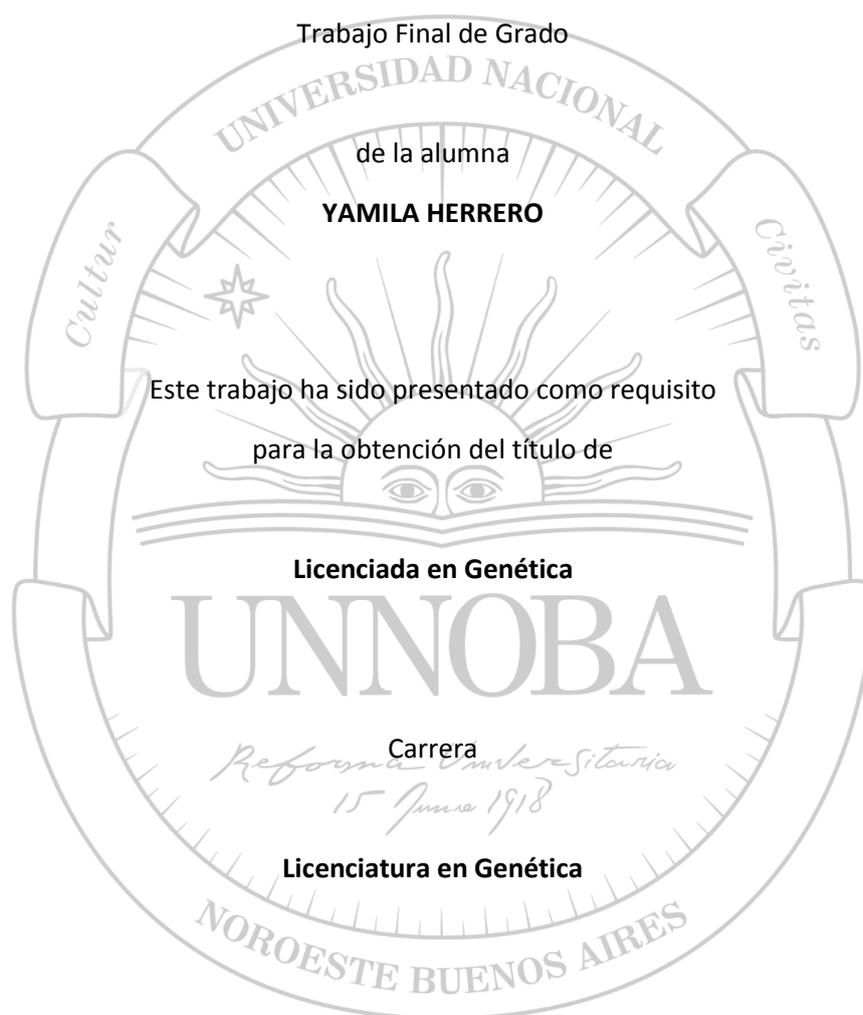


**IDENTIFICACIÓN DE ECTOPARÁSITOS EN ROEDORES Y ANÁLISIS DE SU IMPORTANCIA COMO VECTORES DE PATÓGENOS**



**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.**

**Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.**

Pergamino,.....

**IDENTIFICACIÓN DE ECTOPARÁSITOS EN ROEDORES Y ANÁLISIS DE SU IMPORTANCIA COMO VECTORES  
DE PATÓGENOS**

Trabajo Final de Grado

de la alumna

**YAMILA HERRERO**

Silvina Goenaga  
**Director**

María Laura Martín  
**Co-Director**

Juliana Sánchez  
**Co-Director**

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,  
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino,.....

## **Agradecimientos**

A mi directora, la Dra Silvana Goenaga por enseñarme a trabajar en el laboratorio, por su paciencia y esperarme siempre con un mate, lista para ayudarme.

A mis co- directoras las Doctoras Juliana Sánchez y María Laura Martin, que me brindaron su apoyo desde el primer día y una respuesta cada vez que la necesité.

A todo el personal del Instituto Maiztegui, especialmente al equipo de Virología, y a los investigadores y becarios del Centro de Bioinvestigaciones-Cebio por su excelente predisposición para ayudarme siempre que lo necesité y por hacerme formar parte de un agradable ambiente laboral.

A la Ing. Susana Pistorale, por su enorme eficacia, su dedicación, esfuerzos y constante ayuda para el bienestar de los alumnos.

A todos los docentes de la UNNOBA por haberme formado académicamente.

A todos los amigos que me dio la universidad, por cada momento compartido y por hacer de mi paso por la institución un momento único e inigualable. A Noe, Lu, Yesi y especialmente a Gabo, con el que compartí millones de mates entre charlas y estudio.

A Agus y Nico, por escucharme, cocinarme rico, ayudarme y compartir miles de risas conmigo.

A mis amigas de la infancia, especialmente a Flor y Lu por hacerme comprender el valor de la amistad y su apoyo.

A mis papás, Silvana y Luis, por su esfuerzo para que yo logre llegar a esta instancia, por enseñarme a ser lo que soy hoy en día y acompañarme absolutamente en todo. Sin ellos, nada de todo esto hubiese sido posible. A mi hermano Agustín, que estaba siempre esperándome al grito de “Nerd”

alegrándose por mis logros. A los tíos, tías, primos/as y abuela Bitá que siempre estuvieron ansiosos esperando mis resultados. Mención especial para la tía “Chicha”, que se preocupó para que coma rico en mi periodo universitario.

A Juan, que viajó tantas veces a Pergamino como era posible, y aún más. Gracias por ser ese cumplidor de caprichos serial y ayudarme tanto. Gracias también a su familia, que fueron parte de todo este proceso y estuvieron siempre presentes.

A mis amores perrunos que esperaban ansiosas mi vuelta de Pergamino. Maia, Lola y Galgui, gracias por alegrar todos mis días.

## Índice

Agradecimientos.....	3
1. Introducción .....	6
1.1 Ectoparásitos y su importancia sanitaria.....	6
1.1.1 Arbovirus.....	7
1.2 Ectoparásitos y sus hospedadores .....	17
1.2.1 Orden Phthiraptera .....	19
1.2.2 Orden Siphonaptera.....	19
1.2.3 Subclase Acari .....	21
2. Hipótesis .....	27
3. Objetivos.....	27
3.1 General .....	27
3.2 Específicos.....	27
4. Materiales y métodos.....	28
4.1 Captura de roedores, identificación y colecta de sus ectoparásitos.....	28
4.2 Procesamiento de ectoparásitos, identificación y armado de <i>pools</i> .....	31
4.3 Extracción del ARN total a partir de los <i>pools</i> de ectoparásitos.....	32
4.4 Amplificación del genoma viral por RT-Nested- PCR para la detección de virus de los géneros <i>Alfavirus</i> y <i>Flavivirus</i> .....	33
4.5 Amplificación del genoma viral por RT-PCR para la detección de virus del género <i>Orthobunyavirus</i> .....	39
4.6 Visualización de los productos de amplificación .....	41
5. Resultados.....	42
5.1 Captura de los roedores y obtención de los <i>pools</i> de ectoparásitos .....	42
5.2 Prevalencia de infestación según el sexo .....	45
5.3 Detección de genoma de <i>Flavivirus</i> , <i>Alfavirus</i> y <i>Orthobunyavirus</i> .....	46
6. Discusión .....	48
7. Conclusión .....	51
8. Bibliografía.....	53

## **1. Introducción**

### **1.1 Ectoparásitos y su importancia sanitaria**

Los artrópodos son el Phylum más numeroso y diverso del reino animal (Morrone & Coscarón, 1998). Los miembros de este grupo se caracterizan por poseer: cuerpo dividido en metámeros, un exoesqueleto quitinoso que los protege y apéndices articulados, tanto ambulatorios, como de carácter alimenticio o reproductor (Ribera et al., 2015).

Dentro de los artrópodos existen diversos tipos de vida, entre éstos se encuentra el parasitismo. Un parásito se define como un organismo que vive a expensas de otro organismo (el hospedador). Las especies de artrópodos parásitos que viven en el exterior de su hospedador se denominan ectoparásitos e incluyen ácaros, pulgas, garrapatas y piojos. Estos, pueden parasitar una amplia gama de organismos, desde humanos hasta insectos y plantas (McNair, 2014).

Los ectoparásitos presentan importancia sanitaria dado que tienen la capacidad de generar lesiones y también pueden actuar como vectores, transmitiendo diversos patógenos a sus hospedadores. Especialmente los hematófagos, que desempeñan un papel epidemiológico central en la transmisión de patógenos causantes de enfermedades (virus, bacterias, protozoos y helmintos) a animales y humanos (Sponchiado et al., 2015), participando, además, en el ciclo de mantenimiento de patógenos entre los animales que actúan como hospedadores (Linardi & Guimarães, 2000).

Al mismo tiempo, se sabe que las infecciones transmitidas por ectoparásitos están emergiendo o reemergiendo en todo el mundo, y su

incidencia va en aumento (Bitam et al., 2010). Por ejemplo, luego de los mosquitos, las garrapatas constituyen el vector más importante en la transmisión de patógenos a la población humana (Baneth, 2014).

En relación a su distribución geográfica, los ectoparásitos habitan en todo el mundo. En Argentina se distribuyen cerca de 500 especies de ectoparásitos (Morrone & Coscarón, 1998). En los últimos años se intensificaron los estudios en algunas regiones del país, ampliando el conocimiento ecológico y sistemático de los ectoparásitos asociados a mamíferos (principalmente roedores) (Patagonia: Sanchez et al., 2009; Sanchez & Lareschi, 2013, 2018; Centro: Navone et al., 2009; Lareschi, 2010; NOA: Lareschi et al., 2010; López Berrizbeitia et al., 2013, 2018). Sin embargo, el conocimiento sobre la fauna ectoparasitaria de mamíferos sigue siendo escaso o nulo para muchas regiones del país. Asimismo, para la mayoría de las especies de ectoparásitos distribuidos en Argentina, con la excepción de algunas especies de garrapatas (i.e Cicuttin et al., 2015, 2017; Monje et al., 2016), no se han realizado estudios de infección para el país, por lo que se desconoce la importancia sanitaria de los mismos.

### 1.1.1 Arbovirus

Entre los patógenos que pueden transmitir los artrópodos se encuentran numerosos virus, denominados arbovirus (del inglés arthropod-borne viruses). Los arbovirus son un grupo de virus cuya transmisión se da entre hospedadores vertebrados susceptibles y artrópodos hematófagos (Arredondo-García et al., 2016).

Los modos de transmisión de los arbovirus son múltiples (Fig. 1). Dentro de los ectoparásitos, las garrapatas han sido las más estudiadas y las que

transmiten virus de una forma más diversa (Baneth, 2014). Entre estos modos de transmisión se puede dar:

a) *Trasmisión mecánica* a través de la contaminación del aparato bucal, en la cual no hay replicación del virus en el vector o

b) *Trasmisión biológica* que implica la replicación del arbovirus en el vector previo a la transmisión, y puede ser:

b.1) vertical, se produce por el paso del virus de un vector hembra infectado a su progenie.

b.2) horizontal, venérea, cuando un vector infectado le transmite el virus a otro durante la cópula, u oral, desde un vector infectado a un hospedador vertebrado a través de la saliva durante la alimentación sanguínea.

Entre los arbovirus, la transmisión biológica horizontal oral es la más frecuente. En este caso se produce la infección del tracto digestivo del vector después de alimentarse con sangre infectada, luego la diseminación del virus en el mismo y su replicación en las glándulas salivales, lo que permite la transmisión (Weaver & Reisen, 2010).

En los ectoparásitos se detectó la posibilidad de transmisión mecánica tanto en garrapatas (Lubinga, et al., 2013) como en ácaros (Durden et al., 1992). En garrapatas también se ha registrado la transmisión biológica vertical (Lubinga et al, 2013) y biológica horizontal (Endris & Hess, 1994).

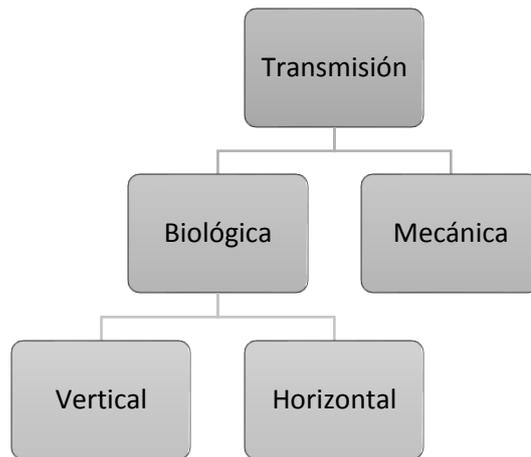


Figura 1. Esquema representativo de los posibles modos de transmisión de los arbovirus.

Para la mayoría de los arbovirus, con excepción de aquellos que se mantienen en la naturaleza por transmisión vertical, establecer y mantener el ciclo de transmisión de los arbovirus depende del patógeno, el vector y el hospedador, que deben interactuar en un ambiente propicio para la transmisión (Fig. 2) (Pfeffer & Dobler, 2010). Por otro lado, existen investigaciones que hacen énfasis en la importancia de factores extrínsecos, como por ejemplo la disponibilidad, la densidad y la abundancia de especies de hospedadores vertebrados, que se modifican con el tiempo y el espacio. Por lo que es importante comprender el ensamble entre las especies de vectores y hospedadores, sus interacciones y fluctuaciones en tiempo y espacio (Diaz et al., 2013).

