



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA



Eco-epidemiología de las pulgas como vectores
potenciales de patógenos y productoras de tungiasis en la
provincia de Misiones, Argentina

Lic. Urdapilleta, Mara

Tesis presentada para optar al título de Doctora en Ciencias Naturales

Directores:

Dra. Marcela Lareschi

Dr. Oscar Daniel Salomón

Instituto Nacional de Medicina Tropical

Puerto Iguazú, Misiones

2021

A mamá Geci Tuca Pasinato y papá Carlos José Urdapilleta,
por enseñarme a volar sin miedo.

A Matías Ezequiel Tilocca, compañero de vuelo,
y a Hannah, fruto del amor.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Marcela Lareschi, quien supo iniciarme en la travesía del sistema científico y en el conocimiento de los ectoparásitos, brindándome herramientas, el apoyo y la confianza indispensables para la realización de las tareas de laboratorio, muestreos y creación de artículos; al Dr. Oscar Daniel Salomón, por la apuesta en la línea de investigación de los ectoparásitos en el INMeT, por su correspondencia y apoyo profesional; a ambos por la revisión atenta de la escritura de esta tesis.

A la Dra. Daniela Lamattina, por su aporte esencial en los análisis estadísticos de esta tesis, y sobre todo por su apoyo y compañía en el camino laboro-maternal. A la Lic. Eliana Burgos por compartir las arduas y gratificantes jornadas de muestreo. A Ramón Sosa y Nilso Molina por su acompañamiento y asistencia en el campo. A las licenciadas Magalí Giuliani, Micaela Cortéz y Belén Mietrich por el soporte técnico en el Laboratorio de Biología Molecular del INMeT.

A las trabajadoras del INMeT, Julieta Siches, Daniela Lamattina, Mariana Lorenzetti, Danny Soto, Pamela Lambert, Magalí Giuliani, Eliana Burgos, Katherina Vizcaychipi, María Elisa Peichoto, Mariela Martínez, Milena Casafús, Paula Díaz, Angelica Pech May, Victoria Gnazzo, Victoria Vadell, Mabel Giménez, Marília Favalesso, Micaela Cortés, Belén Meichtry, Sofía Moya, Micaela Gritti, en el proceso por reconocernos en la lucha de los derechos laborales y poner en el centro de debate la perspectiva de género.

A los compañeros de trabajo Ezequiel Vanderhoeven, Martín Salas, Juan Molina y Esteban Couto.

Al Instituto Nacional de Medicina Tropical (INMeT), por darme el lugar de trabajo y permitirme desarrollar los estudios que se presentan en esta tesis.

A las directoras del Centro de Estudio Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE), Dra. Graciela Navone y Dra. Victoria Micieli por recibirme en cada oportunidad y brindarme los recursos materiales imprescindibles. Particularmente agradecer a la Dra. Alda González por su articulación para la presentación a beca doctoral, al Dr. Walter Ferarri y Dr. Darío Balcázar por su asistencia en el Laboratorio de Biología Molecular, a la Dcv. Laura Morote por el diseño de los mapas, a la Lic. Graciela Minardi por su asesoramiento en los análisis estadísticos.

Al equipo del Laboratorio de Ectoparásitos del CEPAVE, integrado por la Lic. Ekaterina Savchenko, el Vet. Mauricio Melis y el Lic. Mario Espinoza-Carniglia, por los trabajos conjuntos y colaboraciones en la puesta a punto de protocolos, análisis moleculares y filogenéticos. Por sus conversas, mates, cafés y delicias que hicieron cada encuentro más gratificante.

Al Lic. Carlos Galliari (CEPAVE), al Dr. Ulyses Pardiñas (Centro Nacional Patagónico-CENPAT) y al Dr. Pablo Teta (Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia") por las identificaciones de los roedores y marsupiales.

A la Dra. Nazarena De Salvo y al Dr. Gabriel L. Cicuttin del Instituto de Zoonosis Luis Pasteur por iniciarme en el conocimiento y prospección de las bacterias patógenas, y agradecer al Dr. Santiago Nava por facilitar los controles indispensables para la realización de los análisis moleculares.

Estos trabajos fueron posibles gracias al apoyo económico sostenido de la Agencia para la Promoción Científica y Tecnológica (PICTs 2010-0924 [a G. Navone], 2015-1564 [a M. Lareschi]), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (PIO), Universidad Nacional de La Plata (N854 M. Lareschi).

A los y las vecinos/nas de Puerto Iguazú, por su interés en el proyecto de investigación, sus conversaciones y confianza al abrirme las puertas de sus casas, permitirme conocer sus patios y animales de compañía.

A mi querida amiga/hermana Rocío Sueiro por su amor infinito.

A la red familiar y amiga que en la cercanía o lejanía fueron imprescindibles para sobrellevar el desarraigo y el habitar de una ciudad desfavorable en sus condiciones más básicas.

A mis hermanos Andrés y Manuel por saberlos cerca siempre, a mis tías Tuchy Urdapilleta y Gladis Pasinato por estar presente en cada paso y vuelta del camino, a la abuela Licha por sus velas encendidas y a su espíritu al momento de presentar la tesis.

Especial reconocimiento a Matías Tilocca, por su amor; acompañó paso a paso la elaboración y minucioso trabajo de edición de esta tesis, y sobre todo por transmitirme el valor y placer por la escritura.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	7
ÍNDICE DE TABLAS	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
RESUMEN.....	13
ABSTRACT.....	15
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....	17
1.1 Breve historización de las pulgas	17
1.2 Taxonomía, biología y ecología de las pulgas	18
1.3 Importancia sanitaria de las pulgas	23
1.4 Las pulgas de la Selva Paranaense, Misiones, Argentina.....	28
1.5 Objetivo general	30
CAPÍTULO 2: ECO-EPIDEMIOLOGÍA DE LAS PULGAS ASOCIADAS A MAMÍFEROS SILVESTRES Y SINANTRÓPICOS DE MISIONES	31
2.1 Introducción	31
2.2 Metodología	32
2.3 Resultados	46
2.4 Discusión.....	70
CAPÍTULO 3: ECO-EPIDEMIOLOGÍA DE LAS PULGAS ASOCIADAS A ANIMALES DE COMPAÑÍA Y HUMANOS	75
3.1 Introducción	75
3.2 Diseño metodológico.....	76
3.3 Factores condicionantes del parasitismo de las pulgas en perros y gatos	79
3.3.1 Metodología	79
3.3.2 Resultados	84
3.3.3 Discusión.....	94
3.4 Conocimiento, actitudes, prácticas y percepción en relación con tungiasis.....	99
3.4.1 Materiales y métodos	99
3.4.2 Resultados	99
3.4.3 Discusión.....	103
CAPÍTULO 4: PULGAS DE INTERÉS SANITARIO POR SU ROL COMO TRANSMISORAS DE ENFERMEDADES.....	106
4.1 Introducción	106
4.2 Materiales y métodos	107
4.3 Resultados	114
4.4 Discusión.....	119

Conclusiones finales y perspectivas futuras	124
Referencias	127
ANEXO 1:.....	143

ABREVIATURAS

A	Adulto
AM	Abundancia media
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AICc	Criterio de Información de Akaike ajustado para muestras pequeñas
BI	Inferencia Bayesiana
BIC	Criterio de Información Bayesiano
CEPAVE	Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores
cf.	<i>confer</i> – Se aproxima al taxón conocido con algunas diferencias
Δ	Delta
D	Dominancia
DE	Desvío Estándar
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid - Ácido Etilen Diamino Tetraacético
EE	Error Estándar
Exp-H	índices de equidad de Shannon-Wiener
GLM	Modelo Lineal Generalizado
GLMM	Modelo Lineal Generalizado Mixto
gltA	Enzima citrato sintasa
H	Índice de diversidad de especies de Shannon
HA	Helechos Arborescentes, Distrito
<i>hrp</i>	Humedad relativa promedio
IC95%	Intervalo de Confianza del 95%
IM	Intensidad media
INMeT	Instituto Nacional de Medicina Tropical
INTA	Instituto Nacional de Tecnológico Argentino
IPRODHA	Instituto Provincial del Desarrollo Habitacional.
J	Juvenil
KOH	Hidróxido de potasio
L	Laureles, Distrito
LCR	Líquido cefalorraquídeo
Np	Número de pulgas
Nr	Número de ratones
ompB	outer membrane protein B - proteína de membrana externa B
OPS	Organización Panamericana de la Salud
P	Prevalencia
pb	pares de bases

PCR	Polymerase Chain Reaction - Reacción en Cadena de la Polimerasa
PI	Puerto Iguazú
PL	Planaltense, Sector
PNI	Parque Nacional Iguazú
pp	Probabilidades posteriores
PPPP	Parque Provincial Puerto Península
PPU	Parque Provincial Urugua-í
PR	Palo Rosa
RNI	Reserva Nacional Iguazú
rpm	revoluciones por minuto
sp.	Especie
subsp.	subespecie
TN	Trampa noche
<i>tp</i>	Temperatura promedio
TTT	Persona autopercibida Travesti o Transgénero o Transexual
VIF	Factores de inflación de la variación
♀	Hembra
♂	Macho

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Número y proporción de especies de pulgas según los sitios de colecta en Misiones, Argentina.

Tabla 2.2. Número de especies hospedadoras infestadas por pulgas en la provincia de Misiones, Argentina.

Tabla 2.3. Prevalencia y abundancia media de pulgas colectadas de roedores y marsupiales en diferentes áreas de la provincia de Misiones, Argentina.

Tabla 2.4. Frecuencia y abundancia media de pulgas colectadas de roedores y marsupiales en la provincia de Misiones, Argentina.

Tabla 3.1. Correlaciones de Pearson entre variables explicativas climáticas. En rojo y amarillo se resalta la correlación entre máximas y mínimas de la planilla de gatos y perros respectivamente. En verde y gris se resalta la correlación entre máximas, mínimas y sus medias de la planilla de gatos y perros, respectivamente.

Tabla 3.2. Frecuencia (n), intensidad media (IM), abundancia media (AM) y prevalencia (P) de pulgas *Ctenocephalides felis felis* en perros y gatos de áreas urbanas y periurbanas de Puerto Iguazú, Misiones.

Tabla 4.1. Prevalencia mínima de *Rickettsia* sp. en pulgas infestando perros, gatos, comadrejas y roedores en Puerto Iguazú (Misiones, Argentina). (MP=pool+/n (%): pools positivos/número de pulgas testeadas).

Tabla 4.2. Prevalencia mínima de *Bartonella* sp. en pulgas infestando animales de compañía y silvestres de Misiones, Argentina. (MP=pool+/n (%): pools positivos/número de pulgas testeadas).

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. A la izquierda se aprecia un cartel de la época en el cual se invitaba a presenciar aquellos espectáculos; la figura de derecha muestra la escena de un grupo de pulgas realizando diversas actividades durante una función de circo (Secrets of the flea circus, still, 2012. Wellcome collection).

Figura 1.2. Morfología externa de la pulga *Ctenocephalides felis felis* (Lewis, 1993).

Figura 1.3. Ciclo biológico de *Tunga penetrans*.

Figura 2.1. Sitios de colecta de pulgas en la Selva Paranaense, Misiones, Argentina.

Figura 2.2. Las primeras cuatro imágenes corresponden a sitios urbanos, las cuatro siguientes a sitios periurbanos.

Figura 2.3. Sitios de colecta en Parque Provincial Puerto Península.

Figura 2.4. Sitios de colecta en Comunidad Guaraní Iriapú.

Figura 2.5. Sitios de colecta en cultivos agrícolas de la ciudad de Wanda, a) pinar, b) eucaliptal, c y d) cultivo de yerba mate, e) cultivo de mandioca, f) cultivo de caña de azúcar.

Figura 2.6. Procesamiento de animales, a) *Oligoryzomys nigripes*, b) *Monodelphis dimidiata*, d) *Didelphis albiventris*, f) *Akodon montensis*.

Figura 2.7. Esquema fitogeográfico diferenciando las diferentes áreas y respectivos sitios de colecta.

Figura 2.8. Ejemplar macho de *Ctenocephalides felis felis*.

Figura 2.9. Macho *Tunga penetrans* de perro doméstico de Puerto Iguazú.

Figura 2.10. Ejemplares adultos de *Polygenis (P.) platensis*, de izquierda a derecha, hembra; detalle de la genitalia de la hembra; macho.

Figura 2.11. Ejemplares adultos de *Polygenis (P.) rimatus*, de izquierda a derecha, hembra; detalle de la genitalia de la hembra; detalle de la genitalia del macho.

Figura 2.12. Ejemplares adultos de *Polygenis (N.) pradoi*, de izquierda a derecha, hembra; macho; detalle de la genitalia del macho.

Figura 2.13. Ejemplares de *Polygenis (N.) pygaerus*, izquierda hembra; derecha detalle de la genitalia de la hembra.

Figura 2.14. Ejemplar macho de *Adoratopsylla (A.) antiquorum ronnai*; derecha, detalle de la genitalia.

Figura 2.15. Distribución estacional de pulgas colectadas en *Didelphis albiventris* en áreas urbana y periurbana de Puerto Iguazú. Número de pulgas colectadas y N, número de comadreas *Didelphis albiventris* capturadas por área y estación.

Figura 2.16. Gráfico referido a la importancia de los marsupiales y los roedores en la integración de los ciclos de transmisión sinantrópica y doméstica de las pulgas y potenciales patógenos.

Figura 3.1. Mapa de la ciudad de Puerto Iguazú indicando las dos áreas de estudio (en gris oscuro el área urbana/ en gris claro el área periurbana), ubicada en el trifujo noroeste de la provincia de Misiones, noreste de Argentina. La ciudad limita con la República Federativa de Brasil y la República de Paraguay, y con dos áreas naturales protegidas.

Figura 3.2. Revisión de animales de compañía en sitios urbanos y periurbanos de Puerto Iguazú.

Figura 3.3. Correlogramas de Pearson

Figura 3.4. Perros infestados por *Tunga penetrans* con diferentes tipos de lesiones.

Figura 3.5. Distribución de los datos de a) *C. f. felis* colectadas en perros, b) *C. f. felis* colectadas en gatos, en áreas urbanas y periurbanas de Puerto Iguazú 2017-2018.

Figura 3.6. Infestaciones por pique; arriba, pies de adulto de barrio periurbano; en el centro, niño de la Comunidad Mbya Guaraní Yriapú; abajo, dedo de niña donde se observa las heces expulsadas por la pulga (Fotos, Méd. Suvia J., Méd. Couto E., Lic. M. Giuliani, respectivamente).

Figura 4.1. Cabina de Seguridad Biológica Clase II/A-B3 indicada para extracción de ADN (INMeT).

Figura 4.2. Árbol de topología de inferencia bayesiana (IB) para 784 nucleótidos del gen *gltA* de las especies de *Rickettsia* inferido utilizando el modelo HKY+G. Los números de cada rama (sobre la rama) representan las probabilidades posteriores obtenidas en la IB. Se utilizó *Rickettsia bellii* como grupo externo. La barra de escala representa el número esperado de sustituciones de nucleótidos por sitio. La secuencia obtenida está resaltada en negrita.

Figura 4.3. Árbol filogenético de *Bartonella clarridgeiae* construido por el método de Inferencia Bayesiana, utilizando el modelo HKY + G. Los valores de las probabilidades posteriores se

muestran en las ramas. Se utilizó *Bartonella bacilliformis* como grupo externo. La barra de escala representa el número esperado de sustituciones de nucleótidos por sitio.

Figura 4.4. Árbol filogenético de las especies de *Bartonella* construido por el método de IB, utilizando el modelo TIM3ef+G. Los valores de los soportes se muestran en las ramas. Se utilizó *Bartonella bacilliformis* como grupo externo. La barra de escala representa el número esperado de sustituciones de nucleótidos por sitio.

RESUMEN

Las pulgas adultas (Siphonaptera) son insectos holometábolos, ectoparásitos hematófagos de aves y mamíferos, cuya mayor riqueza específica está asociada a los roedores cricétidos. De los aproximadamente 246 géneros y 2000-3000 especies y subespecies que se conocen actualmente a nivel mundial, para Argentina se han registrado unas 130 especies y subespecies de las cuales 47 son endémicas. Desde el punto de vista epidemiológico, las pulgas actúan de vectores en diversas enfermedades, como la peste bubónica (*Yersinia pestis*), y el tifus murino (*Rickettsia typhi*), entre otras especies de bacterias patógenas como las de los géneros *Bartonella* y *Rickettsia*.

La provincia de Misiones perteneciente a la ecorregión de Selva Paranaense es reconocida por su alta riqueza biológica. Sin embargo, el conocimiento sobre la diversidad, ecología e importancia sanitaria de las pulgas distribuidas en esta región es escaso, limitándose a pocos registros de distribución geográfica y de hospedadores. El impacto de la deforestación en la provincia, resultado de las actividades productivas como los monocultivos forestales, cultivos de tabaco, yerba, la ganadería, el turismo intensivo y la rápida construcción de ciudades desprovistas de planificación urbana, ha provocado la pérdida y fragmentación del hábitat de poblaciones de fauna silvestre. En este proceso, la ciudad de Puerto Iguazú se ha configurado como una matriz de paisaje urbano-periurbano-selvático, donde la sociedad humana comparte su espacio y actividades con diversidad biológica doméstica, sinantrópica y silvestre.

En este marco, el objetivo general de este proyecto de investigación doctoral, es contribuir al conocimiento de las pulgas asociadas a micromamíferos silvestres, animales de compañía y a humanos, con el fin de conocer aspectos eco-epidemiológicos y su implicancia sanitaria, contribuyendo de esta manera al desarrollo de futuras estrategias de prevención y control de las ectoparasitosis y las enfermedades bacterianas transmitidas por pulgas en la provincia de Misiones.

El capítulo 2, comienza con la determinación taxonómica de la fauna de pulgas parasitas de pequeños mamíferos silvestres en la Selva Paranaense, ampliando así el conocimiento de su distribución y diversidad. Luego se analiza a través de los índices ecológicos por cada área y hospedador los ensambles de pulgas parásitas de roedores y marsupiales en diferentes localidades de Misiones.

A continuación, en el capítulo 3 la investigación está abocada a la medición de la prevalencia, abundancia e intensidad de las especies de pulgas que parasitan perros y gatos domésticos en áreas urbana y periurbana de Puerto Iguazú. Mediante la construcción de modelos, se evalúan los factores ambientales y climáticos que modularían el parasitismo de los animales

de compañía y se determinaron los factores de riesgo de infestación. Por otra parte, se analizó a través de encuestas semiestructuradas los conocimientos, actitudes y percepciones de los habitantes de los barrios de Puerto Iguazú respecto a la tungiasis y su asociación con las prácticas de cuidado y prevención, y efectividad de las mismas.

La relevancia del capítulo 4 radica en haber investigado la presencia de los patógenos zoonóticos, como las bacterias *Bartonella* y *Rickettsia*, en pulgas de animales de compañía, y mamíferos silvestres y sinantrópicos de diferentes ambientes de la provincia de Misiones. Habiendo trabajado previamente en la puesta a punto de los protocolos y metodología de extracción de ADN “no destructiva”, que consistió en conservar los exoesqueletos de las pulgas intactos para su determinación al microscopio óptico. Los resultados de este estudio aportaron información útil sobre la presencia de *Rickettsia asembonensis* infectando a las pulgas *Ctenocephalides felis felis* en animales sinantrópicos y de compañía, y la presencia de especies de *Bartonella* en pulgas y tejido de roedores y comadrejas.

A modo de conclusión, la existencia de extensas zonas de interfaz entre reservas naturales y sitios rurales y periurbanos contiguos en Puerto Iguazú, con interacciones entre animales silvestres, domésticos y humanos, exige a futuro el desarrollo de estudios eco-epidemiológicos abordados desde la perspectiva de "Una Salud", para promover la vigilancia de las infestaciones por pulgas y eventuales apariciones de enfermedades o ciclos zoonóticos, hecho que destaca a su vez la importancia de detectar y monitorear eventos de propagación en hospedadores no reportados.

ABSTRACT

Adult fleas (Siphonaptera) are holometabolous insects, hematophagous ectoparasites of birds and mammals, whose greatest specific richness is associated with cricetid rodents. Of the approximately 246 genera and 2000-3000 species and subspecies currently known worldwide, about 130 species and subspecies have been recorded for Argentina, of which 47 are endemic. From an epidemiological point of view, fleas act as vectors for various diseases, such as bubonic plague (*Yersinia pestis*), and murine typhus (*Rickettsia typhi*), among other species of pathogenic bacteria such as those of the *Bartonella* and *Rickettsia* genera.

The province of Misiones, which belongs to the Paranaense Rainforest ecoregion, is recognized for its high biological richness. However, knowledge on the diversity, ecology and health importance of fleas distributed in this region is scarce, limited to few records of geographic and host distribution. The impact of deforestation in the province, resulting from productive activities such as monoculture forestry, tobacco and yerba crops, livestock farming, intensive tourism and the rapid construction of cities with no urban planning, has led to the loss and fragmentation of habitat for wildlife populations. In this process, the city of Puerto Iguazú has been configured as a matrix of urban-peri-urban-wildland landscape, where human society shares its space and activities with domestic, synanthropic and wild biological diversity.

In this framework, the general objective of this doctoral research project is to contribute to the knowledge of fleas associated with wild micromammals, companion animals and humans, in order to understand eco-epidemiological aspects and their health implications, thus contributing to the development of future strategies for the prevention and control of ectoparasitoses and bacterial diseases transmitted by fleas in the province of Misiones.

Chapter 2 begins with the taxonomic determination of the flea fauna parasitic on small wild mammals in the Paranaense Rainforest, thus broadening the knowledge of their distribution and diversity. Then, ecological indices for each area and host are used to analyze the parasitic flea assemblages of rodents and marsupials in different localities of Misiones.

Chapter 3 then focuses on measuring the prevalence, abundance and intensity of flea species parasitizing domestic dogs and cats in urban and periurban areas of Puerto Iguazú. Through the construction of models, the environmental and climatic factors that modulate the parasitism of companion animals were evaluated and the risk factors for infestation were determined. On the other hand, semi-structured surveys were used to analyze the knowledge, attitudes and perceptions of the inhabitants of the neighborhoods of Puerto Iguazú regarding tungiasis and their association with care and prevention practices, and the effectiveness of these practices.

The relevance of chapter 4 resides in the investigation of the presence of zoonotic pathogens, such as *Bartonella* and *Rickettsia* bacteria, in fleas of companion animals and wild and synanthropic mammals from different environments in the province of Misiones. Having previously worked on the development of protocols and methodology for "non-destructive" DNA extraction, which consisted of preserving the flea exoskeletons intact for their determination under the optical microscope. The results of this study provided useful information on the presence of *Rickettsia asemonensis* infecting *Ctenocephalides felis felis* fleas in synanthropic and companion animals, and the presence of *Bartonella* species in fleas and tissue of rodents and opossum.

In conclusion, the existence of extensive interface zones between nature reserves and contiguous rural and peri-urban sites in Puerto Iguazú, with interactions between wild, domestic and human animals, calls for the future development of eco-epidemiological studies approached from a "One Health" perspective, to promote surveillance of flea infestations and eventual occurrence of diseases or zoonotic cycles, which in turn highlights the importance of detecting and monitoring spread events in unreported hosts.

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1 Breve historización de las pulgas

Desde fines del siglo XVI en sociedades europeas, las pulgas fueron miradas con cierta simpatía por su destreza como pequeñas acróbatas y sus extraordinarios saltos. Debido a estos atributos, existieron *Circos de pulgas* que alcanzaron una popularidad inusitada para la época. En estos espectáculos las actrices principales eran las pulgas haciendo “acrobacias”, y muchas veces el público debía recurrir a lentes de relojería para poder observarlas con claridad (Figura 1.1). Además, estas pulgas circenses fueron representadas en producciones cinematográficas del siglo XX, por cineastas como Oliver Hardy (1932), Charles Chaplin (1952) y Orson Wells (1955).

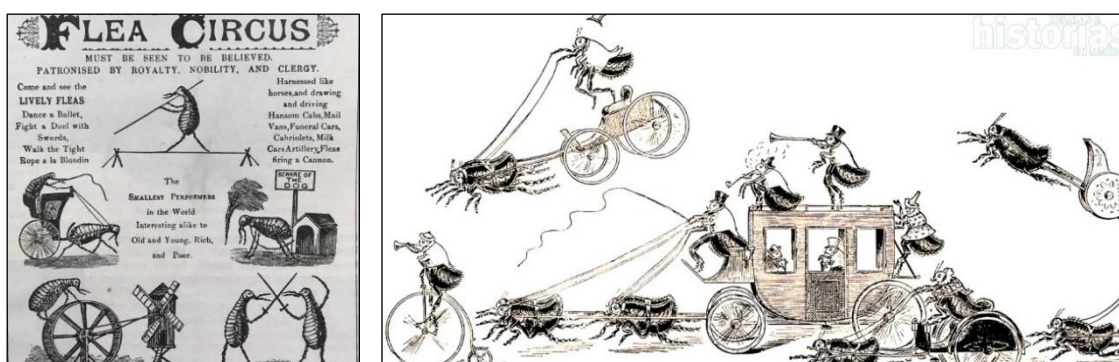


Figura 1.1. A la izquierda se aprecia un cartel de la época en el cual se invitaba a presenciar aquellos espectáculos; la figura de derecha muestra la escena de un grupo de pulgas realizando diversas actividades durante una función de circo (Secrets of the flea circus, still, 2012. Wellcome collection).

El interés científico por las pulgas tuvo su origen en la pandemia causada por *La Peste* (también llamada Peste Negra o La Plaga). Esta enfermedad, endémica de Mongolia, se expandió por todo el mundo y en la Edad Media causó la mortalidad de un tercio de la humanidad y ciudades como Florencia (Italia) quedaron diezmadas. Recién a fines del siglo XIX se consideró que las pulgas actuarían en la vehiculización del agente patógeno y por lo que para una adecuada prevención se requería profundizar en el conocimiento de estos insectos. De este modo, se crea en Londres (Reino Unido), la mayor colección de pulgas que incluye ejemplares de todo el mundo y que constituye la base de los estudios actuales.

A fines del siglo XIX surgen los *Mercados de Pulgas* en París, donde se vendían objetos recolectados en la calle. Entre ellos había ropa que por ser usada se suponía tendrían pulgas, y de allí surgió su nombre. Hoy en día estos *Mercados* o *Ferias de Pulgas* persisten en diversas partes del mundo. En algunos países son lugares de moda donde puede comprarse una variedad de artículos, antigüedades, y además disfrutar de la música en los diversos bares y restaurantes. En cambio, en ciudades de América Latina, estas ferias se consolidan en tiempos de crisis económicas donde prima la lógica del intercambio o trueque.

1.2 Taxonomía, biología y ecología de las pulgas

Clasificación taxonómica

Los sifonápteros, conocidos como pulgas, son un orden de insectos holometábolos altamente especializados que comprende actualmente 246 géneros y aproximadamente 2000-3000 especies y subespecies (Lewis, 1998; Medvedev, 2005; Krasnov, 2008). A pesar de la larga historia de extensos trabajos sobre la clasificación y la biología de las pulgas, actualmente existe una falta de consenso en cuanto a las relaciones filogenéticas entre las familias. La revisión del orden, realizada por Lewis (1998), reconoce 15 familias, mientras que Medvedev (1998) reconoce 18 familias. Medvedev separó la familia de los pulicoides en Pulicidae y Tungidae, y fragmentó Pygiopsyllidae en tres familias distintas: Pygiopsyllidae, Lycopsyllidae y Stivaliidae. Las relaciones superfamiliares de estos dos esquemas de clasificación son contradictorios en muchos aspectos. Estudios moleculares realizados por Whiting y col., (2008) sobre la filogenia de 16 familias del orden Siphonaptera indican que 10 son monofiléticas: Tungidae, Lycopsyllidae, Pygiopsyllidae, Stivaliidae, Stephanocircidae, Rhopalopsyllidae, Chimaeropsyllidae, Pulicidae, Ischnopsyllidae, y Ceratophyllidae; y tres familias, Leptopsyllidae, Hystrichopsyllidae y Ctenophthalmidae son parafiléticas. Cabe destacar la posición de la familia Tungidae en la base de la filogenia, como grupo hermano de los restantes taxones de pulgas más ancestral dentro del orden.

Caracteres morfológicos

La diversidad de rasgos morfológicos adaptativos sitúa al orden Siphonaptera entre las criaturas más intrigantes, ornamentadas y extrañas del microcosmos de los insectos.

A medida que las pulgas evolucionaron con un número diverso de hospedadores aviares/mamíferos, su morfología se adaptó y se hizo igualmente diversa. Las pulgas pueden ser descritas según un patrón general como insectos sin alas, comprimidos lateralmente, que miden entre 1 a 10 mm de longitud, y como en los demás insectos, presentan el cuerpo dividido en cabeza, tórax y abdomen. Utilizaremos el esquema realizado por Lewis (1993) de la pulga *Ctenocephalides felis felis* como referencia para la descripción general de la morfología externa de las pulgas, sin embargo, todos estos caracteres son variables (Figura 1.2). Si comenzamos por describir la forma de la cabeza esta varía sorprendentemente y es útil para distinguir algunas especies. Las piezas bucales se especializan en perforar y succionar los tejidos de sus hospedadores, y constan de tres estiletos: un par de lacinias maxilares y la epifaringe. Éstos están sujetos por los palpos labiales, que suelen ser de cinco segmentos. Los ojos son variables en los adultos y van desde los bien desarrollados y fuertemente pigmentados hasta los vestigiales o

ausentes. Las antenas compuestas por tres segmentos se encuentran en profundos surcos, fosas antenales, a cada lado de la cabeza. Pueden presentar o no ctenidios, excrecencias fuertemente quitinizadas de la cutícula.

Los tres segmentos torácicos están representados por tres escleritos dorsales (pronoto, mesonoto y metanoto) y placas ventrales complementarias. Las placas pleurales son igualmente variables en su forma, y son importantes desde el punto de vista taxonómico. Las patas presentan numerosos rasgos taxonómicos y consisten en una coxa basal, un trocánter, el fémur, la tibia y el tarso, este a su vez dividido en tarsómeros. Los segmentos abdominales están divididos en tergitos dorsales y esternitos ventrales. A partir del segmento abdominal 7 se modifican según el sexo y suelen ser útiles para la determinación taxonómica. El sensilium consiste en una placa plana o convexa con espículas y un número variable de estructuras en forma de cúpula de las que sobresalen tricobotrios.

El sistema genital de la hembra incluye la vagina, la bursa copulatrix, el conducto espermatecal y una o dos espermatecas. Estas últimas suelen estar divididas en una bulga muy esclerotizada y un saliente en forma de dedo menos esclerotizado, la hila. En los machos el órgano copulador se denomina aedeago. En general, las estructuras asociadas a este, derivadas de los tergitos terminales y los esternitos, son las principales empleadas en la determinación taxonómica. El esternito IX es una estructura pareada, fusionada ventralmente y con brazos proximales y distales; su forma y quetotaxia tienen importancia taxonómica. El clasper es una estructura grande y arqueada que se cree que deriva de tergito IX. Para mayores especificaciones de la morfología de las pulgas adultas, véase Hastriter y Whiting (2003), y el glosario de términos publicado en 1971 por Rothschild y Traub.

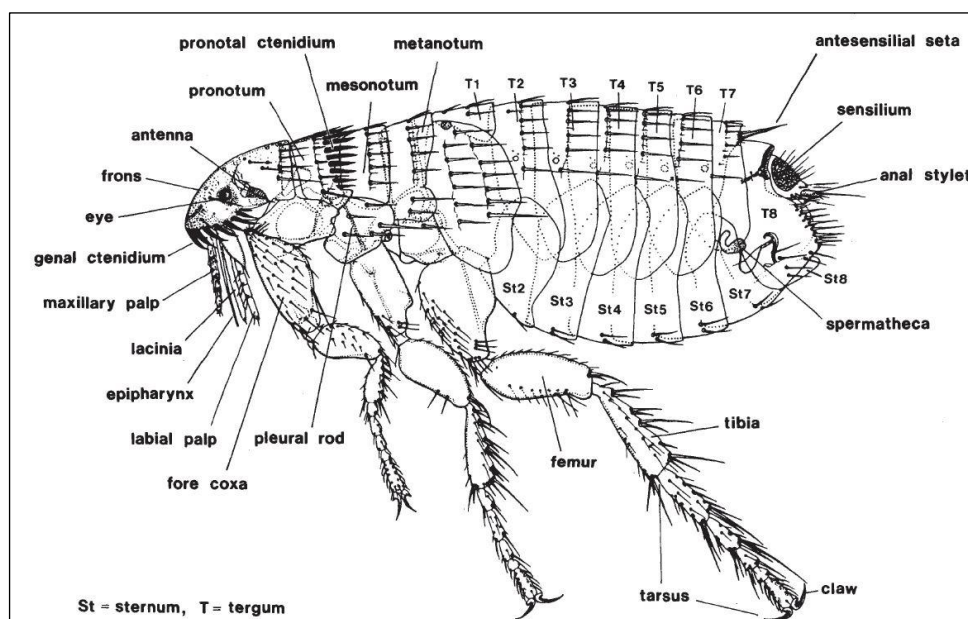


Figura 1.2. Morfología externa de la pulga *Ctenocephalides felis felis* (Lewis, 1993)

Ciclo de vida

Las pulgas son típicos insectos holometábolos, cuyo ciclo de vida consiste en un huevo que eclosiona en una larva, que atraviesa tres mudas larvarias (dos en el caso de las especies de *Tunga*) y una fase de pupa antes de emerger como adulto (Figura 1.3).

El ciclo presenta gran variabilidad, por ejemplo, en la ecología de las larvas: la diversidad de preferencias microambientales, aquellas que se desarrollan en el sustrato del nido y/o madriguera; los mecanismos de alimentación y requisitos nutricionales, las larvas de muchas especies de pulgas se alimentan de materia orgánica del nido o la madriguera del hospedador o en hábitats abiertos, incluso de las heces de las pulgas adultas, de otros huevos, de larvas muertas y pupas desnudas. Al igual que en el caso de los huevos, la supervivencia y la tasa de desarrollo de las larvas dependen de una serie de factores relacionados con el hospedador y el ambiente, así como de la estructura de la comunidad de larvas (densidad y composición de especies) (Krasnov, 2008).

La larva de tercer estadio, al terminar de alimentarse, expulsa todo su contenido intestinal, hila un capullo de seda y se camufla adhiriendo a sí misma partículas del sustrato circundante. El capullo constituye el microambiente protector de una pupa de pulga, la cual permanece inmóvil y sin alimentarse durante el proceso de metamorfosis. Como resultado, se cree que las pupas son resistentes, por ejemplo, a la baja humedad relativa. La salida de las pulgas de los capullos puede ser provocada por una serie de factores ambientales como la vibración, el aumento de la temperatura y el aumento de la concentración de dióxido de carbono en el aire (Marshall, 1981). Sin estímulos externos, algunas pulgas pueden permanecer en los capullos durante largos períodos de tiempo (más de 1,5 años). Por su parte, la longevidad del imago depende de una serie de factores como la especie de hospedador, la disponibilidad de alimento durante la fase larvaria, la densidad de las larvas, el microclima (temperatura y humedad relativa) y sus fluctuaciones, y el sustrato (Krasnov, 2008).

Ciclo de vida de *Tunga penetrans*

El ciclo de vida de la pulga *Tunga* se asemeja al ciclo de otras pulgas, con la salvedad que la hembra diminuta (de tan solo 1mm) penetra la epidermis del hospedador, alimentándose activamente de los capilares sanguíneos, y sufre una hipertrofia de los segmentos abdominales convirtiéndose en un neosoma, es decir, transforma su estado con capacidad de producir nueva cutícula sin muda (Eisele y col., 2003) (Figura 1.3). Produce centenares de huevos durante un periodo de tres semanas, los cuales son expulsados a través del orificio genital que se extienden por encima del estrato córneo de la piel del hospedador, junto con el poro anal y los estigmas respiratorios (Linardi y Guimarães, 2000). Tras la oviposición, el neosoma involuciona y la pulga

muere, siendo desprendida de la epidermis del hospedador por mecanismos de reparación de los tejidos (Eisele y col., 2003). Posterior a la eclosión en el ambiente después de 1 a 6 días, y en condiciones favorables de temperatura y humedad, el estado larvario permanece en el suelo entre 5 a 11 días, y a diferencia de lo que ocurre con otras especies de pulgas, *Tunga penetrans* tiene dos estadios larvarios en vez de tres. Durante este periodo, las larvas se alimentan de restos orgánicos, heces de pulgas y larvas muertas. Después de esta etapa, las larvas se diferencian en pupas, permaneciendo en este estadio de 7 a 15 días, cuando emergen en adultos. A pesar de la preferencia por los suelos arenosos y sombreados en zonas endémicas, las larvas, pupas y adultos pueden encontrarse en el interior y en el exterior de las casas, especialmente en lugares donde los animales suelen descansar (Linardi y col., 2010).

En cuanto al ciclo en el hospedador, Eisele y col. (2003) propone la "Clasificación de Fortaleza", la cual consta de cinco etapas: estadio I, *T. penetrans* en fase de penetración, con una duración de 3 a 7 horas; estadio II, inicio de la hipertrofia de los segmentos abdominales 2 y 3, lo que desencadena la picazón y aparición de signos inflamatorios; estadio III, fase de halo blanco, máxima hipertrofia del parásito, conocida como neosoma, puede alcanzar aproximadamente 1 cm de diámetro. Esta etapa dura alrededor de dos semanas y se liberan entre 100 y 200 huevos al ambiente. En el estadio IV, fase de involución del parásito, se observa una costra de color marrón oscuro con el parásito muerto, con o sin necrosis circundante; y por último el estadio V, refiere a la fase de cicatrización. El ciclo completo de la pulga en el tegumento del hospedador suele durar aproximadamente 40 días.

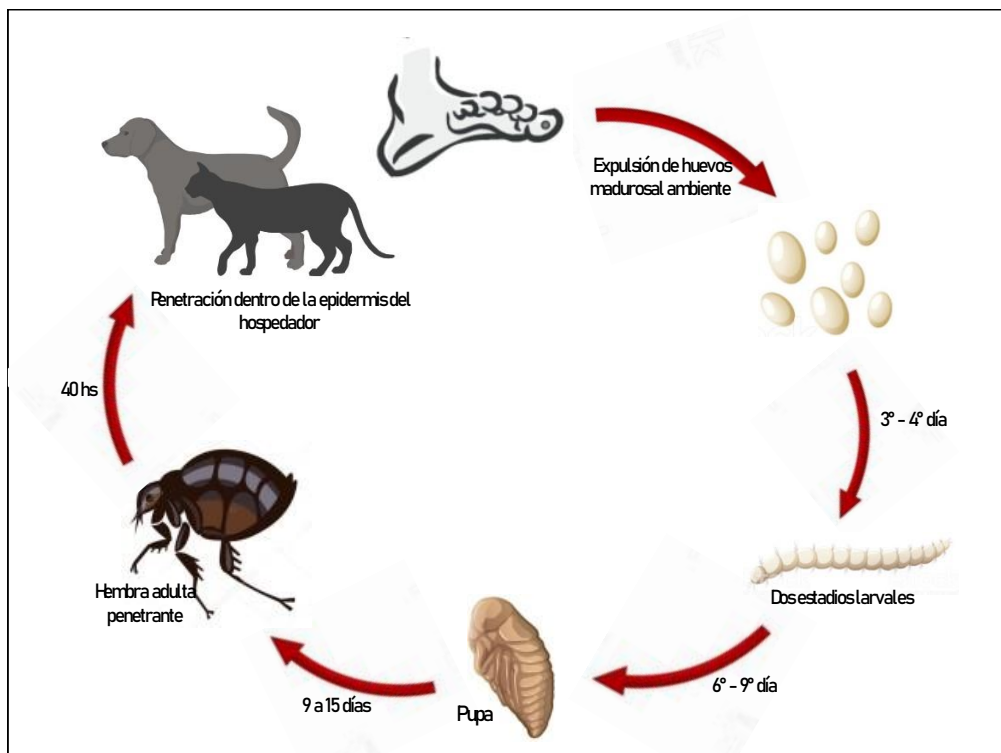


Figura 1.3. Ciclo biológico de *Tunga penetrans* (Fuente: adaptación del ciclo de Tungiasis, CDC)

Asociaciones pulga-hospedador-ambiente

Las pulgas están adaptadas morfológicamente para llevar una vida ectoparásita en sus hospedadores. Más del 94% de las especies de pulgas parasitan a los mamíferos y su mayor riqueza específica está asociada a los roedores cricétidos, y el 6% remanente a las aves. El grado de especificidad de las pulgas por su hospedador varía ampliamente desde las muy específicas hasta las oportunistas (Whiting y col., 2008; Medvedev y Krasnov, 2006).

La clasificación tradicional de los ectoparásitos por el grado de especificidad a su hospedador, basada en el número de especies de hospedadores y sus posiciones taxonómicas, distingue entre pulgas monoxenas (una sola especie de hospedador), oligoxenas (dos o más especies de hospedadores pertenecientes al mismo género), meso o pleioxenas (dos o más géneros de hospedadores pertenecientes a la misma familia), polixenas (dos o más familias de hospedadores pertenecientes al mismo orden) y euryxenas (dos o más órdenes o clases de hospedadores) (Marshall, 1981; Medvedev y Krasnov, 2006). De esta manera, pudiendo distinguir asociaciones parásito-hospedador entre las familias y tribus de pulgas y órdenes de mamíferos. Por ejemplo, algunas familias (Pulicidae, Tungidae, Rhopalopsyllidae, Pygiopsyllidae, Stivaliidae, Hystrichopsyllidae, Stephanocircidae, Ceratophyllidae y Leptopsyllidae) contienen especies que parasitan diferentes órdenes de hospedadores. Otras familias son más específicas, por ejemplo, las pulgas de la familia Ischnopsyllidae asociadas exclusivamente a los murciélagos (Chiroptera), Malacopsyllidae a los armadillos (*Xenarthra*), y Ctenophthalmidae (sensu Lewis, 1993) asociada a marsupiales.

En la provincia de Misiones están representadas siete familias de roedores, entre las cuales la mayor diversidad y riqueza específica corresponde a Cricetidae, todos ellos de la Subfamilia Sigmodontinae. Aunque la mayor diversidad de esta familia se registra en el noreste argentino (Patton y col., 2015), la diversidad de pulgas al inicio de esta tesis doctoral era una de las más baja conocida para el país, en contraposición con los resultados de estudios realizados en biomas patagónicos, donde la diversidad de pulgas es comparativamente mayor (Lareschi y col., 2016; Sánchez y Lareschi, 2018). Entre el ensamblaje de los sigmodontinos de la Selva Paranaense, *Akodon montensis*, es la especie con mayor distribución y dominancia (D'Elía y Pardiñas, 2015; Pardiñas y col., 2003).

Un conjunto de parásitos de diferentes taxones que infestan a una población y/o una comunidad de hospedadores representan una "comunidad componente" (=xenocomunidad) o una "supracomunidad" (=comunidad), respectivamente (Bush y col., 1997). La distribución de los ectoparásitos entre los hospedadores individuales dentro de una comunidad componente no es aleatoria. Por el contrario, las asociaciones entre hospedadores y pulgas son el resultado de

procesos evolutivos y ecológicos, relacionados con factores de los parásitos, de los hospedadores y del ambiente (Lareschi y Krasnov, 2010; Linardi y Krasnov, 2013; Morand y col., 2006).

Los individuos de una población de roedores varían en formas que pueden afectar las interacciones con sus parásitos, por ejemplo, variaciones en su sexo, edad, estado de reproducción, fisiología, ecología, etc., y todas estas características pueden influir en sus poblaciones de pulgas. Además, como las pulgas pasan parte de su ciclo de vida en el suelo o en los nidos de sus hospedadores, pueden ser sensibles a las variaciones del entorno (Krasnov, 2008; Marshall, 1981; Morand y col., 2006).

En muchos casos, la distribución estacional y geográfica y la especificidad de los hospedadores de las pulgas están determinadas en gran medida por los requisitos específicos de las larvas. Cada especie ha desarrollado un estrecho margen de tolerancia a la temperatura y la humedad, lo que permite al orden Siphonaptera explotar prácticamente todos los hábitats (Hastriter y col., 2003). En el caso de algunas especies como las de *Ctenocephalides* y *Pulex* los estadios inmaduros pueden tolerar amplios rangos de temperatura, humedad y requisitos nutricionales, determinando de esta manera una menor especificidad de hospedador de los estadios adultos (Krasnov, 2008).

1.3 Importancia sanitaria de las pulgas

Desde una perspectiva epidemiológica, las pulgas son importantes por su rol como agentes infestantes, actúan como parásitos causando pulicosis o tungiasis, pero también como vectores, permitiendo la multiplicación y/o desarrollo de agentes etiológicos en su tracto digestivo, lo que asegura la transmisión de diversas enfermedades entre los hospedadores parasitados (Otranto y col., 2008). Los microorganismos pueden transmitirse de un hospedador a otro por medio de las piezas bucales contaminadas, saliva, regurgitaciones del canal alimentario o a través de heces infectadas. Como agentes infestantes, provocan irritaciones (dermatitis y reacciones alérgicas), reacciones inflamatorias (infecciones bacterianas de transmisión mecánica causadas por el parasitismo de las especies penetrantes), afectando así a los respectivos hospedadores (Linardi y Guimarães, 2000).

Las pulgas, como vectores, intervienen en la transmisión de agentes que provocan diferentes enfermedades, entre ellas virosis (ej. mixomatosis), bacterianas como rickettsiosis (ej. tifus murino), bartonelosis, tularemia, y actúan como hospedadores intermedios del ciclo biológico de ciertos protozoos (*Trypanosoma lewisi*), cestodes (*Dypilidium caninum*, *Hymenolepis nana* y *H. diminuta*) y nematodos (*Dipetalonema reconditum*), y particularmente destacada entre estos agentes etiológicos es la *Yersinia pestis* responsable de la peste bubónica

con los roedores silvestres y sinantrópicos como reservorios (Lewis, 1993, Linardi y Guimarães 2000).

Además, las pulgas pueden causar pérdidas económicas al parasitar a las aves de corral y al ganado (Yeruham y col., 1989). Los parasiticidas representan el 46% del mercado mundial de la salud de los animales de compañía, siendo los ectoparasiticidas el mayor segmento (Bobey y col., 2015).

