El Colegio de la Frontera Sur

El papel de los marsupiales y perros en la dinámica de transmisión de tres rickettsias (Bacteria) en Campeche, México

TESIS

presentada como requisito parcial para optar el grado de
Maestro en Ciencias en Recursos Naturales y Desarrollo Rural

Por

Edgar Rojero Vázquez

2017

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

A todas las personas, instituciones y dependencias que colaboraron en la realización del presente trabajo.

A El Colegio de la Frontera Sur, el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por las facilidades y financiamiento otorgado para realizar el programa de maestría.

A Manuel Weber Rodríguez por su amistad, paciencia y todo el apoyo brindado durante la realización de este proyecto.

A Abel Gutiérrez Ortega y David González Solís por aceptar formar parte de mi comité tutelar, por los consejos, recomendaciones y revisiones al manuscrito.

Al sínodo externo conformado por Salomé Cabrera, Gabriela García y Juan Carlos Pérez, por sus comentarios y sugerencias para mejorar el manuscrito.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) y a Justo Rivera por el apoyo otorgado durante el trabajo de campo. A Tadeo Mateos e Irwin Chávez por acompañarme y ayudarme en el trabajo de campo y a los habitantes de las localidades por todo el apoyo al abrirnos las puertas de sus casas y su confianza.

A Ethan, Ana Lilia, Jorge Gaona por su colaboración en el procesamiento de muestras en el laboratorio.

A Guadalupe Gordillo Pérez, Carla Sánchez Hernández, Abel Gutiérrez Ortega y Salomé Cabrera Romo por su apoyo y compartir sus experiencias para el diseño de los métodos en el trabajo de laboratorio.

A Gabriela García Marmolejo por su apoyo con los mapas.

Al proyecto titulado “Prevalencia de los agentes causales de enfermedades Rickettsiales transmitidas por garrapatas y su tipificación en vector, roedores y pacientes de la República Mexicana” (No. de registro R–2012–785–069) de la comisión nacional de investigación del IMSS (FIS/IMSS/G13/1192), dirigido por Guadalupe Gordillo Pérez, por financiar gran parte del trabajo de laboratorio. De igual forma, a Abel Gutiérrez Ortega y Carla Sánchez Hernández por su apoyo económico para el procesamiento de las muestras.

A mi familia y amigos que desde lejos me brindaron todo su apoyo y motivación.

ÍNDICE

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS 1
RESUMEN 3
INTRODUCCIÓN 4
ANTECEDENTES 6
Aspectos ecológicos 9
Diagnóstico 10
JUSTIFICACIÓN 12
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN 12
HIPÓTESIS 13
OBJETIVOS 13
General 13
Específicos 13
MÉTODOS 14
Área de estudio 14
Capturas 15
Diagnóstico molecular 17
Análisis de datos 19
Factores de riesgo de infección por PTG 22
RESULTADOS 24
Infecciones 24
Abundancia de hospederos 26
Abundancia de garrapatas en hospederos 29
Prevalencias y factores de riesgo 32
DISCUSIÓN 34
Infecciones 34
Anaplasma phagocytophilum 34
Ehrlichia canis 36
Ehrlichia chaffeensis 38
Abundancia de hospederos 39
Abundancia de garrapatas en hospederos 41
Prevalencias y factores de riesgo 43
Didélfidos y perros en la dinámica de transmisión de Anaplasmataceae 45
RECOMENDACIONES 48
CONCLUSIONES 50
LITERATURA CITADA 51
ANEXOS 59

RESUMEN

En años recientes, a nivel mundial, se ha visto un incremento de patógenos transmitidos por garrapatas (PTG), como *Ehrlichia* spp. y *Anaplasma* spp., lo que pone en riesgo la salud de humanos, animales domésticos y silvestres. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar la presencia de tres bacterias (*Anaplasma phagocytophilum, Ehrlichia canis* y *E. chaffeensis*) en dos especies de tlacuaches (*Didelphis* spp.) y perros de libre rango de cuatro localidades en un área rural cercana a la ciudad de Campeche, México. Los agentes fueron detectados por la técnica molecular de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que tenían como blanco un fragmento del gen 16s ADNr específico a cada uno de los tres patógenos de 102 tlacuaches y 44 perros. *Anaplasma phagocytophilum* estuvo presente en tlacuaches y perros, *E. canis* sólo en perros y *E. chaffeensis* no fue detectada. La prevalencia de *E. canis* en perros fue de 7 %, mientras que *A. phagocytophilum* estuvo presente en 27 % de los perros y 3 % de los tlacuaches. Es la primera vez que se detecta a *A. phagocytophilum* en *D. marsupialis.* A pesar de la baja prevalencia de infección de ambas bacterias, los resultados son de interés para la salud pública por la capacidad zoonótica de *A. phagocytophilum,* por las altas abundancias de garrapatas en los hospederos y porque las poblaciones de tlacuaches y perros de libre–rango alcanzan altas densidades en el área de estudio.

Palabras clave: Patógenos transmitidos por garrapatas (PTG); PCR; *Anaplasma phagocytophilum; Ehrlichia chaffeensis; E. canis;* interfaz entre fauna doméstica-silvestre; México.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas emergentes (EIE) se definen como aquellas que recientemente han sido descubiertas, incrementado su incidencia o rango geográfico (Daszak *et al.* 2001). Su emergencia es atribuida a factores socio-económicos, ambientales y ecológicos, como los sociodemográficos, cambio climático y de uso de suelo (Estrada-Peña y de la Fuente 2014). Dentro de los 335 brotes de EIE analizados en el periodo 1940–2004 (Jones *et al.* 2011), están incluidas las enfermedades causadas por las bacterias patógenas pertenecientes a las familias Anaplasmataceae y Rickettsiaceae (orden Rickettsiales) (Parola *et al.* 2009). *Anaplasma phagocytophilum, Ehrlichia canis* y *E. chaffeensis* son bacterias patógenas de la familia Anaplasmataceae, que son transmitidas por garrapatas de la familia Ixodidae e infectan a una gran variedad de vertebrados (McQuiston *et al.* 2003; Yabsley 2010; Atif 2015). Desde que se describieron *A. phagocytophilum* y *E. chaffeensis* en humanos en 1986 y *E.* canis en perros en 1935, se ha visto un aumento en los casos reportados (principalmente en Europa y América del norte) de las enfermedades causadas por estos patógenos en humanos y otros vertebrados (McQuiston *et al.* 2003; Paddock y Childs 2003; Atif 2015), por lo que son considerados patógenos emergentes (Yabsley *et al.* 2010; Dahlgren *et al.* 2011; Atif *et al.* 2015). Las garrapatas fungen como vectores del agente etiológico, el cual adquieren de un hospedero infectado y en una segunda comida lo transmiten a otro hospedero (McQuiston *et al.* 2003) (Fig. 1).

En general, el ciclo de transmisión de estos patógenos involucra a especies de vertebrados domésticos, silvestres y humanos, estos últimos actúan como hospederos accidentales (Fig. 1). El papel de cada especie de hospedero en la dinámica de transmisión de estos patógenos depende, en parte del contexto ecológico en el que se encuentra y en si se puede infectar. Es común que las especies de tlacuaches generalistas, como el de Virginia (*Didelphis virginiana*) y el común (*D. marsupialis*), compartan el hábitat con especies domésticas en paisajes con perturbación antrópica. Esto tiene implicaciones epidemiológicas, ya que los perros domésticos se han considerado reservorios de *E. canis* y posibles reservorios de *A. phagocytophilum*, mientras que los tlacuaches son posibles reservorios de *E. chaffeensis* y *A.*

phagocytophilum (Castellaw *et al.* 2011; Beall *et al.* 2012; Keesing *et al.* 2012; Conover y Vail 2015). Si las especies silvestres y domésticas coexisten, el proceso de transmisión de patógenos se da hacia ambos lados: los patógenos para los cuales los animales domésticos son reservorios (*E. canis* y en menor medida *A. phagocytophilum*) serían transmitidos hacia animales silvestres, mientras que *E. chaffeensis,* al tener como hospedero reservorio especies silvestres, puede transmitirse hacia las especies domésticas y humanos (Paddock y Childs 2003; Beall *et al.* 2012). En este contexto, *D. virginiana* y *D. marsupialis* pueden estar involucrados en la dinámica de transmisión de los tres patógenos, al igual que los perros con dueño y de libre rango de áreas rurales (perros que tienen acceso a una casa pero son libres de desplazarse a donde quieran) (Fig. 1). Esta aseveración está respaldada porque: 1) *D. virginiana* se ha reportado como hospedero competente para *A. phagocytophilum* y *E. chaffeensis* (Yabsley 2010; Keesing *et al.* 2012), y 2) las dos especies de tlacuaches son especies filogenéticamente relacionadas, generalistas y comunes en la interfaz entre animales domésticos-silvestres (Colchero *et al.* 2014; Zarza y Medellín 2014), lo que las hace más susceptibles a contraer a los patógenos transmitidos por garrapatas (PTG). Tan solo, en la selva Lacandona, el tlacuache común representa el 40 % de la biomasa total de pequeños mamíferos (Colchero *et al.* 2014). En este sentido, las implicaciones epidemiológicas de la abundancia y densidad que pueden representar los tlacuaches para los PTG pueden ser relevantes.

Considerando lo anterior, en las áreas rurales cercanas a la ciudad de Campeche, las poblaciones de tlacuaches habitan una región con un paisaje fragmentado, compuesto por poblaciones humanas, animales domésticos, silvestres y una matriz de vegetación en diferentes grados de perturbación. Por tal motivo, en el presente estudio evalué el papel de los tlacuaches y perros de libre rango con dueño en la dinámica de transmisión de *A. phagocytophilum*, *E. canis* y *E. chaffeensis* en un área rural cercana a la ciudad de Campeche, Campeche, México. Para lograrlo, primero determiné si los agentes etiológicos están presentes en los tlacuaches y perros del área de estudio y la proporción de hospederos infectados (prevalencia). También, calculé la abundancia de garrapatas en los hospederos y la relacioné con posibles variables predictoras.

Finalmente, relacioné con métodos de asociación eco-epidemiológica las prevalencias de los patógenos en los hospederos a una serie de factores de riesgo, con el fin de evidenciar patrones en la relación patógeno-vector-hospedero.

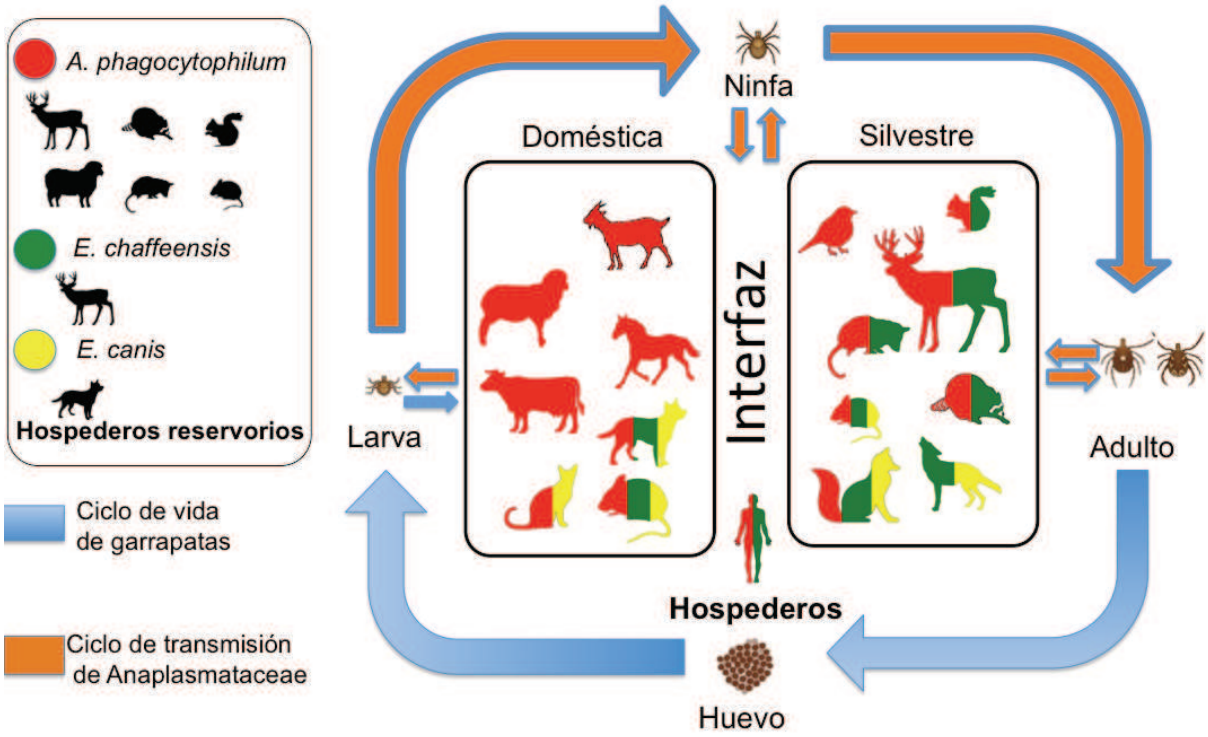


Figura 1. Esquema general que integra el ciclo de vida de las garrapatas, el ciclo de transmisión de Anaplasmatacea y los hospederos de ambos. La posible transmisión de las Rickettsias entre las garapatas y los vertebrados o directamente entre las garrapatas está marcado por flechas naranjas.

ANTECEDENTES

Las tres rickettsias estudiadas son cosmopolitas, pero generalmente, *E. chaffeensis* está más restringida hacia la fauna silvestre, *E. canis* a animales domésticos y *A. phagocytophilum* a ambos (Yabsley 2010; Dahlgren *et al.* 2011; Atif 2015). A nivel mundial, el principal hospedero reservorio y vector de *E. canis* son los perros y la garrapata café de perros (*Ripicephalus sanguineus*), respectivamente, aunque también se ha reportado en otras especies de cánidos (zorras, coyotes, lobos) y gatos (Koenen *et al.* 2013) (Fig. 1). Guerrero-Sánchez y Weber-Rodríguez (2012) reportaron la

presencia de *E. canis* en perros domésticos de zonas rurales y la asociaron con la prevalencia en animales silvestres. Ellos encontraron una alta seroprevalencia de *E. canis* en la zorra gris (*Urocion cinereoargenteus*) (67 %) en la Reserva de la Biósfera Calakmul, similar a la de los perros domésticos (70 %). En contraste, la prevalencia en las zorras grises fue menor (50 %) en una comunidad donde los perros domésticos presentaron una seroprevalencia del 27 %. En general, las prevalencias en perros reportadas en la península de Yucatán son altas: 36 % por PCR, y mayores por métodos serológicos (44 %) debido a que también detectan infecciones pasadas (Rodríguez-Vivas *et al.* 2005; Pat-Nah *et al.* 2015). En EE. UU., *E. chaffeensis* es una bacteria zoonótica que tiene como principal reservorio al venado cola blanca con una seroprevalencia máxima de 86 % y prevalencia por PCR máxima de 40 % (Yabsley 2010), y a la garrapata solitaria (*Amblyomma americanum*) como principal vector (Yabsley 2010). En ambientes naturales, se ha comprobado que los coyotes y zorras también están involucrados en la dinámica de *E. chaffeensis*, y en menor medida, los mapaches y el tlacuache de Virginia (Yabsley 2010) (Fig. 1). En áreas de EE. UU donde *E. chaffeensis* es endémica, los perros están involucrados en la epidemiología de este agente (Beall *et al.* 2012). *Anaplasma phagocytophilum* infecta a una gran variedad de vertebrados alrededor del mundo, incluyendo a humanos. *Ixodes scapularis* e *I. pacificus* son los vectores reportados en EE. UU. (Atif 2015) y el principal reservorio es el venado cola blanca; en tanto que en Europa es mantenida principalmente por rumiantes silvestres y domésticos. Los roedores, ardillas y el tlacuache de Virginia también son hospederos de este agente (Yabsley *et al.* 2010) (Fig. 1). Si bien, no se ha reportado a los perros como hospederos reservorios de *A. phagocytophilum,* son frecuentes los reportes de esta bacteria en perros con seroprevalencias de 10–57 % y prevalencias por PCR de 0.5–6 % (Kohn *et al.* 2011; Movilla *et al.* 2016). El único estudio con fauna silvestre y estos tres PTG en México reportaron prevalencias por PCR en roedores cercanas al 3 %, la cual es similar al 3 % de prevalencia de *E.* chaffeensis en perros y baja en relación a las prevalencias de *A. phagocytophilum* (16 %) y *E. chaffeensis* (47 %) en el venado cola blanca en EE. UU (Yabsley 2010; Sosa-Gutiérrez *et al.* 2014).

El periodo de incubación de *A. phagocytophilum* y *E. chaffeensis* en humanos es de 7–14 días, mientras que en rumiantes es de 5–15 y 10 días, respectivamente. En los perros, para *E. canis* es de 1–3 semanas (McQuiston *et al.* 2003; Yabsley, 2010). Estas tres bacterias invaden las vacuolas de los leucocitos y causan enfermedades que reciben el nombre en función del tipo de célula que infectan. Por ejemplo, *E. chaffeensis* y *E. canis* principalmente residen en los monocitos, y la enfermedad que causan se llama ehrlichiosis monocítica humana (EMH) y canina (EMC). *Aanaplasma phagocytophilum* principalmente infecta a células granulocíticas y causan la denominada anaplasmosis granulocítica humana (AGH) y canina (AGC) (McQuiston *et al.* 2003). La sintomatología de EMH y AGH es similar, provocan fiebre, dolor de cabeza y escalofríos; las complicaciones en pacientes inmunosuprimidos son comunes y pueden ser mortales (McQuiston *et al.* 2003). La EMC puede ser aguda, subclínica y crónica y sus signos clínicos varían dependiendo de la fase; los más frecuentes son la hipertemia, anorexia y emaciación. *Ehrlichia canis* en perros, generalmente se presenta en su fase aguda, seguida de una fase crónica que reduce la esperanza de vida, pero puede durar varios años (Pat–Nah *et al.* 2015). Los signos clínicos de AGC y EMC son el cansancio, fiebre y anorexia, aunque la hepatomelagia y alteraciones hematológicas (anemia, leucopenia, trombocitopenia) son comunes. La infección por *E. chaffeensis* es asintomática en venados, mientras la de *A. phagocytophilum* en animales puede ser asintomática o bien causar fiebre, anorexia y hacer más susceptible al hospedero hacia las infecciones secundarias (Atif 2015).