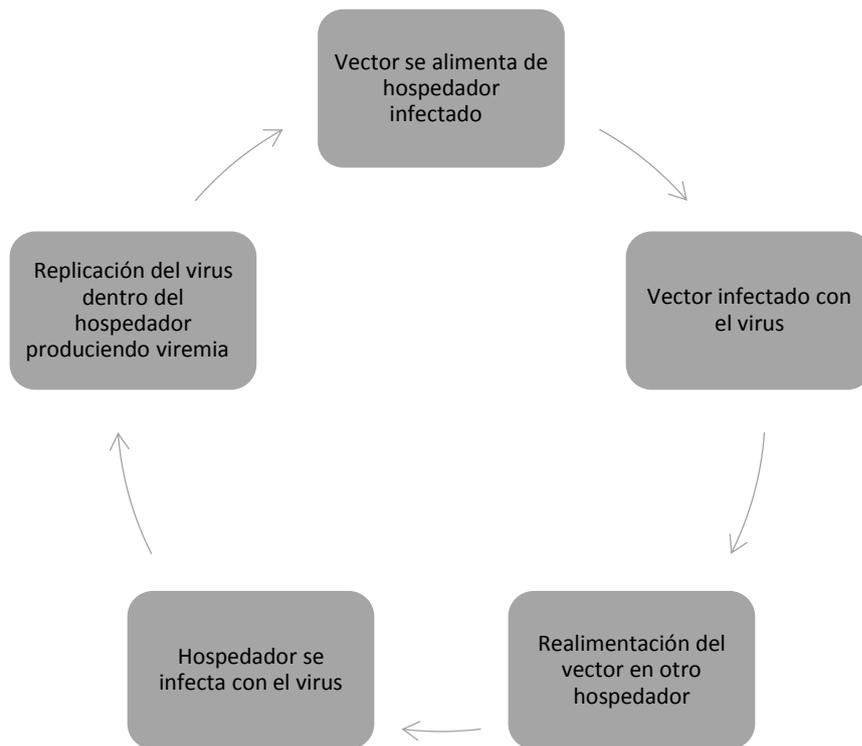


Figura 2. Esquema que representa el ciclo de transmisión de los arbovirus entre artrópodos que actúan como vectores y hospedadores susceptibles.

En cuanto a la clasificación de los arbovirus de mayor importancia sanitaria se agrupan en 3 familias: Flaviviridae, Togaviridae y Bunyaviridae. Estos, son transmitidos por una gran variedad de vectores como mosquitos y garrapatas entre otros (Arredondo-García et al., 2016).

Dichas familias corresponden a virus cuyos genomas son de ARN de diferentes longitudes y polaridades, segmentados y no segmentados. La longitud del genoma de los virus, junto con la baja fidelidad de sus ARN polimerasas permite un alto grado de heterogeneidad genética de estos, lo que les ofrece la capacidad de una rápida adaptación a nuevos sistemas ecológicos (Vasilakis et al., 2016).

Con respecto a la diversidad de los arbovirus, el último catálogo internacional ha enumerado más de 500 arbovirus de los cuales aproximadamente 150 causan enfermedades en humanos y/o animales. Para muchos de ellos solo existe información limitada con respecto a su vector y espectro del hospedador (Pfeffer & Dobler, 2010), por lo que es de gran importancia el abordaje de esta problemática identificando distintos escenarios de riesgo comprendiendo el ensamble entre el hospedador, el vector y el patógeno.

#### *1.1.1.1 Arbovirus del género Flavivirus*

La familia Flaviviridae actualmente consta de cuatro géneros: *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* y el recientemente género propuesto *Pegivirus*. Aunque los miembros de la familia tienen un gran rango de hospedadores que incluyen vertebrados e invertebrados, solo los miembros del género *Flavivirus* se conocen como arbovirus, que son transmitidos por mosquitos o garrapatas (Vasilakis et al., 2016).

El genoma de los Flavivirus tiene aproximadamente 11 kb de longitud, se trata de ARN monocatenario de polaridad positiva (Vasilakis et al., 2016). Contienen un único marco abierto de lectura (ORF) flanqueado por regiones no codificantes (NCR) cortas. La poliproteína codificada por el ORF se escinde para producir 3 proteínas estructurales presentes en los viriones maduros: la cápside (C), la proteína de membrana (M) derivada de su precursora prM y la proteína de la envoltura (E), y 7 proteínas no estructurales (NS) presentes en la células infectadas: la glicoproteína NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5 (Fig. 3) (Cook & Holmes, 2006).

Como se observa en la figura 4, la proteína C interactúa con la molécula de ARN para formar la nucleocápside. prM es procesada por una proteasa dando como resultado una proteína estructural M anclada a la envoltura. La envoltura viral consiste en una bicapa lipídica derivada de la célula infectada, con dímeros de la proteína de la envoltura en la superficie. La proteína E juega un papel fundamental en el tropismo celular, la virulencia y la inmunidad. En cuanto a las proteínas no estructurales, NS1 es expresada en la superficie celular de las células infectadas. NS3 tiene actividad serinoproteasa en el corte postraduccional y también tiene actividad de ARN helicasa y ARN trifosfatasa. Por estas funciones, la secuencia del gen NS3 es altamente conservada. La proteína NS5 está también muy conservada y sus funciones son de ARN polimerasa en la replicación viral y metiltransferasa en la metilación del cap 5' (Monath, 2001).

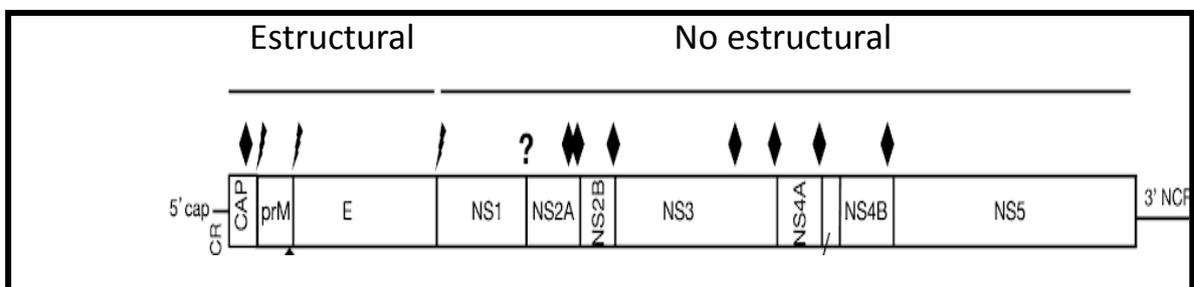


Figura 3. Esquema de la estructura genómica de los *Flavivirus* (Vasilakis N. et al., 2016).

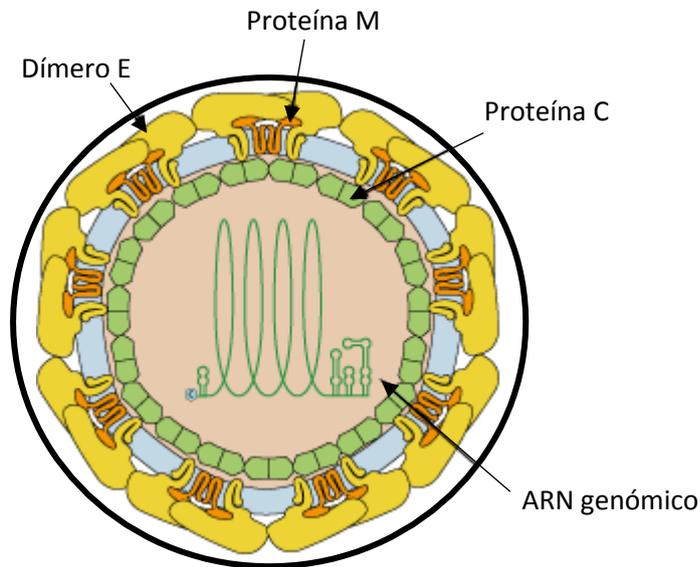


Figura 4. Representación de la disposición del material génico y las proteínas estructurales de los virus del género *Flavivirus*. Imagen tomada de Viral zone ([https://viralzone.expasy.org/24?outline=all\\_by\\_species](https://viralzone.expasy.org/24?outline=all_by_species)).

#### 1.1.1.2 Arbovirus del género *Alfavirus*

La familia *Togaviridae* incluye 3 géneros virales: *Alfavirus*, *Rubivirus* y *Arterivirus* (Westaway et al., 1985). Los virus del género *Alfavirus* fueron objeto de múltiples estudios en las décadas recientes debido, en gran medida, a su importancia como agentes causales de algunas zoonosis que han generado epizootias y epidemias recurrentes (Muñoz & Navarro, 2012), por lo que en este trabajo nos centramos en la búsqueda de virus de este género.

Los *Alfavirus* como todos los demás miembros de la familia *Togaviridae*, comprenden un genoma de ARN de polaridad positiva monocatenaria. Este genoma de es de aproximadamente 11-11.7 kb de longitud (Vasilakis et al., 2016).

El genoma de los *Alfavirus* (Fig. 5), puede subdividirse en dos regiones: la región subgenómica 5', que constituye dos tercios del genoma y codifica para

proteínas no estructurales (nsP1, nsP2, nsP3 y nsP4), estas proteínas cumplen funciones de replicasa/transcriptasa (Rupp et al ., 2015). La región subgenómica 3', representa un tercio del genoma y codifica para proteínas estructurales, los componentes polipeptídicos del virión maduro como se describen en la figura 6 (E1, E2, E3, C, y 6K) (Muñoz & Navarro, 2012). El pequeño péptido llamado 6K, no está presente en todos los viriones (Strauss & Strauss, 1986).

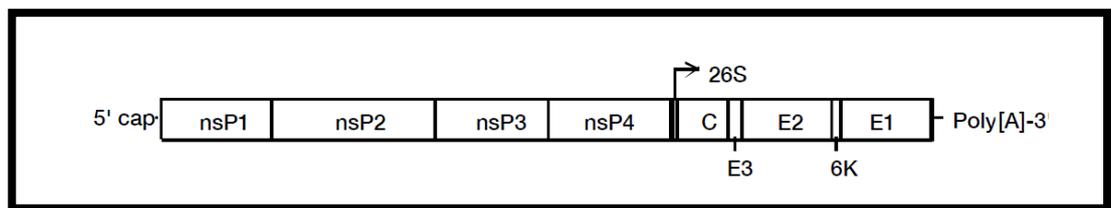


Figura 5. Esquema del genoma de los Alfavirus (Vasilakis et al., 2016).

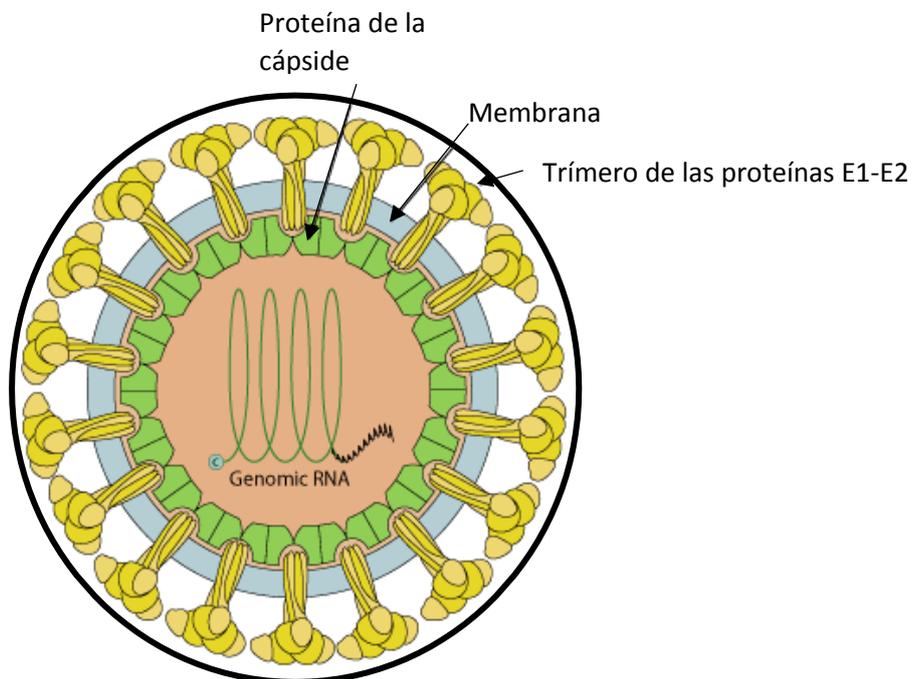


Figura 6. Representación de la disposición del material genético y las proteínas estructurales de los virus del género *Alfavirus*. Imagen tomada y modificada de Viralzone ([https://viralzone.expasy.org/24?outline=all\\_by\\_species](https://viralzone.expasy.org/24?outline=all_by_species)).

### 1.1.1.3 Arbovirus del género *Orthobunyavirus*

La familia Bunyaviridae está compuesta por cuatro géneros de virus que infectan animales (*Orthobunyavirus*, *Phlebovirus*, *Nairovirus* y *Hantavirus*) y uno que infecta plantas (*Tospovirus*) (Plyusnin & Elliott, 2011).

El género *Orthobunyavirus* comprende arbovirus zoonóticos que causan diferentes enfermedades, las cuales pueden incluir desde síntomas febriles hasta encefalitis (Barbosa, et al., 2017).

