

Universidad de la República.

PEDECIBA – Biología

Estado actual de la circulación de hantavirus en Uruguay.

Lic. Andrés Cabrera

Orientadora: Dra. Adriana Delfraro.

Tribunal: Dr. Juan Cristina, Dra. Pilar Moreno y Dr. José Guerrero.

Realizada en: Sección Virología, Facultad de Ciencias. Universidad de la República.

Contenido

Resumen	1
1. Introducción	3
1.1 Taxonomía del género Hantavirus	3
1.2 Género <i>Hantavirus</i> : Estructura del virión y organización del genoma viral	3
1.3 Ciclo de replicación viral	5
1.4 Historia y descubrimiento de los Hantavirus	8
1.5 Hantavirus y sus reservorios naturales	10
1.6 Hantavirus del viejo mundo y sus reservorios naturales	11
1.7 Hantavirus del nuevo mundo y sus reservorios naturales	12
1.8 Soricomorfos: ¿nuevos o antiguos reservorios para los hantavirus?	17
1.9 Los murciélagos como potenciales reservorios de hantavirus	19
1.10 Origen e historia evolutiva de los hantavirus	20
1.11 Los modelos de distribución de especies aplicado al estudio de los reservorios de hantavirus	24
1.12 Características de las infecciones por hantavirus	26
1.13 Hantavirus en Uruguay –antecedentes	30
2. Objetivo General y Específicos	33
3. Materiales y Métodos	34
3.1 Selección de los lugares de trapeo de roedores	34
3.2 Trapeo e identificación de micromamíferos. Procesamiento de las muestras	34
3.3 Análisis retrospectivo de tejidos de roedores	35
3.4 Detección de anticuerpos anti-hantavirus en roedores	36
3.5 Extracción de ARN total de los órganos de los roedores seropositivos	37
3.6 Realización de Ensayos Moleculares: RT-PCR	38
3.7 Secuenciación y análisis filogenéticos	39
3.8 Distribución potencial de especies reservorio de hantavirus	40
4. Resultados	41
4.1 Descripción de las áreas de trapeo	41
4.2 Distribución de roedores por especie y por sitio de captura	45
4.3 Detección de roedores seropositivos para Hantavirus	47
4.4 Infección por Hantavirus en roedores. Amplificación parcial del genoma viral	49
4.5 Infección por Hantavirus en casos de SPH en humanos. Amplificación del genoma viral	49
4.6 Comparación de secuencias y análisis filogenético de los hantavirus de roedores y humanos	51
4.7 Modelos de Distribución Potencial para <i>Oligoryzomys flavescens</i>	59

5. Discusión	64
5.1 Infección por hantavirus en roedores del Uruguay	64
5.2 Detección de genoma viral en muestras de roedores seropositivos y muestras Humanas	70
5.3 Comparación de secuencias y análisis filogenéticos	71
5.4 Distribución potencial del reservorio (<i>Oligoryzomys flavescens</i>)	78
6. Conclusiones	84
8. Perspectivas	86
7.Bibliografía	87
Anexo 1	99
Anexo 2	100
Anexo 3	101
Anexo 4	102

Resumen.

Las virosis emergentes representan uno de los principales problemas para la salud pública a nivel mundial. Estos agentes infecciosos generalmente se encuentran asociados a un conjunto de especies de animales silvestres y ante ciertas condiciones son capaces de transmitirse y producir enfermedades en el hombre. Un ejemplo de estas enfermedades emergentes a nivel mundial son las causadas por los virus del género *Hantavirus* (Familia *Bunyaviridae*). Las hantavirus son virus envueltos y poseen un genoma de ARN polaridad negativa formado por tres segmentos. Los principales hospedadores naturales de estos virus son los roedores (Orden *Rodentia*), en los cuales genera una infección persistente. En el hombre producen la fiebre hemorrágica con síndrome renal y la nefropatía epidémica, transmitida por los roedores de las subfamilias *Murinae* y *Sigmodontinae* y el Síndrome Pulmonar por Hantavirus (SPH) asociado a los roedores de la subfamilia *Sigmodontinae*, este último reconocido como una zoonosis de alto impacto sanitario en las Américas desde 1993. Uruguay no escapa a la compleja situación que vive América Latina sobre esta afección, es así que en 1997 se reportan los primeros casos de SPH en el país, asociados a la variante viral Andes Central Plata. En el año 2003 se reporta al ratón colilargo chico (*Oligoryzomys flavescens*) como el principal reservorio en Uruguay y se caracterizan genéticamente los primeros hantavirus autóctonos. Las variantes virales circulantes en Uruguay tanto en roedores como en casos de SPH fueron identificadas como Andes Central Plata y Lechiguanas, estudios posteriores permitieron determinar por métodos serológicos y moleculares la circulación de otro hantavirus en Uruguay, el virus Juititaba, asociado a dos especies reservorio: el ratón colilargo grande (*Oligoryzomys nigripes*) y el ratón hocicudo (*Oxymycterus nasutus*).

El presente trabajo tiene como objetivo general estudiar la circulación de hantavirus en roedores y en los casos clínicos de SPH en Uruguay.

El abordaje experimental consistió en realizar campañas de trapeo de roedores en lugares más probables de infección y en áreas geográficas al norte del río Negro. La captura de los roedores y posteriormente su procesamiento se realizaron siguiendo las normas de bioseguridad internacionales. En el laboratorio se investigó la presencia de anticuerpos IgG anti hantavirus en la sangre de los roedores por la técnica de ELISA, para la búsqueda de genomas virales se realizó una extracción de ARN total a partir de diferentes órganos de los roedores seropositivos y muestras de suero de casos confirmados de SPH. Posteriormente se procedió a la retrotranscripción del ARN viral a ADN copia y su posterior amplificación por reacción en cadena de la polimerasa. Las secuencias virales obtenidas a partir de los amplicones se compararon entre sí y con secuencias de la región utilizando diferentes métodos de análisis filogenéticos. Con los 55 registros de presencia de la especie *O. flavescens* se utilizó el programa MaxEnt, para realizar un conjunto de mapas de la posible distribución de la especie en cuestión.

Se confirmó que la especie *O. flavescens* es el reservorio principal de hantavirus en Uruguay, en concordancia con trabajos previos. Adicionalmente se obtuvo un ejemplar de *Akodon azarae* seropositivo, especie que no había sido descrita previamente como potencial reservorio de hantavirus en Uruguay. Las prevalencias de infección en *O. flavescens* en la mayoría de las localidades relevadas fueron significativamente mayores a las reportadas previamente en el país. El análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoácidas de los segmentos S y M de las muestras de roedores y casos de SPH comprobaron que la mayor parte de los hantavirus circulantes en Uruguay son variantes relacionadas con la cepa Lechiguanas (Argentina) y las variantes Andes Central Plata. Los análisis de secuencias y filogenéticos indican que existe un alto grado de homología entre los genotipos Lechiguanas/Andes Central Plata, Bermejo y Ñeembucú. En el presente trabajo se identificó por primera vez al virus Juititaba asociado a un caso de SPH ocurrido en el departamento de Maldonado. Se obtuvo un mapa de

distribución potencial de *O. flavescens*, principal reservorio de hantavirus en nuestro país, lo que nos permitió identificar las zonas más idóneas de encontrar a la especie reservorio causante de hantavirosis. Los análisis de distribución potencial de roedores seropositivos para hantavirus revelaron que las variables ambientales que más aportaron a los modelos fueron la temperatura media anual y la altitud. La incidencia de la temperatura en la viabilidad de la partícula viral en el ambiente, puede contribuir a explicar entre otros factores la actual distribución de las hantavirosis en nuestro país. Esta información es un insumo importante, que permitirá orientar las políticas de prevención a las zonas de “alto riesgo” contribuyendo a la vigilancia y control de esta zoonosis.

1. Introducción.

1.1 Taxonomía del género *Hantavirus*.

La familia *Bunyaviridae* fue descubierta originalmente en 1943, agrupando un conjunto de virus transmitidos por artrópodos (arbovirus) que compartían características morfológicas, genéticas y antigénicas similares (Smithburn et al., 1946).

Hoy en día esta familia está compuesta por cinco géneros: *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus* y *Tospovirus*. Los géneros *Orthobunyavirus*, *Nairovirus* y *Phlebovirus* son transmitidos por artrópodos (mosquitos, garrapatas, flebotomos). Todos los géneros mencionados infectan animales, *Tospovirus* es el único género de la familia que infecta plantas (Prins & Goldbach, 1998).

Hantavirus constituye un género particular dado que son virus cuyo reservorio principal son los roedores, aunque a partir del 2000 se han descrito nuevos reservorios como musarañas, topes y murciélagos (Jonsson et al., 2010; Weiss et al., 2012).

En el último informe del año 2014 el Comité Internacional de Taxonomía de Virus enumera noventa y siete especies dentro de la familia, donde el género *Orthobunyavirus* posee cuarenta y ocho especies. Veinticuatro especies componen el género *Hantavirus*, siete especies corresponden al género *Nairovirus*, nueve especies pertenecen al género *Phlebovirus* y, por último, nueve especies conforman el género *Tospovirus* (www.ictvonline.org).

1.2 Género *Hantavirus*: Estructura del virión y organización del genoma viral.

El genoma de los hantavirus está formado por ARN monocatenario de polaridad negativa, dividido en tres segmentos y la suma de dichos segmentos varía entre 12-13 mil pares de bases según el género (Schmaljohn et al., 1985). Cada segmento contiene en su secuencia un marco abierto de lectura (ORF), flanqueados por regiones no codificantes en los extremos 3' y 5' (Plyusnin et al., 1996). Estas regiones no codificantes del genoma contienen nucleótidos complementarios en ambos extremos para formar una estructura “*panhandle*” que funciona como promotor viral y es muy importante tanto en la replicación del genoma como en su transcripción (Hussein et al., 2011).

Los tres segmentos que componen el genoma del virus se clasifican según su tamaño en segmento pequeño o S (*small*) de unos 1.700 nucleótidos, el segmento mediano o M (*medium*) con unos 3.600 nucleótidos y el segmento de mayor tamaño denominado largo o L (*large*) compuesto de 6.500 nucleótidos, tomando como referencia el virus Hantaan (figura 1). Cada uno de estos segmentos codifica para una o varias proteínas virales (Hussein et al., 2011). El segmento S es el encargado de codificar la

nucleoproteína, el segmento M codifica el precursor de las glicoproteínas Gc y Gn y, por último el segmento L es el encargado de codificar la ARNpolimerasa-ARNdependiente. En algunos virus del género *Hantavirus* como el virus Tula, se ha encontrado que el segmento S posee otro marco de lectura que codifica para una proteína no estructural (NNs), la cual sería un antagonista del interferón celular (Jaaskelainen et al., 2008; Virtanen et al., 2010). Encontrar la presencia de proteínas no estructurales codificadas por el segmento S son típicas en los distintos géneros de la familia *Bunyaviridae*, un ejemplo es el virus Bunyawera perteneciente al género *Orthobunyavirus* (Jaaskelainen et al., 2008; van Knippenberg et al., 2013).

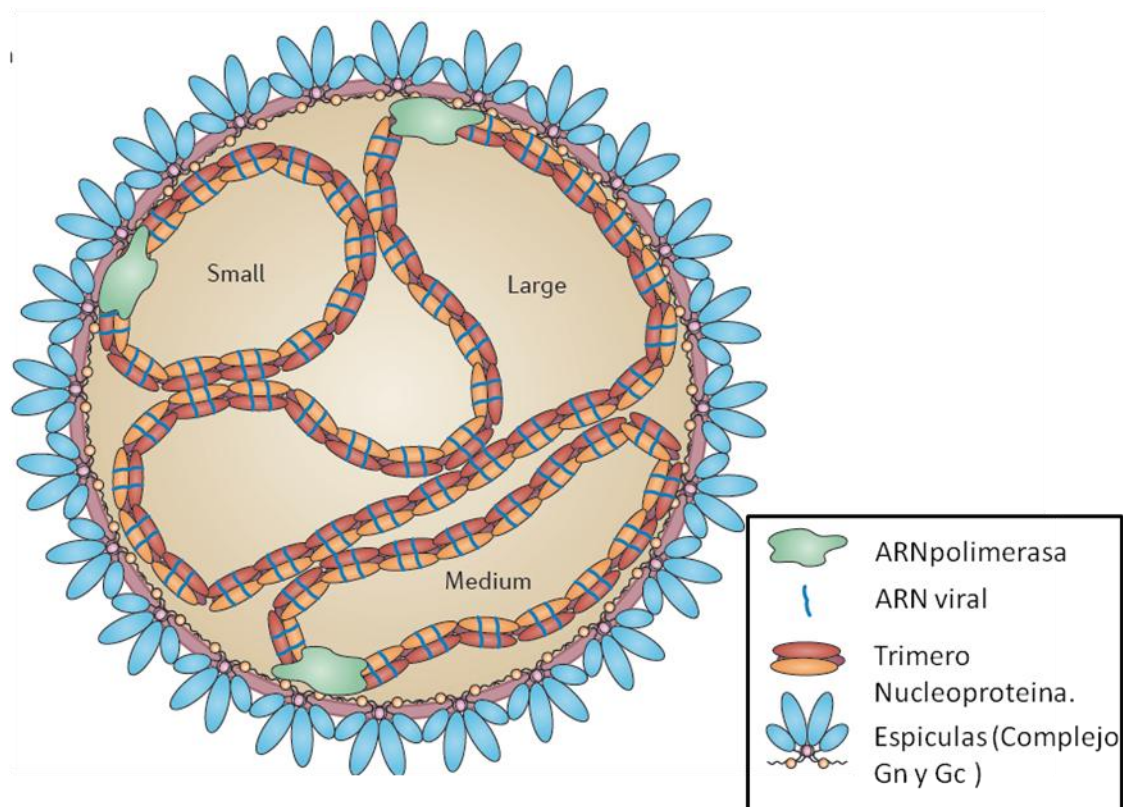


Figura 1. Esquema de la partícula viral de Hantavirus. Modificado de Vaheri et al.,(2013).

