

**VIGILANCIA DE ORTHOBUNYAVIRUS EN MOSQUITOS DE LA PROVINCIA DE
MISIONES, ARGENTINA**

Trabajo Final de Grado
de la alumna



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

Pergamino, 24 de mayo de 2024

**VIGILANCIA DE *ORTHOBUNYAVIRUS* EN MOSQUITOS DE LA PROVINCIA DE
MISIONES, ARGENTINA**

Trabajo Final de Grado

de la alumna

LISET RABINO

Aprobada por el Tribunal Evaluador

Diana Acosta
Evaluadora

Estefanía Boaglio
Evaluadora

Juliana Sanchez
Evaluadora

Silvina Goenaga
Directora

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

Pergamino, 24 de mayo de 2024

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer y dedicar este trabajo final de grado a cada una de las personas que estuvieron presentes a lo largo de este camino.

A mi directora, Sil, GRACIAS por su paciencia y dedicación. Encantada de haber compartido el cierre de esta etapa con ella.

A la UNNOBA, muchas veces mi segundo hogar, a su cuerpo docente y no docente, por brindarme las herramientas y conocimientos para que hoy esté acá. A todos los profesores de la carrera, GRACIAS!

A todos y cada uno de mis compañeros, que siempre con un mate, un chiste, o un repaso de último momento me ayudaron a hacer más llevaderas las cursadas y a superar los miedos pre-examen.

A cada una de las personas que conocí en todos estos años en Pergamino. Compañeros de trabajo que se transformaron en amigos, amigos de esos amigos que se convirtieron también en los míos, compañeros de la Franja con quienes tuve la oportunidad de militar y participar de la vida universitaria desde otro punto de vista. A LuCha, ella también es parte clave de este proceso.

A mis facuamigos, sin ellos nada hubiera sido igual, definitivamente. Agradezco el vínculo generado y que continúen los encuentros y risas.

A mis amigas de Peyrano, que me adoptaron en medio de la carrera, siempre me incluyeron en cada plan, aprovechando como punto de encuentro el pueblo y aún pasando 1 mes entre juntadas, todo seguía intacto.

A mi familia de corazón, vecinos/as y amigos/as, a cada una de las personas que siempre estuvieron, en momentos difíciles y para compartir alegrías, siempre tendiendo una mano, un abrazo. A Ceci, mi mamá de Pergamino, gran compañía para iniciar el cambio.

A toda mi familia. A mi papá, a mis tíos y tías, a mis primas, a mis sobrinos y a mi ahijado. Especialmente a mi mamá, por el apoyo y sostén INCONDICIONAL. A mis abuelos, Nilda y Osvaldo, lo logré.

RESUMEN

Las enfermedades arbovirales se encuentran en aumento, la emergencia/reemergencia de algunos virus como dengue (DENV), virus de la fiebre amarilla (YFV), Chikungunya (CHIKV), entre otros, son la evidencia. Los recientes brotes de estas zoonosis están relacionados con diversos factores, como los cambios ambientales antrópicos, transporte aéreo de personas, tráfico de fauna, movilización de poblaciones humanas a zonas silvestres afectando a las poblaciones de vectores y hospedadores y cambio climático global.

El objetivo del presente trabajo fue detectar la circulación de *Orthobunyavirus* en mosquitos provenientes de la provincia de Misiones. Para ello, se analizaron mosquitos recolectados en 4 puntos geográficos dentro de la provincia, durante campañas de vigilancia en el marco de la vigilancia de la Fiebre Amarilla en el año 2019. Los mosquitos fueron identificados taxonómicamente y se conformaron *pooles* a partir de dicha clasificación. Por medio de técnicas moleculares que incluyeron la extracción de ARN y detección de genoma mediante RT-PCR, se intentó determinar la presencia del género viral mencionado.

Los resultados fueron negativos, en ninguno de los *pooles* conformados fue posible la visualización de bandas de ADNc en los geles por electroforesis. Aun así, la información taxonómica obtenida de los ejemplares muestreados brinda aportes acerca de la amplia diversidad de especies de mosquitos que pueden encontrarse en Misiones, entre las cuales se identificaron algunas involucradas en la transmisión de diferentes arbovirus.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. ARBOVIRUS.....	1
1.2. VECTOR.....	1
1.3. CICLO DE TRANSMISIÓN.....	2
1.4. HOSPEDADOR	4
1.5. ORDEN <i>BUNYAVIRALES</i>	5
1.5.1. <i>Género Orthobunyavirus</i>	6
1.6. DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA E IMPORTANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE <i>ORTHOBUNYAVIRUS</i>	7
2. HIPÓTESIS	9
3. OBJETIVOS	9
3.1. OBJETIVO GENERAL	9
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
4.1. SITIOS DE CAPTURA	10
4.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS MOSQUITOS, CONFORMACIÓN Y PROCESAMIENTO DE <i>POOLS</i>	16
4.2.1. <i>Identificación taxonómica y armado de pools</i>	16
4.2.2. <i>Procesamiento de pools</i>	16
4.3. EXTRACCIÓN DE ARN	16
4.4. DETECCIÓN DE AGENTES VIRALES	17
4.4.1. <i>Amplificación del genoma viral por RT-PCR</i>	17
4.4.2. <i>Análisis de los ácidos nucleicos</i>	18
5. RESULTADOS	20
5.1. CAPTURA E IDENTIFICACIÓN DE LOS MOSQUITOS	20
5.2. DETECCIÓN DE ARN VIRAL POR RT-PCR	22
6. DISCUSIÓN.....	24
7. CONCLUSIÓN	27
BIBLIOGRAFÍA.....	28

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Arbovirus

Los arbovirus (ArBoViruses=arthropod borne viruses) representan un agrupamiento ecológico y polifilético de diversos virus transmitidos por artrópodos. Hasta la fecha alrededor de 100 arbovirus patógenos para plantas, animales y humanos han sido reportados, incluyendo miembros de las familias *Asfarviridae* (género *Asfivirus*), *Peribunyaviridae* (género *Orthobunyavirus*), *Phenuiviridae* (género *Phlebovirus*), *Flaviviridae* (género *Flavivirus*), *Orthomyxoviridae* (género *Thogotovirus*), *Rhabdoviridae* (género *Lyssavirus*), *Reoviridae* (género *Coltivirus*) y *Togaviridae* (género *Alphavirus*), los cuales en su mayoría son virus de ARN monocatenario, a excepción de la familia *Reoviridae* que posee ARN doble cadena (Hubálek *et al.* 2014; Organización Panamericana de la Salud 2022). El hecho de que estos arbovirus presenten predominantemente material genético en forma de ARN, les otorga una mayor plasticidad genética y una mayor capacidad de mutación, características que les permiten adecuarse a ciclos de replicación alternativos y adaptarse a nuevos hospedadores vertebrados e invertebrados (Weaver & Reisen 2010). Los arbovirus de interés sanitario se originan comúnmente a partir de ciclos de transmisión naturales denominados enzoóticos, en los que participan vectores artrópodos propios de ambientes selváticos y hospedadores vertebrados que habitan el mismo tipo de ambiente y funcionan como amplificadores virales. El salto de hospedador (*spillover*) de dichos ciclos selváticos con la población humana es lo que ocasiona la emergencia o reemergencia de los arbovirus (Organización Panamericana de la Salud 2022).

1.2. Vector

Los arbovirus pueden ser transmitidos por una amplia gama de artrópodos hematófagos: flebótomos, simúlidos, culícidos y garrapatas, siendo éstos dos últimos los de mayor relevancia (Rückert & Ebel 2018). Sin embargo, los que mayor importancia sanitaria presentan son los mosquitos (Familia *Culicidae*), los cuales transmiten muchos de los arbovirus más relevantes para la salud pública. Principalmente las especies pertenecientes a los géneros *Aedes* y *Culex*, actúan como eficientes vectores del virus del dengue (*Orthoflavivirus*), virus de la fiebre amarilla (*Alphavirus*), virus de la encefalitis

equina del Oeste (*Alphavirus*), virus de la fiebre del Valle del Rift (*Phlebovirus*) y del virus de La Crosse (*Orthobunyavirus*) (Tabla I). A su vez, los culícidos presentan características como vectores arbovirales, ya que pueden transmitir los agentes de manera biológica (horizontal y vertical), y han sido capaces de adaptarse a nuevos ambientes y hospedadores; también poseen un ciclo de desarrollo corto, lo cual provee de mayor cantidad de individuos a la brevedad capaces de funcionar como propagadores virales (Conway *et al.* 2014; Ferreira-de-Lima *et al.* 2020; Weaver *et al.* 2018).

Tabla I. Especies de mosquitos vectores de arbovirus que causan enfermedades en humanos. (Modificado de Conway *et al.* 2014)

Arbovirus	Vector(es) principal(es)
Virus del dengue	<i>Aedes aegypti</i> , <i>Ae. albopictus</i>
Virus de la fiebre amarilla	<i>Aedes aegypti</i>
Virus de la encefalitis de San Luis	<i>Culex pipiens</i>
Virus chikunguya	<i>Aedes aegypti</i> , <i>Ae. albopictus</i>
Virus de la encefalitis equina del Oeste	<i>Culex pipiens</i>
Virus O'nyong-nyong	<i>Anopheles gambiae</i> , <i>An. funestus</i>
Virus de la fiebre del Valle del Rift	<i>Culex pipiens</i> , <i>Aedes aegypti</i> , <i>Ae. vexans</i> , <i>Ae. mcintoshi</i>
Virus de la encefalitis de La Crosse	<i>Aedes triseriatus</i>

La selección del hospedador por parte de los vectores está determinada a través de una combinación de factores genéticos, ecológicos y conductuales, que determinan la interacción de los artrópodos con los humanos y el comportamiento y preferencia antropofílicos de algunas especies, como es el caso de *Aedes aegypti* y *Culex pipiens* (Kuno & Chang 2005).

