in tick-borne encephalitis risk areas, Germany*. *Parasitol. Res*. 108:323–335.
- Kilpatrick, H.J.; LaBonte, A.M.; Stafford, K.C. (2014) *The relationship between deer density, tick abundance, and human cases of Lyme disease in a residential community*. *J. Med. Entomol*. 51:777–784.
- Krasnov, B.R.; Morand, S.; Hawlena, H.; Khokhlova, I. S. & Shenbrot, G. I. (2005a) *Sex-biased parasitism, seasonality and sexual size dimorphism in desert rodents*. *Oecologia* .146: 209-217.
- Krasnov, B.R.; Khokhlova, I.S.; Arakelyan, M.S. & Degen, A.A. (2005b) *Is a starving host tastier? Reproduction in fleas parasitizing food-limited rodents*. *Funct. Ecol*. 19:625-631.
- Krasnov, B.R.; Poulin, R. y Morand, S. (2006) *Patterns of macroparasite diversity in small mammals*. En: *Micromammals and macroparasites* (Eds.: Morand, S.; Krasnov, B.R. y Poulin, R.). Springer, Tokyo, Japon, p. 197-225
- Krasnov, B.R.; Bordes, F.; Khokhlova, I.S. y Morand, S. (2012) *Gender-biased parasitism in small mammals: patterns, mechanisms, consequences*. *Mammalia*. 76:1-13.
- Kurtti, T.J.; Simser, J.A.; Baldrige, G.D.; Palmer, A.T. y Munderloh, U.G. (2005) *Factors influencing in vitro infectivity and growth of Rickettsia peacockii (Rickettsiales: Rickettsiaceae), an endosymbiont of the Rocky Mountain wood tick, Dermacentor andersoni (Acari, Ixodidae)*. *J. Invertebr. Pathol*. 90:177-186.

- Knülle, W. y Wharton, G.W. (1964) *Equilibrium humidities in arthropods and their ecological significance*. *Acarologia* 6:299–306.
- Labruna, M.B.; Whitworth, T.; Horta, M.C.; Bouyer, D.H.; McBride, J.W.; Pinter, A.; Popov, V.; Gennari, S.M. y Walker, D. H. (2004). *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, M.B.; Pacheco, R.C.; Nava, S.; Brandão, P.E.; Richtzenhain, L.J.; Guglielmone, A.A. (2007a) *Infection by Rickettsia bellii and Candidatus “Rickettsia amblyommii” in Amblyomma neumanni ticks from Argentina*. *Microb. Ecol.* 54:126-33.
- Labruna, M.B.; Ogrzewalska, M.; Martins, T.F.; Pinter, A. y Horta, M.C. (2008) *Comparative susceptibility of larval stages of Amblyomma aureolatum, Amblyomma cajennense, and Rhipicephalus sanguineus to infection by Rickettsia rickettsii*. *J. Med. Entomol.* 45:1156-1159.
- Lackman, D.B.; Parker, R.R.; Gerloff, R.K. (1949) *Serological characteristics of a pathogenic rickettsia occurring in Amblyomma maculatum*. *Public Health Rep.* 64:1342–1349.
- Lackman, D.B.; Bell, E.J.; Stoenner, H.G.; Pickens, E.G. (1965) *The Rocky Mountain spotted fever group of rickettsias*. *Health Lab. Sci.* 74:135–141.
- Lareschi, M. (1996) *Estudio preliminar de la comunidad de roedores (Rodentia: Muridae) y sus ectoparásitos (Acari, Phthiraptera y Siphonaptera) en Punta Lara (Buenos Aires)*. *Rev. Soc. Entomol. Arg.* 55: 113-120.
- Lareschi, M. (2006) *The relationship of sex and ectoparasite infestation in the water rat Scapteromys aquaticus (Rodentia: Cricetidae) in La Plata, Argentina*. *Rev. Biol. Trop.*, 54: 673-679.
- Lareschi, M. (2010a) *Ectoparasite occurrence associated with males and females of wild rodents Oligoryzomys flavescens (Waterhouse) and Akodon azarae (Fischer) (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae) in the Punta Lara wetlands, Argentina*. *Neotr. Entomol.* 39: 818-822.
- Lareschi, M. (2010b) *A new species of Androlaelaps Berlese, 1903 (Acari: Parasitiformes) parasitizing an akodontine rodent (Cricetidae: Sigmodontinae) in northeastern Argentina*. *Syst. Parasitol.* 76: 199-203.
- Lareschi, M. (2011) *Laelapid mites (Parasitiformes: Gamasida), parasites of Akodon philipmyersi (Rodentia: Cricetidae) in the northern campos grasslands, Argentina, with the description of a new species*. *J. Parasitol.* 97: 795-799.