Los viriones tienen forma casi esférica y con un rango de tamaño entre 120-160 nm y poseen una envoltura lipídica entre 5-7 nm de espesor (Hepojoki et al., 2012; Huiskonen et al., 2010). En dicha envoltura se insertan las glicoproteínas Gc y Gn, las cuales forman complejos que se visualizan como espículas a la microscopía electrónica (Hepojoki et al., 2010). Cada una de las espículas es formada por cuatro unidades de cada glicoproteína, las cuales sobresalen de la bicapa lipídica 12 nm (Hepojoki et al., 2010).

La composición del virión consta de un 50% de proteínas, entre un 20-30% de lípidos, un 7% de carbohidratos y solamente un 2% de material genético (Huiskonen et al., 2010).

1.3 Ciclo de replicación viral.

Los *Hantavirus* infectan células endoteliales, macrófagos, dendríticas y linfocitos a través de la unión de las glicoproteínas virales con receptor de superficie celular del huésped. El primer paso en la replicación viral es la adsorción, que consta en el reconocimiento de las partículas virales con los receptores de las células huésped (figura 2) (Mackow & Gavrilovskaya, 2001). En este caso las proteínas encargadas en ese reconocimiento son las glicoproteínas Gn y Gc (Mackow & Gavrilovskaya, 2001). Varios estudios sobre estas proteínas concuerdan en la necesidad de ambas para que el virus pueda unirse a los receptores celulares y pueda ingresar a la célula (Jin et al., 2002; Mackow & Gavrilovskaya, 2001; Mackow & Gavrilovskaya, 2009). Los receptores celulares implicados en este proceso son las integrinas (proteínas que ayudan a la célula a la unión con la matriz extracelular), aunque estudios sobre el virus Prospect Hill (virus no patógeno) encontraron que existe una relación entre la integrina B1 y la entrada del virus al citosol celular. También se demostró que varios hantavirus patógenos que causan enfermedades en los humanos se asocian a la integrina B3 (Mackow & Gavrilovskaya, 2009).

El segundo paso es la penetración: entrada del virus al citosol celular. Los hantavirus entran al citosol celular mediante endocitosis (figura 2). Gracias a la formación de vesículas recubiertas por clatrina y luego su acidificación, se generan cambios conformacionales en las proteínas Gn y Gc que llevan a la fusión de membranas entre el virus y la vesícula endosomal (Jin et al., 2002; Lozach et al., 2010). Una vez ocurrida esta fusión, el material genético y las proteínas como la ARNpolimerasa viral quedan expuestas en el citoplasma celular. Varios estudios sobre la proteína Gn tanto con anticuerpos monoclonales, sensibilidad a las proteasas y aplicación de detergentes comprobaron no solo su participación en la unión con los receptores celulares sino también la colaboración en la unión de membranas, así como sus cambios conformacionales a PH bajos (Lozach et al., 2010; Vaheri et al., 2013).

El tercer paso es la síntesis de proteínas y las nuevas copias de los genomas virales. Para ello la ARNpolimerasa-ARNdependiente inicia la transcripción primaria para dar lugar a los ARN mensajeros virales de los segmentos S, M y L. Al igual que los virus influenza, los hantavirus utilizan el secuestro de *caps* de los ARN mensajeros (ARNm) del hospedador como cebadores para el inicio de la transcripción pero este evento ocurre a nivel de citoplasma y no a nivel del núcleo celular como ocurre en el virus influenza (Bouloy et al., 1978; Flick et al., 2003). Este procesamiento de los ARNm ocurre en regiones selectas del citoplasma celular conocidas como fábrica o cuerpos de procesamiento, en inglés "*processing bodies*" donde es llevado a cabo por la ARN polimerasa viral (Mir et al., 2008). La traducción de los ARN mensajeros virales S y L se produce en los ribosomas libres, y la traducción del transcripto M se produce en los ribosomas unidos a la membrana, que están ubicados en retículo endoplásmico rugoso (Fontana et al., 2008; Ravkov & Compans, 2001; Virtanen et al., 2010). Para los

hantavirus, la nucleoproteína N es la más abundante y se sintetiza en los primeros pasos de la infección (Kaukinen et al., 2001). La nucleoproteína juega un papel clave en el ciclo de vida del virus, como por ejemplo en la traducción, el tráfico y el montaje de las nuevas partículas virales. Existen evidencias que sugieren que la proteína N interactúa y puede modular la respuesta inmune del huésped cuando comienza la infección (Kaukinen et al., 2005). El precursor de la glicoproteína es proteolíticamente procesado en Gn y Gc durante la importación al retículo rugoso (Hepojoki et al., 2010). La mayoría de los hantavirus posee un motivo conservado de aminoácidos situado en el extremo carboxi-terminal de la proteína Gn que se presume ser un sitio de escisión proteolítica (Hepojoki et al., 2012). Luego de la glicosilación de Gn y Gc en el retículo rugoso, estas proteínas son trasladadas al aparato de Golgi (Hepojoki et al., 2012) .

En general, para los virus de polaridad negativa el pasaje de la transcripción a la replicación implica un cambio de la función de la ARNpolimerasa para realizar nuevos genomas virales. Aún no se han descrito cuales son los procesos implicados para que se produzca este cambio de funcionabilidad en la polimerasa viral pero aparentemente se requieren varios factores tanto de la célula huésped como del propio virus. Aunque aún no se ha demostrado, se sugiere que la nucleoproteína pueda tener un papel de anti-terminador, donde la unión de esta proteína con los ARN virales sirve como señal para realizar la síntesis completa de dichas moléculas (Garcin et al., 1995).

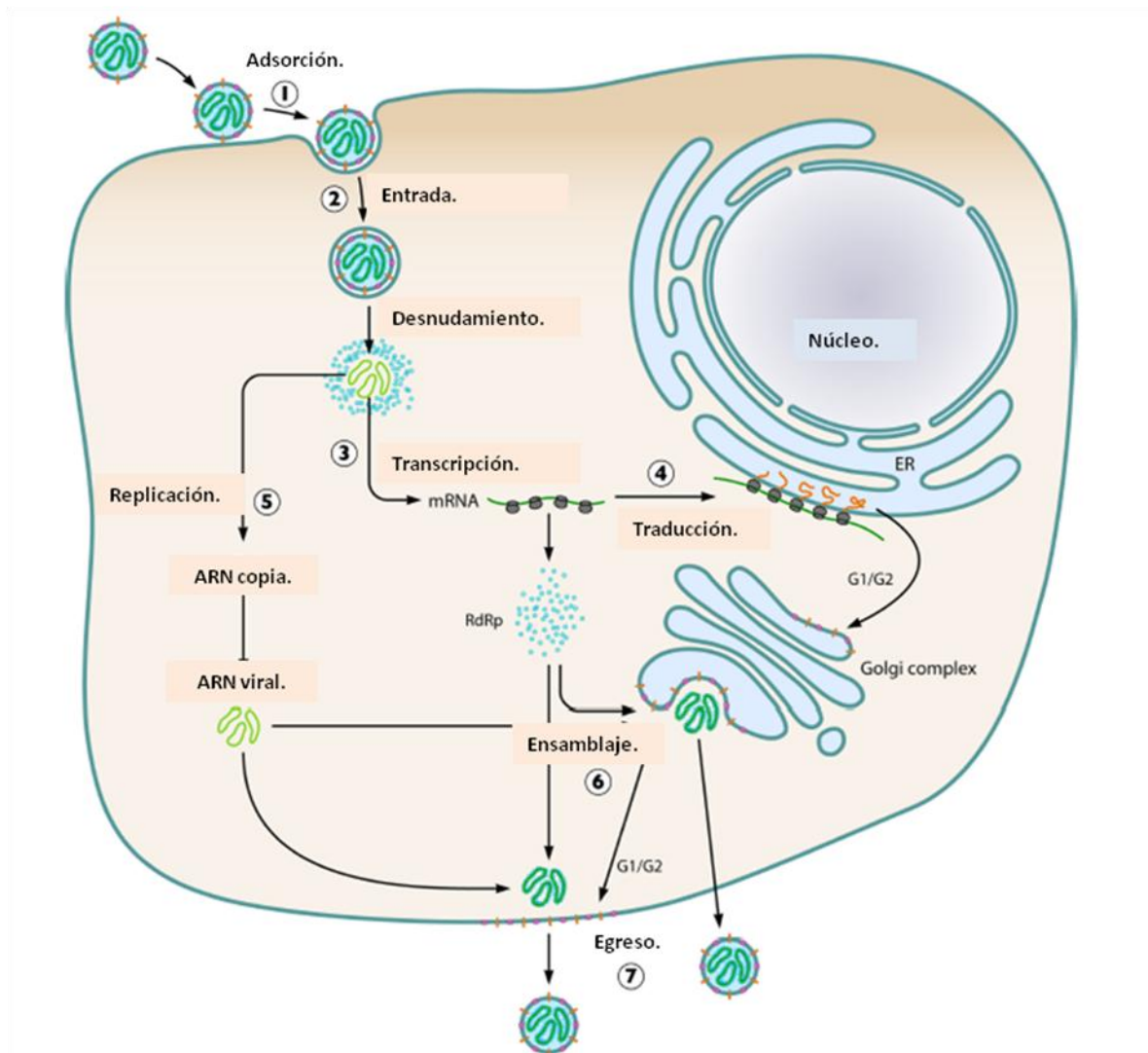


Figura 2. Esquema del ciclo replicativo del género *Hantavirus*. Modificado de Vaheri et al., 2013.

Los ARN virales recién sintetizados se asocian con la nucleoproteína a través del reconocimiento específico entre su zona carboxi-terminal con la región no codificante de los mismos, formando así el complejo ribonucleoproteico. Este complejo es transportado mediante microtúbulos, gracias a la proteína de transporte dienina, hacia el retículo rugoso-aparato de Golgi (Fontana et al., 2008). La polimerasa viral presenta un tamaño entre 237-459 kilodalton y no presenta procesamientos ni modificaciones post-traduccionales (Jin & Elliott, 1993). También se demostró en el género *Orthobunyavirus* que tiene la capacidad de endonucleasa, sugiriendo que esta enzima sería la encargada de capturar la caperuza presentes en los mensajeros celulares (van Knippenberg et al., 2013).

Con todos los actores cercanos al complejo retículo rugoso-aparato de Golgi se inicia el ensamblaje y maduración de las partículas virales. Una de las características del género es que la nueva progenie emerge por brotamiento, pasando del lumen del Golgi y brotando a nivel de la membrana plasmática. Estos virus, a diferencia de otros como los orthomyxovirus y paramyxovirus, carecen de una proteína de matriz que participe

en el ensamblaje de las nuevas partículas virales. En este caso ocurre una interacción directa entre la ribonucleocapside y las proteínas transmembrana (Hussein et al., 2011).

1.4 Historia y descubrimiento de los hantavirus.

Durante la guerra de Corea (1951-1953), conflicto bélico que enfrentó a las dos naciones del Norte y del Sur, las Naciones Unidas desplegaron más de 300.000 tropas en los límites de dichos países(figura 3). Esas tropas fueron afectadas por una extraña enfermedad la cual provocaba manifestaciones hemorrágicas y una mortalidad de un 5% a 10%. La enfermedad se denominó fiebre hemorrágica coreana, que más adelante se conocería como Fiebre Hemorrágica con Síndrome Renal (FHSR) (Lee et al., 1982). Se presenta inicialmente con síntomas similares a la influenza durante aproximadamente una semana, seguido por una fase marcada por trombocitopenia, a menudo con hemorragia petequiral, y provocando estado de “shock” en aproximadamente 10% a 15% de los pacientes. Las muertes fueron principalmente debido a la insuficiencia renal. Una enfermedad similar (epidemia de fiebre hemorrágica) había sido reconocida muchos años antes en el noreste de China y también había sido descrita en el este de la antigua Unión Soviética (Smadel, 1953). Luego de considerables esfuerzos, que tomaron cerca de 25 años, fue posible aislar el virus de un roedor muy común en la zona perteneciente a la especie *Apodemus agrarius* y se propuso a este roedor como fuente de infección para el hombre y principal reservorio natural del virus (Lee et al., 1982). En ese momento, todos los virus conocidos de la familia *Bunyaviridae* eran transmitidos por artrópodos, pero el descubrimiento de un virus transmitido por roedores que compartía muchas características típicas de esta familia, llevó a establecer un nuevo género dentro de la misma: el género *Hantavirus*. El virus prototípico fue nombrado virus Hantaan, debido al nombre del río donde comenzaron los primeros casos en la república de Corea (LeDuc et al., 1986).