1.3. Ciclo de transmisión

La transmisión de arbovirus puede darse de manera vertical en artrópodos en la que la hembra infectada transmite el virus transováricamente a sus huevos, de forma venérea, cuando un macho infectado copula con una hembra, u horizontalmente por transmisión biológica o mecánica. En esta última, el vector se alimenta de un hospedador infectado y

por contacto de las piezas bucales o patas con la sangre de vertebrados infectados conduce el arbovirus a otro hospedador. En la transmisión biológica, el vector adquiere la infección cuando se alimenta de sangre de un hospedador virémico, es decir, conteniendo una carga viral alta para generar una infección en el mismo. Al alcanzar el intestino del artrópodo, el virus infecta el epitelio intestinal y replica en las células epiteliales. De allí, atraviesa la barrera física e inmunológica de la lámina basal para pasar a la hemolinfa, utilizándola como medio para alcanzar los sitios secundarios de replicación como las glándulas salivales, donde se replica y acumula para ser transmitido posteriormente a otros hospedadores mediante la inoculación de saliva infectada (Figura 1). El período en el cual el virus llega a alojarse y es capaz de replicar en las glándulas salivales se denomina ciclo extrínseco y puede variar, entre 3 a 14 días dependiendo del agente viral (Conway *et al.* 2014; Kenney & Brault 2014; Rückert & Ebel 2018).

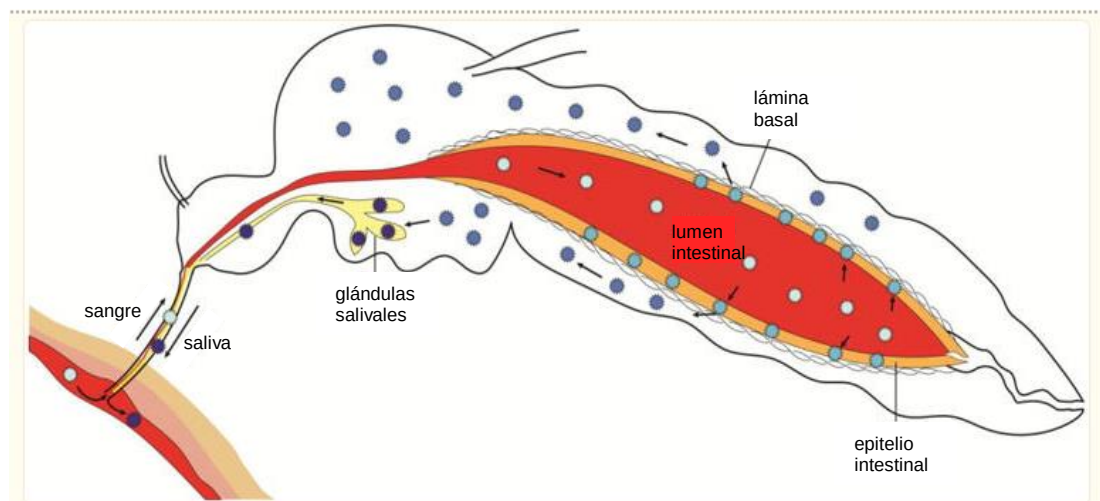


Figura 1. Ingresión de partículas virales ('partículas' blancas), procesamiento e infección de glándulas salivales ('partículas' tonos azules) en mosquito a través de la ingesta de sangre infectada y salida de las partículas virales mediante la saliva del insecto. Imagen extraída y modificada de Rückert & Ebel 2018

La transmisión natural de los arbovirus se da en la vida silvestre, en ciclos enzoóticos entre artrópodos y vertebrados. La interrupción del ciclo enzoótico por participación del humano como hospedador puede darse por tres diferentes mecanismos: ciclo enzoótico con un salto de hospedador quedando el humano como hospedador final; ciclo epidémico urbano, en el que la transmisión ocurre de modo vector-humano continuamente; y ciclo epizootico, donde los vectores involucran a animales domésticos como hospedadores virales y eventualmente pueden transmitir el arbovirus a personas (Figura 2) (Weaver & Reisen 2010; Weaver *et al.* 2018). Algunos arbovirus correspondientes al género

Orthobunyavirus se transmiten interhumanamente por ciclos urbanos o enzoóticos; dentro de éstos últimos, el virus Oropouche.

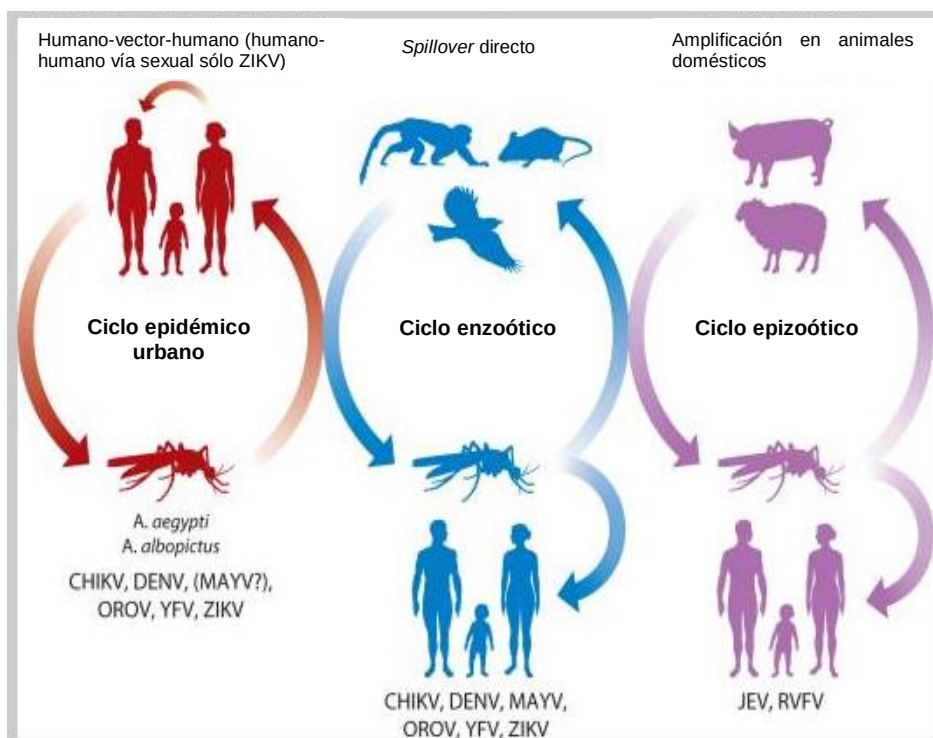


Figura 2. Mecanismos de aparición de arbovirus en poblaciones humanas. CHIKV, virus chikungunya; DENV, virus del dengue; JEV, virus de la encefalitis japonesa; MAYV, virus Mayaro; OROV, virus Oropouche; RVFV, virus de la fiebre del Valle del Rift; YFV, virus de la fiebre amarilla; ZIKV, virus Zika. Imagen extraída y modificada de Weaver *et al.* 2018.

1.4. Hospedador

Para la OMS, los vertebrados hospedadores cumplen dos funciones dentro del ciclo de transmisión viral: son reservorio de los virus y actúan como amplificadores, ya que a partir de un individuo infectado pueden alimentarse un elevado número de potenciales vectores. Generalmente, los hospedadores más efectivos presentan una carga viral elevada y la duración de la viremia debe ser prolongada para que la población infectada coincida en tiempo y espacio con nuevos vectores competentes (Kenney & Brault 2014; Kuno & Chang 2005; Kuno *et al.* 2017).

En el caso de los mosquitos existen preferencias de alimentación dentro de distintos géneros; por ejemplo, *Culex spp* se alimentan predominantemente de aves y mamíferos, mientras que las especies de *Aedes* y *Anopheles* se ven atraídos por mamíferos; otras tienen preferencia por vertebrados de sangre fría, como peces y anfibios (Kuno & Chang

2005).

1.5. Orden *Bunyavirales*

Este orden se estableció en 2019 debido a la necesidad de aglomerar virus que presentan un genoma de ARN segmentado, monocatenario, lineal y de sentido negativo. El genoma es tripartito, consiste en un segmento largo (L), uno mediano (M) y uno corto (S). Estos segmentos de ARN existen en forma helicoidal dentro del virión (Kuhn *et al.* 2022; Yoshimatsu & Arikawa 2012). Según la última actualización taxonómica ratificada y aceptada por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), el orden *Bunyavirales* se desglosa en 14 familias (Figura 3), de las cuales tienen mayor relevancia debido al impacto que tienen algunos de sus integrantes en humanos, ganado y cultivos las familias: *Hantaviridae*, *Nairoviridae*, *Tospoviridae*, *Phenuiviridae* y *Peribunyaviridae*, incluyendo la última mencionada el género *Orthobunyavirus* (Figura 3).

Más de 350 bunyavirus componen el orden *Bunyavirales*, y la mayor parte son transmitidos mediante artrópodos (mosquitos, garrapatas y sandfly) (Resino 2012). Estos virus se encuentran distribuidos globalmente y si bien algunos de estos agentes son patógenos, otros no causan ningún tipo de patología. Algunas de las enfermedades que se producen en humanos y animales domésticos son la fiebre del Valle del Rift, la fiebre hemorrágica de Crimea-Congo, entre otras. Existen dentro de este orden virus emergentes y reemergentes con potencial epidémico (Abudurexiti *et al.* 2019; Barbosa *et al.* 2022; Kuhn *et al.* 2022).