Como se observa en las figuras 7 y 8, los virus de este género poseen un genoma trisegmentado de ARN de cadena negativa. Este genoma comprende un segmento pequeño (S), uno mediano (M) y uno grande (L). Los segmentos son de 6,8 kb, 4,4 kb y 0,9 kb, organizándose de forma circular debido a la complementariedad de los extremos 5' y 3', lo que hace que puedan superponerse las secuencias y generar estructuras circulares cerradas de forma no covalente. Cada uno de los segmentos consiste en una región codificante que está flanqueada por regiones 3' Y 5' UTR. Las regiones UTR contienen los promotores que regulan la transcripción y la replicación del genoma viral. El segmento L codifica para la polimerasa viral y el segmento M expresa una poliproteína que es cotraduccional, esta es cribada y forma las glicoproteínas Gn, Gs y la proteína no estructural NS. El segmento S codifica dos proteínas, N y la proteína no estructural NS, que se traducen de marcos de lectura superpuestos en el mismo ARNm (Blakqori et al., 2012).

El segmento S del ARN de los *Orthobunyavirus* es el segmento más conservado del genoma y por lo tanto ese segmento se usa ampliamente para

la reconstrucción filogenética, detección del virus e incluso para aislamientos (Fernandes Cardoso, et al., 2015).

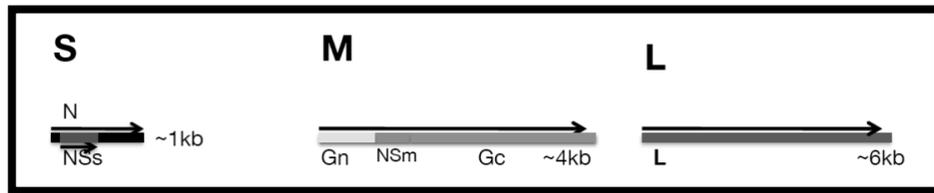


Figura 7. Esquema del genoma de los virus del género *Orthobunyavirus* (Vasilakis et al., 2016).

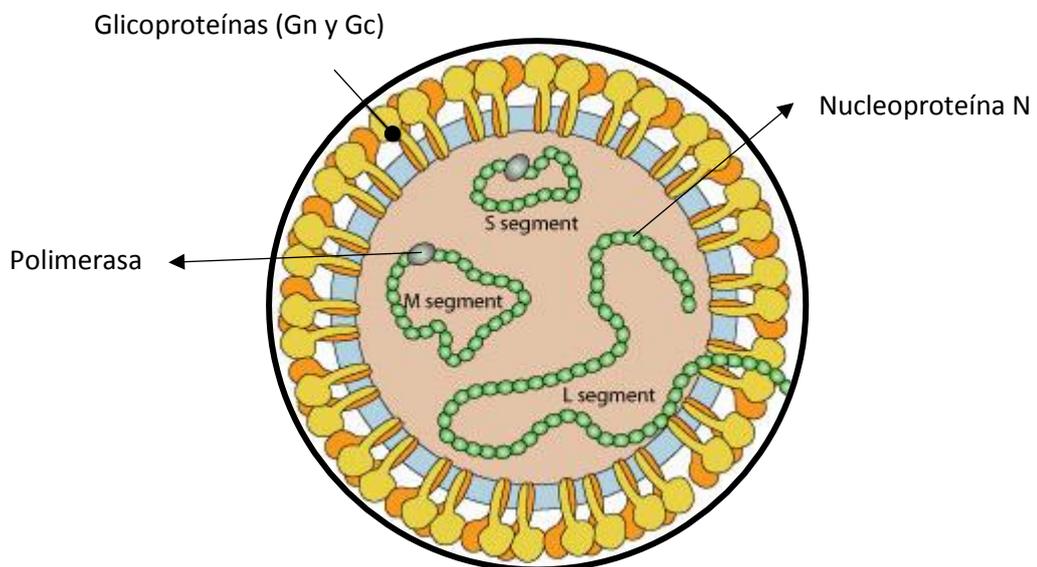


Figura 8. Representación de la disposición del material genético y las proteínas estructurales de los virus del género *Orthobunyavirus*. Imagen tomada de Viralzone ([https://viralzone.expasy.org/24?outline=all\\_by\\_species](https://viralzone.expasy.org/24?outline=all_by_species)).

## 1.2 Ectoparásitos y sus hospedadores

Para introducir el tema de la relación existente entre los ectoparásitos y sus hospedadores es importante definir el concepto de especificidad, que es uno de los principales atributos de los ectoparásitos y se relaciona con el número de especies hospedadoras explotadas por una población parásita (Poulin & Mouillot, 2005). Los ectoparásitos presentes en una sola especie hospedadora se denominan especialistas, mientras que aquellos hallados en diferentes especies de hospedadores son definidos como generalistas. Desde una perspectiva ecológica, la especificidad muestra la diversidad de recursos usados por el parásito (Poulin et al., 2006). Si nos centramos en la importancia sanitaria, en el caso de las especies generalistas se amplía la posibilidad de transmisión de patógenos, desde los animales que actúan como reservorios hacia animales domésticos y el hombre (Poulin & Mouillot, 2005).

En cuanto al ciclo de vida del ectoparásito, este puede tener un ciclo de vida directo cuando requiere de un solo hospedador para completar su ciclo de vida, o puede tener un ciclo de vida indirecto cuando requiere procesos de multiplicación y/o diferenciación en varios tipos de hospedadores (Poulin et al., 2006).

Para analizar el rol de los ectoparásitos como vectores en la transmisión de patógenos, tener éxito en las estrategias de control y prevención de las enfermedades que dichos patógenos provocan, se requiere del conocimiento completo de la biología, sistemática, y de la distribución geográfica y hospedatoria de las especies ectoparásitas en cuestión. Por esta razón, es fundamental la correcta identificación taxonómica de todas las especies involucradas en el sistema ectoparásito-patógeno-hospedador.

Si bien existen numerosos posibles hospedadores para los ectoparásitos, la fauna ectoparásita más rica y diversa se asocia a los roedores (Krasnov, 2006) por lo cual este sistema parásito-hospedador se toma usualmente como modelo para su estudio y, además, tiene importancia epidemiológica ya que los roedores son hospedadores de varios de los patógenos transmitidos por ectoparásitos (Marshall, 1981 ;Linardi & Guimarães, 2000).

Los roedores se diversificaron para aprovechar todos los ambientes terrestres dentro de su extensa distribución geográfica, ocupando un amplio gradiente altitudinal. El conocimiento es parcial para los géneros y especies. Este panorama describe ajustadamente la situación en Tucumán y toda la región noroeste de Argentina (NOA), en donde el conocimiento sobre la distribución de la mayoría de las especies es todavía muy incompleto. Los sigmodontinos están representados por algo más de 50 especies en el NOA, lo que constituye aproximadamente el 30% de los mamíferos registrados en esta región, mostrando una notable diversidad reunida en un área pequeña del continente (Jayat et al., 2018). Entre los géneros de roedores encontrados en el noroeste argentino se encuentran: *Akodon*, *Calomys*, *Necromys*, *Oligoryzomys*, *Phyllotis*, *Andinomys*, *Neotomys*, *Graomys*, *Tapecomys* (Jayat et al., 2008).

Los ectoparásitos que suelen parasitar a roedores se pueden clasificar en grupos principales: Orden: Phthiraptera (piojos), Orden Siphonaptera (pulgas) y Subclase Acari, que son divididos en los órdenes Mesostigmata (ácaros) e Ixodida (garrapatas) (Sponchiado et al., 2015).

### 1.2.1 Orden Phthiraptera

Los piojos se agrupan en varios subórdenes entre los que se destacan Anoplura (chupadores) y Mallophaga (masticadores) (Cortinas & Jones, 2006).

Los piojos son parásitos en todos sus estadios, por lo cual necesitan del hospedador en todo su ciclo de vida, pudiendo cumplirlo en un mismo individuo hospedador o en varios. Las hembras sexualmente maduras realizan la oviposición, los huevos (liendres) generalmente se encuentran adheridos al pelo o plumas del hospedador (Mullen & Durden, 2009). El primer estadio ninfal cumple con tres mudas o instares, hasta convertirse en adulto (Boyd & Reed, 2012).

#### 1.2.1.1 Importancia sanitaria

Los Anoplura parasitan estrictamente mamíferos, son los de mayor importancia sanitaria porque tienen la capacidad de transmitir una gran cantidad de patógenos como bacterias de los géneros *Borrelia*, *Rickettsia*, *Bartonella* y *Salmonella*. También pueden actuar como vectores de la viruela porcina, y posiblemente del virus del cólera (González et al., 2005; Boyd & Reed, 2012; Artiga et al., 2016;).

### 1.2.2 Orden Siphonaptera

Las pulgas pertenecen a la clase Insecta, e incluyen a la fecha más de 2500 especies y subespecies descritas, agrupadas en 16 Familias. La mayoría de las especies de pulgas, se asocian con hospedadores mamíferos, entre éstas, cerca del 75% se registraron parasitando a roedores, mientras que por otro lado

un porcentaje mucho más pequeño de la diversidad total de pulgas parasita aves (Withing et al., 2008). Para Argentina se conocen alrededor de 120 especies y subespecies (Sanchez, 2012; Lareschi et al., 2016).

Su ciclo de vida consta de un huevo, tres estadios larvales, pupa y adulto; es decir, realiza una metamorfosis completa que puede prolongarse durante tres semanas. El desarrollo del ciclo completo puede variar según la temperatura. Los huevos se encuentran generalmente en lugares donde el animal permanece más tiempo. La fase de larva no es parásita y usualmente se alimenta de *detritus* provenientes del hospedador, aunque algunas especies requieren de sangre para su crecimiento, la que obtienen de heces de pulgas adultas. Una vez completado el estadio, la larva teje un capullo y entra en una etapa de prepupa, para luego mudar a pupa. La emergencia del adulto del pupario se lleva a cabo como respuesta a determinadas vibraciones o a un aumento del dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Sin estos estímulos de emergencia, las pulgas pueden permanecer quiescentes durante mucho tiempo (Pullido Villamarín et al., 2016). Debido a los requerimientos para la alimentación mencionados previamente, los individuos adultos, tanto machos como hembras, se encuentran altamente especializados a la vida hematófaga obligada, en cambio, los huevos, larvas y pupas se desarrollan en el suelo (Linardi & Guimarães, 2000).

#### *1.2.2.1 Importancia sanitaria*

Desde el punto de vista epidemiológico, los sifonápteros son importantes como parásitos propiamente dichos, como hospedadores intermediarios y como vectores de patógenos (Linardi & Guimarães, 2000).

Todas las especies de pulgas parasitan animales y pueden picar a los humanos como hospedadores alternativos, ya que muchas especies poseen baja especificidad. Algunas especies pueden actuar en la transmisión de bacterias, entre las que se incluyen *Yersinia pestis*, *Bartonella henselae* y los géneros *Rickettsia* y *Borrelia* (Bitam et al., 2010; Baneth, 2014).

En cuanto a los virus que pueden ser transmitidos por las pulgas, no existen muchos antecedentes, pero se ha reportado en Australia que la pulga del conejo europeo actúa como vector del virus Mixoma que pertenece a la familia de virus de ADN bicatenario Poxviridae (Shepherd & Edmonds, 1977). Además, se cree que las pulgas son los vectores más probables del virus de la viruela aviar en las colonias de pingüinos de Magallanes en nuestro país (Kane, et al., 2012).

### 1.2.3 Subclase Acari

En esta tesis nos centramos en ácaros del Superorden Anactinotrichida, debido a que comprende órdenes de gran importancia sanitaria y que pueden parasitar a los roedores, como los órdenes Ixodida (garrapatas) y Mesostigmata (ácaros) (Balashov, 2006).

#### 1.2.3.1 Orden Ixodida

Las garrapatas son ectoparásitos de los vertebrados y se alimentan de la sangre de sus hospedadores. Se han descrito más de 800 especies de garrapatas que se dividen en tres familias: Argasidae, Ixodidae y Nuttalliellidae.

Las familias que contienen las especies con impacto en la salud pública y la de los animales corresponden a las familias Argasidae e Ixodidae (Venzal et al., 2003).

Las garrapatas buscan una fuente de sangre entre la primavera y el otoño, por lo general, en días cálidos y soleados. Suben a la vegetación y esperan a que pase un animal. El dióxido de carbono emitido por el animal atrae a las garrapatas (Gritsun et al., 2003). Muchas garrapatas, tanto duras (Ixodidae) como blandas (Argasidae), explotan sus huéspedes por un corto período de tiempo (horas o días) durante la toma de sangre y su supervivencia depende por lo tanto fuertemente de su capacidad para hacer frente a la condición del entorno abiótico durante el período fuera del hospedador (McCoy et al., 2013).

Durante el desarrollo de las garrapatas se pueden observar cuatro estadios de desarrollo: huevo, larva (6 patas), ninfas (8 patas) sexualmente inmaduras y adultos sexualmente maduros (8 patas). Luego de un periodo de alimentación, la hembra adulta ingurgitada (llena de sangre), cae al suelo para realizar la oviposición (Pullido Villamarín et al., 2016).

La fauna argentina de garrapatas, actualmente se compone de al menos 39 especies, siendo el género *Amblyomma* el más numeroso con 24 especies (Lamattina et al., 2018).