Más adelante, las investigaciones demostraron que los casos urbanos en Corea, China y Japón eran ocasionados por otro tipo de virus con características similares: el virus de Seúl. Para este virus se demostró que los reservorios naturales son la rata noruega (*Rattus norvegicus*) y la rata negra (*Rattus rattus*). Estos roedores se distribuyen a nivel mundial, y diversos estudios serológicos de muestras de ratas en ciudades portuarias demostraron altos índices de seroprevalencia para el virus Seúl (Cueto et al., 2008; Sejio et al., 2003; Weissenbacher et al., 1996).



Figura 3. Memorial de las tropas caídas en la Guerra de Corea.

Durante más de 50 años, en los países de la región de Escandinavia (Noruega, Suecia y Finlandia), se había descrito una enfermedad denominada nefropatía epidémica (NE). Después del aislamiento del virus de Hantaan, el virus demostró cierta capacidad de reaccionar con sueros de pacientes con nefropatía epidémica en esa región. Este cruce antigénico permitió identificar un nuevo hantavirus, el virus Puumala como la causa de esta patología y estudios posteriores en búsqueda de su reservorio determinaron que el topillo rojo, *Myodes glareolus* (antes denominado *Clethrionomys glareolus*) era su reservorio (Niklasson & LeDuc, 1987).

En el año 1945 ocurrió en la India el primer hallazgo de un hantavirus en una especie de musaraña arborícola (*Suncus murinus*). El virus Thottapalayam fue el primer virus descrito para la familia *Soricidae* (Insectívora), en la actualidad se han descrito varios hantavirus relacionados con dichas familias (Carey et al., 1971; Guo et al., 2013; Kang et al., 2010; Kang et al., 2011; Song et al., 2007; Song et al., 2009).

En 1985 se aisló el Virus Prospect Hill, el primer hantavirus identificado en América. Dicho virus se asocia a un roedor autóctono de Norteamérica: el ratón de campo *Microtus pennsylvanicus*. Sin embargo, dicho virus no se asocia con patología en humanos (Lee et al., 1985).

En 1993, en la región de Four Corners, en el límite de los estados de Utah, Arizona, Nuevo México y Colorado (Estados Unidos), ocurrió un brote epidémico en una reserva indígena, en dicho brote se pudieron observar manifestaciones clínicas similares a una gripe con fiebre y dolores de cabeza, musculares y escalofríos. Rápidamente los pacientes evolucionaban hacia una enfermedad respiratoria baja con infiltrados pulmonares bilaterales, insuficiencia respiratoria, shock y muerte. Esta evolución letal transcurría entre 2 a 10 días después de la aparición de los primeros síntomas en el 75% de los casos. Luego de exhaustivos estudios se identificó el agente etiológico de

esta nueva entidad clínica, llamada síndrome pulmonar por hantavirus (SPH). El virus identificado fue un hantavirus, el cual se le denominó Sin Nombre virus. Más adelante se identificó al roedor reservorio de este virus, el ratón ciervo (*Peromyscus maniculatus*). En los años siguientes se demostró la circulación de al menos de diez hantavirus distintos en América del Norte (Nichol et al., 1993).

Casi simultáneamente se detectaron los primeros hantavirus asociados a SPH en Sudamérica. En 1993 en la ciudad de San Pablo, Brasil, se diagnostican los primeros casos de SPH y el virus identificado fue denominado Juquitiba (Vasconcelos et al., 1997). En la primavera de 1996 ocurre un brote de SPH en El Bolsón (provincia de Río Negro, Argentina) con una elevada letalidad y reporte de transmisión interhumana. El virus implicado se identificó como miembro del género *Hantavirus* y se lo denominó virus Andes. Virus similares se encontrarían posteriormente en todos los países de la región, constituyendo uno de los principales problemas para la salud pública en las Américas (López et al., 1997).

1.5 Hantavirus y sus reservorios naturales.

Existen cerca de 2.200 especies de roedores en todo el mundo, lo que representa aproximadamente el 42% de todas las especies de mamíferos. Los roedores presentan una extraordinaria variedad de adaptaciones ecológicas y fisiológicas a todos los medios terrestres, llegando a vivir en zonas con elevada altitud, climas extremos y regiones con poca, moderada o amplia cobertura vegetal. Los roedores se encuentran en zonas urbanas, semiurbanas y rurales. Muchas especies se volvieron sinantrópicas, es decir, capaces de convivir con los seres humanos, por ejemplo, las ratas (Musser, 2005).

Las especies de roedores descritas como reservorios de hantavirus se clasifican en dos grandes familias: la familia Muridae, subfamilia Murinae (ratas y ratones), que se distribuyen en el Viejo Mundo; y la familia Cricetidae, que se divide en tres subfamilias: Arvicolinae (topillos y lemmings en Eurasia y América del Norte), Neotominae y Sigmodontinae (ratas y ratones del Nuevo Mundo) (Musser, 2005).

Aunque cada hantavirus se asocia predominantemente con un roedor específico y una determinada ubicación geográfica, las infecciones de otros roedores por el mismo virus pueden ocurrir por transmisión inter-específica (*spillover o derrame*). Estos eventos secundarios se producen de vez en cuando en la naturaleza dentro de una región geográfica y han sido documentados para diversos virus. Se presume que una infección de este tipo sería incidental y no es claro si el virus establece una infección persistente en estos hospedadores, ni si los mismos participan en el mantenimiento del virus en la naturaleza. Los cambios ambientales que se traducen en un mayor solapamiento de hábitat pueden crear más encuentros inter-específicos y, por tanto, favorecer los eventos de spillover (Firth et al., 2012; Nichol et al., 1993; Raboni et al., 2009).

1.6 Hantavirus del viejo mundo y sus reservorios naturales.

Se denominan “hantavirus del viejo mundo” a los virus que circulan principalmente en Europa, África y Asia y están asociados a dos grandes subfamilias de roedores: la *Murinae* (familia *Muridae*) y la *Arvicolinae* (familia *Cricetidae*). Los roedores de la subfamilia *Murinae* se distribuyen en Eurasia y África, a excepción de las especies cosmopolitas *Rattus rattus*, *Rattus norvegicus* y *Mus musculus*, que se propagaron a través de varios continentes después de haber sido introducidos por los colonizadores europeos. Los roedores murinos son los reservorios más importantes de hantavirus que causan la denominada Fiebre Hemorrágica con Síndrome Renal en el Viejo Mundo (LeDuc et al., 1986; Xiao et al., 1993).

Los principales géneros de roedores involucrados en el mantenimiento en la naturaleza de los hantavirus del viejo mundo, son el género *Apodemus*, distribuido en Asia y Europa, asociado con los virus Hantaan, Amur y Soochong en Asia y los virus Dobrava y Saaremaa en Europa. Además el género *Rattus* distribuido mundialmente pero originario del Este asiático es el principal reservorio del virus Seúl; el género *Bandicota* en Asia es el portador del virus Tailandia, el virus Puumala asociado al género *Myodes* en Europa y los roedores del género *Microtus* en Europa que albergan el virus Tula (tabla 1) (Hugot et al., 2006; Jiang et al., 2007; Niklasson and LeDuc, 1987; Plyusnin et al., 1994a; Vapalahti et al., 2003).

Tabla 1. Principales Hantavirus del Viejo Mundo con sus reservorios.

Virus.	Reservorio.	Distribución Geográfica.	Enfermedad.
Dobrava	<i>Apodemus flavicollis</i>	Balcanes	Nefropatía epidémica
Saaremaa	<i>Apodemus agrarius</i>	Europa	Nefropatía epidémica
Hantaan	<i>Apodemus agrarius</i> .	Sudeste asiático	Fiebre Hemorrágica
Seoul	<i>Rattus rattus/ norvegicus</i>	Todo el mundo	Fiebre Hemorrágica
Thailand	<i>Bandicota indica</i>	Sudeste asiático	No patógeno
Puumala	<i>Myodes glareolus</i>	Rusia, centro de Europa y Balcanes	Nefropatía epidémica
Khavarovsk	<i>Microtus fortis</i>	Rusia	No patógeno
Tula	<i>Microtus arvalis</i>	Centro y este de Europa	No patógeno
Topografov	<i>Lemmus sibiricus</i>	Rusia	No patógeno

La distribución cosmopolita de las especies del género *Rattus* originó el establecimiento de los virus Seúl y Hantaan en zonas no endémicas como Norteamérica y América del Sur (Cueto et al., 2008).

Actualmente el virus Dobrava es la causa de graves cuadros de FHSR en los Balcanes y en el sur de Europa, los reservorios de este virus son *Apodemus agrarius* y *Apodemus flavicollis*. Sin embargo, se pueden encontrar linajes distintos del virus Dobrava en roedores de estas dos especies. Los casos clínicos relacionados con Dobrava se producen en las zonas rurales e involucran a pobladores con ocupaciones relacionadas con la actividad agraria (Avsic-Zupanc et al., 1999).

La nefropatía epidémica (NE) es una forma más leve de HFRS asociada principalmente con el hantavirus Puumala. La circulación de este virus está documentada para Escandinavia y Europa al oeste de los montes Urales. El virus tiene como reservorio al topillo rojo, *Myodes glareolus* (Brummer-Korvenkontio et al., 1980). En Suecia y Finlandia, el número de casos en residentes rurales generalmente presenta un pico en noviembre y enero, estas epidemias locales suelen reflejar el aumento de las densidades de topillo rojo locales. El virus Puumala está presente también en Bélgica, el noreste de Francia, y Alemania, donde el período de actividad se produce en otoño y primavera coincidiendo con la dinámica, el tamaño y la estructura de las comunidades de reservorio (Escutenaire et al., 2001; Plyusnin et al., 1994a; Sironen et al., 2001).

Se ha documentado además la circulación de otros virus no patogénicos como el Virus Topografov, cuya distribución abarca Rusia y el círculo polar ártico norte, donde se encuentra su principal reservorio el roedor *Lemmus sibiricus* (Vapalahti et al., 1999); se le suma en esa región rusa el hantavirus Khavarovsk cuyo reservorio principal es *Microtus frotis* (Kariwa et al., 1999). Otro virus no patogénico cuya distribución abarca el centro y Este de Europa es el hantavirus Tula asociado al reservorio *Microtus arvalis* (Korva et al., 2009). Finalmente en el sudeste asiático encontramos el virus no patogénico Thailand asociado a la especie *Bandicota indica* (Hugot et al., 2006).

1.7 Hantavirus del nuevo mundo y sus reservorios naturales.

Los hantavirus del nuevo mundo se pueden asociar a tres grupos de roedores de la familia *Cricetidae*; aquellos pertenecientes a las subfamilias *Neotominae* y *Arvicolinae* distribuidos en Norteamérica y parte de América Central y los de la subfamilia *Sigmodontinae* mayoritariamente distribuidos en América del Sur (tabla 2) (Hjelle & Torres-Pérez, 2010; Jonsson et al., 2010).

La rápida radiación adaptativa que ocurrió luego de la invasión a Sudamérica de los sigmodontinos a través del istmo de Panamá hace cien mil millones de años dio lugar a la alta diversidad de los roedores sudamericanos contemporáneos, desplazando otras especies locales (Engel et al., 1998; Stepan et al., 2004).

El primer hantavirus autóctono encontrado en las Américas fue el virus Prospect Hill, dicho virus está asociado a la subfamilia *Arvicolinae*. Su principal reservorio es el ratón *Microtus pennsylvanicus*, distribuido en toda Norteamérica (Parrington & Kang, 1990). Con este virus comparten un alto grado de identidad nucleotídica el virus Isla Vista y el

virus Blodland Lake, ambos asociados a ratones microtinos *Microtus californicus* y *Microtus ochrogaster* (Song et al., 1995). Ninguno se asocia a patología en el humano.

A partir del descubrimiento del virus Sin Nombre, el cual se ha asociado en estudios recientes a una especie diferente del género *Peromyscus* (*P. sonoriensis*) en Estados Unidos (USA) han sido identificadas seis nuevas variantes de hantavirus en América del Norte (Monroe et al., 1999; Nichol et al., 1993; Plyusnin & Morzunov, 2001).

El virus Monongahela circula en el centro y oeste de los USA y parte de Canadá, asociado al reservorio *Peromyscus maniculatus* (Monroe et al., 1999).

Conjuntamente con el virus Monongahela circulan el virus New York, variante viral asociada a casos de SPH en el noreste de los USA y el virus no patogénico Blue River; ambas variantes comparten como reservorio el roedor *Peromyscus leucopus* (Monroe et al., 1999; Plyusnin & Morzunov, 2001).

Otro virus circulante en la región, es El Moro Canyon asociado a *Reithrodontomys megalotis*, dicha variante no está vinculada hasta el momento a enfermedad en humanos (Hjelle & Torres-Pérez, 2010).