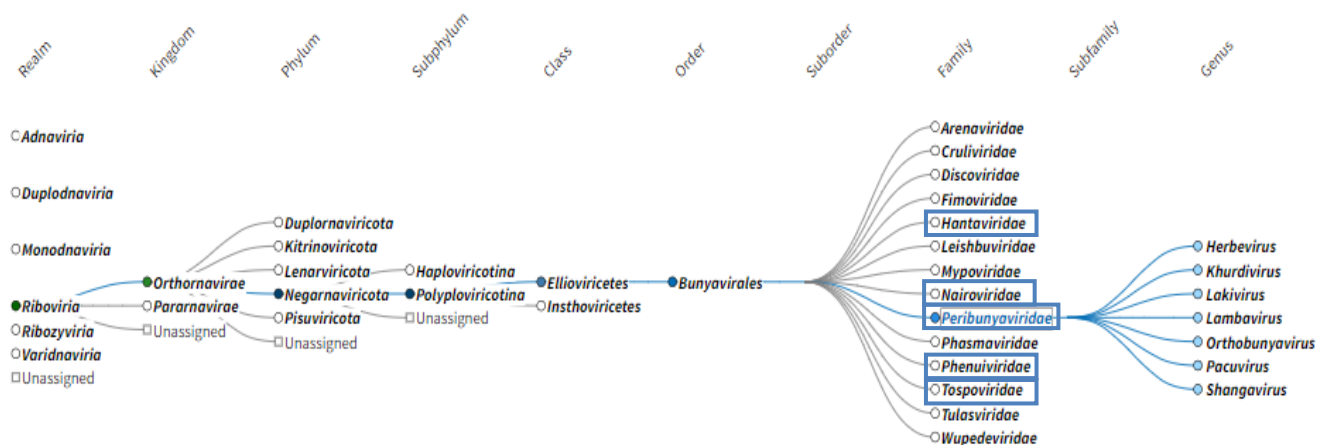


Figura 3. Composición del orden *Bunyavirales* y familias de interés (azul). Explorador de taxonomía visual, ICTV).

1.5.1. Género *Orthobunyavirus*

Correspondiente a la familia *Peribunyaviridae* (Figura 4), *Orthobunyavirus* es un género variado conformado por más de 180 especies virales de las cuales son muy pocas las que han sido reportadas como causantes de enfermedades. Algunos ejemplos de *Orthobunyavirus* patógenos son los virus de La Crosse y Jamestown Canyon, causantes de encefalitis grave en humanos (Evans et al. 2021; Winhaber 2021). Los virus de este género son transmitidos mayoritariamente por mosquitos a un amplio reservorio de vertebrados, como por ejemplo ardillas (virus de La Crosse), murciélagos (virus Mojuí dos Campos), conejos (virus de la liebre con raquetas de nieve), ungulados (virus Akabane), perezosos (virus Oropouche) y aves (virus Mermet). Si se consideran individualmente, cada virus posee un rango restringido de artrópodos y hospedadores, lo que limita su distribución geográfica a pesar de que el género como tal se localiza globalmente por su capacidad de colonizar gran variedad de nichos ecológicos (Beaty & Calisher 1991). Se ha demostrado la habilidad de los virus pertenecientes a este género para recombinarse y generar nuevos genomas virales, lo cual confiere una capacidad de adaptación (Hontz et al. 2015).

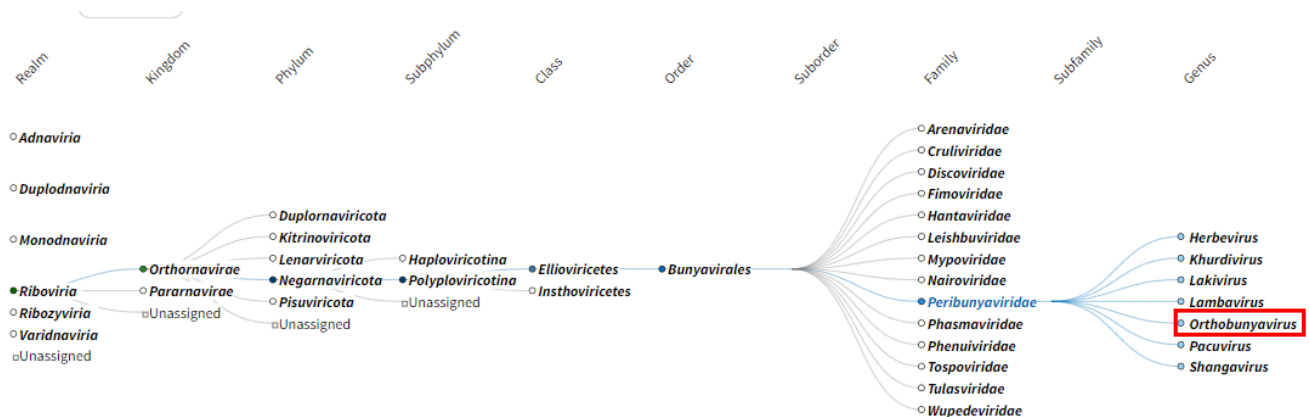


Figura 4. Taxonomía del género *Orthobunyavirus* (Explorador de taxonomía visual, ICTV).

Los virus de este género presentan una envoltura y tienen forma esférica, con un diámetro de entre 80 y 120 nm (Fig. 5 A). Su genoma es segmentado, compuesto por tres moléculas de ARN monocatenario antisentido: L (grande; 6,9 kb) codifica la ARN polimerasa, M (mediano; 4,5 kb) presenta genes de las proteínas de la envoltura, G_n y G_c , y proteínas no codificantes, y S (pequeño; 1,5 kb) codifica componentes de la nucleocápside y una proteína no estructural (Fig. 5 B) (Organización Panamericana de la

Salud 2022; Winhaber 2021).

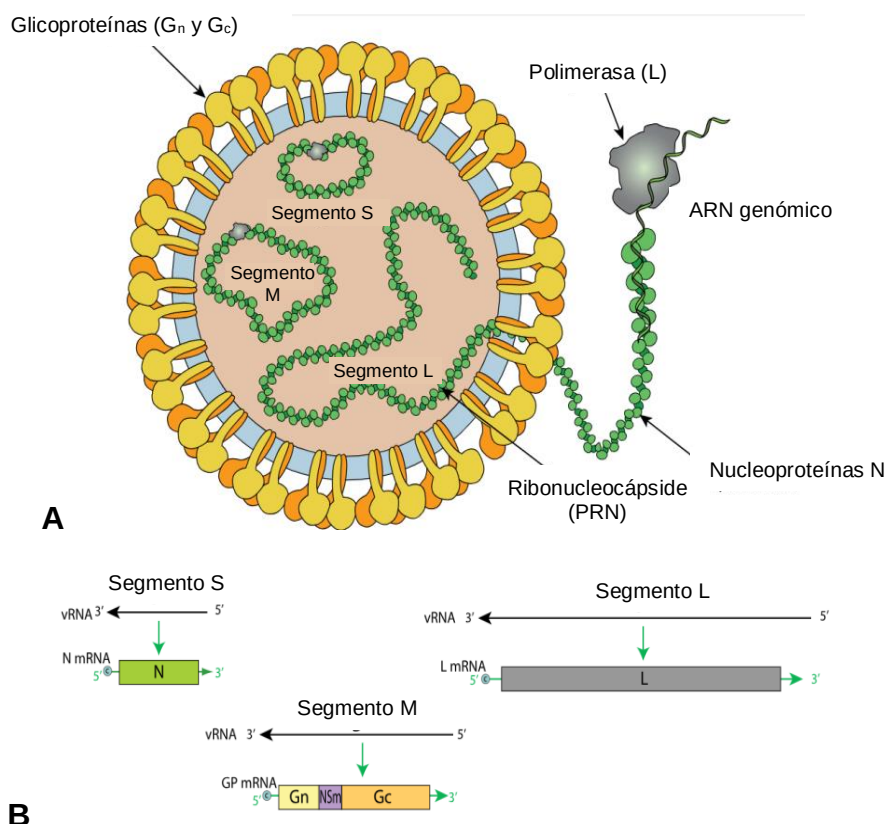


Figura 5. Esquema de los componentes estructurales (A) y genómicos (B) de *Orthobunyavirus*. Imagen tomada y modificada de Viralzone (https://viralzone.expasy.org/250?outline=all_by_species)

1.6. Distribución geográfica e importancia epidemiológica de *Orthobunyavirus*

Inicialmente, el orden *Bunyavirales* surge como la familia *Bunyaviridae* que recibe su nombre del primer virus descubierto de este grupo, el virus Bunyamwera aislado en 1943 en Uganda (África del Sur) a partir de mosquitos de la especie *Aedes* (Organización Panamericana de la Salud 2022). Los miembros pertenecientes al género *Orthobunyavirus* se originaron en diversas locaciones: el virus Bunyamwera se detecta primeramente en mosquitos en Uganda, el virus Oropouche se aísla a partir de un trabajador rural en Vega de Oropouche (Trinidad y Tobago), el virus Guaroa se identifica en una persona en Colombia, mientras que otros virus del género como La Crosse, Encefalitis de California y Jamestown Canyon se distribuyen ampliamente en Estados Unidos, donde fueron hallados por primera vez en *Culiseta inornata*, *Culex tarsalis* y *Aedes sp* (Anderson *et al.* 1961; Contigiani *et al.* 2016). En los últimos años este género

viral ha sido foco de estudio por los brotes de casos febriles ocasionados en Brasil, Panamá y Perú, y a través de la vigilancia epidemiológica se ha registrado circulación de los mismos entre mamíferos silvestres y humanos en Argentina, Colombia, Venezuela y Ecuador, estimando que podría existir una transmisión local en distintas regiones de Sudamérica (Dias *et al.* 2022; Gómez-Camargo *et al.* 2021; Romero-Alvarez & Escobar 2018). En Argentina, los ortobunyavirus han sido estudiados y detectados por brotes de enfermedad febril con síntomas similares a los causados por el virus Dengue en Córdoba (Tauro *et al.* 2009, 2012), encefalitis y abortos en animales domésticos en Santa Fe (Tauro *et al.* 2015b), y a través de la vigilancia epidemiológica de mosquitos como posibles vectores (Tauro *et al.* 2015a).

La actual distribución globalizada de los ortobunyavirus posiblemente se debe a la actividad humana sobre el ambiente y zonas selváticas, al incremento intensivo del transporte global, al comportamiento de los virus gracias a las mutaciones y recombinaciones que pueden sufrir, y a la gran variedad de potenciales vectores y su capacidad de adaptación (Ikegami 2012; Hughes *et al.* 2020). El aumento del contacto entre los animales silvestres y la población humana, sumado a la propagación geográfica del vector y del hospedador vertebrado, contribuye a la dispersión de estos géneros virales (Casel *et al.* 2021; Weaver & Reisen 2010). Por eso la emergencia de estos virus se considera como un proceso multicausal donde varios factores ocasionan el aumento de la actividad y aparición del patógeno, aumentando el riesgo para la salud de la población.