- Lareschi, M. y Sánchez López, M.I. (2000) *Ectoparásitos (Phthiraptera y Acari) de roedores (Rodentia: Muridae: Sigmodontinae) en el delta bonaerense del río Paraná, Argentina*. Rev. Soc. Entomol. Arg. 59: 17-19.
- Lareschi, M. y Gettinger, D. (2009) *A new species of Androlaelaps (Acari: Parasitiformes) from the akodontine rodent Deltamys kempi Thomas, 1919, in La Plata River Basin, Argentina*. J. Parasitol. 95:1352-1355.
- Lareschi, M. y Krasnov, B.R. (2010) *Determinants of ectoparasite assemblage structure on rodents hosts from South American marshlands: the effect of host species, locality and season*. Med. Vet. Entomol. 24: 284-292.
- Lareschi, M. y Velazco, P.M. (2013) *Laelapinae mites (Acari: Parasitiformes: Laelapidae) parasitic of sigmodontine rodents from northern Peru, with the description of a new species from Akodon aerosus (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae)*. J Parasitol. 99:189-193.
- Lareschi, M.; Notarnicola, J.; Navone, G. y Linardi, P.M. (2003) *Arthropod and filaroid parasites associated with wild rodents in the northeast marshes of Buenos Aires, Argentina*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 98: 673-677.
- Lareschi, M.; Literak, I.; Capek, M. y Sychra, O. (2013) *Specific association between the mites Androlaelaps fahrenheitsi (Acari: Laelapidae) and birds Premnoplex brunnescens in Costa Rica: possible evidence of a recent host switch*. Exp. Appl. Acarol. 60:281-287.
- Leschnik, M.; Kirtz, G.; Tichy, A. y Leidinger, E. (2008) *Seasonal occurrence of canine babesiosis is influenced by local climate conditions*. Int. J. Med. Microbiol. 298:243-248.
- L'Hostis, M.; Dumon, H.; Dorchies, B.; Boisdron, F.; GorenXot, A. (1995) *Seasonal incidence and ecology of the tick Ixodes ricinus (Acari: Ixodidae) on grazing pastures in Western France*. Exp. Appl. Acarol. 19, 211–220.
- Liljesthröm , G.G. y Lareschi M. (2002) *Estudio preliminar de la comunidad de ectoparásitos de roedores sigmondontinos en el partido de Berisso, provincia de Buenos Aires*. Red Argentina de Estudio de Artrópodos Vectores de Enfermedades Humanas, Serie Enfermedades Transmisibles. 2: 253-256.
- Linardi, P.M. y L.R. Guimarães. (2000) *Sifonápteros do Brasil*. Museu de Zoologia USP/ FAPESP. São Paulo, Brasil. p. 291.
- Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S.L.; Matsudaira, P.; Baltimore, D. y Darnell, J. (2000) *Processing of rRNA and tRNA*. *Molecular Cell Biology*, 4th edition. (Eds: Berk, A., Zipursky, S., y Lodish, H.). W. H. Freeman, Nueva York, Estados Unidos de Norteamérica. p. 1184

- Lutermann, H.; Fagir, D.M.; Bennett, N.C. (2015) *Complex interactions within the ectoparasite community of the eastern rock sengi (Elephantulus myurus)*. Int. J. Parasitol. 4:148–158
- Malvárez, A.I. (1997) *Las comunidades vegetales del Delta del río Paraná. Su relación con factores ambientales y patrones de paisaje*. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Argentina.
- Mansueto, P.; Vitale, G.; Cascio, A.; Seidita, A.; Pepe, I.; Carroccio, A.; di Rosa, S.; Battista Rini, G.; Cillari, E. y Walker, D.H. (2012) *New insight into immunity and immunopathology of rickettsial diseases*. Clin. Dev. 2012:2-26.
- Maroli, M., Vadell, M. V., Iglesias, A., Padula, P. J., & Villafañe, I. E. G. (2015). Daily Movements and Microhabitat Selection of Hantavirus Reservoirs and Other Sigmodontinae Rodent Species that Inhabit a Protected Natural Area of Argentina. *EcoHealth*, 12(3), 421-431.
- Marques, S.; Barros-Battesti, D.M.; Onofrio, V.C.; Famadas, K.M.; Faccini, J.L. y Keirans, J.E. (2004) *Redescription of larva, nymph and adults of Ixodes loricatus Neumann, 1899 (Acari: Ixodidae) based on light and scanning electron microscopy*. Syst. Parasitol. 59: 135-146.