Parasitismo

Cuando una pulga inserta sus piezas bucales en la piel del hospedador, se inyecta saliva y la sangre es bombeada por la dilatación de una parte del esófago. La saliva impide la coagulación de la sangre y es la causa de la reacción cutánea, manifestada como eritema y edema, al acto de succionar sangre. Una picadura de pulga en la piel puede causar intenso picor durante uno o más días y se caracteriza por una pequeña mancha rojiza. La primera picadura de la pulga no provoca reacciones cutáneas observables en el hospedador, pero induce una hipersensibilidad, hasta alcanzar un estado de no-reactividad (inmunidad). La reacción del hospedador a la alimentación implica formación de complejos antígeno-anticuerpo y parece influir en el desarrollo y la supervivencia de los microorganismos que la pulga pueda transmitir (Lewis, 1998).

Algunas especies de pulgas como *Neotunga euloidea* (Pulicidae) y en todas las especies de *Tunga* (Tungidae) pueden presentar crecimiento neosomático luego de la penetración a través de epidermis del hospedador, paralelismo que se presenta entre especies de distintas familias. Otras especies se adhieren durante largos periodos de tiempo sin incrustarse, y también muestran un crecimiento neosomático parcial: *Chaetopsylla*, *Dorcadia*, *Vermipsylla* (Vermipsyllidae), *Malacopsylla* (Malacopsyllidae), *Echidnofaga* y *Hectopsylla* (Tungidae).

La tungiasis es una ectoparasitosis zoonótica causada por la penetración de pulgas del género *Tunga* (Jarocki, 1938) en el tegumento del hospedador. Hasta la fecha, *T. penetrans* y *Tunga trimamillata* son las únicas especies de las que se sabe que infestan a los humanos (Pampiglione y col., 2009), y se encuentran asociadas a un amplio rango de animales silvestres, de compañía y cría, como así también a poblaciones humanas seriamente fragilizadas por las condiciones sociales, económicas y políticas. En América Latina se encuentran 12 de las 14 especies de *Tunga* conocidas y, de las cuales 3 son endémicas en Argentina. *Tunga perforans* es una pulga cuyas hembras perforan osteodermos de armadillos, y junto a *T. terasma*, otra especie parásita de *Xenarthra*, ambas se encuentran distribuidas en las zonas áridas y semiáridas del país (Ezquiaga y col., 2015). *Tunga penetrans* es la especie más reportada, y está ampliamente distribuida en países de América Latina, el Caribe y el África subsahariana. Predomina en la población humana y animales domésticos, siendo el perro el principal reservorio y factor de riesgo

de la enfermedad en humanos. Particularmente en Argentina, esta especie se halla registrada en las provincias de Buenos Aires, Santa Fe, Corrientes, Misiones, Formosa, Chaco, Santiago del Estero, Tucumán, Salta y Jujuy (Lareschi y col., 2016).

Bacterias patógenas asociadas a las pulgas

Entre las principales bacterias asociadas a las pulgas se encuentra la histórica y mundialmente conocida *Yersinia pestis*, responsable de haber originado diversas pandemias como la *Peste Negra* que azotó a Europa en 1347-1351 d.C. Según Faccini-Martínez y Sotomayor (2013), la historia de la peste en países como Argentina, Uruguay y Paraguay es escasa o nula en la literatura especializada. Sin embargo, en el Boletín Epidemiológico de la OPS (1984), se pueden referenciar los primeros y últimos casos de peste, respectivamente: Argentina, en 1899 y 1958, Uruguay, en 1900 y 1931, y Paraguay, en 1899 y 1928. Desde la década de 1990, persisten brotes de peste en los tres países más endémicos: Madagascar, la República Democrática del Congo y Perú, además en países como Ecuador, Brasil y Bolivia, cuyo posible origen reside en condiciones socioeconómicas inadecuadas, convivencia de humanos con roedores en sus domicilios y factores climáticos desfavorables con el consecuente desplazamiento de la fauna silvestre (Faccini-Martínez y Sotomayor, 2013). Estas situaciones no son ajenas al entorno que vive actualmente el territorio argentino lo que puede generar oportunidades para el ingreso y establecimiento de la peste.

Se trata principalmente de una infección de roedores, y se presenta en dos formas reconocibles en función de la vía de infección: bubónica y neumónica. Cuando un roedor muere de la enfermedad, sus pulgas infectadas, generalmente de la especie *Xenopsylla cheopis* (Pulicidae), buscan otros animales disponibles y las personas puede infectarse accidentalmente. La forma bubónica de la peste se transmite por la regurgitación de los bacilos contenidos en el tracto digestivo de las pulgas, cuyo proventrículo suele quedar temporalmente bloqueado por las bacterias tiempo después de la infección, o por contaminación directa de las piezas bucales. La forma urbana de la enfermedad suele convertirse en una septicemia aguda (infección sistémica causada por la presencia de bacterias en el torrente sanguíneo) y rápidamente mortal. La forma neumónica de la peste, puede desarrollarse a partir de la inhalación de gotitas infecciosas o desarrollarse a partir de la peste bubónica o septicémica no tratada después de que las bacterias se extiendan a los pulmones. La neumonía puede causar insuficiencia respiratoria y shock. La peste neumónica es la forma más grave de la enfermedad, especialmente contagiosa y puede desencadenar epidemias graves con transmisión de persona a persona a través de gotitas respiratorias suspendidas en el aire (Acha y Szyfres, 2003).

En la actualidad, otros patógenos zoonóticos de importancia sanitaria son las bacterias de los géneros *Rickettsia* y *Bartonella* que se asocian a enfermedades emergentes y re-emergentes en animales y humanos, conocidas como rickettsiosis y bartonelosis, respectivamente (Pérez-Osorio y col., 2008). Estas bacterias invaden las células endoteliales de los vasos sanguíneos de algunos vertebrados, así como las células del intestino medio de algunos artrópodos (Walker y col., 2008). La estrecha relación entre los animales de compañía y los humanos, hace que la transmisión de patógenos hacia las personas sea probable, especialmente cuando estos animales de compañía están muy infestados de pulgas. En los últimos decenios, los avances en la capacidad de diagnóstico para la detección de patógenos han permitido describir numerosas especies y subespecies de *Rickettsia* y *Bartonella*, de las cuales muchas se consideran patógenas para los animales y humanos (Fang y col., 2017; Moreno Salas y col., 2019).

El género *Rickettsia* contiene bacterias Gram-negativas, intracelulares obligadas, distribuidas globalmente. Este género se divide en cuatro grupos principales en base a características fenotípicas y serológicas, el grupo de las fiebres manchadas contiene agentes patógenos asociadas principalmente con garrapatas, el grupo del tifus incluye a *Rickettsia prowazekii* y *Rickettsia typhi* agentes causantes del tifus murino, el grupo de transición que contiene a *Rickettsia felis* agente causante de la fiebre manchada transmitida por pulgas, y el grupo ancestral, no patógeno, que incluye a *Rickettsia canadensis* y *Rickettsia bellii* (Parola y col., 2013). Las especies de pulgas *X. cheopis* y *C. f. felis* se consideran vectores y reservorios primarios de *R. typhi* y *R. felis*, ambas reportados como causantes de rickettsiosis humanas emergentes en todo el mundo (Legendre y Macaluso, 2017). Las pulgas *C. f. felis* son muy comunes en perros, gatos, comadrejas y otros animales domésticos, sinantrópicos y silvestres en Argentina (Lareschi y col., 2016). Dado que *C. f. felis* es capaz de albergar a *R. typhi*, podría participar en sus ciclos urbanos que incluyen a otros mamíferos hospedadores, además de la rata, su hospedador tradicional, y su vector común la pulga *X. cheopis*, (Noden y col., 1998).

En América del Sur, se registraron al menos ocho especies de *Rickettsia* en circulación, incluyendo “Candidatus” *Rickettsia senegalensis* y *Rickettsia asebonensis* transmitidas por pulgas (Silva y col., 2017; Cevidane y col., 2017; Loyola y col., 2018). *Rickettsia asebonensis* es un microorganismo cuya patogenicidad aún se encuentra en estudio, y se lo ha detectado en pulgas de *C. f. felis*, *Ctenocephalides canis* y *Pulex simulans* colectadas en perros, gatos y comadrejas (Maina y col., 2019). Actualmente, en Argentina, se encuentran cuatro especies de *Rickettsia* sp. patógenas para los humanos: *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri* y *Rickettsia massiliae* en garrapatas infectadas naturalmente (Cicutin y Nava, 2013; Lamattina y col., 2018), y *R. felis* que infecta a las pulgas (Nava y col., 2008; Melis y col., 2020). Para la provincia de

Misiones se detectó *Rickettsia belli* y *R. parkeri* cepa *Atlantic rainforest* en garrapatas *Amblyomma ovale* (Lamattina y col., 2018).

En cuanto a las pulgas, hay muy poca información sobre las especies de rickettsias asociadas a estos artrópodos en Argentina; *R. felis* se ha encontrado en *C. f. felis* colectadas en perros peridomésticos en la provincia de Santa Fe (Nava y col., 2008), y recientemente Melis y col., (2020) detectaron *R. felis* en *Polygenis (Polygenis) axius axius* (Rhopalopsyllidae) colectada en un roedor cricétido sinantrópico en la provincia de Buenos Aires.

Las especies de *Bartonella* son bacterias Gram-negativas intracelulares facultativas que infectan los eritrocitos y las células endoteliales de los mamíferos. Presentan un ciclo complejo que incluye la participación de mamíferos (domésticos, peridomésticos y silvestres) como hospedadores y artrópodos como vectores. Con más de 36 especies y numerosos genotipos descritos, solo 17 especies se han asociado a enfermedades humanas (Buffet y col., 2013; Breitschwerdt y col., 2017). Estas bacterias producen la bartonelosis, cuya patogénesis se caracteriza en el humano por fiebres altas, erupciones cutáneas, dolores musculares y linfadenopatías regionales que pueden ir asociadas a otras enfermedades como esplenomegalia, hepatomegalia, encefalopatía, angiomatosis bacilar, peliosis hepática y endocarditis (Chomel y col., 2004; Ereemeeva y col., 2007). Además, puede convertirse en trastornos potencialmente mortales en pacientes inmunodeprimidos.

El gato doméstico se considera el reservorio natural de *Bartonella henselae* (Brenner) y *Bartonella clarridgeiae* (Lawson y Collins), ambos agentes causantes de la enfermedad por arañazo de gato. De hecho, *C. f. felis* es el principal vector de *B. clarridgeiae*, *B. henselae* y *B. koehlerae*, pudiendo transmitirlos a través de las picaduras de las pulgas, cuando estas se alimentan defecan, pudiendo las personas infectarse con las heces durante el rascado. Sin embargo, la transmisión del gato al humano se produce principalmente a través del arañazo o la mordedura un gato infectado (Chomel y col., 2004). Evidencia de exposición a *Bartonella* spp. en gatos del sur de Brasil se ha reportado mediante reacción en cadena de la polimerasa específica del género (PCR) (Staggemeier y col., 2010). Mientras que, en la ciudad de Eldorado, a 100 km de Puerto Iguazú, se ha informado de un caso de encefalitis en una joven que vivía en estrecha relación con gatos infestados de pulgas y garrapatas. La PCR para *Bartonella* spp. en suero y la LCR fueron positivas en esta joven, y el diagnóstico se interpretó como encefalitis por *Bartonella* (Cornet y col., 2016).

En cuanto a los mamíferos silvestres como roedores y comadrejas, representan importantes grupos de hospedadores por considerarse reservorios de un gran número de patógenos transmitidos por vectores (Bezerra-Santos y col. 2021; Gonçalves-Oliveira y col., 2020). La

prevalencia de *Bartonella* en las pulgas en todo el mundo es muy variable, y se han identificado diferentes especies o genotipos en una sola pulga, lo que sugiere, que los vectores pueden tener un papel clave en el mantenimiento de la diversidad de especies de *Bartonella* en los mamíferos (Buffet y col., 2013). En este sentido, numerosos estudios realizados en América del Sur documentan el rol fundamental de los roedores como reservorios de estas bacterias y sus pulgas como vectores (Moreno Salas y col., 2019, Gonçalves-Oliveira y col., 2020).

Estudios realizados en Argentina, reportaron la presencia de *B. henselae* y *B. clarridgeiae* en gatos examinados en Buenos Aires, *B. henselae* y *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* en caninos, y *B. henselae* y *B. quintana* en humanos (Cicuttin y col., 2014, 2019). En cuanto a las pulgas, se reportó *Bartonella* sp. en *C. f. felis* de la provincia de Corrientes (Oscherov y col., 2011), así como en la pulga *Neotyphloceras crackensis* asociada a roedores sigmodontinos de la Patagonia argentina (Cicuttin y col., 2019). Además, se mencionaron pulgas *P. irritans* colectadas de zorros de la Patagonia argentina asociadas con *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* y *B. rochalimae* (Millán y col., 2019). Sin embargo, entre los registros mencionados anteriormente de los mamíferos y pulgas, sólo unos pocos genotipos están disponibles en el GenBank (Cicuttin y col., 2019; Millán y col., 2019)

1.4 Las pulgas de la Selva Paranaense, Misiones, Argentina

En Argentina se registraron 132 especies, 24 subespecies y 37 géneros pertenecientes a 11 familias de pulgas (Ceratophyllidae, Ischnopsyllidae, Leptopsyllidae, Ctenophthalmidae, Hystrichopsyllidae, Stephanocircidae, Malacopsyllidae, Pulicidae, Tungidae, Rhopalopsyllidae y Pygiopsyllidae), de las cuales 47 especies son endémicas (Beaucournu y col., 1988; Lareschi y col., 2016; López-Berrizbeitia y Díaz 2019/2020).

La provincia de Misiones representada por áreas de la Selva Paranaense y el Bosque de *Araucaria angustifolia*, forma parte del complejo de la ecorregión del Bosque Atlántico de Brasil, Paraguay y Argentina reconocida por su alta riqueza biológica (Di Bitetti y col., 2003). Sin embargo, el conocimiento sobre la diversidad, ecología e importancia sanitaria de las pulgas distribuidas en esta región es escaso, limitándose a pocos registros de distribución geográfica y de hospedadores. En esta provincia subsiste aproximadamente la mitad de la superficie del bosque original. La mayor parte ha sido explotada para obtener madera, y existen fragmentos (relictos) compuestos por bosques primarios y secundarios en diferentes etapas de sucesión. La perturbación antropogénica del hábitat altera los procesos del ecosistema de manera que puede afectar a la dinámica de las enfermedades zoonóticas (Daszak y col., 2001; Friggens y Beier, 2010).

Hasta el inicio del presente estudio, se habían registrado en la región sólo cuatro especies de pulgas: *Polygenis (Polygenis) rimatus*, *Rhopalopsyllus lugubris lugubris* (Rhopalopsyllidae), *Adoratopsylla (Adoratopsylla) antiquorum antiquorum* (Ctenophthalmidae), y *Tunga penetrans* (Tungidae). El escaso conocimiento de la riqueza y diversidad de especies de pulgas y asociaciones parásito-hospedador en la provincia de Misiones en comparación con las áreas circundantes de Argentina (Lareschi y col., 2016), Uruguay (Lareschi y col., 2006) y Brasil (Linardi y Guimarães, 2000), y específicamente de la ecorregión del Bosque Atlántico (ej. Carvalho y col. 2001; Moraes y col., 2003; Pinto y col., 2009) pudo estar relacionada con la falta de investigaciones que se aboquen a estudios de eco-epidemiología de las pulgas; situación semejante que se repite en el país vecino de Paraguay.

1.5 Objetivo general

El objetivo general de este proyecto de investigación realizado en la provincia de Misiones es contribuir al conocimiento de las pulgas asociadas a micromamíferos silvestres, animales de compañía y a humanos, con el fin de conocer aspectos eco-epidemiológicos y su implicancia sanitaria, contribuyendo de esta manera al desarrollo de futuras estrategias de prevención y control de las ectoparasitosis y las enfermedades bacterianas transmitidas por pulgas en la región.

Objetivos específicos:

1. Determinar la taxonomía de la fauna de pulgas de la Selva Paranaense y aportar al conocimiento de su distribución y diversidad.
2. Analizar los índices ecológicos y epidemiológicos por cada área y hospedador de los ensambles de pulgas parásitas de roedores y marsupiales en diferentes localidades de Misiones.
3. Evaluar factores ambientales y climáticos sobre el parasitismo de pulgas en perros y gatos. Investigar la prevalencia, abundancia e intensidad de pulgas en los animales de compañía, y determinar los factores de riesgo de infestación.
4. Determinar la tasa de infección con bacterias de los géneros *Rickettsia* y *Bartonella* en las distintas especies de pulgas halladas en la provincia de Misiones.
5. Analizar conocimientos, actitudes y percepciones de los habitantes de barrios de Puerto Iguazú respecto a la tungiasis y su asociación con las prácticas de prevención y cuidado, y la efectividad de las mismas.

CAPÍTULO 2: ECO-EPIDEMIOLOGÍA DE LAS PULGAS ASOCIADAS A MAMÍFEROS SILVESTRES Y SINANTRÓPICOS DE MISIONES

2.1 Introducción

Las pulgas adultas (Siphonaptera) son insectos holometábolos altamente especializados a la vida parasitaria con hábitos hematófagos, mientras que los huevos, larvas y pupas se encuentran en el suelo o en los nidos de los hospedadores. Las pulgas o “sifonápteros” parasitan a aves y mamíferos, pero su mayor riqueza específica está asociada a estos últimos, y entre ellos a los roedores cricétidos (Rodentia). Habitualmente los roedores cricétidos están asociados a una variedad de ectoparásitos, como piojos, ácaros (Mesostigmata), garrapatas y pulgas. Las asociaciones parásito-hospedador son el resultado de procesos evolutivos y ecológicos, ya que los individuos de una comunidad o población de roedores varían en su sexo, edad, estado reproductivo, fisiología, ecología, etc., y todas estas características pueden influir en sus poblaciones de ectoparásitos (Lareschi y Krasnov, 2010; Linardi y Krasnov, 2013; Morand y col., 2006).

En la provincia de Misiones, se han registrado 33 especies de roedores silvestres (Lanzone y col., 2018; Galliari y Pardiñas, 2021), cuya distribución abarca otras provincias de Argentina y las áreas de Bosque Atlántico en Paraguay y Brasil (Patton y col., 2015). Un análisis de la riqueza de especies considerando sólo los roedores de la familia Cricetidae (Sigmodontinae), indica que espacialmente los mayores valores se concentran hacia el centro-sur de la provincia, en una región donde el Bosque Atlántico Interior se interdigita con la ecorregión de Campos y Malezales. La elevada riqueza se relaciona con la existencia de una mayor heterogeneidad ambiental con la presencia de roedores de hábitos forestales y otros adaptados a ambientes de pastizal (Lanzone y col., 2018).

De las casi 3000 especies y subespecies de pulgas ubicadas en 16 familias que se conocen actualmente en el mundo (Lewis, 1998; Whiting y col., 2008), se registran para Argentina unas 132 pertenecientes a once familias diferentes (Lareschi y col., 2016). Misiones, en el noreste argentino, ha sido escasamente estudiada, conociéndose hasta el año 2017 solo cuatro especies (*Tunga penetrans*, *Polygenis (Polygenis) rimatus*, *Rhopalopsyllus lugubris lugubris*, *Adoratopsylla (Adoratopsylla) antiquorum antiquorum*), la mayoría de ellas asociadas a roedores cricétidos (Lareschi y col., 2019). Sin embargo, algunas especies de *Polygenis* también parasitan marsupiales (Didelphimorphia) y otros mamíferos en diversas zonas de Argentina, presentando una baja especificidad hospedatoria (Lareschi y col., 2016). En general, los pulcídidos (Pulicidae),

como las especies de *Ctenocephalides* infestan a una gran variedad de especies hospedadoras, incluyendo a humanos, animales domésticos y sinantrópicos como roedores y comadrejas (Lareschi y col., 2018; Sánchez y col., 2018). Además, algunas especies están implicadas en el mantenimiento de patógenos en reservorios silvestres y como vectores de patógenos que causan enfermedades en humanos y en animales domésticos (Schott y col., 2020).

Para una mejor comprensión de la ecoepidemiología de las pulgas, en cuanto a la transmisión de parásitos de una especie hospedadora a otra, fenómeno conocido como *spillover*, entre animales domésticos y silvestres, es necesario conocer aspectos básicos de su dinámica, como las variaciones en su abundancia y prevalencia en relación con las especies hospedadoras y las características ambientales. En este sentido, la zona de estudio es de interés por su gran biodiversidad y por los cambios ambientales que pueden modificar la riqueza de especies y los perfiles de dispersión, con el consiguiente riesgo de transmisión de patógenos, debido al intenso tránsito transfronterizo que aumenta la tasa de contacto y las interacciones entre fauna silvestre, humanos y animales domésticos (Clark y col., 2018).

En este capítulo se investigó el conocimiento de la distribución y diversidad de la fauna de pulgas de la Selva Paranaense, por medio de su determinación taxonómica. Luego se analizó a través de los índices ecológicos por cada área y hospedador los ensamblajes de pulgas parásitas de roedores y marsupiales en diferentes localidades de Misiones.

2.2 Metodología

Área de estudio

Este trabajo está enfocado en la ecorregión de la Selva Paranaense, la más extensa y diversa del complejo de ecorregiones del Bosque Atlántico de selva lluviosa, situada en la provincia de Misiones (Morrone, 2006). Las localidades seleccionadas para este estudio son (Figura 2.1): **L1**, Balneario Municipal Aristóbulo del Valle sobre A° Cuña Pirú (27°3'42.11"S 55° 2'35.07"O); **L2**, Club de Pesca Paraná-í Guazú (26°40'27.97"S 54°48'47.65"O); **L3**, Solar del Che - Parque Provincial "Ernesto Che Guevara", Caraguatay (26°36'53.69"S 54°46'50.82"O); **L4**, Ruta provincial N°2, 6 km NE A° Paraíso (27°14'12.06"S 54° 2'33.92"O); **L5**, Refugio Moconá (27°08'29.36"S 53°55'29.05"O); **L6**, Campo Anexo Manuel Belgrano, INTA, San Antonio (26°02'54.21"S 53°46'32.40"O); **L7**, Reserva de Vida Silvestre Urugua-í, Fundación Vida Silvestre (25°58'32.29"S 54°07'00.08"O); **L8**, Parque Provincial Urugua-í (25°51'39.62"S 54°10'02.51"O); **L9**, Parque Provincial Puerto Península; **L10**, Apepú (25°34'18.09"S 54°18'6.18"O); **L11**, Parque Nacional Iguazú (25°40'59"S 54°27'17"O); **L12**, Ciudad de Puerto

Iguazú (25°36'39"S 54°34'49"O); **L13**, Reserva Comunidad Guaraní Yriapú (25°36'51.0"S 54°32'46.1"O); **L14**, Ciudad Colonia Wanda (25°58'S 54°34'O).

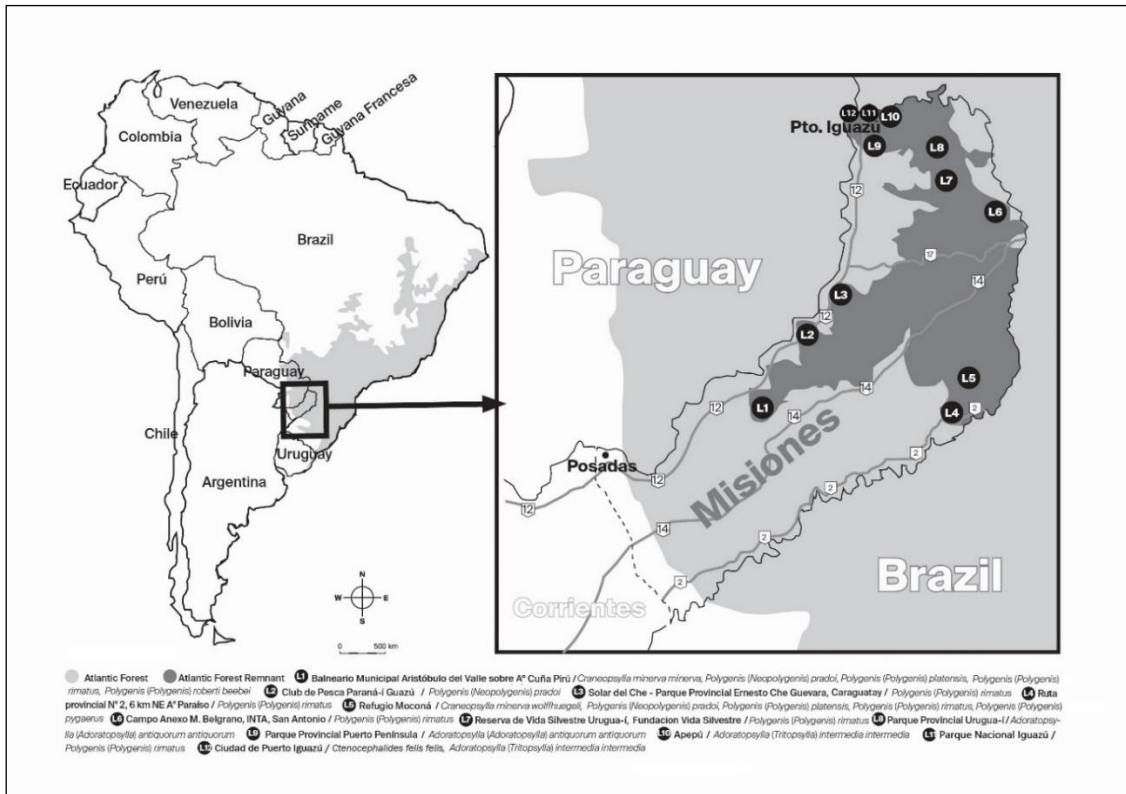


Figura 2.1. Sitios de colecta de pulgas en la Selva Paranaense, Misiones, Argentina.

La ecorregión del Bosque Atlántico tiene un clima subtropical, con una temperatura media anual de 16-22°C y precipitaciones de 1.000 mm a 2.200 mm por año. Sobre un relieve de meseta ondulada que va descendiendo desde el Planalto Meridional del Brasil en sentido nordeste-sudeste, a lo largo de las sierras de Misiones como eje, el medio natural de la Selva Paranaense, con una superficie original de unos 1.000.000 km² distribuidos entre Argentina, Brasil y Paraguay, se asocia a los bosques de araucarias, por encima de los 600 metros, con una cobertura original de 206.459 km² (Martínez Crovetto, 1963). En la actualidad, estas localidades subsisten en el bosque remanente, donde la mayor parte se encuentra dentro de lo que se denomina el Corredor Verde, un área de conservación y uso sostenible. En la provincia, el desarrollo industrial, los monocultivos forestales como las plantaciones de pino, yerba mate y tabaco, son las principales actividades agrícolas que incrementan las deforestaciones y la presión sobre los escasos remanentes boscosos. La pérdida y fragmentación del hábitat que estas actividades generan están ligados a procesos de pérdida de biodiversidad, empobrecimiento del hábitat que conduce a variaciones en la composición de especies y dinámica de los ecosistemas (Cinto y Bertolini, 2003; Plací y Di Bitetti, 2005).

Diseño de muestreo

Para este estudio focalizado en el norte de la provincia de Misiones se realizaron muestreos estacionales: invierno (julio, agosto y septiembre), primavera (octubre, noviembre y diciembre), verano (enero, febrero y marzo) y otoño (abril, mayo y junio), desde julio de 2017 a noviembre de 2018.

La captura de pequeños y medianos mamíferos se llevó a cabo con trampas de captura viva tipo Sherman (24x9x8cm) cebadas con una preparación de grasa, avena y pasta de maní envueltas en algodón, y trampas de captura viva tipo jaula (40x15x15cm) cebadas con carne y fruta. En todos los casos, las mismas permanecieron activas durante 72 horas, siendo revisadas cada 24 horas por la mañana, retiradas las capturas y repuestas las trampas y cebos que fueran necesarios.

Los sitios fueron seleccionados en base a un gradiente de paisaje donde se identificaron cinco ambientes de distinto impacto antrópico: a) urbano, b) periurbano-rural de transición a ambientes de selva o monte, c) selva o monte primario o secundario, d) entornos de selva en ambientes antropizados, e) cultivos agrícolas:

a y b) Ambientes urbano y periurbano-rural de transición a ambientes de selva en la ciudad de Puerto Iguazú:

La ciudad turística de Puerto Iguazú se encuentra ubicada en el triffinio noroeste de la provincia de Misiones, al noreste de Argentina. En un área limítrofe con la República Federativa del Brasil y la República del Paraguay, y con dos áreas naturales, Parques Nacional Iguazú (PNI) y Parque Provincial Puerto Península (PPPP). Los ríos Paraná e Iguazú delimitan su territorio. Puerto Iguazú alberga uno de los más importantes destinos turísticos nacionales e internacionales, las Cataratas del Iguazú (Nuñez, 2009).

Se seleccionaron dos áreas de muestreo diferentes asociadas al tipo de actividad productiva (Furlan y col., 2015) (Figura 2.2): a) área urbana, que se caracteriza por una mayor densidad de población, terrenos de 200 a 600 m², calles generalmente empedradas o pavimentadas, mejor acceso a los servicios básicos (electricidad, agua, recolección de residuos), y sin actividades agrícolas; b) área periurbana-rural, caracterizada por un territorio de interfaz entre el bosque y el medio urbano, situado en las afueras de la ciudad y en el que se genera un mosaico de granjas de uso intensivo de productos primarios (Barsky, 2005), con densidades de población más bajas, terrenos de 600 a 30000 m², con una agricultura principalmente de subsistencia, cría de animales a pequeña escala y un acceso reducido a los servicios básicos.

Se realizaron seis muestreos de captura de animales sinantrópicos en julio y noviembre de 2017 y febrero, mayo, septiembre y noviembre de 2018. En cada área se colocaron 75 trampas jaula, distribuidas en 15 hogares. En los sitios urbanos se colocaron cinco trampas tipo Sherman y cinco trampas tipo jaula por vivienda, mientras que para los sitios periurbanos diez trampas tipo Sherman y cinco trampas tipo jaula, teniendo en cuenta la mayor dimensión de los terrenos.





Figura 2.2. Las primeras cuatro imágenes corresponden a sitios urbanos, las cuatro siguientes a sitios periurbanos.

c) Ambiente de selva o monte primario o secundario

El Parque Provincial Puerto Península (PPPP) incluye, según Giraud y col., 2003, el Sistema Ecológico de Lomas y Zonas Altas, Sistema Ecológico de Depresiones dentro de Zonas Altas, y Sistema Ecológico de Valles Aluviales de Arroyos Internos (Srur y col., 2008).

Se realizaron muestreos de pequeños roedores en noviembre de 2017, marzo, agosto y octubre de 2018. Los animales fueron capturados con trampas vivas en varios tipos de hábitats ecológicos. Los sitios seleccionados dentro del PPPP fueron ambientes de: a) Selva 2° intersección A° Mbocay sobre Ruta N° 12, límite entre el PPPP y el Parque Nacional Iguazú (PNI) (S25°40'49.82" O54°30'30.30"); b) Selva 1° y áreas antropizadas alrededor de la casa de guardaparques y oficina del Ministerio de Ecología en el ingreso al Parque (S25°44'5.43" O54°32'4.12"); c) ambientes de gramíneas, herbáceas heliófitas y selva 2° en el camino de línea de Alta Tensión (S25°43'40.57" O54°32'46.03"); d) selvas 2° y tacuariales de planos bajos y márgenes de arroyos (S25°43'33.68" O 54°32'59.11") (Figura 2.3).

La captura de roedores se realizó mediante la colocación de 150 trampas de captura viva tipo Sherman, dispuestas en grillas de cinco hileras separadas diez metros entre sí, con 10 trampas por hilera cada cinco metros. Durante el primer muestreo se establecieron dos grillas de 25 trampas cada una: una grilla en el sector de selva primaria detrás de la casa de guardaparques, y una segunda grilla en el ambiente de gramíneas, herbáceas heliófitas y selva bajo la línea de alta tensión. Durante el segundo muestreo, se estableció una sola grilla de 50 trampas detrás de la casa de guardaparques. Durante el tercer muestreo se establecieron tres grillas: una de 50 trampas en el sector de selva primaria detrás de la casa de guardaparques, una segunda de 50 trampas en el ambiente de gramíneas, herbáceas heliófilas y selva secundaria en el camino de la línea de Alta Tensión, y una tercera grilla de 50 trampas en ambientes de selvas y tacuariales de planos bajos y

márgenes de arroyos. Por último, en el cuarto muestreo, se adicionó una cuarta grilla de 20 trampas en la naciente del arroyo Mbocay sobre la ruta N° 12.

La Reserva Nacional Iguazú (RNI) se encuentra ubicada en el límite oeste del Parque Nacional Iguazú, entre la ciudad de Puerto Iguazú y la Reserva Turística Provincial 600 ha. La RNI cuenta con 7.675 ha que pertenecieron al Parque Nacional Iguazú hasta la sanción del Decreto-Ley N° 18.801/1970. La atraviesa la Ruta Nacional N°12, único acceso al aeropuerto internacional. El arroyo Mbocay establece el límite con el Parque Provincial Puerto Península.

Los muestreos se desarrollaron durante el período comprendido entre marzo y noviembre de 2018 de manera estacional (verano, otoño, invierno y primavera). Se seleccionaron dos sitios dentro de la RNI: Sitio 1) selvas de altos y medias lomas (en adelante “selva”), en el camino de la repetidora de Canal 12; Sitio 2) selvas de altos y palmital (en adelante “palmital”), ubicado en el cruce de ingreso a Área Cataratas. Para la captura de pequeños roedores se colocó en cada sitio trampas de captura viva tipo Sherman, dispuestas en transectas y grillas de 15-20 trampas por hilera separadas diez metros unas de otras.



Figura 2.3. Sitios de colecta en Parque Provincial Puerto Península.

d) Entornos de selva o monte en ambientes antropizados

Los muestreos se focalizaron en la Reserva Comunidad Guaraní – Yriapú. La misma alberga tierras selváticas en buen estado de conservación, hábitat desde hace tiempo de la comunidad Mbya Guaraní (grupo Yriapú), donde se instalaron mega-empresarios hoteleros a partir del proceso de transferencia de tierras fiscales del Estado nacional a la esfera provincial. (Osorio González y col., 2017).

La comunidad Yriapú mantiene una modalidad de distribución del espacio que le es propia. Las viviendas presentan una distribución “dispersa” que garantiza una apropiación ambiental y social del espacio y responde a funciones sociales propias de la cultura de los pueblos guaraníes. El muestreo se realizó sobre caminos internos poco transitados donde predomina selva primaria y alrededor de viviendas y cultivos distanciados del centro comunal.

Las capturas se realizaron durante noviembre de 2017, y marzo, junio, septiembre y noviembre de 2018. Se colocaron 150 trampas tipo jaula y 150 trampas tipo Sherman dispuestas en transectas de 20-50 trampas separadas al menos cincuenta metros entre transectas y cinco metros entre trampas, alrededor de casas, cultivos y a lo largo de bordes de caminos internos poco transitados con cobertura de gramíneas, tacuaras, arbustos heliófitos al margen de arroyos internos y selva primaria (Figura 2.4).



Figura 2.4. Sitios de colecta en Comunidad Guaraní Yriapú.

e) Cultivos agrícolas

Los muestreos se desarrollaron en la ciudad Colonia Wanda, departamento de Iguazú, situada a una latitud de 25° 58' Sur y a una longitud de 54° 34' Oeste, conectándose por la Ruta Nacional N° 12 con Puerto Iguazú y Posadas. Desde la creación de la empresa forestal *Altos del Paraná S.A.* en 1976, se introdujeron cambios significativos en la zona, definiendo el perfil forestal en desmedro del agrícola. Asimismo, se destaca el cultivo de yerba mate, entre otras actividades agrícolas como el cultivo de mandioca, cítricos, caña de azúcar, a menor escala donde se desarrollaron los muestreos (Figura 2.5).

Las capturas se realizaron durante agosto y noviembre de 2017 y febrero, mayo y noviembre de 2018. Se realizaron muestreos en cultivos de mandioca (verano), yerba mate (verano), pino (otoño), eucalipto (primavera), caña de azúcar (invierno). Se conformaron grillas de 50 trampas, dispuestas en cinco hileras de 10 trampas cada una, separadas cinco metros cada transecta y cada trampa entre sí.



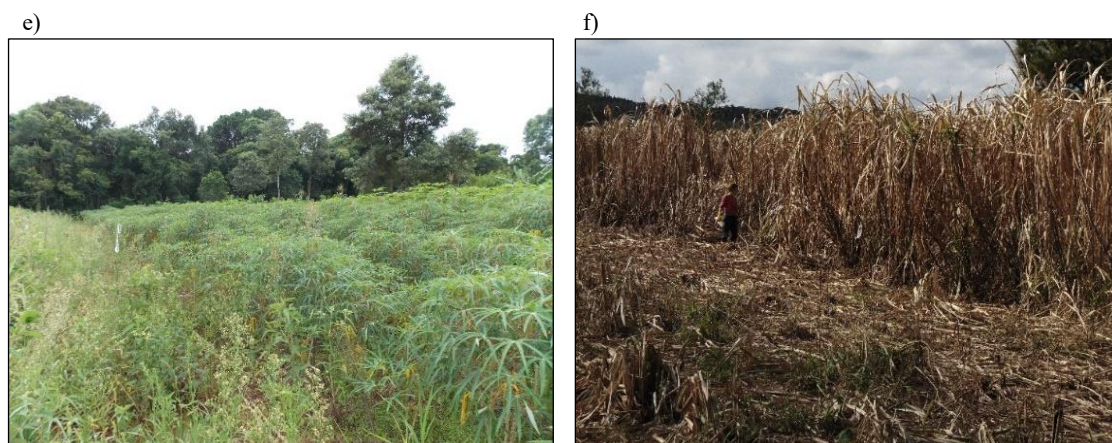


Figura 2.5. Sitios de colecta en cultivos agrícolas de la ciudad de Wanda, a) pinar, b) eucaliptal, c y d) cultivo de yerba mate, e) cultivo de mandioca, f) cultivo de caña de azúcar.

El procesamiento en el campo de los mamíferos se realizó siguiendo las Normas de Seguridad del INMeT establecidas en la “Guía de Seguridad biológica para el trabajo con pequeños y medianos mamíferos” y las “Directrices de la Sociedad Americana de Mastozoólogos para el uso de mamíferos silvestres en la investigación y la educación” (Sikes y col., 2016). Para la colecta de ectoparásitos los roedores silvestres, fueron sedados mediante la inhalación de una dosis baja de isoflurano, mientras que los roedores sinantrópicos fueron sacrificados por dislocación cervical (Figura 2.6). En todos los casos se tomó el peso con balanza electrónica OHAUS Traveler® con precisión de 0,1 g y medidas corporales estandarizadas (largo total del cuerpo, cola, pata posterior derecha y oreja) para su posterior identificación. Se tomaron muestras sanguíneas por sangrado retro-orbitario mediante un tubo capilar heparinizado, las cuales fueron colocadas en tubos con 20 µl de EDTA y se conservaron a -20°C. A continuación, de los animales sacrificados, se realizó la necropsia para la toma de muestras de bazo e hígado, las cuales se colocaron en tubos con etanol 96° que se almacenaron a -18°C para su posterior análisis. Finalmente, los roedores fueron depositados individualmente en bolsas de nylon con alcohol 96%. La determinación de los roedores se realizó en colaboración con el Lic. Carlos A. Galliani (CEPAVE), el Dr. Ulyses F.J. Pardiñas (Centro Nacional Patagónico-CENPAT) y el Dr. Pablo Teta (Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia"). La mayor parte de los roedores fueron depositados en el Museo Bernardino Rivadavia de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Otros roedores fueron liberados en el mismo sitio de captura una vez finalizado el muestreo.

Los especímenes de comadrejas capturados fueron sedados con 20-25 mg/kg de ketamina (5%) y 10 mg/kg de xilacina (2%) por inyección intramuscular (West y col., 2007), para la búsqueda exhaustiva de ectoparásitos, pesado y medición corporal (Figura 2.6). Una vez recuperadas de la anestesia, las comadrejas fueron liberadas en sus respectivos lugares de captura.

El esfuerzo de captura se determinó como el número de trampas utilizadas por tiempo de muestreo, se utilizó la trampa noche (TN) como unidad de muestreo (Jones y col., 1996). Las comadrejas se identificaron a nivel de especie siguiendo a Massoia y col., (2000) y Bárquez y col., (2006), y en colaboración con el Dr. Pablo Teta.



Figura 2.6. Procesamiento de animales, a) *Oligoryzomys nigripes*, b) *Monodelphis dimidiata*, d) *Didelphis albiventris*, f) *Akodon montensis*.

Para este estudio, a las pulgas colectadas en los mencionados muestreo se adicionaron especímenes colectados de roedores cricétidos en años anteriores (2005, 2007, 2009, 2012 y 2013), con la misma metodología que se utilizó en el presente trabajo de tesis, que se encontraban preservadas en alcohol 96% y en freezer a -20°C en el Laboratorio de Ectoparásitos del Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE), como así también pulgas de comadrejas *Didelphis aurita* capturadas en el Parque Nacional Iguazú por la Dra. Daniela Lamattina durante febrero de 2015 a octubre de 2016.

Determinación taxonómica de pulgas

Para la obtención de las pulgas el tegumento de cada mamífero capturado fue examinado a pelo y contrapelo utilizando agujas, pinzas y cepillos. Los ectoparásitos fueron colocados en tubos individuales por hospedador con alcohol 96%, rotulados con el número de campo correspondiente y depositados en freezer a una temperatura de -20°C, hasta los análisis moleculares en el Laboratorio de Biología Molecular del CEPAVE en la ciudad de La Plata, Buenos Aires, y en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Medicina Tropical (INMeT), en Puerto Iguazú, Misiones.

Las pulgas fueron determinadas taxonómicamente de acuerdo con sus caracteres morfológicos, siguiendo las claves y descripciones presentadas por Johnson (1957), Smit (1987) y Linardi y Guimarães (2000). Algunos especímenes que necesitaban la observación de estructuras específicas para la identificación taxonómica fueron analizados individualmente por un método no destructivo de extracción de ADN (Miura y col., 2017; Melis y col., 2020). Luego las pulgas se prepararon para estudios morfológicos siguiendo a Linardi y Guimarães (2000): aclararon en hidróxido de potasio al 10% (KOH), en un tiempo estimado entre tres y siete días de acuerdo al espécimen. Se lavaron en agua destilada y posteriormente, se deshidrataron en una serie creciente de alcoholes (del 80 a 100%) (24 horas en cada graduación), diafanizaron en eugenol (24 horas), y por último se montaron en bálsamo de Canadá, secaron en estufa a 50°C y se observaron bajo el microscopio óptico (Carl Zeiss, AxioStar plus 176045 USA; Leica DM 2500; Olympus BX51).

Los preparados permanentes fueron rotulados con la especie y el sexo de pulga, el acrónimo consistió en la letra "F" (flea) seguida de las siglas del hospedador (algunas de ellas todavía retienen el número de campo, por ejemplo, DAL; para cada pulga individual del mismo hospedador se añadió un número separado por un guion, por ejemplo, F/CNP1938-2). También se incluye un breve informe con las características morfológicas, las especies hospedadoras conocidas y la distribución geográfica, y/o la importancia médica y veterinaria, cuando está disponible. Algunos de los especímenes serán depositados en la Colección de Entomología del

Museo de La Plata, Argentina, mientras que otros permanecen en el Instituto Nacional de Medicina tropical.

Análisis estadísticos

Se analizó de manera comparativa la distribución espacial y los parámetros parasitológicos entre 1) pulgas presentes en áreas protegidas, y 2) pulgas presentes en áreas con gradiente ambiental.

Siguiendo el esquema fitogeográfico de Martínez-Crovetto (1963) para la provincia de Misiones, los sitios de muestreo con características ambientales y fitogeográficas compartidas, fueron agrupados y considerados un único sitio de análisis. A continuación, se detalla cada agrupamiento: (Figura 2.7).

Cuatro agrupamientos en áreas protegidas:

1. **Sector Planaltense (P):** L6, Campo Anexo M. Belgrano, INTA, San Antonio - L7, Reserva de Vida Silvestre Urugua-í, Fundación Vida Silvestre - L8, Parque Provincial Urugua-í
- Sector Misionero:**
2. **Distrito de los Laureles (L):** L1, Balneario Municipal Aristóbulo del Valle sobre A° Cuña Pirú - L2, Club de Pesca Paraná-í Guazú - L3, Parque Provincial “Ernesto Che Guevara”, Caraguatay
3. **Distrito de los Helechos Arborescentes (HA):** L4, Ruta provincial N°2, 6 km NE A° Paraíso - L5, Refugio Moconá.
4. **Distrito de los Palo Rosa (PR):** L9, Parque Provincial Puerto Península – L10, Apepú - L11, Parque Nacional Iguazú.

Cuatro agrupamientos en áreas antropizadas:

5. **L12a**, Urbano de la ciudad de Puerto Iguazú
6. **L12b**, Periurbano-rural de la ciudad de Puerto Iguazú
7. **L13**, Entornos de selva en ambientes antropizados
8. **L14**, Cultivos agrícolas en ciudad Colonia Wanda

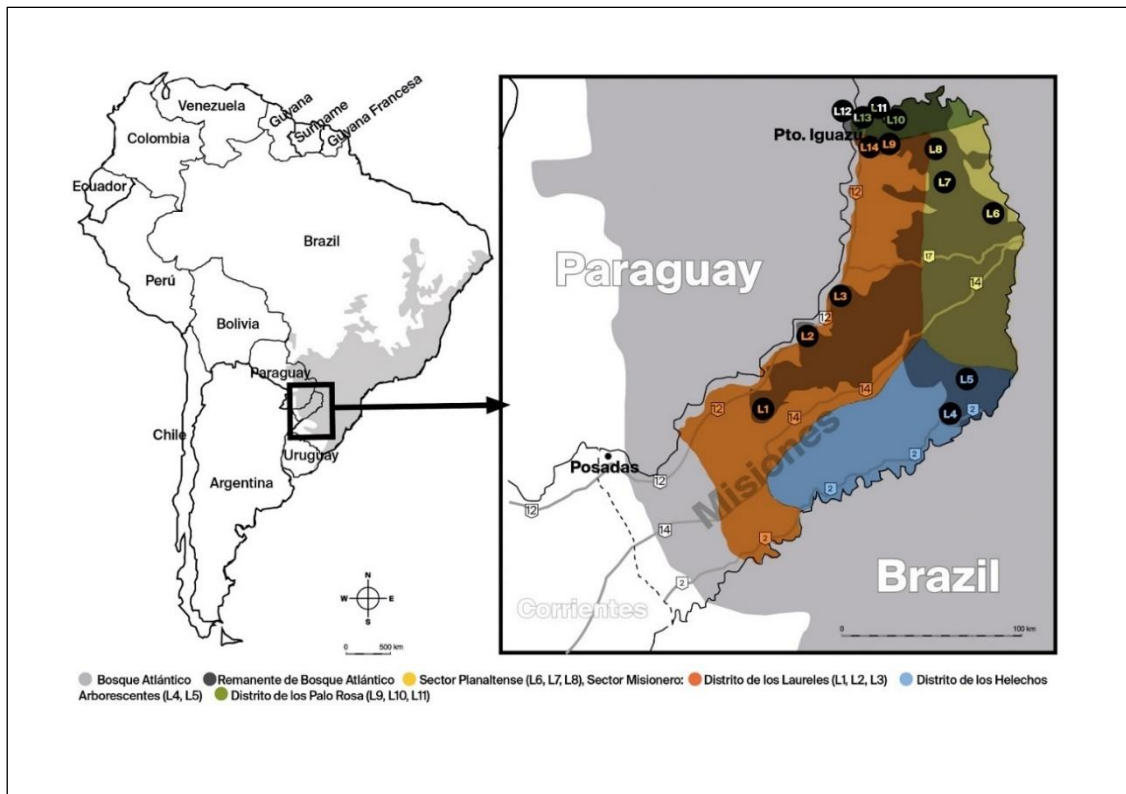


Figura 2.7. Esquema fitogeográfico diferenciando las diferentes áreas y respectivos sitios de colecta.