Sólo en EE. UU., durante el periodo 2000–2007, la incidencia de *E. chaffeensis* en la población de humanos incrementó de 0.80 a 3.0 casos/millón de personas/año, con una tasa de hospitalización de 49 % y una mortalidad de 2 % (Dahlgren *et al.* 2011). Paddock y Childs (2003) consideran que la enfermedad causada por *E. chaffeensis* es emergente en EE. UU., debido al incremento en la población humana, rango geográfico del vector y del principal hospedero, y una mejora en las prácticas de vigilancia de la salud pública y en los métodos de diagnóstico. En Europa, *A. phagocytophilum* es considerada como el patógeno transmitido por garrapatas más propagado en animales

(Stuen 2007). Las muertes en humanos causada por esta bacteria oscilan entre el 7–10 % en EE. UU (Koenen *et al.* 2013).

Aspectos ecológicos

La epidemiología de patógenos transmitidos por garrapatas (PTG) se puede abordar identificando los factores que afectan la distribución y abundancia de las garrapatas, así como la influencia que estos factores y los cambios antrópicos tienen sobre la dinámica de los PTG (Pfäffle *et al.* 2013). Dentro de los principales factores que incrementan o reducen la posibilidad de sobrevivencia y tasa de desarrollo de las garrapatas que se encuentran en la vegetación, se encuentran las variaciones en el microclima (e. g., temperatura, radiación solar, humedad relativa en suelo y sotobosque) (Estrada-Peña y de la Fuente 2014). También la composición y abundancia de la comunidad de hospederos para las garrapatas intervienen en el mantenimiento de las poblaciones de estos parásitos y además son factores que determinan la prevalencia de los PTG. En este sentido la densidad de los vectores es proporcional a la densidad de los hospederos, y el riesgo de infección en los hospederos está relacionado con la abundancia total de garrapatas, la densidad de los reservorios y la prevalencia del patógeno en estos (Estrada-Peña y de la Fuente 2014). Es por esto que las infecciones causadas por PTG se presentan en ambientes donde los vectores (garrapatas), los hospederos reservorios y el agente etiológico coexisten (Gortazar *et al.* 2014). Bajo este planteamiento, los factores que reflejen la abundancia de hospederos, como medidas de abundancia relativa, se pueden utilizar para explicar la presencia del patógeno y/o el vector. El riesgo de infección también se ve influenciado por los sitos con diferentes historias de uso antrópico, porque afecta directa o indirectamente la abundancia de hospederos y garrapatas (Pfäffle *et al.* 2013). Por ejemplo, en los bosques del noreste de EE. UU., el riesgo de infectarse con *E. chaffeensis* es alto, porque albergan una alta población de venado cola blanca y la garrapata *A. americanum* (Yabsley, 2010). Los humanos y las especies domésticas, como los perros, se involucran en el ciclo cuando viven o frecuentan las áreas donde se presentan el vector y reservorio de *E. chaffeensis*; estas áreas generalmente son ecotonos entre bosques y pastizales. Por lo tanto, la frecuencia de contacto entre fauna doméstica y silvestre es mayor en paisajes con asentamientos humanos rurales, y vegetación nativa, por lo que el riesgo de

infección a humanos también es mayor (Paddock y Childs, 2003). El cambio de uso de suelo provocado por actividades humanas puede facilitar o afectar la transmisión de los PTG. Cuando la vegetación nativa es reemplazada por campos agrícolas, ganaderos y asentamientos urbanos, las especies de hospederos silvestres son reemplazadas por animales domésticos, quienes además pueden favorecer a las poblaciones de unas pocas especies de vectores e incrementar el riesgo de infección en la interfaz entre especies domésticas-silvestres (Knobel *et al.* 2014). En este sentido, las variables que reflejen las historias de uso antrópico de suelo, la distancia a un asentamiento rural, o la abundancia de hospederos domésticos, como indicadores de las historias ambientales de los sitios, podrían considerarse factores de riesgo, dependiendo de la ecología del patógeno.

Diagnóstico

Para el diagnóstico de las especies de *Anaplasma* y *Ehrlichia* se han empleado métodos como la citología, búsqueda de agregaciones de la bacteria en las células blanco (mórulas), serología, aislamiento del agente y métodos de detección molecular, como la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Debido a que los métodos serológicos y moleculares permiten analizar muchas muestras en poco tiempo (comparados con la citología y la búsqueda de mórulas), la mayoría de los estudios epidemiológicos está basada en ellos (Harrus y Waner 2011; McQuiston *et al.* 2003; Yabsley 2010; Rodríguez-Vivas *et al.* 2015).

Las pruebas serológicas, como la inmunofluorescencia indirecta (IFI), tienen como desventaja el no detectar al agente etiológico durante la primera fase de la enfermedad (McQuiston *et al.* 2003). Esto se debe a que los anticuerpos aún no se forman durante la fase aguda de la infección. Por ejemplo, durante la primera semana de la enfermedad, las pruebas serológicas para *E. chaffeensis* tienden a dar resultados negativos en el 80 % de los casos (Paddock y Childs 2003). Por tal motivo, se recomienda hacer dos pruebas IFI con diferencia de 7–14 días, y un cambio de 4 veces los títulos de anticuerpos indica una infección activa (Rodríguez-Vivas *et al.* 2015). Desafortunadamente, para los estudios epidemiológicos con fauna silvestre sólo es posible tomar muestras a un mismo individuo en una sola ocasión, la mayoría de las

veces, dado que las recapturas son muy difíciles de lograr (Paddock y Childs, 2003). Una vez formados los anticuerpos IgG contra los agentes etiológicos, estos persisten por varios meses o años después del tratamiento o la eliminación de la rickettsia (Rodríguez-Vivas *et al.* 2015). En este sentido, las seroprevalencias son mayores que las prevalencias reportadas por PCR, porque detectan infecciones pasadas (Cetinkaya *et al.* 2015). Además, las pruebas serológicas tienden a presentar reacciones cruzadas entre varias especies de *Ehrlichia* y *Anaplasma*. En áreas donde la distribución geográfica de estos patógenos se traslapa, las pruebas serológicas pueden no diferenciar adecuadamente entre las especies que infectan (McQuiston *et al.* 2003). Se ha reportado que en 10–30 % de los casos, se dan reacciones cruzadas entre las especies de *Ehrlichia* y *Anaplasma* cuando el diagnóstico se hace por IFI (Paddock y Childs 2003).

Las pruebas moleculares, como la PCR y secuenciación, se recomiendan para respaldar los resultados serológicos en la detección de las rickettsias (Maggi *et al.* 2014; Sainz *et al.* 2015). Los resultados de los PCR para detectar las especies de *Anaplasma* y *Ehrlichia* sirven para confirmar una infección activa (McQuiston *et al.* 2003). Se ha demostrado, de forma experimental que los venados cola blanca infectados con *E. chaffeensis* son positivos por PCR 13 días después de la inoculación y la rickettsemia puede durar hasta 278 días (Yabsley 2010). Por su parte, *E. canis* en perros se puede detectar a partir del octavo día posterior a la inoculación (Rodríguez-Vivas *et al.* 2015).

JUSTIFICACIÓN

En México, el conocimiento sobre la prevalencia de las EIE es insuficiente. Hasta el año 2015, el sector salud reportó el primer caso de (EMH) en un paciente del centro el país, lo que sugiere la emergencia de *E. chaffeensis* en México (Sosa-Gutiérrez *et al.* 2016b). La presencia de especies de garrapatas que puedan actuar como vectores competentes de *A. phagocytophilum, E. canis* y/o *E. chaffeensis* (Guzmán-Cornejo *et al.* 2011*,* 2016), y las altas prevalencias reportadas en perros en la Península de Yucatán, reflejan la importancia de hacer un estudio exploratorio sobre la presencia de *Ehrlichia* spp. y *A*. *phagocytophilum* en animales silvestres y domésticos, más aún cuando se sabe que son enfermedades de origen zoonótico. Con este estudio, podemos ejemplificar el riesgo que representan los animales domésticos y ferales hacia la salud de animales silvestres, domésticos y humanos, ya que generalmente estas especies comparten su hábitat con especies silvestres, por lo que pueden llegar a compartir ectoparásitos (garrapatas), lo que incrementa el riesgo de transmisión de patógenos. Los resultados del presente estudio ayudarían a diseñar estrategias para la prevención de AGH y EMH.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Qué papel desempeñan los tlacuaches (*D. virginiana* y *D. marsupialis*) y los perros (*C. lupus familiaris)* de libre rango con dueño en la transmisión de *A. phagocytophilum, E. canis,* y *E. chaffeensis* y cómo varía la prevalencia en función de algunos factores de riesgo?

HIPÓTESIS

La abundancia de perros, la poca atención sanitaria que reciben y su papel como hospederos frecuentes de *A. phagocytophilum* y reservorios de *E. canis* son factores que afectan la dinámica de transmisión de estos patógenos. Por lo tanto, se espera encontrar mayores prevalencias de estas dos bacterias en los perros que en los tlacuaches silvestres simpátricos.

La presencia de tres especies de venados en el área de estudio, uno de los cuales es ampliamente reconocido como hospedero reservorio de *E. chaffeensis*, incrementa la posibilidad de que el patógeno circule en la comunidad de vertebrados competentes. Por lo tanto, se espera encontrar por lo menos que un individuo (perro y/o tlacuache) sea portador de *E. chaffeensis.*

OBJETIVOS

General

Identificar el papel que desempeñan *D. marsupialis, D. virginiana* y *C. l. familiaris* en la dinámica de transmisión de *A. phagocytophilum, E. canis, y E. chaffeensis* en un área rural cerca de la ciudad de Campeche, México.

Específicos

1) Determinar la presencia y prevalencia de *A. phagocytophilum, E. canis* y *E. chaffeensis* por PCR en *C. lupus familiaris, D. marsupialis y D. virginiana* en cuatro localidades rurales cercanas a la ciudad de Campeche.

2) Encontrar patrones espaciales en las abundancias relativas de tlacuaches y estimar la abundancia de los didélfidos y perros con dueño en el área de estudio.

3) Calcular la abundancia de garrapatas en las dos especies de tlacuaches y perros del área de estudio y relacionarla con posibles variables explicativas (antropogénicas y biológicas).

4) Relacionar la prevalencia de *A. phagocytophilum, E. canis* y *E. chaffeensis* en tlacuaches y perros con algunos factores de riesgo (antropogénicos y biológicos).

MÉTODOS

Área de estudio

El área de este estudio se localiza al sureste de la ciudad de Campeche y abarca los poblados de Chiná, Bobolá, Xcampeu y sus alrededores, así como el campo experimental del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Chiná (Fig. 2). La región cuenta con clima cálido-subhúmedo, una temperatura media anual de 27º C y una precipitación de 1120 mm (INEGI 2014). Esta zona presenta lluvias en verano y bajo porcentaje de lluvia invernal. La época de secas es durante los meses de enero a mayo. El paisaje está compuesto por campos agrícolas, potreros y poblados inmersos en un continuo de selva baja caducifolia, subcaducifolia y vegetación secundaria (acahuales) (Noriega-Trejo y Arteaga-Aguilar, 2010). El poblado de Chiná tiene una población humana de 5149 habitantes y las principales actividades económicas son la agricultura y comercio (INEGI 2010). La principal actividad económica de los 166 pobladores de Bobolá es la agricultura (INEGI 2010); no obstante, la cacería y recolección de leña para carbón son actividades importantes en el pueblo (observ. pers.). Las viviendas en el poblado de Xcampeu no están agrupadas, los 70 pobladores viven en solares y generalmente son empleados de dueños de los ranchos. La principal actividad económica es la ganadería y, en menor medida, la agricultura (comunicación personal del encargado del centro de salud de Xcampeu). El INIFAP es un terreno privado de 330 ha, principalmente con selva baja caducifolia y subcaducifolia en diferentes etapas sucesionales, que es propiedad del INIFAP y está ubicado a 3.5 km del poblado de Chiná. Antes de ser propiedad de esta institución, gran parte de la vegetación nativa de ese terreno fue talada para abrir paso a zonas de pastoreo y agrícolas; sin embargo, la vegetación ha sido poco modificada (solo tala clandestina en las orillas del predio) durante los últimos 15 años. En la parte noreste del terreno, existe cacería y extracción de leña constante por parte de los pobladores de Bobolá (comunicación personal del Dr. Justo Rivera del INIFAP). La parte sureste del polígono del INIFAP colinda con un área agrícola donde viven 20 personas (Fig. 2).

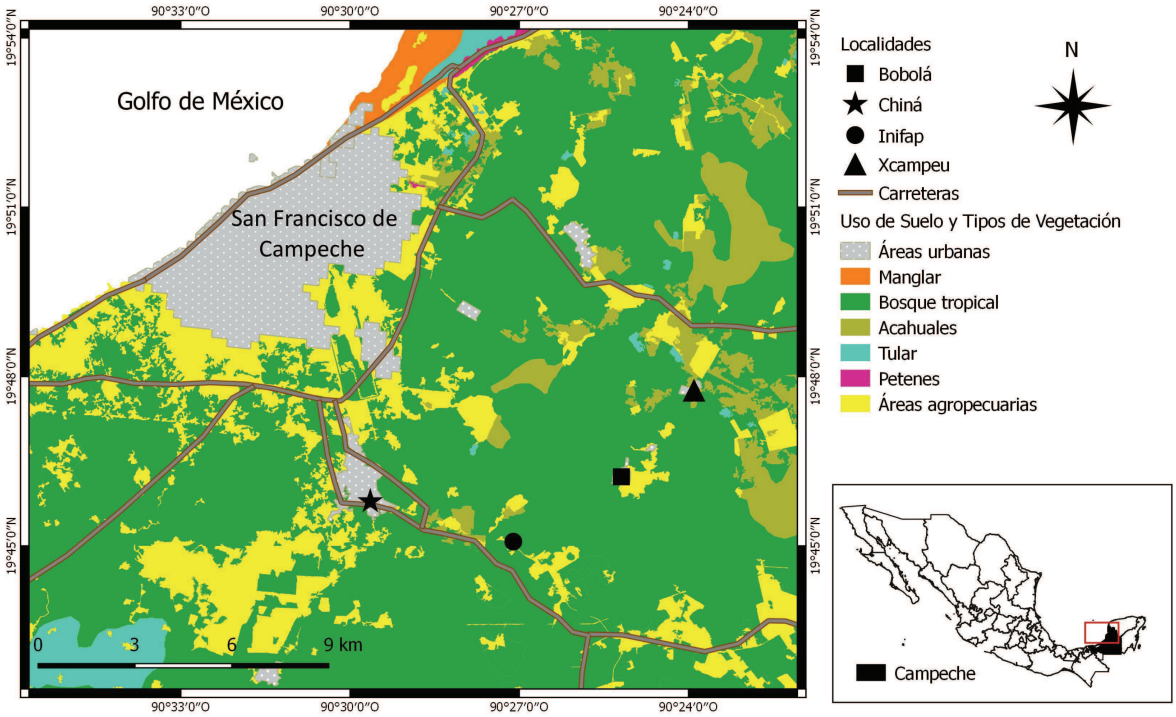


Figura 2. Mapa del área de estudio.

Capturas

El trabajo de campo lo realicé de enero a abril de 2016. Las capturas de los tlacuaches las hice en tres sitios con historias de uso antrópico distintas y con diferentes grados de sucesión (acahuales, ecotonos y solares), en cuatro localidades (Bobolá, Chiná, INIFAP y Xcampeu). Las trampas ubicadas en selva baja caducifolia, subcaducifolia y vegetación secundaria, las catalogué como trampas en acahual porque son estadios sucesionales de vegetación distintos. Las trampas en el ecotono se ubicaron en acahuales o selva baja y a una distancia no mayor de 50 m del cambio de vegetación más cercano (p. ej., de selva a campos agrícolas, ganaderos, o pastizales). Las trampas situadas en bodegas, gallineros, casas, huertos, campos agrícolas y/o ganaderos las consideré como trampas en solares. El riesgo por robo de las trampas colocadas en los acahuales cercanos a Chiná era alto, por lo que no muestree en este tipo de sitio, pero si en los otros tipos de sitios de esta localidad. En el INIFAP, no capturé ningún tlacuache en el único solar de esta localidad, por lo que no se incluyó.

El esfuerzo de muestreo lo ajusté entre localidades y tipos de sitios (acahual, ecotono y solar) para mantener las capturas equitativas entre estas categorías. De las 150 reacciones que tenía disponible para el diagnóstico molecular con PCR, mi intención era dedicar por lo menos 100 a los tlacuaches y 50 a perros. No solo me limité a muestrear a 100 tlacuaches sino a todos los que pudiera capturar durante el trabajo de campo. De igual forma, no solo me limité a recolectar las garrapatas de estos perros, sino de la mayor cantidad por poblado que cumplieran con los requisitos de tener dueño y fueran de libre rango, es decir, que tuvieran acceso a una casa, pero libres de desplazarse a donde quisieran (Gompper 2014). De los perros en esta categoría, prioricé los que acompañaban a su dueño a cazar, colectar leña, campos agrícolas y/o ganaderos. El número de perros muestreados por poblado estuvo en función del número de individuos que cumplieran con estos requisitos.