#### 1.2.3.1.1 Importancia sanitaria

Las garrapatas transmiten más variedad de agentes patógenos que cualquier otro grupo de artrópodos luego de los mosquitos. Los agentes patógenos generalmente, son transmitidos a través de la saliva en el momento

en que se alimenta (Faccioli, 2011). Los patógenos transmitidos por garrapatas incluyen bacterias, protozoos y virus (Maruyama, et al., 2014).

En cuanto a las bacterias transmitidas por este grupo de artrópodos, para nuestro país se ha informado la presencia del ADN de *Bartonella* spp, *Rickettsia rickettsii* (agente causal de fiebre manchada), *Rickettsia parkeri* y *Rickettsia massiliae* (Cicuttin et al., 2017).

En cuanto a los virus transmitidos por garrapatas, se sabe que éstos tienen un impacto significativo en la salud de humanos y la de los animales. Ellos son responsables de algunas de las enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes más graves de las que enfrenta el mundo hoy y que ocurren con frecuencia en forma epidémica (Wesula Lwande, et al., 2013). Entre ellos se pueden citar el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBEV), el cual se mantiene en un ciclo que involucra garrapatas y hospedadores vertebrados silvestres. Las garrapatas permanecen infectadas durante todo su ciclo de vida y transmiten el virus a garrapatas no infectadas cuando se alimentan simultáneamente del hospedador (Gritsun et al., 2003). También se halló el virus de Langat (LGTV), que fue aislado en Malasia y Tailandia de pools de garrapatas, el virus Louping Ill (LIV) es el único *Flavivirus* que se conoce por estar presente en el Reino Unido y el *Flavivirus* Powassan (POWV) que circula en Dakota del Sur, el Oeste de Estados Unidos, oeste de Canadá y Siberia (Gritsun et al., 2003). Cabe destacar que los virus mencionados corresponden a hallazgos del hemisferio Norte, en el hemisferio sur, hasta el momento, no hay registro de circulación de ellos.

### 1.2.3.2 Orden Mesostigmata

El orden Mesostigmata comprende un grupo de ácaros que incluye una gran diversidad de parásitos de vertebrados, simbioses de insectos, que son en su mayor parte depredadores de vida libre (Moghadam & Saboori, 2015).

Se alimentan de sangre, linfa, restos dérmicos y secreciones sebáceas que ingieren al perforar el tegumento, por lo que causan gran irritación, mientras pueden actuar en ese proceso, además, como vectores de diversos patógenos afectando a animales domésticos, silvestres y humanos (González et al., 2005).

Este orden incluye una gran cantidad de familias entre las cuales se destacan algunas de ellas por su importancia sanitaria como son las familias Dermanyssidae, Macronyssidae y Laelapidae (Lareschi et al., 2017).

El ciclo de vida de los ácaros puede durar cuatro semanas, incluyendo uno o varios estadios: huevo (eclosiona en 4 a 6 días), prelarva (3 a 6 días), larva (3 a 5 días), protoninfa (4 a 5 días), deutoninfa (6 a 10 días), tritoninfa y adulto. Las larvas o estadios juveniles solo presentan tres pares de patas, mientras que las protoninfas, ninfas y adultos presentan cuatro pares de patas (Mullen & Durden, 2009).

El desarrollo de huevo a adulto puede durar de 2 a 3 semanas. Los huevos pueden ser depositados externamente o son mantenidos en el útero de la hembra hasta la eclosión (Pullido Villamarín et al., 2016).

#### 1.2.3.2.1 Importancia sanitaria

Este tipo de ectoparásitos pueden producir anemia en sus hospedadores, dermatitis intensa y en individuos sensibles reacciones alérgicas importantes. Son vectores de virus, bacterias, protozoos y helmintos que afectan a la salud humana y animal (González et al., 2005).

Varios autores han demostrado que la Familia Dermanyssidae está implicada en la transmisión de bacterias de los géneros *Salmonella*, *Rickettsia*, *Francisella*, *Borrelia*, *Pasteurella*, *Yersinia*, *Coxiella* y *Listeria*. Estos ácaros, además, pueden transmitir diversos virus. Entre ellos se pueden mencionar *Alfavirus* como el virus de la encefalitis equina del Este y del Oeste, así como también la forma venezolana. También se los encontró actuando como vectores de *Flavivirus* como el virus de la encefalitis de San Luis, el virus West Nile y la encefalitis transmitida por garrapatas (Moro et al., 2005).

En Argentina se estudió el ácaro *Ornithonyssus bursa* (Berlese) (Mesostigmata: Macronyssidae) que es considerada una plaga de aves de corral que causa infestaciones importantes en pollos y se considera un vector potencial de arbovirus. Evaluaron presencia de virus de los géneros *Alfavirus*, *Flavivirus* y *Bunyavirus* en los ácaros, sin hallar ninguno de los géneros virales en sus muestras (Santillán, et al., 2015).

Como se mencionó previamente, si bien en el noroeste del país se intensificaron los estudios en los últimos años, ampliando el conocimiento de los ectoparásitos asociados a roedores del área, aún quedan zonas donde falta estudiar la fauna ectoparásita de mamíferos y su rol como vectores de patógenos (López Berrizbeitia et al., 2013). Tal es el caso de la provincia de Tucumán,

donde hasta la fecha, no existen estudios sobre circulación de arbovirus de los géneros *Alfavirus*, *Flavivirus* y *Orthobunyavirus* en ectoparásitos de roedores, por lo que este trabajo contribuye al conocimiento de los patógenos asociados a la fauna ectoparásita de los roedores, ayudando a comprender la dinámica de algunas zoonosis que son emergentes o re- emergentes y aportando datos para entender escenarios de transmisión que no están siendo contemplados/analizados actualmente.

## **2. Hipótesis**

Los roedores presentan una gran diversidad de ectoparásitos y los mismos están infectados con agentes virales de los géneros *Flavivirus*, *Alfavirus* y *Orthobunyavirus*.

## **3. Objetivos**

### **3.1 General**

El objetivo general del presente trabajo final de grado es conocer la fauna ectoparasitaria asociada a los roedores de la provincia de Tucumán y analizar su rol como potenciales vectores de agentes virales de los géneros *Flavivirus*, *Alfavirus* y *Orthobunyavirus*.

### **3.2 Específicos**

- a) Detectar ectoparásitos de importancia sanitaria colectados en roedores de Tucumán y estudiar su rol como potenciales vectores de agentes virales del género *Flavivirus*, *Alfavirus* y *Orthobunyavirus*.
  
- b) Establecer una nueva metodología de trabajo que permita la colecta y conservación de ectoparásitos para posteriores análisis virales.

#### 4. Materiales y métodos

##### 4.1 Captura de roedores, identificación y colecta de sus ectoparásitos.

La captura de los roedores fue realizada en el marco de un brote de Hantavirus los días 25, 26, 27 y 28 de abril de 2016 por personal del Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas “Dr. Julio I. Maiztegui” (INEVH) en el departamento de Burruyacú en la provincia de Tucumán. Burruyacú es un departamento ubicado en la región noreste de la provincia de Tucumán. Es el departamento más grande de la provincia en términos de extensión territorial, pero el que posee menor densidad poblacional. Dentro de este departamento, fueron muestreadas algunas localidades: El Chañar, El Naranjo, La Ramada y Marino (Fig.9).

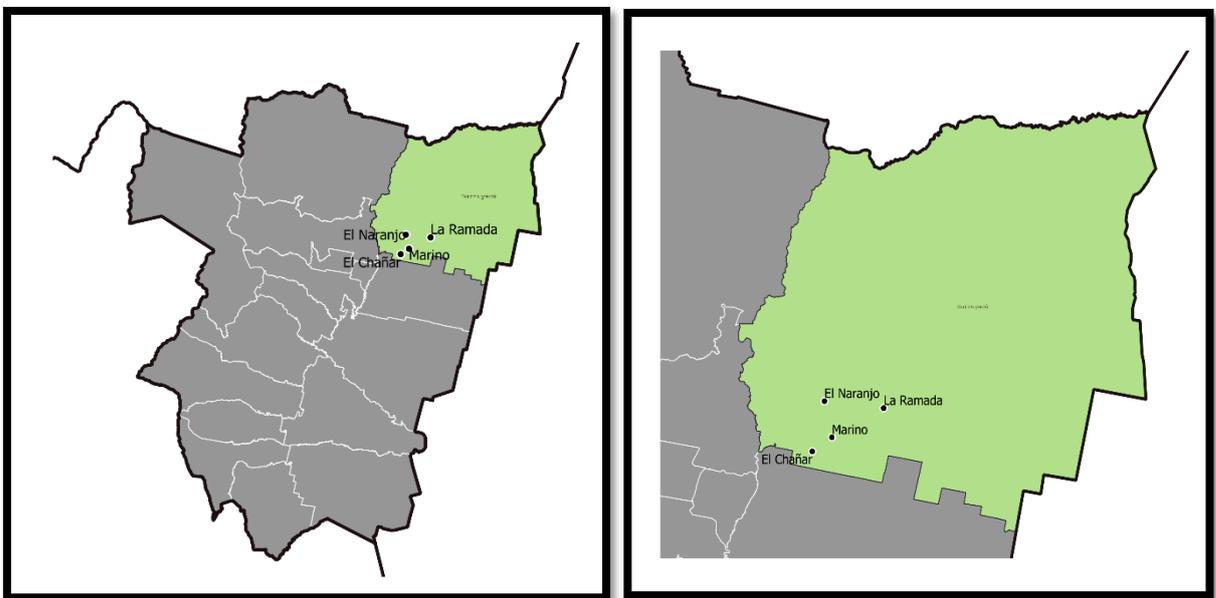


Figura 9. Mapa de la provincia de Tucumán en el cual se encuentra destacado en tono verde el departamento de Burruyacú. Se indican en el

departamento las localidades muestreadas: El Chañar, El Naranjo, Marino y La Ramada.

En los sitios seleccionados para el muestreo quedaron representados los ambientes colindantes a todos los cultivos que se desarrollaban en el área (caña de azúcar, caña forrajera, soja, maíz, cítricos, nogales).

En el sitio de captura se colocaron un total de 1.077 trampas. Se usaron trampas de captura viva de tipo Sherman como las mostradas en la figura 10, permaneciendo activas 1.040 trampas.



Figura 10. Trampas Sherman para la captura de los roedores.

Luego de la revisión de las trampas, los animales capturados fueron trasladados al laboratorio de campo.

La identificación de los roedores capturados fue realizada por personal del Instituto Maiztegui. La misma se realizó a campo, tomando diversos datos morfométricos como el largo total, el largo de la cola, de las orejas, etc., que permiten distinguir entre los distintos géneros de roedores. La conservación en el campo y el transporte de los roedores se llevó a cabo en termos de nitrógeno

líquido hasta su arribo al INEVH en la ciudad de Pergamino donde fueron conservados a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Una vez en el laboratorio, con los roedores conservados a  $-70^{\circ}\text{C}$ , se puede llevar a cabo luego de la identificación de roedores por caracteres morfométricos, complementariamente, la identificación molecular a nivel de especie de los roedores. Para llevarlo a cabo, se utilizó el gen mitocondrial b de la citocromo oxidasa. Este, permite realizar la identificación molecular a nivel de especie debido a la existencia de un gran número de copias de ADN mitocondrial por célula, a su rápida tasa de evolución, a la baja variabilidad intraespecífica y alta variabilidad entre especies (Arif & Khan, 2009). La metodología empleada fue la extracción de ADN a partir de muestras de tejidos, mediante el kit comercial DNeasyBlood and Tissue (QIAGEN). La amplificación del gen mitocondrial b de la citocromo oxidasa se realizó a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando el par de cebadores Mus14095/Mus15398 (Gonzalez-Iltig, et al., 2009). Los productos amplificados se secuenciaron en el equipo 3100- Avant GeneticAnalyzer (AppliedBiosystems) del instituto Maiztegui. Se utilizaron secuencias de referencia para la identificación de especímenes de los géneros *Akodon* y *Calomys*.

De los roedores capturados y conservados a  $-70^{\circ}\text{C}$ , se colectaron sus ectoparásitos examinando cuidadosamente la piel o pelaje del hospedador, se utilizaron fórceps, pinzas de punta fina y/o agujas de disección. Complementariamente a este procedimiento, se realizó un cepillado vigoroso para tener la seguridad de que se estaba colectando la totalidad de los ectoparásitos.

## 4.2 Procesamiento de ectoparásitos, identificación y armado de *pools*

Los ejemplares de ectoparásitos fueron identificados taxonómicamente. Para llevar a cabo la identificación se revisaron las descripciones originales de especies y subespecies y se compararon los ejemplares con aquellos depositados en las colecciones de referencia. La descripción de la morfología general incluye: estructuras de la cabeza, tórax, patas, abdomen, y la genitalia, tanto de la hembra como del macho de cada especie en detalle, teniendo en cuenta aquellas de valor diagnóstico. En este caso, se utilizaron las claves Furman (1972) en el caso de los ácaros, Boero (1957) para las garrapatas, Johnson (1957) para las pulgas y Johnson (1972) y Durden y Musser (1994) para los piojos. Estas identificaciones se realizaron bajo lupa estereoscópica con el uso de una platina fría. Los ectoparásitos fueron identificados sólo a nivel de familia dado que para lograr una identificación a nivel de género y/o especie los mismos deben ser preparados siguiendo técnicas que no permiten el posterior análisis molecular de detección de virus.