Caracterización espacial de los ensambles de pulgas

El uso de curvas de rarefacción de especies en estudios de diversidad por un lado permite estimar cuán bien está representada la fauna en la muestra tomada, y por otro, permite comparar muestras de diferente tamaño (es decir, que no tienen el mismo número de individuos o muestras). Para este último fin, se utilizó la plataforma iNEXT para R (Chao y col., 2016) basada en las curvas de rarefacción y extrapolación, usando un modelo con datos de abundancia incorporando los números de Hill para $q=0$ (riqueza de especies) y la exponencial de la entropía de Shannon o diversidad de Shannon ($q = 1$), con base en datos de abundancia (Chao y col., 2014), con el fin de comparar la diversidad entre comunidades basadas en muestras de igual completitud (medida por la cobertura de la muestra).

La riqueza de especies (S) proporciona una rápida y sencilla interpretación de la diversidad de una muestra, pudiendo completarse al considerar también el número de individuos (N). La riqueza observada es un estimador empírico de la riqueza total colectada y tiende a subestimar la riqueza total del sistema, debido a que un porcentaje de especies suelen pasar desapercibidas por ser raras o de baja abundancia (frecuencia/abundancia 1 = “singleton” o frecuencia/abundancia 2 = “doubleton”) (Chao y col., 2015). En los siguientes análisis se estimó con fines comparativos la riqueza esperada teniendo en cuenta datos sobre la abundancia relativa de individuos de las especies en la muestra total (datos de abundancia), a través del estimador de

riqueza Chao1-bc, que permite el cálculo del estimador incluso cuando no hay individuos con abundancia 2 en la muestra (para detalles de la fórmula véase Chao y col. 2015):

$$S_{\text{Chao1-bc}} = S_{\text{obs}} + [(n - 1)n]f_1(f_1 - 1)[2(f_2 + 1)]$$

donde S es el número total de especies observadas, n es el número total de muestras de pulgas recogidas, f_1 es el número de *singletons* (especies con un solo espécimen colectado) y f_2 es el número de *doubletons* (especies con solo dos ejemplares colectados).

Para evaluar la incertidumbre en la predicción de a qué especie pertenecería un individuo seleccionado al azar de cada una de las áreas de estudio, se estimó el índice de diversidad de especies Shannon-Weber utilizando el programa Diversity Profile Estimation de la plataforma en línea SpadeR (Chao y col., 2015):

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

donde H_e' es el índice de entropía de Shannon de cada ensamble de pulga e , y p_{ie} es la abundancia relativa de la especie i en el ensamble e (Begon y col., 1988; Bush y col., 1997).

Se evaluó la diversidad beta utilizando SpadeR para determinar el grado de similitud o disimilitud entre múltiples comunidades utilizando el índice de Horn ($q=1$), el cual pondera las especies por su abundancia sin enfocarse en especies dominantes, con un bootstrap de 1000 repeticiones. Para cualquier par de grupos el valor se encuentra entre 0 y 1, siendo los valores cercanos a uno los más similares; estos valores dependen del número de especies comunes y de la abundancia relativa de éstas.

Parámetros parasitológicos

La estructura de los ensambles de las pulgas se analizó con el uso de los siguientes índices ecológicos: intensidad media (IM = número de individuos de una especie de pulga/número de hospedadores infestados), abundancia media (AM = número de especímenes de una especie de pulga/número de hospedadores examinados), dominancia (D = número de pulgas de una especie determinada colectadas de los hospedadores/número total de especies de pulgas colectadas de los hospedadores*100), y prevalencia (P = número de especímenes hospedadores parasitados por una especie de pulga/número de hospedadores examinados*100) por áreas y especies hospedadoras (Bush y col., 1997). Las diferencias entre las áreas, las especies de hospedadores y las especies de pulgas se evaluaron con las pruebas de Chi-cuadrado y Bootstrap-t (número de réplicas de bootstrap=2000) utilizando el programa informático Quantitative Parasitology 3.0 (Reiczigel y Rózsa., 2005).

2.3 Resultados

Muestras colectadas

El total de esfuerzo-captura para las áreas urbana y periurbana fue de 2745 y de 2883 trampas-noches, respectivamente. En entornos de selva en ambientes antropizados fue de 1833 trampas-noches y en cultivos agrícolas de 4500 trampas-noches. Para las áreas protegidas, el total de esfuerzo de captura para los Parques Provincial Puerto Península y Nacional Iguazú fueron de 3564 y de 2319 trampas-noches, respectivamente.

Un total de 290 pulgas fueron colectadas de 311 hospedadores (239 roedores y 72 marsupiales) capturados, de los cuales 16 especímenes de pulgas fueron hallados en ambientes de selva, 16 en entornos de selva en ambientes antropizados, 196 en sitios urbano, y 62 en sitios periurbanos-rurales de Puerto Iguazú. No se registraron colectas de pulgas en roedores capturados en cultivos agrícolas. En entornos de selva se capturaron 110 roedores, en entornos de selva antropizados 34 roedores y 5 marsupiales, en sitios urbano 24 roedores y 43 marsupiales, en sitios periurbanos 48 roedores y 24 marsupiales, mientras que en cultivos agrícolas 23 roedores fueron capturados (Tabla 2.1). Además, se estudiaron y determinaron especímenes colectados en el marco de otros proyectos de investigación: 138 pulgas colectadas de 804 roedores examinados en ambientes de selva primaria o secundaria, y 24 pulgas colectadas de 38 comadrejas examinadas en Parque Nacional Iguazú.

En las tablas 2.1 se detalla el número y proporción de especies de pulgas según los sitios de colecta, y en la tabla 2.2 se presenta el total de hospedadores (roedores y marsupiales) que fueron examinados de las 14 localidades de la provincia de Misiones.

Tabla 2.1. Número y proporción de especies de pulgas según los sitios de colecta en Misiones

Sitios de colecta	Familia y especies de pulgas											TOTAL	%		
	Pulicidae	Stephanocircidae	Ctenophthalmidae					Rhopalopsyllidae							
	<i>C. f. felis</i>	<i>C. m. minerva</i>	<i>A. a. antiquorum</i>	<i>A. a. romnai</i>	<i>A. i. intermedia</i>	<i>P. (P.) platensis</i>	<i>P. (P.) rimatus</i>	<i>P. (P.) r. beebei</i>	<i>P. (P.) r. roberti</i>	<i>P. (N.) pradoi</i>	<i>P. (N.) pygaerus</i>				
	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N				
Balneario Municipal Aristóbulo del Valle sobre A° Cuña Pirú (L1)		3					9	32	1					45	26
Club de Pesca Paraná-í Guazú (L2)										1				1	0.6
Parque Provincial "Ernesto Che Guevara", Caraguatay (L3)											1			1	0.6
Ruta provincial N°2, 6 km NE A° Paraíso (L4)								1						1	0.6
Refugio Moconá (L5)		2					2	9			6	5		24	14
Campo Anexo M. Belgrano, INTA, San Antonio (L6)								11						11	6.5
Reserva de Vida Silvestre Urugua-í, Fundación Vida Silvestre (L7)								2						2	1.2
Parque Provincial Urugua-í (L8)		1	2					49			1			53	9
Parque Provincial Puerto Península (L9)								5						5	0.6
Apepú (L10)											1			1	0.6
Parque Nacional Iguazú (L11)			2		7			12		8				29	3
Ciudad de Puerto Iguazú (L12)	229		3	1				25						258	37
Comunidad Iriapú (L13)	2				8			6						16	
Cultivos de Wanda (L14)														0	
TOTAL	231	6	7	1	15	11	152	1	8	10	5			447	
(%)	51,7%	1,3%			5,14%				41,9%						100

Referencia: %: proporción de pulgas en sitios de colectas; (%): proporción de familia de pulgas

Tabla 2.2. Número de especies hospedadoras infestadas por pulgas en la provincia de Misiones, Argentina

Hospedadores	Examinados	Infestados n (%)	Especies de pulgas											Total	
			<i>C. f. felis</i>	<i>A. a. antiquorum</i>	<i>A. a. ronnai</i>	<i>A. i. intermedia</i>	<i>Cr. m. minerva</i>	<i>P. (P.) platensis</i>	<i>P. (P.) rimatus</i>	<i>P. (P.) r. beebei</i>	<i>P. (P.) r. roberti</i>	<i>P. (N.) pradoi</i>	<i>P. (N.) pygaerus</i>		
<i>Akodon montensis</i>	750	79 (10.53%)		1				2	7	93			7	1	111
<i>Brucepattersonus sp.</i>	16	2 (12.5%)					1			1					2
<i>Calomys tener</i>	13	0													0
<i>Euryzomys russatus</i>	16	1 (6.25%)								1					1
<i>Nectomys squamipes</i>	3	1 (33.3%)								1					1
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	112	8 (7.14%)					1	1	5				2		9
<i>Oxymycterus misionalis</i>	1	1 (100%)		1						2					3
<i>Sooretamys angouya</i>	12	1 (8.33%)							1						1
<i>Thaptomys nigrata</i>	31	13 (41.93%)					2	2	15	1			2	4	26
<i>Mus musculus</i>	31	0													0
<i>Rattus rattus</i>	58	2 (3.44%)								5					5
<i>Didelphys albiventris</i>	66	44 (66.6%)	231	3	1					16					251
<i>Didelphys aurita</i>	36	8 (22.22%)		1			6			6		8			21
<i>Monodelphys americana</i>	1	1 (100%)		1											1
<i>Monodelphys dimidiata</i>	2	1 (50%)								4					4
<i>Philander quica</i>	5	4 (80%)					9			1					10
<i>Vegetación</i>													1		1
Total	1153	167 (14.5%)	231	7	1	15	6	11	150	1	8	12	5		447

Determinación taxonómica de pulgas

Los especímenes de pulgas estudiados se enumeran a continuación. Los datos incluyen el símbolo de cada sexo, las siglas y la localidad de la colección.

Pulgas de 12 especies y subespecies pertenecientes a cinco familias fueron colectadas del total de los hospedadores e identificadas como: Pulicidae: Pulicinae: *Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835); Tungidae: *Tunga penetrans* (Linné, 1758), Stephanocircidae, Craneopsyllinae: *Craneopsylla minerva minerva* (Rothschild, 1909); Rhopalopsyllidae: Rhopalopsyllinae: *Polygenis (Polygenis) platensis* (Jordan y Rothschild, 1908), *Polygenis (Polygenis) rimatus* (Jordan, 1932), *Polygenis (Polygenis) roberti beebei* (Fox, 1947), *Polygenis (Polygenis) roberti roberti* (Rothschild, 1905), *Polygenis (Neopolygenis) pradoi* (Wagner, 1937), *Polygenis (Neopolygenis) pygaerus* (Wagner, 1937); Ctenophthalmidae: Doratopsyllinae: *Adoratopsylla (Adoratopsylla) antiquorum antiquorum* (Rothschild, 1904), *Adoratopsylla (Adoratopsylla) antiquorum ronnai* (Guimaraes, 1954) y *Adoratopsylla (Tritopsylla) intermedia intermedia* (Wagner, 1901).

Orden Siphonaptera (Latreille, 1825)

Familia Pulicidae (Billberg, 1820)

***Ctenocephalides felis felis* (Bouché, 1835)**

Hospedador y localidad tipo: Perdido.

Especímenes examinados: 3 ♀ - 2♂ (F/DAL001-1/3, F/DAL005-1/5, F/DAL006-1/2, F/DAL007-1/2 F/DAL008-1/5, F/DAL011-1/11, F/DAL014-1/45, F/DAL015, F/DAL018-1/32, F/DAL027-1/2, F/DAL028-1/2, F/DAL030-1/2, F/DAL032, F/DAL033-1/3, F/DAL034-1/2, F/DAL036-1/8, F/DAL037-1/3, F/DAL038, F/DAL039-1/2, F/DAL040, F/DAL041-1/3, F/DAL042-1/2, F/DAL043-1/2, F/DAL044-1/2, F/DAL045-1/2, F/DAL047-1/3, F/DAL050, F/DAL051, F/DAL052, F/DAL053, F/DAL054-1/12, F/DAL055-1/12, F/DAL056-1/5, F/DAL057-1/2, F/DAL060-1/5, F/DAL061-1/25, F/DAL062-1/4, F/DAL063-1/3, F/DAL064-1/4, F/DAL065, F/DAL067-1/13,) *Didelphis albiventris*, L12.

Rango geográfico y otros hospedadores: Cosmopolita. Principales hospedadores: felinos, caninos, roedores, marsupiales. Didelphimorphia – Didelphidae: *D. albiventris*, *Lutreolina crassicaudata*, *Didelphis* sp. Carnivora – Canidae: *Canis familiaris*, *Lycalopex* sp. Felidae: *Felis catus*, *Puma concolor*. Procyonidae: *Nasua nasua*. Variedad de roedores cricétidos tales como

Graomys spp., *Akodon* sp., *Oligoryzomys* spp. y múridos como *Rattus* spp. (Barros-Battesti y col., 1993; Carvalho y col., 2001; Moraes y col., 2003).

Observaciones: Los datos amplían la distribución geográfica de esta pulga a la región noreste del país. *Ctenocephalides felis felis* es la pulga más común de perros y gatos, asociada a la fauna silvestre y a animales sinantrópicos, como los marsupiales *Didelphis aurita* y *D. albiventris* (Figura 2.8.). Por lo tanto, los nuevos registros de esta pulga podrían tener importantes implicaciones en la salud pública teniendo en cuenta la estrecha relación que tienen estos ectoparásitos con los humanos. La ruta más probable de transmisión de *Rickettsia* por pulgas involucra pulgas infectadas del gato que se desplazan de marsupiales a los animales de compañía que frecuentemente entran en contacto con las personas (Eremeeva y col., 2012).



Figura 2.8. Ejemplar macho de *Ctenocephalides felis felis*.

Familia Tungidae

Tunga penetrans (Linné, 1758)

Hospedador y localidad tipo: Perdido.

Especímenes examinados: Perros (*Lupus familiaris*) y gatos (*Felis catus*) domésticos, humanos.

Rango geográfico y otros hospedadores: Está ampliamente distribuida en regiones neotropicales: Colombia, Chile, Ecuador, Guayana Francesa, Paraguay, Perú, Surinam, Trinidad, Venezuela, y regiones etiópicas de África subsahariana. Es endémica de América del Sur, particularmente en Argentina, esta especie se halla registrada en las provincias de Buenos Aires, Santa Fe, Corrientes, Misiones, Formosa, Chaco, Santiago del Estero, Tucumán, Salta y Jujuy, asociada a *Tapirus terrestres*, *Dasyopus hybridus*, *Chaetophractus villosus*, y a animales domésticos (perros y cerdos) (Ezquiaga y col., 2008).

Observaciones: *Tunga penetrans* es la especie más reportada de este género, predomina en las poblaciones humanas y animales domésticos, siendo el perro el principal reservorio y factor de riesgo de la infestación en humanos (Figura 2.9).

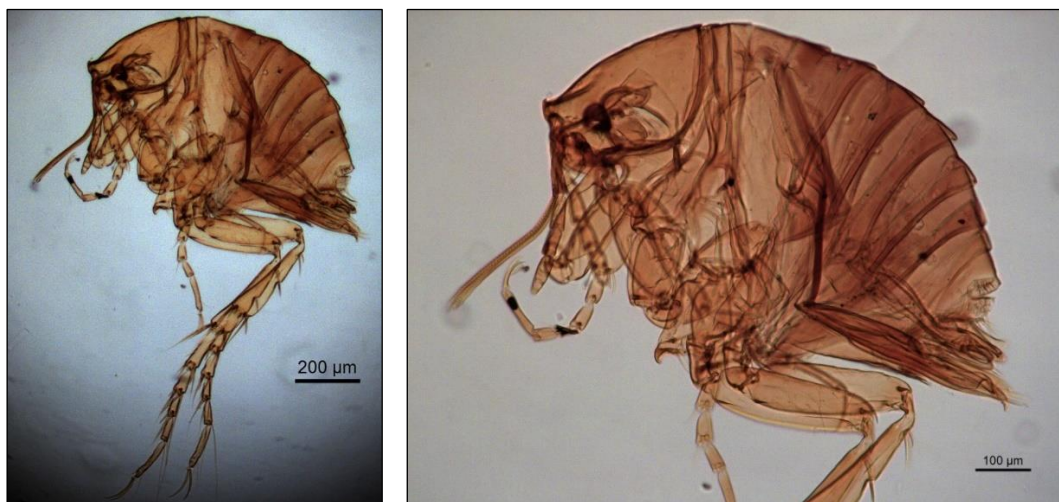


Figura 2.9. Macho *Tunga penetrans* de perro doméstico de Puerto Iguazú.

Familia Stephanocircidae

Subfamilia Craneopsyllinae

Craneopsylla minerva minerva (Rothschild, 1903)

Hospedador y localidad tipo: *Didelphis aurita* (Wied-Neuwied, 1826), Sapucay, Paraguay.

Especímenes examinados: 1 ♀ (F/CNP4059-1) ex *Akodon montensis*, L5; 1 ♀ (F/CNP1938-1) *Thaptomys nigrita*, L5; 1 ♀ (F/CNP2436) ex *Akodon montensis*, L1; 1 ♀ (F/JN700) *Brucepattersonius* sp., L1; 1 ♂ (F/JN381) *Thaptomys nigrita*, L1.

Rango geográfico y otros hospedadores: *Craneopsylla minerva minerva* fue reportada para Argentina, Chile, Ecuador, Paraguay, Perú, Uruguay, Venezuela, central, noreste y sur de Brasil. En Argentina, *C. m. minerva* ha sido asociada con roedores sigmodontinos (Cricetidae) y marsupiales (Didelphidae) en Delta del Paraná en provincia de Buenos Aires (Lareschi y col. 2010). Además, *C. m. minerva* también se ha registrado en localidades situadas en el centro y noroeste de la Argentina, principalmente asociadas con Rodentia – Cricetidae: *Akodon dolores*, *Akodon spegazzinii*, *Deltamys kempii*, *Graomys griseoflavus*, *Holochilus vulpinus*, *Oligoryzomys xanthopygus*, *Oxymycterus rufus*, *Scapteromys aquaticus* y Didelphimorphia – Didelphidae: *Lutreolina crassicaudata*, *Thylamys cf. cinderella*, *Thylamys cf. sponsorius*, y *Thylamys pusillus* (Lareschi y col. 2016).

Observaciones: Aquí reportamos por primera vez *C. m. minerva* para el noreste de Argentina en la ecorregión Bosque Atlántico del Alto Paraná situada en la provincia de Misiones. Además, se menciona por primera vez a *C. m. minerva* asociada a *Brucepattersonius* sp., *A. montensis* y *T. nigrita*. Linardi y Guimarães (2000) y Carvalho y col. (2001) registraron previamente *C. m. minerva* parasitando estos dos últimos roedores en el sur de Brasil.

El género *Craneopsylla* (Rothschild, 1911) es monotípico, con una sola especie subdividida en dos subespecies: *C. m. minerva* y *C. m. wolffhuegeli* (Rothschild, 1909), con 5 y 7/8 dientes en el ctenidium genal, respectivamente. La morfología de los especímenes estudiados coincide con los descritos por Hopkins y Rothschild (1956) y Johnson (1957) para *C. m. minerva*. Los especímenes colectados de *A. montensis* (F/CNP 4059-1) y *T. nigrita* (F/CNP 1938-1) presentan 6 dientes en el ctenidium genal. Según Linardi y Guimarães (2000), estos especímenes pueden ser considerados "raros e intermedios" entre ambas subespecies. Mientras tanto, son asignados a *C. m. minerva* según la distribución geográfica de ambas subespecies. *Craneopsylla m. wolffhuegeli* se ha informado en varias provincias argentinas, principalmente del sur, centro y oeste del país, así como en Chile y Perú. (Hopkins y Rothschild 1956; Lareschi y col. 2016)

Familia Rhopalopsyllidae

Subfamilia Rhopalopsyllinae

Polygenis (Polygenis) platensis (Jordan y Rothschild, 1908)

Hospedador y localidad tipo: *Ctenomys* sp., La Plata, Buenos Aires, Argentina.

Especímenes examinados: 2 ♀ (F/CNP4194, F/CNP4215) ex *Akodon montensis*, L5; 6 ♀ (F/CNP5144-1/2, F/CNP5112-1/2, F/CNP1829, F/CNP1830) ex *Akodon montensis*, L1; 1 ♀ (F/CNP1836) *Sooretamys angouya*, L1; 2 ♀ (F/CNP1839-1/2), *Thaptomys nigrita*, L1.

Rango geográfico y otros hospedadores: *Polygenis (P.) platensis* presenta una amplia distribución en la Argentina, dado que fue recolectada en una diversidad de localidades en el área noroeste, central y sur del país (Lareschi y col., 2016). Además, se registró *P. platensis* en el sur de Brasil, Chile, Uruguay y Bolivia (Linardi y col., 2005). En la Argentina, se registró asociada con una variedad de marsupiales, Didelphimorphia – Didelphidae: *Didelphis albiventris*, *Lutreolina crassicaudata*, roedores, Rodentia – Caviidae: *Cavia aperea*, *Dolichotis patagonum*, *Galea musteloides*, *Microcavia australis*; Cricetidae: *Abrothrix olivacea*, *Akodon azarae*, *Akodon dolores*, *Akodon iniscatus*, *Akodon simulator*, *Calomys musculinus*, *Deltamys kempii*, *Eligmodontia typus*, *Graomys griseoflavus*, *Holochilus vulpinus*, *Necromys obscurus*,

Oligoryzomys nigripes, *Phyllotis xanthopygus*, *Reithrodon auritus*, *Scapteromys aquaticus*, y *xenarthrans*, *Xenarthra* – Dasyopodiade: *Chaetophractus vellerosus*.

Observaciones: Los presentes registros constituyen la primera mención de *P. platensis* para el noreste de Argentina, y la primera mención de esta pulga para el Bosque Atlántico del Alto Paraná. Linardi y col., (2005) citan esta especie en tres municipios del Estado de Río Grande do Sul (Brasil), situados en el pastizal pampeano. La morfología de los ejemplares estudiados se ajusta a las descripciones proporcionadas por Lareschi y Linardi (2009). *Polygenis platensis* incluía anteriormente dos subespecies, *Polygenis (P.) platensis platensis* y *Polygenis (P.) platensis cisandinus*. El número de setas de los esternitos II y VII en las hembras ha sido el criterio más importante para separar las subespecies (Jordan y Rothschild (1923) y Jordan (1939)). Lareschi y Linardi (2009) ponen en sinonimia la subespecie *P. cisandinus* y *P. platensis* considerando que las características que las diferenciaban carecían de valor diagnóstico. Los nuevos registros de hospedadores reportados aquí para esta pulga incluyen *A. montensis*, *S. angouya* y *T. nigrita* (Figura 2.10).



Figura 2.10. Ejemplares adultos de *Polygenis (P.) platensis*, de izquierda a derecha, hembra; detalle de la genitalia de la hembra; macho.

***Polygenis (Polygenis) rimatus* (Jordan, 1932)**

Hospedador y localidad tipo: *Didelphis* sp., Sapucay, Paraguay.

Especímenes examinados: 2 ♂ (F/CNP4059-2, F/CNP4061) ex *Akodon montensis*, L5; 2 ♀ - 7 ♂ (F/CG229, F/CG231-1/2, F/CG232, F/CG236, F/CG239, F/CNP5251, F/CG338, F/CNP4816) ex *Akodon montensis*, L8; 4 ♀ - 4 ♂ (F/CNP5188-1/3, F/CNP3843, F/CNP5211, F/CNP5181, F/ROB227-1/2) ex *Akodon montensis*, L6; 1 ♂ (F/CNP6246) *Thaptomys nigrita*, L6; 20 ♀ - 6 ♂ (F/CNP1797, F/CNP2447, F/CNP5120, F/CNP1882-1/2, F/CNP5149-1/3, F/CNP5108, F/CNP1818, F/JN489, F/CNP5375-1/2, F/CNP5152-1/2, F/CNP5144-3/4, F/CNP5135, F/CNP2434, F/CNP1879-1/2, F/CNP5117, F/CNP1825, F/CNP1834, F/CNP2440, F/CNP1845)

ex *Akodon montensis*, L1; 1 ♂ (F/CNP3711) *Nectomys squamipes*, L7; 1 ♂ (F/CNP3875) *Thaptomys nigrita*, L7; 3 ♀ - 4 ♂ (F/CNP1938-2/3, F/CNP3010-1/2, F/CNP3008-1/3) *Thaptomys nigrita*, L5; 2 ♀ - 4 ♂ (F/CNP1839-3, F/CNP1827, F/CNP1826, F/CNP1816-1/2, F/CNP1832) *Thaptomys nigrita*, L1; 1 ♂ (F/JP088) *Oligoryzomys nigripes*, L8; 2 ♂ (F/ROB250, F/CNP5203) *Oligoryzomys nigripes*, L6; 1 ♀ (F/CNP5988) *Oligoryzomys nigripes*, L4; 1 ♀ - 1 ♂ (F/JP060-1/2) *Oxymycterus misionalis*, L8; 5 (FR2M13-1/2, F/R2M15-1/3), *Rattus rattus*, L12; 2 ♀ - 3 ♂ (F/CDA013-1/2, F/CDA015-1/2, F/CDA017) *Didelphis aurita*, L11. 5 ♀ - 6 ♂ (F/DAL006-1/2, F/DAL008, F/DAL015, F/DAL028, F/DAL032, F/DAL034-1/2, F/DAL036, F/DAL037-1/4, F/DAL066-1/2) *Didelphis albiventris*, L12; ♀ *Philander quica* (F/CPF004-4), L13; 1 ♀ - 3 ♂ *Monodelphis dimidiata* (F/CMD002-1/4), L12.

Rango geográfico y otros hospedadores: *Polygenis (Polygenis) rimatus* ha sido registrado en Paraguay y Perú, aunque la mayoría de los registros son de Brasil y Argentina (Smit 1987; Linardi y Guimarães 2000; Lareschi y col., 2016). En Argentina, esta especie se registró principalmente en provincia de Buenos Aires, y también de las provincias de Chubut, Neuquén, Santiago del Estero, La Rioja, Formosa y Misiones para el Parque provincial Urugua-í. *Polygenis rimatus* fue reportada asociada con marsupiales Didelphimorphia – Didelphidae: *Didelphis albiventris*, *Didelphis aurita*, *Lutreolina crassicaudata*, y roedores de la familia Rodentia – Caviidae: *Cavia aperea*, *Microcavia australis*; Cricetidae: *Abrawayaomys chebezi*, *Akodon azarae*, *Akodon dolores*, *Akodon iniscatus*, *Calomys laucha*, *Calomys musculinus*, *Deltamys kempi*, *Eligmodontia typus*, *Graomys griseoflavus*, *Oligoryzomys flavescens*, *Oligoryzomys longicaudatus*, *Oligoryzomys nigripes*, *Oxymycterus rufus*, *Necomys obscurus*, *Reithrodon auritus*, *Scapteromys aquaticus*; Muridae : *Rattus norvegicus*, *Rattus rattus* y Sciuridae: *Callosciurus erythraeus* (Lareschi y col., 2016).

Observaciones: En Argentina, *P. (P.) rimatus* fue previamente reportada en la provincia de Misiones parasitando *A. chebezi* (Figura 2.11). Roedores de las especies *A. montensis*, *T. nigrita*, *N. squamipes* y *O. misionalis* representan nuevos registros de hospedadores para Argentina, estas asociaciones ya habían sido mencionadas para Brasil (excepto para *O. misionalis*) (Carvalho y col., 2001; Moraes y col. 2003). Lareschi y Linardi (2005) informaron diferencias morfológicas en machos y hembras de *P. rimatus* entre especímenes de la provincia de Buenos Aires en Argentina y los de Brasil. Las hembras aquí estudiadas corresponden a la morfología de los ejemplares de la Provincia de Buenos Aires (espermateca con una región esclerotizada en forma de U), mientras que los machos presentan una combinación de características relacionadas con el aedeagus y los segmentos abdominales modificados que no concuerda con los ejemplares de ninguno de los países, lo que sugeriría que podría tratarse de una nueva especie o subespecie, o que esos caracteres no tendrían valor diagnóstico.

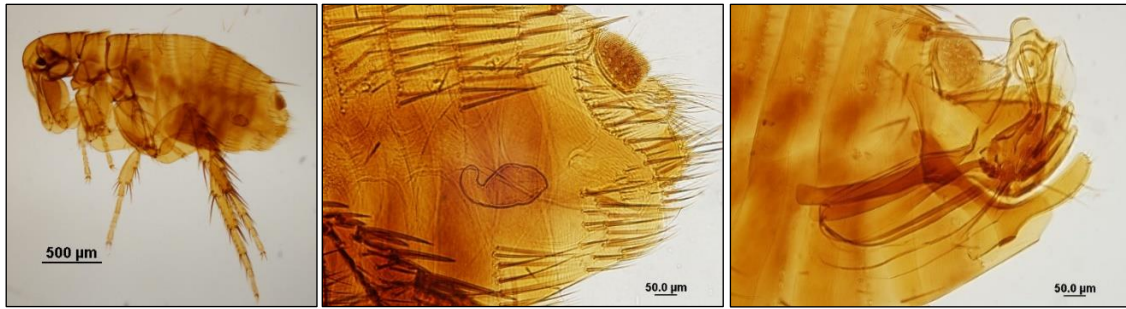


Figura 2.11. Ejemplares adultos de *Polygenis (P.) rimatus*, de izquierda a derecha, hembra; detalle de la genitalia de la hembra; detalle de la genitalia del macho.

***Polygenis (Polygenis) roberti beebei* (Fox, 1947)**

Hospedador y localidad tipo: *Didelphis marsupialis*, Estación Biológica de Rancho Grande, Venezuela.

Especímenes examinados y localidad: 1 ♂ (F/CNP1839-4) *Thaptomys nigrita*, L1.

Rango geográfico y otros hospedadores: Además de Venezuela, esta pulga ha sido registrada en Perú, Bolivia, Colombia, Costa Rica, Ecuador, Guayana Francesa, Panamá, Surinam, Brasil y Argentina. De Brasil *P. (P.) r. beebei* fue mencionado solo para Amapá (Serra Tumucumaque), en el norte de Brasil, asociado con un sigmodontino no identificado de la Tribu Oryzomyini (Vorontsov) (Linardi y Guimarães, 2000). Los orizominos forman la tribu más diversa taxonómicamente de roedores sigmodontinos, con 34 géneros y más de 130 especies reconocidas y la mayor área de distribución geográfica (Patton y col., 2015). En Argentina *P. (P.) r. beebei* sólo fue registrada en el noroeste (Laguna La Brea, provincia de Jujuy), asociado con el orizomino *Euryoryzomys legatus* (Lareschi y col., 2003).

Observaciones: Este es el segundo registro de esta pulga para Argentina, y la primera para el nordeste, provincia de Misiones y Bosque Atlántico. *Thaptomys nigrita* constituye un nuevo registro hospedador.

***Polygenis (Polygenis) roberti roberti* (Rothschild, 1905)**

Hospedador y localidad tipo: *Didelphis marsupialis*, São Paulo, Brasil

Especímenes examinados y localidad: 3 ♂ - 5 ♀ (F/CDA13, F/CDA16-1/2, F/CDA17, F/CDA18, F/CDA21-1/3) *Didelphis aurita*, L11.

Rango geográfico y otros hospedadores: Se distribuye en Brasil (Bahía, Espírito Santo, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Río de Janeiro São Paulo, Santa Catarina, Paraná), Ecuador y Perú (Linardi, 2000). Linardi (1985) y posteriormente Moraes y col., (2003) reportaron esta especie de pulga parasitando principalmente a roedores cricétidos del género *Euryoryzomys*, pero también se encuentra asociada a otros roedores, marsupiales, carnívoros y edentados.

Observaciones: Se reporta la presencia de *Polygenis (P.) r. roberti* por primera vez para Argentina. Este reporte es congruente con los hallazgos de las investigaciones realizadas en Brasil, si consideramos que la Selva Paranaense en Argentina forma parte del complejo de ecorregiones del Bosque Atlántico, con el cual comparte similares rasgos de su biodiversidad.

***Polygenis (Neopolygenis) pradoi* (Wagner, 1937)**

Hospedador y localidad tipo: *Nasua nasua*, Nova Teutonia, Santa Catarina, Brasil.

Especímenes examinados y localidad: 1 ♀ (F/CNP4238) ex *Akodon montensis*, L2; 1 ♀ (F/CNP4198) ex *Akodon montensis*, L3; 1 ♀ - 3 ♂ (F/CNP 4059-3, F/CNP4213-1/2, F/CNP4187) ex *Akodon montensis*, L5; 1 ♂ (F/JP002) ex *Akodon montensis*, L8; 1 ♀ - 1 ♂ (F/CNP1938-4, F/LTU877) *Thaptomys nigrita*, L5.

Rango geográfico y otros hospedadores: *Polygenis (N.) pradoi* se registró para el Bosque Atlántico en el sudeste de Brasil, en particular en los estados de Rio do Janeiro, São Paulo, Paraná y Santa Catarina (Barros-Battesti y col., 1993; Linardi y Guimarães 2000; Carvalho y col. 2001; Moraes y col. 2003). De acuerdo con las conclusiones de Linardi (1985) y Moraes (2003) los especímenes estudiados fueron colectados de roedores del género *Akodon*. En la provincia de Buenos Aires, Argentina, *P. (N.) pradoi* se registró en Didelphimorphia – Didelphidae: *Didelphis albiventris*, Rodentia – Cricetidae: *Akodon azarae*, *Oligoryzomys nigripes*, *Oxymycterus rufus*, y *Scapteromys aquaticus*.

Observaciones: *Polygenis (N.) pradoi* se registra por primera vez en el noreste de Argentina (Figura 2.12). Algunos especímenes examinados presentaron características intermedias entre *P. (N.) pradoi* y *Polygenis frustatus* de acuerdo con observaciones de Linardi (1979) en especímenes de Salesópolis, São Paulo, Brasil, que consideraron que este grupo pertenecía al "complejo de *P. pradoi*". La extensa literatura también notificó las coincidencias entre ambos especímenes (Del Ponte, 1963; Tipton y Machado-Allison, 1972). Los especímenes aquí estudiados coinciden con los descritos para *P. pradoi* (Jordan). Se sugiere una revisión exhaustiva de las especies de *P. pradoi*/*P. frustatus* para aclarar su situación taxonómica.



Figura 2.12. Ejemplares adultos de *Polygenis (N.) pradoi*, de izquierda a derecha, hembra; macho; detalle de la genitalia del macho.

Polygenis (Neopolygenis) pygaerus (Wagner, 1937)

Hospedador y localidad tipo: *Didelphis aurita*, Santa Catarina, Brasil.

Especímenes examinados y localidad: 1 ♀ (F/CNP4059-4), ex *Akodon montensis*, L5; 2 ♀ - 2 ♂ (F/CNP1938-5, F/LTU 860, F/CNP3008-4/5) *Thaptomys nigrita*, L5

Rango geográfico y otros hospedadores: Hay pocos registros de *P. (N.) pygaerus* para Argentina. Esta pulga fue registrada sólo en la provincia de Buenos Aires asociada a dos especies de sigmodontinos y un registro en el marsupial *D. aurita* (Lareschi y col., 2016). Además, Linardi y Guimarães (2000) mencionan a *P. (N.) pygaerus* de los estados de Paraná y Santa Catarina en el sur de Brasil asociado con sigmodontinos tales como *A. montensis*, *Nectomys squamipes* y *T. nigrita*.

Observaciones: Nuestros hallazgos amplían la distribución geográfica de *P. (N.) pygaerus* y su rango hospedatorio para Argentina (Figura 2.13). Esta pulga fue registrada por primera vez en la provincia de Misiones y asociada a *A. montensis* y *T. nigrita*. Ya se han registrado estos roedores hospedadores asociados a *P. pygaerus* en el sur del Brasil (Carvalho y col. 2001).



Figura 2.13. Ejemplares de *Polygenis (N.) pygaerus*, izquierda hembra; derecha detalle de la genitalia de la hembra.

Familia Ctenophthalmidae

Adoratopsylla (Adoratopsylla) antiquorum antiquorum (Rothschild, 1904)

Hospedador y localidad tipo: *Didelphis aurita*, Piquete, São Paulo, Brasil.

Especímenes examinados y localidad: 1 ♂ (F/CNP5283) ex *Akodon montensis*, L8; 1 ♀ (F/JP060-3) *Oxymycterus misionalis* L8; 1 ♂ (F/CMA001) *Monodelphis americana*, L9, 1 ♀ - 2 ♂ *Didelphis albiventris* (F/DAL032, F/DAL049, F/DAL043) L12.

Rango geográfico y otros hospedadores: *Adoratopsylla (A.) a. antiquorum* se registró para el centro, el norte y el sur del Brasil, principalmente asociado con marsupiales de la subfamilia Didelphinae. Barros-Battesti y col. (1997) informaron de esta pulga para dos localidades de Paraná en la zona del Bosque Atlántico y la zona del Bosque de Araucaria angustifolia asociada con *Philander opossum* y *Akodon serrensis*, respectivamente. En Argentina, *A. (A.) a. antiquorum* fue reportada sólo una vez asociada a *Abrawayomys chebezi* en el Parque Provincial Urugua-í, Provincia de Misiones (Pardiñas y col. 2016).

Observaciones: Aunque este género se relaciona principalmente con los marsupiales, también se asocia con roedores sigmodontinos, como *A. montensis* y *Nectomys squamipes* en el sureste de Brasil (Carvalho y col. 2001; Moraes y col. 2003). En este caso *A. montensis*, *O. misionalis* y *M. americana* representan nuevos hospedadores para Argentina.

Adoratopsylla (Adoratopsylla) antiquorum ronnai (Guimaraes, 1954)

Hospedador y localidad tipo: *Didelphis paraguayensis*, Beto Gonzalves, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.

Especímenes examinados y localidad: 1 ♂ (F/DAL36) *Didelphis albiventris*, L12.

Rango geográfico y otros hospedadores: *Adoratopsylla (Adoratopsylla) antiquorum ronnai* ha sido hallada en São Paulo, Santa Catarina y Rio Grande do Sul, parasitando exclusivamente marsupiales: *D. albiventris*, *Philander frenatus* y *Marmosa (Micoureus) demerarae*, *Marmosops incanus* (Guimaraes, 1954). También en algunas localidades de Santa Catarina, Regolin y col., (2010) encontraron *A. (A.) a. ronnai* en *Monodelphis iheringi* en el municipio de Ipanema, y en *Monodelphis americana* en el Parque Estatal de Pedra Branca/RJ (Cáceres, 2012).

Observaciones: Se reporta la presencia de *A. (A.) a. ronnai* por primera vez para Argentina (Figura 2.14). El hallazgo de esta subespecie en la ecorregión de la Selva Paranaense en Misiones

es consistente con los hospedadores y la distribución geográfica descrita en la literatura, suscripta a los marsupiales como principales hospedadores en la región del Bosque Atlántico en Brasil.

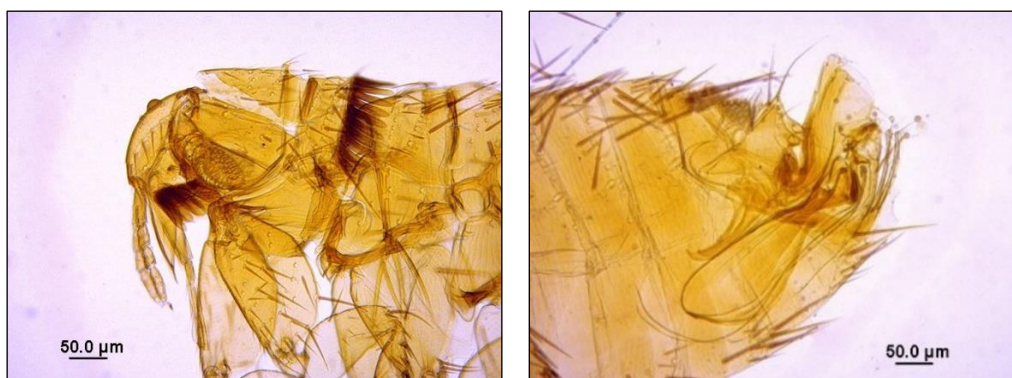


Figura 2.14. Ejemplar macho de *Adoratopsylla (A.) antiquorum ronnai*; derecha, detalle de la genitalia.

***Adoratopsylla (Tritopsylla) intermedia intermedia* (Wagner, 1901)**

Hospedador y localidad tipo: Hospedador desconocido. Paraguay.

Especímenes examinados y localidad: 1 ♂ (F/CPF001), *Philander quica*, L10; 2 ♀ - 5 ♂ (F/CPF002-1/7), *Philander quica*, L12, 4 ♀ - 4 ♂ (F/PF0003-1/2, F/PF004-1/3, F/PF005-1/3), L13.

Rango geográfico y otros hospedadores: *Adoratopsylla (T.) i. intermedia* fue registrada por Linardi y col. (1991) parasitando *Lutreolina crassicaudata* en el Estado de Santa Catarina, en la zona del Bosque Atlántico brasileño, y por Barros-Battesti y Arzua (1997) sobre *Philander opossum* para el Estado de Paraná en Brasil. En Argentina, *A. (T.) i. intermedia* sólo se registró en tres provincias de la zona noroccidental del país: en la provincia de Tucumán parasitando *L. crassicaudata*, *Thylamys cf. cinderella*, y *Thylamys cf. sponsorius*; en la provincia de Jujuy (Calilegua y Tilcara) parasitando *Thylamys* sp. y *Phyllotis osilae* respectivamente; y en la provincia de Salta por *Lutreolina crassicaudata*, *Micoureus constantiae* y *T. cf. sponsorius* (Lareschi y col. 2005; 2010). Esta pulga también fue citada para Ecuador, Paraguay, Perú y Venezuela asociada principalmente con marsupiales Didelphinae y roedores sigmodontinae (Linardi y Guimarães 2000).

Observaciones: El género *Adoratopsylla* se limita a la región neotropical y sus miembros infestan marsupiales de la subfamilia Didelphinae. El marsupial *P. quica* representa un nuevo hospedador, y la subespecie *A. (T.) i. intermedia* se menciona por primera vez para Misiones, en el noreste de Argentina.

Análisis estadísticos

Se analizaron 447 pulgas pertenecientes a tres familias, ocho especies y subespecies que se colectaron parasitando a 108 roedores y 58 comadrejas de un total de 1153 hospedadores examinados (1043 roedores y 110 comadrejas). Estos datos se obtuvieron de 14 sitios de muestreo, los cuales fueron agrupadas en categorías para su análisis (Figura 2.2):

1) áreas selváticas: Sector Planaltense (P), Distrito de los Laureles (L), Distrito de los Helechos Arborescentes (HA), Distrito de los Palo Rosa (PR), se analizaron 173 pulgas colectadas de 113 hospedadores silvestres en ambientes de selva primaria o secundaria.

2) áreas antropizadas: **L12a**, Urbano de la ciudad de Puerto Iguazú, **L12b**, Periurbano-rural de la ciudad de Puerto Iguazú, **L13**, Entornos de selva en ambientes antropizados, **L14**, Cultivos agrícolas en ciudad Colonia Wanda, se analizaron 274 pulgas colectadas de 54 hospedadores sinantrópicos.

En las Tablas 2.3 y 2.4 se describe el número de especies, prevalencias y abundancias medias de las pulgas de acuerdo a cada hospedador y área de muestreo.

Caracterización espacial de los ensambles de pulgas

Análisis entre áreas selváticas

Considerando el total de individuos colectados en los 14 sitios, las curvas de rarefacción y extrapolación mostraron que el aumento del número de individuos en las muestras no aumentaría el número de especies o la completitud de las mismas. Las estimaciones de cobertura (completitud) de las muestras de referencia de cada conjunto fueron en el rango de 0,9702 a 1.

La riqueza de especies del conjunto de pulgas estimada entre los ambientes de selva mediante Chao1-bc fueron similares: 5,5 en los Distritos de los Laureles, de los Helechos Arborescentes y de los Palo Rosa, superiores al hallado en el Sector Planaltense donde fue de 4,50. Los índices de diversidad (Exp-H) que contemplan abundancias relativas fueron variables según el número efectivo de especies: el Distrito de los Helechos Arborescentes presentó el mayor índice 4,461 (DE=0,522). Mientras que en el Distrito de los Palo Rosa fue 3,844 (DE=0,533), y en el Distrito de los Laureles y el Sector Planaltense fue de 2.783 (DE=0,439) y 1,404 (DE=0,187), respectivamente.

El resultado de la comparación de las abundancias relativas (Horn) de las distintas especies de pulgas entre los cuatro ambientes selváticos, con un bootstrap de 1000 repeticiones,

fue un estimador de similitud de 0,7189 (DE=0,044, IC95%=0,6327-0,8050) y un promedio de similitud de pares de ensambles de 0,727. A continuación, se detallan los índices de similitud entre los distintos ambientes selváticos:

Estimador Horn	Estimación	s.e.	95% IC
Distrito Laureles / Distrito Helechos Arborescentes	0,78	0,09	(0,61, 0,95)
Distrito Laureles / Sector Planaltense	0,90	0,05	(0,80, 0,99)
Distrito Laureles / Distrito Palo Rosa	0,61	0,06	(0,49, 0,73)
Distrito Helechos Arborescentes / Sector Planaltense	0,82	0,11	(0,59, 1,00)
Distrito Helechos Arborescentes / Distrito Palo Rosa	0,57	0,09	(0,39, 0,75)
Sector Planaltense / Distrito Palo Rosa	0,71	0,09	(0,54, 0,87)

Análisis de áreas con gradiente ambiental

La riqueza de especies del conjunto de pulgas presentes en los ambientes de selva estimada mediante Chao1-bc fue de 9, superior a la encontrada en ambientes urbanos, periurbanos y entornos selváticos antropizados donde los estimadores fueron de 4,0, 3,00 y 3,00, respectivamente.