2. HIPÓTESIS

Existe circulación de diversos *Orthobunyavirus* en la provincia de Misiones de Argentina.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Detectar a través de métodos de biología molecular la presencia de *Orthobunyavirus* en muestras de mosquitos de la provincia de Misiones, Argentina.

3.2. Objetivos específicos

- Detectar las especies virales del género *Orthobunyavirus* en mosquitos capturados en distintas regiones (selváticas y rurales) de la provincia de Misiones, Argentina.
- Identificar las especies virales en aquellos *pooles* que resulten positivos mediante secuenciación nucleotídica.
- Caracterizar los virus hallados por medio de las relaciones filogenéticas de los agentes virales detectados.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

Es relevante destacar que el proceso de investigación se inició a partir de la etapa de extracción de ARN, ya que la captura de los mosquitos, su identificación taxonómica y la maceración de los ejemplares fueron realizadas previamente durante otros ensayos por el personal del Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. Julio I. Maiztegui" (INEVH-ANLIS).

4.1. Sitios de captura

Los mosquitos fueron colectados en 4 puntos distantes de la provincia de Misiones, en el marco de la vigilancia de la Fiebre Amarilla realizadas en marzo y diciembre del año 2019. Los sitios de muestreo fueron:

- **Reserva privada Yucatinga**

El muestreo se llevó a cabo en marzo del año 2019. Los mosquitos fueron atrapados en distintos puntos de la Reserva con captura manual por medio de redes y aspiradores (Figura 6). Las capturas se hicieron durante 3 días consecutivos.

La Reserva privada Yucatinga se ubica en el extremo norte de la de la provincia (Figura 7). Cuenta con una extensión de 570 has., presentando una abundante y diversa vegetación (Figura 8) (Misiones. Flora y fauna.: <https://misiones.tur.ar/flora-y-fauna/>).

A su vez, la Reserva Yucatinga está integrada en una red de reservas de fauna y flora silvestres, lo que contribuye a su notable diversidad biológica. Por consiguiente, se reconoce como un sitio idóneo para la captura de especies debido a la riqueza faunística que alberga. (Yucatinga Lodge. Reserva Natural Privada.: <https://www.yucatinga.com/reserva-natural-privada/>).



Figura 6. Fotografías de una red de captura entomológica y de un aspirador.

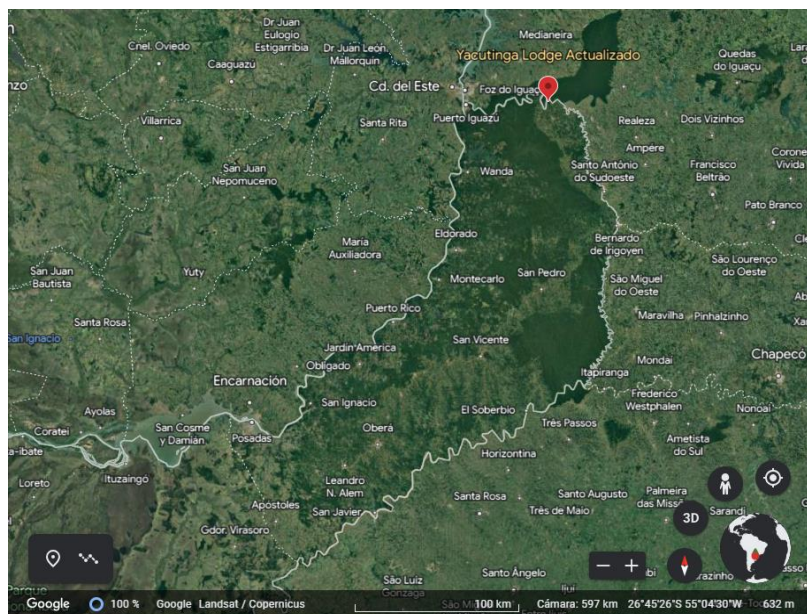


Figura 7. Ubicación geográfica de la Reserva privada Yucatinga (Yucatinga Lodge).

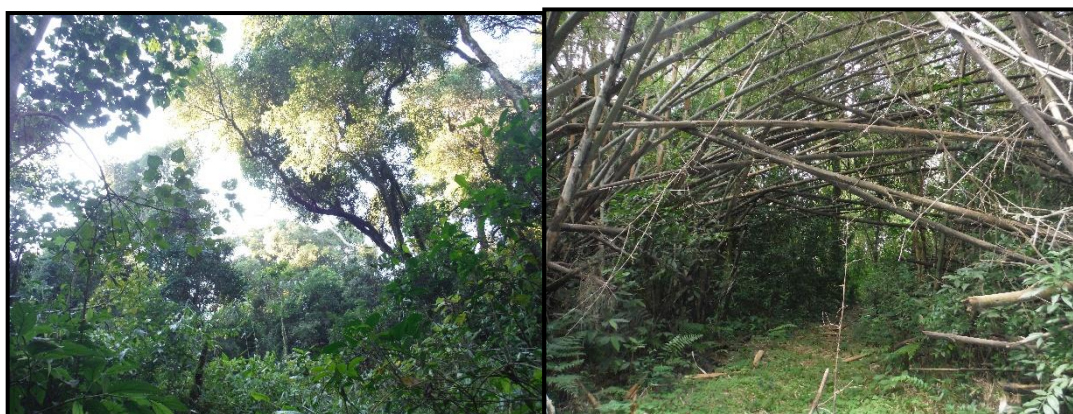


Figura 8. Fotografías de la Reserva privada Yucatinga.

- **Parque Provincial Piñalito**

Las capturas se realizaron de forma manual, en dos períodos dentro del año 2019; el primero se llevó a cabo a fines de marzo, y el segundo a inicios de diciembre del 2019. Al igual que el anterior, las capturas se realizaron durante 3 días consecutivos mediante el uso de redes y aspiradores.

El Parque Provincial Piñalito se encuentra al Este de la provincia de Misiones, en el departamento de San Pedro (Figura 9). Se halla en la ecorregión de la Selva Paranaense, abarcando una superficie de 3796 has., donde la espesa vegetación combina helechos, arbustos y árboles de mediano y gran porte (Figura 10) (Misiones. Flora y fauna.: <https://misiones.tur.ar/flora-y-fauna/>).

El principal objetivo del Parque es preservar especies y la diversidad genética de felinos. Se encuentra bajo la administración de la Dirección General de Ecología de la Subsecretaría de Ecología, Ministerio de Ecología y Recursos Renovables (Sistema de Información de Biodiversidad (SIB) de la Administración de Parques Nacionales (APN). Parque Provincial Piñalito.: https://sib.gob.ar/area/MISIONES*PI*PI?ALITO).

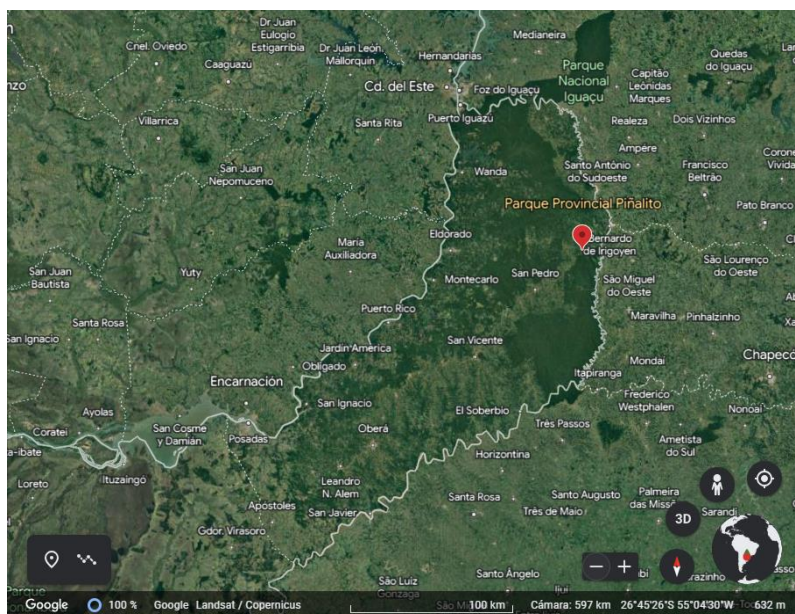


Figura 9. Ubicación geográfica del Parque Provincial Piñalito.



Figura 10. Fotografías tomadas en el Parque Provincial Piñalito.

- **Montecarlo, Guatambú**

Montecarlo es una ciudad localizada al Oeste de la provincia de Misiones, perteneciente al departamento de mismo nombre (Figura 11). Las capturas de mosquitos fueron realizadas de manera manual en tres puntos (campamentos) del barrio Guatambú, en el transcurso de 3 días del mes de diciembre de 2019.

El paisaje se caracteriza por pastizales y cercanía de las viviendas con regiones selváticas profusas (Figura 12).

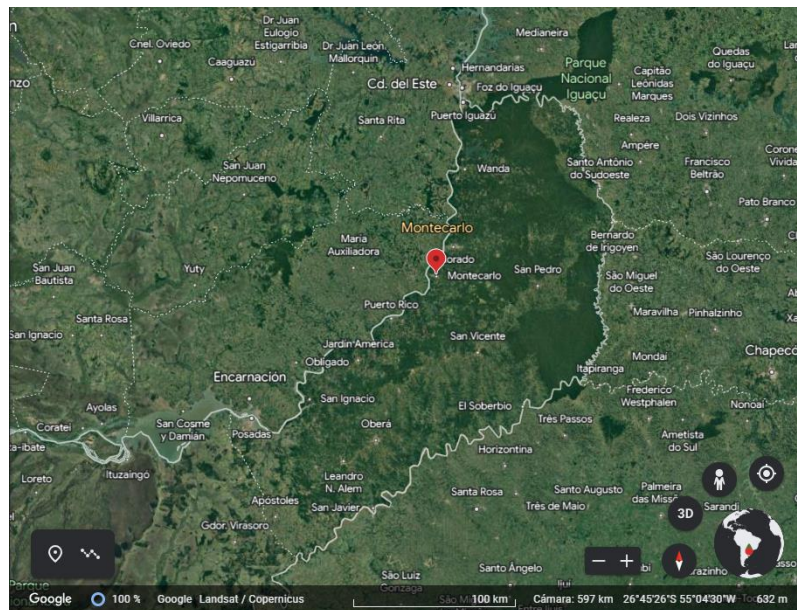


Figura 11. Ubicación geográfica de la ciudad de Montecarlo; el barrio Guatambú se localiza en la zona sur.