- Martines, E.L. y Lira L.C. (2008) *Cálculo de la Temperatura de Punto de Rocío a Diferentes Valores de Presión*. Simposio de Metrología. Santiago de Querétaro, México, 22 al 24 de Octubre de 2008.
- Martins, T.F.; Onofrio, V.C.; Barros- Battesti, D.M. y Labruna, M.B. (2010) *Nymphs of the genus Amblyomma (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescrptions, and identification key*. Ticks Tick borne Dis. 1:75-99.
- Martins, T.F., Labruna, M.B., Mangold, A.J., Cafrune, M.M., Guglielmone, A.A., 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.
- Martins-Hatano, F.; Gettinger, D.; Manhaes, M.L y Bergallo, H.G. (2012) *Morphometric variations of laelapine mite (Acari: Mesostigmata) populations infesting small mammals (Mammalia) in Brazil*. Syst. Parasitol., 70: 185-190.
- Marzal, A.; Bensch, S.; Reviriego, M.; Balbontin, J.; De Lope, F. (2008) *Effects of malaria double infestation in birds: one plus one is not two*. J. Evol. Biol. 21: 979–987.
- Massoia, E. y Fornes, A. (1969) *Claves para el reconocimiento de los roedores del Delta del Paraná (Mammalia)*. IDIA. 253:11–18.
- Mauri, R.A. (1966) *Ácaros parásitos de roedores del delta bonaerense*. Neotrópica 12: 36-37.

- Mauri, R.A. y Capri, J.J. (1972) *Ectoparásitos (Acarina y Suctoria) de roedores del delta bonaerense*. Delta del Paraná, 13: 28-29.
- Mertins, J.W.; Moorhouse, A.S.; Alfred, J.T.; Hutcheson, H.J. (2010) *Amblyomma triste (Acari: Ixodidae): new North American collection records, including the first from the United States*. J. Med. Entomol. 47:536–542.
- Mideo, N. (2009) *Parasite adaptations to within-host competition*. Trends Parasitol. 25:261–268.
- Milagres, B.S.; Padilha, A.F.; Montandon, C.E.; Freitas, R.N.; Pacheco, R.; Walker, D. H.; Labruna, M.B.; Mafra, C.L. y Galvão, M.A. (2013) *Spotted fever group rickettsia in small rodents from areas of low endemicity for brazilian spotted fever in the eastern region of Minas Gerais state, Brazil*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 88:937-939.
- Mills J.N.; Yates T.L.; Childs J.E.; Parmenter R.R.; Ksiazek T.G.; Rollin P.E. y Peters C. J. (1995) *Guidelines for working with rodents potentially infected with hantavirus*. J. Mammal. 76:716-722.
- Milstone, A. y Dumler, J.S. (2009). *Rocky Mountain Spotted Fever*. En: *Bacterial Infections of Humans* (Eds: Evans, A.S. y Brachman, P.S.) Springer, Nueva York, Estados Unidos de Norteamérica, p. 661-676.
- Myllymaki, A., Paasikallio, A., Pankakoski, E., Kanervo, V. 1971 Removal experiments on small quadrats as a means of rapid assessment of the abundance of small mammals. Ann Zool Fennici 8, 177-185.
- Monje, L.; Varayoud, J.; Luque, E.H. y Ramos, J.G. (2007) *Neonatal exposure to bisphenol A modifies the abundance of estrogen receptor alpha transcripts with alternative 5'-untranslated regions in the female rat preoptic area*. J Endocrinol. 194: 201-212.
- Monje, L.D.; Nava, S.; Antoniazzi, L.R.; Colombo, V.C.; Beldomenico, P.M. (2014) *In vitro isolation and infection intensity of Rickettsia parkeri in Amblyomma triste ticks from the Paraná River Delta region, Argentina*. Ticks tick borne dis. 5: 924-927.
- Monje, L.D.; Nava, S.; Eberhardt, A.T.; Correa, A.I.; Guglielmone, A.A. y Beldomenico, P.M. (2015a) *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, L.D.; Costa, F.B.; Colombo, V.C.; Labruna, M.B.; Antoniazzi, L.R.; Gamietea, I.; Nava, S.; Beldomenico, P.M. (2015b). Infection dynamics of Rickettsia parkeri in cattle in the Paraná River Delta, Argentina. J. Med. Entomol. (en revisión)

- Mooring, M.S.; Mazhowu, W. y Scott, C.A. (1994) *The effect of rainfall on tick challenge at Kyle Recreational Park, Zimbabwe*. Exp. App. Acarol. 18:507-520.
- Mooring, M.S.; Benjamin, J.E.; Harte, C.R. y Herzog, N.B. (2000) *Testing the interspecific body size principle in ungulates: the smaller they come, the harder they groom*. Anim. Behav. 60: 35-45.