Se han reportado además otras variantes no patogénicas en dicha región, un ejemplo de ello son los virus Limestone Canyon y Muleshoe. El virus Limestone Canyon se asocia con el hospedero *Peromyscus boylii*, ubicándose al suroeste de USA, en tanto el virus Muleshoe se asocia con *Sigmodon hispidus* en el sur de USA (Kariwa et al., 2011; Rawlings et al., 1996).

El virus Muleshoe y el virus Black Creek Canal comparten el mismo reservorio, pero éste último es el principal agente etiológico de los casos de SPH en el estado de Florida, USA. El reservorio de ambos virus (*Sigmodon hispidus*) se considera una rama basal de los sigmodontinos sudamericanos (Rawlings et al., 1996).

En el oeste de México se ha identificado recientemente al hantavirus Playa de Oro, asociado al roedor *Oryzomys mexicanus* (Chu et al., 2008). Otros dos virus encontrados en el país azteca son el virus Montano cuyo principal reservorio es *Peromyscus beatae* y el virus Carrizal asociado al roedor *Microtus smichrasti*. Finalmente se ha reportado al virus Huitzilac el cual tiene dos especies reservorio, *Reithrodon megalotis* y *Reithrodon smichrasti* (Kariwa et al., 2011)

Tabla 2. Hantavirus de América del Norte con sus correspondientes reservorios.

Virus.	Reservorio.	Distribución Geográfica.
Sin Nombre	<i>Peromyscus sonoriensis</i>	Centro,USA
Monongahela	<i>Peromyscus maniculatus</i>	Centro y Oeste USA, Canadá
Limestone Canyon	<i>Peromyscus boylii</i>	Suroeste,USA
Muleshoe	<i>Sigmodon hispidus</i>	Sur, USA
El Moro Canyon	<i>Rheithrodontomys megalotis</i>	USA
Prospect Hill	<i>Microtus pennsylvanicus</i>	Norteamérica
Isla Vista	<i>Microtus californicus</i>	Oeste, Usa y México
Montano	<i>Peromyscus beatae</i>	México
Carrizal	<i>Microtus smichrasti</i>	México
Playa de Oro	<i>Oryzomys mexicanus</i>	México
Huitzilac	<i>Reithrodon megalotis</i>	México

Los sigmodontinos sudamericanos presentan una gran diversidad como resultado de una invasión históricamente reciente del continente y su rápida radiación adaptativa posterior (Steppan et al., 2004). En esta amplia diversidad se pueden distinguir seis grandes tribus: Akodontini, Oryzomyini, Phyllotini, Thomasomyini, Abrotrichini y Ichtyomyini. En concordancia con esta diversidad se han descrito más 50 variedades de hantavirus a lo largo del continente sudamericano (figura 4) (de Oliveira et al., 2014b).

En 1996 se reportó el primer brote de hantavirus en la localidad de El Bolsón, provincia de Rio Negro (Argentina). Al virus identificado se lo nombró como virus Andes, el cual fue asociado al roedor *Oligoryzomys longicaudatus*, de amplia distribución en el sur de Argentina y Chile (Levis et al., 1998; López et al., 1997). Estudios posteriores en la zona andina chilena revelaron la circulación de este virus tanto en humanos como en su reservorio natural (López et al., 1997). El virus Andes es el único hantavirus para el cual se ha demostrado la transmisión interhumana (Martinez et al., 2005; Pinna et al., 2004).

Otro hantavirus descrito para la zona central de Argentina y asociado a casos de síndrome pulmonar por hantavirus es la variante Lechiguanas asociada al roedor *Oligoryzomys flavescens* (Levis et al., 2004; Levis et al., 1998).

Una variante genéticamente relacionada con Lechiguanas son los virus Bermejo y Ñeembucú cuyo reservorio fue originalmente asignado a la especie *O. chacoensis*, y que se distribuye en el noreste argentino, Paraguay y Bolivia (Chu et al., 2003; Levis et al., 2004; Suzuki et al., 2004). Estudios recientes indican que el roedor reservorio de Bermejo y Ñeembucú no fue correctamente identificado, y que estos roedores deben ser asignados a la especie *O. flavescens* (Rego, 2008).

También se identificaron dos virus no patógenos asociados a roedores akodontinos. Estos fueron el virus Maciel, cuyo roedor reservorio es *Akodon azarae*, y el virus

Pergamino, asociado a *Necromys obscurus*. Todos ellos se distribuyen en la zona central del territorio argentino (Levis et al., 1998).

Brasil posee una enorme diversidad de ambientes y especies de roedores, lo que se refleja en las diferentes variantes de hantavirus reportados hasta el momento (de Oliveira et al., 2014b). En 1999 se identificó el primer caso de hantavirus en humanos en la ciudad de San Pablo. Este hantavirus fue denominado Juquitiba. Posteriormente se identificó su reservorio: el roedor *O. nigripes* (Johnson et al., 1999), el cual se distribuye por los estados de San Pablo, Rio Grande del Sur, Santa Catarina, Minas Gerais y Paraná. En este último se ha identificado al virus Araucaria, que presenta un alto grado de similitud con Juquitiba, y está asociado a los roedores *O. nigripes*, *O. judex* y *A. montensis* (de Oliveira et al., 2014b; Raboni et al., 2009; Suzuki et al., 2004). El hantavirus no patogénico Jaborá se ha identificado en los estados de Paraná y Santa Catarina, asociado a las especies *A. montensis*, *A. paranaensis* y *A. serrensis* (Raboni et al., 2014).

Otros virus circulantes en Brasil son el virus Araraquara cuyo reservorio es *Necromys lasiurus*, el cual produce enfermedad en humanos, encontrándose en la región del Cerrado y la mata Atlántica (Suzuki et al., 2004).

El virus Rio Mearim se desconoce si afecta al humano. Su reservorio es *Holochilus sciureus* el cual se encuentra en el estado de Maranhao (de Oliveira et al., 2014b).

El virus Castelo do Sonhos fue detectado primero en pacientes con síndrome pulmonar y luego se pudo identificar la especie reservorio (*O. utiaritensis*), su distribución se acota al sureste amazónico y a la ecoregión conocida como el Cerrado (de Oliveira et al., 2014b).

Otra variante es el virus Anajatuba el cual está asociado al reservorio *O. fornesi*, el cual se distribuye principalmente en la región de la mata atlántica brasilera (Rosa et al., 2005).

El virus Laguna Negra, originalmente descrito para Paraguay, también circula en Argentina (Suzuki et al., 2004), y está asociado a los roedores *Calomys lucha* y *Calomys callosus*. Este virus es el principal agente de síndrome pulmonar por hantavirus en Paraguay (Johnson et al., 1997).

En la región amazónica brasileña circula el virus Rio Mamore asociado al reservorio *O. microtis*, este virus también se encuentra en la regiones amazónicas de Bolivia y Perú (Bharadwaj et al., 1997; Casapia et al., 2012; de Oliveira et al., 2014a). En Guayana Francesa se detectó la circulación de un virus emparentado a Rio Mamore, primero en casos de SPH y luego identificado en sus reservorios naturales (*O. fulvescens* y *Z. brevicauda*), al nuevo virus se lo denominó Maripa (de Thoisy et al., 2014).

Más hacia el norte del continente se ha reportado la circulación del virus Caño Delgadito descrito para Venezuela y su principal reservorio es *Sigmodon alstoni*. Se

desconoce su patogenicidad en humanos (Fulhorst et al., 2002). También se encontró el virus Maporal en el suroeste del país caribeño, este virus se ha asociado al roedor *O. delicatus* (Hanson et al., 2011; Milazzo et al., 2010).

En Colombia, estudios recientes reportaron la presencia de antiuerpos anti hantavirus en sueros de varios trabajadores rurales en los estados límites con Panamá, así también se encontró al virus Calabazo en muestras de roedores. En Ecuador no se encontró hasta el momento la presencia de hantavirus (Blanco et al., 2012; Londono et al., 2011; Mattar et al., 2014; Mattar and Parra, 2004).

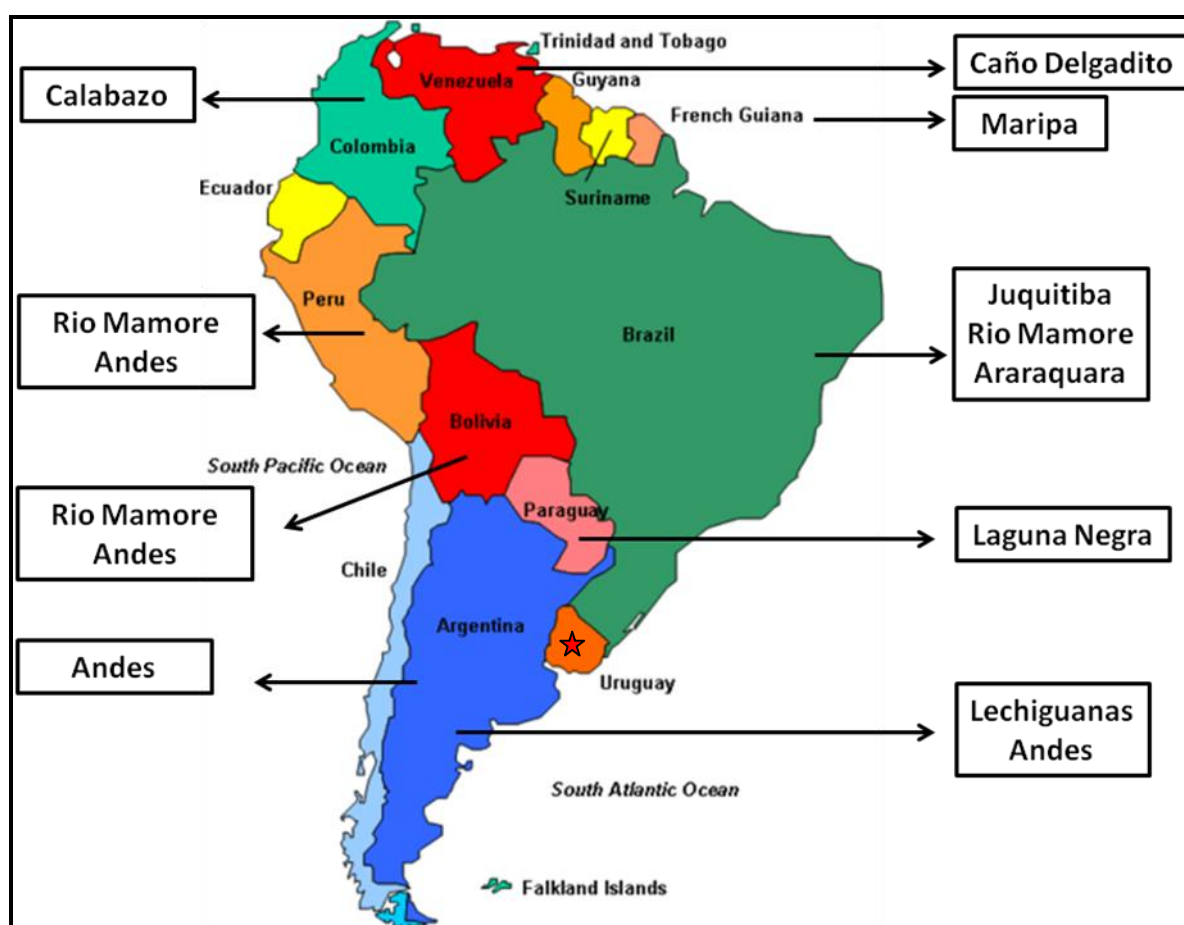


Figura 4. Principales hantavirus causantes de SPH en distintos países de Sudamérica.*El estado de conocimiento de hantavirus para Uruguay se reseña mas adelante.

En Centroamérica el primer país en detectar un hantavirus autóctono fue Panamá, que logró caracterizar al virus Choclo a partir de casos de SPH, este virus posteriormente se asoció al roedor *O. fluvescens*. En paralelo se encontró al virus Calabazo el cual se identificó en la especie *Zygodontomys brevicauda*, no observándose su circulación en humanos (Vincent et al., 2000).

En Honduras se descubrió el virus Catcamas asociado al roedor *Oryzomys couesi* (Milazzo et al., 2006). Finalmente en Costa Rica se detectó la circulación del virus Rio Segundo en la especie *Reithrodontomys mexicanus* (Hjelle et al., 1995).

1.8 Soricomorfos: ¿nuevos o antiguos reservorios para los hantavirus?

Más de 40 años después de la identificación del virus Thottapalayam (TPM), aislado en 1964 (Carey et al., 1971), se han identificado nuevos hantavirus en diversas especies de musarañas y topos distribuidos en Eurasia, África y Norteamérica (Arai et al., 2007; Carey et al., 1971; Klempa et al., 2007; Song et al., 2007; Song et al., 2009; Zeller et al., 1989). Hasta el momento, ninguno de los hantavirus asociados a soricomorfos se ha relacionado con enfermedad en humanos, aunque se observaron anticuerpos contra el virus de la TPM en un paciente febril en Tailandia (Okumura et al., 2007).

Debido a su pequeño tamaño corporal y una ecología de vida muy parecida a los roedores, las musarañas y topos en ocasiones son confundidas por estos últimos, a pesar de que tienen historias evolutivas muy diferentes (Gliwicz, 2002).