Las trampas que utilicé para la captura de los didélfidos fueron de tipo Tomahawk de tamaño medio (32 x 10 x 13 pulgadas), las cuales estuvieron a una distancia mínima de 50 m entre ellas y fueron georreferenciadas. En los acahuales y ecotonos, coloqué las trampas a lo largo de trayectos, los cuales establecí en función de la accesibilidad del sitio y seguridad de las trampas. Cada trampa la dejé en el mismo sitio de cinco a siete noches, tiempo suficiente para capturar a los distintos individuos del área y evitar recapturas. El cebo de las trampas consistió de una mezcla de atún, sardina y huevo (Guerrero-Sánchez y Weber-Rodríguez 2012), el cual fue cambiado cada dos noches, en caso que no hubiera una captura. Por las mañanas, cebé las trampas y procesé inmediatamente a los individuos capturados.

Los tlacuaches capturados los inmovilicé con una inyección intramuscular de un anestésico disociativo (Ketamina 10 mg/kg), cuyo efecto dura unos 20 min (Suzán y Ceballos 2005). Marqué a los individuos mediante tatuaje permanente en el pliegue interno de la ingle. El número del tatuaje asignado a los individuos fue en orden creciente en función de las capturas. Las muestras de sangre (1 ml) las tomé de la vena caudal del individuo (Rejmanek *et al.* 2009). Cuando el ejemplar pesó menos de 1 kg, tomé lo correspondiente al 1 % de su peso corporal (Guerrero–Sánchez y Weber-

Rodríguez 2012). La sangre colectada la coloqué en tubos BD vacutainer de 3 ml con un anticoagulante (ácido etilendiaminotetraacético, EDTA) y la almacené en una hielera a 4ºC por un máximo de 5 h, para después mantenerla a –20ºC hasta la fecha de la extracción de ADN (Ndip *et al.* 2005).

Mediante una revisión externa de los tlacuaches y perros capturados, colecté y conté las garrapatas de la familia Ixodidae utilizando pinzas de punta fina. Estas fueron diferenciadas a simple vista de las garrapatas "blandas" pertenecientes a la familia Argasidae, debido a que las primeras poseen un escutelo o coraza dorsal. Las garrapatas las almacené en microtubos cónicos Eppendorf® de 1.5 ml con 1 ml de alcohol etílico al 70 % (Márquez-Luna 2005). Cuando el individuo tenía más de 50 garrapatas en el vientre y dorso, realicé una estimación del total, para las cuales conté las garrapatas dentro de un círculo de 5 cm de diámetro en el dorso y vientre y lo extrapolé al resto del cuerpo. A esta estimación le sumé las garrapatas de las patas, cola y orejas, extremidades que por no tener pelo, permiten el conteo de los individuos. También registré el peso, medidas corporales (longitud de la cabeza, cuerpo, cola y pata trasera), condición corporal, sexo y especie de cada individuo capturado. La determinación de los tlacuaches a nivel de especie la hice usando la guía de Aranda (2000).

Las garrapatas colectadas las envié al Laboratorio de Enfermedades Infecciosas del Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, a cargo de la Dra. Guadalupe Gordillo Pérez, para su posterior identificación a nivel de especie.

Diagnóstico molecular

Para la extracción de los ácidos nucleicos de las muestras de sangre completa, usé el kit de extracción DNAeasy Blood & Tissue (QIAGEN®), según las instrucciones del fabricante, para obtener un volumen de elución de 150 μL. Las muestras de ADN las almacené a -20ºC hasta su uso en el PCR punto final. Llevé a cabo una PCR en el ADN extraído, para detectar la presencia de *E. canis, E. chaffeensis* y/o *A. phagocytophilum.* Las muestras de ADN se sometieron a un primer PCR (PCR punto final) para amplificar un segmento de 800 pares de bases (pb) correspondiente al gen 16S ADNr de

Anaplasmataceae*,* utilizando los cebadores 15F ("forward"/sentido) y 842R (cebador "reverse"/anti–sentido) (Tabla 1). El producto amplificado del primer PCR se sometió a un PCR especie-específico (PCR anidado) utilizando los cebadores específicos para cada especie y complementados por un cebador género-específico llamado GA1UR (Tabla 1). Los cebadores utilizados en la reacción de PCR anidado están dirigidos a una región para el gen 16S ADNr lo suficientemente heterogénea entre las especies de *Ehrlichia* y *A. phagocytophilum,* lo que permite el diseño de cebadores especie-específicos y la amplificación de un fragmento de 410 pb*.*

El protocolo consistió en un PCR punto final, con 25 μl de volumen total, compuesto por 12.5 μl de H_2O grado molecular; 2.5 μl de buffer para PCR; 1.5 mM de $MgCl_2$; 0.2 mM de cada nucleótido (DNTP); 2 pmol de cada cebador (iniciador y anti-sentido); 1.2 U de la enzima Taq polimerasa (Invitrogen, Brasil); y 5 μl de la extracción de ADN con una cantidad de ADN de 55–110 ng. Cuando los 5 μl de la extracción de ADN no contenían por los menos 55 ng de ADN, agregué un mayor volumen de la extracción (un máximo de 10 μl) y ajusté el volumen de agua para obtener un volumen final de 50 μl. El protocolo de PCR utilizado para ambas reacciones (punto final y anidado) consistió en 95ºC de incubación por 5 min; posteriormente, 94ºC por 1 min para desnaturalización, 50ºC por 2 min para el alineamiento, a 70ºC por 1.5 min para la extensión, y finalmente una temperatura de extensión de 70ºC durante 7 min. Como control positivo de reacción utilicé muestras de ADN de perros o pacientes humanos positivos a *A. phagocytophilum, E. canis* o *E. chaffeensis*, donadas por la Dra. Guadalupe Gordillo Pérez del IMSS*.* El control negativo consistió en la mezcla maestra con 5 μl de agua para biología molecular libre de ADNasas. Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 1.5 % teñidos con bromuro de etidio (Anderson *et al.* 1992; Warner y Dawson 1996). Consideré a las muestras positivas a cada uno de las tres bacterias cuando se pudo apreciar una banda de 410 pb en el PCR anidado respectivo a cada bacteria (Anexo 1).

Tabla 1. Cebadores usados para la identificación de *A. phagocytophilum, E. canis* y *E. chaffeensis.*

Función	Dirigido *16S ADNr*	Cebadores	Secuencias de nucleótidos 5' – 3'	Tamaño amplicón
Cebadores familia específicos	*Ehrlichia* spp. *Anaplasma* spp.	15F (sentido)	ATC ATG GCT CAG AAC GAA CG	800
		842R (anti–sentido)	CTC ATC GTT TAC TCG GTC GAC T	N/A
Cebadores especie específicos	*E. canis* (M73226.1)	Canis (sentido)	CAA TTA TTT ATA GCC TCT GGC TAT AGG A	409pb 49–457
	E. chaffeensis (M73222.1)	Chaf: He–1 (sentido)	CAA TTG CTT ATA ACC TTT TGG TTA TAA AT	410pb, 49–458
	A. phagocytophilum (DQ458807.2)	HGE (GE9F) (sentido)	AAC GGA TTA TTC TTT ATA GCT TGC T	412pb 1–412
	Ehrlichia spp.* (Reverse)	GA1UR (anti–sentido)	GAG TTT GCC GGG ACT TCT TCT	N/A

Análisis de datos

Para calcular la prevalencia, dividí el número de hospederos infectados entre el número de hospederos que examiné y lo expresé en porcentaje. Utilicé el método de Wilson para calcular los límites superiores e inferiores del intervalo de confianza (I.C.) al 95 % de las prevalencias (Newcombe 1998). La abundancia de garrapatas refiere al número de garrapatas (de todas las especies y estadios) en un solo hospedero, tomando en cuenta a los que no presentaron ninguna garrapata. La abundancia promedio de garrapatas refleja el número total de garrapatas en una muestra de hospederos dividido por el número total de hospederos examinados. La intensidad de infestación es el número de garrapatas en un individuo (Bush *et al.* 1997).

La abundancia relativa de los tlacuaches la estimé con el número de capturas divididas por el esfuerzo de muestreo, el cual consistió en el número de trampas activas por noche (noches/trampa). Para probar si las abundancias relativas de las dos especies de tlacuaches variaron en función de la localidad e historia del sitio, realicé un ANOVA para *D. marsupialis* y para *D. virginiana,* una prueba de Kruskal-Wallis debido a que los datos de abundancia relativa no cumplieron con el supuesto de homogeneidad de varianzas. Para determinar si a mayor abundancia relativa de *D. virginiana*, la abundancia relativa de *D. marsupialis* disminuye, hice una prueba de correlación de

Pearson. La estimación de la abundancia de perros por localidad la hice promediando la relación humanos: perros reportada en 14 localidades rurales en México, la cual fue de un perro por cada 3.5 humanos y extrapolándola al número de habitantes por poblado (Gompper 2014). La abundancia de perros está subestimada, porque los estudios de caso en los que me basé, sólo consideraron a los perros con dueño, ignorando a los perros de calle y de libre rango sin dueño. La estimación del número de tlacuaches en el área de estudio la hice con dos métodos distintos. El primero basa la estimación en el área total de suelo forestal, el número de trampas y capturas en este uso de suelo, y el área real de muestreo de cada trampa (7.8 ha), la cual no es precisa, pero está basada en el éxito de captura y recapturas de los tlacuaches. Para la segunda estimación utilicé el reporte de densidad *D. marsupialis* en un ecosistema similar al del área de estudio (selva tropical caducifolia) y lo extrapolé al área total de uso de suelo forestal en el mismo polígono. El reporte de densidad que utilicé fue el de un ecosistema lo más parecido al del presente estudio. Fleeming (1972) reportó una densidad de 0.09 *D. marsupialis* por hectárea en una selva tropical caducifolia secundaria en Panamá. Con ayuda del programa QGIS versión 2.18.3 (QGIS Development Team 2016) calculé el área total de uso de suelo forestal (ecotonos y acahuales) en un polígono delimitado por las principales carreteras dentro del área de estudio (Anexo 2). Utilicé para los usos de suelo y vegetación un mapa vectorial escala 1:50 000 de la serie Recursos Forestales, el cual comprende información derivada de una clasificación supervisada sobre imágenes RapidEye (2011–2012) complementada con información de campo obtenida del Inventario Estatal Forestal y de Suelos (periodo 2013–2014), y la carta de Uso del Suelo y Vegetación Serie V (CONAFOR 2014). Finalmente, con base a la capacidad competente de *D. virginiana* hacia *A. phagocytophilumm* (ver Keesing *et al*. 2012), estimé el número de garrapatas infectadas por este patógeno, bajo el supuesto que todas las especies de garrapatas en los tlacuaches del área de estudio fueran vectores potenciales y si todos los tlacuaches estuvieran infectados, pero también considerando la prevalencia de este patógeno en los tlacuaches (3 %).

Utilicé pruebas de U-Mann-Whitney para determinar si la abundancia de garrapatas varió en relación: a las dos especies de tlacuache, entre tlacuaches y perros, a la distancia al solar más cercano (0–600 m y 601–1800 m), y al sexo de los tlacuaches. Para evitar enfrentarme con el problema de tamaños de muestra no suficientes, y por la similitud en los hábitos de *D. marsupialis* y *D. virginiana*, decidí considerar a estas dos especies como una sola para las pruebas estadísticas ya mencionadas. Calculé el tamaño de muestra de los tlacuaches con una prueba de poder estadístico que basa la estimación en un intervalo de confianza (95 %), en una población infinita y en la prevalencia esperada. Para el cálculo del tamaño de muestra *a priori*, utilicé una prevalencia mínima esperada de 1 %, para la cual la prueba me arrojó una muestra con al menos 298 tlacuaches. Para estimar el tamaño de muestra *a posteriori*, utilicé las prevalencias encontradas en el presente estudio. La significancia de la relación entre las abundancias de garrapatas en tlacuaches en función de la historia de los sitios y localidad, la determiné mediante una prueba de Kruskal-Wallis. Utilicé esta última prueba para determinar si la abundancia de garrapatas en perros varió en función de la localidad y una prueba de U-Mann-Whitney para determinar si la abundancia de garrapatas varió cuando los perros recibían tratamiento para prevenirlas o no.

Usé modelos lineales generalizados (GLM, por sus siglas en inglés) con una distribución de error negativa binomial y una función del vínculo logarítmica para modelar la abundancia de garrapatas en los hospederos con cinco predictores potenciales. Desarrollé dos modelos: uno para los tlacuaches y otro combinando los tlacuaches y perros. Las variables predictoras en el modelo máximo para tlacuaches fueron la localidad, historia de los sitios, distancia de la captura al solar más cercano, sexo, y relación peso-longitud total. En el modelo máximo de perros-tlacuaches, utilicé los mismos predictores, con excepción de la historia de los sitios, y relación peso-longitud. La significancia del modelo la determiné con la prueba estadística Omnibus que prueba si la varianza explicada es significativamente mayor a la varianza no explicada (Introduction to SAS 2007). Opté por una distribución binomial negativa, debido a la sobredispersión en los datos cuando los modelé con una distribución tipo Poisson (Buckley 2015). Para conocer si los datos estaban sobredispersados me basé

en el parámetro de dispersión y en si los residuos de la desviansa eran significativamente mayor a los grados de libertad de los residuos. Las pruebas estadísticas las hice con los programas SPSS 21.

La identificación de los factores de riesgo potenciales que están asociados con las infecciones en los hospederos (tlacuaches y perros) de *E. canis* y *A. phagocytophilum*, la hice por medio de la prueba de Chi^2 con una corrección de Yates para tablas de contingencia de 2 x 2. La significancia de cada asociación la determiné con una prueba exacta de Fisher. Utilicé la corrección de Yates y la prueba exacta de Fisher porque los datos no cumplían con la regla de Thumb, donde todas las frecuencias esperadas deben de ser mayor a 2 y no más del 20 % de las frecuencias esperadas debe de ser menor a 5 (Zar 1984). Determiné si había asociación del número de individuos infectados por cada patógeno en relación a los hospederos (tlacuaches contra perros), localidad, distancia al solar, abundancia de garrapatas, e historia de los sitios. Esta última asociación sólo la apliqué para los tlacuaches, porque los perros no tenían asignada la categoría de historia de sitio, ya que normalmente estos fueron muestreados en las casas de sus dueños, a pesar de ser de libre rango. También calculé el riesgo relativo (Rr), considerando como "expuestos" al grupo con mayor prevalencia y como "no expuestos" al resto de el/los grupo(s), con excepción de las tablas de las abundancia de garrapatas, en las cuales el grupo expuesto fue el de mayor abundancia. Además, realicé un mapa con la representación espacial de las abundancias relativas de *Didelphis* spp. y abundancia de *C. lupus familiaris* por localidad, así como las prevalencias de *A. phagocytophilum* y *E. canis* en sus hospederos.

Factores de riesgo de infección por PTG

Con base en la ecología de las rickettsias y en las posibilidades de recolectar información durante el trabajo de campo que pudiera relacionarla con las prevalencias de *A. phagocytophilum* y *E. canis*, identifiqué factores de riesgo para asociarlos con las prevalencias reportadas en el presente estudio.

- La abundancia de garrapatas en los hospederos: bajo el supuesto que entre mayor número de garrapatas por hospedero se incrementa la probabilidad de que alguna(s) de estas esté(n) infectada(s) y transmita(n) al patógeno (Keesing *et al*. 2010). Además, una mayor intensidad de infestación está relacionada con una mayor dosis del agente infeccioso (Stich *et al.* 2008). La abundancia de garrapatas la dividí en tres grupos: baja (0–5 garrapatas), media (6–20 garrapatas) y alta (mayor a 20 garrapatas).
- La distancia del lugar de captura de los tlacuaches con el solar más cercano, bajo el supuesto que a una menor distancia están más en contacto con los perros de libre rango, quienes son hospederos comunes de *A. phagocytophilum* y reservorios de *E. canis.* Por el contrario, a una distancia mayor, los tlacuaches estarían en contacto con un mayor número de especies silvestres, como el venado cola blanca, considerado como reservorio de *E. chaffeensis.* El riesgo de infección por este patógeno se incrementaría a mayor distancia del solar más cercano. Esta variable, inicialmente continua, la convertí en categórica haciendo dos grupos: los de una distancia de 0–600 m y el de una distancia mayor a 600 m.
- Los sitios con historias de uso antrópico distinto (solar, acahual y ecotono) es un factor de riesgo, debido a que en los solares y, en menor medida los ecotonos, la presencia de perros es mayor que en los acahuales, lo que facilita la transmisión de los patógenos asociados a ellos (*A. phagocytophilum* y *E. canis*).
- Localidades: se ha reportado que los poblados con un mayor número de humanos están relacionados con un mayor número de perros (Gompper 2014), lo que incrementaría el riesgo de infección por patógenos asociados a ellos.
- Los hospederos: debido a que frecuentemente se reporta a los perros como hospederos de *A. phagocytophilum* y reservorios de *E. canis*, consideré que tienen mayor riesgo de infección que los tlacuaches.