- Moraru, G.M.; Goddard, J.; Paddock, C.D. y Varela-Stokes, A. (2013) *Experimental infection of cotton rats and bobwhite quail with Rickettsia parkeri*. Parasit Vectors, 6: 70.
- Myllymaki, A.; Paasikallio, A.; Pankakoski, E.; Kanervo, V. (1971) Removal experiments on small quadrats as a means of rapid assessment of the abundance of small mammals. Ann Zool Fennici 8, 177-185.
- Nava, S.; Lareschi, M. y Voglino, D. (2003) *Interrelationship between ectoparasites and wild rodents from northeastern Buenos Aires province, Argentina*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 98: 45-49.
- Nava, S.; Lareschi, M.; Abba, A.M.; Beldoménico, P.M.; Venzal, J.M.; Mangold, A.J.; Guglielmone, A.A. (2005) *Larvae and nymphs of Amblyomma tigrinum Koch, 1844 and Amblyomma triste Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) naturally parasitizing sigmodontinae rodents*. Acarologia. 46:135–141.
- Nava, S.; Elshenawy, Y.; Eremeeva, M.E.; Sumner, J.W.; Mastropaolo, M.; Paddock, C.D. (2008a) *Rickettsia parkeri* in Argentina. Emerg. Infect. Dis. 14:1894-1897
- Nava, S.; Pérez-Martínez, L.; Venzal, J.M.; Portillo, A.; Santibáñez, S. y Oteo, J.A. (2008b) *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides felis* from Argentina. Vector Borne Zoonotic Dis.8: 465–466.
- Nava, S.; Mangold, A.J.; Mastropaolo, M.; Venzal, J.M.; Fracassi, N.; Guglielmone, A.A. (2011) *Seasonal dynamics and hosts of Amblyomma triste (Acari: Ixodidae) in Argentina*. Vet. Parasitol. 181: 301-308.
- Nava, S., Mastropaolo, M., Guglielmone, A.A. y Mangold, A.J. (2013) *Effect of deforestation and introduction of exotic grasses as livestock forage on the population dynamics of the cattle tick Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) in Northern Argentina*. Res. Vet. Sci. 95: 1046-1054.
- Nelson, W.A.; Keirans, J.E.; Bell, J.F.; Clifford, C.M. (1975) *Host-ectoparasite relationships*. J. Med. Entomol. 12:143–166.
- Navone, G.T.; Notarnicola, J.; Nava, S.; Robles, M.R.; Galliari, C. y Lareschi, M. (2009) *Arthropods and helminths assemblage in sigmodontine rodents from wetlands of the rio de La Plata, Argentina*. Mastozool. Neotr. 16: 121-133.

- Nieri-Bastos, F. A.; Labruna, M.B.; Marcili, A.; Durden, L.A.; Mendoza-Uribe, L. y Barros-Battesti, D.M. (2011) *Morphological and molecular analysis of Ornithonyssus spp.(Acari: Macronyssidae) from small terrestrial mammals in Brazil*. Exp. Appl. Acarol. 55: 305-327.
- Nieri-Bastos, F.A.; Szabó, M.P.J; Pacheco, R.C.; Soares, J.F., Soares, H.S.; Moraes-Filho, J.; Dias, R.A.; Labruna, M.B. (2013) *Comparative evaluation of infected and noninfected Amblyomma triste ticks with Rickettsia parkeri, the agent of an emerging rickettsiosis in the New World*. Biomed Res. vol. 2013, Article ID 402737, 6 p
- Ochsenbein, A.F. y Zinkernagel, R.M. (2000) *Natural antibodies and complement link innate and acquired immunity*. Immunol. Today. 21:624–630.
- Ogrzewalska, M.; Pacheco ,R.C.; Uezu, A.; Richtzenhain, L.J.; Ferreira, F.; Labruna, M.B. (2009) *Rickettsial infection in Amblyomma nodosum ticks (Acari: Ixodidae) from Brazil*. Ann. Trop. Med. Parasitol. 103:413-425.
- Ogrzewalska, M.; Saraiva, D.G.; Moraes-Filho, J.; Martins, T.F.; Costa, F.B.; Pinter, A. y Labruna, M. (2012) *Epidemiology of Brazilian spotted fever in the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil*. Parasitology. 139:1283-1300.
- Ogrzewalska, M.; Martins, T.; Miroslav, C.; Literak, I.; Labruna, M.B. (2013) *A Rickettsia parkeri-like agent infecting Amblyomma calcaratum nymphs from birds in Mato Grosso do Sul, Brazil*. Ticks Tick Borne Dis.7:1-10.