El orden *Soricomorpha* (anteriormente Insectívora) se divide en cuatro grandes familias: *Soricidae* (musarañas), *Talpidae* (topos), *Solenodontidae* (solenodontes) y *Nesophontidae* (Nesophontes), ésta última familia se considera extinta. Desde el descubrimiento de TPM hasta la fecha ya son 21 hantavirus que se han descrito en cinco géneros de musarañas de la familia *Soricidae* (*Neomys*, *Suncus*, *Crocidura*, *Sorex* y *Anourosorex*) y cuatro géneros de topos de la familia *Talpidae* (*Talpa*, *Urotrichus*, *Neurotrichus* y *Scalopus*) (Hutterer, 2005).

Los seis hantavirus que se han descubierto en la familia *Talpidae* son: el virus Asama en el género *Urotrichus*, que se encuentra distribuido en las islas japonesas; el virus Nova, aislado del tejido renal del topo europeo (*Talpa europaea*) (Myers et al., 2000; Song et al., 2009) y los virus de Cao Bang y Lianghe, los cuales han sido identificados en el topo musaraña chino *Anourosorex squamipes*, que habita en los bosques situados entre 1.500 y 3.000 m de altitud con una distribución geográfica que se extiende desde China central-occidental, el norte de Myanmar, el norte de Tailandia, Assam, Bután, Vietnam del Norte y Taiwán (Arai et al., 2007; Kang et al., 2010; Kang et al., 2009; Kang et al., 2011; Song et al., 2009; Sumibcay et al., 2012).

El virus de Oxbow se identificó en *Neurotrichus gibbsii*, que es el topo más pequeño y primitivo que existe en América del Norte; el Rockport virus (RKPV) fue identificado en un estudio retrospectivo en tejidos de topo oriental fosorial (*Scalopus aquaticus*) que databan de 1986 en el estado de Texas, USA. Este nuevo hallazgo puede explicar el antepasado en común más reciente con hantavirus relacionados a roedores, aumentando la posibilidad de eventos de salto de huésped en el pasado desde los insectívoros a los roedores (Arai et al., 2007; Kang et al., 2010; 2011).

En USA diversas especies de musarañas albergan varios hantavirus, como la especie *Blarina brevicauda*, la cual es infectada por el virus de Camp Ripley (Arai et al., 2007). Otro ejemplo es la musaraña oscura (*Sorex monticolus*), esta especie de musaraña está

relacionada con el virus Jemez Springs, el cual luego se identificó en cuatro especies más de la familia Soricidae, incluyendo la musaraña enmascarada (*Sorex cinireus*), la cual también puede hospedar el virus del río Ceniza. La musaraña enmascarada y musaraña oscura son las musarañas más extendidas en América del Norte, y ocupan una variedad de hábitats húmedos. Cabe destacar que un virus muy similar a JMSV fue identificado en otra especie de musaraña de Nuevo México: *S. haydeni* (Arai et al., 2008).

El género *Crociodura* (Soricidae) tiene una distribución extensa en Europa, África y Asia, y contiene más especies descritas que cualquier otro género de mamíferos. Las especies que componen este género y se asocian a diferentes hantavirus son los siguientes: (A) *C. lasiura*, que se asocia con el virus MJNV en Corea y se pueden encontrar en los claros de los bosques, humedales, prados secos, bosques de arbustos, a lo largo de las orillas de los ríos y lagos, en los campos agrícolas y en las carreteras (Song et al., 2009); (B) *C. theresae*, que se asocia con el virus Tanganya (TGNV) en Guinea y habita en los bosques de tierras bajas húmedas tropicales o subtropicales y las sabanas húmedas (Klempa et al., 2007); (C) *C. obscurior*, que es una musaraña pigmeo de África Occidental que se encuentra en las regiones subtropicales y tropicales húmedas con bosques de baja altitud en Ghana, Guinea, Liberia, Sierra Leona y, posiblemente, Nigeria y está asociado con el virus Azagny (AZGV) en Costa de Marfil (Kang et al., 2011); (D) *C. shantungensis*, que es una especie asociada con el virus de Jeju (JEJV) en la isla de Jeju en Corea del Sur (Arai et al., 2012) y (E) el virus Imjin encontrado en la especie de musaraña *C. lasiurus* en Corea del Sur.

La reciente demostración de que TPMV y otros hantavirus identificados en *Soricidae* y *Talpidae* son genéticamente distintos, combinado con la detección de virus en los tejidos de estos animales procedentes de regiones geográficas muy distantes, desafía la visión convencional de que los roedores son los hospedadores primarios o primordiales en la evolución de los hantavirus. Por otra parte, esta evidencia sugiere un antigua co-evolución y radiación adaptativa dentro de un escenario evolutivo muy complejo donde el salto de huésped y co-divergencia parecen haber jugado un papel fundamental en la evolución de estos virus (Arai et al., 2008; Kang et al., 2011; Plyusnin & Morzunov, 2001; Plyusnin & Sironen, 2014). En el marco de la filogenia molecular y la zoogeografía, la estrecha asociación entre clados de hantavirus distintos y subfamilias específicas de roedores, musarañas y topos parece ser el resultado de la alternancia y co-divergencia periódica en el tiempo evolutivo (Plyusnin & Morzunov, 2001).

1.9 Los murciélagos como potenciales reservorios de hantavirus.

Los murciélagos (orden *Chiroptera*) son fuentes de una amplia gama de patógenos emergentes, incluyendo coronavirus, filovirus, henipavirus y rhabdovirus (Calisher et al., 2006). Con un registro fósil que data del Eoceno (aproximadamente 50 millones de años), los murciélagos se localizan en todos los continentes excepto en la Antártida, siendo uno de los órdenes de mamíferos más rico en especies (Simmons, 2005).

Las características de los murciélagos como su distribución global, su abundancia, la capacidad de vuelo (algunas especies pueden cubrir más de 80 km por noche), su alta densidad de población y el comportamiento social de algunas especies pueden favorecer el mantenimiento, evolución y propagación de varios virus. Muchas especies de murciélagos son gregarias y forman grupos de unos pocos individuos o colonias que pueden alcanzar 20 millones de individuos. Ejemplo de estas grandes colonias son las de *Tadarida brasiliensis*, localizadas en la Cueva Bracken en Texas, USA (Simmons, 2005). Además, diferentes especies de murciélagos pueden cohabitar en el mismo refugio, lo que favorece la posibilidad de transmisión interespecífica, a su vez una alta tasa de contacto dentro de estas colonias pueden conducir a la rápida transmisión de patógenos.

Otras características que hacen que los murciélagos sean reservorios importantes para los patógenos son sus largos periodos de vida en relación con el tamaño de su cuerpo, lo que puede facilitar la persistencia y la transmisibilidad del virus, como así su capacidad para hibernar o entrar en un estado metabólico de letargo lo que lleva a la reducción de la replicación viral y la función inmune (Luis et al., 2013).

Por todo lo mencionado anteriormente este orden de mamíferos es muy investigado como fuente de virus. En el marco de este tipo de estudios, se ha demostrado recientemente que los murciélagos pueden ser hospedadores potenciales para los hantavirus.

Una de las primeras evidencias surge en 2012, en Sierra Leona. El descubrimiento de un nuevo hantavirus, llamado Magboi en la especie de murciélago *Nycteris hispida*, abrió la interrogante si este grupo de mamíferos también estaba involucrado en su dispersión. Por el grado de divergencia con los hantavirus conocidos de roedores e insectívoros, se trataría de una nueva especie viral (Weiss et al., 2012).

En el mismo año se identificó a otro hantavirus llamado Mouyassué, asociado a murciélagos de la especie *Neoromicia nanus* (pipistrellos plátano) en África. En este caso se discute si se trata de un nuevo virus, por su grado de similitud con virus de insectívoros (Sumibcay et al., 2012).

Más recientemente, se han identificado tres nuevos hantavirus: el virus Longquan en murciélagos *Rhinolophus affinis* y *R. sinicus*, el virus Huangpi en *Pipistrellus abramus* en

China; y finalmente el virus de Xuan Son en *Hipposideros pomona* en Vietnam (Arai et al., 2013; Guo et al., 2013).

Por las características mencionadas anteriormente, este orden de mamíferos podría contribuir a la distribución de nuevos virus a diferentes poblaciones humanas como así también podría ser el posible reservorio antecesor en común de todos los hantavirus.

1.10 Origen e historia evolutiva de los hantavirus.

En 1992 Antic, a través del estudio de las secuencias de genes y proteínas de hantavirus, propone la existencia de dos caminos evolutivos: uno que incluía los virus asociados al género *Apodemus* y los virus transmitidos por *Rattus* como Hantaan y Seoul. La otra senda incluía los virus asociados al género *Clethrionomys* (actualmente *Myodes*) y al género *Microtus* como Prospect Hill y Puumala. Se llegó a la conclusión que la evolución de estos virus era influida por muchos factores, de los cuales el más significativo era la estrecha relación del virus con su huésped roedor (Antic et al., 1992).

En 1996, Plyusnin retoma la idea y propone que la relación genética entre los hantavirus se asemeja a la de sus hospederos naturales, apoyando la hipótesis de la co-evolución hantavirus-reservorio, esta afirmación se basó en estudios filogenéticos del segmento S de hantavirus de Europa (Dobrava y Tula), Asia (Khabarovsk) y Norteamérica (Sin Nombre, New York, Black Creek Canal, El Moro Canyon), en comparación con las filogenias de los roedores. En estos análisis los diferentes hantavirus fueron asociados con las tres grandes subfamilias de roedores: Murinae, Arvicolinae y Sigmodontinae (Plyusnin et al., 1996).

Posteriormente, análisis de reconciliación filogenética (co-filogenia) entre virus y reservorios realizados para hantavirus, arenavirus, lyssavirus y ciertos retrovirus, mostraron que las filogenias de hantavirus y roedores presentan un grado de congruencia significativamente mayor al esperado por azar, por lo tanto, se postuló que estos virus mantienen asociaciones estables con sus hospedadores a una escala de tiempo evolutiva (Jackson & Charleston, 2004).

Hasta ese momento el género *Hantavirus* estaba acotado al Orden Rodentia pero en 1994 se descubre el primer hantavirus asociado a un insectívoro, el virus Thottapalayam virus (TPMV) cuyo reservorio principal es la musaraña asiática, *Suncus murinus* (Carey et al., 1971). Posteriormente, estudios filogenéticos acerca de este virus, comprobaron que pertenecía a un grupo filogenético de hantavirus muy diferente a los conocidos previamente (Chu et al., 1994; Xiao et al., 1994). Estas nuevas evidencias llevaron a proponer una nueva hipótesis: la existencia del género *Hantavirus* en el orden Rodentia e Insectívora no sería una reintroducción o un salto de un orden al otro, sino que habría un ancestro en común a los hantavirus actuales

que circulaba en el ancestro predecesor a dichos órdenes de mamíferos, aproximadamente en el periodo Cretácico (Plyusnin & Sironen, 2014).

Varios autores postulan que no hay evidencias fehacientes de co-evolución entre virus y reservorios, y que en realidad las similitudes en la topología de las filogenias de los hantavirus y sus hospedadores refleja la historia más reciente de cambio de huésped o salto inertespecífico preferencial, promoviendo la adaptación local (Jackson & Charleston, 2004; Ramsden et al., 2009).

A esto se le suma que los análisis filogenéticos de cualquier marcador genético dado (tal como el gen del citocromo b) pueden resultar en una filogenia que es incompatible con la historia evolutiva de las especies, sobre todo si se utilizan secuencias parciales. Los datos de secuencia pueden ser inadecuados, produciendo errores en los análisis filogenéticos, los cuales pueden desdibujar la historia general de la co-evolución (Pamilo & Nei, 1988; Sharp & Simmonds, 2011).

Otro argumento que se ha utilizado para oponerse al concepto de co-evolución virus-huésped es la aparente discrepancia entre las escalas de tiempo de evolución viral y del huésped: los tiempos de divergencia virales calculados a partir de datos de corto plazo parecen demasiado recientes para su co-divergencia con el anfitrión. Se ha hecho evidente, sin embargo, que las tasas de corto plazo de la evolución no se deben utilizar para estimar los tiempos de eventos de divergencia más profundas dentro de filogenias virales (Sharp & Simmonds, 2011). Es importante destacar que la tasa de mutación viral debe distinguirse de la tasa de sustitución viral: tasa de mutación se refiere a la generación de cambio genético, mientras que la tasa de sustitución implica la posterior fijación de mutaciones en poblaciones, y no hay una correlación simple entre estos dos parámetros (Belshaw et al., 2011).

Los recientes hallazgos de nuevos genotipos de hantavirus en musarañas, topos y murciélagos contribuyeron en gran medida al conocimiento de la situación general de la ecología y evolución de hantavirus (Guo et al., 2013). Estos hallazgos importantes se han interpretado a veces como una indicación de que sólo ahora el tiempo a gran escala de la evolución de hantavirus se puede apreciar, y que el predecesor de los hantavirus circuló por quirópteros y/o soricomorfos, y sólo más tarde fue introducido en los roedores (Guo et al., 2013).