Figura 12. Fotografías de viviendas y caminos del barrio Guatambú, Montecarlo.

- **Reserva Yabotí**

El muestreo se ejecutó por captura manual, durante 2 días consecutivos en diciembre del año 2019, en sitios con presencia humana.

Comprende una amplia región de aproximadamente 236.000 has. de zona selvática, formando una masa boscosa densa compuesta por especies vegetales de gran y mediano porte y por helechos (Figura 14). Abarca parte de los departamentos de Guaraní y San Pedro (Figura 13), y en su extensión se ubican varios Parques Provinciales como es el Moconá y el Esmeralda, sumados a otras Reservas.

El principal objetivo es la preservación del hábitat y la conservación de especies en peligro de extinción, como el yagareté, el tapir, el puma, entre otros. La Reserva de Biósfera Yabotí está bajo la administración de la Dirección General de Ecología (Sistema de Información de Biodiversidad (SIB) de la Administración de Parques Nacionales (APN). Reserva de Biósfera Yaboty. https://sib.gob.ar/area/MISIONES*YB*YABOTY).

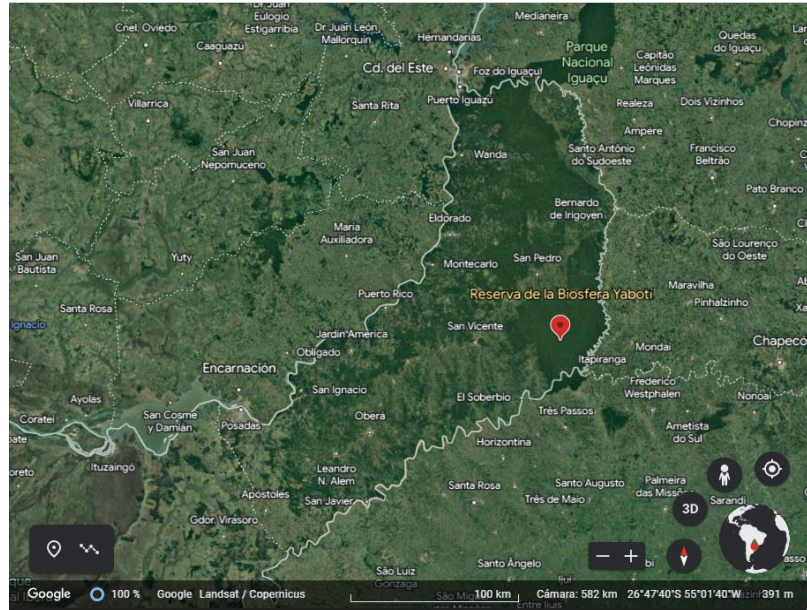


Figura 13. Ubicación geográfica de la Reserva Yabotí.

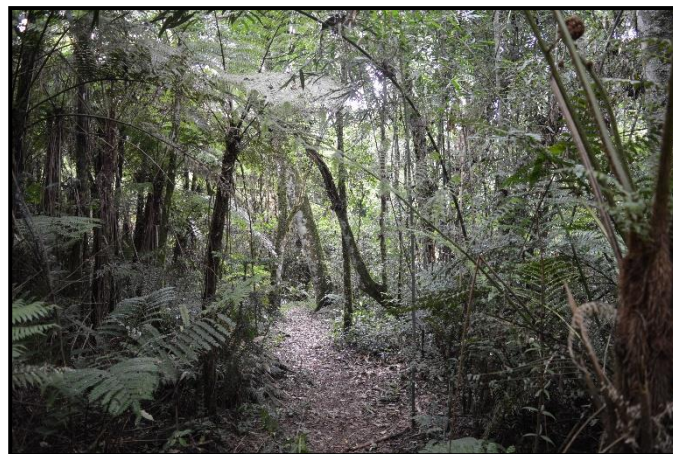


Figura 14. Fotografías de la Reserva Yabotí.

4.2. Identificación de los mosquitos, conformación y procesamiento de *pools*

Los mosquitos colectados de manera manual en redes durante las campañas de vigilancia, se colocaron en conservadoras con hielo seco. Luego fueron transferidos a crioviales adecuadamente rotulados y depositados dentro de termos con nitrógeno líquido; en estas condiciones fueron trasladados hacia el INEVH, donde se almacenaron en conservadoras a -70 °C hasta el momento de su identificación.

4.2.1. Identificación taxonómica y armado de *pools*

Los ejemplares se identificaron hasta el nivel de especie en la mayoría de los casos, – aquellos individuos que estaban dañados fueron clasificados hasta género- bajo lupa estereoscópica utilizando platina fría de acuerdo a la clave de Darsie (1985). Se separaron en base a la clasificación taxonómica y al sitio y día de captura y se colocaron en tubos *ependorf* de 1,5 mililitros (ml) para formar los *pools*, los cuales estuvieron compuestos por 1 o hasta 35 individuos de la misma categoría taxonómica. Las hembras grávidas se analizaron de manera independiente.

4.2.2. Procesamiento de *pools*

A cada *pool* se le adicionó 0,5 ml de suspensión de albúmina-bovina (0,75%), penicilina y streptomycin (1%), fungizona (1%) en buffer fosfato salino (PBS)(pH 7,4) y se maceró por 2 minutos en equipo OMNI Bead Ruptor 24 (Omni International). Posteriormente, se centrifugaron las suspensiones obtenidas a 14.000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue trasvasado a crioviales rotulados, los cuales se conservaron a -86°C para luego ser analizados molecularmente por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) luego de retrotranscripción de la muestra (*RT-PCR*).

4.3. Extracción de ARN

Para el posterior análisis de los *pools* y detección de agentes virales del orden *Bunyavirales* por medio de técnicas moleculares se llevó a cabo la extracción del ARN de la suspensión de homogenato de mosquitos mediante la técnica de Trizol con TRI REAGENT TM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) (Trizol). Para ello, se tomó una alícuota de 100 µl de la suspensión de mosquitos en 900 µl de Trizol en viales tipo *ependorf* de 1,5 ml estériles. La solución resultante se homogeneizó en agitador orbital y

se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente. A cada vial se agregó 200 µl de cloroformo frío (4°C) y nuevamente las muestras se colocaron en agitador orbital durante 15 segundos, luego se dejaron reposar durante 1 minuto a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 13.200 rpm durante 15 minutos y a 4°C. La fase acuosa fue transvasada a tubo tipo *eppendorf* estéril de 1,5 ml y se adicionó 500 µl de isopropanol a 4°C y se mezcló por inversión. Las muestras fueron incubadas durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego centrifugadas a 13.200 rpm por 10 minutos y a 4°C. El sobrenadante se descartó por inversión y se agregó 800 µl de etanol 70 % frío (4°C) seguido de un pulso de centrifuga. El sobrenadante fue descartado por inversión. El precipitado se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente se añadió 20 µl de agua despirogenada libre de ARNasa y se agitó suavemente para favorecer la re-suspensión del ARN.

Las muestras fueron almacenadas a –86° C hasta su posterior utilización.

4.4. Detección de agentes virales

4.4.1. Amplificación del genoma viral por RT-PCR

La amplificación del genoma viral de *Orthobunyavirus* en las muestras de mosquitos se llevó a cabo mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa, tras retrotranscripción de la muestra (*RT-PCR*). Primeramente se realizó la transcripción del ARN viral en ADN complementario o copia (ADNc), a través de una transcriptasa reversa. Luego, el fragmento de ADNc obtenido fue sometido a varios ciclos de amplificación utilizando los cebadores específicos BCS82C y BCS332V (Tabla II) (Kuno *et al.* 1996), obteniéndose amplicones de 251 pares de bases (pb).

Tabla II. Secuencia de los cebadores utilizados para la detección de *Orthobunyavirus*

BCS82C	ATGACTGAGTTGGAGTTTCATGATGTTCGC
BCS332V	TGTTCTGTTGCCAGGAAAAT

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. En todos los procesos de amplificación se utilizaron termocicladores marca *MyCycler™*

Bio Rad (*ThermalCycler, Bio Rad, Foster City, CA, USA*) y tubos de reacción de 0,2 ml de pared delgada estériles, libres de DNAsas y RNAsas. En la Tabla III se describen los reactivos y volúmenes utilizados. Los tubos conteniendo la mezcla de reacción fueron sometidos a las siguientes condiciones de ciclado:

50°C 60" + 94°C 2' + [94°C 1' + 56°C 1' + 72°C 1'] x 39 + 72°C 5' + 15°C ∞

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

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

4.4.2. Análisis de los ácidos nucleicos

Los productos de la reacción *RT-PCR* fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Se prepararon los geles en buffer tris-acetato-EDTA (TAE) 1X, teñidos con SYBR® Safe 10.000 X (*Invitrogen Eugene, Oregon, USA*) al 10%. A cada muestra se le agregó 3 µl de la solución de carga al 1% (azul de bromofenol+glicerol+agua) y luego se sembraron 30 µl en cada calle del gel. El marcador de peso molecular empleado fue un patrón de ADN comercial de 1kb (*Invitrogen, Eugene, Oregon, USA*) a una concentración

de 100 nanogramos/ μ l. La electroforesis se desarrolló en una solución de buffer TAE 1X a una intensidad de corriente eléctrica de 80 voltios durante aproximadamente 60 minutos, visualizándose los productos de amplificación con transiluminador de luz LED con la debida protección del operador.

No se obtuvieron fragmentos de ADN del tamaño esperado por lo que no fue posible continuar con la purificación de los ácidos nucleicos y la secuenciación genómica.