Los índices de equidad de Shannon-Wiener (Exp-H) utilizados para evaluar la diversidad de los ensambles de pulgas de los diferentes ambientes indicaron que se obtuvo una mayor equidad en los ambientes selváticos, 3,39 (DE=0,33). Mientras que en los entornos selváticos antropizados fue 2,83 (DE=0,34), y en ambiente urbano y periurbano de 1,22 (DE=0,08) y 2,18 (DE=0,16).

El resultado de la comparación de las abundancias relativas (Horn) de las distintas especies entre los cuatro ambientes, con un bootstrap de 1000 repeticiones, para los ensambles de pulgas, fue un estimador de similitud de 0,60 (DE=0,04 IC95%=0,51-0,68) y un promedio de similitud de pares de ensambles de 0,48. A continuación, se detallan los índices de similitud en el gradiente ambiental:

Estimador	Estimación	s.e.	95% IC
Horn (Selva / Urbano)	0,08	0,04	(0,01, 0,16)
Horn (Selva / Periurbano)	0,46	0,05	(0,35, 0,57)
Horn (Selva / Selva antropizada)	0,63	0,10	(0,44, 0,82)
Horn (Urbano / Periurbano)	0,83	0,05	(0,74, 0,93)
Horn (Urbano / Selva antropizada)	0,31	0,19	(0,10, 0,53)
Horn (Periurbano / Selva antropizada)	0,56	0,11	(0,34, 0,79)

Parámetros parasitológicos

Áreas selváticas

Considerando los sitios de muestreo, el Distrito de los Laureles y el Sector Planaltense presentaron mayores asociaciones pulga-hospedador. El Distrito de los Helechos Arborescentes si bien presentó similar riqueza específica (5) que los demás ambientes, fue el que obtuvo mayor índice de diversidad (Exp-H=4,46), evidenciado en la presencia de especies únicas, como por ejemplo *P. (P.) pygaerus* registrada en este único ambiente, como así también por el mayor porcentaje de infestación de la especie *P. (N.) pradoi*.

Por su parte, el Distrito de los Laureles presentó igual riqueza específica y fue el segundo sitio caracterizado con mayor índice de diversidad de especies de Shannon (H=3,844). En cuanto a los índices parasitológicos analizados exhibió valores totales más altos de pulgas (n=47; P=26,31%; AM=0,35). En este sitio, como así también en los demás, la pulga más prevalente fue *P. (P.) rimatus* (n=32; P=18,8%; AM=0,24), la cual mostró diferencias significativas en la infestación comparada con el resto de las especies registradas para este sitio (0,001; $P \leq 0,05$, Chi-square test). Mientras que la pulga *P. (P.) r. beebei* se registró solo para este ambiente y *P. (P.) platensis* fue la segunda especie más frecuente (n=9, P=3%), y la más distribuida entre los especímenes de roedores examinados (Tabla 2.3).

Si bien en el Sector Planaltense se capturó el mayor número de especímenes de roedores, la prevalencia de infestación de pulgas para este sitio fue considerablemente menor (Nr= 539; Np= 50 (9,3%)) en comparación con los demás sitios, evidenciando valores de riqueza específica y diversidad de especies Shannon bajos (Chao1-bc=4,5; Exp-H=1,40). *P. (P.) rimatus* fue la pulga más frecuente registrada parasitando 6 especies de roedores (n=61; P= 8,72%; AM=0,11).

A diferencia de los demás ambientes, en el Sector de Palos Rosa se analizaron pulgas colectadas de marsupiales. Por esta razón la riqueza y diversidad de la muestra esta influenciada por aquellas especies halladas en estos hospedadores, como se observa en la presencia de especies del género *Adoratopsylla* o la subespecie *P. (P.) r. roberti* registradas únicamente en este sitio asociadas a la comadreja *D. aurita*. Como se observó en los demás sitios, *A. montensis* fue el único roedor que registró infestaciones por pulgas, asociado a la especie *P. (P.) rimatus*. Puede mencionarse también que la prevalencia del ambiente fue alta en comparación con el resto de los sitios (P=11,4%).

Alrededor del 90,17% de las pulgas determinadas pertenecen al género *Polygenis*, asociadas a roedores sigmodontinos de ocho especies, siendo *A. montensis* el que registró mayor prevalencia en todas las áreas estudiadas (Tabla 2.3). De la misma manera, *A. montensis* fue la especie hospedadora más frecuentemente infestada por *P. (P.) rimatus* (Tabla 2.4). Esta especie de pulga fue la más prevalente, abundante, dominante (P=12,7%; AM=0,13; D=70,0%), y con mayor rango hospedatorio, registrada en la mayoría de los sitios estudiados parasitando a siete de 8 especies hospedadoras.

Por su parte, las especies *P. (P.) platensis*, *P. (N.) pradoi*, *P. (P.) r. roberti*, *P. (P.) pygaerus* registraron prevalencias en los distintos sitios de colecta que oscilaron entre 0 y 7%, parasitando alrededor de 1 a 6 especies de sigmodontinos. En contraste *P. r. beebei* fue hallado parasitando un único roedor, *T. nigrita*. Considerando las especies hospedadoras, *A. montensis* y *T. nigrita* exhibieron los mayores valores de riqueza esperada (Chao1-bc=6,5 y Chao1-bc=6, respectivamente) y diversidad de pulgas (Exp-H=1,99; Exp-H=4,19, respectivamente); además de registrar las mayores frecuencias y prevalencias de infestación de pulgas (n=111, P=10,5%; n=26, P=42%, respectivamente). En cuanto a las comadrejas, *D. aurita* fue la especie con mayor frecuencia en PNI, registrando una prevalencia de infestación de 22,2%, estimando una riqueza específica de 3 y un valor de diversidad de 3.13.

Tabla 2.3. Prevalencia y abundancia media de pulgas colectadas de roedores y marsupiales en diferentes áreas de la provincia de Misiones, Argentina

Área	Hospedadores	E	I	Adoratopsylla a. antiquorum			Adoratopsylla i. intermedia			Craneopsylla minerva minerva			Polygenis (P.) platensis			Polygenis (P.) rimatus			Polygenis (P.) roberti beebei			Polygenis (P.) roberti roberti			Polygenis (N.) pygaerus			Polygenis (N.) pradoi			Total pulgas	
				N	P	AM	N	P	AM	N	P	AM	N	P	AM	N	P	AM	N	P	AM	N	P	AM	N	P	AM	N	P	AM		N
Distrito de los Laureles	<i>Akodon montensis</i>	94	23							1	1,06%	0,01	5	2,12%	0,05	25	19,10%	0,27										2	2,12%	0,02		
	<i>Brucepattersonius</i> sp.	5	2							1	20%					1	20%	0,20														
	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	22	1										1	4,54	0,05																	
	<i>Sooretamys</i> sp.	2	1										1	50%	0,50																	
	<i>Thaptomys nigrita</i>	10	8							1	10%	0,10	2	10%	0,20	6	50%	0,60	1	10%	0,10											
Total	133	35 (26,31%)							3	2,25%	0,02	9	3,0%	0,07	32	18,8%	0,24	1	0,75%	0,01							2	1,5%	0,02		47	
Distrito de los Helechos Arborescente	<i>Akodon</i>	90	6							1	1,11%	0,01	2	2,22%	0,02	2	2,22%	0,02							1	1,1%	0,01	4	3,33%	0,04		
	<i>Brucepattersonius</i> sp.	2	0																													
	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	28	1																								2	3,57%	0,07			
	<i>Sooretamys</i> sp.	4	0																													
	<i>Thaptomys nigrita</i>	8	5							1	12,50%	0,13				7	37,50%	0,88							4	37,5	0,50	2	25%			
Total	132	12 (9,1%)							2	1,51%	0,02	2	1,51%	0,02	9	3,80%	0,07							5	3,8%	0,04	8	4,54%	0,06		26	
Sector Planaltense	<i>Akodon montensis</i>	444	39	1	0,22%											50	8,33%	0,11									1	0,22%	0,00			
	<i>Brucepattersonius</i> sp.	8	0																													
	<i>Euryoryzomys russatus</i>	16	1													1	6,25	0,06														
	<i>Nectomys squamipes</i>	3	1													1	33,3	0,33														
	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	55	6							1	1,20%	0,02				5	9,10%	0,09														
	<i>Oximycterus misionalis</i>	1	1	1	100%											2	100%	2,00														
	<i>Sooretamys</i> sp.	6	0																													
	<i>Thaptomys nigrita</i>	6	2													2	33,30%	0,33														
	Total	539	50 (9,3%)	2	0,37%					1	0,18%	0,00				61	8,72%	0,11									1	0,18%	0,00		65	

Entre áreas con gradiente ambiental

Se capturaron un total de 43 comadrejas (todas ellas identificadas como *D. albiventris*) y 24 roedores (22 *R. rattus*, 2 *M. musculus*) en el área urbana; 24 comadrejas (22 *D. albiventris*, 2 *M. dimidiata*) y 48 roedores (33 *R. rattus*, 13 *M. musculus*, 2 *A. montensis*) en el área periurbana; 5 comadrejas (4 *P. quica*, 1 *D. albiventris*) y 34 roedores (1 *R. rattus*, 9 *M. musculus*, 24 *A. montensis*) en área selvática antropizada; y 23 roedores (1 *R. rattus*, 6 *M. musculus*, 2 *A. montensis*, 1 *O. nigripes*, 13 *C. tener*) (Tabla 2.4).

De los 72 roedores examinados de áreas urbanas y periurbanas, se obtuvieron solo cinco pulgas, todas ellas identificadas como *P. (P.) rimatus*, parasitando a dos roedores *R. rattus* capturados en sitios periurbanos-rurales de transición cercanos al borde de monte. Mientras que en entornos de selva en ambientes antropizados, se capturaron 24 roedores sigmodontinos, identificados como *A. montensis*, de los cuales cuatro de ellos estaban infestados con pulgas *P. (P.) rimatus*. No se registraron infestaciones con pulgas en roedores capturados en el ambiente urbano y cultivos agrícolas (Tabla 2.4). Además, se colectaron 265 pulgas parasitando comadrejas (196 en la zona urbana, 58 en la periurbana, 11 en entornos de selva en ambientes antropizados), las cuales fueron identificadas como *C. f. felis* (87,2%), *P. (P.) rimatus* (7,9%), *A. (T.) i. intermedia* (3,02%) y *A. (A.) a. antiquorum* (1,13%), *A. (A.) a. ronnai* (0,38%).

En el área urbana, la única especie de comadreja capturada fue *D. albiventris*. Se identificaron pulgas de tres especies en este hospedador, de las cuales *A. (A.) a. ronnai* se reporta por primera vez su presencia en Argentina. En el área periurbana se capturaron dos especies de comadrejas (*D. albiventris* y *M. dimidiata*) y *C. f. felis* también fue la especie más abundante, mientras que en las áreas selváticas antropizadas se capturó *P. quica*, y un ejemplar de *D. albiventris* (Tabla 2.1).

Nueve hospedadores estaban coinfectados con más de una especie de pulga: 1 *D. albiventris* (*C. f. felis*/*A. a. antiquorum*) del área urbana y 7 *D. albiventris* (6 con *C. f. felis*/*P. (P.) rimatus*, 1 con *C. f. felis*/*A. a. antiquorum*) del área periurbana y 1 *P. quica* (*P. (P.) rimatus*/*A. i. intermedia*) del área selvática antropizada. En cuanto a los roedores, se capturaron *R. rattus* y *M. musculus* en todas las áreas, mientras que *A. montensis* sólo se capturó en áreas periurbana y selvática antropizada asociado a pulgas *P. (P.) rimatus*.

La prevalencia global y el IM en el área urbana fueron del 42% y 7, respectivamente; mientras que estos índices fueron del 25% y 3,44 en la zona periurbana y del 20,5% y 2,0 en áreas selváticas antropizadas, hallando diferencias significativas entre las áreas ($X^2=7,73$, $df=2$, p -valor=0,02). Sólo se observaron diferencias significativas en la prevalencia de *P. (P.) rimatus*

entre áreas para *D. albiventris* ($X^2=9,00$, $df=1$, $p\text{-valor}=0,001$). Del mismo modo, la prevalencia entre las especies de pulgas colectadas en *D. albiventris* fueron significativamente diferentes entre áreas, evidenciando la dominancia de *C. f. felis* ($X^2_{\text{periurbano}}=47,06/X^2_{\text{urbano}}=19,75$, $df=2$, $p\text{-valor}<0,001$). Además, la AM y la IM de todas las especies de pulgas no fueron significativamente diferentes entre áreas en *D. albiventris*. Aunque no hubo diferencias significativas en prevalencia entre las especies de hospedadores asociadas a *P. (P.) rimatus* en la zona periurbana, ($X^2=7,54$; $df=3$, $p\text{-valor}=0,056$) hubo una mayor infestación de esta especie de pulga asociada a comadrejas con respecto a los roedores examinados ($X^2=35,87$; $df=1$, $p\text{-valor}<0,001$) (Tabla 2.4).

Respecto a la prevalencia de infestación anual de todas las especies de pulgas en *D. albiventris* estratificada por áreas, fue significativamente diferente entre las estaciones del área urbana ($X^2=15,0$; $df=3$, $p\text{-valor}=0,002$), registrándose valores elevados en primavera (82,8%) y verano (44,4%), sin infestaciones en las dos restantes. A pesar de que no se observaron tales diferencias estacionales en el área periurbana ($X^2=2,71$; $df=2$, $p\text{-valor}=0,26$), la mayor prevalencia de infestación también se registró en primavera (73,7%) (Figura 2.15).

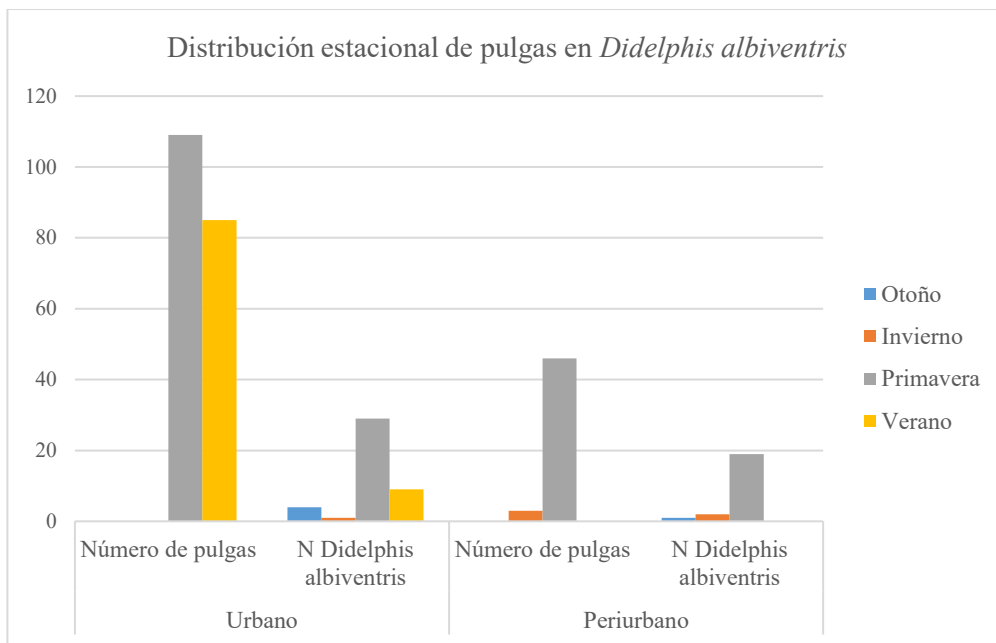


Figura 2.15. Distribución estacional de pulgas colectadas en *Didelphis albiventris* en áreas urbana y periurbana de Puerto Iguazú. Número de pulgas colectadas y N, número de comadrejas *Didelphis albiventris* capturadas por área y estación.

Tabla 2.4. Frecuencia y abundancia media de pulgas colectadas de roedores y marsupiales en la provincia de Misiones, Argentina

Área	Hospedadores	Examinados	Infestados n (%)	<i>Ctenocephalides f. felis</i>				<i>Adoratopsylla a. antiquorum</i>				<i>Adoratopsylla a. ronnai</i>				<i>Adoratopsylla i. intermedia</i>				<i>Polygenis (P.) rimatus</i>				Total pulgas
				N	AM	IM	P	N	AM	IM	P	N	AM	IM	P	N	AM	IM	P	N	AM	IM	P	
Área Urbana	<i>Mus musculus</i>	2																						
	<i>Rattus rattus</i>	22																						
	<i>Didelphis albiventris</i>	43	28 (65,1%)	189	4,40	6,75	60,50%	2	0,05	0,07	4,65%	1	0,02	0,03	2,32%					4	0,09	0,14	4,65%	
	Total área urbana	67	28 (41,79%)	189				2				1								4				
Área Periurbana	<i>Akodon montensis</i>	2																						
	<i>Mus musculus</i>	13																						
	<i>Rattus rattus</i>	33	2																	5	0,15	2,5	6,06%	
	<i>Monodelphis dimidiata</i>	2	1(50%)																	4	2,00	4	50%	
	<i>Didelphis albiventris</i>	22	15 (68,2%)	40	1,82	0,27	63,30%	1	0,05	0,07	4,54%									12	0,55	0,8	27,27%	
	Total área periurbana	72	18 (25,0%)	40				1												21				
Entornos de selva en ambientes antropizados	<i>Akodon montensis</i>	24	4 (60%)																	5	0,21	0,21	16,66%	
	<i>Mus musculus</i>	9																						
	<i>Rattus rattus</i>	1																						
	<i>Didelphis albiventris</i>	1	1 (100%)	2	2,00	2	100%																	
	<i>Philander quica</i>	4	3 (75%)												8	2,00	2	75%		1	0,25	0,25	25%	

	Total selva ambientes antropizados	39	8 (20,5%)	2	2				8		6		16			
Cultivos agrícolas	<i>Akodon montensis</i>	2														
	<i>Calomys tener</i>	13														
	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	1														
	<i>Mus musculus</i>	6														
	<i>Rattus rattus</i>	1														
	Total Cultivos	23	0										0			
Áreas protegidas	<i>Akodon</i>	94	12 (12,8%)								16	0,17	1,33	12,80%	16	
	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	6														
	<i>Brucepatersonius</i>	1														
	<i>Thaptomys nigrita</i>	7														
	<i>Mus musculus</i>	1														
	<i>Rattus rattus</i>	1														
	Total Áreas protegidas	110	12 (12,8%)									16	0,15	1,33	12,80%	16
	TOTAL	311	61	231	11,70%	3	1,43%	1	0,28%	8	2,30%	47	7,14%	290		

2.4 Discusión

Se analizaron 447 pulgas pertenecientes a tres familias, ocho especies y subespecies que se colectaron parasitando a 108 roedores y a 58 comadrejas de 1043 y 110 hospedadores examinados, respectivamente.

Además, se mencionan por primera vez para la provincia de Misiones tres especies y otras cuatro subespecies de pulgas pertenecientes a cuatro familias (Pulicidae: *C. f. felis*; Stephanocircidae: *C. m. minerva*; Rhopalopsyllidae: *P. (P.) platensis*, *P. (P.) r. beebei*, *P. (N.) pradoi*, *P. (N.) pygaerus*; Ctenophthalmidae: *A. (T.) i. intermedia*), y dos nuevos reportes para Argentina (*P. (P.) r. roberti*; *A. (A.) a. ronnai*) (Tabla 2.2). Estos hallazgos aumentan el conocimiento sobre la riqueza y diversidad de pulgas en la ecorregión de la Selva Paranaense de la Argentina. Se informa, a su vez, de veintidós nuevas asociaciones parásito/hospedador para el país, de las cuales doce ya se habían registrado para el Brasil, mientras que siete son nuevas en la ecorregión de la Mata Atlántica. A diferencia de lo esperado, no se registraron infestaciones por la pulga *T. penetrans* en animales sinantrópicos, considerando los elevados valores de infestación observados en perros y gatos de los mismos sitios de estudio.

Alrededor del 86.5% de las pulgas reportadas pertenecen a la Familia Rhopalopsyllidae, Subfamilia Rhopalopsyllinae, género *Polygenis*, asociadas a catorce especies hospedadoras. Entre ellos *A. montensis* fue el roedor más frecuente y con mayor prevalencia de infestación por pulgas, asociado principalmente a *P. (P.) rimatus* (Tabla 2.3). Sin embargo, es probable que la mayor proporción de esta especie de pulga, que representa más del 50% del total de las muestras, se deba al mayor número de *A. montensis* examinados (65%); considerado este roedor como la especie de más amplia distribución y dominante entre el ensamble de pequeños mamíferos de la Selva Paranaense (D'Elía y Pardiñas, 2015; Pardiñas y col., 2003). *Polygenis (P.) rimatus* fue también la especie de mayor distribución, observada en todos los sitios de muestreo, seguida de *P. (P.) platensis* y *P. (N.) pradoi*, respectivamente (Tabla 2.4). Considerando los sitios de colecta, los Distritos de Laureles y de los Helechos Arborescentes fueron los que mostraron mayor frecuencia de asociaciones pulga-hospedador. Esto se explica desde el punto de vista biogeográfico, a una mayor riqueza de roedores producto de un contexto de mayor heterogeneidad ambiental, debido a la intersección de las ecorregiones de Selva Paranaense y Campos y Malezales hacia el centro-sur de la provincia de Misiones, y la presencia de roedores de hábitos forestales y otros adaptados a ambientes de pastizal (D'Elía y Pardiñas, 2015; Lanzone y col., 2018).

La familia Ctenophthalmidae se encuentra bien representada en la provincia, con especímenes asociados principalmente a marsupiales. En este estudio se evidencia en la mayor proporción de pulgas colectadas del género *Adoratopsylla*, representado por tres subespecies

asociadas a comadrejas en el Sector de Palos Rosa, al norte de la provincia. Las pulgas *A. a. ronnai* y *A. a. antiquorum* fueron halladas asociadas a *D. albiventris*, En el caso de la primera representa un nuevo registro para el país, y la segunda una nueva asociación parásito-hospedador para la Argentina, debido a que esta subespecie de pulga había sido registrada previamente asociada a un roedor silvestre en el Parque Provincial Urugua-í, Misiones (Pardiñas y col., 2016).

En el caso de *P. (P.) rimatus*, se registraron infestaciones de esta pulga sobre *R. rattus* sólo en el área periurbana, vinculada a parches de bosque nativo, y sobre *D. albiventris*, predominando en el área periurbana. Estos resultados pueden asociarse con los hallazgos obtenidos en las provincias de Misiones y Buenos Aires, Argentina y en Brasil (Horta et al., 2007; Cáceres, 2012), que consideran a Rhopalosyllidae y Ctenophthalmidae como las familias con el mayor número de especies ectoparásitas sobre roedores cricétidos y marsupiales. Estos resultados ponen de relieve el movimiento de especies hospedadoras no domésticas en área urbanas, que podría estar asociado a la introducción de nuevos parásitos en los ecosistemas urbanos, como *P. (P.) rimatus* en *R. rattus*. Además, la subespecie de pulga *A. i. intermedia* sólo se registró en *P. quica*, lo que demuestra la especificidad de la asociación pulga/hospedador en consonancia con la bibliografía (Oliveira y col., 2010).

Las diferencias entre los ambientes selvático, selvático antropizado y urbano/periurbano pueden explicarse mediante los datos de riqueza de especies, las abundancias proporcionales y relativas de cada especie, y las características microclimáticas que difieren entre áreas, como se detalla en la metodología. Los índices de Shannon-Wiener expresan los diferentes valores de diversidad de especies de pulgas de cada área, siendo comparativamente mayores en el ambiente selvático, como es de esperar teniendo en cuenta la mayor equitatividad entre las especies de pulgas mostrada en estos ambientes, dada por una alta proporción de especies raras representadas por un bajo número de individuos. A su vez el índice de Horn da una medida del alto nivel de similitud entre las áreas urbana/periurbana, que, a pesar de compartir la mayoría de las especies de pulgas, muestran abundancias relativas diferentes, con pocos individuos por especie colectados en el área urbana y más individuos por especie en el área periurbana.

En los entornos antropogénicos en los que la fauna silvestre y los animales domésticos comparten el hábitat, se esperan coinfecciones con más de una especie de pulga asociada a diferentes ambientes (Figura 2.16). En este estudio, se registraron 7 coinfecciones en *D. albiventris* y 1 en *P. quica* en el área periurbana donde se encontró la mayor riqueza de hospedadores y pulgas, mientras que sólo 1 *D. albiventris* del área urbana estaba coinfectada con más de una especie de pulga (*C. f. felis/A. a. antiquorum*). Este escenario también fue informado por Bezerra y col. (2020), donde la alta frecuencia de *C. f. felis* en las comadrejas de *D. aurita* capturadas en áreas urbanas del estado de Minas Gerais, sugiere que la circulación de las pulgas

entre los ambientes silvestres y urbanos desempeñan un rol importante en el ciclo de los patógenos zoonóticos que involucran a las comadrejas, a los animales de compañía, domésticos y a humanos. En este sentido, debido al comportamiento polixeno de *C. f. felis*, con capacidad de infestar a una amplia variedad de fauna silvestre y de hospedadores domésticos, su presencia en las comadrejas sinantrópicas no es accidental y podría estar asociada a los cambios antropogénicos derivados de la creciente urbanización (Dobler y Pfeffer, 2011; Hassell y col., 2021).

En este estudio, *R. rattus* (43,4%) fue la especie sinantrópica más abundante en el área periurbana, mientras que *D. albiventris* fue especie sinantrópica más abundante capturada en el área urbana y la comadreja más abundante en el área periurbana (78,6%); *P. quica*, *M. dimidiata* y *A. montensis* se limitaron al área periurbana, capturados en sitios adyacentes a parches de bosque nativo. El aumento de la deforestación ha provocado que algunas especies de comadrejas y roedores se adapten a la fragmentación del hábitat (Cáceres, 2012) y al ambiente urbano adquiriendo hábitos sinantrópicos en respuesta a las presiones de comportamiento y selección en función de los recursos disponibles, favorecidos por su dieta omnívora (Hassell et al., 2017). En cuanto a los índices AM y P de *C. f. felis*, se observaron valores elevados en *D. albiventris* tanto en áreas urbanas como periurbanas, aunque no se encontraron diferencias significativas entre las áreas para estos parámetros, lo que fue coherente con las conclusiones abordadas por Werner y Nunn, (2020). Además, el predominio de esta especie de pulga sobre las demás se evidenció en *D. albiventris*, mientras que *P. quica* y *M. dimidiata* no registraron infestaciones por *C. f. felis*.

Los marsupiales neotropicales presentan una variación estacional de la densidad poblacional como consecuencia de una estación reproductiva definida. En general, este periodo reproductivo se extiende desde el final de la estación seca hasta el final de la estación húmeda, cuando se observan las mayores densidades de individuos destetados (Cáceres, 2012). En este sentido, los resultados del análisis estacional sugieren que los valores de infestación de pulgas en *D. albiventris* durante las estaciones de primavera y verano, podrían estar asociados al mayor número de individuos capturados, considerando que se trata de un período reproductivo donde la el movimiento, la dispersión, la tasa de contacto entre las comadrejas, y la activa búsqueda de recursos alimenticios aumentan considerablemente.

Cabe remarcar, en el caso del área urbana, y en continuidad con el área periurbana, la disponibilidad de alimentos como frutos y restos de desechos de consumo humano, en un área de distribución compartido con animales domésticos y de compañía generan ambientes de exposición a diversas infecciones parasitarias (Bezerra-Santos y col., 2021) como se observa en las altas abundancias de *C. f. felis* registradas en este estudio. Concluimos que una mayor densidad de población de comadrejas debido a la disminución de sus áreas de distribución, junto con el aumento de las interacciones entre la fauna silvestre, los animales de compañía, domésticos y los

humanos, facilitaría el mantenimiento y la transmisión de las pulgas y las bacterias transmitidas por éstas, promoviendo así la aparición de zoonosis (Figura 2.16).

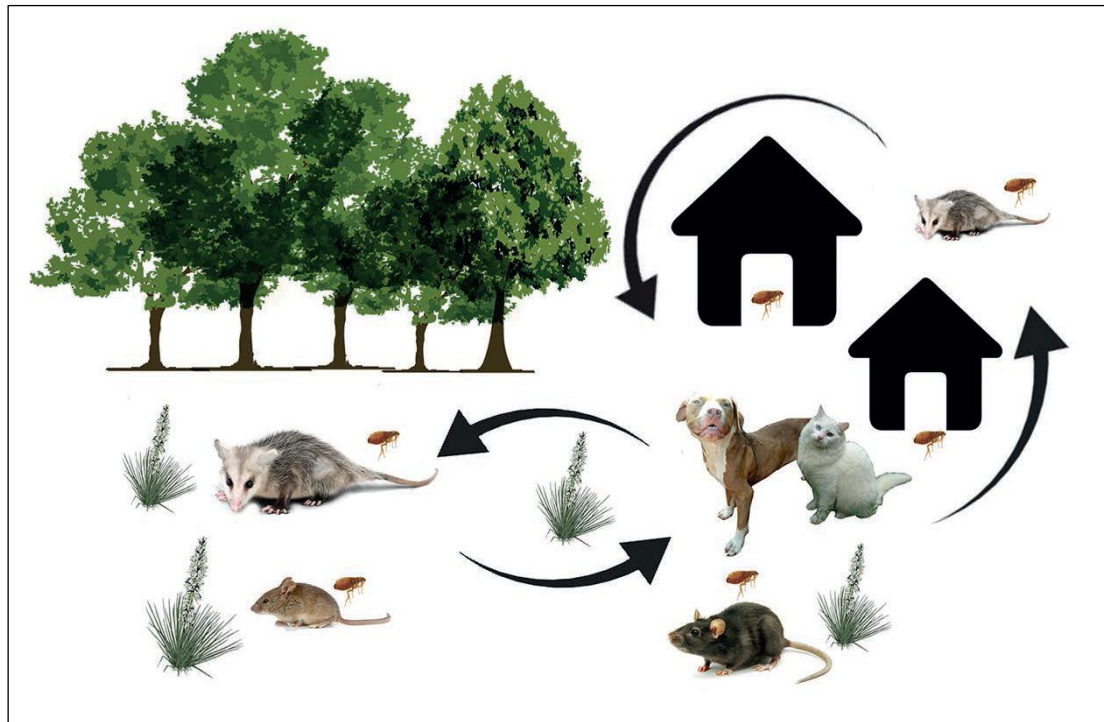


Figura 2.16. Aquí se grafica la importancia de los marsupiales y los roedores en la integración de los ciclos de transmisión sinantrópica y doméstica de las pulgas y potenciales patógenos.

En el caso de las pulgas *Polygenis*, estas pueden desempeñar un papel fundamental en el mantenimiento de los patógenos entre los roedores silvestres (Abbot y col., 2007; Buffet y col., 2013; Linardi y col., 2017; Melis y col., 2020). El intercambio entre las pulgas de pequeños mamíferos silvestres y sinantrópicos es un parámetro importante en los estudios epidemiológicos, ya que los humanos pueden ser picados por una pulga infectada. Los estudios sobre marsupiales y roedores silvestres y sinantrópicos de los Estados de Paraná y Santa Catarina en el Brasil, muestran que algunas especies de las familias Rhopalopsyllidae y Stephanocircidae, como *P. (N.) pradoi*, *P. (P.) rimatus* y *C. m. minerva*, se encuentran frecuentemente en simpatria con las pulgas de la Familia Pulicidae (*C. f. felis* y *Pulex irritans*) (Linardi y col., 1991; Carvalho y col., 2001).

La perturbación antropogénica favorece varias condiciones que conducen a la propagación de enfermedades transmitidas por las pulgas, a saber, niveles de infestación más altos, mayor abundancia de pulgas, por una mayor utilización de los hospederos. Dado que el área de estudio incluye sitios de diferentes perturbaciones antropogénicas (periurbanos, agrícolas y áreas forestales protegidas) que están en estrecho contacto, se debe considerar la propagación del patógeno y/o el derrame entre paisajes adyacentes para evaluar los riesgos de transmisión de enfermedades. Dada la magnitud de la biodiversidad de la Selva Paranaense, la dinámica y presión

de cambios de uso de la tierra, la contigüidad de paisajes socio-ambientales diferentes, las tendencias climáticas, que pueden modificar la riqueza de especies y los perfiles de dispersión, con el consiguiente riesgo de cambios en el patrón de transmisión de patógeno (Friggens y Beirer 2010), los resultados obtenidos sugieren la necesidad de realizar estudios longitudinales. Por otra parte, la información obtenida en este capítulo permite ampliar el conocimiento sobre los ectoparásitos de mamíferos y de biodiversidad de la provincia de Misiones, esencial para los estudios zoonóticos y así también, para contribuir al desarrollo de estrategias de prevención para el escudo epidemiológico nacional en el área del trifuinio con Brasil y Paraguay.

CAPÍTULO 3: ECO-EPIDEMIOLOGÍA DE LAS PULGAS ASOCIADAS A ANIMALES DE COMPAÑÍA Y HUMANOS

3.1 Introducción

Hasta la actualidad, las enfermedades parasitarias siguen causando un grave problema sanitario en las poblaciones animales y humanas de las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo. Además, el impacto de algunas enfermedades es desproporcionadamente desigual por las condiciones de vida de las poblaciones que suelen favorecer la exposición a determinados parásitos, cuya transmisión puede estar asociada a condiciones habitacionales y sanitarias deficientes, así como a las desigualdades en el acceso a la educación y a los servicios sanitarios primarios (Dantas-Torres y Otranto, 2014).

En Argentina, los perros y los gatos son hospedadores de un gran número de ectoparásitos, como pulgas, piojos y garrapatas. De hecho, especies de pulgas como *Ctenocephalides canis*, *Ctenocephalides felis felis*, y *Tunga penetrans* infestan a una gran variedad de especies hospedadoras, incluyendo a los humanos, animales domésticos, así como comadrejas y roedores sinantrópicos (Lareschi y col., 2018; Sánchez y col., 2018). A su vez, la distribución y prevalencia de infestación de estas pulgas a nivel local pueden variar según las condiciones climáticas y el grado de urbanización de cada zona o región.

Un particular tipo de parasitismo lo comprende la tungiasis, una ectoparasitosis zoonótica, causada por la pulga *T. penetrans*. Esta enfermedad se constituye como un problema sanitario en los trópicos y subtropicos, profundizado por las condiciones sociales, económicas, políticas, y ambientales de las comunidades en los países de América Latina, el Caribe y el África subsahariana (Heukelbach y col., 2001; Eisele y col., 2003). Las pulgas de este género son endémicas de América del Sur, y se las conoce con distintos nombres según la región, *pique* en Argentina, *bicho do pé* o *pulga da areia* en Brasil, *nigua* en Costa Rica, Colombia, Ecuador, entre otros.

Esta dolorosa enfermedad parasitaria no es exclusiva de los humanos, sino que también afecta a un amplio rango de animales silvestres, domésticos y de compañía (Harvey y col., 2021). La afección está asociada a una considerable morbilidad aguda y crónica, en el primer caso está directamente relacionado con el número de pulgas hembras incrustadas. La sintomatología de la tungiasis puede provocar dolor, edema, prurito, inflamación, absceso/supuración, cojera,

hiperqueratosis, miasis secundaria, infección bacteriana y amputación de falanges (Kehr y col., 2007).

Múltiples estudios realizados a lo largo de todo el territorio de Brasil evidencian altas incidencias en humanos y animales domésticos asociadas a áreas desfavorecidas con un alto índice de vulnerabilidad social y malas condiciones sanitarias (Harvey y col., 2021). Sumado a que no existen datos eco-epidemiológicos sobre esta ectoparasitosis en Paraguay ni tampoco en Argentina que puedan estimar su importancia sanitaria y desarrollar las intervenciones correspondientes.

La ciudad de Puerto Iguazú se configura como un paisaje heterogéneo, fundada por contrastadas desigualdades en la construcción social del hábitat. La ausencia de planificación territorial, profundizada por grandes falencias en los servicios básicos de agua, electricidad y red cloacal configura sectores de la población con un alto índice de Necesidades Básicas Insatisfechas (NBI) en una situación de precariedad y/o de exclusión en un entorno de degradación ambiental, que contradice los discursos ecológicos legitimados por el turismo (Núñez, 2009). Estas son algunas de las razones por las que numerosos barrios se encuentran en riesgo epidemiológico.

En este marco socio-ambiental, el capítulo 3 de esta tesis está subdividido en dos apartados, considerando las especificidades metodológicas y analíticas, las discusiones se abordarán por separado: en el 3.3 se investigó la prevalencia, abundancia e intensidad de las especies de pulgas que parasitan perros y gatos domésticos en áreas urbana y periurbana de Puerto Iguazú. Además, se evaluaron los factores ambientales y climáticos sobre el parasitismo de los animales de compañía y se determinó los factores de riesgo de infestación. Complementariamente, en el apartado 3.4 se analizó los conocimientos, actitudes y percepciones de los habitantes de los barrios de Puerto Iguazú, respecto a la tungiasis y su asociación con las prácticas de cuidado y prevención, y efectividad de las mismas.

3.2 Diseño metodológico

Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en el ecosistema urbano de la ciudad de Puerto Iguazú, situada en el trifujo noroeste de la provincia de Misiones, en el noreste de Argentina (Figura 3.1). Las áreas de muestreo fueron seleccionadas en base a características microambientales y socioeconómicas asociadas al tipo de actividad productiva (Furlan y col., 2015, ver descripción detallada en cap. 2):

1) Área urbana situadas entre las coordenadas 25°37'S y 54°34'O y circunscripta a las calles Jujuy, Av. Su Santidad Papa Francisco y Av. Libertad, alberga los barrios: B° Primavera, B° Santa Rita, B° Los Trabajadores, B° Unión, B° Los Cedros, B° Las Leñas. Los sitios del área urbana comprenden un distrito densamente poblado, de aproximadamente 20 viviendas por manzana donde predominan casas bajas y calles empedradas o no asfaltadas. Con excepción del B° Las Leñas (IPRODHA), el único de calles asfaltadas. La vegetación se caracteriza por arbustos y árboles leñosos distribuidos alrededor de las edificaciones (principalmente mango, palta, higuera), suelos de tierra desnuda y abundante hojarasca. Ninguno de los barrios posee servicio de red cloacal, recurriendo a pozos negros o zanjas para la eliminación de efluentes. La red de agua potable no garantiza la distribución continua del suministro, recurriendo a pozos artesanales para la extracción de agua.

2) Área periurbana situado entre las coordenadas 25°38'S 54°34'O y 25°40'S 54°32', comprende el Barrio 2000 hectáreas (Zona de usos múltiples). Caracterizada por ser un territorio de interfase entre el ambiente forestal protegido y el urbano, ubicado en la periferia de la ciudad y donde se genera un mosaico de explotaciones agropecuarias de tipo primario-intensivo, con menores densidades de población, predios de 600 a 30000 m², con agricultura principalmente de subsistencia, ganadería de pequeña escala y menor acceso a los servicios básicos. Las calles no son asfaltadas, dificultando el tránsito vehicular.

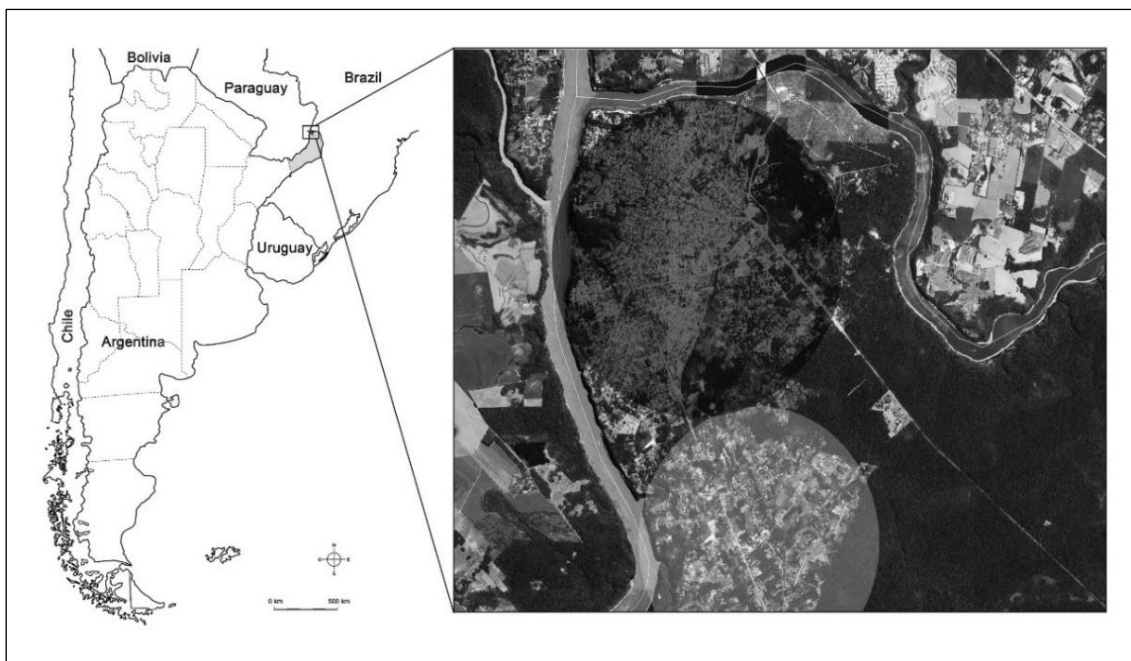


Figura 3.1. Mapa de la ciudad de Puerto Iguazú indicando las dos áreas de estudio (en gris oscuro el área urbana/ en gris claro el área periurbana), ubicada en el tríplice punto noroeste de la provincia de Misiones, noreste de Argentina. La ciudad limita con la República Federativa de Brasil y la República de Paraguay, y con dos áreas naturales protegidas.

Se llevó a cabo un estudio longitudinal con muestreos estacionales: invierno (julio, agosto y septiembre), primavera (octubre, noviembre y diciembre), verano (enero, febrero y marzo) y otoño (abril, mayo y junio), durante marzo de 2017 y febrero de 2018.

En total fueron seleccionadas 114 viviendas en áreas urbanas (39) y periurbana (75), de Puerto Iguazú. Para el cálculo de la muestra se utilizó el software Epi. Info 3.5.1. para un nivel de confianza del 95% y un grado de precisión estadística que corresponde a un margen de error permitido entre el 5 y el 10%.

Para la selección de los sitios y el tamaño de la muestra se tuvo en cuenta el total de manzanas (n=62) y los siguientes parámetros:

- 15% del total de manzanas por barrio
- 40% del total de viviendas por manzana (=20 casas)

B° Primavera → 15% del total de 9 manzanas = $1,35 \times 8$ (40% del total de viviendas por manzana) = 11 viviendas

B° Santa Rita → 15% del total de 7 manzanas = $1,05 \times 8$ (40% del total de viviendas por manzana) = 8 viviendas

B° Los Trabajadores → 15% del total de 9 manzanas = $1,35 \times 8$ (40% del total de viviendas por manzana) = 11 viviendas

B° Unión → 15% del total de 14 manzanas = $2,1 \times 8$ (40% del total de viviendas por manzana) = 17 viviendas

B° Los Cedros → 15% del total de 7 manzanas = $1,05 \times 8$ (40% del total de viviendas por manzana) = 8 viviendas

B° Las Leñas → 15% del total de 17 manzanas = $2,55 \times 8$ (40% del total de viviendas por manzana) = 20 viviendas

B° 2000 ha → 15% del total de 260 viviendas = 39 viviendas

- **Bloque 1** (Calle Libertad) = → 15% del total de 78 viviendas = 12
- **Bloque 2** (Salto turista) = 15% del total de 51 viviendas = 8
- **Bloque 3** (Izq de calle Libertad) = 15% del total de 48 viviendas = 7
- **Bloque 4** (Límite PPPP I Izq) = 15% del total de 35 viviendas = 5
- **Bloque 5** (Límite PPPP II Der) = 15% del total de 44 viviendas = 7

3.3 Factores condicionantes del parasitismo de las pulgas en perros y gatos

3.3.1 Metodología

Obtención de pulgas

Todos los perros y gatos que se hallaban en la vivienda al momento del muestreo fueron inspeccionados para la colecta de pulgas, previa autorización del responsable quien fue informado sobre el objetivo de estudio (Figura 3.2). Durante la inspección, los animales se sujetaron mecánicamente. Para los perros se utilizó bozal protector, y se examinó minuciosamente toda la superficie corporal del animal, separando el pelo utilizando pinzas y algodón con alcohol durante seis minutos, según la Guía general de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2008).

Las pulgas colectadas se colocaron en tubos con etanol al 96% y depositaron a -20°C en el Instituto Nacional de Medicina Tropical (INMeT) de Puerto Iguazú hasta la realización de los análisis moleculares en los laboratorios de Biología Molecular del Instituto Nacional de Medicina Tropical (INMeT), de la ciudad de Puerto Iguazú y del Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE) de la ciudad de La Plata, Buenos Aires.





Figura 3.2. Revisión de animales de compañía en sitios urbanos y periurbanos de Puerto Iguazú.

Determinación taxonómica

En un primer paso, las pulgas se examinaron utilizando un microscopio binocular estereoscópico. Los especímenes identificados a nivel de especie se analizaron mediante pools para la extracción de ADN. Para los especímenes que necesitaban la observación de estructuras internas específicas para la identificación taxonómica a nivel de especie, primero se extrajo el ADN mediante un método no destructivo (ver detalles en capítulo 4), y luego se prepararon para la identificación en el microscopio óptico (Carl Zeiss, Axiostar plus 176045 USA). Para ello, las pulgas se aclararon con KOH, se deshidrataron con una serie creciente de etanol (del 80 al 100%), se diafanizaron con eugenol y se montaron con bálsamo de Canadá. Para la identificación taxonómica se siguieron las claves y descripciones presentadas por Hopkins y Rothschild, (1953, 1956, 1966), Johnson (1957), Smit, (1987), Linardi y Guimarães (2000). Los ejemplares representativos de cada especie de pulga serán depositados en la Colección de Entomología del Museo de La Plata, Argentina.