En la actualidad se cree que los principales eventos de diversificación durante la evolución de Placentarios comenzaron hace 150 millones de años y los cuatro clados (Laurasiatheria, Euarchontoglires, Xenarthra y Afrotheria) se formaron cada uno durante un período relativamente corto de tiempo, de aproximadamente 100 millones de años (Meredith et al., 2012). Si bien hay un acuerdo considerable entre el reloj molecular y la evidencia fósil sobre la composición de los órdenes de los placentarios, no se puede decir exactamente los años de divergencia de los clados. Se estima que evolucionaron juntos por un tiempo antes de la división del clado Euarchontoglires,

que incluía el orden Rodentia, y el clado Laurasiatheria que incluye los órdenes Eulipotyphla (ex insectívora) y los quirópteros (Archibald, 2003). A continuación, el orden Eulipotyphla se habría separado del orden Chiroptera y otros órdenes de este clado (como por ejemplo: Carnivora y Pholidota), y se comenzó a diversificar alrededor de 71-86 millones de años. Chiroptera, a su vez, comenzó a diversificarse del resto de la clados hace aproximadamente 62-78 millones de años, a principios del Paleoceno, mientras que Rodentia comenzó a diversificarse hace 64 a 88 millones de años (Meredith et al., 2012; Teeling et al., 2005).

Plyusnin y Sironen (2014) postulan la existencia de un pre-hantavirus que se ubicaría antes de la diversificación de los órdenes de placentarios. Dicho pre-hantavirus a su vez sería un bunyavirus antiguo de origen artrópodo, el cual se pudo adaptar y co-evolucionar en células de mamíferos (Plyusnin & Sironen, 2014). Recientemente se han descrito además varios bunyavirus cuyo ciclo natural ocurre solamente en artrópodos (Marklewitz et al., 2013). Ejemplo de éstos son el virus Gouleako encontrado en África occidental y aislado de mosquitos (Marklewitz et al., 2011). Los virus Herbert, Tai y Kibale, fueron recientemente aislados en diferentes países de África como Costa de Marfil, Ghana y Uganda a partir de mosquitos (*Culex* y *Uranotaenia*). Todos ellos poseen la característica importante de replicarse con altos títulos virales en células de insecto y con bajos títulos en las células de mamíferos (Marklewitz et al., 2013)

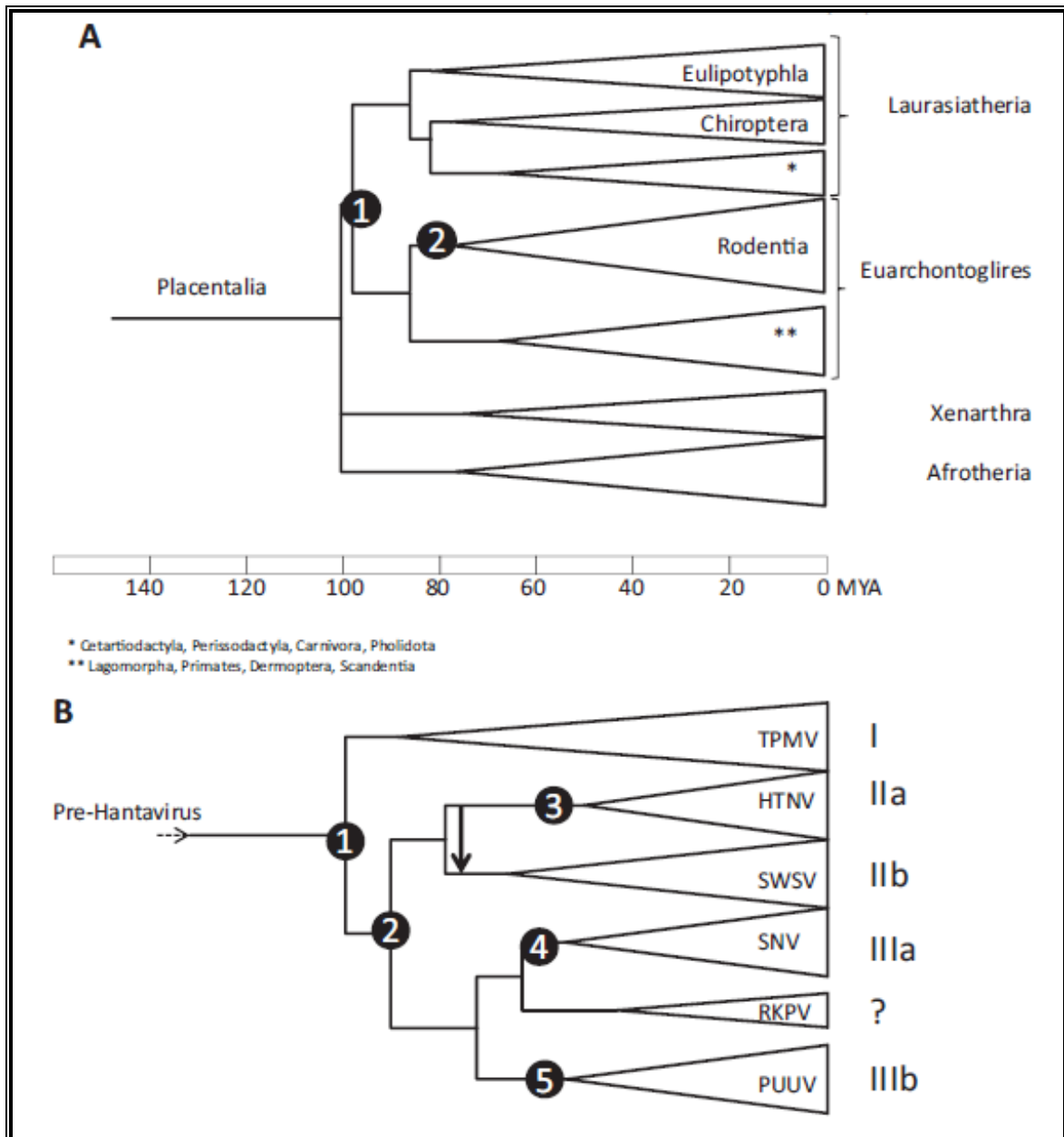


Figura 5. Presentación esquemática de la cronología de los principales acontecimientos de diversificación de los hantavirus y sus hospedadores. (A) Esquema de la evolución de los mamíferos placentados (Meredith et al., 2012). El punto 1 se refiere a la división de Laurasiatheria (incluyendo el orden Eulipotyphla y Chiróptera) y Euarchontoglires (incluyendo el orden Rodentia), que se estima que se ha producido hace 100 millones de años. El punto 2 se refiere al tiempo estimado donde el orden Rodentia comenzó a diversificarse, aproximadamente entre 69-85 millones de años. (B) Representa un árbol filogenético de máxima verosimilitud basado en secuencias del segmento L. Los clados están numerados del I al III: Grupo I incluye virus asociados con hospederos no roedores, grupo II aquellos virus asociados a roedores de la familia Muridae (IIa) y los soricomorphos (IIb). El conjunto de virus del grupo III representa aquellos hantavirus asociados a la subfamilia Cricetidae. La flecha señala un posible salto de hospedero desde los murinos hacia soricomorphos. TPMV (Thottapalayam virus), HTNV (Hantaan virus), SWSV (Seewis virus), SNV (Sin Nombre virus), RKPV (Rockport virus), PUUV (Puumala virus) Modificado de Plyusnin & Sironen, 2014 .

En la figura 5a se observa una primera diversificación en dos grandes grupos de hantavirus: aquellos asociados al orden Rodentia, y los hantavirus asociados a los otros dos órdenes Chiroptera y Eulipotyphla (familia *Soricidae*), señalado con el número 1. También podemos apreciar dentro del orden Rodentia, la subdivisión de los hantavirus en las dos grandes familias de roedores: *Cricetidae* y *Muridae* (punto 2).

Posteriormente habrían ocurrido diversificaciones internas dentro de la familia *Cricetidae*. Se propone aquí la formación de dos grandes grupos: aquellos virus que se asocian con la subfamilia *Arvicolinae* que incluye topillos, ratas de agua, lemmings y ratas almizcleras, distribuidos por toda Europa (señalado como punto 5 del esquema) y otro gran grupo que ocupan las dos subfamilias *Sigmodontidae* y *Neotominae*, que comprende los roedores del nuevo mundo (punto 4).

En este diagrama se postula también un posible salto de hantavirus entre dos órdenes de mamíferos: en este caso sería desde los roedores a los insectívoros. Ese evento habría ocurrido en un solo clado, donde los hantavirus relacionados con los murinos pasarían al orden *Eulipotyphla* (ex insectívoros).

En conclusión, para estos autores el fenómeno de la co-especiación podría explicar la mayor parte de los datos filogenéticos de virus y reservorios (roedores, insectívoros y en quirópteros). La búsqueda y el análisis de nuevos hantavirus en mamíferos aportará información de gran relevancia, contribuyendo al esclarecimiento de las complejas relaciones evolutivas entre virus y hospedadores (Plyusnin & Sironen, 2014).

A su vez, la búsqueda de nuevos hantavirus en otros grupos de mamíferos mas ancestrales como los Xenarthra (armadillos y tatú) y Afrotheria (topos dorados, tenrecs, topo elefante, entre otros), sería de gran interés, ya que el hallazgo de hantavirus en estos grupos apoyaría la hipótesis de un ancestro común viral para todos los mamíferos (Plyusnin & Sironen, 2014).

1.11 Los modelos de distribución de especies aplicado al estudio de los reservorios de hantavirus.

Los hantavirus que son patógenos para el hombre tienen como reservorio principal a los roedores. Una de las medidas de control más eficaz es mantener la población humana fuera del contacto con dichas poblaciones (Klein & Calisher, 2007). Por lo tanto, es de interés investigar los aspectos básicos como la distribución geográfica, la dinámica poblacional, así como la ecología de las especies involucradas en esta zoonosis. El desarrollo de modelos predictivos de distribución de especies o modelos de nicho son muy bien evaluados en diferentes áreas de la biología como la biogeografía, evolución, ecología, conservación y la gestión de las especies invasoras (Broennimann & Guisan, 2008; Guisan et al., 2013).

El uso de estas potentes herramientas se está aplicando recientemente en la epidemiología de diferentes enfermedades infecciosas donde participan especies

como vectores o reservorios, generando resultados que revelan la posible distribución de la especie involucrada y/o la distribución de la enfermedad (Andreo et al., 2011; Larson et al., 2010; Mughini-Gras et al., 2013; Mweya et al., 2013).

En particular para hantavirus, trabajos recientes utilizan este tipo de aproximaciones, aportando información útil para la epidemiología y el control de la enfermedad (Andreo et al., 2011; Andreo et al., 2014; de Oliveira et al., 2014b; de Thoisy et al., 2014; Zeimes et al., 2012).

MaxEnt es un método de propósito general para hacer predicciones o inferencias a partir de información. Sus orígenes se encuentran en la mecánica estadística (Jaynes, 1957) y sigue siendo un área activa de investigación basada en la máxima entropía y los métodos bayesianos, que posee aplicaciones en áreas tan diversas como la astronomía, la reconstrucción de imágenes y la física estadística entre otros.

El software “MaxEnt” utiliza un algoritmo de máxima entropía que identifica a través de un conjunto de variables ambientales y registros georreferenciados de la especie a estudiar cuáles son aquellas áreas más idóneas para que la especie se encuentre (Pearson, 2004). Cada algoritmo es diseñado para extraer la relación entre el medio ambiente, su variación y la presencia de especie. Esta relación se usa para predecir la distribución de las especies en lugares no muestreados, teniendo en cuenta las condiciones ambientales de la zona de interés (Phillips, 2005). Los métodos para la distribución de las especies de modelado difieren en cómo seleccionan las variables, el peso de la contribución de cada variable individual, y en la predicción de los patrones de ocurrencia. Además, mientras que algunos algoritmos confían en los datos de presencia solamente, otros requieren tanto presencia como ausencia de datos. En última instancia, la elección del algoritmo de modelado debe basarse tanto en la intención de uso de las estimaciones de la distribución resultantes como en la disposición de datos (Phillips, 2005).

Utilizando el software “MaxEnt” es posible estimar la idoneidad en la distribución, en este caso de la o las especies de roedores, mediante la búsqueda de la zona más idónea, sujeto a un conjunto de restricciones que representan nuestra información incompleta sobre el estudio de esa distribución. Se define idoneidad como aquellas condiciones necesarias para que la especie pueda estar y desarrollar su actividad normal. La información disponible sobre el destino de la distribución a menudo se presenta como un conjunto de valores reales-variables, denominados “características”, y las limitaciones son que el valor esperado de cada función debe coincidir con su empírica promedio (valor medio para un conjunto de puntos de muestra tomado de la distribución de destino). Cuando se aplica “MaxEnt” para modelar la distribución de las especies usando únicamente el dato de presencia, los píxeles de la zona de estudio constituyen el espacio en el cual se define la distribución, esos píxeles o puntos que representan la ocurrencia de la especie nos brindan datos característicos asociados a

dichas especies como por ejemplo variables climáticas, altura del terreno, uso de suelo, tipo de vegetación u otra variables ambientales (Bowler, 2013; Phillips, 2005).