RESULTADOS

Infecciones

En total, capturé 104 tlacuaches, aunque solo hice el diagnóstico a 102 de ellos, porque una muestra de sangre no fue suficiente y otra se degradó. Tres tlacuaches fueron positivos a *A. phagocytophilum* y ninguno a *E. canis* o *E. chaffeensis.* Uno de los tlacuaches positivos a la primera especie fue *D. marsupialis* el cual lo capturé en un acahual de Bobolá, mientras que los otros dos fueron capturados en ecotonos de Bobolá y Chiná (Anexo 3). Si bien, colecté muestras de sangre y garrapatas a 89 perros, provenientes de las cuatro localidades, sólo pude hacer el diagnóstico por PCR a 44 de ellas, de las cuales 12 fueron positivas a *A. phagocytophilum* y tres a *E. canis,* con prevalencias de 27 % y 7 %, respectivamente (Tabla 2). Las infecciones por *A. phagocytophilum* en perros solo se concentraron en Chiná y Xcampeu, mientras que las de *E. canis* fueron en Bobolá y Chiná (Tabla 2). De todos los hospederos infectados, sólo un perro presentó co-infección con *A. phagocytophilum* y *E. canis* (Tabla 2, Anexo 4). Con base a la prevalencia de *A. phagocytophilum* en tlacuaches, el tamaño de muestra *a posteriori* estimó tener una muestra de por lo menos 98 tlacuaches. Debido a que *E. canis* y *E. chaffeensis* no estuvieron presentes en los tlacuaches del presente estudio, no pude calcular el tamaño de muestra *a posteriori* para poder saber si tuve un tamaño de muestra representativo.

Tabla 2. Prevalencia de *A. phagocytophilum, E. canis* y *E. chaffeensis* en marsupiales (*Didelphis* spp.) y perros en las cuatro localidades cercanas a la ciudad de Campeche.

Localidad	Especie (n)	Prevalencia (%) (hospederos infectados) IC		
		A. phagocytophilum	*E. canis*	*E. chaffeensis*
Las cuatro localidades	*D. marsupialis* (45)	2 (1); 0.4–11.5	0.0	0.0
	D. virginiana (57)	4 (2); 1–11.9	0.0	0.0
	Didelphis spp. (102)	3 (3); 1–8.3	0.0	0.0
	Canis lupus familiaris (44)	27 (12); 16.3–41.8	7 (3); 2.3–18.2	0.0
Bobolá	*D. marsupialis* (5)	20 (1); 3.6–62.4	0.0	0.0
	D. virginiana (12)	8 (1); 1.5–35.4	0.0	0.0
	Didelphis spp. (17)	12 (2); 3.3–34.3	0.0	0.0
	Canis lupus familiaris (12)	0.0	17 (2); 4.7–44.8	0.0
Chiná	*D. marsupialis* (2)	0.0	0.0	0.0
	D. virginiana (18)	6 (1); 1–25.8	0.0	0.0
	Didelphis spp. (20)	5 (1); 0.9–23.6	0.0	0.0
	Canis lupus familiaris (20)	50 (10); 30–70.1	5 (1); 0.9–23.6	0.0
Inifap	*D. marsupialis* (18)	0.0	0.0	0.0
	D. virginiana (7)	0.0	0.0	0.0
	Didelphis spp. (25)	0.0	0.0	0.0
	Canis lupus familiaris (4)	0.0	0.0	0.0
Xcampeu	*D. marsupialis* (20)	0.0	0.0	0.0
	D. virginiana (20)	0.0	0.0	0.0
	Didelphis spp. (40)	0.0	0.0	0.0
	Canis lupus familiaris (8)	25 (2); 7.1–59.1	0.0	0.0

Abundancia de hospederos

El esfuerzo total de muestreo fue de 1329 “noches/trampa”, lo cual permitió capturar un total de 104 tlacuaches, 47 *D. marsupialis* y 57 *D. virginiana*, con abundancias relativas de 0.035 y 0.043, respectivamente (Tabla 3). Las abundancias relativas de *D. virginiana* (X^2_3=5.8, p=0.897, Kruskal-Wallis) y *D. marsupialis* ($F_{0.05;\ 3,\ 6}$= 1.5, *p*= 0.3, ANOVA una vía) no presentaron una diferencia significativa en relación a la localidad.

Tabla 3. Abundancia relativa (capturas/trampas activas por noche) por especie de tlacuache en las localidades de muestreo.

Especie	Bobolá	Chiná	INIFAP	Xcampeu	Total
Didelphis marsupialis	0.033 (5/150)	0.020 (3/149)	0.039 (19/485)	0.036 (20/545)	0.035 (47/1329)
Didelphis virginiana	0.08 (12/150)	0.12 (18/149)	0.014 (7/485)	0.036 (20/545)	0.043 (57/1329)
Total	0.113 (17/150)	0.141 (21/149)	0.053 (26/485)	0.073 (40/545)	

Respecto a la distribución de las capturas de tlacuaches en función de la historia de los sitios, obtuve 31 en solares, 44 en ecotonos y 29 en acahuales. Las abundancias relativas de *D. virginiana* y *D. marsupialis* no variaron significativamente en función de las historias de los sitios (X^2= 5.8, *p*= 0.054, Kruskal-Wallis; $F_{0.05:\ 2,\ 7}$= 3.6, *p*= 0.082, ANOVA una vía, respectivamente) (Fig. 3). Considerando a las dos especies como una sola, se aprecia un decremento de sus abundancias relativas desde los solares hacia los acahuales, pero tampoco fue estadísticamente significativo ($F_{0.05;\ 2,\ 7}$= 0.39, *p*= 0.69, ANOVA una vía) (Fig. 3). La correlación de Pearson mostró que a mayor abundancia de *D. virginiana*, se reduce la abundancia de *D. marsupialis* (r= –0.65, df= 8, *p*= 0.041) (Fig. 4).

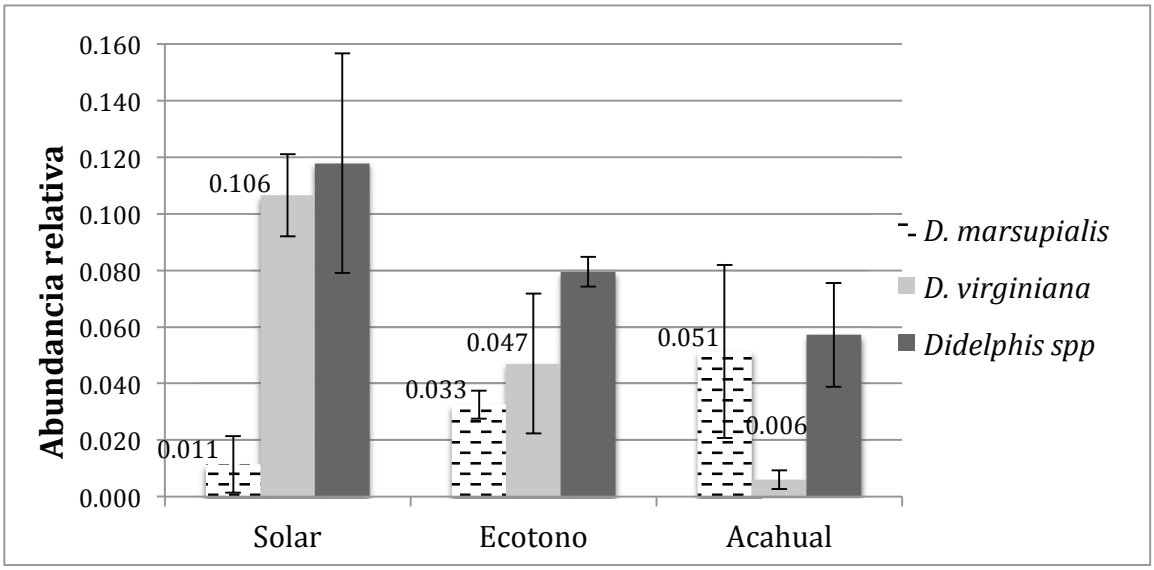


Figura 3. Abundancia relativa por especie de tlacuache, en función de la historia de los sitios. Barras= 1 error estándar.

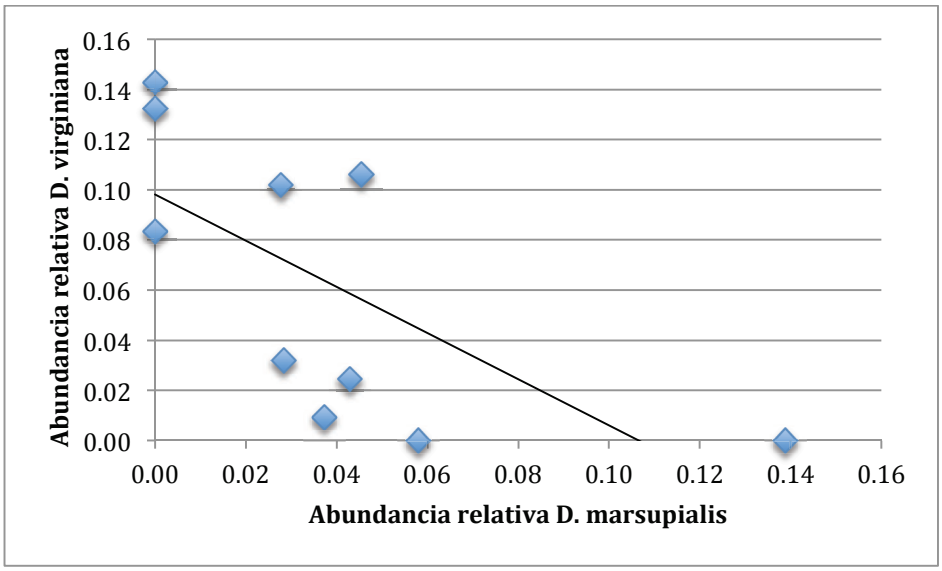


Figura 4. Correlación entre las abundancias relativas de *D. virginiana* y *D. marsupialis* en toda el área de estudio (r= -0.65, gl= 8, *p*= 0.041).

La estimación de la abundancia de tlacuaches, con el método del área real de muestreo, fue de 2738 individuos (Anexo 5). Si considero la abundancia promedio de garrapatas en los tlacuaches que muestreé, 25.5±4.54, éstos alimentarían a 69819 garrapatas (Anexo 5). La estimación de la abundancia de tlacuaches en el área de estudio basándome en la densidad de 0.09 tlacuaches/ha fue de 3737 los cuales alimentarían a 95302 garrapatas de la familia Ixodidae (Anexo 6). Si considero que *Didelphis* spp. infecta con *A. phagocytophilum* al 13 % de las garrapatas que se alimentan de ellos (Keesing *et al.* 2012), que todas las especies de garrapatas fuesen vectores y que una prevalencia del 100 %, el número de garrapatas infectadas sería de 9076 y 12389. Sin embargo, la prevalencia de *A. phagocytophilum* en tlacuaches fue del 3 %, por lo que solo 272 y 371 garrapatas estarían infectadas con este patógeno (Anexo 5 y 6) .

En general, la estimación de perros por localidad va de mayor a menor en función del número de habitantes por localidad. Chiná, por ser la localidad con mayor número de habitantes (31 veces más que la segunda localidad más grande) fue también la de mayor número de perros (Tabla 4).

Tabla 4. Abundancia estimada de perros por localidad y número de perros muestreados. EE= 1 error estándar.

Localidad	Abundancia (± EE)	N
INIFAP	6.4 (± 0.6)	5
Xcampeu	22.3 (± 2.3)	17
Bobolá	53 (± 5.4)	23
Chiná	1641 (± 166.3)	44
Área de estudio*	2533 (± 257)	89

* La estimación de perros del área de estudio la hice del mismo polígono delimitado por carreteras que usé para estimar la abundancia de tlacuaches (Anexo 2).

Abundancia de garrapatas en hospederos

La abundancia de garrapatas no fue estadísticamente diferente entre las dos especies de tlacuaches (U= 1116.5, Z= –1.46, *p*= 0.14, U-Mann-Whitney), ni entre los organismos capturados a 0–600 m o 601–1,800 m al solar más cercano (U= 950.5, Z= –0.66, *p*= 0.5, U-Mann-Whitney). De igual forma, los sitios (acahual, ecotono y solar) no fueron factores que influyeran en la abundancia de garrapatas (X^2_2= 1.54, *p*= 0.46, prueba de Kruskal-Wallis). La abundancia de garrapatas si se vio influenciada por el sexo (U= 821, Z= –3.36, *p*= 0.001, Mann-Whitney) y la localidad donde se capturaron a los tlacuaches (X^2_3= 25.6, *p*< 0.001, Kruskal-Wallis) (Fig. 5, Tabla 5). Los tlacuaches capturados en Bobolá tuvieron menor abundancia que en las otras localidades (Fig. 6, Tabla 5). La abundancia de garrapatas en tlacuaches fue significativamente menor a la de los perros (25.5 vs 40) (U= 3414, Z= 3.15, *p*= 0.002, U-Mann-Whitney).

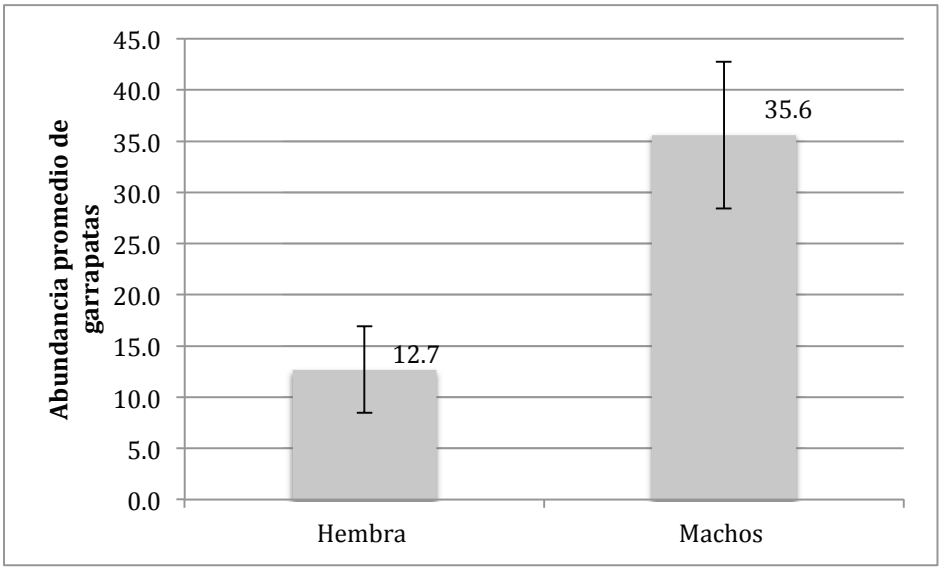


Figura 5. Abundancias de garrapatas en tlacuaches (*Didelphis* spp.) en función de su sexo en el área de estudio. Barras= 1 error estándar.

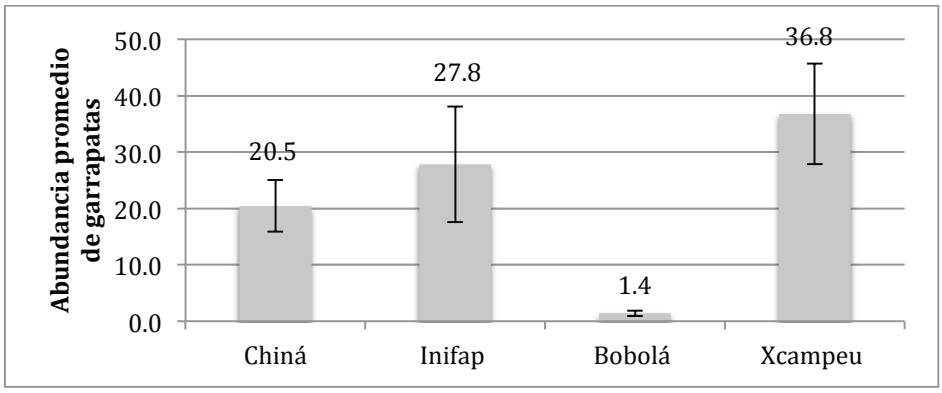


Figura 6. Abundancia promedio de garrapatas en ambas especies de tlacuaches por localidad. Barras= 1 error estándar.

Tabla 5. Estadísticos usados para detectar factores asociados con la abundancia de garrapatas en *Didelphis* spp. de Campeche, México. *diferencias estadísticamente significativas

Variables	Estadístico
Localidad*	X^2_3= 25.6, *p*< 0.001. Kruskal–Wallis
Historia de los sitios	X^2_2 = 1.54, *p*= 0.46. Kruskal–Wallis
Distancia al solar más cercano	U= 950.5, Z= –0.66, *p*= 0.5. Mann–Whitney
Sexo*	U= 821, Z= –3.36, *p*= 0.001. Mann–Whitney

El modelo mínimo sugiere que las variables de sexo y localidad explicaron significativamente la abundancia de garrapatas en tlacuaches. Los machos presentaron una mayor abundancia de garrapatas respecto a las hembras y los tlacuaches de la localidad de Bobolá tuvieron una menor abundancia de garrapatas respecto al resto de las localidades (Tabla 6). El modelo mínimo adecuado fue significativo (Chi^2= 40.1, gl= 4, *p*<0.0001, prueba Omnibus). El parámetro de dispersión del modelo (1.69), al ser mayor a cero, pero no muy distante indica que la varianza es mayor a la media y sugiere una ligera sobredispersión de los datos. De igual forma, el hecho que la desviansa residual del modelo (119.98) fue un poco mayor a los grados de libertad (99) indica una ligera sobredispersión de los datos. Sin embargo, al no ser las diferencias

tan grandes, el modelo binomial negativo es apropiado para explicar la abundancia de garrapatas en tlacuaches. No incluí las abundancias de garrapatas en los perros, porque hacían que la sobredispersión se incrementara, a tal punto que ya no era confiable considerarlos en el modelo.

Tabla 6. Modelo mínimo adecuado de GLM para explicar la abundancia de garrapatas en tlacuaches.