Parámetros parasitológicos de las pulgas

El grado de infestación de cada animal se determinó según Costa-Junior (2012): sin infestación; baja (1-3 pulgas); media (4-10 pulgas); alta (> 10 pulgas). Se calculó la intensidad

media (IM = número de individuos de una especie de pulga/número de hospedadores infestados por esa especie de pulga), la abundancia media (AM = número de ejemplares de una especie de pulga/número de hospedadores examinados), la prevalencia (P = número de ejemplares de hospedadores parasitados por una especie de pulga/número de hospedadores examinados*100) de las pulgas por área, especie hospedadora y estación, con las pruebas Chi-cuadrado y Bootstrap-t (número de réplicas bootstrap=2000) utilizando el software estadístico Quantitative Parasitology 3.0 (Reiczigel y Rózsa, 2005).

Relevamiento epidemiológico

Se aplicó un cuestionario semiestructurado a las personas responsables de los animales de compañía, replicado cuatro veces durante cada muestreo estacional, con el fin de identificar posibles factores de riesgo de infestación. La repetición de este cuestionario permitió observar la coherencia en las respuestas de quienes accedieron a la entrevista, ante las preguntas sistematizadas. La selección de las variables utilizadas se concatena con los trabajos de Christodouloupoulos y col., (2006) y Harvey y col., (2017), con el fin de determinar los factores de riesgo de infestación: I) variables asociadas al hospedador: sexo (macho/hembra), edad (animales de 3 a 12 meses de edad se consideraron juveniles/animales mayores a 12 meses de edad se consideraron adultos), colocación de antiparasitario externo en el último mes, permanencia (restricción parcial/total del animal al salir de los límites de la vivienda sin supervisión); II) Variables asociadas a factores del ambiente: tipo de área (urbana, periurbana), vegetación (rangos de cobertura vegetal del peridomicilio: 0%, 1-50%, 50-100%), tipo de suelo alrededor de la vivienda (cemento-pasto/tierra), fumigación del peridomicilio. Los sitios de muestreo fueron geo-referenciados y se realizó una descripción edafológica y ambiental de un área buffer de 20 metros alrededor del peridomicilio.

Para el registro de la tungiasis se realizó la inspección de las lesiones según la “Clasificación de Fortaleza” de Eisele y col., (2003), descrita en la introducción de este capítulo. A través de la observación directa se relevaron los tipos de lesiones, individuales o grupales, manipuladas por el perro o su responsable, las localizaciones y los estadios (I, II y III consideradas lesiones vitales, y los estadios IV y V lesiones muertas). También se observaron signos clínicos, comportamentales de los animales infestados, y las prácticas de cuidado y/o manejo de la tungiasis.

Modelo de parasitismo en animales de compañía

Con el objetivo de obtener resultados con mayor confianza y verosimilitud en relación al número de variables analizadas, se consideraron las especies de pulgas dominantes, *C. f. felis* y *T. penetrans*, colectadas sobre los perros y gatos examinados para la construcción de modelos y

analizadas por separado. Se registraron los factores de riesgo de los perros y gatos asociados a la infestación por pulgas, consideraron tres grupos de variables: I) Variables asociadas al hospedador: sexo, edad, colocación de antiparasitario externo en el último mes, permanencia; II) Variables asociadas a factores del ambiente: tipo de área, vegetación, tipo de suelo peridomiciliario, fumigación del peridomicilio; III) Variables climáticas: temperatura máxima semanal (calculada como el promedio de la temperatura máxima de la semana); temperatura mínima semanal (promedio de las temperaturas mínimas de una semana); temperatura media (temperatura promedio semanal registrada); humedad relativa máxima semanal (es el promedio semanal de la humedad relativa máxima registrada); humedad relativa mínima semanal (es el promedio semanal de la humedad relativa mínima registrada); humedad relativa media semanal (es el promedio semanal de la humedad relativa media registrada).

Las variables climáticas se calcularon para las cuatro semanas previas (7, 14, 21 y 28 días) al momento del muestreo, desde s-1 (una semana previa) hasta s-4 (cuatro semanas previas). La selección de lags temporales de hasta s-4 se realizó teniendo en cuenta los ciclos de vida de las pulgas (huevo-adulto) y cohortes acumulativas. Se calcularon correlaciones de Pearson para todas las variables climáticas semanales, y entre estas variables y los promedios entre máximas y mínimas. Las altas correlaciones entre máximas y mínimas, y entre estas y sus promedios, justifican la selección de estas últimas para la construcción de los modelos (Figura 3.3, Tabla 3.1 en Anexo 1).

Para la detección de asociaciones entre la presencia/pseudoausencia de pulgas y las variables explicativas, se construyó un modelo lineal generalizado (GLM) global de respuesta binomial y función de enlace logit. Este incluyó todas las variables explicativas del hospedador y las interacciones de interés, y se simplificó eliminando términos paso a paso mediante el comando stepAIC, utilizando el paquete MASS (Venables y Ripley, 2002) sobre la plataforma de R 3.4.1 (R Core Team, 2017). Según los criterios de máxima verosimilitud y parsimonia, la selección de parámetros paso a paso se basó en el Criterio de Información de Akaike (AIC), removiendo las variables cuya eliminación no provocó un aumento del AIC del modelo de más de dos unidades (Burnham y Anderson, 2002). Para los modelos de parasitismo en gatos se utilizó AIC corregido por tamaño muestral bajo (AICc), ya que se recomienda cuando la razón $n/k < 40$, en este caso, el número de observaciones es 87 y el número de parámetros supera los 4. El GLM global fue el siguiente:

$$\text{perros_positivos} \sim \text{sexo} + \text{edad} * \text{antiparasitario} * \text{permanencia}, \text{familia} = \text{binomial}$$

Se calcularon los factores de inflación de las varianzas (VIF) usando el paquete *car* (Fox y Weisberg, 2011). Valores de VIF mayores a seis fueron considerados determinantes para la remoción de variables explicativas altamente correlacionadas.

Además, se incorporó el factor aleatorio “vivienda” al modelo global para controlar el error que pudiera estar aportando las observaciones tomadas de animales de la misma vivienda. Para la construcción del modelo lineal generalizado mixto (GLMM) de respuesta binomial se utilizó el comando *glmer* del paquete *lme4* de R. El GLMM global fue el siguiente:

$$\text{perros_positivos} \sim \text{sexo} + \text{edad} * \text{antiparasitario} * \text{permanencia} + (1 | \text{vivienda}), \text{familia} = \text{binomial}$$

Como en el anterior, este modelo se simplificó paso a paso eliminando variables hasta obtener el de menor AIC. Finalmente, ambos modelos (GLM-GLMM) fueron comparados y se optó el de mayor ajuste para la continuación de los análisis.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se confeccionaron sets de GLMM de respuesta binomial para la detección de asociaciones entre la presencia/pseudoausencia de pulgas en perros y gatos y las variables explicativas de hospedador, de ambiente y climáticas, los cuales se simplificaron para la obtención del modelo más verosímil y parsimonioso de cada set.

Por otro lado, se construyeron modelos para evaluar asociaciones entre la carga parasitaria por *C. f. felis* y las variables predictoras. Se observó la frecuencia de las observaciones mediante histogramas (Figura 3.5), y considerando la distribución de los datos de conteos de pulgas en perros y gatos, se planteó un GLMM inicial global con distribución de Poisson y variables explicativas del hospedador. A su vez, se incorporó un offset de números de perros que conviven en la misma casa, permitiendo tener en cuenta diferencias en el esfuerzo de muestreo o en la tasa de exposición de cada observación:

$$\text{perros_conteo} \sim \text{sexo} + \text{edad} * \text{antiparasitario} * \text{permanencia} + \text{offset} (\log (\text{perros} \times \text{casa})) + (1 | \text{vivienda}), \text{familia} = \text{Poisson}$$

Se calculó la discrepancia de Pearson para evaluar la sobredispersión del modelo global con respuesta Poisson, el cual presentó un valor elevado y por lo tanto sobredispersión de los datos. Por consiguiente, se confeccionó un GLMM global con las mismas variables y respuesta binomial negativa para modelar dicha sobredispersión. La selección de los modelos finales se realizó mediante una simplificación paso a paso de los términos utilizando AIC y AICc. Las variables que no causaron una reducción de al menos dos unidades del AIC del modelo se eliminaron (Burnham y Anderson, 2002). Este mismo procedimiento se llevó a cabo para la selección de los modelos de conteos de pulgas con variables explicativas del ambiente y climáticas.

3.3.2 Resultados

Parámetros parasitológicos

Se examinaron 238 perros y 48 gatos de 75 viviendas urbanas, y 164 perros y 39 gatos de 40 viviendas periurbanas. Se colectaron 1030 pulgas en perros (IM=5,42; AM=4,33; P=79,8%) y 81 en gatos (IM=2,19; AM=1,69; P=77,1%) en el área urbana, y se colectaron 745 pulgas en perros (IM=5,14; AM=4,54; P=88,4%) y 76 en gatos (IM=2,92; AM=1,95; P=66,7%) en el área periurbana (Tabla 3.2). Todas estas identificadas como *C. f. felis*. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en los índices IM y AM entre áreas, mientras que las diferencias en estos índices entre gatos y perros fueron significativas en ambas áreas (área urbana: IM: $t=-7,16$; valor $p<0,001$; AM: valor $p<0,001$; área periurbana: IM: $t=-5,19$; p -valor $<0,001$; MA: p -valor $<0,001$). Sólo se registraron niveles de infestación de más de 12 pulgas en los perros (rango 0-30). La prevalencia de la infestación se asoció significativamente con la estacionalidad ($X^2=24,21$; $df=3$, $P<0,001$), en perros fue significativamente diferente entre áreas ($X^2=5,15$; $df=1$, p -value=0,02), con el valor más alto en el área periurbana. Por el contrario, los gatos no presentaron diferencias significativas en la prevalencia entre áreas ($X^2=1,17$; $df=1$, valor $p=0,28$). Además, la prevalencia entre perros y gatos en el área urbana no fue diferente ($X^2=0,18$; $df=1$, valor $p=0,67$), aunque sí en la periurbana ($X^2=11,22$; $df=1$, valor $p=0,001$).

Se colectaron y observaron infestaciones por *T. penetrans* en 195 (48,5%) perros y 29 gatos (33,33%); registrándose para ambos hospedadores mayores valores de prevalencia en el área periurbana ($X^2_{perros}=57,82$; $df=1$, p -valor $<0,0001$, $P=71,34\%$; $X^2_{gatos}=20,91$; $df=1$, p -valor $<0,001$, $P=58,97\%$). De los animales infestados por *pique*, 87 (49,7%) perros y 21 (37,5%) gatos eran hembras, y 103 (47,0%) perros y 8 (25,8%) gatos eran machos, 143 (47,82%) perros y 19 (37,25%) gatos tenían más de un año de edad, 121 (62,06%) perros se mantenían en régimen de semirestricción, presentando diferencias significativas entre áreas ($X^2=81,12$; $df=1$, p -valor $<0,001$, 23,1% en urbano, 88,1% en periurbano).

Tabla 3.2. Frecuencia (n), intensidad media (IM), abundancia media (AM) y prevalencia (P) de pulgas *Ctenocephalides felis felis* en perros y gatos de áreas urbanas y periurbanas de Puerto Iguazú, Misiones.

Áreas	Viviendas	Perros	Gatos	<i>C. f. felis</i> en perros			<i>C. f. felis</i> en gatos				
		n	n	n	IM	AM	P	n	IM	AM	P
Urbano	75	238	48	1030	5,42	4,33	79,8%	81	2,19	1,69	77,1%
Periurbano	40	164	39	745	5,14	4,54	88,4%	76	2,92	1,95	66,7%
Total	115	402	87	1775				157			

Registro cualitativo del parasitismo en animales de compañía

Los perros infestados por *T. penetrans* presentaron lesiones en las almohadillas de tipo activas, avitales y/o intervenidas. Entre los signos clínicos agudos y crónicos de la tungiasis se observó: edema, erosión, inflamación, absceso/supuración, miasis secundaria, renguera, hiperqueratosis, amputación de falanges (Figura 3.4).

Entre los trastornos de comportamiento (19,4%) se registraron lamido excesivo, renguera, desobediencia a las órdenes y postración en perros infestados. Entre las prácticas habituales para eliminar los parásitos se sumerge las patas infestadas en querosén, nafta, gasoil o aceite negro. Los métodos de extracción mecánica eran variados, generalmente se extraía la pulga neosómica entera o no, utilizando instrumentos punzantes como agujas, alfileres, espinas de cítricos, los cuales dejaban una llaga en forma de cráter en la piel, pudiéndose aplicar luego cal, ceniza, aerosol organofosforado a la herida. En ocasiones, los huevos junto al neosoma se les rociaba alcohol para quemarlos. En otros casos, los tutores no generaban prácticas para retirar los *piques* de sus animales infestados, y estos mismos se los extraían con la mordida. En un 62,5% de los casos las personas recurrían a la utilización de productos para la eliminación de los parásitos del animal y del ambiente, entre los principales utilizados se administra insecticidas o ectoparasiticidas (40%), ivermectina inyectable (28,3%), jabones blancos (10%), pipetas (6,7%), macerado naturales con plantas nativas (6,7%).

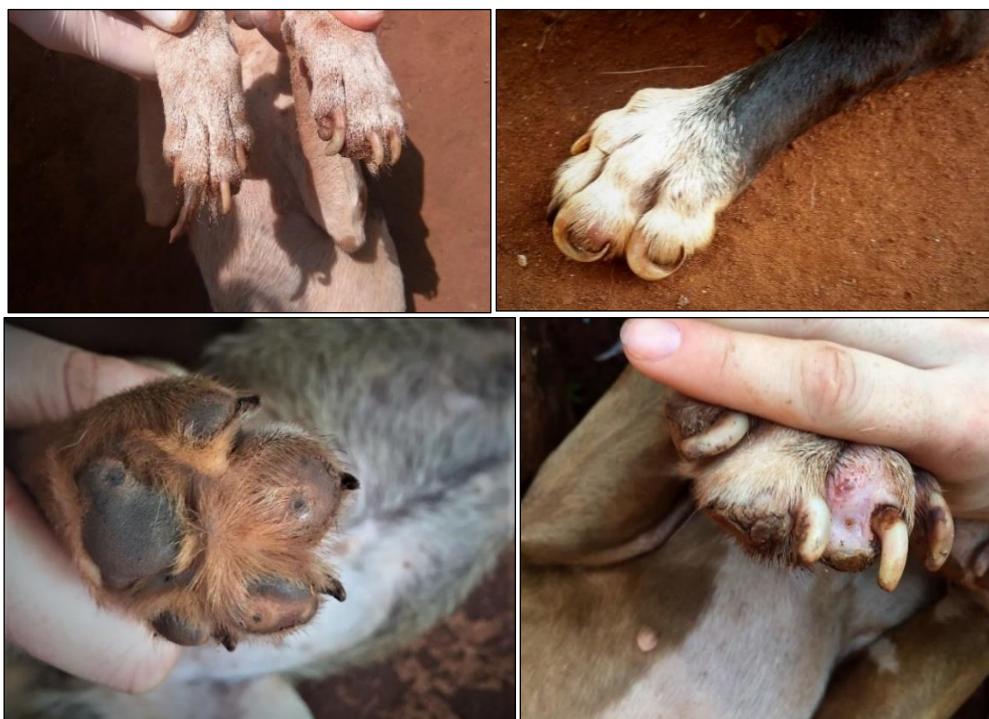




Figura 3.4. Perros infestados por *Tunga penetrans* con diferentes tipos de lesiones.

Modelos de parasitismo en animales de compañía

Los conteos de parásitos generalmente poseen una distribución agregada (usualmente Poisson), con pocos hospedadores albergando altas cargas parasitarias, mientras que las mayores frecuencias corresponden a individuos con bajas cargas. En esta sección, al tratarse de conteos de ectoparásitos sobre hospedadores, fue esperable que la distribución de los datos no correspondiera a una distribución normal (Figura 3.5), por lo que se modelaron funciones no lineales de la media para el análisis estadístico de asociaciones.

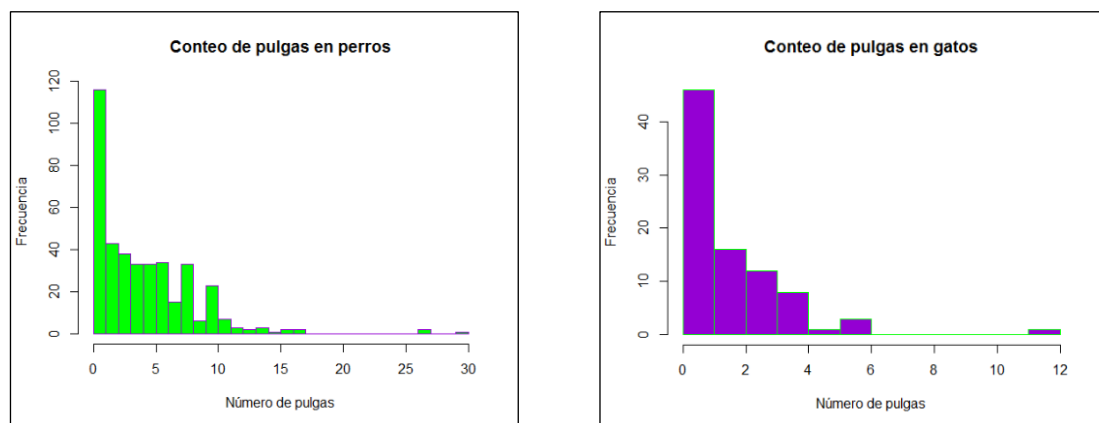


Figura 3.5. Distribución de los datos de a) *Ctenocephalides felis felis* colectadas en perros, b) *C. f. felis* colectadas en gatos, en áreas urbanas y periurbanas de Puerto Iguazú 2017-2018.

➤ *Parasitismo de Ctenocephalides felis felis en perros*

Todos los VIF de las variables explicativas del GLM global de respuesta binomial con **variables del hospedador** fueron menores a tres, por lo cual se retuvieron en el modelo para la simplificación. La remoción de términos paso a paso dio como resultado el siguiente modelo:

$perros_positivos \sim edad + antiparasitario + permanencia + edad: permanencia,$
familia=binomial

Para el caso de GLMM global, el modelo con menor AIC fue el siguiente:

$perros_positivos \sim edad + antiparasitario + permanencia + edad: permanencia + (1|vivienda),$
familia=binomial

El Δ AIC entre el GLM y el GLMM fue de 22,34, por lo tanto, como se menciona en la descripción de la metodología, se define la incorporación del factor aleatorio “vivienda” a todos los modelos subsiguientes.

Los resultados del GLMM arrojaron estimaciones de los parámetros no significativas, por lo cual, se continuó la simplificación teniendo en cuenta los p valor de cada estimación, eliminando aquellos con $p > 0,05$. El resultado para el modelo con variable predictoras del hospedador fue el siguiente:

$perros_positivos \sim edad + antiparasitario + (1|vivienda), familia=binomial$

Parámetro	Coefficiente	p valor	Exponencial
edad	1,1	< 0,01	3,01
antiparasitario	-0,66	< 0,01	0,52

Se construyó y simplificó el siguiente modelo global con **variables predictoras del ambiente**:

$perros_positivos \sim \acute{a}rea + fumigaci\acute{o}n + tierra + vegetaci\acute{o}n + (1|vivienda), familia=binomial$

Los VIF fueron menores a 1. El modelo de menor AIC fue el que contuvo únicamente la variable *área*. El Δ AIC entre este y el nulo fue de 10,65.

Parámetro	Coefficiente	p valor	Exponencial
área	-2,15	< 0,003	0,08

El modelo global con variables **climáticas** fue el siguiente:

$perros_positivos \sim hrp_{s-1} + hrp_{s-2} + hrp_{s-3} + hrp_{s-4} + tp_{s-1} + tp_{s-3} + tp_{s-4} + (1|vivienda)$,
familia=binomial

La variable tp_{s-2} fue removida por tener un VIF mayor que seis. El modelo de menor AIC simplificado contuvo las variables hrp_{s-4} y tp_{s-4} . El Δ AIC entre este y el nulo fue de 22.564.

Parámetro	Coefficiente	p valor	Exponencial
hrp_{s-4}	-0,16	< 0,01	0,86
tp_{s-4}	-0,25	0,01	0,78

Para la construcción de los modelos de **carga parasitaria**, la simplificación dio como resultado el siguiente modelo. El Δ AIC entre este y el nulo fue de 4,83:

$perros_conteo \sim permanencia + offset(\log(perros \times casa)) + (1|vivienda)$, *familia=binomial negativa*

Parámetro	Coefficiente	p valor	Exponencial
permanencia	-0,42	0,01	0,66

Se construyó y simplificó el siguiente modelo global con **variables predictoras del ambiente**:

$$\text{perros_conteo} \sim \text{área} + \text{fumigación} + \text{tierra} + \text{vegetación} + \text{offset}(\log(\text{perros} \times \text{casa})) + (1|\text{vivienda}), \text{familia}=\text{binomial negativa}$$

Los VIF fueron menores a 2. El modelo de menor AIC fue el que contuvo las variables *fumigación* y *tierra*. El Δ AIC entre este y el nulo fue de 5,12.

Parámetro	Coefficiente	p valor	Exponencial
fumigación	-0,23	0,04	0,80
tierra	0,48	0,03	1,61

El modelo global con **variables climáticas** fue el siguiente:

$$\text{perros_conteos} \sim \text{hrp}_{s-1} + \text{hrp}_{s-3} + \text{hrp}_{s-4} + \text{tp}_{s-1} + \text{tp}_{s-3} + \text{tp}_{s-4} + \text{offset}(\log(\text{perros} \times \text{casa})) + (1|\text{vivienda}), \text{familia}=\text{binomial negativa}$$

Las variables tp_{s-2} y hrp_{s-2} fueron removidas por su elevado VIF. El modelo de menor AIC simplificado contuvo las variables hrp_{s-3} y tp_{s-4} . El Δ AIC entre este y el nulo fue de 23,69.

Parámetro	Coefficiente	p valor	Exponencial
hrp_{s-3}	-0,02	< 0,01	0,98
tp_{s-4}	-0,03	0,02	0,97

En resumen, las variables que resultaron definitivas para explicar la presencia/pseudoausencia de pulgas en perros fueron: la *edad*, el *antiparasitario*, el tipo de *área* y las condiciones climáticas de humedad y temperatura de la *s-4*. Mientras que las variables asociadas a los conteos de pulgas en perros fueron la *permanencia* en la vivienda, la *fumigación*

del peridomicilio, el *tipo de suelo* y las condiciones climáticas de humedad y temperatura de las semanas s-3 y s-4, respectivamente.

➤ *Parasitismo de Ctenocephalides felis felis en gatos*

El modelo global binomial con **variables del hospedador** en gatos incluyó la variable explicativa *presencia de perros infestados*. Todos los VIF de las mismas fueron menores a dos, por lo cual se retuvieron para la simplificación, dando como resultado el siguiente modelo:

$$\text{gatos_positivos} \sim \text{edad} + \text{perros infestados} + (1|\text{vivienda}), \text{ familia}=\text{binomial}$$

Parámetro	Coefficiente	p valor	Exponencial
edad	2,24	0,04	9,35
perros infestados	2,12	0,04	8,36

El Δ AIC entre este y el nulo fue de 3,45.

Se construyó y simplificó el siguiente modelo global con **variables predictoras del ambiente**:

$$\text{gatos_positivos} \sim \text{área} + \text{fumigación} + \text{tierra} + \text{vegetación} + (1|\text{vivienda}), \text{ familia}=\text{binomial}$$

Los VIF fueron menores a tres. El modelo de menor AIC fue el que contuvo únicamente la variable *vegetación*.

Parámetro	Coefficiente	p valor	Exponencial
vegetación	3,31	0,04	27,44

El Δ AIC entre este y el nulo fue de 2,67

El modelo global con **variables climáticas** fue el siguiente:

$$\text{gatos_positivos} \sim \text{hrp}_{s-1} + \text{hrp}_{s-3} + \text{hrp}_{s-4} + \text{tp}_{s-1} + \text{tp}_{s-3} + \text{tp}_{s-4} + (1|\text{vivienda}), \text{ familia}=\text{binomial}$$

La variable tp_{s-2} y hrp_{s-2} fueron removidas por tener un VIF mayor a seis. El modelo simplificado contuvo la variable tp_{s-4} . Sin embargo, la estimación del coeficiente de este parámetro no fue significativa por lo cual no se consideró válido este modelo.

Para los **modelos de carga parasitaria**, la simplificación del GLMM global con variables del hospedador dio como resultado el siguiente modelo:

$$gatos_conteo \sim edad + perros\ infestados + offset(\log(gatos\ x\ casa)) + (1|vivienda), \\ familia=binomial\ negativa$$

Parámetro	Coficiente	p valor	Exponencial
edad	0,74	< 0,01	2,09
perros infestados	0,69	0,01	2,00

El Δ AIC entre este y el nulo fue de 6,38:

Se construyó y simplificó el siguiente modelo global con **variables predictoras del ambiente**:

$$gatos_conteo \sim \acute{a}rea + fumigaci\acute{o}n + tierra + vegetaci\acute{o}n + offset(\log(gatos\ x\ casa)) + \\ (1|vivienda), familia=binomial\ negativa$$

Los VIF fueron menores a 3. El modelo de menor AIC fue el que contuvo la variable *fumigación*. El Δ AIC entre este y el nulo fue menor a 2, por lo que se consideró que no se detectaron asociaciones entre variables ambientales y el conteo de pulgas en gatos.

El modelo global con **variables climáticas** fue el siguiente:

$$gato_conteos \sim hrp_{s-1} + hrp_{s-3} + hrp_{s-4} + tp_{s-1} + tp_{s-3} + tp_{s-4} + offset(\log(gatos\ x\ casa)) + \\ (1|vivienda), familia=binomial\ negativa$$

Las variables tp_{s-2} y hrp_{s-2} fueron removidas por su elevado VIF. El modelo de menor AIC simplificado contuvo las variables hrp_{s-4} . Sin embargo, al igual que el modelo de variables ambientales el Δ AIC entre este y el nulo fue menor a dos y el coeficiente del parámetro no significativo.

En resumen, las variables asociadas a la presencia/pseudoausencia de pulgas en gatos fueron la *edad*, la *presencia de perros infestados*, la *cobertura vegetal*. Mientras que las variables asociadas a los conteos de pulgas en gatos fueron solo la *edad* y la *presencia de perros infestados* en la vivienda.

➤ *Parasitismo de Tunga penetrans en perros*

Los VIF de las variables del GLMM global de familia binomial con **variables del hospedador** fueron menores a dos. La simplificación paso a paso dio como resultado el siguiente modelo:

$$\text{perros_positivos} \sim \text{antiparasitario} + (1|\text{vivienda}), \text{ familia}=\text{binomial}$$

Parámetro	Coficiente	p valor	Exponencial
antiparasitario	-1,52	0,01	0,22

El Δ AIC entre este y el nulo fue de 5,56.

Se construyó y simplificó el modelo global con **variables predictoras del ambiente**, y el GLMM resultante fue el siguiente:

$$\text{perros_positivos} \sim \text{área} + (1|\text{vivienda}), \text{ familia}=\text{binomial}$$

Los VIF fueron menores a 2. El Δ AIC entre este y el nulo fue de 44,11.

Parámetro	Coficiente	p valor	Exponencial
área	-7,61	0,01	0,01

El modelo global con **variables climáticas** fue el siguiente:

$$\text{perros_positivos} \sim \text{hrp}_{s-1} + \text{hrp}_{s-3} + \text{hrp}_{s-4} + \text{tp}_{s-1} + \text{tp}_{s-2} + \text{tp}_{s-3} + \text{tp}_{s-4} + (1|\text{vivienda}), \text{ familia}=\text{binomial}$$

La variable hrp_{s-2} fue removida por tener un VIF mayor que seis. El modelo de menor AIC simplificado contuvo las variables hrp_{s-1} , hrp_{s-3} , y tp_{s-2} :

Parámetro	Coefficiente	p valor	Exponencial
hrp_{s-1}	0,08	0,01	1,08
hrp_{s-3}	-0,11	0,01	0,90
tp_{s-2}	0-31	0,01	1,36

El Δ AIC entre este y el nulo fue de 36,23.

En resumen, las variables que resultaron definitivas para explicar la presencia/pseudoausencia de *pique* en perros fueron: el *antiparasitario*, el tipo de *área* y las condiciones climáticas de humedad relativa de las *s-1* y *s-3*, y la temperatura relativa de la *s-2*.

➤ *Parasitismo de Tunga penetrans en gatos*

El GLMM resultante de la simplificación del modelo global con **variable del hospedador** contuvo solo la variable *presencia de perros infestados*. Los VIF de las variables explicativas fueron menores a cuatro. El Δ AIC entre el modelo final y el nulo fue de 67,67. Sin embargo, el parámetro no fue significativo, por lo cual el resultado no fue considerado válido.

Los VIF del modelo global con **variables predictoras del ambiente** fueron menores a tres, y el modelo simplificado contuvo la variable *área*:

Parámetro	Coefficiente	p valor	Exponencial
área	-3,88	0,02	0,02

El Δ AIC entre este y el nulo fue de 8,55

El modelo global con **variables climáticas** fue el siguiente:

$$\text{gatos_positivos} \sim \text{hrp}_{s-1} + \text{hrp}_{s-2} + \text{hrp}_{s-3} + \text{hrp}_{s-4} + \text{tp}_{s-1} + \text{tp}_{s-4} + (1|\text{vivienda}), \text{familia}=\text{binomial}$$

La variable tp_{s-2} y tp_{s-3} fueron removidas por tener un VIF mayor que seis. El modelo simplificado contuvo la variable $\text{hrp}_{s-1} + \text{hrp}_{s-4}$.

Parámetro	Coficiente	p valor	Exponencial
hrp_{s-1}	0,56	0,01	1,76
hrp_{s-4}	-1,57	0,02	0,21

El Δ AIC entre este y el nulo fue de 21,45

En resumen, las variables asociadas a la presencia/pseudoausencia de *pique* en gatos fueron el tipo de *área*, y las variables climáticas de humedad relativa de las *s-1* y *s-4*.

3.3.3 Discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo varían de los estudios sobre pulgas realizados en diversas regiones del mundo, es decir, que los factores que influyen en la aparición, prevalencia y abundancia de pulgas, *C. f. felis*, dependerán de las características hospedatorias, socio-ambientales y climáticas de cada lugar.

En las áreas estudiadas, *T. penetrans* y *C. f. felis* resultaron las especies de pulgas dominantes asociadas a animales de compañía. El predominio de ambas pulgas se correlaciona con otros estudios ya realizados (Pampiglione y col., 2009; Dobler y Pfeffer, 2011). Las mayores prevalencias entre los perros del área periurbana sugieren una asociación entre sus abundancias y el área periurbana-rural (Heukelbach, 2005; Feldmeier y col., 2014).

De acuerdo con Dantas-Torres y Otranto (2014), la presencia y abundancia de pulgas en perros y gatos podría estar asociada a múltiples factores que influyen en la dinámica de la infestación por pulgas a nivel local, incluyendo la abundancia y la proximidad de los hospedadores, las condiciones del microhábitat como el tipo y la cantidad de vegetación, la sombra, la temperatura, la humedad relativa y los niveles de saturación, las características climáticas, las condiciones socioeconómicas, la falta de control y negligencia en el manejo de las

poblaciones de animales de compañía y sinantrópicos, la falta de información y de políticas de salud pública.

Entre los factores dependientes del hospedador, la incidencia del parasitismo por pulgas podría estar relacionada a la edad del hospedador (Buckner, 1964). En sintonía con los resultados obtenidos por Azrizal-Wahid y col. 2019, en nuestro estudio la infestación de pulgas en gatos y perros está significativamente influenciada por la edad, registrándose mayores infestaciones en los animales juveniles; la razón de infestación por pulgas *C. f. felis* entre perros jóvenes y adultos es 3,01, y para gatos jóvenes y adultos es 9,4. Siendo a su vez, las pulgas 2,9 veces más abundantes en los gatos jóvenes en comparación con los adultos. Cabe mencionar las posibles hipótesis de estos resultados: aspectos comportamentales de los perros y gatos juveniles, la incapacidad de extraerse por ellos mismos las pulgas, un mayor movimiento y exposición por contacto estrecho entre ellos y/u otros animales, la imposibilidad de colocación de antiparasitarios externos, entre otras.

La mayor prevalencia de infestación por pulgas (*C. f. felis* y *T. penetrans*) en los perros y gatos del área periurbana de Puerto Iguazú, se alinea con numerosas investigaciones, como ejemplo Costa y col. (2013), quien atribuye esta diferencia en parte a la falta de acceso a productos para el control de ectoparásitos en comparación con las zonas urbanas. Es probable que las prácticas y los modos de tratamiento de las parasitosis tanto en el animal como en el ambiente varíen entre áreas de acuerdo al acceso a la información, conocimientos y saberes de las personas. Además, las condiciones socio-económicas, socio-ambientales, y la escasa información sobre los tratamientos antiparasitarios y de fumigación del entorno hace que los tratamientos antipulgas no sean efectivos, ya sea por el desconocimiento de que gran parte del ciclo de vida de las pulgas tiene lugar en la vivienda, como por la imposibilidad de sostenerlos en el tiempo y la utilización de productos inespecíficos que puede no tener una eficacia adecuada contra las pulgas (ivermectina, creolina, aceite negro, aguarrás, querosén, lavandina); evidenciando una diferencia sustancial en aquellos casos donde se aplica un tratamiento específico de manera adecuada y sostenida (Cooper y col., 2020).

En este sentido, la aplicación periódica de una o más medidas de control contra pulgas en perros, gatos y en el ambiente reduce significativamente la probabilidad de infestación activa por pulgas (Farkas y col., 2009). Cabe destacar que en el área periurbana existen métodos de tratamiento ecológicos para los animales y de fumigación del peridomicilio con el aprovechamiento de planta nativas como el güembé o el fruto del paraíso, en contraposición con los productos comerciales, generalmente insecticidas de amplio espectro, aunque tanto para la mayor parte de los productos comerciales y naturales, no hay estudios rigurosos de efectividad. Teniendo en cuenta, a su vez, el ambiente y escenario social del área de estudio, especialmente

condiciones climáticas que afectan la residualidad de los principios activos sean o no sintéticos; y conciencia de buenas prácticas en el manejo de los productos como en el caso del paraíso y sus componentes tetranortriterpenos, neurotóxicos y enterotóxicos para los animales de cría.

La tenencia de perros semirrestringidos se asoció a una mayor abundancia de la infestación; al no permanecer encerrados en los límites de las casas pueden circular libremente y, por lo tanto, hay mayores posibilidades de contacto con animales y/o entornos infestados. Las altas infestaciones en perros actúan amplificando el tamaño poblacional de la comunidad de pulgas. En el caso de la prevalencia de infestación en los gatos, la presencia de otros perros compartiendo la misma vivienda incrementa 8,36 veces la razón de estar infestados y su abundancia en 2,00 veces. Es decir, que en un contexto ambiental donde la presión de infestación es alta los gatos tienen mayores probabilidades de exposición. De acuerdo con Azrizal-Wahid y col. (2019), la mayor abundancia y prevalencia de infestación por pulgas en gatos en casas con varios animales de compañía indica que tener más de un animal es un factor de riesgo de infestación por pulgas.

En el caso del modelo con variables del hospedador de la base de datos del parasitismo de *pique* en gatos, el mismo evidenció un ajuste fuerte; además el valor de X^2 calculado para evaluar la independencia de las variables perros + gatos fue elevado ($X^2= 67.282, p<0.01$), lo cual indica falta de independencia de las mismas. Posiblemente el número de observaciones no haya sido suficiente para detectar asociaciones en los modelos con variables relacionadas al parasitismo con pulgas en gatos.

Respecto a la tungiasis canina, se observó una asociación entre el ambiente y con la condición de semirrestricción de los perros, siendo mayor el porcentaje de animales que deambulan libres en el área periurbana. Esto podría estar relacionado a las características propias del área, terrenos con mayor porcentaje de suelo desnudo, sin perímetros que limiten la circulación fuera de la vivienda. Como menciona Vieira y col., 2006, la falta de supervisión y la movilidad errática suponen un riesgo para la salud de los animales, que pueden convertirse en reservorios y centinelas de enfermedades para las personas y otros animales domésticos y sinantrópicos.

Las infestaciones por *pique* en los perros de este estudio se concentraron en las patas, con preferencia por las almohadillas palmares, coincidiendo estas observaciones con Heukelbach y col., (2004) y Harvey y col. (2021), sin embargo, se registró en menor proporción infestaciones en otros sitios como el hocico, el abdomen y los testículos. En cuanto a las manifestaciones clínicas, las lesiones o grupos de lesiones pueden derivar en graves procesos inflamatorios debido a infecciones bacterianas secundarias y miasis, ocasionando deformidades, automutilación,

pérdida de dedos y sepsis. Además, la exposición crónica a tungiasis podría generar dificultad para mantener la posición cuadrúpeda, renguera, lamido excesivo de las patas, cambio constante de posición, desobediencia a las órdenes y agresividad (Heukelbach y col. y col., 2004; Harvey y col., 2021).

Según Beugnet y col. (2004), las condiciones ambientales de los patios y viviendas son factores de riesgo importantes para el desarrollo de *C. felis felis*. De acuerdo con nuestros resultados, variables el tipo de suelo y la cobertura vegetal son los factores que modulan la presencia/ausencia y abundancia de pulgas en el ambiente. A nivel microambiental una mayor cobertura vegetal y la presencia de suelo de tierra se asociaron significativamente con presencia de pulgas aumentando la infestación en perros y gatos en comparación con aquellos sitios donde predomina la presencia de cemento. En este sentido, la ausencia de suelo de tierra y la escasa vegetación aportan poca materia orgánica y protección de la desecación a los estadios inmaduros.

La capacidad de *C. f. felis* de tolerar una amplia gama de condiciones ambientales contribuye a la abundancia y distribución de esta especie (Cooper y col., 2020). Sin embargo, la reproducción, el desarrollo y la supervivencia de las pulgas, dependen además de condiciones climáticas favorables para el desarrollo de los estadios inmaduros y adultos que sobrevivan a periodos sin alimentarse (Dryden, 1993; Rust y Dryden, 1997). Las condiciones para el desarrollo óptimo de *C. felis* son de 27-32 °C y 75-92% de HR. Las temperaturas superiores a 35 °C son letales para los estadios inmaduros y la baja humedad relativa es adversa para todos los estadios, excepto para la pupa; pudiendo sobrevivir durante periodos prolongados en ausencia de hospedadores o en condiciones ambientales desfavorables (Silverman, 1981; Krasnov, 2001).

Los porcentajes de infestación por *C. f. felis*, en la misma población de perros y gatos muestreados, se mantuvieron en niveles altos a lo largo del año. Se registraron mayores índices de infestación durante los meses de invierno (93.5%), sin embargo, las diferencias fueron significativas respecto a la estación de otoño, la cual registró el menor porcentaje de infestación (73,1%). Coincidiendo con los resultados de Paz y col., (2015) para Belo Horizonte, Brasil, nuestros estudios sugieren que en la zona subtropicales las condiciones climáticas, principalmente los valores de humedad y temperaturas, favorecen el desarrollo de las poblaciones de pulgas en la estación seca. Es probable que las elevadas tasas de infestación registradas en primavera (91,3%) estén influenciadas por las variables climatológicas y cohortes acumulativas de las semanas previas. En nuestro modelo tanto la presencia como la abundancia de las pulgas podría explicarse por las semanas s-3 y s-4, respectivamente, para las infestaciones de pulgas en perros; incluyendo la s-1 en el caso de las infestaciones por *pique*, teniendo en cuenta el ciclo de vida de las pulgas, de huevo a adulto, el cual se completa, aproximadamente, en 30 días. Las condiciones

edafológicas de las áreas periurbanas generalmente con mayor humedad relativa o de saturación de suelo, podrían favorecer el desarrollo de los estadios inmaduros de las pulgas.

En este sentido, observamos una tendencia de infestación descendente hacia el verano, relacionado a la humedad excesiva 95%-100%, que inhibe el desarrollo de las larvas (Dryden y Rust 1994). A su vez, como señalan Linardi y Guimarães (2000), la acción mecánica de la lluvia reduce los estadios de vida libre, huevos y larvas de *C. f. felis*, favoreciendo mayores tasas de infestación en períodos secos de la región subtropical.

Los perfiles estacionales de infestación por *C. f. felis* mostraron diferencias con las características climáticas de las regiones templadas del hemisferio norte cuyas condiciones climáticas favorecen el desarrollo de las poblaciones de pulgas en verano y otoño respecto a las estaciones frías del invierno y la primavera (Rust y Dryden 1997). En el hemisferio sur, en la ciudad de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil, se observaron mayores tasas de infestación en los meses de verano de diciembre y enero (Oliveira y Ribeiro 1982/1983), siendo el clima de esta región de tipo templado húmedo con un invierno lluvioso. A diferencia de lo que sucede al noroeste de la provincia de Misiones, particularmente en la ciudad de Puerto Iguazú, el clima subtropical caracteriza otoños y primaveras lluviosas, mientras que las condiciones climáticas de temperatura y humedad propician inviernos cortos y secos que favorecen mayores infestaciones por pulgas en los meses de junio, julio y agosto.

3.4 Conocimiento, actitudes, prácticas y percepción en relación con tungiasis

3.4.1 Materiales y métodos

Se seleccionaron al azar 38 viviendas las cuales formaron parte del muestro anterior (Apartado 3.3), y mediante la aplicación de un método cualitativo de recolección de datos (encuestas semiestructuradas – Anexo 2) se abordaron diferentes aspectos relacionados a los saberes construidos y naturalizados sobre la tungiasis, hasta alcanzar la saturación de los datos de acuerdo a la heterogeneidad de los mismos.

La información colectada se agrupó en cinco categorías: (1) factores sociodemográficos (género, edad, educación); (2) factores asociados a la vivienda (principales materiales de la casa, tipo de suelo de la casa, acceso a agua potable, tratamiento de residuos); (3) presencia y hábitos de animales domésticos (perros, gatos, aves de corral, cerdos); (4) conocimientos, actitudes y prácticas relacionadas con la tungiasis (conocimiento sobre el agente etiológico, sobre la transmisión, uso regular de calzado, medidas preventivas, tratamiento); (5) percepciones de las acciones del Municipio-Ministerio de Salud.

El estudio se realizó mediante un análisis cualitativo de los datos obtenidos en las encuestas, y a través de descriptores cuantitativos comparamos medidas y porcentajes de las cinco categorías seleccionadas para investigar la tungiasis humana entre las dos áreas muestreadas (Ver anexo 2).

3.4.2 Resultados

Entre los factores sociodemográficos de las 38 personas encuestadas, la mediana de edad resultó de 42,5 años (rango 18-73 años); la diversidad de género conformada por un 44,7% hombres, 52,32% mujeres y 2,63% mujeres trans. La mediana de personas por hogar fue de cuatro, en un rango de una a once personas, habiendo en un 44,7% de los casos una persona escolarizada en cada hogar. En las Figuras 3.6, se visualizan infestaciones por *pique* en un adulto y niños de Puerto Iguazú; en la última imagen se observa un halo claro de piel estirada causado por la hipertrofia de la pulga, y las espirales fecales expulsadas a través de su ano en el centro del neosoma.



Figura 3.6. Infestaciones por *pique*; arriba, pies de adulto de barrio periurbano; en el centro, niño de la Comunidad Mbya Guaraní Yriapú; abajo, dedo de niña donde se observa las heces expulsadas por la pulga (Fotos, Méd. Suvia J., Méd. Couto E., Lic. M. Giuliani, respectivamente).

Una de las variables socio-ambientales incluidas en este estudio se refiere a los principales materiales utilizados en la construcción de las viviendas; en las áreas urbanas y periurbanas es el ladrillo (73.4%) y la madera (87%), y en su interior, el suelo de cemento (100%) y de madera (56.5%), respectivamente. Otra variable analizada es el acceso a la red de distribución de agua potable; el 66.7% de los hogares urbanos accede a diferencia de los hogares periurbanos donde la red de distribución no llega, siendo en pozo artesanal el principal recurso utilizado; la recolección de residuos en las viviendas urbanas es del 93.3%, con una frecuencia que oscila entre una o tres veces por semana a diariamente, mientras que en las viviendas periurbanas no hay servicio de recolección de residuos, optando por quemar sus desechos en el 65,8% de los casos, por enterrarlos o arrojarlos dentro de su domicilio en el 18,42%, y en algunos casos, quienes disponen de vehículo los acarrear hasta el basural.

En cuanto a los hábitos de los perros en las áreas urbana y periurbana el 53.3% y 30% respectivamente, se relevó la pertenencia y permanencia de estos en ámbito doméstico. Los principales sitios donde los perros descansan son el corredor de la casa y al aire libre/bajo la vivienda, y en menor medida bajo cobertizos/galpones, en la cucha propia, o dentro de la vivienda. El 73% de los perros (86.6% urbano, 65.2% periurbano) tiene un nivel de restricción parcial, pudiendo deambular fuera de su domicilio sin la supervisión de sus tutores. La cría de animales, generalmente para consumo propio o venta en el mercado comunitario, es una actividad muy extendida entre los habitantes del área periurbana (91.3%), siendo gallinas, patos, conejos, vacas, chanchos, los principales animales de producción, permaneciendo encerrados en corrales en el 57.1% de los casos. Mientras que para el área urbana un 13.4% se dedica a la cría de gallinas y patos.

Con respecto a los conocimientos relacionados con la tungiasis, la mayoría de las personas entrevistadas expresaron conocer el *pique*, habiendo sido afectados al menos uno de los integrantes de su familia por su picadura en los últimos seis meses. Sin embargo, al inquirir mayor precisión sobre *qué es el pique*, el 31.6% lo relacionó con las pulgas y su ciclo biológico, mientras que el 50% suele asociarlo con “bichos del polvo”, del suelo o la arena. Por otra parte, la mitad se refirió a la emergencia del *pique* en la estación de verano (50%) y en épocas de sequía (30%). En cuanto a su localización un 39.5% asoció el hallazgo del *pique* a los sitios donde descansan los perros, bajo las viviendas o cobertizos, relacionando el polvo y/o las condiciones ambientales de suciedad como lugares favorables para el *pique*.