- Ostfeld, R. S., Levi, T., Jolles, A. E., Martin, L. B., Hosseini, P. R., y Keesing, F. (2014). *Life history and demographic drivers of reservoir competence for three tick-borne zoonotic pathogens*. Plos One. 9: e107387
- Pacheco, R.C.; Venzal, J.M.; Richtzenhain, L.J.; Labruna, M.B. (2006) *Rickettsia parkeri in Uruguay*. Emerg. Infect. Dis. 12: 1804–1805.
- Pacheco, R.C.; Moraes-Filho, J.; Nava, S.; Brandão, P.E.; Richtzenhain, L.J.; Labruna, M.B. (2007a) *Detection of a novel spotted fever group rickettsia in ticks Amblyomma parvum (Acari: Ixodidae) from Argentina*. Exp. Appl. Acarol. 43:63–71.
- Pacheco, R.C.; Horta, M.C.; Moraes-Filho, J.; Ataliba, A.C.; Pinter, A. y Labruna, M. B. (2007b) *Rickettsial infection in capybaras (Hydrochoerus hydrochaeris) from Sao Paulo, Brazil: serological evidence for infection by Rickettsia bellii and Rickettsia parkeri*. Biomedica. 27: 364-371.
- Pacheco, R.C.; Arzua, M.; Nieri-Bastos, F.A.; Moraes-Filho, J.; Marcili, A.; Richtzenhain, L.J.; Barros-Battesti, D.M. y Labruna, M. (2012) *Rickettsial infection in ticks (Acari: Ixodidae) collected on birds in southern Brazil*. J. Med .Entomol. 49:710-716.

- Paddock, C.D.; Sumner, J.W.; Comer, J.A.; Zaki, S.R.; Goldsmith, C.S.; Goddard, J.; McLellan, S.L.F.; Tamminga, C.L. y Ohl, C. A. (2004) *Rickettsia parkeri: A newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States*. Clin. Infect. Dis.38: 805–811.
- Paddock, C.D. (2005) *Rickettsia parkeri as a paradigm for multiple causes of tick-borne spotted fever in the western hemisphere*. Ann. N. Y. Acad. Sci.1063: 315–326.
- Paddock, C.D.; Finley, R.W.; Wright, C.S.; Robinson, H.N.; Schrodt, B.J.; Lane, C.C.; Ekenna, O.; Blass, A.; Tamminga, C.L.; Ohl, C.A.; McLellan, S.L.F.; Goddard, J.; Holman, R.C.; Openshaw, J.; Sumner, J.; Zaki, S. y Eremeeva, M. E. (2008a). *Rickettsia parkeri rickettsiosis and its clinical distinction from Rocky Mountain spotted fever*. Clin. Infect. Dis. 47:1188-1196.
- Paddock, C.D.; Fernandez, S.; Echenique, G.A.; Sumner, J.W.; Reeves, W.K.; Zaki, S. R. y Remondegui, C.E. (2008b) *Rocky mountain spotted fever in Argentina*. Am. J. Trop. Med. Hyg.78: 687–692.
- Padgett, D.A. y Glaser, R. (2003) *How stress influences the immune response*. Trends Immunol. 24:444–448.
- Parker, R.R.; Kohls, G.M.; Cox, G.W.; Davis, G.E. (1939) *Observations on an infectious agent from Amblyomma maculatum*. Public Health Rep. 54:1482-4.
- Parola, P.; Paddock, C.D.; Socolovschi, C.; Labruna, M.B.; Mediannikov, O.; Kernif, T.; Abdad, M.Y.; Stenos, J.; Bitam, I.; Fournier, P.E.; Raoult, D. (2013) *Update on tick-borne rickettsioses around the world: A geographic approach*. Clin. Microbiol. Rev. 26:657–702.
- Pathak, A.; Pelensky, C.; Boag, B.; Cattadori, I. (2012) *Immuno-epidemiology of chronic bacterial and helminth co-infestations: observations from the field and evidence from the laboratory*. Int. J. Parasitol. 42: 647–655.
- Perret, J.L.; Guigoz, E.; Rais, O. y Gern, L. (2000) *Influence of saturation deficit and temperature on Ixodes ricinus tick questing activity in a Lyme borreliosis-endemic area (Switzerland)*. Parasitol. Research. 86: 554-557.
- Petney, T.N. y Andrews, R.H. (1998) *Multiparasite communities in animals and humans: frequency, structure and pathogenic significance*. Int. J. Parasitol. 28: 377–393.
- Piranda, E.M.; Faccini, J.L.H.; Pinter, A.; Saito, T.B.; Pacheco, R.C.; Hagiwara, M.K. & Labruna, M.B. (2008) *Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of Rickettsia rickettsii: clinical and laboratory findings*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 103: 696-701.