Los ejemplares previamente identificados fueron colocados en tubos tipo *ependorf* de 1,5 mililitros (ml) conformando un *pool*. Cada *pool* contenía entre 1 y 50 ejemplares. Los *pool*es fueron constituidos con aquellos ejemplares de la misma familia que se hallaban presentes en el mismo género de roedor capturados en un sitio determinado. Los *pools* fueron macerados con pilones de plásticos estériles en tubos tipo *ependorf*. Luego, a cada tubo se les añadió 0,5 ml del diluyente de la muestra que contenía albúmina bovina (0,75%), penicilina + estreptomicina (1%), fungizona (1%) y solución buffer fosfato (PBS) a pH 7,4 y se continuó macerando. Finalmente, se agregó nuevamente 0,5 ml del diluyente y se continuó con el macerado durante 2 minutos más. La suspensión resultante

fue centrifugada a 13.200 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se trasvasó a crioviales rotulados y dicha suspensión fue conservada a -70°C para su posterior análisis molecular.

### **4.3 Extracción del ARN total a partir de los *pools* de ectoparásitos**

Se realizó la extracción de ARN a partir de la suspensión de ectoparásitos. Esta se llevó a cabo mediante la técnica de Trizol (*Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA*). La función de este, es la desnaturalización de proteínas y ruptura de las estructuras celulares. La solución resultante luego del agregado de 900 *ul* de Trizol se homogeneizó y se dejó reposar a temperatura ambiente. Seguidamente, a cada muestra se le agregó cloroformo frío, para permitir la separación de la solución en una fase acuosa, donde se encontraba el ARN, y una interfase donde se encontraban los restos de proteínas. Las muestras se agitaron nuevamente y se dejaron reposar durante 2 minutos. Posteriormente, se centrifugó en frío a 13.200 rpm durante 15 minutos. La fase acuosa fue trasvasada a un nuevo tubo *ependorf* estéril evitando tocar la interfase. Se le adicionó isopropanol frío para deshidratar el ARN, se mezcló por inversión y se incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Seguidamente se centrifugó en frío durante 10 minutos. El sobrenadante se descartó por inversión. Posteriormente, se logró la precipitación del ARN por el agregado de etanol a 4°C seguido de centrifugación en frío de 1 minuto. El sobrenadante fue descartado por inversión y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Por último, el ARN se rehidrató con 20  $\mu$ l de agua despirogenada libre de ARNasa y se agitó suavemente para favorecer la re-suspensión del ARN. Las muestras fueron almacenadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior utilización.

Es importante destacar que todos los *pools* fueron procesados en gabinetes de seguridad biológica, los procedimientos de extracción del ARN viral y la posterior reacción de reacción en cadena de la polimerasa, en este caso *RT-PCR* y *RT-nested-PCR* se realizaron en gabinetes de seguridad biológica y ambientes diferentes para minimizar el riesgo de contaminaciones.

#### **4.4 Amplificación del genoma viral por RT-Nested- PCR para la detección de virus de los géneros *Alfavirus* y *Flavivirus***

Para la detección y amplificación del genoma de virus de los géneros *Flavivirus* y *Alfavirus* en los ectoparásitos obtenidos se utilizó la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) modalidad anidada, tras retrotranscripción de la muestra (*RT-Nested-PCR*). El fundamento de esta técnica consiste en una primera reacción (1<sup>er</sup> ciclo) en la cual el ARN viral se convierte en ADN complementario o copia (ADNc) mediante la acción de una transcriptasa reversa y éste, luego, se somete a varios ciclos de amplificación utilizando oligonucleótidos iniciadores específicos (cebadores).

Como se muestra en el esquema de la figura 11, el ADN amplificado en la primera reacción (1<sup>o</sup>ciclo) es sometido a una segunda reacción de amplificación (2<sup>o</sup>ciclo) utilizando cebadores internos. Con esta segunda amplificación se aumenta la especificidad y sensibilidad de la técnica.

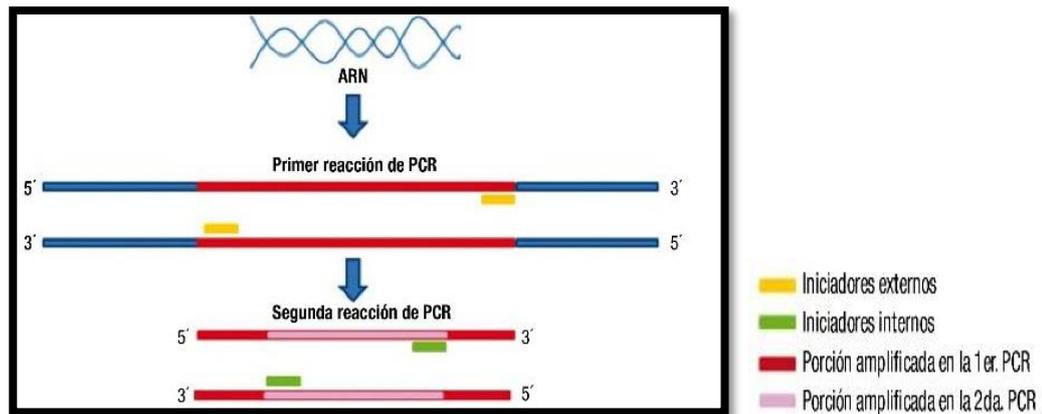


Figura 11. Diagrama de los fragmentos amplificados por cada par de cebadores.

La región que amplifican los cebadores internos y específicos corresponden a una porción del gen de la polimerasa viral NS5 en el caso de los *Flavivirus* y, el gen nsP4 en el caso de los *Alfavirus*, ambas regiones son altamente conservadas. Los cebadores permiten de esta manera amplificar el genoma de una gran diversidad de *Flavivirus* y *Alfavirus* presentes en las muestras (Sanchez-Seco et al., 2001, 2005). En la Tabla I se describe la secuencia de los cebadores utilizados.

En todos los casos, se usaron controles positivos que validen los ensayos. En este caso, como control positivo, en todas las reacciones de amplificación, se utilizó ARN puro extraído del virus Dengue y del virus Chikungunya para *Flavivirus* y *Alfavirus* respectivamente. Como control negativo se usó agua destilada.

Como se mencionó previamente, para evitar contaminaciones la preparación de la mezcla de reactivos se realizó en gabinete de seguridad biológica en un área del laboratorio diferente de aquella donde se añadió el ARN de las muestras, o el ADNc molde, para la realización del 2º ciclo.

Los reactivos en sus respectivas concentraciones para ambos ciclos se describen en las tablas II y III. Las condiciones del ciclado se describen en la tabla IV.

En todos los procesos de amplificación se utilizaron termocicladores marca MyCycler™ Bio Rad y tubos de reacción de 0,2 ml estériles, libres de DNAsas y RNAsas.

Tabla I. Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados en la reacción *RT-Nested-PCR* para la amplificación de genomas de *Alfavirus* y *Flavivirus* (Sanchez-Seco et al., 2001, 2005) en los dos ciclos de PCR.

Género viral	Diana	Cebadores	Secuencia de los cebadores	Productos
<i>Alfavirus</i>	nsP4	ALFA +1	5' GAYGCITAYYTIGAYATGGTIGAIGG-3'	Primera reacción: 481 pb
		ALFA -1	5' CKYTCYTCIGTRTGYTTGTICCI GG-3'	
		ALFA +2	5' GGIAAYTG YAAYGTIACICARATG-3'	Segunda reacción: 195 pb
		ALFA-2	5' GCRAAIARIGCIGCIGCYTYIGGICC-3'	
<i>Flavivirus</i>	NS5	FLAVI +1	5' GAYYTIGGITGYGGIIGGGIRGITGG-3'	Primera reacción: 1385 pb
		FLAVI -1	5' TCCAICCGCIRTRTCRTCIGC-3'	
		FLAVI +2	5' YGYRTIYAYAWCAYSATGGG-3'	Segunda reacción: 143 pb
		FLAVI -2	5' CCARTGITCYKYRTTIAIRAAICC-3'	

El número 1 corresponde a los cebadores utilizados en el 1<sup>er</sup> ciclo y el número 2 a los utilizados en el 2<sup>do</sup> ciclo. El signo “+” corresponde al sentido genómico (5' → 3') y el “-” al antisentido de los cebadores (3' → 5')

Tabla II. Reactivos y volúmenes utilizados en la reacción *RT-Nested-PCR* para la detección de genomas de *Flavivirus* y *Alfavirus* en el 1<sup>er</sup> ciclo:

Reactivos	Volumen/ muestra
H <sub>2</sub> O	16,06µl
Buffer (10X)	3 µl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1,1 µl
dNTP's (A, T, C, G) (20mM)	4 x 0,3 µl
Taq (5U/µl)	0,24 µl
RT (21µg/µl)	0,4 µl
Cebadores <i>Alfavirus</i> (100ng/µl)	2 x 1 µl
Cebadores <i>Flavivirus</i> (100ng/µl)	2 x 2 µl
ARN molde	2 µl
Reacción total	30 µl

Tabla III. Reactivos y volúmenes utilizados en la reacción *RT-Nested-PCR* para la detección de genomas de *Flavivirus* y *Alfavirus* en el 2<sup>do</sup> ciclo:

Reactivos	Volumen/ muestra
H <sub>2</sub> O	17,46µl
Buffer (10X)	3 µl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	1,1 µl
dNTP's (A, T, C, G) (20mM)	4 x 0,3 µl
Taq (5U/µl)	0,24 µl
Cebadores <i>Alfavirus</i> (100ng/µl)	2 x 1 µl
Cebadores <i>Flavivirus</i> (100ng/µl)	2 x 2 µl
ADNc	1 µl
Reacción total	30 µl

Tabla IV. Condiciones de ciclado utilizadas.

1 <sup>er</sup> ciclo = 42°C 45' + 94°C 2' + [ 94°C 30'' + 47°C 1' + 72°C 1'15'' ] x 40 + 72°C 5'
2 <sup>do</sup> ciclo = 94°C 2' + [94°C 30'' + 47°C 3' + 72°C 30'' ] x 40 + 72°C 5'

También se utilizó la PCR genérica para la detección de *Flavivirus* descrita por Kuno y colaboradores (1998). En este caso, a diferencia de la descrita anteriormente, no es anidada. Para este procedimiento, los cebadores se

utilizaron para amplificar las regiones genómicas de cerca de 1 kb de longitud que se encuentran en el extremo 3' del gen NS5 (Tabla V).

Tabla V. Secuencia de los cebadores para la detección de *Flavivirus*.

Género viral	Diana	Cebadores	Secuencia de los cebadores	Productos
<i>Flavivirus</i>	extremo 3' del gen NS5	FU1	5' TACAACATGATGGGAAAGAGAGAGAA- 3'	1000 pb
		cFD3	5' AGCATGTCTTCCGTGGTCATCCA 3'	

Tabla VI. Reactivos y volúmenes utilizados en la reacción de RT-PCR para la detección de genomas de *Flavivirus*.

Reactivos	Volumen/ muestra
H <sub>2</sub> O	19,65 µl
Buffer (10X)	3,3 µl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0.9 µl
dNTP's (mix)	0,6 µl
DTT (0.1M)	1,5 µl
RNAsin	0,05 µl
Primer (100 uM)	2 x 0,3 µl
Taq (5U/ul)	0,3 µl
RT (SSIII)	0.1 µl
ARN	3 µl
<u>Reacción total</u>	30 µl

Tabla VII. Condiciones de ciclado usadas para la detección de virus del género *Flavivirus* descrita por Kuno et al 1998.

<p>50°C 60'' + 94°C 2' + [ 94°C 20'' + 45°C 1' + 68°C 1'] x 3 + [ 94°C 20'' + 50°C 30'' + 68°C 1'] x 10 + [ 94°C 20'' + 50°C 30'' + 68°C 1'] x 16 + 68°C 5' + 4°C</p>
---

#### 4.5 Amplificación del genoma viral por RT-PCR para la detección de virus del género *Orthobunyavirus*

Esta reacción no es anidada, y se realizó, amplificando un fragmento de 251 pb del segmento S usando los cebadores BCS82C y BCS332V. Las secuencias se encuentran descritas en la Tabla VIII (Kuno et al., 1996).

Tabla VIII. Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados en la reacción de PCR para la amplificación de genomas de virus del género *Orthobunyavirus*.

Género viral	Diana	Cebadores	Secuencia de los cebadores	Producto
<i>Orthobunyavirus</i>	Segmento S	BCS82C	5'ATGACTGAGTTGGAGTTTCATGATGTCGC-3'	251 pb
		BCS332V	5'GAATATCAGCTTTGGGTGTTGRTG-3'	

En la Tabla IX, se describen los reactivos utilizados y sus volúmenes para la RT-PCR usada para la detección de virus del género *Orthobunyavirus*.

En este caso, como control positivo, en todas las reacciones de amplificación, se utilizó ARN puro extraído del virus Maguarí y como control negativo se utilizó agua destilada.

Tabla IX. Reactivos y volúmenes necesarios para realizar la RT-PCR para la detección de virus del género *Orthobunyavirus*.

Reactivos	Volumen/muestra
H <sub>2</sub> O	19,35 µl
Buffer (10X)	3,3 µl
MgCl <sub>2</sub> (50mM)	0,9 µl
dNTP's (mix)	0,6 µl
DTT (0,1 M)	1,5 µl
RNAsin	0,05 µl
Primer (100 uM)	2 x 0,3 µl
Taq (5U/ul)	0,3 µl
RT (21µg/µl) (3U)	0,4 µl
ARN	3 µl
Reacción total	30µl

Tabla X. Condiciones de ciclado para la detección de *Orthobunyavirus*.