De acuerdo a las prácticas de las personas afectadas por las picaduras de *T. penetrans*, el 90% de ellas declararon no concurrir al hospital o Centro de Atención Primaria de la Salud (CAPS) para su tratamiento con profesionales de la salud. Esto deriva en el autotratamiento de las lesiones que contempla diversas prácticas de extracción de la pulga y desinfección de la herida;

en el área urbana el 93% de las personas suele utilizar agujas de coser, de las cuales el 66.7% utiliza el alcohol como medida de limpieza de la zona afectada, rara vez se utilizaron agujas hipodérmicas; mientras que el 52.17% de las personas del área periurbana suelen tratar las lesiones con instrumentos de perforación no estériles como espinas de limonero o naranjo, aplicando para su desinfección la colocación de ceniza, aceites calientes, hierbas o ungüentos en la herida generada.

Cuando se preguntó sobre el tipo de prácticas utilizadas para prevenir la tungiasis en los hogares, ante la aparición del *pique* en el peridomicilio, un análisis general de ambas áreas estableció que el 95% incorpora el riego como práctica preventiva, únicamente con agua (31.5%), o aplicando insecticidas comerciales (26.3%), u otras soluciones naturales (36.8%) a base de plantas nativas como el güembé o el paraíso. La frecuencia del riego varía en su periodicidad, ya sea diariamente, cada 15 días, una vez al mes, intensificándose durante las estaciones de sequía. Al preguntar sobre la protección de los pies, como principal área de exposición del cuerpo a la infestación por *pique*, el 23.7% respondió permanecer descalzo y el 89.5% afirmó tener un uso regular de calzado abierto en el peridomicilio.

Al consultarse a las personas sobre acciones llevadas a cabo por el Municipio de Puerto Iguazú y las políticas delineadas por el Ministerio de Salud de la provincia de Misiones, específicamente sobre jornadas educativas sobre el *pique* y su patología asociada, y campañas de concientización para su control, tratamiento y prevención, la respuesta generalizada fue negativa. Asimismo, la ausencia de promotores de salud en los barrios.

Sobre la red de Servicios de Salud, el 86,6% y el 54,5% de las personas del área urbana y periurbana, respectivamente, expresaron conocer su disponibilidad. Entre las instituciones públicas a las que acceden con mayor frecuencia las personas de los barrios del área periurbana (82%) se encuentran el hospital y los Centros de Atención Primaria de la Salud (CAPS), mientras que en el área urbana un 46.6% accede a establecimientos privados. Además, en ambas áreas manifestaron recibir una buena calidad en la atención de los servicios de salud (84%). Por otra parte, el 60% de las personas que viven en barrios del área urbana no tienen mayores dificultades para trasladarse y acceder al centro de salud durante cualquier horario del día o la noche. Este contexto no se condice con el de las personas que viven en los barrios del área periurbana donde el 59% manifestaron tener dificultades para trasladarse, ya que no cuentan con vehículo propio, o por la baja frecuencia del colectivo urbano, que ingresa solo dos veces al día, o directamente no lo hace. Esta situación se agrava en el caso de inclemencias climáticas por el estado deplorable de los caminos de tierra que se tornan intransitables.

3.4.3 Discusión

En mayo de 2013, la 66.^a Asamblea Mundial de la Salud, en colaboración con los Estados Miembros y sus asociados para garantizar la aplicación de la resolución WHA66.12, decidió intensificar e integrar las medidas de lucha contra las enfermedades tropicales desatendidas, como la tungiasis, y planificar inversiones para mejorar la salud y el bienestar social de las poblaciones afectadas.

Más recientemente, en 2019, a partir de las acciones propuestas en la reunión sobre Enfermedades Ectoparásitas en la Región de las Américas: Desarrollo de una Hoja de Ruta para Determinar la Situación Epidemiológica e Identificar Acciones para Reducir el Impacto, la tungiasis causada por *T. penetrans* fue incluida en el grupo de Enfermedades Tropicales Desatendidas enfocadas por el Plan de Acción para la Eliminación y Post-Eliminación de las Enfermedades Infecciosas Desatendidas 2016-2022 de la Organización Panamericana de la Salud - prevención, reducción de la morbilidad y control de la enfermedad grave (OPS, 2020).

A pesar de la existencia de las normativas internacionales para políticas sanitarias, educativas y zoonóticas en relación con la tungiasis, a nivel nacional, provincial y el municipio de Puerto Iguazú, por causas relacionadas a criterios de prioridad y destino de recursos, no reconoce la tungiasis integrada a un marco de ambiente saludable. En este estudio las personas encuestadas expresaron un conocimiento parcializado sobre la enfermedad en humanos y animales. En muchos casos los conocimientos se adquieren a través de experiencias personales al haber sido afectadas o por un saber transmitido mediante la oralidad. Entre los factores determinantes de la tungiasis en humanos conocidos por los miembros de la comunidad, se consideran: la presencia de perros infestados sin restricción ambulatoria por las calles del barrio y en contacto con otros animales, viviendas donde predominan los suelos polvorientos, el espacio por debajo de las casas de madera donde descansan los hospedadores, la dinámica ocupacional de tierras sin titularidad, acompañada de la ausencia de previsión, inversión y planificación territorial, de servicios y saneamiento ambiental exiguos (falta de red de distribución de agua potable, recolección de residuos, pavimentación de calles).

En las áreas estudiadas, las personas afectadas por la tungiasis no acceden a centros de atención primaria de salud, probablemente porque consideran que para los profesionales sanitarios esta enfermedad es minimizada en su importancia o porque pueden sufrir algún tipo de estigmatización, debido a que está asociada a malas prácticas de higienización y a los condicionamientos estructurales de las viviendas (Mutebi y col., 2018). Esta situación es preocupante, ya que en muchos casos la inadecuada extracción de *piques* deriva en llagas que no son tratadas para controlar la sepsis, utilizándose métodos que agravan el riesgo de infecciones bacterianas secundarias, como el uso de ceniza, aceites, o ungüentos en las heridas, o la aplicación

de productos químicos como insecticidas organofosforados que generan toxicidad. Observamos este último caso, durante un muestreo urbano de Puerto Iguazú, los tutores de un niño de tres años contaron haberle colocado “*curabichera*” en su cabeza al presuponer que la picadura era de un *pique*.

Investigaciones a nivel comunitario revelan que los niños entre 5-9 años son el grupo de edad más vulnerable por esta ectoparasitosis, y en segundo lugar el grupo de edad de >60 años, sugiriendo que patrones de comportamiento específicos de la edad, podrían determinar el grado de exposición (Muehel y col., 2003). Los niños de cinco a nueve años adquieren mayor movimiento y desplazamiento a través del juego y la exploración de su barrio, generalmente descalzos o con sandalias de goma, exponiéndose al *pique* durante muchas horas al día. Si bien el calzado cerrado protege parcialmente, ante la realidad de las comunidades con pocos recursos, esta protección carece de efectividad, por falta del mismo o reservarlo para ocasiones específicas (Feldmeier, y col., 2014). La exposición suele tener lugar tanto dentro de la vivienda donde se lleva calzado abierto como sandalias de goma, como en el peridomicilio donde el calzado deteriorado permite que las pulgas puedan alcanzar la piel a través de aberturas y agujeros. En el caso de las personas mayores a 60 años, la disminución de la movilidad, o la postración y la incapacidad de extraerse los *piques* por sus propios medios, debido a limitaciones físicas de la edad, vuelve a este grupo más vulnerable a la tungiasis teniendo que ser asistidos por terceras personas (Heukelbach y col., 2007; Ugbomoiko y col., 2007).

Desde esta perspectiva, para el abordaje de la tungiasis la capacitación transdisciplinar de promotores de la salud permitiría brindar información sobre medidas preventivas, por ejemplo: el uso específico de repelentes e insecticidas (químicos o a base de plantas nativas), identificación de sitios de cría del *pique* y sus reservorios, y acompañamiento sanitario a la comunidad en el correcto tratamiento, uso de instrumentos, formas de extracción y desinfección evitando riesgos de infecciones bacterianas secundarias. La escasez de estudios sistemáticos que detecten factores de riesgo de infestación humana y canina, la falta de datos clínicos y epidemiológicos y la ausencia de programas de salud que incluyan la tungiasis, evidencia la falta de reconocimiento de esta enfermedad zoonótica, por parte de las autoridades públicas, los profesionales sanitarios, los investigadores y las poblaciones afectadas (Heukelbach y col., 2001; Ariza y col., 2007; Carvalho y col., 2012). En este sentido la contribución de esta tesis doctoral permite consolidar las estrategias en base a información, crear y validar los instrumentos de control y transferencia a los organismos responsables, y luego generar las normativas para promover las actividades adaptadas a la condición local incorporadas al manejo integrado de parásitos y de vectores, y principalmente con el concepto de ambiente saludable.

Como lo demuestran diferentes estudios realizados en Brasil, existen propuestas preventivas alternativas como la aplicación de un repelente a base de aceite de coco en los pies el cual reduciría la tasa de ataque en un 100% (Feldmeier y col., 2006; Buckendahl y col., 2010). Por otra parte, la propuesta de “Clasificación de Fortaleza” de Eisele y col., (2003), podría utilizarse con fines clínicos y epidemiológicos, el cual permitiría un diagnóstico preciso, posibilitando la evaluación de enfoques quimioterapéuticos y medidas de control a nivel comunitario.

Concluimos que la tungiasis, al tratarse de una zoonosis, y teniendo en cuenta sus intrincados vínculos con la pobreza y la vulneración de los derechos humanos requiere una investigación transdisciplinar en la que deben interactuar la salud pública, la zoonosis, las ciencias sociales, la educación sanitaria (Feldmeier y col., 2014). En este sentido, la tungiasis, junto con otras Enfermedades Tropicales Desatendidas (ETD), tiene el potencial de desencadenar estrategias políticas basadas en el concepto de "Una salud" que pueden garantizar resultados más eficaces e integrales desde una perspectiva socio-ambiental.

CAPÍTULO 4: PULGAS DE INTERÉS SANITARIO POR SU ROL COMO TRANSMISORAS DE ENFERMEDADES

4.1 Introducción

Las pulgas son insectos mundialmente distribuidos e implicados en la transmisión de patógenos a una amplia variedad de animales silvestres, domésticos y también a humanos (Nguyen y col., 2020). La infección zoonótica históricamente reconocida es la "peste negra" (peste bubónica), causada por *Yersinia pestis* (Lehmann y Neumann, 1896) y transmitida por pulgas de roedores; desde la década de 1990, los tres países más endémicos son Madagascar, la República Democrática del Congo y Perú, donde están presentes los componentes del ciclo enzoótico.

En las últimas décadas, se han detectado otros patógenos zoonóticos emergentes en las pulgas, como las bacterias de los géneros *Rickettsia* y *Bartonella* (Bitam y col., 2010). La pulga del gato *Ctenocephalides felis felis* es el principal vector de *Bartonella henselae*, agente causante de la enfermedad conocida como *arañazo de gato* (Chomel y col., 2004, 2006). En Argentina, otras especies como *B. quintana*, *Bartonella clarridgeiae*, *Bartonella rochalimae* también son importantes desde una perspectiva sanitaria. Recientemente, se han descrito varias especies indeterminadas o nuevas variantes de *Bartonella* sp. asociadas a pulgas y a hospedadores silvestres principalmente roedores (De Sousa y col., 2018; Gonçalves-Oliveira y col., 2020; De Salvo y col., 2020).

Las pulgas también son conocidas como vectores del tifus murino (*Rickettsia typhi*), y desempeñan un papel en la transmisión del tifus epidémico (*Rickettsia prowazekii*). En los últimos años se detectó *Rickettsia felis*, agente de la fiebre manchada transmitida por pulgas, distribuida globalmente, y *C. f. felis* es considerada el principal vector (Raoult y col., 2001). Nuevos estudios amplían la presencia de este patógeno en una variedad creciente de pulgas (Melis y col., 2020).

Con el desarrollo de nuevas herramientas de investigación molecular se está dilucidando la prevalencia y la importancia potencial de las enfermedades por rickettsias, como el tifus murino y la fiebre manchada transmitida por las pulgas, y la bartonelosis en los animales de compañía y en humanos. En los últimos años, las investigaciones relacionadas a la búsqueda de vectores artrópodos y reservorios animales de bacterias patógenas se han profundizado, aportando conocimiento teórico y técnico para el ajuste de protocolos y nuevas metodologías de detección. En esta dirección, como un logro obtenido por el Equipo del Laboratorio de Ectoparásitos del

CEPAVE en el marco de esta tesis doctoral, la determinación específica de las pulgas exigió la puesta a punto de protocolos y una metodología de extracción de ADN “no destructiva”, que consiste en conservar los exoesqueletos de las pulgas intactos para su montaje y observación al microscopio óptico, cuando la identificación a priori no fuese posible.

En la ciudad de Puerto Iguazú, la existencia de extensas zonas de interfaz, cuyas interacciones de animales silvestres, domésticos y humanos, entre reservas naturales y sitios rurales y periurbanos contiguos, exige el desarrollo de estudios eco-epidemiológicos abordados desde la perspectiva de "*Una Salud*"; debido a la necesidad de identificar eventuales apariciones de enfermedades o ciclos zoonóticos y la importancia de detectar y monitorear eventos de propagación en hospedadores no reportados. Teniendo en cuenta las implicancias en salud pública de las bacterias *Bartonella* y *Rickettsia*, y la ausencia de estudios sobre estas en roedores y marsupiales en Misiones, la relevancia de este capítulo radica en investigar la presencia de estos patógenos en pulgas de animales de compañía, y de mamíferos silvestres y sinantrópicos en diferentes ambientes de la provincia.

4.2 Materiales y métodos

Las pulgas seleccionadas para la detección de bacterias de los géneros *Rickettsia* y *Bartonella* fueron acondicionadas para su procesamiento. Se lavaron todos los especímenes individualmente con agua destilada para eliminar el exceso de etanol, antes de introducirlos en los tubos para la extracción de ADN. Las pulgas identificadas a nivel de especie en el microscopio binocular estereoscópico se trituraron por medio de varillas de vidrio o acrílico autoclavadas, y procesaron en pools de hasta ocho individuos, colectados del mismo hospedador. Aquellas pulgas que necesitaban ser preparadas para su identificación al microscopio óptico después de la extracción de ADN, fueron procesadas individualmente por un método no destructivo de extracción de ADN para preservar el exoesqueleto. Este método consiste en realizar una incisión abdominal entre los tergitos tres y cuatro de cada pulga, utilizando hojas de bisturí estériles (Miura y col., 2017).

Un total de 691 pulgas agrupadas en 115 pools fueron analizadas para detectar la presencia de ADN de *Rickettsia* y de *Bartonella*. Las pulgas se analizaron en grupos de uno a ocho individuos, cada grupo formado por especímenes de una sola especie, colectados del mismo hospedador individual; pertenecientes a áreas protegidas: Parque Nacional Iguazú (*Polygenis* (*Polygenis*) *roberti roberti*), Parque Provincial Puerto Península (*Polygenis* (*Polygenis*) *rimatus*), Parque Provincial Urugua-í (*P. (P.) rimatus*, *Craneopsylla minerva minerva*) y áreas urbana y periurbana de Puerto Iguazú (*C. f. felis*, *P. (P.) rimatus*, *Adoratopsylla intermedia intermedia*, *Adoratopsylla antiquorum antiquorum*).

Para detectar la presencia de ADN rickettsial se analizaron 312 pulgas agrupadas en 76 pools. De estas pulgas, 152 (115 de *C. f. felis*, 21 de *P. (P.) rimatus*, 6 *P. (P.) r. roberti*, 7 de *A. i. intermedia* y 3 de *A. a. antiquorum*) se colectaron de 46 comadrejas (17 *Didelphis aurita*, 35 de *D. albiventris*, 3 de *P. quica*, 1 de *Monodelphis dimidiata*), 29 pulgas (28 de *P. (P.) rimatus*, 1 de *C. m. minerva*) se colectaron de 23 roedores (17 *Akodon montensis*, 3 *Oligoryzomys nigripes*, 3 *Rattus rattus*) y 131 pulgas (127 *C. f. felis*, 4 *Tunga penetrans*) de 28 perros y 16 gatos.

Para detectar la presencia de ADN de *Bartonella*, se analizaron 379 pulgas agrupadas en 36 pools. De estas pulgas, 64 (45 *C. f. felis*, 10 *P. (P.) rimatus*, 5 *P. (P.) r. roberti*, 1 *A. i. intermedia* y 3 *A. a. antiquorum*) se colectaron de 29 comadrejas (4 *D. aurita*, 22 *D. albiventris*, 2 *P. quica*, 1 *M. dimidiata*), 44 pulgas (43 *P. (P.) rimatus*, 1 *C. m. minerva*) se colectaron de 43 roedores (36 *A. montensis*, 1 *Brucepattersonius* sp., 1 *Euryoryzomys russatus*, 3 *O. nigripes*), 3 *R. rattus* (PI) y 271 pulgas (todas ellas *C. f. felis*) se colectaron de 79 perros y 24 gatos.

Extracción de ADN de pulgas y tejidos de hospedadores

Dado que los estudios de extracción de ADN para el análisis de bacterias en las pulgas son relativamente recientes, más aún cuando se trata de utilizar técnicas no destructivas, se experimentaron diferentes metodologías que debieron ser puestas a punto. Para la extracción de ADN de las pulgas se utilizaron diferentes protocolos según el kit de extracción, los cuales se realizaron bajo una cabina de flujo laminar Clase II A/B-3 (Figura 4.1): 1) High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche® Applied Science, Mannheim, Alemania), 2) resina Chelex® 100 Grado Biología Molecular, 3) kit de ADN PuriPrep-S kit (INBIO HIGHWAY- Catalogo K1205) para ADN de muestras de sangre y órganos de mamíferos.

1) High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche® Applied Science, Mannheim, Alemania): El ADN de las muestras de pulgas se extrajo utilizando el kit de extracción. Se adicionaron 40µl de proteinasa K y 200 µl de Binding Buffer (Roche®) a cada muestra de pulga, se homogeneizó y se incubó en baño seco a 70°C durante 10 minutos. Se incubaron con 40µl de proteinasa K y 200µl de Buffer Lisis Tissue (Roche®) a 55°C durante por lo menos una hora. Luego, se trasvasaron las muestras a las columnas de extracción y se centrifugaron a 8.000 xg durante un minuto. Se realizaron lavajes con Wash Buffer (Roche®) y la elución del ADN con 60 µl de Elution Buffer (Roche®).

2) Resina Chelex® 100 Grado Biología Molecular: De acuerdo al número de especímenes analizados por tubo, las muestras se incubaron con 50-100µl de resina y 3 µl de proteinasa K (10 mg/ml), adaptando el procedimiento descrito por Miura y col., (2017) de la siguiente manera: cada muestra se incubó en termobloque a 56°C durante al menos 15 horas y a 94°C durante 10 minutos. La suspensión final se centrifugó a 14000 rpm durante cinco minutos. Finalmente, el

sobrenadante se retiró cuidadosamente de cada muestra y se colocó en un tubo limpio etiquetado. La concentración de ADN se determinó con un espectrofotómetro NanoDrop (Nano- Drop ND-1000 Technologies, Wilmington, DE), y osciló entre 77 y 1500 ng/μl. Todas las extracciones se diluyeron a concentraciones óptimas y se almacenaron en freezer a -20°C hasta las ampliaciones por PCR.

3) Kit de ADN PuriPrep-S kit (INBIO HIGHWAY- Catalogo K1205): Trozos de no más de 5 mm (25-50 mg) de bazo de roedores fueron descongeladas minutos antes de su procesamiento para la extracción de ADN, y seccionados con hojas de bisturí estériles antes de colocarlos en tubos a los cuales se le adicionó 300 μl PBS 1X y 20 μl de proteinasa K. Las muestras se maceraron en frío, se les adicionó 350 μl de buffer de lisis y fueron incubadas a 56 °C durante dos horas. Posteriormente, se añadió 350 μl de etanol 100% y se trasvasaron las muestras a las columnas de extracción; se centrifugaron a 12.000 xg durante un minuto. Se realizaron lavajes con Buffer (BLav 1 y 2) y la elución del ADN con 50 μl de Buffer BE.

Para todas las muestras analizadas se realizó la cuantificación de los ácidos nucleicos mediante espectrofotómetro MaestroNano (MAESTROGEN), con el fin de evaluar la calidad de ADN extraído. Por otra parte, a las muestras procesadas con resina Chelex® se agregó un control de inhibición seleccionando dentro de cada PCR la muestra más concentrada.



Figura 4.1. Cabina de Seguridad Biológica Clase II/A-B3 indicada para extracción de ADN (INMeT).

Reacción de Cadena de Polimerasa (PCR), purificación, secuenciación

Para la detección de ADN de bacterias del género *Rickettsia* en muestras de pulgas se empleó una PCR convencional para amplificar un fragmento de 830-pb del gen rickettsial que codifica la enzima citrato sintasa (*gltA*), utilizando los cebadores CS-239: 5'-GATGATGTCTGAAGATATGAAACA AAT-3', y CS-1069: 5'-

CTGCTCGTCTATTTTACTTCTTAAAGT-3', siguiendo el protocolo de ciclado descrito por Labruna y col., 2004:

- un ciclo de desnaturalización inicial del ADN durante tres minutos a 95°C
- 40 ciclos con desnaturalización a 95°C por 15 segundos, hibridación a 48°C por 30 segundos y polimerización a 72°C durante 30 segundos
- un ciclo de polimerización final de siete minutos a 72°C.

Las muestras positivas a la amplificación del gen *gltA* fueron sometidas a una PCR adicional para amplificar un fragmento de ca. 820-pb del gen *ompB*, que codifica una proteína de membrana externa específica de rickettsias del grupo de las fiebres manchadas. Se emplearon los cebadores 120-M59: 5'-CCGCAGGGTTGGTAACTGC-3' y 120-807: 5'-CCTTTTAGATTACCGCCTAA-3', y el siguiente protocolo (Roux y Raoult, 2000):

- un ciclo de desnaturalización inicial del ADN durante tres minutos a 95°C
- 40 ciclos con desnaturalización a 95°C por 30 segundos, hibridación a 58°C por 30 segundos y polimerización a 68°C durante 90 segundos
- un ciclo de polimerización final de siete minutos a 68°C.

Para la detección de ADN de bacterias del género *Bartonella* en muestras de pulgas se empleó una PCR convencional para amplificar un fragmento de 438-pb del gen que codifica la enzima citrato sintasa (*gltA*), utilizando los cebadores P24E: 5'-CCTTCAGTTMGGCTGGATC-3', y 16SR: 5'-GCCYCCTTGCGGTTAGCACAGCA-3', siguiendo el protocolo de ciclado descrito por Gil y col., 2010:

- un ciclo de desnaturalización inicial del ADN durante nueve minutos a 94°C
- 39 ciclos con desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación a 64.3°C por 60 segundos y polimerización a 72°C durante 90 segundos
- un ciclo de polimerización final de siete minutos a 72°C.

Las muestras positivas a la amplificación del gen *I6S* fueron sometidas a una PCR anidada para amplificar en primer lugar un fragmento de 531-pb del gen *gltA*, que codifica un fragmento del gen de la enzima citrato sintasa. Se emplearon los cebadores *gltA*-F2: 5'-GCTTTKCTGTCCDTGTGAAG-3' y *gltA*-R2: 5'-GCAAAAAGAACAGTAAACATTTC-3', y el siguiente protocolo (Gil y col., 2010):

- un ciclo de desnaturalización inicial del ADN durante nueve minutos a 94°C
- 39 ciclos con desnaturalización a 94°C por 30 segundos, hibridación a 50°C por 30 segundos y polimerización a 72°C durante 60 segundos

- un ciclo de polimerización final de siete minutos a 72°C.

A continuación, se reamplificaron 2 μ l del producto de la primera ronda de PCR con los cebadores *gltA*-F1: 5'-AAAATGCTICAAGAAATHGG-3' y *gltA*-R1: 5'-AGCTTTTAATGTAATDCCDG-3', obteniendo un fragmento final de 300 pb. Ambas reacciones se llevaron a cabo en las mismas condiciones descritas anteriormente para la primera ronda.

Todas las reacciones se llevaron a cabo con la enzima GoTaq© Green y Taq DNA Polymerase (Promega®), utilizando termociclador el Eppendorf© flexlid. Se utilizó agua libre de nucleasas como control negativo y como controles positivos dependiendo el caso, se utilizó ADN de *R. vinii*, *R. massilae*, *B. henselae*, *B. clarridgeiae*.

Los productos de la PCR de *Rickettsia* sp. y *Bartonella* sp. se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa (1,5% de agarosa en buffer TAE), se tiñeron con 0,5 μ g/ml de Sybr Green (Invitrogen, USA). En cada celda del gel se sembraron 6 μ l de las muestras amplificadas y se realizó la corrida a 90 V durante 30-45 min. En cada gel se sembraron también los controles positivos y negativos de amplificación y el marcador de peso molecular (ladder). La lectura se realizó mediante un transiluminador de luz ultravioleta.

Los productos de la PCR se purificaron con el kit HW DNA Puriprep-GP (Inbio, Argentina), y se secuenciaron utilizando los cebadores directos e inversos en secuenciadores automáticos CEQ 2000XL (Beckman Coulter, EE.UU.) y ABI 3730XLs (Macrogen, Corea).

Análisis de secuencias

Para el estudio de las bacterias *Rickettsia* se utilizaron las secuencias directas e inversas de todas las muestras para generar secuencias de consenso. Estas secuencias se alinearon y editaron utilizando MEGA v.10 (Kumar y col., 2018). Los haplotipos se identificaron utilizando DnaSP v.5 (Librado y Rozas, 2009) y se compararon con otras secuencias *gltA* y *ompB* de la base de datos GenBank utilizando la herramienta de búsqueda de alineación local básica (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Los alineamientos múltiples se realizaron con Clustal-W incorporado en MEGA v.10. La similitud y la identidad se calcularon utilizando el MatGat (Matrix Global Alignment Tool, Campanella y col., 2003).

La reconstrucción filogenética a partir de las secuencias de *gltA* se realizó utilizando Mr.Bayes v.3.2 (Ronquist y col., 2012). El mejor modelo de sustitución se seleccionó utilizando jModelTest bajo el Criterio de Información Bayesiano (BIC). Las secuencias disponibles de *R. asembonensis* (KY650697, KY445726, KX196267, MF281711, MK923723, MK923728,

MK923733, MK923738, MK923743), *R. felis* (JN375500, MG818715), *Rickettsia senegalensis* (KF666472), *R. typhi* (CP003398, MG952764), *R. prowazekii* (DQ926853), *Rickettsia rickettsii* (KF742602), *Rickettsia conorii* (EU716648), *Rickettsia massiliae* (CP003319), *Rickettsia akari* (U59717) fueron descargados del GenBank y utilizados para los análisis. La secuencia de *R. bellii* (CP000087) se utilizó como grupo externo. La inferencia bayesiana (BI) se generó utilizando Mr. Bayes v.3.2. Las probabilidades posteriores (PP) de los árboles filogenéticos se estimaron utilizando 10 millones de generaciones (muestreadas cada 1.000 generaciones) y cuatro Markov chain Monte Carlo (MCMC) acoplados a Metrópolis para permitir un tiempo adecuado de convergencia ($\leq 0,002363$). El primer 25% de los árboles muestreados se consideraron quemados. El árbol se visualizó con FigTree v.1.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Bacterias del género *Bartonella* fueron analizadas de pulgas de animales de compañía. La secuencia de citrato sintasa (*glta*) obtenida fue editada manualmente utilizando MEGA v.7 (Kumar y col., 2018). Esta se comparó con otras secuencias de la base de datos GenBank utilizando la herramienta de búsqueda de alineación local básica (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). La secuencia de *B. clarridgeiae* (número de acceso: KX001761, KY913634, KY913635, KY913636, FN645454) junto a las demás *Bartonella* spp. disponibles en GenBank (números de acceso: *B. rochalimae* (JF429602; JF429590), *B. henselae* (KY913627; KY913624; KY913626; MF364384; MH019305; HQ012580), *Bartonella tribocorum* (MG027995; MG027996), *Bartonella koehlerae* (AF176091; KY913638), *Bartonella quintana* (DQ383817; Z70014), *Bartonella vinsonii subsp. vinsonii* (Z70015), *B. vinsonii subsp. berkonoffii* (AF143445), *Bartonella* sp. (MH710576; MH710577; MH710578) se alinearon utilizando el programa MUSLE del software Geneious® (www.geneious.com/download). Se utilizó el software DnaSP v.5 (Librado y Rozas, 2009) para comparar el haplotipo obtenido con otras secuencias de *B. clarridgeiae* de diferentes orígenes geográficos disponibles en el GenBank y se calculó la similitud e identidad utilizando el software MatGat (Campanella y col., 2003). La inferencia filogenética se analizó utilizando secuencias de *Bartonella* spp. disponibles en el GenBank. El modelo de evolución de mejor ajuste se estimó utilizando el Criterio de Información Bayesiano (BIC) implementado en el software JModeltest v.2.1.7 (www.darwin.uvigo.es/our-software; Darriba y Posadas, 2012). La inferencia bayesiana (IB) se analizó utilizando el software MrBayes v.3.2 (Ronquist y col., 2012), se ejecutaron cuatro Markov Chain Monte Carlo (MCMC) acoplados a Metropolis durante 220.000 generaciones para permitir un tiempo adecuado para la convergencia (≤ 0.005778). El primer 25% de los árboles muestreados se consideraron quemados. El árbol se visualizó con FigTree V1.4. (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). Se utilizó la secuencia de *B. bacilliformis* (número de acceso: CP014012) como grupo externo.

Además, se analizó la presencia de bacterias *Bartonella* en pulgas de animales silvestres. Las secuencias de nucleótidos se editaron y alinearon mediante el método de alineación MUSCLE en el programa Geneious versión 5.4.7. Las secuencias editadas se examinaron en busca de similitud con secuencias de ADN conocidas utilizando el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NIH/NCBI (National Center for Biological Information). Se realizó un análisis filogenético basado en las secuencias obtenidas y comparadas con otras secuencias *gltA* de la base de datos GenBank, utilizando la herramienta de búsqueda de alineación local básica (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)

Se utilizó JModeltest (Posada, 2008) y el criterio de inferencias bayesianas (BIC) para hallar el modelo de sustitución mejor ajustado. El árbol filogenético se produjo mediante el método de inferencia bayesiana (IB) utilizando el software MrBayes 3.2.6 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003), las probabilidades posteriores (PP) se estimaron utilizando 1 millón de generaciones, incluyendo 4 cadenas de Monte Carlo Markov. El apoyo a la topología se examinó utilizando bootstrapping (opción heurística) sobre 1000 réplicas para evaluar la fiabilidad relativa de los clados. El primer 25% de los árboles muestreados se consideraron quemados. Para la visualización del árbol final se utilizó el programa Figtree 1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Se utilizó *Brucella abortus* (número de acceso del Genbank: CP034695) como grupo externo ya que este es el género más cercano taxonómicamente a *Bartonella* (La Scola y col. 2003). Para las relaciones filogenéticas se utilizaron las secuencias: (*B. rochalimae* (FN645459, KU29571); *B. clarridgeiae* (MK977726, MN101209, MN107413); *Bartonella rattaaustraliani* (EU111795); *B. taylorii* (AF191502); *B. vinsonii berkhoffii* (CP003124, MT741531); *B. vinsonii arupensis* (AF214557, FJ946844); *B. koelherae* (KY913638, FJ832088, MN107416, MH019306); *B. henselae* (AJ439406, KY913626); *Bartonella elizabethae* (NZLFMF01000002); *Bartonella queenslandensis* (JX158355, MG027994); *Bartonella grahamii* (CP001562, Z70016); *B. tribocorum* (KT324581, MG027995, KT324541, AJ005494); *B. bacilliformis* (CP0005494); *Bartonella shoenbuchensis* (HG977196); *Bartonella chomelii* (KM215690); *Bartonella tamiae* (JH725147); *B. apis* (CP015820); *Bartonella* sp. (KX270253, KX270254, KX270234, KX086730, KX086716, AF082322, MN613441, MH279892, KY304482, KX086720, MN787563, MN787564, MN787565, MN787566).

El análisis evolutivo se llevó a cabo en MEGA 10.0.5 (Kumar y col., 2018), la divergencia evolutiva se estimó sobre el número de diferencias de bases por sitio a partir del promedio de todos los pares de secuencias entre los grupos se muestran y se expresa en porcentaje. La variación de la tasa entre sitios se modeló con una distribución gamma (parámetro de forma = 1).

4.3 Resultados

Bacterias del género Rickettsia

Todos los pools de *C. f. felis*, *C. m. minerva* y el 50% de las muestras de *T. penetrans* fueron positivos para la amplificación de un fragmento de los genes *gltA* y *ompB*, mientras que no se han detectado muestras positivas para estos genes en las demás especies de pulgas analizadas (*P. (P.) rimatus*, *P. (P.) roberti*, *A. i. intermedia* y *A. a. antiquorum*). La prevalencia mínima de *Rickettsia* spp. detectada en las pulgas *C. f. felis* colectadas de *D. albiventris* fue del 28,7%. En el caso de *C. f. felis* colectadas en perros y gatos, la prevalencia mínima fue del 27,5% y del 55,2% respectivamente (Tabla 4.1).

Tabla 4.1. Prevalencia mínima de *Rickettsia* sp. en pulgas infestando perros, gatos, comadrejas y roedores en Puerto Iguazú, Misiones. (MP=pool+/n (%): pools positivos/número de pulgas testeadas)

Hospedador	Examinados	<i>Rickettsia</i> sp. (pool +/n (%))*							Total
		<i>Ctenocephalides f. felis</i>	<i>Tunga penetrans</i>	<i>Adoratopsylla a. antiquorum</i>	<i>Adoratopsylla i. intermedia</i>	<i>Craneopsylla m. minerva</i>	<i>Polygenis (P.) rimatus</i>	<i>Polygenis (P.) roberti</i>	
<i>Didelphis albiventris</i>	35	33/115 (28,7%)		0/2 (0%)			0/17 (0%)		
<i>Monodelphis dimidiata</i>	1						0/3 (0%)		
<i>Philander frenatus</i>	3				0/3 (0%)		0/1 (0%)		
<i>Didelphis aurita</i>	7			0/1 (0%)	0/4 (0%)			0/6 (0%)	
<i>Akodon montensis</i>	17						0/23 (0%)		
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	3					1/1 (100%)	1/2 (50%)		
<i>Rattus rattus</i>	3						0/3 (0%)		
<i>Canis lupus familiaris</i>	28	27/98 (27,5%)	2/4 (50%)						
<i>Felis catus</i>	16	16/29 (55,2%)							
Total	113	76/242 (31,4%)	2/4 (50%)	0/3 (0%)	0/7 (0%)	1/1 (100%)	0/49 (0%)	0/6 (0%)	79/312 (25,3%)

*Prevalencia mínima: no. de pool de pulgas positivas a la PCR/total no. de pulgas testeadas. Se asume que cada pool positivo a la PCR contiene ADN de al menos una pulga infectada con *Rickettsia*

Se analizaron genéticamente un total de 10 secuencias de fragmentos del gen *gltA* de muestras individuales de *C. f. felis* colectadas de perros y gatos. La longitud de los fragmentos era de 784 pb y se identificó un único haplotipo (números de acceso del GenBank: MW205508, MW205509). Este haplotipo era 100% similar a las muestras de *R. asembonensis* de Perú (KY650697, MK923723, MK923728, MK923733, MK923738, MK923743) y Brasil (KX196267, KY445726). Las secuencias de Perú y Brasil se obtuvieron de muestras de pulgas *C. canis* y garrapatas *R. sanguineus*. El análisis BI se construyó utilizando el modelo HKY+G como el más apropiado para los datos (-lnL=2279,26; BIC=4758,50; Delta BIC=0; G=0,15). El clado de *R. asembonensis* se agrupó con PP = 1,0; *R. felis*, y *R. senegalensis* se agruparon dentro de un clado monofilético con *R. asembonensis*, apoyado por 0,96 PP (Fig. 2).

Además, se analizaron tres secuencias de fragmentos del gen *ompB* de muestras agrupadas de 13 *C. f. felis* colectadas en gatos, perros y *D. albiventris*. La longitud de los fragmentos era de 796 pb y se identificó un único haplotipo (número de acceso al GenBank: MW383252). Este haplotipo era 100% similar a las secuencias de *R. asembonensis* de Perú (KY650699, MK923721, MK923726, MK923731, MK923736, MK923741) y Brasil (KY445737- KY445742), obtenidas de muestras de pulgas de *C. canis* y *C. f. felis* (Figura 4.1).

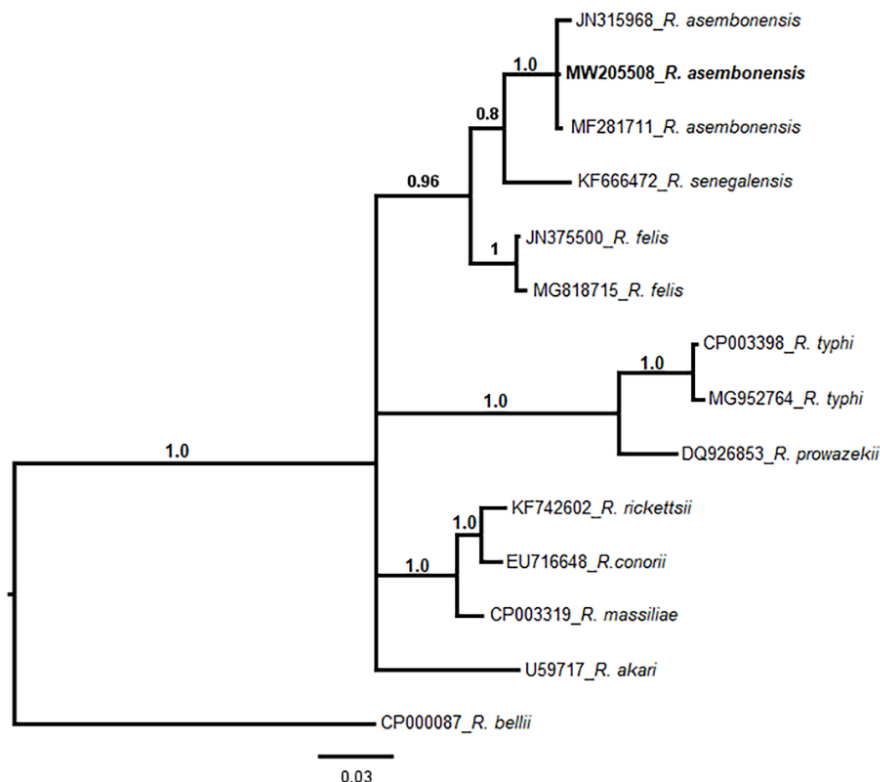


Figura 4.2. Árbol de topología de inferencia bayesiana (IB) para 784 nucleótidos del gen *gltA* de las especies de *Rickettsia* inferido utilizando el modelo HKY+G. Los números de cada rama (sobre la rama) representan las probabilidades posteriores obtenidas en la IB. Se utilizó *Rickettsia bellii* como grupo externo. La barra de escala representa el número esperado de sustituciones de nucleótidos por sitio. La secuencia obtenida está resaltada en negrita.

Bacterias del género Bartonella

A partir del análisis de ADN basado en el fragmento del gen *gltA* se detectaron muestras positivas para *Bartonella* spp. en pulgas *C. f. felis* (4,44%) y *P. (P.) rimatus* (16,6%) que se hallaban parasitando comadrejas *D. albiventris* de áreas urbanas y periurbanas; pulgas *P. (P.) r. roberti* (40%) colectadas de *D. aurita* en PNI; de *P. (P.) rimatus* (52,7%) y *C. m. minerva* (100%) colectadas de roedores *A. montensis* y *O. nigripes*, respectivamente, en PPU y PPPP, y pulgas *C. f. felis* colectadas de perros (2,6%) y gatos (9,5%) de áreas urbanas y periurbanas. Por otra parte, se obtuvieron resultados positivos para la amplificación del mismo fragmento de gen *gltA* sobre muestras de tejido de bazo de roedores *A. montensis* (7,14%) y *R. rattus* (9,61%) capturados en el área periurbana de Puerto Iguazú (Tabla 4.2).

Tabla 4.2. Prevalencia mínima de *Bartonella* sp. en pulgas infestando animales de compañía y silvestres de Misiones, Argentina. (MP=pool+/n (%): pools positivos/número de pulgas testeadas)

Hospedador	Examinados	Bazo		<i>Bartonella</i> sp. (pool +/n (%))*					Total	
		Analizados	<i>gltA</i> n (%)	<i>Ctenocephalides f. felis</i>	<i>Adoratopsylla a. antiquorum</i>	<i>Adoratopsylla i. intermedia</i>	<i>Craneopsylla m. minerva</i>	<i>Polygenis (P.) rimatus</i>		<i>Polygenis (P.) r. roberti</i>
<i>Didelphis albiventris</i>	22			2/45 (4,44%)	0/2 (0%)			1/6 (16,6%)		
<i>Monodelphis dimidiata</i>	1							0/3 (0%)		
<i>Philander quica</i>	2					0/1 (0%)		0/1 (0%)		
<i>Didelphis aurita</i>	4				0/1 (0%)				2/5 (40%)	
<i>Akodon montensis</i>	42	42	3 / 7,14%					19/36 (52,7%)		
<i>Brucepattersonius</i> sp.	1							0/1 (0%)		
<i>Euryoryzomys russatus</i>	1							0/1 (0%)		
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	3	3	0%				1/1 (100%)	1/2 (50%)		
<i>Rattus rattus</i>	3	52	5 / 9,61%					0/3 (0%)		
<i>Mus musculus</i>	19	19	0%							
<i>Canis lupus familiaris</i>	79			6/229 (2,6%)						
<i>Felis catus</i>	24			4/42 (9,5%)						
Total	201	122	8 / 6,55%	12/316 (3,8%)	0/3 (0%)	0/1 (0%)	1/1 (100%)	21/53 (39,6%)	2/5 (40%)	36/379 (9,5%)

*Prevalencia mínima: no. de pools de pulgas positivas a la PCR/no. total de pulgas analizadas. Se asume que cada pool positivo a la PCR contiene ADN de al menos una pulga infectada con *Bartonella*

Se llevó a cabo el análisis de un fragmento de 463 pb del gen *gltA* obtenido de una pulga *C. f. felis* de gato. Los resultados del BLAST identificaron la secuencia como *B. clarridgeiae* (número de acceso al GenBank: MN101209) compartiendo efectivamente el haplotipo (100% de identidad y similitud) con *B. clarridgeiae* de Chile (KY913634-KY913636), Suiza (FN645454) y Tailandia (KX001761). De manera similar, otras dos secuencias presentan el mismo haplotipo, aunque el fragmento disponible en el GenBank era más pequeño (China: EU770616 y Engly: MG384320), por esta razón, no se incluyeron en los análisis filogenéticos. El análisis BI se construyó utilizando el modelo HKY + G como el más apropiado para los datos (-lnL=1787,42; BIC=3894,0; Delta BIC=0) con gamma de 0,33. Se identificaron dos clados principales (1,0 PP) a) el primero apoyado por 1,0 PP que está compuesto por *B. clarridgeiae* y *B. rochalimae* y b) el segundo apoyado por 0,9 PP que está compuesto por dos subclados 1) *B. henselae*, *B. koehlerae*, *B. quintana*, 2) *B. spp.*, *B. vinsonii* y *B. tribocorum* (Figura 4.2).

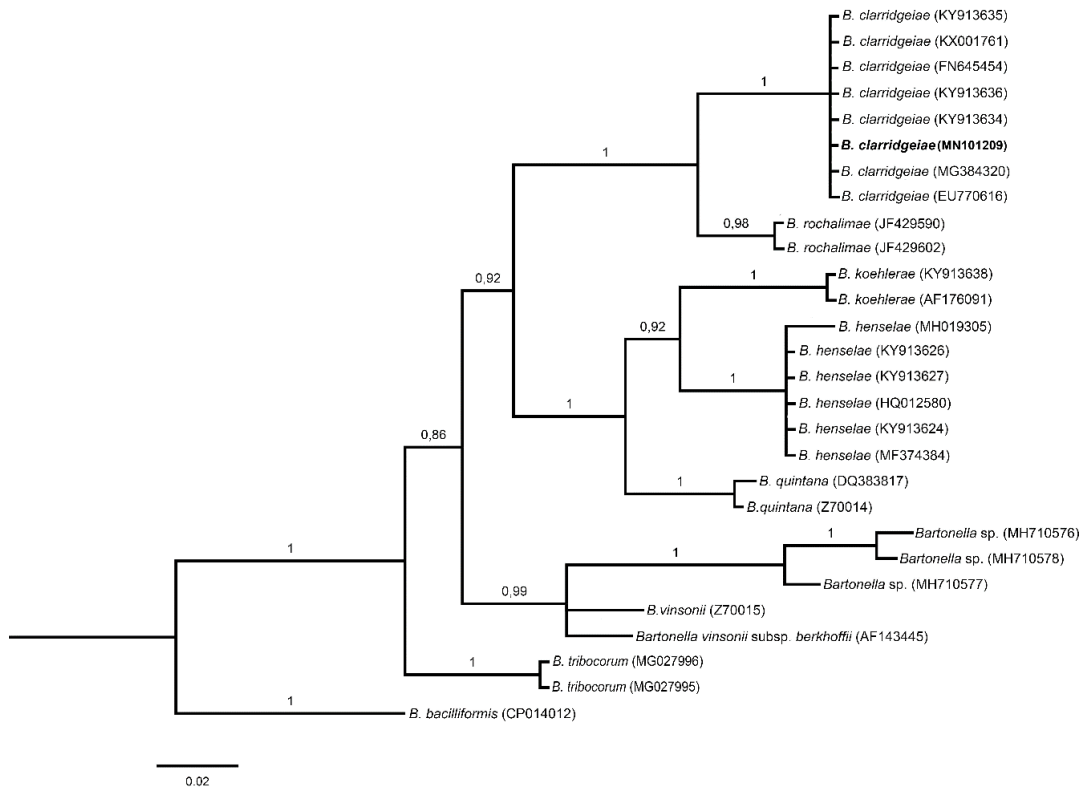


Figura 4.3. Árbol filogenético de *Bartonella clarridgeiae* construido por el método de Inferencia Bayesiana, utilizando el modelo HKY + G. Los valores de las probabilidades posteriores se muestran en las ramas. Se utilizó *Bartonella bacilliformis* como grupo externo. La barra de escala representa el número esperado de sustituciones de nucleótidos por sitio.