Predictor (Factor)	**Coeficiente de regresión**	**Valor Z**	**Significancia**
Intersección	0.157	0.4	0.68
Macho	0.78	2.8	0.005
Hembra	0	.	.
Xcampeu	2.92	6.53	0.000
INIFAP	2.57	5.49	0.000
Chiná	2.3	4.8	0.000
Bobolá	0	.	.
Parámetro de dispersión	**1.69**		

Los perros que recibieron tratamiento profiláctico anti-garrapaticida y/o anti-parasitario no presentaron infestaciones por garrapatas y tuvieron una abundancia promedio de garrapatas de 1 y fueron estadísticamente diferentes a las abundancias promedio (50) de los perros que no recibían tratamiento (U= 261.5, Z= –4, *p*= 0.000, U-Mann-Whitney). La abundancia de garrapatas en perros fue similar en las distintas localidades (X^2_3= 3.5, *p*= 0.32, Kruskal-Wallis) (Tabla 7).

Tabla 7. Abundancia de garrapatas en perros por localidad.

Localidad	Abundancia promedio de garrapatas	Error estándar
INIFAP	1	0.4
Xcampeu	4	1
Bobolá	16	7
Chiná	70	28.7

Prevalencias y factores de riesgo

Debido a las bajas prevalencias de *A. phagocytophilum* en los marsupiales, decidí hacer las pruebas de asociación y riesgo relativo usando el número de perros (44) y tlacuaches (102) diagnosticados. También, por la ausencia de individuos positivos a *E. chaffeensis*, no hice el ejercicio de asociación de los factores de riesgo por medio de tablas de contingencia con este patógeno.

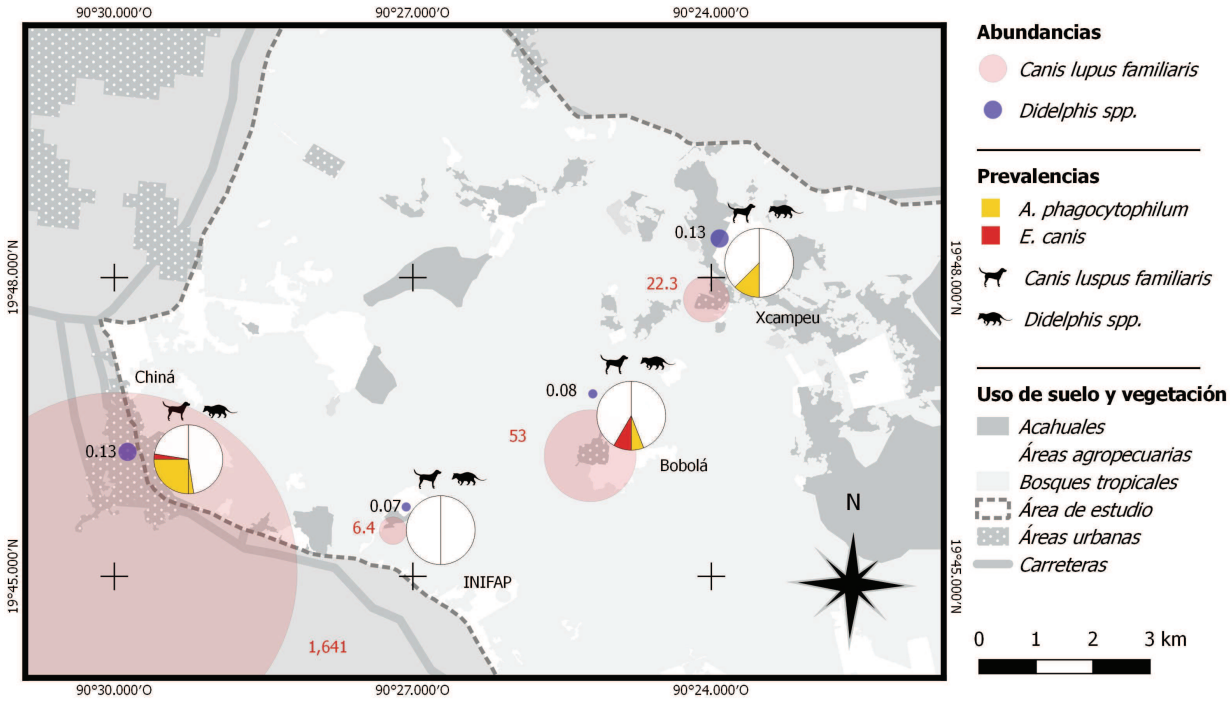


Figura 7. Representación espacial de las abundancias relativas de *Didelphis* spp. y abundancia de *C. lupus familiaris* por localidad, así como las prevalencias de *A. phagocytophilum* y *E. canis* en sus hospederos.

Tabla 8. Posibles factores de riesgo asociados con la infección y riesgo relativo (Rr) de *A. phagocytophilum* y *E. canis* en tlacuaches y perros de Campeche, México.

Factores de riesgo (n)[a]	*Anaplasma phagocytophilum*			*Ehrlichia canis*		
	(+).	P (%)	Rr	(+).	P (%)	Rr
Abundancia de garrapatas						
Baja (64)	5	8d		1	2d	
Media (47)	7	16d	0.8	1	2d	1.58
Alta (35)	3	9d		1	3d	
Infestado						
Si (125)	15	12d	N/A	2	2d	0.3
No (21)	0	0d		1	5d	
Distancia al solar más cercano (m)						
0–600 (120)	15	13d	N/A	3	3d	N/A
>600 (26)	0	0d		0	0d	
Historia sitio						
Acahual (28)	1	4d				
Ecotono (43)	2	5d	0.8			
Solar (31)	0	0d				
Localidad						
Chiná (40)	**11**	**27d**		1	3d	
Bobolá (29)	**2**	**7e**	**6.6***	2	7d	8
INIFAP (29)	**0**	**0e**		0	0d	
Xcampeu (48)	**2**	**4e**		0	0d	
Hospedero						
Tlacuaches (102)	**3**	**3d**	**9.3***	**0**	**0d**	N/A
Perros (44)	**12**	27e		3	**7e**	

Para cada factor de riesgo hice una tabla de contingencia. [a] Número total de hospederos analizados. (+) = número de hospederos (tlacuaches y perros) positivos. P= prevalencia. * Riesgo relativo significativo. N/A = no aplica. Los números con letra diferente fueron significativamente diferentes (p=<0.05). Usé las mismas letras para indicar la significancia de cada grupo dentro del factor de riesgo para ambos patógenos.

Ningún patógeno estuvo asociado a algún grado de abundancia de garrapatas ni si los hospederos estaban o no infestados. Si bien, los 15 individuos (perros y tlacuaches) positivos a *A. phagocytophilum* y tres perros a *E. canis*, se presentaron a una distancia del solar más cercano menor a 600 m, la tabla de contingencia no mostró asociación

entre ellas. Tampoco, ninguno de los tres tlacuaches positivos a *A. phagocytophilum* estuvieron asociados a los sitios. Debido a que 10 de los 15 individuos positivos a *A. phagocytophilum* se presentaron en Chiná, el factor de localidad fue significativo (Fig. 7). Además el Rr= 6.6 indica que el grupo "expuesto" de Chiná tiene mayor incidencia de hospederos infectados que el grupo no "expuesto" compuesto por Bobolá, INIFAP y Xcampeu.. Las tres infecciones con *E. canis* se repartieron en dos localidades por lo que la tabla de contingencia no mostró una asociación con el factor de localidad. La tabla de contingencia mostró que los perros presentaron mayores prevalencias de *A. phagocytophilum* y *E. canis* que los tlacuaches, por lo que también los perros (grupo "expuesto") tuvieron una mayor prevalencia de infección para estos dos patógenos que los tlacuaches (grupo "no expuesto") (Tabla 8).

DISCUSIÓN

Infecciones

A pesar de que los tlacuaches y perros son relativamente abundantes en el área de estudio y existe una elevada abundancia de garrapatas, solo *Anaplasma phagocytophilum* estuvo presente en ambos hospederos, *Ehrlichia canis* solo se presentó en perros y *E. chaffeensis* no fue encontrada.

Anaplasma phagocytophilum

La prevalencia de *A. phagocytophilum* en tlacuaches en el presente estudio (3 %) es menor a la del único reporte de este patógeno en *D. virginiana* (36 %) en Nueva York (ver Kessing *et al.* 2012). Esta diferencia puede deberse a que su estudio se hizo en un área donde la bacteria es endémica y considerada como de alto riesgo por el incremento en la población de venado cola blanca (hospedero reservorio) y del principal vector (*Ixodes scapularis*). En este sentido, probablemente las poblaciones de venados son más pequeñas en el área del presente estudio, debido a que es una zona con nula regulación de cacería, lo que reduce el riesgo de transmisión. El ratón de patas blancas (*Peromiscus leucopus*), junto con el venado cola blanca, son los únicos hospederos reservorios reportados en América (Woldehiwet 2010), por lo que junto con otras especies de roedores podrían mantener al patógeno en la comunidad de hospederos

competentes. Sin embargo, los bajos niveles de bacteriemia que desarrollan los roedores, comparados con los rumiantes, y su ciclo de vida corto pone en duda su papel como reservorios (Woldehiwet 2010). Este es el primer reporte del país para *A. phagocytophilum* en *D. virginiana* y *D. marsupialis.* Además, es el segundo reporte en fauna silvestre, ya que antes se encontró en roedores de áreas naturales protegidas principalmente del centro del país (ver Sosa-Gutiérrez *et al.* 2014), lo que sugiere que no está restringido a áreas con una abundante población de venado cola blanca y del vector. Para saber si la prevalencia que encontramos en tlacuaches se debe a que la infección que desarrollan (al igual que los roedores) no es tan alta como en los rumiantes, habría que hacer estudios experimentales que determinen la bacteriemia en estos hospederos.

La prevalencia de *E. canis* en los perros del presente estudio (27 %) es similar a la encontrada en perros de Colombia (33 %) (McCown *et al.* 2015); sin embargo, dicho estudio se hizo con perros de ciudad y serología, método que tiende a sobreestimar el número de individuos infectados, porque detecta infecciones pasadas. En general las prevalencias de *A. phagocytophilum* en perros del presente estudio están por encima de reportes previos. En México, se reportó una baja seroprevalencia promedio de *Anaplasma* spp. en perros (9.9 %), y un promedio ligeramente mayor en perros (14 %) solo en los estados del sureste mexicano (Tabasco, Campeche, Quintana Roo y Yucatán) (Movilla *et al.* 2016). La mayor prevalencia del presente estudio se debe a que ellos trabajaron con perros con dueño de libre rango y confinados en sus casas, los cuales tienden a presentar menores prevalencias de patógenos (Gompper 2014). La prevalencia por PCR de *A. phagocytophilum* en perros alrededor del mundo, varía de 0.5 a 6.3 % (Cetinkaya *et al.* 2015). A pesar que es común que los perros sean hospederos de éste patógeno (Woldehiwet 2010), no muy comúnmente se encuentran prevalencias tan altas. Una posible explicación a este resultado, es que en el área de estudio se encuentran los elementos (vectores, clima, alta densidad de perros) para que el patógeno se mantenga y circule en la población de perros. Además, la mayoría de los reportes se han hecho en regiones templadas donde el clima es una limitante para el principal vector (*Ripicephalus* sanguineus) de este patógeno en áreas urbanas.

Debido a que los tlacuaches comparten el territorio con los perros, esperaba que la prevalencia de este patógeno en tlacuaches capturados en solares y ecotonos fuera similar a la de los perros. Sin embargo, los didélphidos, que pudieran infectarse con las garrapatas infectadas por los perros, no siempre logran adquirirlas, pues les es difícil ingresar y/o escapar de los lugares que frecuentan los perros, pues son presa fácil de estos y de humanos. Además, los patrones de movimiento de los tlacuaches (lugares elevados y bordes) hacen que no siempre estén en contacto con las mismas garrapatas que los perros alimentaron. También, habría que evaluar cuáles especies de garrapatas son vectores de este patógeno en el área de estudio y si estos vectores se alimentan por igual de tlacuaches y perros.

Ehrlichia canis

Si bien, alrededor del mundo se han reportado a varias especies de roedores, felinos, cánidos domésticos y silvestres como hospederos de *E. canis* (Koenen *et al.* 2013; Sainz *et al.* 2015), los didélfidos no forman parte de este grupo. La ausencia de tlacuaches positivos a *E. canis* puede deberse a que su sistema inmunitario es lo suficientemente fuerte para evitar que este patógeno se hospede en las células blanco por lo que serían hospederos incopetentes. El trabajo de Guerrero-Sánchez y Weber-Rodríguez (2012) apoya esta hipótesis, debido a que no encontraron tlacuaches positivos a *E. canis* en un área donde las prevalencias en zorras y perros fue alta. Sin embargo, esta hipótesis debe de ser comprobada en futuros estudios, donde se inocule experimentalmente al patógeno en las dos especies de tlacuaches y determinen la reacción inmunitaria del hospedero y la bacteriemia.

La prevalencia de *E. canis* en perros del presente estudio (7 %) es baja en relación a otros estudios (Rodríguez-Vivas *et al.* 2005; Pat-Nah *et al.* 2015; Cetinkaya *et al.* 2015); esto a pesar de que a nivel mundial se han reportado a los perros como hospederos reservorios de *E. canis,* especialmente en regiones mediterráneas y tropicales (McQuiston *et al.* 2003). En estas regiones, el principal vector (*R. sanguineus*) se ve favorecido por las condiciones climáticas, ya que las temperaturas por debajo de los 10ºC afectan la sobrevivencia de los huevos y garrapatas a la espera de hospederos (McQuiston *et al.* 2003; Stich *et al.* 2008; Beall *et al.* 2012). En el área de estudio, se

han reportado seroprevalencias de *E. canis* del 44 % en perros callejeros de Mérida, Yucatán (Rodríguez-Vivas *et al.* 2005), y 35.4 % en Tabasco, Campeche, Quintana Roo y Yucatán (Movilla *et al.* 2016). Estos antecedentes contrastan con lo encontrado en el presente estudio y dichas diferencias pueden deberse a que los estudios epidemiológicos que usan pruebas serológicas, como método de diagnóstico, presentan mayores prevalencias que las reportadas por métodos moleculares, debido a que también detectan infecciones pasadas (Cetinkaya *et al.* 2015). Sin embargo, recientemente, se reportó una prevalencia por PCR de 36 % en perros que se encontraban en centros de control animal de Mérida y Umán, Yucatán (Pat-Nah *et al.* 2015). Los perros de ciudad y, sobre todo los que pertenecen a centros de control animal, tienen mayor riesgo de infección a los patógenos (Gompper 2014), como *E. canis* (Beall *et al*. 2012), debido a que su abundancia y densidad son mayores que en las áreas rurales, lo que facilita la transmisión de patógenos (Johnson *et al.* 2015). Aparentemente, la prevalencia de *E. canis* en perros domésticos de la ciudad de Campeche (a tan solo 10–20 km del área de estudio) también tiende a ser alta en los animales que son llevados a clínicas veterinarias locales (K. Lezama com. pers.). A diferencia de las ciudades, en las zonas rurales, la densidad de perros es menor, factor que disminuye la transmisión, si consideramos que esta es denso-dependiente (Paddock y Childs 2003; Gompper 2014). Aunado a esto, la baja prevalencia de *E. canis* en perros del presente estudio es comparable con la reportada por Almazán y colaboradores (2016) en Coahuila, donde el 4 % de los perros estuvieron infectados y el 8.7 % de seroprevalencia en perros de Yucatán (ver Jiménez-Coello *et al.* 2009). La diferencia en las prevalencias reportadas en México (4–8 vs 36 %) y las encontradas en las localidades del presente estudio (16.7 vs 5 vs 0 %), sugiere que las altas prevalencias de *E. canis* no están generalizadas y apunta hacia la agregación de garrapatas y patógenos transmitidos por estas (Estrada-Peña y de la Fuente 2014). Paddock y Childs (2003) también han reportado la agregación espacial en patógenos transmitidos por garrapatas incluyendo *Ehrlichia* spp, la cual es referida como una variación geográfica natural en las infecciones de hospederos resultado de un agrupamiento espacial de las garrapatas infectadas y de factores que intervienen en la estructura y composición de las comunidades de hospederos y vectores. Estas

contrastantes prevalencias en el área de estudio se repiten en otras regiones, por ejemplo, un estudio reciente en Turquía reportó una prevalencia en perros menor a 6 % en comparación con reportes previos en áreas cercanas (41 %). Incluso, las prevalencias en perros alrededor del mundo varían de 0.5 a 41 % (Cetinkaya *et al.* 2015).

Ehrlichia chaffeensis

En el presente estudio, no encontré ningún individuo positivo a *E. chaffeensis.* Con excepción de Sosa-Gutiérrez y colaboradores (2014), quienes lo encontraron en roedores silvestres en 11 estados de México, no hay otros reportes de este patógeno en animales silvestres. Sosa-Gutiérrez y colaboradores (2016b) describieron el primer caso mortal de EMH en un paciente del centro del país, lo que sugiere que está establecida en dicha región y junto con el reporte en roedores silvestres, también sugiere la posible emergencia de esta enfermedad en México. En otro estudio, se reportó su presencia en garrapatas de áreas naturales de 31 estados de México, aunque no se menciona de dónde provienen los especímenes infectados (Sosa-Gutiérrez *et al.* 2016a). A partir del reporte de individuos de *D. virginiana* infectados con *E. chaffeensis* en EE. UU., se ha considerado a esta especie con potencial para ser hospedero reservorio (Lockhart *et al.* 1997; Castellaw *et al.* 2011). Sin embargo, estos reportes se restringen a diagnósticos serológicos, los cuales indican una exposición al patógeno, pero no necesariamente una infección y, además, pudiera tratarse de una reacción cruzada con otras bacterias del género *Ehrlichia Anaplasma.* No hay estudios que muestren por métodos moleculares la presencia de *E. chaffeensis* en los didélfidos.