$45^{\circ}\text{C } 60'' + 94^{\circ}\text{C } 2' + [ 94^{\circ}\text{C } 20'' + 45^{\circ}\text{C } 1' + 72^{\circ}\text{C } 1'] \times 3 + [ 94^{\circ}\text{C } 20'' + 50^{\circ}\text{C } 30'' + 72^{\circ}\text{C } 1'] \times 10 + [ 94^{\circ}\text{C } 20'' + 50^{\circ}\text{C } 30'' + 72^{\circ}\text{C } 1'] \times 16 + 72^{\circ}\text{C } 5' + 4^{\circ}\text{C}$
---

#### 4.6 Visualización de los productos de amplificación

Los productos de la reacción de RT-PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, separando los fragmentos de ácidos nucleicos de distinto tamaño mediante la migración a diferente velocidad según su peso molecular al ser sometidos a una corriente eléctrica.

Se prepararon los geles usando 100 ml de buffer tris-acetato-EDTA (TAE) 1X, 2 gr de agarosa, se agregó 10  $\mu$ l de SYBR  $\text{\textcircled{R}}$  Safe10.000 X (*Invitrogen Eugene, Oregon, USA*) al 10%, se mezcló, se vertió en la cama de electroforesis y se dejó solidificar por 30 minutos. A cada muestra se le agregó 3  $\mu$ l de la solución de carga al 1% que contenía azul de bromofenol, glicerol y agua. Luego, se sembraron 30  $\mu$ l en cada calle del gel. Para que pueda determinarse el tamaño de los fragmentos en la muestra de RT-PCR, el marcador de peso molecular empleado fue un patrón de ADN comercial de 1kb Plus DNA Ladder (*Invitrogen, Eugene, Oregon, USA*) a una concentración de 100 nanogramos/ $\mu$ l.

La electroforesis se desarrolló en una solución de buffer TAE 1X y el proceso se llevó a cabo con una intensidad de corriente eléctrica de 80 voltios durante aproximadamente 60 minutos, visualizándose los productos de amplificación con transiluminador.

Las bandas que se correspondían con un resultado positivo fueron cortadas y conservadas a -20°C hasta su posterior purificación y secuenciación genómica.

## 5. Resultados

### 5.1 Captura de los roedores y obtención de los *pools* de ectoparásitos

En total se examinaron 94 roedores que fueron cepillados con el fin de obtener la totalidad de ectoparásitos que se hallaban en su pelaje. Del total de animales examinados, se realizó la identificación a campo a nivel de género por caracteres morfométricos y 19 pertenecieron al género *Calomys* (20 %) y 75 al género *Akodon* (80%) (Fig 12). A fin de detectar la presencia de *Calomys* fecundus (roedor de la zona muestreada que actúa como hospedador natural de Hantavirus) dentro de la muestra de roedores examinados, se seleccionaron 6 roedores con características morfométricas compatibles a dicha especie. Solo estos roedores fueron caracterizados molecularmente hasta el nivel de especie por amplificación del gen mitocondrial b de la citocromo oxidasa, obteniendo como resultado que 5 roedores pertenecieron a la especie *Calomys boliviae* y 1 a la especie *Calomys musculinus*. En los 5 roedores de la especie *Calomys boliviae* se hallaron pulgas de la Familia Stephanocircidae y ácaros de la Familia Laelapidae, en el roedor de la especie *Calomys musculinus* no se hallaron ectoparásitos.

Del total de los 94 hospedadores capturados se obtuvieron 184 ectoparásitos, de los cuales 143 pertenecieron a ácaros de la Familia Laelapidae, 11 a pulgas de la Familia Stephanocircidae, 3 garrapatas de la Familia Ixodidae y 27 a piojos de la Familia Hoplopleuridae (tabla XI).



Figura 12. Imágenes de roedores de los géneros A) *Calomys* y B) *Akodon*.

A partir del total de los ectoparásitos colectados pudieron constituirse 51 *pools* de ectoparásitos, de los cuales 10 pertenecieron a pulgas de la Familia *Stephanocircidae*, 3 a garrapatas de la Familia *Ixodidae*, 34 a ácaros de la Familia *Laelapidae* y 4 a piojos de la Familia *Hoplopleuridae*.

Tabla XI. Número de roedores de cada género con su correspondiente género y número de ectoparásitos obtenidos

Número de roedores analizados de cada especie	Tipo de ectoparásito y familia a la que pertenece	Nº de ejemplares
<i>Calomys</i> sp. (19)	Ácaros (Familia Laelapidae)	51
	Pulgas (Familia Stephanocircidae)	4
	Garrapatas (Familia Ixodidae)	2
	Piojos (Familia Hoplopleuridae)	13
<i>Akodon</i> sp. (75)	Ácaros (Familia Laelapidae)	92
	Pulgas (Familia Stephanocircidae)	7
	Garrapatas (Familia Ixodidae)	1
	Piojos (Familia Hoplopleuridae)	14
Total de ectoparásitos colectados		184

## 5.2 Prevalencia de infestación según el sexo

Existen estudios previos en los que se evaluó la existencia de prevalencia de infestación de los roedores con ectoparásitos dependiendo de su sexo (Zuk & McKean, 1996; Sponchiado et al., 2016).

Como se ve en la tabla XII, en el caso de los ácaros y los piojos, los cuales representan la mayor abundancia, no se observa gran diferencia de porcentajes entre la cantidad de ectoparásitos hallados en roedores hembras y machos, al contrario de lo que fue observado en las pulgas y garrapatas donde la mayor abundancia se observa en machos.

Tabla XII. Porcentaje de ectoparásitos en los distintos sexos de los roedores.

	<b>Porcentaje de ectoparásitos en roedores machos</b>	<b>Porcentaje de ectoparásitos en roedores hembras</b>
Ácaros	44,9 %	55,1 %
Piojos	55,5%	44,5%
Pulgas	70%	30%*
Garrapatas	66,6%	33,4%*

\* Diferencias significativas.  $X^2_{0,05,1}$  ( $p < 0,05$ )

### 5.3 Detección de genoma de *Flavivirus*, *Alfavirus* y *Orthobunyavirus*

No se detectaron agentes virales de los géneros *Flavivirus*, *Alfavirus* y *Orthobunyavirus* en ninguno de los *pools* de ectoparásitos analizados por las técnicas moleculares mencionadas anteriormente.

En la figura 13 se muestra la fotografía del revelado de uno de los geles correspondiente a las *RT-Nested-PCR* realizadas para la búsqueda de virus de los géneros *Flavivirus* y *Alfavirus*. Se puede observar que en la calle 1, la muestra arrojó un resultado negativo para ambos géneros virales. En la calle 2 se observa el control positivo para *Flavivirus* y se corresponde con una banda de 150 pb. En la calle 3, se observa el control positivo para el género viral *Alfavirus* (200 pb). Luego se observa el control negativo, para el cual se utilizó agua pura y la última calle corresponde al patrón de peso molecular.

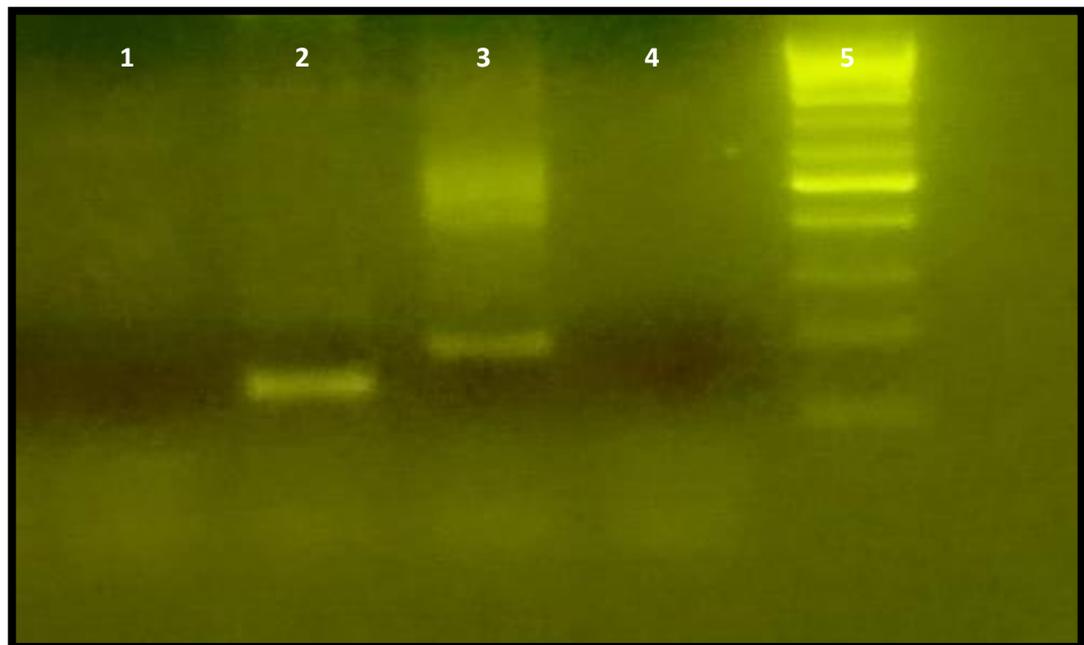


Figura 13. Fotografía correspondiente al revelado del gel luego de la corrida electroforética, para visualizar los resultados de la *RT-Nested-PCR* para la búsqueda de virus de los géneros *Flavivirus* y *Alfavirus*.

En la figura 14, se observa la fotografía correspondiente al revelado de una de las corridas electroforéticas luego de realizar RT-PCR para la detección de virus del género *Orthobunyavirus*. En la primera calle del gel se ve al patrón de peso molecular, las calles 2, 3, 4, 6 y 7 pertenecen a muestras negativas para virus del género *Orthobunyavirus*, en la calle 5 se observa el control positivo, que pertenece al ARN de una muestra positiva para el virus Maguarí y su banda se corresponde con 251 pb. En la calle 8 se sembró una muestra que contenía agua pura como control negativo.

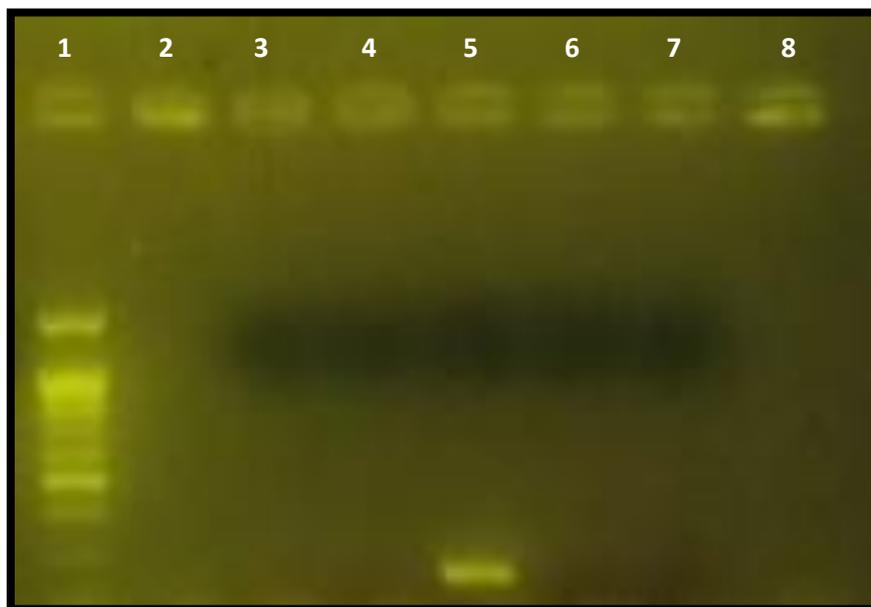


Figura 14. Fotografía correspondiente al revelado de uno de los gels luego de la electroforesis para la búsqueda de virus del género *Orthobunyavirus*.

## 6. Discusión

En total se examinaron 94 roedores del departamento de Burruyacú (75 del género *Akodon* y 19 de *Calomys*). Se observó que los roedores presentaban una gran cantidad de ectoparásitos. Como se observa en la Tabla XI la mayoría de los ectoparásitos hallados pertenecieron al orden Mesostigmata (ácaros), seguido de Phthiraptera (piojos).

En cuanto a las pulgas, el número de ejemplares colectados fue menor. Este número tan bajo, puede deberse a que las pulgas abandonan rápidamente el cuerpo del hospedador durante una situación estresante como captura o manipulación (Sponchiado J. , et al., 2015).

Las garrapatas también fueron colectadas en un número bajo y los ejemplares se encontraban en estadios juveniles. Generalmente el ciclo de vida de las garrapatas influye en su grado de especificidad, tendiendo los adultos a tener predilección por ciertas especies de mamíferos de mayor tamaño, mientras que las ninfas tienden a parasitar mamíferos pequeños, principalmente roedores (Bonifaz Osorio, 2017 ; Cicuttin, De Salvo, & Nava, 2017).