Para identificar los genotipos de *Bartonella* que circulan en pulgas colectadas de roedores y marsupiales de diferentes ambientes de la provincia Misiones, se compararon siete secuencias de muestras individuales para el fragmento de gen *gltA* con otras secuencias previamente

4.4 Discusión

El presente estudio revela la presencia de bacterias *Rickettia* y *Bartonella* en pulgas *C. f. felis* colectadas en perros y gatos domésticos y en roedores y marsupiales de la provincia de Misiones. Este es el primer informe de *R. asebonensis* en *C. f. felis* en Argentina. Investigaciones anteriores sobre bacterias rickettsiales del país incluyen, *R. felis* asociada a *C. f. felis* colectada en perros peridomésticos en la provincia de Santa Fe (Nava y col., 2008), y *Polygenis (P.) axius axius* (Rhopalopsyllidae) colectada en un roedor sigmodontino en una zona urbanizada de la provincia de Buenos Aires (Melis y col., 2020).

En este estudio, los análisis moleculares sostienen que la infección por *R. asebonensis* está extendida entre las poblaciones de *C. f. felis* en la ciudad de Puerto Iguazú. De hecho, se encontró un solo haplotipo circulante en el país, que es compartido con *R. asebonensis* determinado en Perú y Brasil en muestras de pulgas de *C. f. felis*, *C. canis* y garrapatas de *R. sanguineus* (Silva y col., 2017; Loyola y col., 2018). Por otro lado, no se obtuvieron secuencias de *R. felis*; en concordancia con estudios previos que reportan una prevalencia de *R. asebonensis* de hasta el 100% en pulgas de *C. f. felis* presentes en animales de compañía y comadrejas, asociada a una menor prevalencia de *R. felis* (Jiang y col., 2013; 2016; Silva y col., 2017).

La pulga del gato, *C. f. felis*, es el único vector reconocido de *R. felis* y actualmente es el principal vector de la fiebre manchada transmitida por pulgas (Nava y col., 2008), lo que realza su importancia como vector de patógenos zoonóticos. Además, esta pulga es capaz de hospedar a *R. typhi*, y podría estar involucrada en ciclos urbanos que incluyan otros mamíferos hospedadores además del tradicional de las ratas y pulgas de rata (Legendre y Macaluso, 2017). El comportamiento polixeno de esta pulga y la capacidad de desplazamiento sin restricción de los perros, genera que las pulgas puedan ser transportadas entre poblaciones humanas y áreas naturales, por lo tanto, entre animales domésticos y silvestres (Dobler y Pfeffer 2011, Dantas-Torres et al. 2012). Sugiriendo que los carnívoros silvestres estarían más expuestos a *Ctenocephalides* spp. en áreas de interfaz y estrecho contacto con humanos y sus animales domésticos.

Entre los organismos similares a *R. felis* (RFLO) descritos, solo *R. asebonensis* y *Candidatus R. senegalensis* han sido cultivados y caracterizados a partir de *C. f. felis* (Mediannikov y col., 2015). Hay pocos estudios sobre la patogenicidad de estos organismos similares a *R. felis*; sin embargo, hallazgos recientes informan de la presencia de *R. asebonensis* en la sangre de humanos con síndrome febril agudo inespecífico en Perú (Palacios-Salvatierra y col., 2018), así como de *Rickettsia* sp. RF2125/"*Ca. R. aseboensis*" en sangre de monos sanos de Malasia peninsular (Tay y col., 2015).

A pesar de la proximidad espacial entre mamíferos domésticos y silvestres en el área de estudio, no se encontró ADN de rickettsias en pulgas de comadrejas y roedores (Tabla 4.1). La ausencia de especies de *Rickettsia* en las pulgas *P. (P.) rimatus*, *A. i. intermedia* y *A. a. antiquorum*, que co-infectan al mismo hospedador con *C. f. felis*, no está clara y debería investigarse en profundidad teniendo en cuenta la relevancia epidemiológica de la presencia de pulgas silvestres en los ciclos de infección urbanos.

Estudios anteriores reportaron una alta prevalencia de *R. asembonensis* en *C. f. felis* y *C. canis*, y una baja prevalencia en otras especies coinfectantes como *Echidnophaga gallinacea*, *Xenopsylla cheopis* y *Pulex irritans* (Jiang y col., 2013; Silva y col., 2017). Como los mecanismos de transmisión de patógenos por parte de las pulgas suelen ser multifactoriales, y cada especie tiene varias vías de transmisión para asegurar su mantenimiento, es fundamental profundizar en estudios experimentales sobre la capacidad vectorial de las diferentes especies de pulgas para transmitir bacterias rickettsiales. Sobre todo, teniendo en cuenta su amplia distribución en la ecorregión de la Mata Atlántica y las conclusiones aportadas por Horta y col. (2007), Melis y col. (2020) y Schott y col. (2020) donde se reporta la infección en pulgas neotropicales por *Rickettsia* spp., y se sugiere su potencial rol como vectores y transmisoras de enfermedades.

Respecto a las primeras evidencias de *B. clarridgeiae* en pulgas *C. f. felis* de Argentina, sugerimos la presencia de enfermedades conexas transmitidas por pulgas en la región. Estudios previos detectaron *B. clarridgeiae* en el 5,9% de los gatos examinados en Buenos Aires, mientras que todos los perros dieron negativo en los ensayos de hibridación PCR y Reverse Line Blot (Cicuttin y col., 2014). Otros informes de *Bartonella* en Argentina incluyen *B. henselae* y *B. quintana* en humanos, *B. henselae* y *B. vinsonii* subsp. *berkhoffii* en caninos y *B. henselae* en felinos (Cicuttin y col., 2019). En nuestro análisis identificamos el mismo haplotipo de *B. clarridgeiae* circulando en varios países del mundo como Chile, Suiza, Tailandia, China e Inglaterra sugiriendo un polimorfismo genético nulo en el gen *gltA*. La identificación de *B. clarridgeiae* en pulgas *C. f. felis* de los gatos reportados aquí es consistente con la literatura, considerándolo principal vector de *B. clarridgeiae*, *B. henselae* y *B. koehlerae*. Los gatos domésticos son reservorios naturales de *B. clarridgeiae* y los perros también pueden estar infectados con estos patógenos (Abdullah y col., 2019). Como mencionamos anteriormente, la evidencia de exposición a *Bartonella* spp., en el caso de encefalitis en la joven de Eldorado, y en el sur de Brasil en gatos reportados, da cuenta que la prevalencia de *Bartonella* en humanos es subestimada, probablemente, una de las razones se debe a que los síntomas inespecíficos de este patógeno son comunes a otras enfermedades.

Otros mecanismos de infección de *Bartonella* en humanos pueden ocurrir a través de transfusiones/trasplantes de órganos, contacto con saliva de artrópodos o sus heces en el caso de

la enfermedad del arañazo de gato (CSD) (Reeves y col., 2005). En este complejo escenario de riesgo, es imprescindible monitorear la posible presencia de vectores asociados, así como incluir a *Bartonella* en el diagnóstico de las patologías emergentes, según la epidemiología y la presentación clínica. Cabe remarcar, que los estudios sobre los patógenos de enfermedades transmitidas por las pulgas son importantes para el seguimiento del estado de la sanidad animal y los riesgos implicados en salud pública.

Por otra parte, éste es el primer estudio sobre *Bartonella* spp. en pulgas de roedores y comadrejas para la región noreste del país, así como la primera detección de *Bartonella* spp. en tejido de bazo de roedores *R. rattus* y *A. montensis* y en pulgas *P. (P.) rimatus*, *P. (P.) roberti*, *C. m. minerva* de Argentina. Es importante destacar que las especies de roedores, comadrejas y pulgas analizados aquí, se distribuyen ampliamente a lo largo del Bosque Atlántico abarcando Paraguay y Brasil. La prevalencia de *Bartonella* detectada en bazo (6,5%) y pulgas (9,5%) se encuentra dentro del rango informado en diferentes regiones del mundo (Gutiérrez y col., 2015); particularmente en distintos biomas de Brasil, la ocurrencia de *Bartonella* spp. entre roedores varía entre 3,2% y 35,9% (Gonçalves y col., 2016).

En el caso de los genotipos B20 y B124, estos comparten un 97.8% de similitud entre sí, además de la misma especie de pulga donde fueron detectadas, sin embargo, los hospedadores y áreas de distribución son diferentes. Este hallazgo evidencia un fenómeno descrito como spillover, donde las pulgas que parasitan a roedores de diferentes especies juegan un papel fundamental como vectores y amplificadores de la diversidad genética de bartonellas (Buffet y col., 2013, Kosoy y col., 2012, Gutierrez y col., 2015). Por eso hipotetizamos que el conjunto de variantes de *Bartonella* detectadas en las pulgas podría reflejar el conjunto de variantes de *Bartonella* detectadas sobre sus especies de hospedadores. Así, poblaciones separadas de la misma especie de parásito pueden a menudo circular y persistir independientemente en poblaciones de especies hospedadoras diferentes y simpátricas.

En el análisis filogenético de las restantes secuencias cabe destacar la estrecha relación entre bartonellas detectadas en roedores sigmodontinos y en pulgas *Polygenis* de Brasil y roedores de la Reserva Costanera Sur de Argentina (De Salvo y col., 2020), formando un clado monofilético separado de otras especies de *Bartonella*. Retomando el interrogante formulado por Gonçalves y col., (2016) sobre si las relaciones filogenéticas entre las secuencias analizadas podrían representar nuevas especies o genotipos de *Bartonella*, el criterio utilizado varía según los distintos autores (Kosoy y col., 2018). Según La Scola y col., (2003), los genes *gltA* y *rpoB* son los marcadores más potentes para la demarcación de nuevas especies de *Bartonella*, cuando existe una similitud de secuencia inferior al 96,0% y al 95,4%, respectivamente. Entre las secuencias de *gltA* amplificadas la máxima divergencia de nucleótidos fue del 93% para el grupo

I), y de 95% para el grupo II), lo que sugiere que las secuencias no son similares a las mismas *B. rochalimae* y *Bartonella* spp. respectivamente según la definición de especie propuesta por La Scola y col., 2003, proponiendo que los nuevos aislamientos de *Bartonella* deben ser considerados como nuevas especies.

En nuestro análisis las muestras positivas de tejidos de bazo de roedores y de las pulgas de *D. albiventris* pertenecen a sitios del área periurbana. Mientras, el total de las pulgas de roedores silvestres y comadreja *D. aurita* positivas para la amplificación pertenecen a áreas protegidas. En la diversidad de estas bacterias podría desempeñar un rol sustancial su propagación entre especies de roedores y la interacción de diferentes genotipos dentro del mismo hospedador. Por esta razón, la investigación sobre la ecología de las poblaciones de roedores, comadrejas y sus pulgas se torna fundamental para la comprensión de las interacciones en el ciclo bartonella-pulga-hospedador, y cómo la especificidad del ectoparásito puede contribuir a asociaciones entre la bacteria y los mamíferos silvestres (Gutiérrez y col., 2015).

Estudios epidemiológicos y experimentales constatan la importancia de *C. f. felis* y otras especies en la transmisión de bacterias entre humanos, gatos, perros y otros mamíferos en todo el mundo (Bitam y col., 2010). Este vector, al que se hace referencia principalmente en los gatos, se ha reportado coinfectando junto a otras especies de pulgas en carnívoros silvestres y animales sinantrópicos como ratas y comadrejas.

La urbanización de las áreas naturales se asocia a la aparición de enfermedades infecciosas. Los roedores y comadrejas, se adaptan a los entornos urbanos y periurbanos, facilitando la transmisión de enfermedades entre especies con los animales domésticos, y potencialmente con sus propietarios, como dispersores mecánicos de ectoparásitos infectados.

Al estar la ciudad de Puerto Iguazú ubicada en la frontera de tres países (Argentina, Paraguay y Brasil), se convierte en una zona de intenso tránsito transfronterizo e interacciones entre fauna silvestre, humanos (residentes y turistas) y animales domésticos en estrecho contacto con áreas naturales conservadas como los continuos Parques Nacionales de Iguazú de Brasil y Argentina. Dada su importancia epidemiológica, las áreas de interfaz, como las zonas periurbanas-rurales que actúan como zonas de amortiguación entre las reservas naturales y los entornos urbanos, representan un punto de control crítico para la transmisión de zoonosis. La existencia de extensas áreas de interfase entre reservas naturales y sitios periurbanos-rurales en el norte de la provincia de Misiones en Argentina hace que este tipo de estudios sean relevantes desde la perspectiva de "*Una salud*", necesarios para identificar la potencial emergencia de enfermedades zoonóticas y para detectar y dar seguimiento a eventos en hospederos no reportados.

Los resultados de este estudio aportan información útil sobre la presencia de *R. asemonensis* infectando a pulgas de *C. f. felis* en animales sinantrópicos y de compañía, además de la presencia de *Bartonella* spp. en pulgas y tejido de roedores y comadrejas en el área trifronteriza del noreste argentino. Por todo lo expuesto, se recomienda para futuras investigaciones promover la vigilancia de las infestaciones por pulgas, las tasas de contacto entre sus hospedadores que podrían actuar como verdaderos reservorios de estas y otras especies de *Rickettsia* y *Bartonella*, y la evaluación del riesgo de exposición en humanos.

Conclusiones finales y perspectivas futuras

Nuestros estudios aportan nuevos conocimientos sobre la diversidad, ecología y epidemiología de las pulgas asociadas a animales silvestres, domésticos y poblaciones humanas principalmente en la ciudad de Puerto Iguazú, y en cultivos de Wanda, y en diferentes sitios de áreas selváticas y protegidas de la provincia de Misiones; además, esta tesis explora las implicancias en la interfaz urbana-periurbana-selvática, y las dinámicas entre la fauna silvestre, doméstica y la salud humana y animal.

Ampliamos el escaso registro previo, mencionando por primera vez para la provincia de Misiones tres especies y otras cuatro subespecies de pulgas pertenecientes a cuatro familias (Pulicidae: *C. f. felis*; Stephanocircidae: *C. m. minerva*; Rhopalopsyllidae: *P. (P.) platensis*, *P. (P.) r. beebei*, *P. (N.) pradoi*, *P. (N.) pygaerus*; Ctenophthalmidae: *A. (T.) i. intermedia*), y dos nuevos reportes para Argentina (*P. (P.) r. roberti*; *A. (A.) a. ronnai*). Además, se informa de veintidós nuevas asociaciones parásito/hospedador para el país, de las cuales doce ya se habían registrado para el Brasil, mientras que siete son nuevas en la ecorregión del Bosque Atlántico. Estos hallazgos aumentan el conocimiento sobre la riqueza y diversidad de pulgas en la ecorregión de la Selva Paranaense de la Argentina, y aunque no fueran contemplados en los objetivos de este trabajo, la dificultad en la detección de complejos de especies de pulgas exige la utilización de técnicas moleculares y genes específicos para determinarlas con mayor precisión.

Entre las pulgas identificadas, el género *Polygenis*, Familia Rhopalopsyllidae, resultó ser dominante en la ecorregión, asociado a catorce especies hospedadoras, siendo *A. montensis* el roedor más frecuente y con mayor prevalencia de infestación, además de ser la especie hospedadora con mayor porcentaje de infestación por *P. (P.) rimatus*. Esta especie de pulga silvestre es dominante en las áreas antropizadas asociadas a *D. albiventris* y a *M. dimidiata*, predominando en el área periurbana. A su vez, la mayor proporción de pulgas colectadas asociadas a comadrejas estuvo representada por tres subespecies del género *Adoratopsylla*. La pulga *A. a. ronnai* representa una nueva especie registrada para el país y *A. a. antiquorum* una nueva asociación parásito-hospedador, ambas asociadas a *D. albiventris*.

En los entornos antropogénicos en los que la fauna silvestre y los animales domésticos comparten el hábitat, las coinfecciones con más de una especie de pulga asociada a diferentes entornos se evidenciaron principalmente en *D. albiventris* en áreas periurbanas. Estos hallazgos ponen de relieve por un lado el movimiento de especies hospedadoras silvestres en áreas urbanas, y por otra parte la circulación de sus pulgas entre los entornos silvestre y los ecosistemas urbanos desempeñándose con un rol importante en el ciclo de los patógenos zoonóticos que afectan a las comadrejas, los roedores, los animales de compañía, domésticos y a humanos.

En las áreas urbana y periurbana muestreadas, *T. penetrans* y *C. f. felis* resultaron las especies de pulgas dominantes asociadas a animales de compañía. La presencia y abundancia de pulgas en perros y gatos se debe a múltiples factores que influyen en la dinámica de la infestación por pulgas a nivel local. Esto queda evidenciado en las variables analizadas en los modelos de este estudio; tales como factores asociados al hospedador, la edad del animal, la colocación de antiparasitario externo, la condición de semirestricción del animal; factores asociados al ambiente como el tipo de área, fumigación del domicilio, condiciones edafológicas y cobertura vegetal del peridomicilio, la presencia de perros infestados en la vivienda, y por último, factores asociados a las condiciones climáticas, humedad y temperatura relativa.

Las elevadas prevalencias de infestación por tungiasis canina registradas en esta tesis, estuvieron asociadas a una baja supervisión de la circulación de los animales fuera del domicilio, particularmente en las áreas periurbanas. Aquí la cobertura vegetal y el tipo de suelo constituyen factores importantes que modula la presencia/ausencia y abundancia de pulgas en el ambiente. Estos factores suponen un riesgo para la salud de los animales, que pueden convertirse en reservorios y centinelas de enfermedades para las personas y otros animales domésticos y sinantrópicos.

La tungiasis es una ectoparasitosis zoonótica extendida no solo entre los animales domésticos, principalmente los perros, sino también entre las personas de la comunidad de Puerto Iguazú, intensificado en los barrios afectados por condiciones socio-económicas y socio-ambientales de alta vulnerabilidad. Presumiblemente, los factores que favorecen la alta prevalencia de patologías graves en las personas, especialmente en los niños, son de índole estructural: la falta de acceso a productos para el control de ectoparásitos, la escasa información sobre el ciclo de vida de la pulga, sobre su tratamiento y prevención, la desprotección propiciada por la ausencia o el tipo de calzado utilizado, y la negligencia de los servicios de salud municipales y provinciales. Concluimos que la tungiasis, al tratarse de una zoonosis, y teniendo en cuenta sus intrincados vínculos con la pobreza y la vulneración de los derechos humanos requiere una investigación transdisciplinar en la que deben interactuar la salud pública, la zoonosis, las ciencias sociales, la educación sanitaria.

El presente estudio revela la presencia de bacterias *Rickettia* y *Bartonella* en pulgas colectadas en perros y gatos domésticos y en roedores y marsupiales de la provincia de Misiones. La detección de *Rickettsia* y *Bartonella* en pulgas de animales de compañía y sinantrópicos requiere una atención especial desde un enfoque de salud pública. Si bien, aún no existe acuerdos sobre la patogenicidad de *R. asembonensis*, *R. felis* es un agente zoonótico y representa un riesgo potencial para la salud humana, sobre todo teniendo en cuenta que *C. felis* está ampliamente distribuido en los animales domésticos, y que puede parasitar humanos y especies silvestres.

Dadas las implicaciones para la salud pública de los ectoparásitos estudiados y su considerable prevalencia consideramos a los perros y comadrejas como un eslabón eco-epidemiológico clave en la interfaz entre las poblaciones humanas, los animales domésticos y la fauna silvestre, porque podrían compartir ectoparásitos y potencialmente patógenos, en una posible dinámica de contagio y retroalimentación.

La perturbación antropogénica favorece varias condiciones que conducen a la propagación de enfermedades transmitidas por las pulgas, a saber, niveles de infestación más altos, mayor abundancia de pulgas, por una mayor utilización de los hospederos. Dado que el área de estudio incluye sitios de diferentes perturbaciones antropogénicas (periurbanos, agrícolas y áreas forestales protegidas) que están en estrecho contacto, se debe considerar la propagación del patógeno y/o el derrame entre paisajes adyacentes para evaluar los riesgos de transmisión de enfermedades.

Respecto a la posible subestimación de la patogenicidad de *Bartonella* y subregistro de su infección en humanos, debido a que los síntomas de esta bacteria son comunes a otras enfermedades, sugerimos que su diagnóstico sea incorporado en la prospección de los análisis clínicos.

En cuanto a las perspectivas futuras, la existencia de extensas zonas de interfaz en Puerto Iguazú, cuyas interacciones entre animales silvestres, domésticos y humanos, en reservas naturales y sitios rurales y periurbanos contiguos, exigirá el desarrollo de estudios eco-epidemiológicos abordados desde el enfoque de "*Una Salud*", tornándose imprescindible continuar monitoreando los ensambles de pulgas en cada escenario particular, para alertar acerca de cambios en la abundancia de las especies y su potencial rol como vectores, georreferenciar la distribución de las mismas y sus hospedadores, y continuar describiendo las características ambientales y climáticas que favorecen la abundancia de vectores, a distintas escalas, para hacer modelos predictivos y validarlos en terreno, y así poder anticipar la presencia de pulgas de interés sanitario.

Referencias

- Abbot P., Aviles A.E., Eller L., Durden L.A. (2007). Mixed infections, cryptic diversity, and vector-borne pathogens: Evidence from *Polygenis* fleas and *Bartonella* species. *Appl Environ Microbiol*; 73:6045–6052.
- Abdullah, S., Helps, C., Tasker, S., Newbury, H., y Wall, R. (2019). Pathogens in fleas collected from cats and dogs: Distribution and prevalence in the UK. *Parasites and Vectors*, 12. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3326-x>
- Acha, P.N., y Szyfres, B. (2003). Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales: Volumen I: Bacteriosis y micosis. *Organización Panamericana de la Salud*.
- Almeida, A.J.D., Torquetti, C.G., y Talamoni, S.A. (2008). Use of space by neotropical marsupial *Didelphis albiventris* (Didelphimorphia: Didelphidae) in an urban forest fragment. *Revista Brasileira de Zoologia*, 25, 214-219.
- Azrizal-Wahid, N., Sofian-Azirun, M., y Low, V.L. (2019). Risk factors associated with flea infestation on cats. *Tropical Biomedicine*, 36(4), 810-821.
- Barsky, A. (2005). El periurbano productivo: un espacio en constante transformación. Introducción al estado del debate y referencias al caso de Buenos Aires. *Scripta Nova*. Barcelona 9: 194(36). <http://www.ub.edu/geocrit/sn/sn-194-36.htm>
- Barros-Battesti, D.M., Linardi P.M., y Botelho J.M., (1993). Ectoparasites of some wild rodents from Parana State, Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 30 (6), 1068-1070.
- Barros-Battesti, D.M. y Arzua, M., (1997). Fleas of marsupial in the State of Paraná, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 92 (4), 485-486.
- Bárquez, R.M., M.M. Díaz y R. Ojeda. (2006). Mamíferos de Argentina: sistemática y distribución. *Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos*. Tucumán, 359 págs
- Beaucournu, J-C., Gallardo, M.N. (1988). Puce nouvelles d'Argentine (Insecta, Siphonaptera). *Revue suisse de Zoologie* 95(1):99–112 DOI 10.5962/bhl.part.79641.
- Begon, M., Harper, J.L. y Townsend C.R. (1988). *Ecología: individuos, poblaciones y comunidades*. Ediciones Omega, Barcelona.
- Beugnet, F., Porphyre, T., Sabatier, P., y Chalvet-Monfray, K. (2004). Use of a mathematical model to study the dynamics of *Ctenocephalides felis* populations in the home environment and the impact of various control measures. *Parasite*, 11, 387-399.
- Bezerra-Santos, M.A., Nogueira, B.C.F., Yamatogi, R.S., Ramos, R.A. N., Galhardo, J.A., y Campos, A.K. (2020). Ticks, fleas and endosymbionts in the ectoparasite fauna of the black-eared opossum *Dipelphis aurita* in Brazil. *Experimental and Applied Acarology*, 80(3), 329–338. <https://doi.org/10.1007/s10493-020-00468-4>

- Bezerra-Santos, M.A., Ramos, R.A.N., Campos, A.K., Dantas-Torres, F., y Otranto, D. (2021). *Didelphis* spp. opossums and their parasites in the Americas: A One Health perspective. *Parasitology Research*, 1-21.
- Bitam, I., Dittmar, K., Parola, P., Whiting, M.F., Raoult, D., (2010). Fleas and flea-borne diseases. *International Journal of Infectious Diseases* 14, e667–e676.
- Bobey, M.C. (2015). Harmonization of regulatory guidelines on efficacy of ectoparasiticides for companion animals: Status and missing points. *Vet. Parasitol.* 208, 48–55.
- Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana. (1934). Crónicas Peste. Disponible en <https://iris.paho.org/>
- Breitschwerdt, E.B. (2017). Bartonellosis, one health and all creatures great and small. *Veterinary Dermatology* 28(1):96-e21 DOI 10.1111/vde.12413
- Buckendahl, J., Heukelbach, J., Ariza, L., Kehr, J.D., Seidenschwang, M., y col. (2010). Control of tungiasis through intermittent application of a plant-based repellent: An intervention study in a resource-poor community in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e879. <https://doi:10.1371/journal.pntd.0000879>
- Buckner, C.H. (1964). Metabolism, food capacity, and feeding behavior in four species of shrews. *Canadian Journal of Zoology*, 42(2), 259-279.
- Buffet, J.P, Kosoy, M., Vayssier-Taussat, M., (2013). Natural history of *Bartonella*-infecting rodents in light of new knowledge on genomics, diversity and evolution. *Future Microbiol*; 8:1117–1128.
- Burnham, K.P., Anderson, D.R. (2002). *Model Selection and Multimodel Inference: a Practical Information-Theoretic Approach*. Springer, New York. p. 488.
- Bush, A.O., Lafferty, K. D., Lotz, J.M. y Shostak, A.W. (1997). Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis y col. revisited. *Journal of Parasitology* 83:575–583.
- Cáceres, N.C. (2012) *Os Marsupiais do Brasil: Biologia Ecologia e Evolução*. (N. Cáceres, Ed.), *Os Marsupiais do Brasil: Biologia Ecologia e Evolução* (pp. 1–500).
- Campanella, J.J., Bitincka, L., Smalley, J., (2003). MatGAT: an application that generates similarity/identity matrices using protein or DNA sequences. *BMC Bioinforma.* 4. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-4-29>.
- Carvalho, R.W., Serra-Freire, N.M., Linardi, P.M., Almeida, A.B. y Costa, J.N., (2001). Small rodents fleas from the bubonic plague focus located in Serra dos Órgãos mountain range, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96, 603-609.
- Carvalho, T.F., Ariza, L., Heukelbach, J., Silva, J.J., Mendes, J., de Assis e Silva, A., y Limongi, J.E. (2012). Tungiasis-related knowledge of health professionals from an endemic area of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil, 2010. *Epidemiologia e serviços de saúde*, 21(2), 243-251.

- Cevidane, A., Altet, L., Chirife, A. D., Proboste, T., y Millán, J. (2017). Drivers of *Bartonella* infection in micromammals and their fleas in a Mediterranean peri-urban area. *Veterinary Microbiology*, **203**, 181–188. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.03.023>
- Cevidane, A., Di Cataldo, S., Vera, F., Lillo, P., y Millán, J. (2018). Molecular detection of vector-borne pathogens in rural dogs and associated *Ctenocephalides felis* fleas (Siphonaptera: Pulicidae) in Easter Island (Chile). *Journal of medical entomology*, *55*(6), 1659-1663.
- Chao A, Gotelli NJ, Hsieh TC, Sander EL, Ma KH, Colwell RK, Ellison AM. (2014). Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: a framework for sampling and estimation in species diversity studies. *Ecol Monogr*. 84: 45–67.
- Chao, A., Ma, K.H., Hsieh, T.C., y Chiu, C.H. (2015) Online Program SpadeR (Species-richness Prediction and Diversity Estimation in R). Program and User's Guide. http://chao.stat.nthu.edu.tw/wordpress/software_download/softwarespader_online/
- Chao, A., Ma, K. H., and Hsieh, T.C. (2016) iNEXT (iNterpolation and EXTrapolation) Online: Software for Interpolation and Extrapolation of Species Diversity. Program and User's Guide published at http://chao.stat.nthu.edu.tw/wordpress/software_download/.
- Chomel, B.B., Boulouis, H.J., y Breitschwerdt, E.B. (2004). Cat scratch disease and other zoonotic *Bartonella* infections. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, **224**, 1270–1279. <https://doi.org/10.2460/javma.2004.224.1270>
- Chomel, B.B., Kasten, R.W., Henn, J.B., y Molia, S. (2006). *Bartonella* infection in domestic cats and wild felids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, **1078**, 410–415. Blackwell Publishing Inc. <https://doi.org/10.1196/annals.1374.080>
- Christodoulou, G., Theodoropoulos, G., Kominakis, A. (2006). Theis JH. Biological, seasonal and environmental factors associated with *Pulex irritans* infestation of dairy goats in Greece. *Vet Parasitol*.137:137–143.
- Cicuttin, G.L., y Nava, S. (2013). Molecular identification of *Rickettsia parkeri* infecting *Amblyomma triste* ticks in an area of Argentina where cases of rickettsiosis were diagnosed. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, *108*(1), 123–125. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762013000100022>
- Cicuttin, G.L., Brambati, D.F., Rodríguez Eugui, J.I., Lebrero, C.G., De Salvo, M.N., Beltrán, F.J., ... Anda, P. (2014). Molecular characterization of *Rickettsia massiliae* and *Anaplasma platys* infecting *Rhipicephalus sanguineus* ticks and domestic dogs, Buenos Aires (Argentina). *Ticks and Tick-Borne Diseases*, *5*(5), 484–488. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.03.001>
- Cicuttin, G.L., De Salvo, M.N., Sánchez, J., Cañón, C., y Lareschi, M. (2019). Molecular detection of *Bartonella* in fleas (Hexapoda, Siphonaptera) collected from wild rodents

- (Cricetidae, Sigmodontinae) from Argentina. *Medical and Veterinary Entomology*.
<https://doi.org/10.1111/mve.12370>
- Cinto, J.P. y Bertolini, M.P., (2003). Conservation capacity in the Paraná Forest. En: Galindo Leal C. y De Gusmao Camara I. (Editores). *The Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Threats, and Outlook (State of the Hotspots, 1)*. Center for Applied Biodiversity Science at Conservation International. Island Press, Washington D.C. pp 227-244.
- Clark, N. J., Seddon, J. M., Šlapeta, J., y Wells, K. (2018). Parasite spread at the domestic animal-wildlife interface: anthropogenic habitat use, phylogeny and body mass drive risk of cat and dog flea (*Ctenocephalides* spp.) infestation in wild mammals. *Parasites y vectors*, 11(1), 1-11.
- Cooper, A.R., Nixon, E., Rose Vineer, H., Abdullah, S., Newbury, H., y Wall, R. (2020). Fleas infesting cats and dogs in Great Britain: spatial distribution of infestation risk and its relation to treatment. *Medical and Veterinary Entomology*, 34(4), 452-458.
- Cornet, M.L., Paravano, L., Calderón, G., Borda, S., Redonnet, C., Giamperetti, S., Bogdanowicz, E. (2016). Encefalitis por *Bartonella* sp. In XVI Congreso de la Sociedad Argentina de Infectología SADI. Mendoza: Sociedad Argentina de Infectología.
- Costa, A.P., Silva, A.B., Costa, F.B., Xavier, G.S., Martins, T.F., Labruna, M.B., y Guerra, R.M. (2013). A survey of ectoparasites infesting urban and rural dogs of Maranhão state, Brazil. *Journal of medical entomology*, 50(3), 674-678.
- Dantas-Torres, F., y Otranto, D. (2014). Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil: Opening the black box. *Parasites and Vectors*. BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-22>.
- Darriba, D., Posada, D., (2012). jModelTest 2.0 manual. *Nat. Methods* 2 9 (8), 772. Retrieved from. <http://code.google.com/p/jmodeltest2>.
- Daszak, P., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D. (2001). Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Trop.* 78, 103–116.
- D'Elía, G. y Pardiñas, U.F.J. (2015). Tribe Akodontini. In: Patton, J.L., Pardiñas, U.F.J. y D'Elía, G. (Eds.), *Mammals of South America, Volume 2. Rodents* (pp. 140-279). Chicago, Illinois, The University of Chicago Press.
- De Salvo, M.N., Herculini, C., Arístegui, E., Bruno, A., Brambati, D.F., Cicuttin, G.L. (2020). *Bartonella* spp. associated with rodents in an urban protected area, Buenos Aires (Argentina), *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101515>
- De Sousa, K.C.M., Do Amaral, R.B., Herrera, H.M., Santos, F.M., Macedo, G.C., De Pinto, P.C.E., Barros-Battesti, D.M., Machado, R.Z. y André M.R. (2018). Genetic diversity of *Bartonella* spp. in wild mammals and ectoparasites in Brazilian Pantanal. *Microbial Ecology*, 76, 544.

- Del Ponte, E., (1963). Notas sobre Suctoria argentinos V. Nuevos datos sobre Rhopalopsyllidae, Rhopalopsyllinae. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 26, 75- 87.
- Di Bitetti, M.S. Placci, L.G. y Dietz, L.A. (2003). Una visión de biodiversidad para la ecorregión del Bosque Atlántico del Alto Paraná: diseño de un paisaje para la conservación de la biodiversidad y prioridades para las acciones de conservación, ed. World Wildlife Foundation, Washington, D.C.
- Dobler, G., Pfeffer, M. (2011) Fleas as parasites of the family Canidae. *Parasites and Vectors*. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-139>.
- Dryden MW. (1933). Biology of fleas of dogs and cats. *Comp Cont Educ Pract Vet*.15:569–579
- Dryden, M.W., Boyer, J.F., y Smith, V. (1994). Techniques for estimating on-animal populations of *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). *Journal of Medical Entomology*, **31**, 631–634. <https://doi.org/10.1093/jmedent/31.4.631>
- Eisele, M., Heukelbach, J., Van Marck, E., Mehlhorn, H., Meckes, O., Franck, S., Feldmeier, H. (2003). Investigations on the biology, epidemiology, pathology and control of *Tunga penetrans* in Brazil: I. Natural history of tungiasis in man. *Parasitol Res*. 90(2):87-99. doi: 10.1007/s00436-002-0817-y
- Eremeeva, M.E., Gerns, H.L., Lydy, S.L., Goo, J.S., Ryan, E.T., Mathew, S.S., ... y Koehler, J. E. (2007). Bacteremia, fever, and splenomegaly caused by a newly recognized *Bartonella* species. *New England Journal of Medicine*, 356(23), 2381-2387.
- Eremeeva, M.E., Karpathy, S.E., Krueger, L., Hayes, E.K., Williams, A.M., Zaldivar, Y., Bennett, S., Cummings, R., Tilzer, A., Velten, R.K., y col. (2012). Two pathogens and one disease: detection and identification of flea-borne rickettsiae in areas endemic for murine typhus in California. *J. Med. Entomol.* 49: 1485–1494.
- Ezquiaga, M.C., Lareschi, M., Abba, A.M. y Navone, G.T. (2008) Nuevo registro de pulgas (Siphonaptera) parásitas de dasipódidos (Mammalia: Xenarthra) en el noreste de la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Mastozoología Neotropical*, 15, 193–196.
- Ezquiaga, M.C., Linardi, P.M., Moreira de Avelar, D. y Lareschi, M. (2015) A new species of *Tunga* perforating the osteoderms of its armadillo host in Argentina and redescription of the male of *Tunga terasma*. *Medical and Veterinary Entomology*, 29, 196–204. <http://dx.doi.org/10.1111/mve.12106>
- Faccini-Martínez, A.A. y Sotomayor, H.A. (2013). Reseña histórica de la peste en Suramérica: una enfermedad poco conocida en Colombia. *Biomédica*, 33, 8-27.
- Fang, R., Blanton, L.S. y Walker, D.H. (2017). Rickettsiae as emerging infectious agents. *Clin. Lab. Med.* 37: 383–400.
- Farkas, R., Gyurkovszky, M., Solymosi, N., y Beugnet, F. (2009). Prevalence of flea infestation in dogs and cats in Hungary combined with a survey of owner awareness. *Medical and*

- Feldmeier, H., Kehr, J.D., Heukelbach, J. (2006). A plant-based repellent protects against *Tunga penetrans* infestation and sand flea disease. *Acta Trop* 99: 126–136.
- Feldmeier, H., Heukelbach, J., Ugbomoiko, U.S., Sentongo, E., Mbabazi, P., y col. (2014) Tungiasis—A Neglected Disease with Many Challenges for Global Public Health. *PLoS Negl Trop Dis* 8(10): e3133. doi:10.1371/journal.pntd.0003133
- Friggens, M.M. y Beier, P., (2010). Anthropogenic disturbance and the risk of flea-borne disease transmission. *Oecologia*, 164, 809–820
- Furlan, V., Cariola, L., García, D., y Hilgert, N. (2015). Caracterización de los sistemas agroforestales familiares y estrategias de uso del ambiente en el Bosque Atlántico Argentino. *Gaia Scientia*. 9, 69–81. doi: 10.21707/gaia.v9i3.27706
- Galliari, C.A., y Pardiñas, U.F. (2021). Roedores sigmodontinos de la Provincia de Misiones (Argentina): Síntesis de datos en una década de muestreos esporádicos. *Ecología en Bolivia*, 56(1), 42-64.
- Gil, H., García-Esteban, C., Barandika, J.F. y col. (2010) Variability of *Bartonella* genotypes among small mammals in Spain. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 8062–8070.
- Giraud, A.R., Krauczuk, E.R., Arzamendia, V., y Povedano, d.H. (2003). Critical analysis of protected areas in the Atlantic Forest of Argentina. In Galindo-Leal, C. and I. Guzmán-Camara, editors. *The Atlantic Forest of South America: biodiversity status, threats and outlook*. Center for Applied Biodiversity Science at Conservation International, Island Press, Washington. D.C., USA.
- Gonçalves, L.R., Favacho, A.R.deM., Roque, A.L.R., Mendes, N.S., Fidelis, O.L., Benevenuto, J.L., André, M.R. (2016). Association of *Bartonella* species with wild and synanthropic rodents in different Brazilian biomes. *Applied and Environmental Microbiology*, 82, 7154–7164. <https://doi.org/10.1128/AEM.02447-16>
- Gonçalves-Oliveira, J., Rozental, T., Guterres, A., Teixeira, B.R., Andrade-Silva, B.E., da Costa Neto, S.F., ... y Lemos, E.R.S. (2020). Investigation of *Bartonella* spp. in Brazilian mammals with emphasis on rodents and bats from the Atlantic Forest. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 13, 80-89.
- Gutiérrez, R, Krasnov B, Morick D, y col (2015). *Bartonella* infection in rodents and their flea ectoparasites: an overview. *Vector-Borne and Zoonotic Disease*, 15, 27–39.
- Harvey, T.V., Heukelbach, J., Assunção, M.S., Fernandes, T.M., da Rocha, C.M.B.M., y Carlos, R.S.A. (2017). Canine tungiasis: High prevalence in a tourist region in Bahia state, Brazil. *Preventive veterinary medicine*, 139, 76-81.
- Harvey, T.V., Linardi, P.M., Carlos, R.S.A., y Heukelbach, J. (2021). Tungiasis in domestic, wild,

- and synanthropic animals in Brazil. *Acta Tropica*, 106068.
- Hassell, J.M., Begon, M., Ward, M.J., y Fèvre, E.M. (2017). Urbanization and Disease Emergence: Dynamics at the Wildlife–Livestock–Human Interface. *Trends in Ecology y Evolution* <https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.09.012>.
- Hassell, J.M., Bettridge, J.M., Ward, M.J., Ogendo, A., Imboma, T., Muloi, D., ... y Fèvre, EM. (2021). Socio-ecological drivers of vertebrate biodiversity and human-animal interfaces across an urban landscape. *Global change biology*, 27(4), 781-792.
- Hastriter, M.W., Whiting, M.F., (2003). Siphonaptera (fleas). In: Resh, V.H., Cardé, R.T. (Eds.), *Encyclopedia of Insects*. Elsevier Science, Orlando, FL, pp. 1039-1045.
- Heukelbach, J., De Oliveira, F.A.S., Hesse, G., y Feldmeier, H. (2001). Tungiasis: a neglected health problem of poor communities. *Tropical Medicine y International Health*, 6(4), 267-272.
- Heukelbach, J., Costa, A.M.L., Wilcke, T., Mencke, N., y Feldmeier, H. (2004). The animal reservoir of *Tunga penetrans* in severely affected communities of north-east Brazil. *Medical and veterinary entomology*, 18(4), 329-335.
- Heukelbach, J. (2005). Tungiasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 47(6), 307-313.
- Hopkins, G.H.E. y Rothschild, M. (1953). An illustrated catalogue of the Rothschild collection of fleas (Siphonaptera) in the British Museum (Nat. Hist.). Vol. I. Tungidae and Pulicidae. British Museum (Nat. Hist.), xv + 361p.
1956. An illustrated catalogue of the Rothschild collection of fleas (Siphonaptera) in the British Museum (Nat. Hist.). Vol. II. Coptosyllidae, Vermipsyllidae, Stephanocircidae, Ischnopsyllidae, Hypsophthalmidae, and Xiphopsyllidae and Macropsyllidae. British Museum (Nat. Hist.), xi + 445 p.
1966. An illustrated catalogue of the Rothschild collection of fleas (Siphonaptera) in the British Museum (Nat. Hist.). Vol. IV. Hystrichopsyllidae (Ctenophthalminae, Dinopsyllinae, Doratopsyllinae and Listropsyllinae) British Museum (Nat. Hist.), viii + 549 p.
- Horta, M.C., Labruna, M.B., Pinter, A., Linardi, P.M., y Schumaker, T.T.S. (2007). *Rickettsia* infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(7), 793–801. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762007000700003>.
- Horta, M.C., Ogrzewalska, M., Azevedo, M.C., Costa, F.B., Ferreira, F., Labruna, M.B. (2014). *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides felis* from five geographic regions of Brazil. *Am J Trop Med*. 91: 96–100.
- Jiang, J., Maina, A. N., Knobel, D.L., Cleaveland, S., Laudisoit, A., Wamburu, K., ... Richards, A.L. (2013). Molecular detection of *Rickettsia felis* and *Candidatus Rickettsia Asemboensis* in Fleas from Human Habitats, Asembo, Kenya. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 13(8), 550–558. <https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1123>

- Johnson, P.T., (1957). A Classification of Siphonaptera of South America. Memoirs of the Entomological Society of Washington, Washington, DC (298 pp).
- Jones, C., Mcshea, W.J., Conroy, M.J. y Kunz, T.H. (1996). Capturing Mammals (Chapter 8). In: Wilson, D.E., Cole, F.R., Nichols, J.D., Rudran, R. y Foster, M.S. (Eds). Measuring and monitoring biological diversity. Standard methods for mammals. Smithsonian Institution Press, Washington and London: 115-155.
- Jordan, K. y Rothschild, N.C., (1923). On the genera *Rhopalopsyllus* and *Parapsyllus*. Ectoparasites, 1, 320–370.
- Jordan, K., (1939). On five new Siphonaptera from the Republic of Argentina. Novitates Zoologicae, 41, 292–294.
- Kehr, J. D., Heukelbach, J., Mehlhorn, H., y Feldmeier, H. (2007). Morbidity assessment in sand flea disease (tungiasis). Parasitology research, 100(2), 413-421.
- Kosoy, M., Hayman, D.T.S., Chan, K-S., (2012). *Bartonella* bacteria in nature: where does population variability end and a species start? Infect. Genet. Evol. 12, 894–904.
- Kosoy, M., McKee, C., Albayrak, L., y Fofanov, Y. (2018). Genotyping of *Bartonella* bacteria and their animal hosts: current status and perspectives. Parasitology, 145(5), 543-562.
- Krasnov, B.R., Khokhlova, I.S., Fielden, L.J., y Burdelova, N.V. (2001). Effect of air temperature and humidity on the survival of pre-imaginal stages of two flea species (Siphonaptera: Pulicidae). Journal of Medical Entomology, 38(5), 629-637.
- Krasnov, B.R. (2008). Functional and evolutionary ecology of fleas: a model for ecological parasitology. Cambridge Univ. Press.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., y Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. Molecular Biology and Evolution, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Labruna, M.B., Whitworth, T., Horta, M.C., Bouyer, D.H., McBride, J.W., y Pinter, A. (2004) Rickettsia species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of Sao Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(1): 90–98.
- Lamattina, D., Tarragona, E.L., y Nava, S. (2018). Molecular detection of the human pathogen *Rickettsia parkeri* strain Atlantic rainforest in *Amblyomma ovale* ticks in Argentina. *Ticks and Tick Borne Diseases*, 9(5):1261-1263. doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.05.007. Epub 2018 May 5. PMID: 29764730.
- Lanzone, C., Labaroni, C.A., Formoso, A., Buschiazzo, L.M., Da Rosa, F., y Teta, P. (2018). Diversidad, sistemática y conservación de roedores en el extremo sudoccidental del Bosque Atlántico Interior. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales n. s.* 20:151–164

- Lareschi, M., Linardi, P.M., Autino, A.G., Barquez, R.M. y Díaz, M.M., (2003). First report of *Polygenis (Polygenis) roberti beebei* (Fox, 1947) (Siphonaptera: Rhopalopsyllidae) in Argentina, with a new host record and morphological data. *Systematic Parasitology*, 56, 183–187. <http://dx.doi.org/10.1023/b:sypa.0000003804.37547.9b>
- Lareschi, M. y Linardi, P.M., (2005). New data on the morphology of *Polygenis (Polygenis) rimatus* (Jordan) (Siphonaptera: Rhopalopsyllidae). *Neotropical Entomology*, 34, 121–125.
- Lareschi M., Venzal J.M., Arzua M. y González E., (2006). Fleas of small mammals in Uruguay, with new host and distribution records. *Comparative Parasitology*, 73 (2), 263–268.
- Lareschi, M. y Linardi, P.M., (2009). Morphological variability in *Polygenis (Polygenis) platensis* (Jordan y Rothschild) (Siphonaptera: Rhopalopsyllidae: Rhopalopsyllinae) and taxonomic consequences. *Zootaxa*, 2310, 35–42.
- Lareschi, M., and Krasnov, B. (2010). Determinants of ectoparasite assemblage structure on rodent hosts from South American marshland: The effects of host species, locality and season. *Medical and Veterinary Entomology* 24:284–292.
- Lareschi, M., Sánchez, J.P., Ezquiaga, M.C, Autino, A.G., Díaz, M.M y Barquez, R.M., (2010). Fleas associated with mammals from northwestern Argentina, with new distributional Reports. *Comparative Parasitology*, 77, 207–213.
- Lareschi, M., Sánchez, J.P. y Autino, A.G., (2016). A review of the fleas (Insecta: Siphonaptera) from Argentina. *Zootaxa*, 4103, 239–258.
- Lareschi, M., Venzal, J.M., Nava, S., Mangold, A.J., Portillo, A., Palomar-Urbina, A.M., y Oteo-Revuelta, J.A. (2018). The human flea *Pulex irritans* (Siphonaptera: Pulicidae) in northwestern Argentina, with an investigation of *Bartonella* and *Rickettsia* spp. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 89(2), 375–381. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2018.2.2392>
- Lareschi, M., Savchenko, E., y Urdapilleta, M. (2019) Ectoparasites associated with sigmodontine rodents from northeastern Argentina. *Therya*, 10(2), 103–108. <https://doi.org/10.12933/therya-19-758>
- La Scola, B., Zeaiter, Z., Khamis, A., y Raoult, D. (2003). Gene-sequence-based criteria for species definition in bacteriology: The *Bartonella* paradigm. *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(03\)00143-4](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(03)00143-4)
- Lawrence, A.L., Brown, G.K., Peters, B., Spielman, D.S., Morin-Adeline, V., y Šlapeta, J. (2014). High phylogenetic diversity of the cat flea (*Ctenocephalides felis*) at two mitochondrial DNA markers. *Medical and veterinary entomology*, 28(3), 330-336.