La ausencia de *E. chaffeensis* en perros del presente estudio puede deberse a que los principales hospederos reservorios y vectores de este patógeno están poco representados en la comunidad de hospederos vertebrados competentes y vectores. En EE.UU., las áreas catalogadas como de alto riesgo de infección por *E. chaffeensis* son aquellas que presentan altas densidades del vector (*Amblyomma americanum*) y del venado cola blanca, el cual es el principal hospedero de la garrapata y hospedero reservorio. En áreas rurales de la península de Yucatán, que presentan cacería constante y poco regulada, la densidad de venados es menor respecto a las áreas

donde no hay cacería (Weber 2014a). En el área de estudio, la cacería es una práctica común (observ. pers.), por lo que los perros que frecuentan los acahuales y ecotonos tendrían poco contacto directo e indirecto con estos ungulados. Además, a pesar que se han reportado prevalencias similares en perros y venados en áreas de EE. UU., consideradas de alto riesgo de infección por *E. chaffeensis* (19 vs 17 %) (Yabsley 2010), en general las seroprevalencias promedio en áreas rurales de EE.UU. es baja (2.8 %) (Beal *et al.* 2012), en comparación con la de venados cola blanca (47 %) (Yabsley 2010). En este sentido es necesario hacer un estudio exploratorio de este patógeno en el resto de la comunidad de vertebrados, principalmente el venado cola blanca, su principal hospedero reservorio.

Solo un perro de 44 presentó co-infección con *A. phagocytophilum* y *E. canis*, la cual es una situación muy común (Movilla *et al*. 2016). Dado que uno de los efectos de una infección con éstos patógenos es hacer susceptible al hospedero de infecciones secundarias y porque ambos patógenos son comunes en los perros del área de estudio, era de esperarse esta co-infección. En general, la frecuencia de co-infecciones con éstos patógenos en perros es baja (0.6 %) (Cetinkaya *et al.* 2015), al igual que en el presente estudio.

Abundancia de hospederos

En el presente estudio, las abundancias relativas de *D. virginiana* y *D. marsupialis* se comportaron de forma inversa entre los sitios, pero no fueron estadísticamente significativas. La similitud estadística entre las abundancias relativas en función de la historia del sitio puede deberse a que ninguna de las dos especies tiene una marcada preferencia hacia hábitats con algún grado de perturbación. Se ha reportado que ambas especies se encuentran en una gran variedad de hábitats y se adaptan muy bien a ambientes perturbados, aunque también se encuentran en ambientes conservados (Sunquist *et al.* 1987; Adler *et al.* 1997; Colchero *et al.* 2014; Zarza y Medellín 2014). No obstante, la prueba de correlación sugirió que a una mayor abundancia relativa de una especie, menor es la de la otra. Aun cuando no hay diferencias estadísticas entre las abundancias relativas de cada especie de tlacuache, en relación al tipo de sitio, es evidente que en cada sitio se comportan de manera diferente. Cuando la abundancia

relativa de una especie es alta, la otra es baja, excepto en los ecotonos debido a que muestree en ecotonos que estaban en un área con mayor proporción de selva pero también en ecotono más cercanos a los asentamientos rurales y donde en los primeros, en general capturé más *D. marsupialis* que D. virginiana y viceversa. En un estudio en la depresión central de Chiapas, la presencia de *D. marsupialis*, se restringió a sitios poco perturbados, donde *D. virginiana* es más abundante (Cruz-Salazar 2013). Mientras que en el límite sur del rango de distribución de *D. virginiana*, solo *D. marsupialis* estuvo presente en áreas rurales (Vaughan Foster 1999), lo que sugiere una posible interacción de competencia por recursos entre estas dos especies. Esta interacción puede explicar la baja abundancia relativa del tlacuache común en solares. Por otra parte, el tlacuache de Virginia presentó una baja abundancia relativa en los sitios que catalogué como acahual. Este resultado está apoyado por Kanda y colaboradores (2009) quienes reportan que el tlacuache de Virginia en EE. UU. prefiere son sitios rurales medianamente urbanizados, debido a la disponibilidad de alimento y refugio durante todo el año. En este sentido, la baja abundancia de esta especie en los acahuales puede deberse a que le es más fácil conseguir alimento en los solares (gallinas y frutos en particular), que en las selvas del área de estudio. Las capturas de *D. virginiana* se concentraron principalmente en solares y ecotonos, mientras *D. marsupialis* se concentró en acahuales y ecotonos. Con los resultados del presente estudio no puedo afirmar si el patrón observado en la prueba de correlación se deba a la preferencia de hábitat o a una interacción de competencia entre las dos especies de tlacuaches.

La estimación de abundancia de los perros fue mayor en Chiná y menor en INIFAP. Dado que los perros dependen de los recursos provistos por los humanos, una variación en la densidad de humanos, prácticas de manejo de residuos y recursos disponibles, resulta en una variación de la abundancia (Gompper 2014). La diferencia entre las abundancias de perros entre las localidades va de la mano con la gran variabilidad en los parámetros que determinan la abundancia de perros de una localidad a otra de una misma región. Solo en Yucatán, la proporción humano:perro varía de

4.6:1 a 1.7:1 en dos poblados de municipios cercanos (Vázquez-Ávila 2004; Ortega-Pacheco *et al.* 2007).

Abundancia de garrapatas en hospederos

La distancia al solar más cercano y el tipo de sitio (acahual, ecotono y solar), no influyeron sobre la abundancia de garrapatas en los tlacuaches, pero sí la localidad donde se muestreó. Los tlacuaches de Xcampeu presentaron una mayor abundancia de garrapatas, mientras que en Bobolá fue estadísticamente menor que en el resto de las localidades. Una posible explicación a la diferencia de las abundancias de garrapata en relación la localidad, es por la historia ambiental de estos. En los acahuales de Xcampeu hubo prácticas ganaderas un par de años previos al muestreo y/o durante el mismo (adyacentes al parche de vegetación muestreado). En los sitios donde hubo o hay ganadería, las garrapatas asociadas al ganado se comparten con otros hospederos (domésticos y silvestres) y los niveles de infestación pueden ser mayores en estos sitios que en áreas donde esta práctica no existe (Rodríguez-Vivas *et al.* 2013). En los acahuales de Bobolá, se practica la cacería, recolección de leña para carbón y apicultura, pero su principal actividad económica es la agricultura, la cual está negativamente asociada con la abundancia de garrapatas por excluir a los hospederos y la pérdida de hábitat para las garrapatas (Pfäffle *et al.* 2013). En este sentido, la abundancia de garrapatas en los tlacuaches capturados de Bobolá pudo verse afectada negativamente por la cercanía de los sitios de colecta con los campos agrícolas de este poblado (el ámbito hogareño de la mayoría de los tlacuaches capturados en este poblado abarcaba campos agrícolas). Por el contrario, la cercanía de los sitios de colecta en Xcampeu con áreas ganaderas o sitios donde hubo esta práctica una temporada previa al muestreo, pudo ser un factor que favoreciera la abundancia de garrapatas en los tlacuaches de este poblado.

Es importante mencionar que la historia ambiental de las localidades no es suficiente para explicar las diferencias, ya que existe una compleja relación hospedero-garrapata que depende de factores locales (microclima, estructura y composición de la vegetación, y comunidad de hospederos) (Kiffner *et al.* 2011; Pfäffle *et al.* 2013; Del Fabbro *et al.* 2015) y a nivel de paisaje (proporción de áreas agrícolas, ganaderas,

tamaño del parche de vegetación y conectividad con otros parches) (Estrada-Peña y de la Fuente 2014; Perez *et al.* 2016). El número y tamaño de los fragmentos de vegetación pudieran determinar la composición de la comunidad de vertebrados (Gortazar *et al.* 2014), así como los factores propios a cada sitio.

El sexo determinó la abundancia de garrapatas en tlacuaches, los machos presentaron valores mayores (35.6 ± 14.3) que las hembras (12.7 ± 8.5). Este fenómeno se ha reportado en venados y roedores (Brunner y Ostfeld 2008; Ruiz-Fons *et al.* 2013), y es la primera vez que se reporta en *Didelphis* spp. La mayor carga parasitaria en machos puede relacionarse con una mayor superficie corporal, lo que los hace más susceptibles a contraer y alimentar a un mayor número de garrapatas (Ruiz-Fonz *et al.* 2013). Sin embargo, no hubo diferencias entre el peso y relación peso/longitud entre machos y hembras, por lo que el patrón encontrado no se explica con la anatomía de los tlacuaches. Otra posible razón es la desventaja inmunitaria de los machos, la cual señala que uno de los efectos secundarios de la testosterona es suprimir el sistema inmunológico del hospedero, por lo que son más susceptibles a infestarse con garrapatas (Brunner y Ostfeld 2008; Ruiz-Fons *et al.* 2013). Además, las especies polígamas gastan más energía en reproducirse, que en su sistema inmunológico, especialmente los machos (Rolff 2002). La diferencia entre el comportamiento de machos y hembras de los didélphidos también pudiera explicar las diferencias, porque aunque el ámbito hogareño sea similar (Sunsquist *et al.* 1987; Vaughan y Hawkins 1999; Wright *et al.* 2012; Walter *et al.* 2013), se ha reportado que los machos recorren mayores distancias, incluso cubren el territorio de varias hembras (Sunsquist *et al.* 1987; Zarza y Medellín 2014), lo que los hace más vulnerables a contraer garrapatas. En un contexto epidemiológico, los machos de *Didelphis* spp. pudieran estar más involucrados en la dinámica de transmisión de enfermedades por garrapatas por una tendencia a recorrer mayores distancias que las hembras, tener un mayor ámbito hogareño y contener un mayor número de garrapatas.

Los perros presentaron una mayor abundancia de garrapatas que los tlacuaches, lo cual tiene sentido porque a mayor superficie corporal es mayor el número de garrapatas y se incrementa la probabilidad de adquirirlas (Ruiz-Fons *et al.* 2013). Además, la alta densidad que los perros alcanzan en los asentamientos humanos, junto con el poco o nulo cuidado sanitario que reciben, favorece a la población de garrapatas (*Ripicephalus sanguineus*) y presentan mayores infestaciones que las especies silvestres (Gompper 2014). La abundancia de garrapatas en perros no fue estadísticamente diferente entre las localidades. No obstante, las infestaciones iguales o mayores a 50 garrapatas fueron comunes en Chiná. Este patrón puede deberse a que esta localidad fue la de mayor población de perros, lo que favorece a la población de garrapatas. Además, el poco cuidado sanitario que reciben, los hacen más vulnerables a contraer garrapatas.

Prevalencias y factores de riesgo

Por el bajo número de tlacuaches y perros positivos, decidí considerar a las tres especies de hospederos en un mismo grupo para hacer las respectivas asociaciones. Aun así, las infecciones por *A. phagocytophilum* y *E. canis* no estuvieron asociadas a algún grado de infestación por garrapatas, ni si los hospederos estaban o no infestados. Una posible explicación a la falta de asociación es que no se necesita un número grande de garrapatas infectadas para que el hospedero también lo esté. En el noreste de EE. UU., reportaron que de 25 *D. virginiana* capturados, nueve (36 %) estaban infectados con *A. phagocytophilum* y el promedio de garrapatas por hospedero fue de 20, pero solo 13 % de las garrapatas también presentaban al patógeno (Keesing *et al.* 2012). Pese a que a un mayor grado de infestación por garrapatas se incrementa el riesgo de que le transmita al patógeno (Ruiz-Fons *et al.* 2013), Keesing y colaboradores (2012) dejan en claro que no se necesitan muchas garrapatas infectadas por hospedero para adquirir la infección.

Las infecciones en México por *A. phagocytophilum* y *E. canis* en México han estado asociadas a la presencia de garrapatas en el hospedero y al libre acceso de los perros al exterior de sus casas (Movilla *et al.* 2016), lo cual no fue nuestro caso. Una posible explicación es que ellos muestrearon a perros con dueño de ciudades, quienes brindan un mejor cuidado sanitario a sus perros (e. g., baños frecuentes, remoción de

ectoparásitos), a diferencia de los perros rurales con dueño que no viven al interior de la casa y tienen libre acceso a las calles, áreas forestales, ganaderas y/o agrícolas, donde es más frecuente el contacto con ectoparásitos.

Si bien, los hospederos infectados con *A. phagocytophilum* y *E. canis* se restringieron a 0–600 m del solar más cercano, no fue significativa la asociación. Posiblemente, el resultado estuvo influenciado por el bajo número de individuos muestreados a una distancia mayor de 600 m. Con tan pocos tlacuaches positivos a *A. phagocytophilum*, tampoco hubo un patrón en relación a los acahuales, ecotonos y solares. No obstante, la distribución de los pocos tlacuaches positivos, respecto al sitio, sugiere que las localidades con mayor población de perros tienen mayor probabilidad de infección por patógenos que usan a los perros como reservorios (*E. canis*) o patógenos comunes en estos (*A. phagocytophilum*) (Gompper 2014; Atif 2015). El efecto de agregación de las prevalencias en perros en función de las localidades también se ha reportado en perros de EE. UU. donde el rango de seroprevalencias de *A. phagocytophilum* en perros de ciudad y áreas rurales fue 4.8 a 21.8 %, e incluso otras donde no encontraron al patógeno (Bowman *et al.* 2009).

La localidad de Chiná tuvo la mayor población humana, perros con dueño (1751.4) y garrapatas en estos hospederos (70.2), lo que generó que las infecciones por *A. phagocytophilum* se concentraran allí, debido a que los perros son considerados hospederos comunes de este patógeno (Atif 2015). Esto sugiere que la infección de *A. phagocytophilum* en perros es denso-dependiente, pero posiblemente no lo sea en tlacuaches, ya que también fueron abundantes y presentaron una abundancia de garrapatas altas, pero una prevalencia baja.

A pesar de que en Chiná se presentaron factores que facilitan la transmisión de *E. canis* (alta densidad de perros, poco cuidado sanitario), sólo hubo un perro infectado por este patógeno. El resto de los perros con *E. canis* fueron de Bobolá, segunda localidad con mayor estimación de abundancia de perros (56.5). Brunner y Ostfeld (2008) reportaron que es frecuente la agregación de patógenos transmitidos por garrapatas en la

población de hospederos, y que no necesariamente, el patógeno va a estar presente en una comunidad donde se encuentren los elementos que faciliten su transmisión (vectores y hospederos). Los perros presentaron mayores infecciones por *A. phagocytophilum* y *E. canis* que los tlacuaches. Este resultado era de esperarse por ser los perros hospederos comunes y reservorios de estos dos patógenos (Beall *et al.* 2012; Atif 2015).

Didélfidos y perros en la dinámica de transmisión de Anaplasmataceae

La presencia de *A. phagocytophilum* en tlacuaches y perros, y *E. canis* en perros, sugiere la posibilidad que estos patógenos, en parte, estén presentes en los hospederos competentes del área de estudio. Si bien, sólo se ha comprobado la capacidad de *D. virginiana* para mantener y transmitir a *A. phagocytophilum* (Keesing *et al.* 2012), por la similitud filogenética de las dos especies de tlacuaches (Colcher *et al.* 2014; Zarza *et al.* 2014), no se debe de descartar la posibilidad de que *D. marsupialis* también sea un hospedero competente para esta bacteria. *Ehrlichia chaffeensis* sólo se ha reportado en el tlacuache de Virginia por métodos serológicos (Lockhart *et al.* 1997; Castellaw *et al.* 2011), lo que sugiere que hubo una exposición al patógeno más no necesariamente una infección (Cetinkaya *et al.* 2015). Hasta la fecha, no se puede confirmar que los didélfidos jueguen el papel de hospederos en la dinámica de transmisión de *E. canis* y *E. chaffeensis,* debido a que no se ha confirmado su infección por métodos moleculares (Estrada-Peña y de la Fuente 2014). En este sentido, conocer la virulencia de los patógenos en el hospedero es necesario para definir su capacidad para mantener y transmitir la infección (Paddock y Childs 2003).

El bajo número de tlacuaches positivos a *A. phagocytophilum,* y la ausencia de *E. chaffeensis* y *E. canis* en los tlacuaches del presente estudio se ve compensado por las abundancias que llegan a presentar las dos especies de tlacuaches y por la cantidad de garrapatas que alimentan, a pesar que solo unas pocas estarían infectadas con *A. phagocytophilum* (Anexo 5 y 6). En este sentido, los tlacuaches estarían contribuyendo con el mantenimiento de las poblaciones de garrapatas vectores de PTG, más que contribuir directamente en la transmisión de *Aanaplasma* spp. y *Ehrlichia* spp. Estos resultados contrastan con el reporte de que *D. virginiana* es un hospedero que

“absorbe” las infecciones, porque se quitan o matan hasta 5487 garrapatas por hectárea, por lo que su presencia en la comunidad de hospederos, más que facilitar la transmisión de PTG, la afectaría (bajo el contexto del “efecto de dilusión) (Kessing *et al.* 2006, 2012).