Respecto de las familias de ectoparásitos que componen el ensamble asociado a roedores, nuestros resultados coinciden con lo mencionado en la bibliografía para ácaros, garrapatas y piojos. Por ejemplo, en roedores capturados en una zona de bosque en el límite entre Brasil y Paraguay, en el Delta Bonaerense, en humedales del Río de La Plata y en La Rioja se hallaron ectoparásitos de las Familias Laelapidae, Ixodidae y Hoplopleuridae, mientras que las pulgas fueron de las familias Tungidae, Ctenophthalmidae y Rhopalopsyllidae (Lareschi & Sánchez López, 2000; Navone, et al., 2009; Sponchiado et al., 2016;). Dichos autores no hallaron pulgas de la Familia

Stephanocircidae en roedores de las regiones mencionadas, no obstante esta familia de pulgas está ampliamente representada en el NOA y en particular en Tucumán (Lareschi et al., 2016), también se halló en roedores de Córdoba (Lareschi et al., 2007), por lo que su identificación en este trabajo era esperable.

Con respecto a los grupos de ectoparásitos que han sido previamente mencionados en roedores del NOA, además de pulgas de la Familia Stephanocircidae, se registran ácaros de la Familia Laelapidae en roedores del género *Akodon* en La Rioja y Tucumán (López Berrizbeitia et al., 2013) y garrapatas de la Familia Ixodidae en *Akodon* y *Calomys* de Salta y Tucumán (Beldomenico, et al., 2003).

Por otro lado, con los resultados obtenidos de los roedores secuenciados, puede confirmarse que pulgas de la Familia Stephanocircidae y ácaros de la Familia Laelapidae parasitan roedores de la especie *Calomys boliviae*. Este estudio debe continuarse para poder determinar con exactitud que especies de roedores se encuentran asociadas a cada familia de ectoparásitos y de esta forma tener una visión más integral acerca de los posibles escenarios de transmisión de patógenos.

En cuanto al sexo de los roedores parasitados, numerosos estudios (Khokhlova et al. 2011; Krasnov et al. 2005, 2011; Kiffner et al. 2014; Kowalski et al. 2015) han sugerido que los machos de mamíferos pequeños tienden a tener tasas más altas de infestación que las hembras. Esto se atribuye al hecho de que, en los mamíferos, los machos tienen rangos de distribución más grandes, frecuencias de desplazamiento más altas y contacto con otros individuos debido a actividades de competencia o actividad de crianza. Además, las hormonas esteroides, particularmente la testosterona, causan

inmunosupresión, lo que aumentaría la susceptibilidad al parasitismo (Sponchiado et al., 2015). Los resultados de este estudio no mostraron diferencias significativas en las prevalencias de parasitismo de ácaros y piojos entre sexos del hospedador, en concordancia con los estudios realizados por Lareschi y colaboradores en Brasil (Linardi & Guimarães, 2000; Lareschi, 2004, 2010). Sin embargo, en relación a las pulgas y garrapatas, se encontró una mayor prevalencia en machos (Tabla XIII). Este hecho pudo haberse debido al azar, ya que los ejemplares colectados de estos dos tipos de ectoparásitos fueron escasos o a que, como describieron algunos trabajos (Lareschi M. , 2004, 2010) efectivamente, los mamíferos pequeños del sexo masculino tienen más susceptibilidad al parasitismo.

Los resultados obtenidos en relación a la detección de agentes virales de los géneros *Flavivirus*, *Alfavirus* y *Orthobunyavirus* en los ectoparásitos colectados, fueron negativos en todos los casos. Como se mencionó previamente, se realizó en el país la búsqueda de estos géneros virales en un tipo de ácaros de aves, en los cuales tampoco se halló ninguno de los tres géneros virales (Santillán, et al., 2015). Los resultados obtenidos a partir de las muestras analizadas no evidencian que exista circulación de los géneros virales analizados. La falta de evidencia de la circulación viral no significa que no haya circulación, por lo que deberían ampliarse los estudios de este tipo en otras zonas del país, o sobre especies de ectoparásitos que se encuentren en otros hospedadores, a fin de mejorar la prevención, control y vigilancia de enfermedades zoonóticas.

Por otro lado, esta nueva metodología de obtención de ectoparásitos a partir de animales conservados en nitrógeno líquido y luego a -70°C, hace que

los muestreos puedan ser colaborativos y se amplía de esta forma, la cantidad de información que puede ser obtenida a partir de un mismo grupo de muestras.

## 7. Conclusión

En el muestreo realizado en el departamento de Burruyacú, en la provincia de Tucumán, los roedores más abundantes pertenecen a los géneros *Akodon* y *Calomys*. Estos roedores tienen importancia sanitaria, ya que pueden actuar como reservorios de diversos agentes patógenos. A su vez, estos presentan una gran cantidad de ectoparásitos, principalmente ácaros de la Familia Laelapidae, y piojos de la Familia Hoplopleuridae. En menor proporción se hallan parasitados por garrapatas de la Familia Ixodidae y pulgas de la Familia Stephanocircidae.

Todas las muestras de ectoparásitos analizadas resultaron negativas para la detección de virus de los géneros *Flavivirus*, *Alfavirus* y *Orthobunyavirus* por la metodología utilizada.

Si bien no se detectaron agentes virales en las muestras analizadas, este trabajo aporta datos acerca de las familias de ectoparásitos que se hallan principalmente en los roedores de dicha zona y esta información aumenta el conocimiento sobre los roles que cumplen los ectoparásitos en los posibles ciclos de transmisión de agentes patógenos a sus hospedadores.

Esta búsqueda realizada de virus en ectoparásitos de roedores sienta las bases en cuanto a una novedosa metodología para futuros estudios en otras regiones y/o buscando otros géneros virales. La conservación de los roedores en termos con nitrógeno líquido y luego en congeladoras a  $-70^{\circ}\text{C}$ , permite preservar los ectoparásitos asociados y realizar potencialmente el estudio de

agentes patógenos, situación que no sería posible en un muestreo convencional de ectoparásitos. Esta metodología, además, permite un mejor aprovechamiento de los recursos económicos, logrando explotar al máximo los ejemplares colectados para distintos estudios. De esta manera, se posibilita además la realización de estudios colaborativos con otras instituciones, compartiendo el material biológico para estudios con distintos objetivos, teniendo siempre en cuenta los principios éticos para la experimentación con animales.

## 8. Bibliografía

- Arif, I. A., & Khan, H. A. (2009). Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal Biodiversity and Conservation*, 32.1: 9–17.
- Arredondo-García , J. L., Méndez-Herrera , A., & Medina-Cortina , H. (2016). Arbovirus en Latinoamérica. *Acta Pediatr Mex*, 37(2), 111-131.
- Artiga, C. G., García Saldaña, C., & Rubio Langre, S. (2016). Prevención, control y tratamiento de las patologías más frecuentes en el ganado porcino. *Panorama actual del medicamento*, 40(396), 852-860.
- Balashov, Y. S. (2006). Types of Parasitism of Acarines and Insects on Terrestrial Vertebrates. *Entomological Review*, 86(8), 957-971.
- Baneth, G. (2014). Tick-borne infections of animals and humans: a common ground. *International journal for parasitology*, 44(9), 591-596.
- Barbosa, N. S., Mendonca, L. R., Dias, M. V., Pontelli, M. C., da Silva, E. Z., Criado, M. F., . . . da Silva, L. L. (2017). ESCRT machinery components are required for Orthobunyavirus particle production in Golgi compartments. *PLoS pathogens*, 14(5), e1007047.
- Bechah, Y., Socolovschi, C., & Raoult, D. (2011). Identification of Rickettsial Infections by using cutaneous Swab specimens and PCR. *Emerging infectious diseases*, 17(1), 83.

- Beldomenico, P. M., Baldi, C. J., Antoniazzi, L. R., Orduna, G. M., Mastropaolo, M., Macedo, A. C., . . . Guglielmone, A. A. (2003). Systematics, morphology and physiology. Ixodid Ticks (Acari: Ixodidae) Present at Parque Nacional El Rey, Argentina. *Neotropical Entomology*, 32(2), 273-277.
- Bitam, K., Dittmar, P., Parola, M., & Whiting, D. (2010). Fleas and flea-borne diseases. *Int. J. Infect Dis*, 14: 667-676.
- Blakqori, G., Lowen, A. C., & Elliott, R. M. (2012). The small genome segment of Bunyamwera orthobunyavirus harbours a single transcription termination signal. *Journal of General Virology*, 93(7), 1449-1455.
- Bonifaz Osorio, E. A. (2017). Impacto de la tala en la carga ectoparasitaria de mamíferos pequeños en la cuenca del tahuamanu. *Tesis*. Lima, Perú: Universidad Ricardo Palma. Facultad de Ciencias Biológicas. Escuela profesional de biología.
- Boyd, B. M., & Reed, D. L. (2012). Taxonomy of lice and their endosymbiotic bacteria in the post-genomic era. *Clinical Microbiology and Infection*, 18(4), 324-331.
- Castillo Martinez, A., Cueto Medina, S., Méndez López, R., Pérez Muñoz , R., Hernandez Rodriguez, S., & Ortega Morales, A. (2016). Garrapatas (acari: ixodidae, argasidae) de la comarca lagunera en Durango, México. *Acarología Y Aracnología*.
- Cicuttin, G., De Salvo, M., & Nava, S. (2017). Especies de garrapatas duras en un área urbana protegida de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires.

- Colombo, V. C., Nava, S., Antoniazzi, L. R., Monje, L. D., Racca, A. L., Guglielmone, A. A., & Beldomenico, P. M. (2015). Factors affecting patterns of *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae) parasitism in a rodent host. *El Sevier. Veterinary Parasitology*, 211(3-4), 251-258.
- Cook, S., & Holmes, E. C. (2006). A multigene analysis of the phylogenetic relationships among the flaviviruses (Family: Flaviviridae) and the evolution of vector transmission. *Archives of Virology*, 151: 309–325.
- Cortinas, R., & Jones, C. J. (2006). Ectoparasites of Cattle and Small Ruminants. *Veterinary Clinics: Food Animal Practice*, 22(3), 673-693.
- Damonte, E. B. (2006). Dengue: Un viejo y nuevo desafío para la quimioterapia antiviral. *Química viva*, , 5(2).
- Diaz, L. A., Flores , F. S., Quaglia, A., & Contigiani, M. S. (2013). Intertwined arbovirus transmission activity: reassessing the transmission cycle paradigm. *Frontiers in physiology*, 3, 493.
- Durden , L. A., Linthicum, K. J., & Turell, M. J. (1992). Mechanical transmission of Venezuelan equine encephalomyelitis virus by hematophagous mites (Acari). *Journal of medical entomology*, 29(1), 118-121.
- Endris, R. G., & Hess, W. R. (1994). Attempted transovarial and venereal transmission of African swine fever virus by the Iberian soft tick *Ornithodoros (Pavlovskyella) maroccanus* (Acari: Ixodoidea: Argasidae). *Journal of medical entomology*, 31(3), 373-381.

- Faccioli, V. (2011). Garrapatas (acari: ixodidae y argasidae) de la colección de invertebrados del museo provincial de ciencias naturales Florentino Ameghino. Santa Fe.
- Fernandes Cardoso, B., Pereira Serra, O., Borges da Silva Heinen, L., Zuchi, N., Costa de Souza, V., Gomes Naveca, F., . . . Dezengrini Shhessarenko, R. (2015). Detection of Oropouche virus segment S in patients and in *Culex quinquefasciatus* in the state of Mato Grosso, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 110(6), 745-754.
- González , A., Del C Castro, D., & De Villalobos, C. (2005). *Artrópodos de interés médico en Argentina*. Buenos Aires: Fundación Mundo Sano.
- Gonzalez- Ittig, R. E., Salazar- Bravo, J., Barquez, R. M., & Gardenal, C. N. (2010). Phylogenetic relationships among species of the genus *Oligoryzomys* (Rodentia, Cricetidae) from Central and South America. *Zoologica Scripta*, 39(6), 511-526.
- González, A., Lareschi, M., & De Villalobos, C. (2005). *Artrópodos de interés médico en Argentina* . Buenos Aires: Fundación Mundo Sano.
- Gonzalez-Ittig, R. E., Rossi-Fraire, H. J., Cantoni, G. E., Herrero, E. R., Benedetti, R., Gallardo, M. H., & Gardenal, C. N. (2009). Population *genetic* structure of long-tailed pygmy rice rats (*Oligoryzomys longicaudatus*) from Argentina and Chile based on the mitochondrial control region. *Canadian Journal of Zoology*, 88(1), 23-35.
- Gritsun, T. S., Lashkevich, V. A., & Gould, E. A. (2003). Tick-borne encephalitis. *El Sevier. Antiviral Research*, 57(1-2), 129-146.

Jacquot, M., Abrial, D., Gasqui, P., Bord, S., Marsot, M., Masseglia, S., . . . Bailly, X. (2016). Multiple independent transmission cycles of a tick-borne pathogen within a local host community. *Nature. Scientifics reports*, 6, 31273.

Jayat, J. P., Ortiz, P. E., Teta, P., Pardiñas, U. F., & D'Elía, G. (2006). Nuevas localidades argentinas para algunos roedores sigmodontinos (Rodentia: Cricetidae). *Mastozoología Neotropical*, 13(1).

Jayat, J. P., Ortíz, P. E., & Miotti, M. D. (2008). Distribución de roedores sigmodontinos (Rodentia: Cricetidae) en pastizales de neblina del noroeste de Argentina. *Acta zoológica mexicana*, 24(3), 137-177.

kane, O. J., Uhart, M. M., Rago, V., Pereda, A. J., Smith, J. R., Van Buren, A., . . . Boersma, D. P. (2012). Avian Pox in Magellanic Penguins (*Spheniscus magellanicus*). *Journal of Wildlife Diseases*, 48(3):790-794.