- Portillo, A.; García-García, C.; Sanz, M.M.; Santibáñez, S.; Venzal, J.M.; Oteo, J.A. (2013) *Case report: a confirmed case of Rickettsia parkeri infection in a traveler from Uruguay*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 89: 1203–1205.
- Racca, A.L.; Eberhardt, A.T.; Moreno, P.G.; Baldi, C.; Beldomenico, P.M. (2014) *Differences in natural antibody titres comparing free-ranging guanacos (Lama guanicoe) and capybaras (Hydrochoerus hydrochaeris)*. Vet. J. 199:308–309.
- Randolph, S.E. (2000) *Ticks and tick-borne disease systems in space and from space*. Adv. Parasit. 47:217–243.
- Randolph, S.E. (2004) *Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors*. Parasitology. 129:37-65.
- Randolph, S. E. y Storey, K. (1999). *Impact of microclimate on immature tick-rodent host interactions (Acari: Ixodidae): implications for parasite transmission*. J. Med. Entomol. 36: 741-748.
- Raoult, D. (2010) *Introduction to Rickettsioses, Ehrlichioses, and Anaplasmosis*. En: *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 7th ed (Eds: Mandell GL; Bennett JE; Dolin R.) Elsevier, Philadelphia, USA. p. 2495-2498.
- Raoult, D. y Roux, V. (1997) *Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases*. Clin. Microbiol. Rev. 10: 694-719.
- Raoult, D.; La Scola, B.; Enea, M.; Fournier, P.E.; Roux, V.; Fenollar, F.; Galvao, M. A. y de Lamballerie, X. (2001) *A flea-associated Rickettsia pathogenic for humans*. Emerg. Infect. Dis. 7: 73-81.
- Regnery, R.L.; Spruill, C.L. y Plikaytis, B.D. (1991) *Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes*. J. Bacteriol. 173:1576-1589.
- Richards, S. (2008) *Dealing with overdispersed count data in applied ecology*. J. Appl. Ecol. 45:218–227.
- Ricketts, H.T. (1906) *The transmission of Rocky Mountain spotted fever by the bite of the wood tick (Dermacentor occidentalis)*. J. Am. Med. Assoc. 47:358
- Ripoll, C.M.; Remondegui, C.E.; Ordonez, G.; Arazamendi, R.; Fusaro, H.; Hyman, M. J.; Paddock, C.D.; Zaki, S.R.; Olson, J.G. y Santos-Buch, C. A. (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, J.J.; Moreira-Soto, A.; Alvarado, G.; Taylor, L.; Calderón-Arguedas, O.; Hun, L.; Corrales-Aguilar, E.; Morales, J.A.; 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, A.C.; Crudo, F.; Nicholson, W.L.; Varela-Stokes, A.; Lash, R.R. y Paddock, C.D. (2011) *Rickettsia parkeri Rickettsiosis, Argentina*. Emerg. Infect. Dis. 17:1169-1173.
- Romer, Y.; Nava, S.; Govedic, F.; Cicuttin, G.; Denison, A.M.; Singleton, J.; Kelly, A.; Kato, C. y Paddock, C. D. (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.
- Roulin, A.; Christe, P.; Dijkstra, C.; Ducrest, A.L.; Jungi, T.W. (2007) *Originrelated, environmental, sex, and age determinants of immunocompetence, susceptibility to ectoparasites, and disease symptoms in the barn owl*. Biol. J. Linn. Soc. 90:703–718
- Roux, V.; Fournier, P.E.; 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.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York, Estados Unidos de Norteamérica, p. 2344.
- Seijo, A.; Picollo, M.; Nicholson, W.; Paddock, C. (2007) *Rickettsial spotted fever in the Paraná Delta. An emerging disease*. Medicina (Buenos Aires). 67:723-726.
- Sheldon, B.C. y Verhulst, S. (1996) *Ecological immunology: costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology*. Trends. Ecol. Evol. 11:317–321.
- Silveira, I.; Pacheco, R.; Szabó, M.; Ramos, H.; Labruna, M. (2007) *Rickettsia parkeri in Brazil*. Emerg. Infect. Dis. 13:1111–1113
- Simon, A.; Thomas, D.W.; Blondel, J.; Lambrechts, M.M.; Perret, P. (2003) *Within-brood distribution of ectoparasite attacks on nestling blue tits: a test of the tasty chick hypothesis using inulin as a tracer*. Oikos 102:551–558.