5. RESULTADOS

5.1. Captura e identificación de los mosquitos

En total se capturaron 1024 ejemplares de mosquitos que fueron identificados a nivel de especie o género. Se conformaron y analizaron 152 *pools*, de 1 a 30 individuos de acuerdo al sitio de captura. En las Tablas IV, V, VI, VII y VIII pueden visualizarse estos resultados de las especies capturadas por sitio y el número de *pools* conformados.

Tabla IV. Especies/Taxón capturadas, número de individuos y *pools* obtenidos de las capturas realizadas en la Reserva privada Yacutinga, en marzo del 2019.

Especie o taxón	Total mosquitos (<i>pools</i>)
<i>Aedes serratus</i>	28 (6)
<i>Aedes serratus</i> (grávida)	2 (2)
<i>Anopheles</i> sp.	9 (1)
<i>Coquillettidia nigricans</i>	37 (5)
<i>Coquillettidia nigricans</i> (grávida)	1 (1)
<i>Culex</i> sp.	4 (1)
<i>Haemagogus leucocelaenus</i>	82 (10)
<i>Haemagogus leucocelaenus</i> (grávida)	6 (5)
<i>Limatus durhamii</i>	13 (3)
<i>Mansonia</i> sp.	1 (1)
<i>Ochlerotatus</i> sp.	1 (1)
<i>Psorophora</i> sp.	2 (1)
<i>Sabethes albiprivus</i>	1 (1)
<i>Sabethes aurescens</i>	39 (5)
<i>Sabethes chloropterus</i>	3 (1)
<i>Sabethes</i> sp.	5 (2)
<i>Trichoprosopon pallidiventer</i>	6 (4)
<i>Trichoprosopon</i> sp.	1 (1)
TOTAL	241 (51)

Tabla V. Especies/Taxón capturadas, número de individuos y *pools* obtenidos de las capturas realizadas en el Parque Provincial Piñalito, en marzo del 2019.

Especie o taxón	Total mosquitos (<i>pools</i>)
<i>Aedes serratus</i>	8 (3)
<i>Anopheles sp.</i>	1 (1)
<i>Haemagogus leucocelaenus</i>	12 (6)
<i>Limatus durhamii</i>	1 (1)
<i>Ochlerotatus sp.</i>	8 (3)
<i>Psorophora cilipes</i>	1 (1)
<i>Psorophora ferox</i>	46 (7)
<i>Psorophora sp.</i>	25 (6)
<i>Psorophora sp. (gravida)</i>	1 (1)
<i>Sabethes aurescens</i>	270 (14)
<i>Trichoprosopon pallidiventer</i>	76 (7)
<i>Trichoprosopon sp.</i>	14 (2)
<i>Wyeomyia aponoroma</i>	36 (5)
TOTAL	499 (57)

Tabla VI. Especies/Taxón capturadas, número de individuos y *pools* obtenidos de las capturas realizadas en Parque Provincial Piñalito, en diciembre del 2019.

Especie o taxón	Total mosquitos (<i>pools</i>)
<i>Coquillettidia nigricans</i>	1 (1)
<i>Haemagogus leucocelaenus</i>	2 (2)
<i>Limatus sp.</i>	3 (1)
<i>Psorophora ferox</i>	1 (1)
<i>Sabethes aurescens</i>	88 (7)
<i>Sabethes chloropterus</i>	2 (2)
<i>Trichoprosopon pallidiventer</i>	17 (3)
<i>Trichoprosopon simile</i>	2 (1)
<i>Wyeomyia aponoroma</i>	26 (4)
<i>Wyeomyia serratoria</i>	12 (2)
TOTAL	154 (24)

Tabla VII. Especies/Taxón capturadas, número de individuos y *pools* obtenidos de las capturas realizadas en Montecarlo, Guatambú, en diciembre del 2019.

Especie o taxón	Total mosquitos (<i>pools</i>)
<i>Limatus durhamii</i>	9 (3)
<i>Sabethes aurescens</i>	47 (2)
<i>Sabethes sp.</i>	17 (1)
<i>Trichoprosopon pallidiventer</i>	1 (1)
<i>Wyeomyia oblita</i>	2 (1)
<i>Wyeomyia serratoria</i>	2 (1)
TOTAL	78 (9)

Tabla VIII. Especies/Taxón capturadas, número de individuos y *pools* obtenidos de las capturas realizadas en la Reserva Yabotí, en diciembre del 2019.

Especie o taxón	Total mosquitos (<i>pools</i>)
<i>Haemagogus leucocelaenus</i>	1 (1)
<i>Limatus durhamii</i>	5 (1)
<i>Psorophora ferox</i>	1 (1)
<i>Sabethes albiprivus</i>	2 (2)
<i>Sabethes aurescens</i>	24 (2)
<i>Trichoprosopon pallidiventer</i>	8 (1)
<i>Trichoprosopon simile</i>	4 (1)
<i>Wyeomyia serratoria</i>	7 (2)
TOTAL	52 (11)

5.2. Detección de ARN viral por RT-PCR

El resultado del análisis para la detección de virus pertenecientes al género *Orthobunyavirus*, fue negativo para todos los *pooles* de mosquitos efectuados (152) según la metodología empleada.

En la figura 15 se visualiza la fotografía resultado de la corrida electroforética para el género *Orthobunyavirus*.

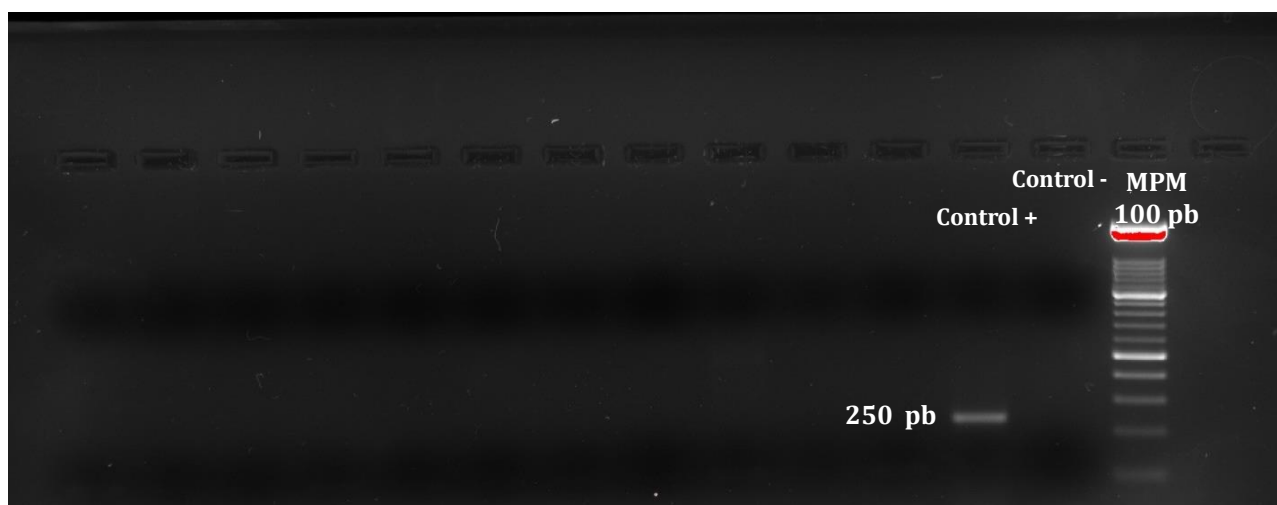


Figura 15. Fotografía del revelado de gel luego de la corrida electroforética correspondiente al resultado de RT-PCR para la búsqueda de virus del género *Orthobunyavirus*. La anteúltima calle visualiza el revelado del marcador de peso molecular.

6. DISCUSIÓN

Recientemente algunos arbovirus, como el virus del dengue (DENV), el virus de la fiebre amarilla (YFV), el virus Zika (ZIKV), el virus Chikungunya (CHIKV) y el virus Oropouche (OROV), han cobrado relevancia debido a la reemergencia global de los mismos (Romero-Alvarez & Escobar 2018; Sakkas *et al.* 2018). Sumado a esto, la emergencia de otros agentes virales en América del Sur causantes de síndromes febriles en la población refuerza la necesidad de realizar campañas de vigilancia de Arbovirus en regiones subtropicales, a fin de no subestimar aquellos patógenos que podrían resultar potencialmente emergentes y epidémicos para la población (Hontz *et al.* 2015; Navarro *et al.* 2016).

Estas campañas de vigilancia entomoviológica se centran en la identificación de potenciales vectores y en la detección de arbovirus entre ellos. Estos análisis son de gran importancia porque podrían dar evidencia de arbovirus en ecosistemas alterados como áreas selváticas, debido, por ejemplo, al avance antropogénico sobre dichas áreas con el fin de ampliar la frontera agrícola.

En el mundo, hay distribuidas más de 3500 especies de mosquitos, de las cuales sólo son capaces de transmitir diferentes arbovirus unas 150 especies (Kain *et al.* 2022). Se han realizado relevamientos sobre las especies de mosquitos que pueden hallarse en determinadas regiones, y según Sang y cols. (2017) es posible encontrar unas 40 especies diferentes pertenecientes a 6 géneros, de un total de 69.000 mosquitos capturados, en dos zonas ecológicas diferentes de Kenia, África. Mientras que estudios realizados por Cano-Pérez y cols. (2023) mencionan la recolección de 11.566 ejemplares diferenciados en 63 especies, y 13 géneros, en la región Caribe de Colombia.

En este trabajo final, se evaluaron distintos puntos de la provincia de Misiones, donde el ambiente con abundante vegetación, el clima templado/húmedo, la gran variedad de hospedadores y la alta actividad turística hacen que se convierta en un foco de ruptura del ciclo enzoótico-arboviral entre vectores (mosquitos) y hospedadores (vertebrados no humanos), exponiendo a la población a brotes endémicos.

Del material colectado, en general, los mosquitos capturados se lograron identificar hasta la categoría taxonómica de especie, sin embargo, en algunos casos los ejemplares se encontraban deteriorados y la identificación sólo fue posible hasta género.