El software “MaxEnt” ofrece varias ventajas para llevar a cabo análisis de distribución potencial: se requiere sólo datos de presencia, junto con la información ambiental para el área de estudio. Se puede utilizar tanto un set de datos continuos a los que se les puede incorporar interacciones entre los diferentes variables. La distribución de probabilidad “MaxEnt” tiene una concisa definición matemática, y es por tanto susceptible de análisis. Este programa tiene un enfoque generativo, en lugar de discriminativo, que puede ser una ventaja inherente cuando la cantidad de datos de entrenamiento es limitada (Bowler, 2013).

1.12 Características de las infecciones por hantavirus.

A) En los reservorios naturales.

La infección por hantavirus en roedores es aparentemente subclínica y persiste a la largo de toda la vida con excreción de virus a través de saliva, orina y heces (Lee et al., 1981; Meyer & Schmaljohn, 2000). Los estudios de los reservorios naturales de diversos hantavirus han confirmado que la infección puede pasar de un roedor a otro por transmisión horizontal. La agresión mediante mordeduras por combates debido a la competencia por diversos recursos (ya sea alimentos, territorio o por búsqueda de pareja) es una de las principales causas de transmisión, así como mediante aerosoles de las heces y orinas contaminadas con el virus (Lee et al., 1981; Mills et al., 2007; Nuzum et al., 1988; Padula et al., 2004). Algunas variantes, como el virus Sin Nombre son transmitidas predominantemente a través de fluidos corporales, en particular durante los encuentros agresivos y posiblemente durante la limpieza de las crías entre individuos en una colonia (Pearce-Duvet et al., 2006). Sin embargo, otros hantavirus como el virus Puumala o el virus Hantaan se transmiten preferencialmente de forma indirecta entre los reservorios por la inhalación de heces contaminadas (Bernshtein et al., 1999; Kariwa et al., 1998; Yanagihara et al., 1985). La transmisión vertical no se ha demostrado, y los anticuerpos maternos parecen proteger contra la infección de las crías durante unos meses. Las hembras infectadas comúnmente transfieren anticuerpos a su descendencia en el útero y durante la lactancia para proporcionar protección temporal que puede durar hasta 80 días (Klein & Calisher, 2007). Esto se comprobó para el virus Puumala en topillos rojos que tienen una vida promedio de 3 a 5 meses en la naturaleza (Kallio et al., 2010).

La seroprevalencia entre los roedores normalmente aumenta con el peso y la edad, lo cual es consistente con la transmisión horizontal del virus dentro de las poblaciones de roedores. El efecto de la edad que se asocia con una larga exposición al virus, apoya la idea de que la transmisión horizontal es el mecanismo principal para el mantenimiento

de los hantavirus en la naturaleza (Pearce-Duvet et al., 2006). En resumen, el sexo, la edad, la masa corporal, y las heridas son factores importantes que afectan la probabilidad de las infecciones por hantavirus en los roedores y están estrechamente vinculadas con la transmisión horizontal (Mills & Childs, 1998; Mills et al., 2007; Tersago et al., 2011; Yahnke et al., 2001).

Los virus se concentran y se eliminan a través de la saliva, la orina y las heces durante un largo período de tiempo (Enria and Pinheiro, 2000; Lyubsky et al., 1996; Peters et al., 1999). El tiempo durante el cual el virus se elimina en cada tipo de excreción varía para cada tipo viral y la especie de roedor infectado. Durante la infección experimental del roedor *Sigmodon hispidus* con el virus Black Creek Canal se detectaron partículas virales en la orina hasta 70 días después de la infección (Hutchinson et al., 1998). Para el virus Puumala en su reservorio natural, se lo detectó por un período de hasta 44 días (Hardestam et al., 2008).

Los hantavirus que causan infecciones persistentes en roedores poseen una corta fase inicial aguda que dura de dos a tres semanas, en la cual la concentración de virus infeccioso es alta. Posteriormente, la infección se caracteriza por una fase crónica prolongada durante la cual la infección es productiva, en este caso el virus está presente con cargas virales relativamente bajas, las cuales pueden variar e incluso ser detectables en presencia de altos niveles de anticuerpos neutralizantes (Botten et al., 2003; Hutchinson et al., 1998; Lyubsky et al., 1996; Netski et al., 1999).

La viremia es transitoria en roedores, muy probablemente debido a la eliminación de virus por la acción de los anticuerpos neutralizantes. De todos modos, éstos no son capaces de erradicar completamente la infección (Botten et al., 2003). Los factores involucrados en el establecimiento de las infecciones persistentes por hantavirus aun no están bien definidos (Meyer & Schmaljohn, 2000). La detección durante la fase aguda de concentraciones elevadas de ARN viral en la sangre de los roedores naturalmente infectados, indica que los roedores infectados recientemente juegan un papel importante en la transmisión viral dentro de las poblaciones de roedores en la naturaleza (Klein and Calisher, 2007).

Luego de la viremia el virus afecta diversos órganos: pulmones, riñones, corazón, bazo, hígado y sistema nervioso. En varios estudios se pudo comprobar la existencia de marcadores virales durante la fase aguda de la infección (Botten et al., 2003; Meyer and Schmaljohn, 2000). El título viral puede variar en función del órgano y el tipo viral involucrado (Korva et al., 2009). Los mayores títulos virales se han encontrado en las muestras de pulmón de los roedores infectados naturalmente por los virus Puumala y Dobrava ($\sim 1,7 \times 10^9$ copias / ml de tejido homogeneizado) y en muestras de riñón de *Apodemus agrarius*, infectados con el virus Saarema. Las cargas virales en los diferentes tejidos estudiados variaban desde 10 hasta 1.10^{11} copias / mL, y el rango de la carga viral en muestras de orina fue de 10 a 10^6 copias / mL.

Aunque no se observan manifestaciones clínicas en los roedores, recientemente se ha demostrado que la infección por hantavirus afecta su supervivencia durante los meses de invierno debido a que el animal debe destinar sus limitados recursos para hacer frente a la infección (Kallio et al., 2007; Kariwa et al., 1998; Lyubsky et al., 1996). Esto se pudo demostrar analizando los datos demográficos de campo recogidos durante 15 años de una población de ratones ciervo (*Peromyscus maniculatus*) con anticuerpos para el virus Sin Nombre, observándose que estos tienen menos probabilidades de sobrevivir en comparación con ratones no infectados (Luis et al., 2012)

A pesar del escaso conocimiento sobre la influencia de los anticuerpos en el establecimiento y mantenimiento de las infecciones persistentes y asintomáticas en reservorios naturales, algunos estudios han demostrado que los roedores desarrollan una fuerte respuesta inmunológica al antígeno N (Ravkov et al., 1995). Además también se vio la capacidad del virus para replicarse en las células inmunes, tales como macrófagos, monocitos y linfocitos T (Easterbrook & Klein, 2008).

Recientemente, mediante la infección experimental del virus Andes en ratones ciervos (*Peromyscus maniculatus*), el reservorio principal del virus Sin Nombre, se demostró la eliminación del virus por la regulación de genes implicados en la respuesta inmune, y por la producción de anticuerpos. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que la replicación del hantavirus y su persistencia están restringidos a los reservorios principales en los que se han adaptado (Schountz et al., 2014; Spengler et al., 2013)

B) Infección en el hombre: epidemiología, clínica y diagnóstico.

La infección en humanos es incidental ya que éstos no forman parte del ciclo natural de estos virus. Esta interacción ocurre cuando el humano entra en contacto con orina o heces de un roedor infectado. Generalmente las partículas virales entran por vía aérea en forma de aerosol, provocando la infección (Klein & Calisher, 2007).

Hasta el momento sólo el virus Andes se ha demostrado que tiene la capacidad de generar contagio persona a persona (López et al., 1997; Martinez et al., 2005; Pinna et al., 2004).

El Síndrome Pulmonar por Hantavirus (SPH) se caracteriza por tener un periodo de incubación que varía de una a cinco semanas, y su fase prodrómica dura entre tres a cinco días, donde el individuo puede presentar un síndrome gripal con fiebre hasta 38°C, mialgias y malestar general. A estos síntomas se le puede agregar dolor de cabeza, mareos, dolor abdominal, vómitos y diarrea. Como se puede observar en este período, es muy difícil separarlo de otras enfermedades como por ejemplo la gripe, otras virosis emergentes y la leptospirosis, debido a que los síntomas son muy generales. Por ello es muy importante tener claro el contexto epidemiológico a la hora

del diagnóstico. Al final de esta fase y previo al inicio del edema pulmonar aparece la tos y taquipnea (Enria et al., 2001).

La fase cardiopulmonar la determina la presencia de shock y edema pulmonar con un rápido progreso que puede ser de cuatro a veinticuatro horas. Con frecuencia se observan hipotensión y oliguria sumándole debilidad y delirio como resultado del shock. La entrada progresiva de fluido con altas cantidades de proteínas de la sangre circulante hacia los intersticios pulmonares y alveolos resulta en hipovolemia, contribuyendo al shock. El deterioro es muy rápido y el paciente fallece en 24-48 horas (Enria et al., 2001; Santana et al., 2006).

Si el paciente logra superar esta fase entra en la fase diurética donde se resuelve el edema pulmonar, la fiebre y shock ceden y el paciente comienza una lenta recuperación. La fase final es la convaleciente donde puede durar hasta dos meses y su recuperación completa (Enria et al., 2001).

La paraclínica que acompaña a esta enfermedad y ayuda con la búsqueda del agente etiológico está representada mediante algunos valores de laboratorio como por ejemplo la trombocitopenia (conteo de plaquetas menor a $150.000/\text{mm}^3$) conteo elevado de células blancas, presencia de células mononucleares y frecuentemente hemoconcentración. Puede existir disfunción hepática, donde se pueden ver alteraciones de las enzimas hepáticas, y alteración de la función renal. El uso de imágenes radiológicas del tórax del paciente, presentando infiltrados intersticiales bilaterales a nivel de pulmón y en ocasiones efusión pleural y pericardiaca puede complementar el estudio (Campos et al., 2009).

El diagnóstico de las hantaviriosis se basa en la detección de anticuerpos IgM e IgG, específicos en suero o plasma de los pacientes. Las pruebas más utilizadas son la inmunofluorescencia o pruebas inmunoenzimáticas tales como el ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), inmunoblotting o neutralización. Gracias a la elevada reactividad cruzada a nivel de la nucleoproteína que poseen los hantavirus es posible utilizar antígeno crudo o proteína N purificada de diferentes variantes virales, logrando una buena sensibilidad y especificidad. Las respuestas de anticuerpos IgM e IgG se detectan tempranamente, aunque hay casos donde la respuesta de IgM puede ser más tardía, como se demostró para las infecciones por el virus Puumala (Padula et al., 2000; Raboni et al., 2007; Vapalahti et al., 2001).

En Uruguay el diagnóstico de referencia se realiza en el Departamento de Laboratorio de Salud Pública. Las técnicas utilizadas son ELISA de origen comercial (FOCUS[®]) el cual es recomendado y evaluado por el Centro de Prevención de Enfermedades (CDC). Este kit permite la búsqueda en suero de anticuerpos IgM e IgG contra hantavirus. También se utiliza como técnica complementaria la detección genómica por RT-PCR basada en la amplificación parcial de segmento M.

1.13 Hantavirus en Uruguay - antecedentes.

Los primeros estudios sobre hantavirus en Uruguay datan de 1985 y 1987 donde utilizando inmunofluorescencia indirecta se detectó una seroprevalencia de 1% en sueros de donantes de sangre (Weissenbacher et al., 1996). En estos estudios los antígenos utilizados fueron Hantaan y Seoul, los cuales se clasifican como hantavirus del Viejo Mundo (Weissenbacher et al., 1996).

Los primeros casos registrados en el Uruguay se diagnosticaron en 1997, en las localidades de Cebollatí (Rocha) y Melilla (Montevideo). A partir de ese momento las autoridades del Ministerio Salud Pública montaron un equipo de vigilancia y diagnóstico de la enfermedad.

En el año 2000 se publican secuencias parciales de los segmentos S y M de dos casos de Síndrome Pulmonar por Hantavirus (SPH), diagnosticados en los años 1997 y 1999. El análisis genético de dichas secuencias reveló que correspondían al linaje Andes-Central Plata, variante que circula en la provincia de Buenos Aires y a ambos márgenes del Río de la Plata, de donde se originó su nombre (Padula et al., 2000).

En el año 2003 se reporta al ratón colilargo chico (*Oligoryzomys flavescens*), como uno de los principales reservorios en Uruguay y se caracterizan genéticamente los primeros hantavirus autóctonos. Las variantes circulantes en Uruguay en roedores y casos de SPH se identificaron como Central Plata y Lechiguanas, ambas variantes altamente emparentadas a nivel nucleotídico y aminoacídico. La seroprevalencia para hantavirus en *O. flavescens* fue determinada para las diferentes localidades de captura y varió entre 2,1% a 2,9% (Delfraro et al., 2003). Estudios posteriores permitieron determinar por métodos serológicos y moleculares la circulación de otro hantavirus en Uruguay, el virus Juquitiba, asociado a dos especies reservorio: el ratón colilargo grande (*Oligoryzomys nigripes*) y el hocicudo (*Oxymycterus nasutus*) (Delfraro et al., 2008). Este trabajo reporta por primera vez a *O. nasutus* como reservorio de hantavirus. El hantavirus Juquitiba, como se ha mencionado antes circula además en la zona Centro-sur de Brasil (Vasconcelos et al., 1997). La seroprevalencia encontrada en los roedores mencionados más arriba fue de 6% para el ratón hocicudo y 3,2% para *Oligoryzomys nigripes* (Delfraro et al., 2008).