- Smit, F.G.A.M. (1987) *An illustrated catalogue of the Rothschild collection of fleas (Siphonaptera) in the British Museum (Natural History) 7: Malacopsylloidea (Malacopsyllidae and Rhopalopsyllidae)*. Oxford University, Oxford, Reino Unido. p.380.

- Soliman, S.; Marzouk, A.S.; Main, A.J.; Montasser, A.A. (2001) *Effect of sex, size, and age of commensal rat hosts on the infestation parameters of their ectoparasites in a rural area of Egypt*. J. Parasitol. 87:1308–1316.
- Sorci, G.; de Fraipont, M.; Clobert, J. (1997) *Host density and ectoparasite avoidance in the common lizard (Lacerta vivipara)*. Oecologia. 111:183–188.
- Souza, C.E.; Moraes-Filho, J.; Ogrzewalska, M.; Uchoa, F.C.; Horta, M.C.; Souza, S.S.L.; Borba, R.C.M.; Labruna, M.B. (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.
- Strandtmann, R.W. y Wharton, G.W. (1958) *Manual of mesostigmatid mites, Contribution N°4 Of The Institute of The Acarology*. University of Maryland, College Park, Maryland, Estados Unidos de Norteamerica. 330 p.
- Stafford, K.C. (1993) *Reduced abundance of Ixodes scapularis (Acari: Ixodidae) with exclusion of deer by electric fencing*. J. Med. Entomol. 30:986–996.
- Stanko, M.; Miklisová, D.; de Bellocq, J.G.; Morand, S. (2002) *Mammal density and patterns of ectoparasite species richness and abundance*. Oecologia.131:289–295.
- Sutherst, R.W. y Bourne, A.S. (2006) *The effect of desiccation and low temperature on the viability of eggs and emerging larvae of the tick, Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Canestrini) (Ixodidae)*. Int. J. Parasitol. 36:193–200.
- Szabó, M.P.J.; Mukai, L.S.; Rosa, P.C.S.; Bechara, G.H. (1995) *Differences in the acquired resistance of dogs, hamsters, and guinea pigs to repeated infestations with adult ticks Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae)*. Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci. 32: 43–50.
- Tack, W.; Madder, M.; Baeten, L.; De, F.P.; Verheyen, K. (2012) *The abundance of Ixodes ricinus ticks depends on tree species composition and shrub cover*. Parasitology 139:1273–1281.
- Tack, W.; Madder, M.; Baeten, L.; Vanhellefont, M.; Verheyen, K. (2013) *Shrub clearing adversely affects the abundance of Ixodes ricinus ticks*. Exp. Appl. Acarol. 60, 411–420.
- Tarragona, E.L.; Cicuttin, G.L.; Mangold, A.J.; Mastropaolo, M.; De Salvo, M.N. y Nava, S. (2015). *Rickettsia infection in Amblyomma tonelliae, a tick species from the Amblyomma cajennense complex*. Ticks tick borne dis. 6:173-177.
- Telfer, S.; Lambin, X.; Birtles, R.; Beldomenico, P.; Burthe, S.; Paterson, S.; Begon, M. (2010) *Species interactions in a parasite network drive infestation risk in a wildlife population*. Science. 330:243–246.

- Tomassone, L.; Conte, V.; Parrilla, G.; De Meneghi, D. (2010) *Rickettsia infection in dogs and Rickettsia parkeri in Amblyomma tigrinum ticks, Cochabamba Department, Bolivia*. Vector Borne Zoonotic Dis.10:953-958.
- Uchiyama, T. (2012) *Tropism and pathogenicity of rickettsiae*. *Front. Microbiol.* 3: article 230.
- Ulrich, Y. y Schmid-Hempel, P. (2012) *Host modulation of parasite competition in multiple infestations*. *Proc. Biol. Sci.* 279: 2982–2989.
- Vaclav, R.; Calero-Torralbo, M.A. y Valera, F. (2008) *Ectoparasite load is linked to ontogeny and cell-mediated immunity in an avian host system with pronounced hatching asynchrony*. *Biol. J. Linn. Soc.* 94: 463-473.
- Venzal, J.M.; Portillo, A.; Estrada-Peña, A.; Castro, O.; Cabrera, P.A.; Oteo, J.A. (2004) *Rickettsia parkeri in Amblyomma triste from Uruguay*. *Emerg. Infec. Dis.*10:1493– 1495.
- Venzal, J.M.; Estrada-Peña, A.; Castro, O.; De Souza, C.G.; Felix, M.L.; Nava, S.; Guglielmone, A.A. (2008) *Amblyomma triste Koch, 1844 (Acari: Ixodidae): hosts and seasonality of the vector of Rickettsia parkeri in Uruguay*. *Vet. Parasitol.* 155:104–109.