En este trabajo se identificaron 1.024 especímenes recolectados en los diferentes puntos de la provincia de Misiones, lo que resultó en un total de 14 especies, pertenecientes a 12 géneros, siendo el sitio de captura con mayor diversidad la Reserva Yucatinga con un total de 8 especies y 11 géneros clasificadas entre los 241 ejemplares capturados en la zona. La especie más abundante en dicha reserva fue *Haemagogus leucocelaenus* (88), seguida de *Sabethes aurescens* (39) y *Coquillettidia nigricans* (38), incluidas las hembras grávidas.

El sitio de muestreo con el mayor número de ejemplares capturados fue el Parque provincial Piñalito, en la campaña realizada en marzo de 2019. Allí se atraparon 499 individuos correspondientes a 8 especies y 9 géneros, siendo la especie más predominante *Sabethes aurescens* (270), seguida de los géneros *Trichoprosopon* (90) y *Psorophora* (73), siendo dentro de éstos las especies *Tr. pallidiventer* y *Ps. ferox* las más abundantes. En la captura realizada durante diciembre del mismo año, la cantidad de mosquitos fue menor (154), lo cual podría estar asociado a factores naturales, como variaciones normales en la población de mosquitos a lo largo del tiempo debido a cambios en las condiciones climáticas o en la ecología local, o incluso a la variabilidad en la recopilación de muestras.

Posiblemente, el número de mosquitos capturados en Montecarlo y en la Reserva Yabotí es menor al del Parque Piñalito porque el ambiente estaba más modificado por la actividad antrópica. En ambos puntos de muestreo (Montecarlo y en la Reserva Yabotí) la especie predominante fue *Sabethes aurescens*, con 47 y 24 individuos recolectados para las locaciones de Montecarlo y Yabotí, respectivamente.

Las especies *Limatus durhamii*, *Sabethes aurescens*, y *Trichoprosopon pallidiventer* se encontraron en todos los sitios de muestreo.

La búsqueda de *Orthobunyavirus* por medio de las técnicas descriptas, arrojó un resultado negativo en todos los *pools* constituidos.

En relación a ello, Tauro y cols. (2009; 2015) han identificado casos de *Orthobunyavirus* como el virus Bunyamwera, virus Cache Valley y virus Kairi, tanto en personas como en animales, en las provincias de Córdoba y Santa Fe, respectivamente (Tauro *et al.* 2009, 2012, 2015b). Tauro y cols. (2015a) lograron recuperar una cepa de virus Bunyamwera de *Ochlerotatus albifasciatus* recolectados en la provincia de Córdoba.

Especies correspondientes al género *Ochlerotatus*, como *Ochlerotatus scapularis* y *Oc. albifasciatus*, y a la especie *Culex quinquefasciatus* pueden transmitir *Orthobunyavirus* según los trabajos anteriormente mencionados (Tauro *et al.* 2015a).

Si bien los resultados de este trabajo fueron negativos y no se detectaron ortobunyavirus entre los mosquitos tomados de los puntos de recolección en la provincia de Misiones, no es factible descartar a partir de esto la posibilidad de que exista circulación de estos agentes virales en Misiones, o en el resto de Argentina, ya que algunos virus correspondientes al género analizado en el presente trabajo pueden transmitirse por la especie *Aedes serratus*, vector del virus Oropouche, encontrada en la Reserva Yucatinga y en el Parque Provincial Piñalito. Además, especies dentro de los géneros *Ochlerotatus* (*Ochlerotatus serratus*) y *Culex* (*Culex quinquefasciatus*), hallados en la Reserva Yucatinga y en el Parque Piñalito, son transmisoras del virus Oropouche (Pereira-Silva *et al.* 2021).

Es necesario llevar a cabo estudios de vigilancia entomo-virológicas tanto en Misiones, ya que por su biodiversidad y clima selvático provee un entorno favorable para la reproducción de vectores y el establecimiento de ciclos enzoóticos de Arbovirus, como a nivel nacional, debido a la evidencia demostrada de casos aislados o brotes por Arbovirus. Sumado a la vigilancia, es de gran importancia la prevención mediante el control de vectores y las medidas de protección personal (Sakkas *et al.* 2018).

En esta tesis, se obtuvo conocimiento acerca de las especies de mosquitos presentes en el área de Misiones y lo diversas que pueden llegar a ser. De este modo se hace evidente la importancia sanitaria de algunas especies halladas y su rol como potenciales vectores de arbovirus implicados en brotes de enfermedades como la fiebre amarilla, cuyo virus puede ser transmitido por vectores como *Haemagogus leucocelaenus* y *Sabethes aurescens*, o *Psorophora ferox*, que además funciona como vector del virus de la Encefalitis Equina Venezolana y del virus Mayaro (Cano *et al.* 2022; Muñoz & Navarro 2012). Las especies mencionadas fueron halladas en la mayoría de los sitios de captura, excepto *Sa. aurescens* que se encontró en todas las locaciones.

Esperamos que estos resultados contribuyan a la comprensión de la dinámica de las enfermedades arbovirales y los mecanismos de transmisión.

7. CONCLUSIÓN

En general, en todos los muestreos realizados en la provincia de Misiones se encontró una gran diversidad a nivel de especie de mosquitos, muchas de las cuales son de importancia sanitaria como *Aedes serratus*, capaz de transmitir el virus Oropouche (*Orthobunyavirus*), *Sabethes aurescens*, vector del virus de la fiebre amarilla (*Orthoflavivirus*) al igual que algunas especies del género *Ochlerotatus* y las especies *Haemagogus leucocelaenus* y *Psorophora ferox*, transmisoras del virus Mayaro (*Alphavirus*) (Cano et al. 2022; Muñoz & Navarro 2012).

En la Reserva Yucatinga se encontró el mayor número de taxones, 8 identificados hasta especie y 11 agrupados por género, siendo las más abundantes *Haemagogus leucocelaenus*, *Sabethes aurescens* y *Coquillettidia nigricans*, participando las dos primeras en la transmisión del virus de la fiebre amarilla (Weaver et al. 2017).

En el Parque provincial Piñalito se encontraron 8 especies y 10 agrupamientos de individuos por género en marzo del 2019, mientras que en diciembre se capturaron individuos correspondientes a 9 especies y 7 géneros, de los cuales en su mayoría, tomando en cuenta los géneros, coincidieron en ambas campañas. La especie más numerosa fue *Sabethes aurescens*.

En la Reserva Yabotí fueron identificadas 8 especies y en Montecarlo, 5 especies y 4 géneros. En ambos sitios, *Sabethes aurescens* fue la especie predominante entre los mosquitos capturados.

A pesar de la obtención de resultados negativos para la detección de Arbovirus pertenecientes al género *Orthobunyavirus* en los ejemplares analizados, este trabajo aporta información acerca de la gran diversidad de especies de mosquitos que pueden localizarse en los sitios muestreados, lugares altamente turísticos y/o que funcionan como puntos de referencia para la investigación del mantenimiento de los ciclos de transmisión enzoótica de diferentes Arbovirus, y del rol de los culícidos como potenciales vectores.

Es de importancia aclarar que, aunque no se hayan encontrado agentes arbovirales del género mencionado entre los mosquitos colectados esto no implica que no exista circulación del mismo o posibilidad de que ocurra el ingreso en el área, por lo que es importante continuar con la vigilancia entomo-epidemiológica para anteceder la posibilidad de un brote.

BIBLIOGRAFÍA

Abudurexiti, A., Adkins, S., Alioto, D., Alkhovsky, S. V., Avšič-Županc, T., Ballinger, M. J., Bente, D. A., Beer, M., Bergeron, É., Blair, C. D., Briese, T., Buchmeier, M. J., Burt, F. J., Calisher, C. H., Cháng, C., Charrel, R. N., Choi, I. R., Clegg, J. C. S., de la Torre, J. C., de Lamballerie, X., & Kuhn, J. H. (2019). Taxonomy of the order Bunyavirales: update 2019. *Archives of virology*, 164(7), 1949–1965. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04253-6>

Anderson, C. R., Spence, L., Downs, W. G., & Aitken, T. H. (1961). Oropouche virus: a new human disease agent from Trinidad, West Indies. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 10, 574–578. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1961.10.574>

Barbosa, N. S., Concha, J. O., & daSilva, L.P. (2022). Bunyavirus. *Encyclopedia of Infection and Immunity*, Vol. 2, 207-218. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818731-9.00037-9>

Beaty, B. J., & Calisher, C. H. (1991). Bunyaviridae--natural history. *Current topics in microbiology and immunology*, 169, 27–78.

Cano, M. E., Martí, G. A., Alencar, J., Freitas Silva, S. O., & Micieli, M. V.(2022) Categorización por puntuación de especies de mosquitos (Diptera: Culicidae) relacionadas con las epizootias de fiebre amarilla en Argentina, *Revista de Entomología Médica* , Volumen 59, Número 5, páginas 1766–1777, <https://doi.org/10.1093/jme/tjac079>

Cano-Pérez, E., González-Beltrán, M., Ampuero, J. S., Gómez-Camargo, D., Morrison, A. C., & Astete, H. (2023). Prevalencia de poblaciones de mosquitos en la región Caribe de Colombia con importantes implicaciones para la salud pública. *Medicina Tropical y Enfermedades Infecciosas* ; 8(1):11. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed8010011>

Casel, M. A., Park, S. J., & Choi, Y. K. (2021). Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus: emerging novel phlebovirus and their control strategy. *Experimental & molecular medicine*, 53(5), 713–722. <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00610-1>

Charrel, R. N., Gallian, P., Navarro-Mari, J. M., Nicoletti, L., Papa, A., Sánchez-Seco, M. P., Tenorio, A., & de Lamballerie, X. (2005). Emergence of Toscana virus in Europe. *Emerging infectious diseases*, 11(11), 1657–1663. <https://doi.org/10.3201/eid1111.050869>

Contigiani, M. S., Diaz, L. A., Spinsanti, L. I., & Tauro, L. B. (2016). Capítulo 13: "Arbovirus" en Berón, C. M., Campos, R. E., Gleiser, R. M., Díaz-Nieto, L. M., Salomón, O. D. & Schweigmann N., *Investigaciones sobre mosquitos de Argentina*, 1a ed., 157-178. Universidad Nacional de Mar del Plata, Mar del Plata, Argentina.