- Legendre, K.P., y Macaluso, K.R. (2017). *Rickettsia felis*: A review of transmission mechanisms of an emerging pathogen. Tropical Medicine and Infectious Disease. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed2040064>
- Lewis, R.E. (1993). Fleas (Siphonaptera). In Medical insects and arachnids (pp. 529-575). Springer, Dordrecht.
- Lewis, R.E. (1998). Résumé of the Siphonaptera (Insecta) of the world. Journal of Medical Entomology, 35, 377–389
- Librado, P., Rozas, J., (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. Bioinformatics 25 (11), 1451–1452. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>.
- Linardi, P.M, y Guimarães L.R. (2000). Siphonapteros do Brasil. Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil. 291p.
- Linardi, P.M., (1979). Sobre algumas espécies de Rhopalopsyllidae (Siphonaptera) sulamericanas integrantes do “complexo *pradoi*”. Revista Brasileira de Entomologia. 23, 99-106.
- Linardi, P.M., (1985). Dados complementares sobre hospedeiros de sifonápteros ropalopsilinos. Revista Brasileira de Biología 45: 73-78.
- Linardi, P.M., Botelho J.R., Ximenez A. y Padovani C R., (1991). Notes on ectoparasites of some small mammals from Santa Catarina State, Brazil. Journal of Medical Entomology. 28, 183-185.
- Linardi, P.M, Cardoso, V.A., Botelho, J.R., Lareschi, M. y Freitas, T.O., (2005). *Polygenis (Polygenis) platensis* (Jordan y Rothschild, 1908) (Siphonaptera: Rhopalopsyllidae) a new record in Brazil. Neotropical Entomology, 34, 837–841.
- Linardi, P.M., Calheiros, C.M.L., Campelo-Junior, E.B., Duarte, E.M., Heukelbach, J., y Feldmeier, H. (2010). Occurrence of the off-host life stages of *Tunga penetrans* (Siphonaptera) in various environments in Brazil. Annals of Tropical Medicine y Parasitology, 104(4), 337-345.
- Linardi, P.M., y Krasnov, B.R. (2013). Patterns of diversity and abundance of fleas and mites in the Neotropics: host-related, parasite-related and environment-related factors. Medical and veterinary entomology, 27(1), 49-58.
- Linardi, P.M., (2017). Fleas and diseases, in: Marcondes, C.B. (Ed.), Arthropod borne diseases. Springer, Cham, Switzerland, pp. 517-536.
- López-Berrizbeitia, M.F., y Diaz, M.M. (2019). Siphonaptera associated with small mammals (Didelphimorphia, Chiroptera, and Rodentia) from northwestern Argentina. Therya, 10(3), 279-308.
- López-Berrizbeitia, M.F., Pérez, M.J. y Barquez, R.M. (2020). Description of two new species of *Ectinorus (Ectinorus)* (Siphonaptera, Rhopalopsyllidae) from Argentina, including a morphometric approach. Acta Tropica, 211, 105612.

- Loyola S, Flores C, Torre A, Kocher C, Melendrez M, Luce-Fedrow A, y col. *Rickettsia asemonensis* characterization by multi-locus sequence typing of complete genes, Peru. *Emerg Infect Dis.* (2018) 24:931–3. doi: 10.3201/eid2405.170323
- Maina, A. N., Jiang, J., Luce-Fedrow, A., St. John, H.K., Farris, C.M., y Richards, A.L. (2019). Worldwide presence and features of flea-borne *Rickettsia asemonensis*. *Frontiers in Veterinary Science.* Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00334>
- Marshall, A.G. (1981). *The ecology of ectoparasitic insects.* Academic, London, UK.
- Martínez Crovetto, R. (1963). Esquema Fitogeográfico de la Provincia de Misiones. *Bonplandia*, 1(3):171-223.
- Massoia, E., Forasiepi, A., Teta, P. (2000). Los marsupiales de la Argentina. Editorial L.O.L.A. (Literature of Latin America), Buenos Aires 71 pp.
- Mediannikov, O., Aubadie-Ladrix, M., y Raoult, D. (2015). Candidatus “*Rickettsia senegalensis*” in cat fleas in Senegal. *New Microbes and New Infections*, 3(C), 24–28. <https://doi.org/10.1016/j.nmni.2014.10.005>
- Medvedev, S.G. (1998). Classification of fleas (Order Siphonaptera) and its theoretical foundations. *Entomol. Rev.* 78, 1080–1093.
- Medvedev, S.G. (2005). An attempted system analysis of the evolution of the order of fleas (Siphonaptera). *Lectures in memoriam NA Kholodkovsky*, (57).
- Medvedev, S.G., y Krasnov, B.R. (2006). *Fleas: permanent satellites of small mammals. In Micromammals and Macroparasites* (pp. 161-177). Springer, Tokyo.
- Melis, M., Espinoza-Carniglia, M., Savchenko, E., Nava, S., y Lareschi, M. (2020). Molecular detection and identification of *Rickettsia felis* in *Polygenis* (Siphonaptera, Rhopalopsyllidae, Rhopalopsyllinae) associated with cricetid rodents in a rural area from central Argentina. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, vol. 21.
- Millán, J., Travaini, A., Cevidanes, A., Sacristán, I., y Rodríguez, A. (2019). Assessing the natural circulation of canine vector-borne pathogens in foxes, ticks and fleas in protected areas of Argentine Patagonia with negligible dog participation. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 8, 63–70. <https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2018.11.007>
- Miura, K., Higashiura, Y., y Maeto, K. (2017). Evaluation of easy, non-destructive methods of DNA extraction from minute insects. *Applied Entomology and Zoology*, 52(2), 349–352. <https://doi.org/10.1007/s13355-017-0481-4>
- Moraes, L.B.D., Bossi, D.E.P., y Linhares, A.X. (2003). Siphonaptera parasites of wild rodents and marsupials trapped in three mountain ranges of the Atlantic Forest in Southeastern Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 98, 1071-1076.
- Morand, S., Krasnov, B., y Poulin, R. (2006). *Micromammals and Macroparasites. From Evolutionary Ecology to Management.* Tokyo, Japan.

- Moreno Salas L, Espinoza-Carniglia M, Lizama Schmeisser N, Torres LG, Silva-de la Fuente MC, Lareschi M, González-Acuña D. (2019). Fleas of black rats (*Rattus rattus*) as reservoir host of *Bartonella* spp. in Chile. PeerJ 7:e7371 DOI 10.7717/peerj.7371
- Morrone, J.J. (2006). Biogeographic areas and transition zones of Latin American and the Caribbean Islands based on the panbiogeographic and cladistic analyses of the entomofauna. Annual Review of Entomology, 51, 467–494. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130447>
- Muehlen M, Heukelbach J, Wilcke T, et al. Investigations on the biology, epidemiology, pathology and control of *Tunga penetrans* in Brazil: II. Prevalence, parasite load and topographic distribution of lesions in the population of a traditional fishing village. Parasitol Res 2003; 90: 449–455.
- Mutebi, F., Krücken, J., von Samson-Himmelstjerna, G., Waiswa, C., Mencke, N., Eneku, W., ... y Feldmeier, H. (2018). Animal and human tungiasis-related knowledge and treatment practices among animal keeping households in Bugiri District, South-Eastern Uganda. Acta tropica, 177, 81-88.
- Nava, S., Pérez-Martínez, L., Venzal, J.M., Portillo, A., Santibáñez, S., y Oteo, J.A. (2008). *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides felis* from Argentina. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 8(4), 465–466. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0243>
- Nguyen, V., Colella, V., Greco, G., Fang F., Nurcahyo, W., Hadi, U.K., Venturina, V., Yew Tong, K.B., Tsai, Y., Taweethavonsawat, P., Tiwananthagorn, S., Tangtrongsup, S., Quang Le, T., Bui, K.L., Do, T., Watanabe, M., Abd Rani, P.A.M., Dantas-Torres, F., Halos, L., Beugnet, F., Otranto, D. (2020). Molecular detection of pathogens in ticks and fleas collected from companion dogs and cats in East and Southeast Asia. *Parasites and Vectors* 13, 420. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04288-8>.
- Noden, B.H., Radulovic, S., Higgins, J.A., y Azad, A.F. (1998). Molecular Identification of *Rickettsia typhi* and *R. felis* in Co-Infected *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). Journal of Medical Entomology, 35(4), 410–414. <https://doi.org/10.1093/jmedent/35.4.410>
- Nuñez A.C. (2009). En Puerto Iguazú, Misiones (Arg.). Ordenamiento territorial y políticas hegemónicas. Una visión crítica. XXVII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Sociología. VIII Jornadas de Sociología de la Universidad de Buenos Aires. Asociación Latinoamericana de Sociología, Buenos Aires.
- Oliveira, C.M.B.; Ribeiro, P.B. Espécies de pulgas que parasitam cães em Porto Alegre e suas prevalências mensuais. Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS, v. 10-11, p. 29-33, 1982/83.
- Oliveira, H.H., Almeida, A.B., Carvalho, R.W., Gomes, V., Serra-Freire, N. M., Quinelato, I., y Carvalho, A.G. (2010). Siphonaptera of small rodents and marsupials in the Pedra Branca

- State Park, State of Rio de Janeiro, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 19(1), 51–56. <https://doi.org/10.4322/rbpv.01901009>
- Oscherov, E.B., Milano A.M.F., Lobo B., Anda P., Escudero R. (2011). Detection of *Anaplasma platys* and other pathogens in ectoparasites from urban hosts in Northeast Argentina. *Revista Ibero-Latinoamericana de Parasitología*, 70, 42-48.
- Osorio González, R., Rampello, P., y González Domínguez, I. (2017). Impactos socio-territoriales: Puerto Iguazú y Reserva Iriapú, 600 hectáreas. Misiones, Argentina. *El periplo sustentable*, (33), 363-393.
- Otranto, D., y Wall, R. (2008). New strategies for the control of arthropod vectors of disease in dogs and cats. *Medical and Veterinary Entomology*, 22(4), 291-302.
- Palacios-Salvatierra, R., Cáceres-Rey, O., Vásquez-Domínguez, A., Mosquera- Visaloth, P. y Anaya-Ramírez, E. (2018). Rickettsial species in human cases with non-specific acute febrile syndrome in Peru. *Rev. Peru. Med. Exp. Salud Publica*. 35: 630–635.
- Pampiglione, S., Fioravanti, M.L., Gustinelli, A., Onore, G., Mantovani, B., Luchetti, A., y Trentini, M. (2009). Sand flea (*Tunga* spp.) infections in humans and domestic animals: state of the art. *Medical and Veterinary Entomology*, 23(3), 172-186.
- Pardiñas, U.F.J., D'Elía, G. y Cirignoli, S. (2003). The genus *Akodon* (Muroidea: Sigmodontinae) in Misiones, Argentina. *Mammalian Biology*, 68,129– 43.
- Pardiñas U.F.J., Teta P., Lareschi M. and Galliari C.A. (2016). New data on *Abrawayaomys chebezi* (Rodentia, Cricetidae), a poorly known South American sylvan rodent. *Mammalia*, 80(3), 341–348. <https://doi.org/10.1515/mammalia-2014-0178>.
- 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. *Clinical Microbiology Reviews*. 26; 657-702.
- Patton, J.L., Pardiñas, U.F.J. y D'Elía G., (2015). *Mammals of South America. Volume 2. Rodents*. The University of Chicago Press, Chicago: 1336 pp.
- Paz, G. F., Avelar, D.M., Reis, I.A., y Linardi, P.M. (2015). Dynamics of *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae) infestations on urban dogs in southeastern Brazil. *Journal of medical entomology*, 52(5), 1159-1164.
- Pérez-Osorio, C.E., Zavala-Velázquez, J.E., León, J.J.A., y Zavala-Castro, J.E. (2008). *Rickettsia felis* as emergent global threat for humans. *Emerging Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.3201/eid1407.071656>
- Pinto, I.S., Botelho, J.R., Costa, L.P., Leite, Y.L.R., Linardi, P.M. (2009) Siphonaptera associated with wild mammals from the Central Atlantic Forest biodiversity corridor in Southeastern Brazil. *J Med Entomol* 46:1146–1151. <https://doi.org/10.1603/033.046.0523>
- Plací, G. y Di Bitetti, M. (2005). Situación ambiental en la Ecorregión del Bosque Atlántico del Alto Paraná (Selva Paranaense) Una visión de biodiversidad para la Ecorregión del

- Bosque Atlántico del Alto Paraná: Diseño de un Paisaje para la Conservación de la Biodiversidad y Prioridades para las Acciones de Conservación, pp. 197–225. World Wildlife Fund, Washington, DC.
- Poo-Muñoz, D.A., Elizondo-Patrone, C., Escobar, L.E., Astorga, F., Bermúdez, S. E., Martínez-Valdebenito, C., ... Medina-Vogel, G. (2016). Fleas and ticks in carnivores from a domestic-wildlife interface: Implications for public health and wildlife. *Journal of Medical Entomology*, 53(6), 1433–1443. <https://doi.org/10.1093/jme/tjw124>
- Posada, D. (2008). jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7), 1253–1256. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn083>
- Raoult D, La Scola B, Enea M, Fournier PE, Fenollar F, Galvao MA, de Lamballerie X. (2001). A flea-associated *Rickettsia* pathogenic for humans. *Emerg Infect Dis*. 7:73–81.
- Reeves, W K., Nelder, M.P., y Korecki, J.A. (2005). *Bartonella* and *Rickettsia* in fleas and lice from mammals in South Carolina, U.S.A. *Journal of Vector Ecology*, 30, 310–315.
- Reiczigel J, Rózsa L. (2005). *Quantitative Parasitology 3.0*. Budapest. Distributed by the authors.
- Regolin, A.L., Cherem, J.J., Botelho, J.R. Carvalho-Pinto, C.J. Linardi, P.M. (2010). Alguns ectoparasitos de mamíferos terrestres não voadores de Santa Catarina e Rio Grande do Sul: novos registros geográficos e de hospedeiros. In: V Congresso Brasileiro de Mastozoologia, São Pedro, SP, Resumos.
- Ronquist, F. y Huelsenbeck, J.P. (2003) MrBAYES 3: bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572–1574.
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Huelsenbeck, J.P., (2012). MrBayes 3.2: efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 61 (3), 539–542. <http://sysbio.oxfordjournals.org/content/early/2012/02/12/sysbio.sys029>.
- Roux V, Raoult D. (2000). Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer membrane protein rOmpB (*ompB*). *Int J Syst Evol Microbiol.* 50:1449–55.
- Rothschild, M., Traub, R., y Hopkins, G.H.E. (1971). A Revised Glossary of Terms Used in the Taxonomy and Morphology of Fleas: Reprinted from an Illustrated Catalogue of the Rothschild Collection of Fleas (Siphonaptera) in the British Museum (Natural History). Volume V, Pp. 8-85 by GHE Hopkins and Miriam Rothschild. Trustees of the British Museum (Natural History).
- Rust, M.K. y Dryden, M.W. (1997). The biology, ecology, and management of the cat flea. *Annual Review of Entomology*, 42, 451–473.
- Sánchez, J.P., Ezquiaga, M.C., y Ruiz, M. (2018). Fleas (Insecta: Siphonaptera) with public health relevance in domestic pigs (Artiodactyla: Suidae) from Argentina. *Zootaxa*. 4374(1), 144–150. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4374.1.8>

- Schott, D., Souza, U.A., Dall'Agnol, B., Webster, A., Doyle, R., Peters, F., Favarini, M., Mazim, F., Rosa, A.O., Jardim, M.M.A., Trigo, T.C., y Reck, J. (2019). Detection of *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in *Ctenocephalides felis* fleas from free-ranging crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*). *Medical and Veterinary Entomology*, 33(4):536-540.
- Schott D., Umeno K., Dall'Agnol B., Souza U.A., Webster A., Michel T., Peters F., Christoff A.U., André M.R., Ott R., Jardim M., Reck J. (2020). Detection of *Bartonella* sp. and a novel spotted fever group *Rickettsia* sp. in Neotropical fleas of wild rodents (Cricetidae) from Southern Brazil. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*.73:101568
- Sikes, R. S. (2016). Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research and education. *Journal of Mammalogy*. Allen Press Inc. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyw078>
- Silva, A.B., Vizzoni, V.F., Costa, A.P., Costa, F.B., Moraes-Filho, J., Labruna, M.B., y col. (2017) First report of a *Rickettsia asembonensis* related infecting fleas in Brazil. *Acta Trop.* 171:240. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.04.004
- Silverman, J., Rust, M. K., y Reiersen, D. A. (1981). Influence of temperature and humidity on survival and development of the cat flea, *Ctenocephalides felis* (Siphonaptera: Pulicidae). *Journal of Medical Entomology*, 18(1), 78-83.
- Smit, F.G.A.M., (1987). An Illustrated Catalogue of the Rothschild Fleas (Siphonaptera) in the British Museum (Natural History) 7: Malacopsylloidea (Malacopsyllidae and Rhopalopsyllidae). Oxford University Press, Oxford 380 pp.
- Srur, M., Herrera, J., Izquierdo, A. (2008). Diversidad de tipos vegetación y ambientes en las áreas protegidas del Núcleo Norte de la Selva Paranaense. Una aproximación a escala de paisaje. Informe para Proyecto Araucaria XXI, inédito.
- Staggemeier, R., Venker, C.A., Klein, D.H., Petry, M., Spilki, F.R., y Cantarelli, V.V. (2010). Prevalence of *Bartonella henselae* and *Bartonella clarridgeiae* in cats in the south of Brazil: A molecular study. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, **105**, 873–878. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762010000700006>
- Tay, S.T., Koh, F.X., Kho, K.L., y Sitam, F.T. (2015). Rickettsial infections in monkeys, Malaysia. *Emerging Infectious Diseases*, 21(3):545-7 <https://doi.org/10.3201/eid2103.141457>
- Tsai, Y., Chang C., Chuang S. y Chomel B.B. (2011). *Bartonella* species and their ectoparasites: Selective host adaptation or strain selection between the vector and the mammalian host?. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 34, 299– 314.
- Tipton V.J., Machado Allison C.E., (1972). Fleas of Venezuela. *Brigham Young University Science Bulletin, Biological Series* 17, 1–115.

- Ugbomoiko, U. S., Ariza, L., Ofoezie, I. E., y Heukelbach, J. (2007). Risk factors for tungiasis in Nigeria: identification of targets for effective intervention. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 1(3), e87.
- Vieira, A.M.L., Almeida, A.B., Magnabosco, C., Ferreira, J.C.P., Carvalho, J.L.B., Gomes, L.H. y col. (2006). Programa de controle de populações de cães e gatos do estado de São Paulo. *Boletim Epidemiológico Paulista*. 3 Suppl 5.
- Walker, D.H., y Ismail, N. (2008). Emerging and re-emerging Rickettsioses: Endothelial cell infection and early disease events. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1866>
- Werner, C.S., y Nunn, C.L. (2020). Effect of urban habitat use on parasitism in mammals: a meta-analysis. *Proceedings of the Royal Society B*, 287(1927), 20200397.
- West, G., Heard D, Caulkett N. (2007). *Zoo animal and wildlife immobilization and anesthesia*. Blackwell Publishing. Iowa. p. 718.
- Whiting, M.F., Whiting, A.S., Hastriter, M.W., y Dittmar, K. (2008). A molecular phylogeny of fleas (Insecta: Siphonaptera): origins and host associations. *Cladistics*, 24(5), 677-707.
- World Organisation for Animal Health. (2008). *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. World Organisation for Animal Health, (May), 1185–1191. Retrieved from http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/2.09.03_CAMPYLO.pdf
- Yeruham, I., Rosen, S., Hadani, A. (1989). Mortality in calves lambs and kids caused by severe infestation with the cat flea *Ctenocephalides felis felis* (Bouche, 1985) in Israel. *Vet Parasitol*, 30:351–356.

ANEXO 1:

Figura 3.4. Correlogramas de Pearson para todas las variables explicativas climáticas semanales, y entre estas variables y los promedios entre máximas y mínimas. Las altas correlaciones entre máximas y mínimas, y entre estas y sus promedios, justifican la selección de estas últimas para la construcción de los modelos. Arriba, gráfico correspondiente a planilla de dato de gatos; abajo correspondiente a la planilla de perros.

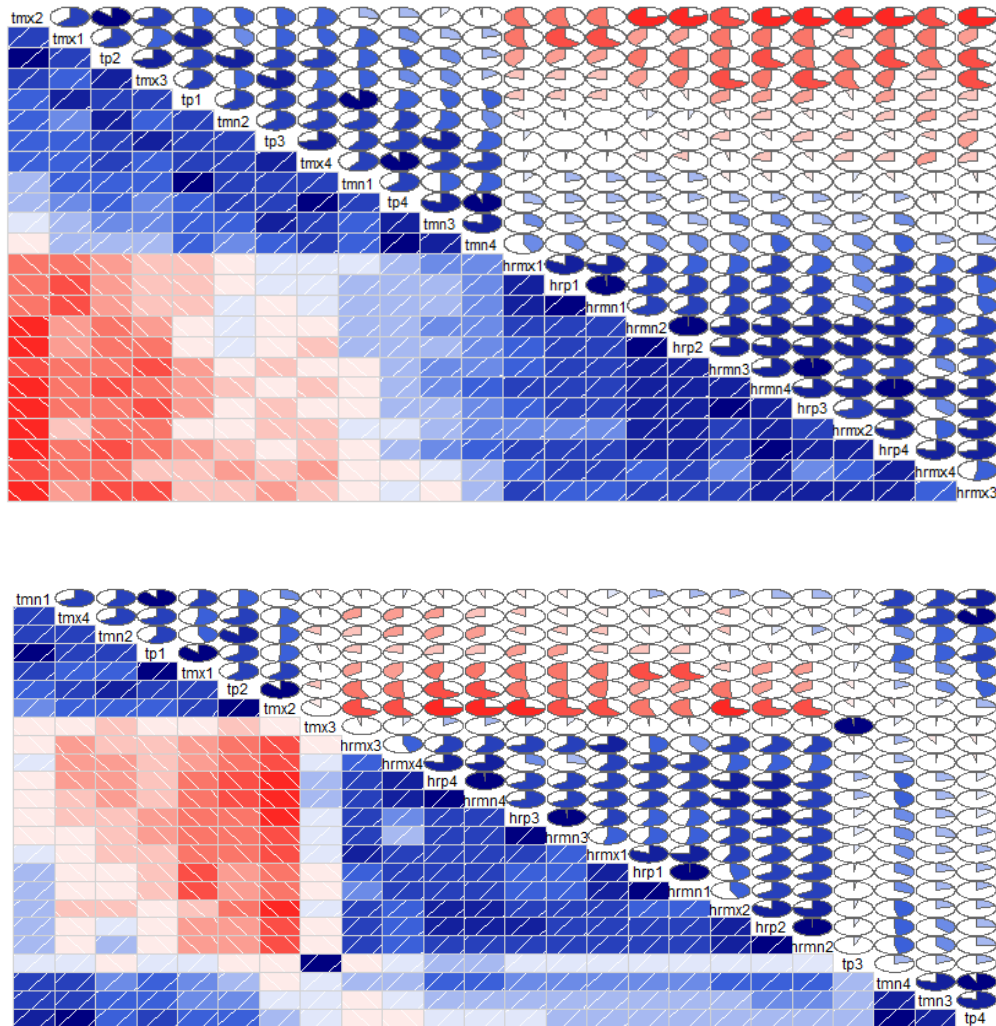


Tabla 3.1. Correlaciones de Pearson entre variables explicativas climáticas. En rojo y amarillo se resalta la correlación entre máximas y mínimas de la planilla de gatos y perros respectivamente. En verde y gris se resalta la correlación entre máximas, mínimas y sus medias de la planilla de gatos y perros, respectivamente. (Variables climáticas: *tmx*, temperatura máxima semanal; *tmn*, temperatura mínima semanal; *tp*, temperatura media; *hrmx*, humedad relativa máxima semanal; *hrmn*, humedad relativa mínima semanal; *hrp*, humedad relativa media semanal. s-1 (una semana previa) hasta s-4 (cuatro semanas previas)).

	hrmx1	hrmx2	hrmx3	hrmx4	hrmn1	hrmn2	hrmn3	hrmn4	hrp1	hrp2	hrp3	hrp4	tmx1	tmx2	tmx3	tmx4	tmn1	tmn2	tmn3	tmn4	tp1	tp2	tp3	tp4
hrmx1	1.00	0.43	0.61	0.57	0.77	0.58	0.54	0.66	0.82	0.57	0.57	0.67	-0.53	-0.56	-0.21	0.05	0.10	-0.10	0.33	0.43	-0.22	-0.43	0.07	0.28
hrmx2	0.43	1.00	0.77	0.49	0.36	0.79	0.66	0.78	0.38	0.85	0.71	0.77	-0.20	-0.75	-0.55	-0.25	0.06	-0.13	0.18	0.38	-0.07	-0.56	-0.23	0.10
hrmx3	0.61	0.77	1.00	0.53	0.45	0.67	0.67	0.72	0.48	0.70	0.74	0.72	-0.39	-0.76	-0.64	-0.28	-0.04	-0.26	-0.01	0.25	-0.23	-0.64	-0.39	0.02
hrmx4	0.57	0.49	0.53	1.00	0.71	0.57	0.35	0.72	0.71	0.57	0.39	0.77	-0.50	-0.62	-0.26	-0.32	0.00	-0.30	0.00	0.20	-0.27	-0.56	-0.16	-0.04
hrmn1	0.77	0.36	0.45	0.71	1.00	0.66	0.57	0.63	1.00	0.63	0.58	0.66	-0.64	-0.52	-0.23	0.02	0.22	0.00	0.22	0.35	-0.21	-0.34	-0.01	0.22
hrmn2	0.58	0.79	0.67	0.57	0.66	1.00	0.73	0.78	0.67	0.99	0.75	0.78	-0.40	-0.77	-0.41	-0.14	0.22	0.09	0.29	0.40	-0.07	-0.46	-0.08	0.17
hrmn3	0.54	0.66	0.67	0.35	0.57	0.73	1.00	0.74	0.58	0.74	0.99	0.71	-0.52	-0.69	-0.69	-0.04	-0.08	-0.06	0.31	0.41	-0.32	-0.49	-0.23	0.23
hrmn4	0.66	0.78	0.72	0.72	0.63	0.78	0.74	1.00	0.65	0.80	0.76	1.00	-0.49	-0.78	-0.47	-0.22	-0.09	-0.25	0.32	0.46	-0.31	-0.64	-0.09	0.17
hrp1	0.82	0.38	0.48	0.71	1.00	0.67	0.58	0.65	1.00	0.64	0.59	0.68	-0.64	-0.54	-0.23	0.02	0.21	-0.01	0.24	0.37	-0.21	-0.37	0.00	0.23
hrp2	0.57	0.85	0.70	0.57	0.63	0.99	0.74	0.80	0.64	1.00	0.77	0.80	-0.38	-0.79	-0.45	-0.16	0.20	0.06	0.28	0.41	-0.07	-0.49	-0.11	0.17
hrp3	0.57	0.71	0.74	0.39	0.58	0.75	0.99	0.76	0.59	0.77	1.00	0.74	-0.52	-0.73	-0.71	-0.07	-0.08	-0.09	0.28	0.41	-0.32	-0.53	-0.26	0.21
hrp4	0.67	0.77	0.72	0.77	0.66	0.78	0.71	1.00	0.68	0.80	0.74	1.00	-0.50	-0.78	-0.46	-0.24	-0.08	-0.26	0.30	0.44	-0.32	-0.65	-0.10	0.15
tmx1	-0.53	-0.20	-0.39	-0.50	-0.64	-0.40	-0.52	-0.49	-0.64	-0.38	-0.52	-0.50	1.00	0.61	0.55	0.45	0.54	0.42	0.28	0.21	0.86	0.62	0.50	0.34
tmx2	-0.56	-0.75	-0.76	-0.62	-0.52	-0.77	-0.69	-0.78	-0.54	-0.79	-0.73	-0.78	0.61	1.00	0.71	0.53	0.28	0.45	0.08	-0.02	0.50	0.89	0.47	0.25
tmx3	-0.21	-0.55	-0.64	-0.26	-0.23	-0.41	-0.69	-0.47	-0.23	-0.45	-0.71	-0.46	0.55	0.71	1.00	0.55	0.49	0.50	0.39	0.15	0.59	0.72	0.84	0.36
tmx4	0.05	-0.25	-0.28	-0.32	0.02	-0.14	-0.04	-0.22	0.02	-0.16	-0.07	-0.24	0.45	0.53	0.55	1.00	0.61	0.66	0.66	0.71	0.61	0.69	0.73	0.91
tmn1	0.10	0.06	-0.04	0.00	0.22	0.22	-0.08	-0.09	0.21	0.20	-0.08	-0.08	0.54	0.28	0.49	0.61	1.00	0.66	0.50	0.55	0.90	0.52	0.59	0.62
tmn2	-0.10	-0.13	-0.26	-0.30	0.00	0.09	-0.06	-0.25	-0.01	0.06	-0.09	-0.26	0.42	0.45	0.50	0.66	0.66	1.00	0.56	0.43	0.63	0.81	0.63	0.57
tmn3	0.33	0.18	-0.01	0.00	0.22	0.29	0.31	0.32	0.24	0.28	0.28	0.30	0.28	0.08	0.39	0.66	0.50	0.56	1.00	0.80	0.45	0.34	0.83	0.80
tmn4	0.43	0.38	0.25	0.20	0.35	0.40	0.41	0.46	0.37	0.41	0.41	0.44	0.21	-0.02	0.15	0.71	0.55	0.43	0.80	1.00	0.45	0.21	0.57	0.94
tp1	-0.22	-0.07	-0.23	-0.27	-0.21	-0.07	-0.32	-0.31	-0.21	-0.07	-0.32	-0.32	0.86	0.50	0.59	0.61	0.90	0.63	0.45	0.45	1.00	0.65	0.62	0.56
tp2	-0.43	-0.56	-0.64	-0.56	-0.34	-0.46	-0.49	-0.64	-0.37	-0.49	-0.53	-0.65	0.62	0.89	0.72	0.69	0.52	0.81	0.34	0.21	0.65	1.00	0.64	0.46
tp3	0.07	-0.23	-0.39	-0.16	-0.01	-0.08	-0.23	-0.09	0.00	-0.11	-0.26	-0.10	0.50	0.47	0.84	0.73	0.59	0.63	0.83	0.57	0.62	0.64	1.00	0.69
tp4	0.28	0.10	0.02	-0.04	0.22	0.17	0.23	0.17	0.23	0.17	0.21	0.15	0.34	0.25	0.36	0.91	0.62	0.57	0.80	0.94	0.56	0.46	0.69	1.00

	hrmx1	hrmx2	hrmx3	hrmx4	hrmn1	hrmn2	hrmn3	hrmn4	hrp1	hrp2	hrp3	hrp4	tmx1	tmx2	tmx3	tmx4	tmn1	tmn2	tmn3	tmn4	tp1	tp2	tp3	tp4
hrmx1	1.00	0.57	0.73	0.59	0.76	0.63	0.54	0.67	0.82	0.64	0.60	0.68	-0.49	-0.62	0.02	-0.12	0.12	-0.19	0.22	0.37	-0.20	-0.48	0.06	0.16
hrmx2	0.57	1.00	0.69	0.54	0.43	0.78	0.62	0.77	0.47	0.83	0.66	0.77	-0.19	-0.72	0.01	-0.16	0.15	-0.15	0.20	0.47	-0.03	-0.51	0.04	0.20
hrmx3	0.73	0.69	1.00	0.44	0.42	0.58	0.62	0.59	0.48	0.61	0.71	0.59	-0.36	-0.69	-0.04	-0.33	-0.04	-0.27	-0.07	0.17	-0.22	-0.56	-0.05	-0.06
hrmx4	0.59	0.54	0.44	1.00	0.70	0.55	0.28	0.73	0.71	0.56	0.31	0.78	-0.43	-0.59	0.07	-0.34	0.05	-0.29	0.01	0.24	-0.21	-0.52	0.07	-0.03
hrmn1	0.76	0.43	0.42	0.70	1.00	0.66	0.53	0.58	1.00	0.65	0.54	0.61	-0.65	-0.53	-0.02	-0.05	0.17	-0.05	0.21	0.31	-0.26	-0.35	0.02	0.16
hrmn2	0.63	0.78	0.58	0.55	0.66	1.00	0.70	0.71	0.68	1.00	0.71	0.71	-0.33	-0.68	-0.01	-0.04	0.26	0.15	0.39	0.47	-0.04	-0.33	0.06	0.26
hrmn3	0.54	0.62	0.62	0.28	0.53	0.70	1.00	0.67	0.55	0.70	0.99	0.64	-0.51	-0.71	0.07	-0.11	-0.10	-0.15	0.28	0.36	-0.33	-0.51	0.12	0.16
hrmn4	0.67	0.77	0.59	0.73	0.58	0.71	0.67	1.00	0.61	0.74	0.69	1.00	-0.43	-0.76	0.15	-0.29	-0.06	-0.35	0.24	0.46	-0.27	-0.65	0.19	0.13
hrp1	0.82	0.47	0.48	0.71	1.00	0.68	0.55	0.61	1.00	0.67	0.57	0.64	-0.65	-0.56	-0.01	-0.06	0.17	-0.07	0.22	0.33	-0.26	-0.38	0.03	0.16
hrp2	0.64	0.83	0.61	0.56	0.65	1.00	0.70	0.74	0.67	1.00	0.72	0.74	-0.32	-0.70	-0.01	-0.06	0.25	0.11	0.38	0.48	-0.04	-0.36	0.06	0.26
hrp3	0.60	0.66	0.71	0.31	0.54	0.71	0.99	0.69	0.57	0.72	1.00	0.66	-0.51	-0.74	0.06	-0.15	-0.09	-0.17	0.24	0.35	-0.33	-0.54	0.10	0.14
hrp4	0.68	0.77	0.59	0.78	0.61	0.71	0.64	1.00	0.64	0.74	0.66	1.00	-0.44	-0.77	0.14	-0.30	-0.05	-0.36	0.22	0.44	-0.27	-0.66	0.18	0.12
tmx1	-0.49	-0.19	-0.36	-0.43	-0.65	-0.33	-0.51	-0.43	-0.65	-0.32	-0.51	-0.44	1.00	0.62	-0.02	0.54	0.59	0.44	0.32	0.31	0.89	0.61	0.04	0.45
tmx2	-0.62	-0.72	-0.69	-0.59	-0.53	-0.68	-0.71	-0.76	-0.56	-0.70	-0.74	-0.77	0.62	1.00	-0.11	0.53	0.30	0.51	0.09	-0.05	0.52	0.88	-0.09	0.23
tmx3	0.02	0.01	-0.04	0.07	-0.02	-0.01	0.07	0.15	-0.01	-0.01	0.06	0.14	-0.02	-0.11	1.00	-0.02	-0.05	-0.17	0.01	0.08	-0.04	-0.15	0.98	0.04
tmx4	-0.12	-0.16	-0.33	-0.34	-0.05	-0.04	-0.11	-0.29	-0.06	-0.06	-0.15	-0.30	0.54	0.53	-0.02	1.00	0.69	0.66	0.68	0.67	0.69	0.68	0.10	0.90
tmn1	0.12	0.15	-0.04	0.05	0.17	0.26	-0.10	-0.06	0.17	0.25	-0.09	-0.05	0.59	0.30	-0.05	0.69	1.00	0.61	0.60	0.66	0.89	0.52	0.06	0.73
tmn2	-0.19	-0.15	-0.27	-0.29	-0.05	0.15	-0.15	-0.35	-0.07	0.11	-0.17	-0.36	0.44	0.51	-0.17	0.66	0.61	1.00	0.53	0.34	0.59	0.85	-0.07	0.54
tmn3	0.22	0.20	-0.07	0.01	0.21	0.39	0.28	0.24	0.22	0.38	0.24	0.22	0.32	0.09	0.01	0.68	0.60	0.53	1.00	0.78	0.52	0.35	0.18	0.81
tmn4	0.37	0.47	0.17	0.24	0.31	0.47	0.36	0.46	0.33	0.48	0.35	0.44	0.31	-0.05	0.08	0.67	0.66	0.34	0.78	1.00	0.54	0.16	0.22	0.93
tp1	-0.20	-0.03	-0.22	-0.21	-0.26	-0.04	-0.33	-0.27	-0.26	-0.04	-0.33	-0.27	0.89	0.52	-0.04	0.69	0.89	0.59	0.52	0.54	1.00	0.63	0.05	0.67
tp2	-0.48	-0.51	-0.56	-0.52	-0.35	-0.33	-0.51	-0.65	-0.38	-0.36	-0.54	-0.66	0.61	0.88	-0.15	0.68	0.52	0.85	0.35	0.16	0.63	1.00	-0.09	0.43
tp3	0.06	0.04	-0.05	0.07	0.02	0.06	0.12	0.19	0.03	0.06	0.10	0.18	0.04	-0.09	0.98	0.10	0.06	-0.07	0.18	0.22	0.05	-0.09	1.00	0.18
tp4	0.16	0.20	-0.06	-0.03	0.16	0.26	0.16	0.13	0.16	0.26	0.14	0.12	0.45	0.23	0.04	0.90	0.73	0.54	0.81	0.93	0.67	0.43	0.18	1.00

ANEXO 2: Encuesta de relevamiento de los factores de riesgo de tungiasis en Puerto Iguazú.

Fecha:

ID (n° + inicial del nombre):

.....
(Se preservará el anonimato y la confiabilidad de los datos)

I) Variables socio-ambientales

1. **Barrio: 7 categorías** **Manzana: Número** **Casa: Número**
2. **Edad:** Numérica continua
3. **Género:** Nominal
 - Varón: 0
 - Mujer: 1
 - TTT: 2
4. **¿Cuántas personas viven en su casa?** Cuantitativa discreta
5. **¿Algún integrante de la familia estudia?** Cuantitativo discreto
6. **¿Acceden al servicio de agua potable?** Nominal
Si: 0 No: 1
7. a. **¿Pasa el camión de recolección de residuos por el barrio?** Nominal
Si: 0 No: 1 (*Pasa a pregunta 8*)
b. **¿Cuántas veces por semana?** Cuantitativa discreta
 - Diario: 0
 - 2 veces por semana: 1
 - 3 veces por semana: 2
 - Otros: 3
8. **Principales materiales de la vivienda:** Nominal
 - Ladrillo: 0
 - Madera: 1
 - Caña: 2
 - Barro: 3
 - Otro: 4
 - Observaciones:
9. **Material del piso de la vivienda:** Nominal
 - Cemento: 0
 - Madera: 1
 - Tierra: 2
10. **Porcentaje de cobertura del suelo del peridomicilio: (0% - 25% - 50% - 75% - 100%)**
 - Cemento:
 - Tierra:
 - Pasto:
 - Hojarasca:
 - Arena:
 - Otros:
11. **Porcentaje de vegetación del peridomicilio: (0% - 25% - 50% - 75% - 100%)**
 - Pasto: 0
 - Árboles: 1
 - Arbustos: 2
 - Otros:
12. **¿Ingresan los perros al interior de la vivienda?:** Nominal
Si: 0 No: 1
13. **¿Dónde duermen?**
 - Dentro de la vivienda: 0
 - Cucha: 1
 - Cobertizo/galpón: 2
 - Aire libre/bajo vivienda: 3
 - Corredor: 4

- 14. Los animales no salen de la casa sin supervisión:**
- Parcial:
 - Directa:
- 15. a. ¿Cría animales?** Nominal
Si: 0 No: 1 (*Pasa a pregunta 13*)
- b. ¿Cuáles?** Nominal
- Vacas: 0
 - Caballos: 1
 - Chanchos: 2
 - Cabras: 3
 - Gallinas: 4
- c. ¿Qué tipo de restricción aplica?:** Nominal
- En corrales: 0
 - Ambulatorio: 1
- d. ¿Con qué finalidad los cría?** Nominal
- Consumo propio: 0
 - Los vende: 1
 - Otro: 2
 - Observaciones:
- e. ¿Con qué frecuencia los revisa?** Cuantitativa discreta
- Diariamente: 0
 - 1 vez por semana: 1
 - Cada 15 días: 2
 - 1 vez al mes: 3

II) Nivel de conocimiento sobre la Pulga Tunga sp.

- 16. a. ¿Conoce el pique o bicho do pé?** Nominal
Si: 0 No: 1 (*Pasa a pregunta 14*)
- b. ¿Sabe lo qué es?** Nominal
Si: 0 No: 1
- c. ¿Qué es?** Nominal. Descripción correcta: Pulga
- Correcta: 0
 - Incorrecta: 1
 - No sabe: 2
 - Observaciones:
- d. ¿En qué época del año aparece con mayor intensidad?** Nominal
- Verano: 0
 - Otoño: 1
 - Primavera: 2
 - Invierno: 3
 - Otro: seca: 4
 - No sabe: 5
- e. ¿En qué sitios del hogar suele encontrarlo?** Nominal
- Bajo la vivienda: 0
 - En el suelo del patio: 1
 - Galpones/cobertizo: 2
 - Otros: donde duermen los perros: 3

III) Actitudes y Prácticas

- 17. ¿Recurre al centro de salud cuando lo pica a ud. o a alguien de su familia?** Nominal
Si: 0 No: 1
- 18. a. ¿Ud. o algún integrante de su familia ha sido picado por pique en los últimos 6 meses?**
Si: 0 No: 1 (*pasa a pregunta 16*)
- b. ¿Quiénes?** Nominal
- < 14 años: 0
 - > 14 años: 1
 - Observaciones:
- c. ¿En qué lugar?:** Nominal
- Dedo gordo del pie: 0

- Demás dedos del pie: 1
- Resto del pie: 2
- Piernas: 3
- Manos: 4
- Muslos: 5
- d. **¿Se extrae manualmente el pique?** Nominal
Si: 0 No: 1
- e. **¿De qué manera?** Nominal
 - Aguja: 0
 - Espina: 1
- f. **¿Se desinfecta luego de la extracción?:** Nominal
Si: 0 No: 1
- g. **¿Con qué producto?** Nominal. Manera correcta: Alcohol, Pervinox, otro desinfectante.
 - Correcta: 0
 - Incorrecta: 1
 - Observación:
- 19. a. **¿Utiliza algún método preventivo en su patio?** Nominal
Si: 0 No: 1 (*pasa a pregunta 17*)
- b. **¿Con qué riega?** Nominal
 - Agua: 0
 - Insecticida: 1
 - Otro: 2
 - Observaciones:
- c. **¿Con qué frecuencia?** Cuantitativa discreta
 - 1 vez por semana: 0
 - Cada 15 días: 1
 - 1 vez al mes: 2
- 20. **¿Anda descalzo por el patio?:** Nominal
Si: 0 No: 1
- 21. **¿Qué calzado usa fuera de la casa?** Nominal
 - Cerrado: 0
 - Abierto: 1

IV) Percepciones de las acciones del Municipio-Ministerio de Salud

- 22. a. **¿El municipio realiza campañas de concientización para controlar el pique?** Si: 0 No: 1
- b. **¿El municipio realiza jornadas de educación sobre el pique?** Si: 0 No: 1
- c. **¿Cada cuánto los visitan los promotores de salud en el barrio?** _____
- 23. a. **¿Qué servicio de Salud utiliza con más frecuencia?**
 - Hospital: 0
 - CAPS: 1
 - Centros de Salud Fronterizos: 2
 - Clínicas privadas: 3
- b. **¿Cómo califica la atención de los servicios de salud de la ciudad?**
 - Buena: 0
 - Regular: 1
 - Mala: 2
- 24. **¿Conoce los servicios de salud disponibles en su comunidad?** Si: 0
No: 1
- 25. **¿Puede viajar hacia el centro de salud en cualquier horario del día o la noche?** Si: 0
No: 1

ANEXO 3: Trabajos publicados en relación al estudio eco-epidemiológico de las pulgas en la provincia de Misiones

- Urdapilleta, M., Linardi, P. M., y Lareschi, M. (2019). Fleas associated with sigmodontine rodents and marsupials from the Paranaense Forest in Northeastern Argentina. *Acta tropica*, 193, 71-77. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.02.011>
- Urdapilleta, M., Cicuttin, G.L., De Salvo, M.N., Pech-May, A., Salomon, O.D., y Lareschi, M. (2020). Molecular detection and identification of *Bartonella* in the cat flea *Ctenocephalides felis felis* collected from companion animals in a border area in northeastern Argentina. *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*, 19, 100361. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2019.100361>
- Lareschi, M., Savchenko, E., y Urdapilleta, M. (2019). Ectoparasites associated with sigmodontine rodents from northeastern Argentina. *Therya*, 10(2), 103-108. <https://doi.org/10.12933/therya-19-758>
- Urdapilleta, M., Pech-May, A., Lamattina, D., Burgos, E.F., Balcazar, D.E., Ferrari, W.A.O., Lareschi, M. y Salomón, O.D. (2021). Ecology of fleas and their hosts in the triffinio of north-east Argentina: first detection of *Rickettsia asemonensis* in *Ctenocephalides felis felis* in Argentina. *Medical and Veterinary Entomology*. <https://doi.org/10.1111/mve.12546>
- Urdapilleta, M., Galliari, C.A., Navarro F.T., Lareschi, M. (2022) Effect of host and environment related factors on the distribution of the ectoparasites of the montane grass mouse *Akodon montensis* (Cricetidae, Sigmodontinae) in the Atlantic Forest ecoregion in northeastern Argentina, with emphasis on laelapids (Mesostigmata). *Revista mexicana de biodiversidad*, 93: e933894. <https://doi.org/10.22201/ib.20078706e.2022.93.3894>