Khokhlova IS, Serobyán V, Degen AA, Krasnov BR (2011) Discrimination of host sex by a haematophagous ectoparasite. *Anim Behav* 81:275–281

Kiffner C, Stanko M, Morand S, Khokhlova IS, Shenbrot GI, Laudisoit A, Leirs H, Hawlena H, Krasnov BR (2013) Sex-biased parasitism is not universal: evidence from rodent–flea associations from three biomes. *Oecologia* 173:1009–1022

Kowalski K, Bogdziewicz M, Eichert U, Rychlik L (2015) Sex differences in flea infections among rodent hosts: is there a male bias? *Parasitol Res* 114:337–341

Krasnov BR, Morand S, Hawlena H, Khokhlova IS, Shenbrot GI (2005) Sex-biased parasitism, seasonality and sexual size dimorphism in desert rodents. *Oecologia* 146:209–217

Krasnov, B. R. (2006). *Patterns of macroparasite diversity in small mammals*. In *Micromammals and Macroparasites* (pp. 197-231). Springer, Tokyo.

Krasnov BR, Stanko M, Matthee S, Laudisoit A, Leirs H, Khokhlova IS, Korrallo-Vinarskaya NP, Vinarski MV, Morand S (2011) Male hosts drive infracommunity structure of ectoparasites. *Oecologia* 166:1099–1110

Krenn , H. W., & Aspöck , H. (2011). Form, function and evolution of the mouthparts of blood-feeding Arthropoda. *Arthropod Structure & Development*, 41(2), 101-118.

Kuno, G., Chang, G. J., Tsuchiya, R. K., Karabatsos, N., & Cropp, B. C. (1998). Phylogeny of the Genus Flavivirus. *Journal of Virology* , 72(1), 73-83.

Kuno, G., Mitchell, C. J., Chang, G.-J., & Smith, G. C. (1996). Detecting Bunyaviruses of the Bunyamwera and California Serogroups by a PCR Technique. *Journal of clinical Microbiology* , 34(5), 1184-1188.

Lamattina, D., Venzal, J. M., Terragona, E. L., Mangold, A. J., & Nava, S. (2018). *Amblyomma yucumense* Krawczak, Martins & Labruna, 2015 (Acari:Ixodidae) in Argentina. *Systematic & Applied Acarology*,52(1), 28-37.

- Lareschi, M. (2004). Ectoparásitos Asociados a Machos y Hembras de *Oxymycterus rufus* (Rodentia: Muridae). Estudio comparativo en la Selva Marginal del río de La Plata, Argentina. *Rev. Soc. Entomol. Argent*, 63(3-4), 39-44.
- Lareschi, M. (2010). Ectoparasite Occurrence Associated with Males and Females of Wild Rodents *Oligoryzomys flavescens* (Waterhouse) and *Akodon azarae* (Fischer) (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae) in the Punta Lara Wetlands, Argentina. *Neotropical Entomology*, 39(5):818-822.
- Lareschi, M. (2017). Artrópodos ectoparásitos. En F. B. Drago, *Macroparásitos. Diversidad y biología*. Editorial de la Universidad de la Plata.
- Lareschi, M., & Sánchez López, M. I. (2000). Ectoparásitos (Phthiraptera y Acari) de roedores (Rodentia: Muridae: Sigmodontinae) en el delta bonaerense del río Paraná, Argentina. *Sociedad Entomológica Argentina*, , 59(1-4), 17-19.
- Lareschi, M., González , A., & De Villalobos, C. (2005). Siphonaptera. En O. Salomón, *Artrópodos de interés médico en Argentina*. Buenos Aires: Fundación Mundo Sano. *Publicación Monográfica*, 6.
- Lareschi, M., Sanchez, J., & Autino, A. (2016). A review of the fleas (Insecta: Siphonaptera) from Argentina. *Zootaxa*, 4103(3), 239-258.
- Linardi , P. M., & Guimarães, L. R. (2000). Sifonápteros do Brasil. *Museu de Zoologia USP/Fapesp*, 291.

- López Berrizbeitia, M. F., Díaz, M., & Lareschi, M. (2013). Los ectoparásitos de los roedores sigmodontinos (Cricetidae) de La Rioja, resultados preliminares.
- López Berrizbeitia, M. F., Díaz, M., Barquéz, R. M., & Lareschi, M. (2013). Pulgas (Siphonaptera) parásitas de roedores (Rodentia: Cricetidae) de la provincia de Salta, Argentina: nuevos registros de distribución. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*, 72(3-4), 141-146.
- Lubinga, J. C., Tuppurainen, E. S., Coetzer, J. A., Stoltz, W. H., & Venter, E. H. (2013). Transovarial passage and transmission of LSDV by *Amblyomma hebraeum*, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Rhipicephalus decoloratus*. *Experimental and applied acarology*, , 62(1), 67-75.
- Lubinga, J. C., Tuppurainen, E. S., Mahlare, R., Coetzer, J. A., Stoltz, W. H., & Venter, E. H. (2013). Evidence of transstadial and mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Amblyomma hebraeum* ticks. *Transboundary and Emerging Diseases*, 62(2), 174-182.
- Marshall, A. G. (1981). *The Ecology of Ectoparasitic Insects*. Academic Press.
- Maruyama, S. R., Chaves Ribeiro, J. M., Castro-Jorge, L., Gardinassi, L. G., Rocha Garcia, G., Giampietro Brandão, L., . . . Kinney Ferreira de Miranda-Santos, I. (2014). Characterisation of divergent flavivirus NS3 and NS5 protein sequences detected in *Rhipicephalus microplus* ticks from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 109(1), 38-50.
- McCoy, K. D., Léger, E., & Dietrich, M. (2013). Host specialization in ticks and transmission of tick-borne diseases: a review. *Front. Cell. Infect. Microbiol*, 3, 57.

- McNair, C. (2014). Ectoparasites of medical and veterinary importance: drug resistance and the need for alternative control methods. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 67(3), 351-363.
- Mencke, N., Vobis, M., Mehlhorn, H., D Haese, J., Rehagen, M., Mangold-Gehring, S., & Truyen, U. (2009). Transmission of feline calicivirus via the cat flea (*Ctenocephalides felis*). *Parastology Research*, 105(1), 185.
- Moghadam , A., & Saboori, A. (2015). Some mesostigmatic mites (Acari: Mesostigmata) associated with ants in Shahrekord region, Iran. *Ecologica Montenegrina*, 2(4), 315-326.
- Monath, T. P. (2001). Yellow fever: an update. *The Lancet infectious diseases*, 1(1), 11-20.
- Moraza , L., & Balanzategui, I. (2015). Orden Mesostigmata. *Ibero Diversidad Entomológica*.
- Moro, V. C., Chauve, C., & Zenner, L. (2005). Vectorial role of some Dermanyssoid mites (Acari, Mesostigmata, Dermanyssoidea). *Parasite journal*, 12(2), 99-109.
- Morrone, J. J., & Coscarón, S. (1998). Biodiversidad de Artrópodos Argentinos. Una perspectiva biotaxonómica. *Ediciones Sur*. Buenos Aires, Argentina.
- Mullen, G. R., & Durden, L. A. (2009). *Medical and veterinary entomology*. USA: Academic Press.
- Muñoz, M., & Navarro, J. C. (2012). Virus Mayaro: un arbovirus reemergente en Venezuela y Latinoamérica. *Biomédica vol.32 no.2 Bogotá*.

- Nava, S., & Lareschi, M. (2012). Ecological Characterization of a Community of Arthropods Parasitic of Sigmodontine Rodents in the Argentinean Chaco. *Population and community ecology*, 49(6), 1276-1282.
- Navone, G. T., Notarnicola, J., Nava, S., Robles, M., Galliari, C., & Lareschi, M. (2009). Arthropods and helminths assemblage in sigmodontine rodents from wetlands of the rio de La Plata, Argentina. *Mastozoología Neotropical*, 16(1), 121-133.
- Pfeffer, M., & Dobler, G. (2010). Reemergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. *Parasites & Vectors*, 3(1), 35.
- Plyusnin, A., & Elliott, R. M. (2011). *Bunyaviridae. Molecular and Cellular Biology*. Norfolk, UK: Caister Academic Press.
- Poulin, R., & Mouillot, D. (2005). Combining phylogenetic and ecological information into a new index of host specificity. *Journal of parasitology*, 91(3), 511-514.
- Poulin, R., Krasnov, B. R., & Morand, S. (2006). *Micromammals and Macroparasites. From Evolutionary Ecology to Management*. Springer Science & Business Media.
- Pullido Villamarín, A., Castañeda-Salazar, R., Ibarra Ávila, H., Gómez-Méndez, L. D., & Barbosa-Buitrago, A. M. (2016). Microscopía y Principales Características Morfológicas de Algunos Ectoparásitos de Interés Veterinario. *Rev Inv Vet Perú*, 27(1): 91-113.
- Ribera, I., Melic, A., & Torralba, A. (2015). Introducción y guía visual de los artrópodos. *Revista Ide@- SEA*, (2), 1-30.

- Rupp, J. C., Sokoloski, K. J., Gebhart, N. N., & Hardy, R. W. (2015). Alphavirus RNA synthesis and non-structural protein functions. *Journal of General Virology*, 96(9), 2483-2500.
- Sanchez, J. (2012). Sifonápteros Parásitos de los Roedores Sigmodontinos de la Patagonia Norte de la Argentina: Estudios Sistemáticos y Ecológicos. *Tesis Doctoral*. Facultad de Ciencias Naturales y Museo Universidad Nacional de La Plata.
- Sanchez-Seco, M. P., Rosario, D., Domingo, C., Hernandez, L., Valdés, K., Guzmán, M. G., & Tenorio, A. (2005). Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification. *Journal of Virological Methods*, 126(1-2), 101-109.
- Sanchez-Seco, M. P., Rosario, D., Quiroz, E., Guzmán, G., & Tenorio, A. (2001). A generic nested-RT-PCR followed by sequencing for detection and identification of members of the alphavirus genus. *Journal of Virological Methods*, 95(1-2), 153-161.
- Santillán, M. A., Grande, J. M., Liébana, M. S., Martinez, P., Díaz, L. A., Bragagnolo, L. A., . . . Sarasola, J. H. (2015). New hosts for the mite *Ornithonyssus bursa* in Argentina. *Medical and Veterinary Entomology*, 29(4), 439-443.
- Shepherd, R. C., & Edmonds, J. W. (1977). Myxomatosis: the transmission of a highly virulent strain of myxoma virus by the European rabbit flea *Spilopsyllus cuniculi* (Dale) in the Mallee region of Victoria. *Epidemiology & Infection*, 79(3), 405-409.

- Slovak, M., Kazimirova, M., Siebenstichova, M., Ustanikova, K., Klempa, B., Gritsun, T., . . . Nuttall, P. A. (2014). Survival dynamics of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks. *Ticks borne deseases*, 5(6), 962-969.
- Sponchiado, J., Melo, G. L., Martins, F. S., Krawczak, F. S., Jacinavicius, F. C., Labruna, M. B., . . . Cáceres, N. C. (2016). Ectoparasites of small-mammals : determinants of community structure in South American savannah. *Parasitology*, 144(4), 475-483.
- Sponchiado, J., Melo, G., Landulfo, G. A., Jacinavicius, F. C., Barros-Battesti, D. M., & Cáceres, N. C. (2015). Interaction of ectoparasites (Mesostigmata, Phthiraptera and Siphonaptera) with small mammals in Cerrado fragments, western Brazil. *Experimental and Applied Acarology*, 66(3), 369-381.
- Strauss, E. G., & Strauss, J. H. (1986). Structure and Replication of the Alphavirus genome. *Schlesinger S., Schlesinger M.J. (eds) The Togaviridae and Flaviviridae* (pp. 35-90). Springer, Boston, MA.
- Vasilakis, N., Lambert, A., MacLachlan, J., & Brault, A. C. (2016). Genomic Organization of Arboviral Families. *Molecular Biology, Evolution and Control*.
- Venzal, J. M., Castro, O., Cabrera, P. A., de Souza, G. C., & Guglielmone, G. G. (2003). Las garrapatas de Uruguay: especies, hospedadores, distribución e importancia sanitaria. *Veterinaria (Montevideo)*, 38(150-151), 17-28.
- Weaver, S. C., & Barrett, A. D. (2004). Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Reviews Microbiology*, 2(10), 789.

Weaver, S. C., & Reisen, W. K. (2010). Present and Future Arboviral Threats. *Antiviral research*, 85(2), 328-345.

Westaway, E. G., Brinton, M. A., Gaidamovich, S. Y., Horzinek, M. C., Igarashi, A., Kaariainen, L., . . . Trent, D. W. (1985). Togaviridae. *Togaviridae Group, Vertebrate Virus Subcommittee, International Committee on Taxonomy of Viruses.* , 24: 125-139.

Wesula Lwande, O., Lutomiah, J., Obanda, V., Gakuya, F., Mutisya, J., Mulwa, F., . . . Sang, R. (2013). Isolation of Tick and Mosquito-Borne Arboviruses from Ticks Sampled from Livestock and Wild Animal Hosts in Ijara District, Kenya. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 13(9), 637-642.

Zuk M, McKean KA (1996) Sex differences in parasite infections: patterns and processes. *Int J Parasitol*, 26:1009–1024.