Conway, M. J., Colpitts, T. M., & Fikrig, E. (2014). Role of the Vector in Arbovirus Transmission. *Annual review of virology*, 1(1), 71–88. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085513>

Dias, H. G., Dos Santos, F. B., & Pauvolid-Corrêa, A. (2022). An Overview of Neglected Orthobunyaviruses in Brazil. *Viruses*, 14(5), 987. <https://doi.org/10.3390/v14050987>

Evans, A. B., Winkler, C. W., & Peterson, K. E. (2021). Orthobunyaviruses (*Peribunyaviridae*) en Bamford, D. H. & Zuckerman, M. *Encyclopedia of Virology*, 4a ed., 654-665. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.21542-2>.

Ferreira-de-Lima, V. H., Andrade, P. D. S., Thomazelli, L. M., Marrelli, M. T., Urbinatti, P. R., Almeida, R. M. M. S., & Lima-Camara, T. N. (2020). Silent circulation of dengue virus in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) resulting from natural vertical transmission. *Scientific reports*, 10(1), 3855. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60870-1>

Flora y Fauna - Ministerio de Turismo (2023). Misiones. Consultado el 17 de octubre de 2023. Disponible en: <https://misiones.tur.ar/flora-y-fauna/>

Gómez-Camargo, D. E., Egurrola-Pedraza, J. A., Cruz, C. D., Popuche, D., Ochoa-Díaz, M. M., Guevara, C., Silva, M., Abente, E. J., & Ampuero, J. S. (2021). Evidence of Oropouche Orthobunyavirus Infection, Colombia, 2017. *Emerging infectious diseases*, 27(6), 1756–1758. <https://doi.org/10.3201/eid2706.204405>

Hontz, R. D., Guevara, C., Halsey, E. S., Silvas, J., Santiago, F. W., Widen, S. G., Wood, T. G., Casanova, W., Vasilakis, N., Watts, D. M., Kochel, T. J., Ebihara, H., & Aguilar, P. V. (2015). Itaya virus, a Novel Orthobunyavirus Associated with Human Febrile Illness, Peru. *Emerging infectious diseases*, 21(5), 781–788. <https://doi.org/10.3201/eid2105.141368>

Hubálek, Z., Rudolf, I., & Nowotny, N. (2014). Arboviruses pathogenic for domestic and wild animals. *Advances in virus research*, 89, 201–275. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800172-1.00005-7>

Hughes, H. R., Russell, B. J., & Lambert, A. J. (2020). Genetic Characterization of Frijoles and Chilibre Species Complex Viruses (Genus Phlebovirus; Family Phenuiviridae) and Three Unclassified New World Phleboviruses. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 102(2), 359–365. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.19-0717>

Ikegami, T. (2012). Molecular biology and genetic diversity of Rift Valley fever virus. *Antiviral research*, 95(3), 293–310. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2012.06.001>

Kain, M. P., Skinner, E. B., Athni, T. S., Ramirez, A. L., Mordecai, E. A., & van den Hurk, A. F. (2022). Not all mosquitoes are created equal: A synthesis of vector competence experiments reinforces virus associations of Australian mosquitoes. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 16(10): e0010768. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010768>

Kenney, J. L., & Brault, A. C. (2014). The role of environmental, virological and vector interactions in dictating biological transmission of arthropod-borne viruses by mosquitoes. *Advances in virus research*, 89, 39–83. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800172-1.00002-1>

Kuhn, J. H., Adkins, S., Alkhovsky, S. V., Avšič-Županc, T., Ayllón, M. A., Bahl, J., Balkema-Buschmann, A., Ballinger, M. J., Bandte, M., Beer, M., Bejerman, N., Bergeron, É., Biedenkopf, N., Bigarré, L., Blair, C. D., Blasdel, K. R., Bradfute, S. B., Briese, T., Brown, P. A., Bruggmann, R., & Økland, A. L. (2022). 2022 taxonomic update of phylum Negarnaviricota (Riboviria: Orthornavirae), including the large orders Bunyavirales and Mononegavirales. *Archives of virology*, 167(12), 2857–2906. <https://doi.org/10.1007/s00705-022-05546-z>

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. <https://doi.org/10.1128/jcm.34.5.1184-1188.1996>

Kuno, G., & Chang, G. J. (2005). Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. *Clinical microbiology reviews*, 18(4), 608–637. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.608-637.2005>

Kuno, G., Mackenzie, J. S., Junglen, S., Hubálek, Z., Plyusnin, A., & Gubler, D. J. (2017). Vertebrate Reservoirs of Arboviruses: Myth, Synonym of Amplifier, or Reality?. *Viruses*, 9(7), 185. <https://doi.org/10.3390/v9070185>

Muñoz, M., & Navarro, J. C. (2012). Virus Mayaro: un arbovirus reemergente en Venezuela y Latinoamérica [Mayaro: a re-emerging Arbovirus in Venezuela and Latin America]. *Biomedica : revista del Instituto Nacional de Salud*, 32(2), 286–302. <https://doi.org/10.1590/S0120-41572012000300017>

Navarro, J. C., Giambalvo, D., Hernandez, R., Auguste, A. J., Tesh, R. B., Weaver, S. C., Montañez, H., Liria, J., Lima, A., Travassos da Rosa, J. F., da Silva, S. P., Vasconcelos, J. M., Oliveira, R., Vianez, J. L., Jr, & Nunes, M. R. (2016). Isolation of Madre de Dios Virus (Orthobunyavirus; Bunyaviridae), an Oropouche Virus Species Reassortant, from a Monkey in Venezuela. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 95(2), 328–338. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0679>

Organización Panamericana de la Salud (2022). Capítulo 1: Emergencia y ciclo de vida de los

arbovirus en *Recomendaciones para la detección y el diagnóstico por laboratorio de infecciones por arbovirus en la Región de las Américas*. Consultado el 17 de Octubre de 2023. Disponible en: <https://doi.org/10.37774/9789275325872>.

Pereira-Silva, J. W., Riós-Vela'squez, C. M., Lima, G. R., Marialva dos Santos, E. F., Belchior, H. C. M., Luz, S. L. B., Gomes Naveca, F., & Costa Pessoa, F. A. (2021). Distribution and diversity of mosquitoes and Oropouche-like virus infection rates in an Amazonian rural settlement. *PLoS ONE* 16(2): e0246932. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246932>

Resino, S. (2012). *Bunyavirus*. Epidemiologia Molecular de Enfermedades Infecciosas. Consultado el 17 de Octubre de 2023. Disponible en: <http://epidemiologiamolecular.com/bunyavirus/>

Romero-Alvarez, D., & Escobar, L. E. (2018). Oropouche fever, an emergent disease from the Americas. *Microbes and infection*, 20(3), 135–146. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2017.11.013>

Rückert, C., & Ebel, G. D. (2018). How Do Virus-Mosquito Interactions Lead to Viral Emergence?. *Trends in parasitology*, 34(4), 310–321. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2017.12.004>

Sakkas, H., Bozidis, P., Franks, A., & Papadopoulou, C. (2018). Oropouche Fever: A Review. *Viruses*, 10(4), 175. <https://doi.org/10.3390/v10040175>

Sang, R., Arum, S., Chepkorir, E., Mosomtai, G., Tigoi, C., Sigei, F., Wesula Lwande, O., Landmann, T., Affognon, H., Ahlm, C., & Evander, M. (2017) Distribution and abundance of key vectors of Rift Valley fever and other arboviruses in two ecologically distinct counties in Kenya. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 11(2): e0005341. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005341>

SIB: Sistema de Información de Biodiversidad. Parque provincial Piñalito. Consultado el 17 de Octubre de 2023. Disponible en: https://sib.gob.ar/area/MISIONES*PI*PI*ALITO

SIB: Sistema de Información de Biodiversidad. Reserva de Biósfera Yaboti. Consultado el 17 de Octubre de 2023. Disponible en: https://sib.gob.ar/area/MISIONES*YB*YABOTY

Tauro, L. B., Almeida, F. L., & Contigiani, M. S. (2009). First detection of human infection by Cache Valley and Kairi viruses (Orthobunyavirus) in Argentina. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 103(2), 197–199. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.09.004>

Tauro, L. B., Venezuela, R. F., Spinsanti, L. I., Konigheim, B. S., & Contigiani, M. S. (2012). First case of human infection with a Bunyamwera serogroup virus in Argentina. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 54(1), 98–

99. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.01.023>

Tauro, L. B., Batallan, G. P., Rivarola, M. E., Visintin, A., Berrón, C. I., Sousa, E. C., Jr, Diaz, L. A., Almiron, W. R., Nunes, M. R., & Contigiani, M. S. (2015a). Detection of Orthobunyavirus in mosquitoes collected in Argentina. *Medical and veterinary entomology*, 29(3), 338–343. <https://doi.org/10.1111/mve.12121>

Tauro, L. B., Rivarola, M. E., Lucca, E., Mariño, B., Mazzini, R., Cardoso, J. F., Barrandeguy, M. E., Teixeira Nunes, M. R., & Contigiani, M. S. (2015b). First isolation of Bunyamwera virus (Bunyaviridae family) from horses with neurological disease and an abortion in Argentina. *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 206(1), 111–114. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2015.06.013>

Weaver, S. C., & Reisen, W. K. (2010). Present and future arboviral threats. *Antiviral research*, 85(2), 328–345. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.008>

Weaver, S. C., Charlier, C., Vasilakis, N., & Lecuit, M. (2018). Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. *Annual review of medicine*, 69, 395–408. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-050715-105122>

Windhaber, S., Xin, Q., & Lozach, P. Y. (2021). Orthobunyaviruses: From Virus Binding to Penetration into Mammalian Host Cells. *Viruses*, 13(5), 872. <https://doi.org/10.3390/v13050872>

Yacutinga Lodge: Alto Iguazú - Disfrutar La Selva. Consultado el 17 de octubre de 2023. Disponible en: <https://www.yacutinga.com/>