- Venzal, J.M.; Estrada-Peña, A.; Portillo, A.; Manglod, A.J.; Castro, O.; De Souza, C.G.; Felix, M.L.; Pérez-Martínez, L.; Santibáñez, S. y Oteo, J.A. (2012) *Rickettsia parkeri: a Rickettsial pathogen transmitted by ticks in endemic areas for spotted fever rickettsiosis in southern Uruguay*. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.*54:131-134.
- Veronez, V.A.; de Castro, M.B.; Bechara, G.H. y Szabó, M.P. (2010). *Histopathology of Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae) ticks fed on resistant hosts*. *Exp. App. Acarol.* 50:151-161.
- Vicente, J.; Perez-Rodriguez, L.; Gortazar, C. (2007) *Sex, age, spleen size, and kidney fat of redder relative to infection intensities of the lungworm Elaphostrongylus cervi*. *Naturwissenschaften* 94:581–587
- Walker, D.H.; Paddock, C.D. y Dumler, J.S. (2008) *Emerging and re-emerging tick-transmitted rickettsial and ehrlichial infections*. *Med. Clin. N. Am.* 92: 1345-1361.
- Walker, D.H. (2010) *Rickettsia rickettsii and other spotted fever Group Rickettsiae (Rocky Mountain spotted fever and other spotted fevers)*. En: *Principles and Practice of Infectious Diseases 7th Ed.* (Eds.: Mandell, G.L.; Bennett, J.E.; Dolin, R.) Elsevier. Philadelphia, Estados Unidos de Norteamérica. p. 2499-2508.
- Weiss, E. y Dasch, G.A. (1991) *Introduction to the Rickettsiales and other parasitic or mutualistic prokaryotes*. En: *The Prokaryotes, 2nd Ed.* (Eds: Balows, A.; Trüper, H.G.; Dworking, M.;

- Harder, W. y Schleifer, W.) Springer , New York, Estados Unidos de Norteamérica. p. 2402–2406.
- Whitman, T.J.; Richards, A.L.; Paddock, C.D.; Tamminga, C.L.; Sniezek, P.J.; Jiang, J.; Byers, D. y Sanders, J.W. (2007) *Rickettsia parkeri* infection after tick bite, Virginia. *Emerg. Infect. Dis.* 13:334.
- Whiteman, N.K. y Parker, P.G. (2004) *Body condition and parasite load predict territory ownership in the Galapagos hawk*. *Condor*. 106: 915–921.
- Wilson, K.; Bjornstand, A.P.; Dobson, S.; Merler, G.; Poglayen, G.; Randolph, S.E.; Read, A.F. y Skorping, A. (2002). *Heterogeneities in macroparasite infections: patterns and processes*. En: *The Ecology of Wildlife Diseases*. (Eds.: Hudson, P.; Rizzoli, A.; Grenfell, B.; Heesterbeek, H.; Dobson, A.). Oxford University Press, Oxford, Inglaterra. p: 6-44.
- Wright, C.L.; Gaff, H.D.; Sonenshine, D.E. y Hynes, W.L. (2015a). *Experimental vertical transmission of Rickettsia parkeri in the Gulf Coast tick, Amblyomma maculatum*. *Ticks tick borne dis.* 6:568-573.
- Wright, C.L.; Sonenshine, D.E.; Gaff, H.D. y Hynes, W.L. (2015b) *Rickettsia parkeri* Transmission to *Amblyomma americanum* by cofeeding with *Amblyomma maculatum* (Acari: Ixodidae) and Potential for Spillover. *J. Med. Entomol.* 52:1090-1095.
- Yoder, J.A.; Christensen, B.S.; Croxall, T.J.; Schumaker, L.K.; Tank, J.L. (2008) *Moisture requirements for activity/survival of the gulf coast tick, Amblyomma maculatum Koch (Acari: Ixodidae), based on a water balance study of all life cycle stages*. *Int. J. Acarol.* 34:285–292.
- Zemtsova, G.E.; Montgomery, M. y Levin, M.L. (2015) *Relative Sensitivity of Conventional and Real-Time PCR Assays for Detection of SFG Rickettsia in Blood and Tissue Samples from Laboratory Animals*. *Plos one.* 10: e0116658.
- Zoffoli, M.; Kandus, P.; Madanes, N.; Calvo, D. (2008) *Seasonal and interannual analysis of marshlands in South America using NOAA-AVHRR NDVI time series: the case of the Parana Delta Region*. *Landscape Ecol.* 23:833-848.
- Zullinger, E.M.; Ricklefs, R.E.; Redford, K.H.; Mace, G.M. (1984) *Fitting sigmoidal equations to mammalian growth curves*. *J. Mammal.* 65:607–636.