Los perros en la interfaz entre especies domésticas-silvestres adoptan el rol de depredadores, presas, competidores y reservorios o transmisores de parásitos (Gompper 2014). Su alta abundancia y constante intromisión en ambientes con fauna silvestre, son factores de riesgo que facilitan la transmisión de sus patógenos (Knobel *et al.* 2014). La baja calidad de vida (poco cuidado sanitario y densidades altas), generalmente, está asociada a una baja calidad en salud, factor que los hace más vulnerables a infestaciones por ectoparásitos y a infecciones por patógenos, como los del presente estudio (Gompper *et al.* 2014). La alta abundancia de perros (1751.4) en el poblado de Chiná, y la prevalencia de *A. phagocytophilum* en los perros muestreados del mismo poblado (50 %), los hacen una especie y población clave en el mantenimiento de este patógeno, aún más que los tlacuaches. Sin embargo, para comprobar si hay una transmisión de *A. phagocytophilum* y *E. canis* entre fauna silvestre y doméstica, es necesario futuros estudios filogenéticos que revelen la similitud entre los patógenos en los perros y fauna silvestre. La mayoría de los perros muestreados incursionaban en los acahuales, por lo menos una vez al mes, lo que los coloca como una especie activa en la interfaz fauna doméstica-silvestre y como factor de riesgo en la transmisión de patógenos y ectoparásitos (Knobel *et al.* 2015).

La diversidad de la comunidad de vertebrados en el área de estudio puede tener un doble efecto en el riesgo de transmisión de *A. phagocytophilum, E. canis* y *E. chaffeensis.* En las comunidades ecológicas existen factores que en lugar de facilitar la transmisión (como una alta densidad de hospederos competentes para el patógeno y vector), la limitan o regulan. Por ejemplo, es frecuente que en las comunidades haya igual o mayor número de hospederos no competentes, que al no infectarse con estos patógenos, detienen la transmisión, porque la garrapata infectada se alimenta de un hospedero en el cual el patógeno no puede sobrevivir o, en caso que si pueda, la

bacteriemia no es lo suficiente para infectar a otras garrapatas y que estas continúen con el ciclo de transmisión. A esto se le conoce como “efecto de dilución” (la diversidad de un ecosistema diluye o “absorbe” la transmisión de patógenos) y “efecto de facilitación”(la diversidad de un ecosistema facilita la transmisión de patógenos) (Keesing *et al.* 2006; Wood *et al.* 2014). Bajo este contexto, en los ecosistemas que contengan densidades altas de hospederos reservorios de los patógenos en cuestión, como el venado cola blanca para *E. chaffeensis* y *A. phagocytophilum*, especie de hospedero que incluso es usada como centinela para monitorear la dispersión de estas bacterias (Woldehiwet 2010; Yabsley 2010), lo convierte en un factor de riesgo para la infección por estos patógenos. En la Península de Yucatán, los venados temazate café y rojo también comparten el hábitat con el venado cola blanca (Galindo-Leal y Weber 2014; Medellín 2014; Weber 2014b), los cuales, por su similitud filogenética, también deberían de ser considerados como posibles reservorios de estos patógenos y su presencia considerada como factor de riesgo. Además, la alta diversidad de especies que encontramos en la Península (muchas de ellas hospederos de estos patógenos), sobretodo en la reserva de Calakmul, refleja la posibilidad que patógenos, como *E. chaffeensis* y *A. phagocytophilum,* encuentren las condiciones para estar presentes y circulando en la comunidad de vertebrados. Si bien, en el presente estudio no detecté individuos positivos a *E. chaffeensis,* valdría la pena hacer un monitoreo de este patógeno en los cérvidos, especialmente en el venado cola blanca y en la comunidad de garrapatas. Los perros, al poder infectarse con los tres patógenos y por su abundancia, pudieran ser hospederos centinelas, lo que permitiría mapear las zonas de alto riesgo de infección para cada una de las bacterias.

RECOMENDACIONES

Para poder confirmar que la ausencia de *E. canis* y *E. chaffeensis* en los tlacuaches del presente estudio se deba a que no alcancé el tamaño de muestra, bajo el supuesto que se pueden llegar a infectar, en futuros estudios habría que incrementar el número de individuos analizados a por los menos 299 (estimación de tamaño de muestra *a priori*).

Para evaluar la capacidad competente de los tlacuaches y su posible estatus como hospederos, es necesario estudios experimentales de laboratorio complementarios que determinen qué tan susceptibles son de infectarse con las sepas de los tres patógenos de la región de estudio, cuánto dura la infección y la probabilidad que tienen las garrapatas de adquirir al agente etiológico cuando se alimentan de estos (Keesing *et al.* 2012; Estrada-Peña y de la Fuente 2014).

Para darle continuidad al trabajo, es recomendable hacer el diagnóstico también a las garrapatas y de las especies de garrapatas positivas, evaluar su capacidad para transmitir al patógeno.

Para poder explicar la influencia del sexo en la abundancia de garrapatas, habría que evaluar cuáles son las características de los hábitos de los tlacuaches, si la fortaleza del sistema inmunitario es igual en machos que en hembras y determinar en qué medida estos factores estarían asociados a la abundancia de garrapatas en estos hospederos.

El efecto de localidad en la abundancia de garrapatas no sólo se explica por la historia ambiental, por lo que habría que investigar la fenología de la comunidad de garrapatas y la relación de ésta con la composición de la comunidad de hospederos con el fin de tener una mejor idea de los factores que intervienen en su abundancia de estas (Estrada-Peña y de la Fuente 2014).

Recomiendo que futuros estudios evalúen si los perros con dueño de libre rango pueden ser usados como centinelas para el monitoreo de las tres rickettsias en la

Península de Yucatán. Esta información sería de utilidad para generar mapas de riesgo de infección de los patógenos en cuestión (Yabsley 2010). También recomiendo que se determine si las tres especies de patógenos están presentes en las tres especies de venados de la Península de Yucatán y si estos posibles hospederos se pueden usar como especies centinelas.

Para poder concluir que los perros están transmitiendo *a A. phagocytophilum* a los tlacuaches y posiblemente al resto de hospederos silvestres competentes, habría que completar el presente estudio con análisis filogenéticos de los patógenos encontrados en cada hospedero.

Finalmente es de suma importancia que se hagan campañas para controlar la población de perros de libre rango (sobre todo en Chiná) para prevenir brotes de *A. phagocytophilum* y que se informe a la población en general de prevenir el contacto con garrapatas y en caso de ser mordidos por una, retirarla antes que pasen 24 h. De igual forma, recomendar a los encargados de los centros de salud de las tres localidades que tengan en cuenta la presencia de *A. phagocytophilum* en la región y que consideren la enfermedad de AGH a pacientes con sintomatología. También es recomendable que en el área de estudio se tenga un mayor control de infestaciones por garrapatas en animales domésticos.

CONCLUSIONES

Conocer la dinámica de transmisión de enfermedades en la interfaz fauna silvestre, animales domésticos y humanos se ha vuelto una de las prioridades en la investigación ecológica y epidemiológica. Bajo este enfoque, encontré evidencia irrefutable de la presencia de *A. phagocytophilum* en tlacuaches y perros con dueño de libre rango en una región rural de la Península de Yucatán. A pesar de la baja prevalencia de este patógeno en los tlacuaches, o nulas (para *E. canis* y *E. chaffeensis*), estos podrían estar involucrados de forma indirecta en la dinámica de transmisión de PTG debido a la alta abundancia de garrapatas que presentaron. Los machos pudieran tener un papel más importante en la transmisión de PTG, debido a la mayor abundancia promedio de garrapatas que presentaron en relación a las hembras. Otros factores regionales también parecen afectar la abundancia de garrapatas, como la ganadería, que la favorece, o la agricultura que la disminuye; y que finalmente se traduce en un riesgo mayor o menor de infección por PTG. En cuanto a los perros de libre rango del presente estudio y las altas prevalencias encontradas, superiores a reportes previos en México y en el mundo, podrían considerarse como hospederos reservorios en esta región. Esto ante la gran abundancia de perros en áreas rurales de México y la tendencia creciente de su población, es un hallazgo que no puede soslayarse en términos de salud, ni para futuras investigaciones sobre rickettsiosis en socio-ecosistemas neotropicales.

LITERATURA CITADA

Adler GH, Arboledo JJ y Travi BL. 1997. Population dynamics of *Didelphis marsupialis* in Northern Colombia. Studies on Neotropical Fauna and Environment 32: 7–11.

Almazán C, González-Álvarez VH, Fernández de Mera IG, Cabezas–Cruz A, Rodríguez–Martínez R, de la Fuente J. 2016. Molecular identification and characterization of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs in Mexico. Ticks Tick–Borne Diseases 7(2): 276–83.

Anderson BE, Sumner JW, Dawson JE, Tzianabos T, Greene CR, Olson JG. 1992 Detection of the etiologic agent of human ehrlichiosis by polymerase chain reaction. Journal of Clinical Microbiology 30: 775–780.

Aranda M. 2000. Huellas y otros rastros de los mamíferos grandes y medianos de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Xalapa: Instituto de Ecología, A. C.

Atif FA. 2015. *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*: Rickettsiales pathogens of veterinary and public health significance. Parasitology Research 114(11): 3941–3957.

Beall MJ, Alleman AR, Breitschwerdt EB, Cohn LA, Couto CG, Dryden MW, Guptill LC. 2012. Seroprevalence of *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in dogs in North America. Parasites and Vectors 5(1): 2–11.

Bowman D, Little SE, Lorentzen L, Shields J, Sullivan MP, Carlin EP. 2009. Prevalence and geographic distribution of *Dirofilaria immitis*, *Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia canis*, and *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in the United States: Results of a national clinic-based serologic survey. Veterinary Parasitolpgy 160(1–2): 138–148.

Brunner JL, Ostfeld RS. 2008. Multiple causes of variable tick burdens on small–mammal hosts. Ecology 89(8): 2259–2272.

Buckley MY. 2015. Generalized linear models. En: Fox GA, Negrete-Yankelevich S, Sosa VJ (eds) Ecological Statistics, contemporary theory and application. Oxford: Oxford University Press, p. 130–148.

Bush AO, Lafferty KD, Lotz JM, Shostak AW. 1997. Parasitology meets ecology in its own terms: Margolis et al. revisited. Journal of Parasitology 83: 575–583.

Castellaw AH, Chenney EF, Varela-Stokes AS. 2011. Tick–borne disease agents in various wildlife from Mississippi. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 11(4): 439–42.

Cetinkaya H, Matur E, Akyazi I, Ergul–Ekiz E, Aydin L, Toparlak M. 2015. Serological and molecular investigation of *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp. in ticks and blood of dogs, in the Thrace region of Turkey. Ticks and Tick–borne Diseases. 7: 706–714.

Colchero F, O'Farril G, Medellín RA. 2014. Common opossum. En: Ceballos G. (eds) Mammals of Mexico. Baltimore: Johns Hopkins Univerity Press, p. 74–76.

Comisión Nacional Forestal (CONAFOR) 2014. Inventario Estatal Forestal y de Suelos de Campeche. Informe 2013–2014. México.

Conover MR, Vail RM. 2015. Human Diseases from Wildlife. Manhattan: CRC Press.

Cruz-Salazar B. 2013. Efectos de paisajes modificados en *Didelphis marsupialis* y *Didelphis virginiana* en Chiapas, México: Un estudio poblacional y genético. [Tesis de Doctorado] El Colegio de la Frontera Sur, 145 pp.

Dahlgren FS, Mandel EJ, Krebs JW, Massung RF, McQuiston JH. 2011. Increasing incidence of *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* in the United States, 2000–2007. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 85(1): 124–131.

Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. 2001. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. Acta Tropica 78: 103–16.

Del Fabbro S, Gollino S, Zuliani M, Nazzi F. 2015. Investigating the relationship between environmental factors and tick abundance in a small, highly heterogeneous region. Journal of Vector Ecology 40(1): 107–116.

Estrada-Peña A, y de La Fuente J. 2014. The ecology of ticks and epidemiology of tick–Borne viral diseases. Antiviral Research 108(1): 104–128.

Fleeming H. 1972. Aspects of the population dynamics of three species of opossums in the Panama Canal Zone. Journal of Mammalogy 53(3): 619–623.

Galindo-Leal C, Weber M. 2014. White-tailed deer. En: Ceballos G (eds) Mammals of Mexico. Baltimore: Johns Hopkins University Press, p. 595–598.

Gompper ME. 2014. Free-Ranging Dogs and Wildlife Conservation. Oxford: Oxford University Press.

Gortazar C, Reperant L, Kuiken T, De la Fuente J, Boadella M, Martínez-Lopez B, Ruiz-Fons F, Estrada-Peña A, Drosten C, Medly G, Ostfeld R. 2014. Crossing the interspecies barrier: Opening the door to zoonotic pathogens. PLoS Pathogens 10(6): 15-21.

Guerrero-Sánchez S, Weber-Rodríguez M. 2012. Riesgo zoonótico y antropozoonótico en carnívoros silvestres pequeños y mediados en Calakmul, Campeche. En: Mariaca R. (eds) El Huerto Familiar en el Sureste de México. México: SERNAPAM.TABASCO y ECOSUR, p. 269–291.

Guzmán-Cornejo C, Robbins RG, Guglielmone AA, Montiel-Parra G, Pérez TM. 2011. The *Amblyomma* (Acari : Ixodida : Ixodidae) of Mexico. Zootaxa 2998: 16–38.

Guzmán-Cornejo C, Robbins RG, Guglielmone AA, Montiel-Parra G, Rivas G, Pérez TM. 2016. The *Dermacentor* (Acari, Ixodida, Ixodidae) of Mexico: hosts, geographical distribution and new records. Zookeys 22: 1–22.

Harrus S, Waner T. 2011. Diagnosis of canine monocytotropic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*): An overview. The Veterinary Jpurnal 187(3): 292–296.

[INEGI] Instituto Nacional de Estadística y Geografía. 2010. XIII Censo Nacional de Población y Vivienda.

[INEGI] Instituto Nacional de Estadística y Geografía 2014. Anuario estadístico y geográfico de Campeche, México.

Introduction to SAS. 2007. UCLA Statistical Consulting Group; [consultada enero 2017]. http://statistics.ats.ucla.edu/stat/mult_pkg/faq/general/citingats.htm

Jiménez-Coello M, Pérez–Osorio C, Vado–Solís I, Rodríguez–Buenfil JC, Ortega–Pacheco A. 2009. A serological survey of *Ehrlichia canis* in stray dogs from Yucatan, Mexico, using two different diagnostic tests. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 9: 209–211.

Johnson PTJ, Ostfeld RS, Keesing F. 2015. Frontiers in research on biodiversity and disease. Ecology Letters 18: 1119–1133.

Jones EO, Webb SD, Ruiz–Fons FJ, Albon S, Gilbert L. 2011. The effect of landscape heterogeneity and host movement on a tick–borne pathogen. Theoretical Ecology 4 (4): 435–448.

Kanda LL, Fuller TK, Sievert PR, Kellogg RL. 2009. Seasonal source-sink dynamics at the edge of a species range. Ecology 90(6): 1574–1585.

Keesing F, Belden LK, Daszak P, Dobson A, Harvell CD, Holt RD, Hudson P, Jolles A, Jones KE, Mitchell CE, Myers SS, Bogich T, Ostfeld RS. 2010. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. Nature 468(7324): 647–652.

Keesing F, Hersh MH, Tibbetts M, McHenry DJ, Duerr S, Brunner J, Killilea M, LoGiudice K, Schmidt KA. 2012. Reservoir competence of vertebrate hosts for *Anaplasma phagocytophilum*. Emerging Infectious Diseases 18(12): 2013–2016.

Keesing F, Holt RD, Ostfeld RS. 2006. Effects of species diversity on disease risk. Ecology Letters 9: 485–498.

Kiffner C, Vor T, Hagedorn P, Niedrig M, Rühe F. 2011. Factors affecting patterns of tick parasitism on forest rodents in tick–borne encephalitis risk areas, Germany. Parasitology Research 108(2): 323–335.

Knobel DL, Butler RA, Lembo T, Crithlow R, Gompper ME. 2014. Dogs, diseases and wildlife. En: Gompper ME (eds) Free-Ranging Dogs and Wildlife Conservation. Oxford: Oxford University Press, p.144–169.

Koenen F, Pascucci I, Jaenson TGT, Madder M, Sousa R, Estrada-Peña A, Farkas R, Salman M. 2013. Tick–borne infectious (including zoonoses) in Europe and Mediterranean basin. En: Salman M, Tarrés–Call J (eds) Ticks and Tick–borne Diseases, Geographical Distribution and Control Strategies in the Euro–Asia Region. UK: CAB International. p. 33–75.

Kohn B, Silaghi C, Galke D, Arndt G, Pfister K. 2011. Infections with *Anaplasma phagocytophilum* in dogs in Germany. Research in Veterinary Science 91(1): 71–76.

Lockhart JM, Davidson WR, Stallknecht DE, Dawson JE, Little SE. 1997. Natural history of *Ehrlichia chaffeensis* (Rickettsiales: Ehrlichidae) in the Piedmont physiographic province of Georgia. Journal of Parasitology 83: 887–894.

Márquez-Luna J. 2005. Técnicas de colecta y preservación de insectos. Boletín Sociedad Entomológica Aragonesa 37: 385–408.

Maggi RG, Birkenheuer AJ, Hegarty BC, Bradley JM, Levy MG, Breitschwerdt EB. 2014. Comparison of serological and molecular panels for diagnosis of vector-borne diseases in dogs. Parasites and Vectors 7: 127.

McCown ME, Monterroso VH, Cardona W. 2015. Monitoreo de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi*, y *Dirofilaria immitis* en perros de tres ciudades en Colombia. Medicina Veterinaria y Zootecnia 10 (2): 224–231.

McQuiston J, McCall C, William N. 2003. Ehrlichiosis and related infections. Zoonosis update 223(12): 1750–1756.

Medellín RA. 2014. Yucatan brown brocket. En: Ceballos G (ed) Mammals of Mexico. Baltimore: Johns Hopkins Univerity Press. p. 592–593.

Movilla R, García C, Siebert S, Roura X. 2016. Countrywide serological evaluation of canine prevalence for *Anaplasma* spp., *Borrelia burgdorferi* (sensu lato), *Dirofilaria immitis* and *Ehrlichia canis* in Mexico. Parasites and Vector*s* 9(1): 421–433.

Newcombe RG. 1998. Two–sided confidence intervals for the single proportion: comparison of seven methods. Stat Med 17: 857–872.

Ndip LM, Ndip RN, Esemu SN, Dickmu VL, Fokam EB, Walker DH, McBride JW. 2005. Ehrlichial infection in Cameroonian canines by *Ehrlichia canis* and *Ehrlichia ewingii*. Veterinary Microbiology 111(1–2): 59–66.

Noriega-Trejo R, Arteaga-Aguilar M. 2010. Ecosistemas continentales: Síntesis de los tipos de vegetación terrestre. En Villalobos–Zapata GJ, Mendoza–Vaga J (eds) La Biodiversidad en Campeche: Estudio de Estado. México: CONABIO, UAC y ECOSUR, p. 148–155.

Ortega-Pacheco A, Rodríguez–Buenfil JC, Bolio–González ME, Sauri-Arceo CH, Jiménez-Coello M, Linde C. 2007. A survey of dog populations in urban and rural areas of Yucatan, Mexico. Anthrozoos 20(3): 261–74.

Paddock D, Childs CJ. 2003. *Ehrlichia chaffeensis*: A prototypical emerging pathogen. Clinical Microbiology Reviews 16(1): 37–64.

Parola P, Davoust B, Raoult D. 2009. Tick- and lea-borne rickettsial emerging zoonoses. Veterinary Research 36: 469–492.

Pat-Nah H, Rodríguez-Vivas RI, Bolio-González ME, Villegas-Pérez SL, Reyes-Novelo E. 2015. Molecular diagnosis of *Ehrlichia canis* in dogs and ticks *Rhipicephalus*

sanguineus (Acari: Ixodidae) in Yucatan, Mexico. Journal of Medical Entomology 52(1): 101–104.

Perez G, Bastian S, Agoulon A, Bouju A, Durand A, Faille F, Lebert I, Rantier Y, Plantard O, Butet A. 2016. Effect of landscape features on the relationship between *Ixodes ricinus* ticks and their small mammal hosts. Parasites and Vectors 9(1): 20.

Pfäffle M, Littwin N, Muders SV, y Petney TN. 2013. The ecology of tick–borne diseases. International Journal for Parasitology 43: 12–13.

QGIS Development Team. 2016. Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. http://www.qgis.org/

Rejmanek D, Vanwormer E, Miller MA, Mazet JK, Nichelason AE, Melli AC, Packham AE, Jessup DA, Conrad PA. 2009. Prevalence and risk factors associated with *Sarcocystis neurona* infections in opossums (*Didelphis virginiana*) from Central California. Veterinary Parasitology 166(1–2): 8–14.

Rodríguez-Vivas RI, Albornoz REF, Bolio GME. 2005. *Ehrlichia canis* in dogs in Yucatan, Mexico: seroprevalence, prevalence of infection and associated factors. Veterinary Parasitology 172: 75–79.

Rodríguez-Vivas RI, Bolio-González ME, Ojeda-Chi MM. 2015. Diagnóstico de ehrlichiosis monocítica canina, una revisión actualizada. Ciencia y Agricultura 12(1): 85–98.

Rodríguez-Vivas R, Ojeda-Chi MM, Rosado-Aguilar JA, Trinidad-Martínez I, Torres-Acosta JFJ, Ticante-Pérez V, Castro-Marin JM, Tapia-Moo CA, Vázquez-Gómez G. 2013. Red deer (*Cervus elaphus*) as a host for the cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in Yucatan, Mexico. Experimental ans Appllied Acarology 60: 543–552.

Rolff J. 2002. Bateman's principle and immunity. Proceedings of the Royal Society of Biological Sciences 269: 867–872.

Ruiz-Fons F, Acevedo P, Sobrino R, Vicente J, Fierro Y, Fernández–de–Mera IG. 2013. Sex–biased differences in the effects of host individual, host population and environmental traits driving tick parasitism in red deer. Front Cell Infect Microbiol [Online]. 3(June): 23.

Sainz A, Roura X, Miró G, Estrada-Peña A, Kohn B, Harrus S, Solano-Gallego L. 2015. Guideline for veterinary practitioners on canine ehrlichiosis and anaplasmosis in Europe. Parasites and Vectors 8: 75.

Sosa-Gutiérrez CG, Vargas M, Torres J, Gordillo-Pérez G. 2014. Tick-borne rickettsial pathogens in rodents from Mexico. Journal of Biomedical Science and Engineering. 7: 884–889.

Sosa-Gutiérrez CG, Vargas M, Torres J, Gordillo-Pérez G. 2016a. Tick-borne rickettsial pathogens in questing ticks, removed from humans and animals in Mexico. Journal of Veterinary Science 17 (3): 353–360.

Sosa-Gutiérrez C, Solorsano-Santos F, Walker DH, Torres J, Serrano CA, Gordillo-Pérez G. 2016b. Fatal monocytic ehrlichiosis in woman, Mexico, 2013. Journal of Emerging Infectious Diseases 22(5): 871–874.

Stich RW, Schaefer JJ, Bremer WG, Needham GR, y Jittapalapong S. 2008. Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as related to the tick-borne pathogen, *Ehrlichia canis*. Veterinary Parasitology 158: 256–273.

Stuen S. 2007. *Anaplasma phagocytophilum* – the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. Veterinary Research Communications 31: 79–84.

Sunquist ME, Austad SN, Sunquist F. 1987. Movement patterns and home range in the common opossum (*Didelphis marsupialis*). Journal of Mammalogy 68: 173–176.

Suzán G, Ceballos G. 2005. The role of feral mammals on wildlife infectious disease prevalence in two nature reserves within Mexico city limits. Journal of Zoo and Wildlife Medicine 36 (3): 479–484.

Vaughan CS, Foster Hawkins L.1999. Late dry season habitat use of common opossum, *Didelphis marsupialis* (Marsupialia: Didelphidae) in neotropical lower montane agricultural areas. Revista de Biología Tropical. 47(1–2): 263–269.

Vázquez-Ávila L. 2004. Estudio de población canina y felina mediante encuestas a la comunidad del puerto de Celestún, Yucatán. Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. Reserva de la Biósfera de Celestún (reporte no publicado).

Walter WD, Fischer JW, Anderson CW, Marks DR, Deliberto T., Robbe-Austerman S., Vercautern KC. 2013. Surveillance and movements of Virginia opossum (*Didelphis*

virginiana) in the bovine tuberculosis region of Michigan. Epidemiology and Infection 141(7): 1498–1508.

Warner CK, Dawson JE. 1996. Genus- and species-level identification of *Ehrlichia* species by PCR and sequencing. En: Persing DH (ed) PCR Protocols for Emerging Infectious Diseases. American Society for Microbiology. Washington, p. 101–105.

Weber M. 2014a. Temazates y venados cola blanca tropicales. En: Valdez R y Ortega SA (eds) Ecología y Manejo de Fauna Silvestre. México: Colegio de Posgraduados, p. 421–452.

Weber M. 2014b. Red brocket. En: Ceballos G (ed) Mammals of Mexico. Baltimore: Johns Hopkins University Press. p. 589–591.

Woldehiwet Z. 2010. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. Veterinary Parasitology 167(2–4): 108–22.

Wood CL, Lafferty KD, DeLeo G, Young HS, Hudson PJ, Kuris AM. 2014. Does biodiversity protect humans against infectious disease? Ecology 95(4): 817–832.

Wright JD, Burt MS, Jackson VL. 2012. Influences of an urban environment on home range and body mass of Virginia opossums (*Didelphis Virginiana*). Northeastern Naturalist 19(1): 77–86.

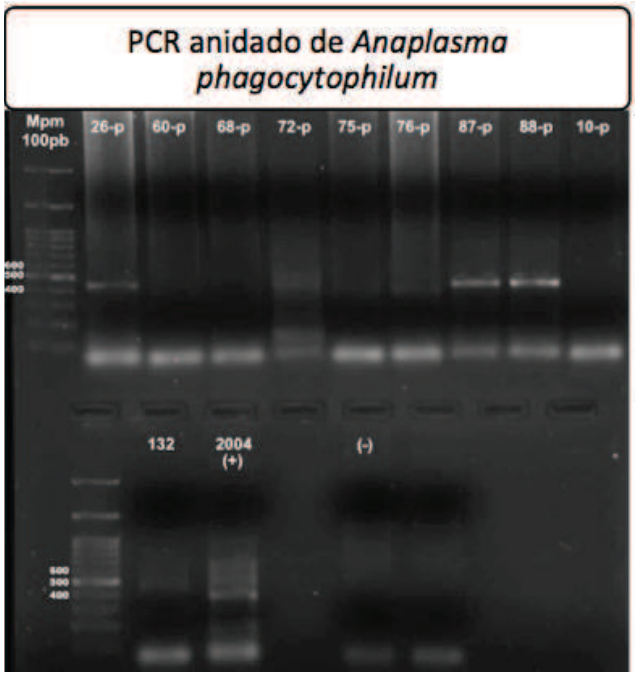
Yabsley MJ. 2010. Natural history of *Ehrlichia chaffeensis*: Vertebrate hosts and tick vectors from the United States and evidence for endemic transmission in other countries. Veterinary Parasitology 167(2-4): 136–148.

Zar JH. 1984. Biostatistical Analyisis. New-York: Prentice Hall.

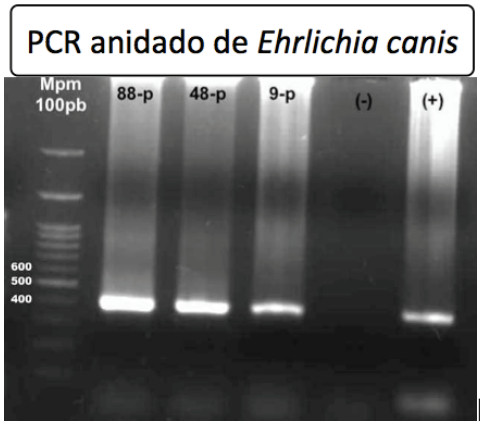
Zarza H, Medellín RA. 2014. Virginia opossum. En: Ceballos G (ed) Mammals of Mexico. Baltimore: Johns Hopkins University Press, p. 76–78.

ANEXOS

Anexo 1. Fotos de los geles de agarosa con productos amplificados por PCR anidado de A) *Anaplasma phagocytophilum* y B) *Ehrlichia canis.* (A) muestra el resultado positivo a la presencia de un fragmento del gen 16s ADNr de *A. phagocytophilum* de las muestras de perro 26–p, 72–p, 76–p, 87–p, 88–p y el control positivo 2004. (B) muestra el resultado positivo a la presencia de un fragmento del gen 16s ADNr de *E. canis* de las muestras de perro 88–p, 48–p, 9–p y el control positivo.

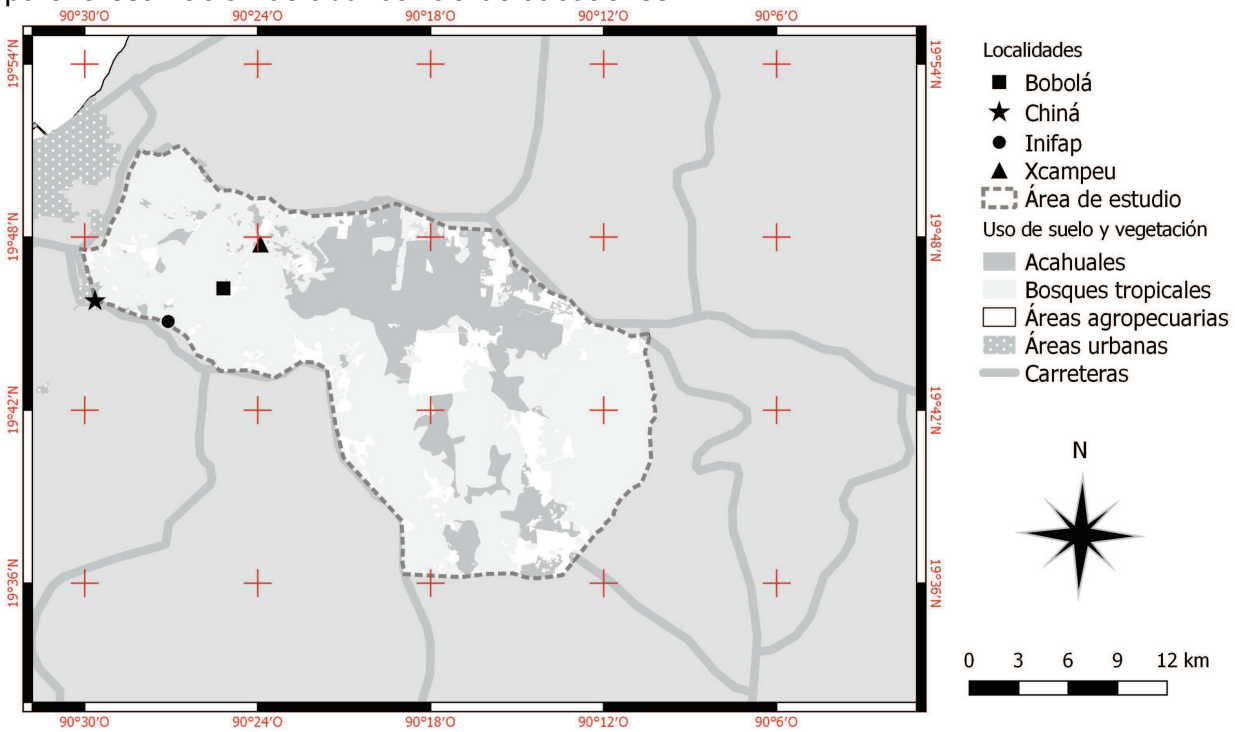


A



B

Anexo 2. Mapa del polígono delimitado por carreteras, del cual se obtuvieron los sitios para la estimación de abundancia de tlacuaches.



Anexo 3. Características de captura de los tlacuaches infectados por *A. phagocytophilum*

Especie	Localidad	Historia del sitio	Sexo	Edad	Abundancia garrapatas	Infección	Clave
D. marsupialis	Bobolá	Acahual	Hembra	Adulto	6	*A. phagocytophilum*	2
D. virginiana	Bobolá	Ecotono	Hembra	Adulto	2	*A. phagocytophilum*	71
D. virginiana	Chiná	Ecotono	Macho	Adulto	11	*A. phagocytophilum*	130

Anexo 4. Características de muestreo de los perros infectados por *A. phagocytophilum* y *E. canis*

Localidad	Condición corporal	Días monte/mes	Actividad dueño	Abundancia garrapatas	tratamiento	Sexo	Infección	Clave
Chiná	Normal	2	Comisario/ Cazador	4	No	Hembra	*A. phagocytophilum*	4–p
Xcampeu	Normal	10	Solar	2	Si	Hembra	*A. phagocytophilum*	17–p / p-3-c
Xcampeu	Normal	20	Solar	11	No	Hembra	*A. phagocytophilum*	26–p
Chiná	Normal	15	Comerciante	700	No	Macho	*A. phagocytophilum*	58–p
Chiná	Normal	20	Ganadero Agricultor	100	No	Macho	*A. phagocytophilum*	72–p
Chiná	Normal	20	Comerciante Cazador–Agr	6	No	Macho	*A. phagocytophilum*	76–p
Chiná	Normal	8	Solar–Velador	6	No	Hembra	*A. phagocytophilum*	82–p
Chiná	Normal	28	Comerciante Ganadero	15	No	Macho	*A. phagocytophilum*	86–p
Chiná	Normal	16	Apiario Cazador	3	Si	Macho	*A. phagocytophilum*	87–p
Chiná	Delgado	28	Comerciante Cazador	200	No	Macho	*A. phagocytophilum*	90–p
Chiná	Normal	12	Apiario Cazador	5	No	Macho	*A. phagocytophilum*	92–p
Chiná	Normal	30	Apiario/ Cazador	9	No	Macho	*A. phagocytophilum / E. canis*	88–p
Bobolá	Delgado	25	Leñador/ Carbonero	0	No	Macho	*E. canis*	9–p
Bobolá	Normal	10	Solar/Cazador	100	No	Macho	*E. canis*	48–p

Anexo 5. Estimación de abundancia de *Didelphis* spp. en el uso de suelo forestal del área de estudio usando el área real de muestreo.

Uso de suelo	No. de trampas	Área real de muestreo (ha)	No. de tlacuaches capturados	Área total (ha)	Estimación abundancia de tlacuaches*	No. de garrapatas	No. de garrapatas infectadas por *A. phago.* **	No. de garrapatas infectadas por *A. phago.***
Forestal	140	1092	72	41526	2738	69819	9076	272

*Estimación de abundancia de tlacuaches = (41526 ha * 72) / 1092 ha. ** Estimación de garrapatas considerando que el 100 % de la estimación de tlacuaches estuviesen infectados. *** Estimación de garrapatas considerando que el 3 % de la estimación de tlacuaches estuviesen infectados.

Anexo 6. Estimación de abundancia de *Didelphis* spp. en el uso de suelo forestal del área de estudio con base en la densidad de tlacuaches.

Densidad: tlacuaches por hectárea	Estimación abundancia de tlacuaches	No. de garrapatas	No. de garrapatas infectadas por *A. phago.* *	No. de garrapatas infectadas por *A. phago* **	Hectáreas de uso de suelo forestal
0.09	3737	95302	12389	372	41526

Estimación de garrapatas considerando que el 100 % de la estimación de tlacuaches estuviesen infectados. ** Estimación de garrapatas considerando que el 3 % de la estimación de tlacuaches estuviesen infectados.