Desde 1997 hasta fecha el número de casos de hantavirosis reportados por el Ministerio de Salud Pública (MSP) varían año a año (figura 6).

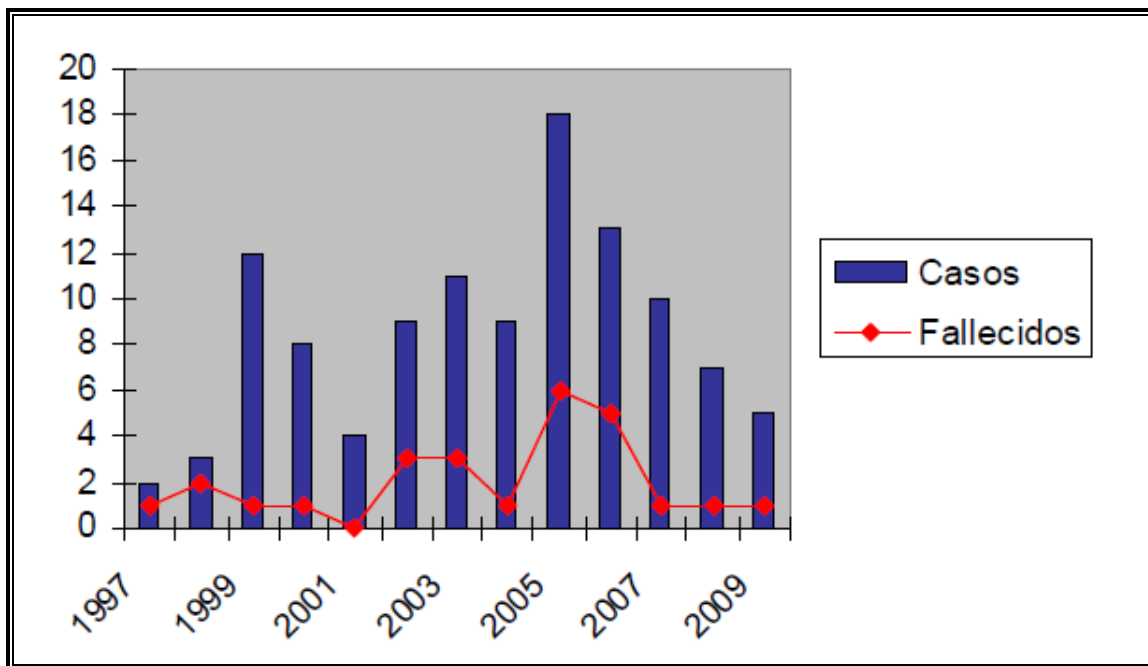


Figura 6. Histograma de la enfermedad por Hantavirus en Uruguay, donde se muestra la cantidad de casos y el número de fallecidos diagnosticados por el Ministerio de Salud Pública desde el año 1997 hasta el año 2010.

Basándose en el número de casos de SPH se definió una zona endémica para hantavirus la cual se ubica al sur del Río Negro, ubicándose la mayoría de los casos en los departamentos de Montevideo y Canelones (figura 7).

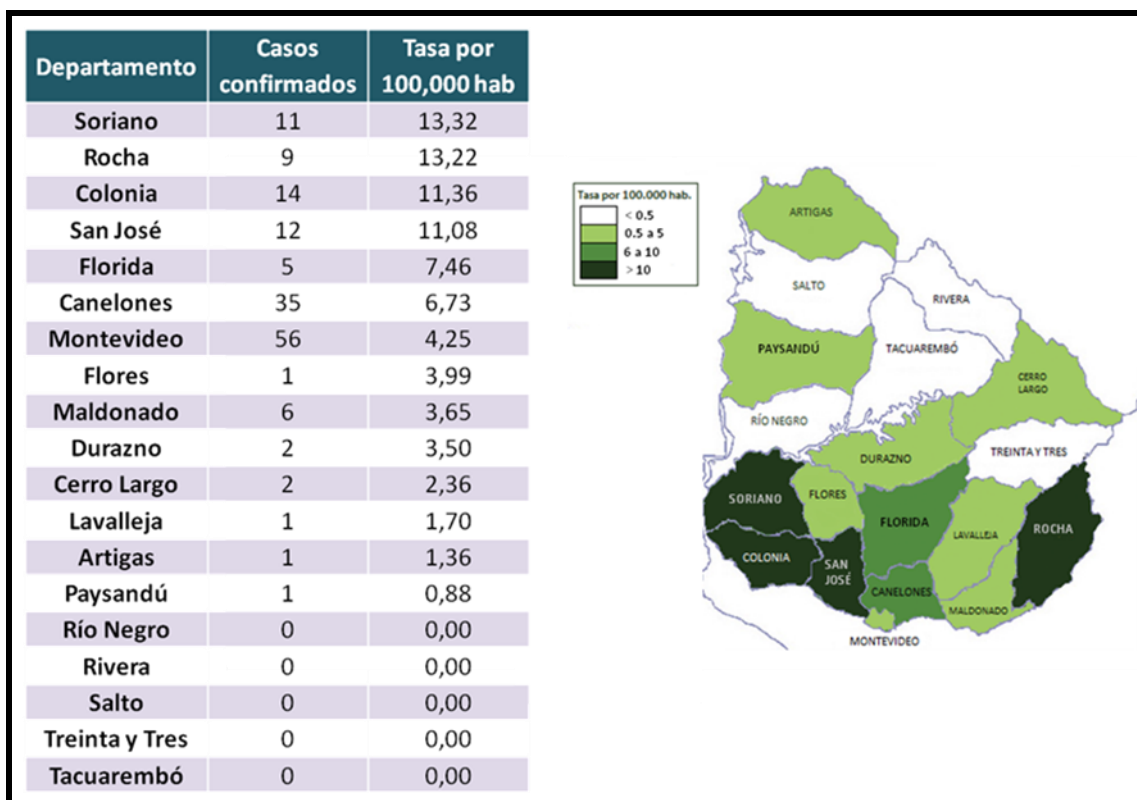


Figura 7. Mapa del Uruguay con la incidencia de hantavirus cada 100 mil habitantes y el número de casos confirmados hasta el año 2013. Datos cedidos por el Ministerio de Salud Pública.

A su vez, los departamentos con mayor incidencia cada 100000 habitantes son Soriano, Rocha, Colonia y San José (figura 7). Durante el año, la mayor cantidad de casos ocurre en primavera-verano y otoño, esto es consistente con el aumento de las actividades de riesgo.

Hasta 2008 no existían casos confirmados de SPH en ninguno de los departamentos ubicados al norte del Río Negro. En el año 2009, se confirmó por laboratorio el primer caso de SPH en el departamento de Artigas. Recién en el 2014 se sumarían dos casos más en el departamento de Paysandú, siendo hasta el momento tres los casos confirmados al norte del país.

2. Objetivos.

Objetivo general:

Estudiar la circulación de hantavirus en roedores y en los casos clínicos de SPH en Uruguay.

Objetivo específicos:

- . Profundizar el conocimiento de las especies de roedores que actúan como reservorio de hantavirus en Uruguay.
- . Determinar las diferencias en las prevalencias de infección entre las poblaciones de roedores de distintas áreas geográficas.
- . Caracterizar genéticamente los hantavirus aislados de muestras de roedores seropositivos.
- . Caracterizar genéticamente los virus provenientes de casos de SPH diagnosticados en humanos.
- . Comparar los hantavirus provenientes de roedores seropositivos con los virus provenientes de muestras de casos de SPH, con el fin de establecer la fuente de infección al humano.
- . Ampliar estudios previos analizando las poblaciones de roedores del norte del país con el fin de determinar si existe circulación de hantavirus en esa región.
- . Realizar un análisis retrospectivo de tejidos de roedores, con el fin de detectar circulación de virus previa a la aparición de los primeros casos de SPH en el país.
- . Elaborar un mapa de distribución potencial para la principal especie reservorio de hantavirus, con el fin de determinar posibles zonas de riesgo de hantavirosis en Uruguay.

3. Materiales y métodos.

3.1 Selección de los lugares de trampeo de roedores.

El trampeo de roedores fue orientado a diferentes localidades, tomando en consideración los datos previos sobre la distribución de las hantaviriosis en el país.

- A. Colecta de roedores en localidades donde ocurrieron casos confirmados de SPH y que no habían sido relevados en trabajos previos, tanto en la zona endémica como en el norte del país. Los datos de los casos de SPH fueron facilitados por el departamento de laboratorios de Salud Pública y la División de Epidemiología del MSP, e incluyeron lugares geográficos donde las personas vivían o trabajan dentro de los 45 días previos al inicio de los síntomas (tabla 3).
- B. Colecta de roedores en localidades del país donde no se han registrado casos confirmados de hantaviriosis (tabla 3).

Tabla 3. Lugares donde se realizaron las diferentes salidas de campo.

Localidad	Ubicación Geográfica	Departamento	Año	Salida asociada a caso SPH
Laguna de Castillos	34°21'S/53°51'W	Rocha	2008	NO
Punta del Diablo	34°2'S/53°32'W	Rocha	2012	SI
Villa Serrana	34°19'S/55°26'W	Lavalleja	2012	SI
Cerro Chapeu	30°58'S/55°26'W	Rivera	2012	NO
San Pedro	34°19'S/57°50'W	Colonia	2013	SI
Las Piedras	34°43'S/56°36'W	Canelones	2013	SI
Los Titanes	34°46'S/55°33'W	Canelones	2013	NO
Guazuvirá	34°46'S/55°36'W	Canelones	2013	NO
Constancia	32°12'S/58°00'W	Paysandú	2014	SI
Tranqueras	32°11'S/55°46'W	Rivera	2014	NO

3.2 Trampeo e identificación de micromamíferos. Procesamiento de las muestras.

Se seleccionaron diferentes ambientes para el trampeo: peridomicilios, o sea sitios relacionados con la vivienda o lugar de trabajo de los pacientes con SPH confirmado (casas, galpones, jardines, cobertizos, alambrados y borde de camino) y ambientes naturales representativos de cada área (humedales, chircales, bordes de arroyo, campos cultivados, bosques naturales o artificiales, etc.). Se colocaron trampas Sherman para captura de animales vivos (modelo LFATDG 23cm x 8cm x 8.5 cm, Sherman Traps Inc, Tallahassee, FL) siguiendo una transecta aproximadamente de un metro de distancia entre cada trampa y en intervalos de aproximadamente 10 metros.

La colocación de las trampas se realizó en el horario de la tarde y se retiraron al otro día en las primeras horas de la mañana, durante tres días consecutivos. El cebo utilizado fue avena con vainilla líquida. El número de trampas/noche por captura fue de 300 trampas/noche.

Los animales capturados fueron recogidos y procesados de acuerdo a las normas nacionales (protocolo aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal) e internacionales de bioseguridad (Mills & Childs, 1998). Cada roedor fue anestesiado y se colectó una muestra de sangre del seno retro-orbitario. Dicho animal se sacrificó mediante sobredosis de anestesia. Los roedores fueron clasificados taxonómicamente en el campo en base a los caracteres externos por el Dr. Mario Clara (Centro Universitario de Rivera). A cada roedor se le midió la longitud total, la masa corporal, sexo y estado reproductivo. Las muestras biológicas obtenidas fueron: hígado, pulmón y riñón, los cuales se conservaron en nitrógeno líquido hasta su llegada al laboratorio donde se conservaron a -80°C. Las muestras de sangre se conservaron a 4°C durante la salida. Al llegar al laboratorio se procedió a centrifugarlas a 2.500 revoluciones por minuto durante 10 minutos para separar el suero del coágulo. El suero se conservó a -20°C hasta su procesamiento. Las carcasas de los individuos capturados fueron conservadas en formol al 10% y guardadas en la colección de Facultad de Ciencias.

3.3 Análisis retrospectivo de tejidos de roedores.

El estudio retrospectivo de tejidos de roedores se llevó a cabo en muestras de hígado (N=29) las cuales fueron conservadas a -80°C. Los roedores fueron colectados entre 1994 y 1997 en distintas zonas del país para la realización de estudios poblacionales (tabla 4). Y fueron cedidas para la realización de este estudio por el Prof. Enrique Lessa (Laboratorio de Evolución, Facultad de Ciencias).

Tabla 4. Muestras analizadas en el estudio retrospectivo. N=29.

Catálogo	Especie	Procedencia
738	<i>Oxymycterus spp.</i>	Arroyo La Paloma, Rocha
627	<i>Oxymycterus spp.</i>	Arroyo La Paloma, Rocha
687	<i>Oxymycterus spp.</i>	Arroyo Tararira, Maldonado
680	<i>Oxymycterus spp.</i>	Arroyo El Renegado, Maldonado
688	<i>Oxymycterus spp.</i>	Arroyo El Renegado, Maldonado
685	<i>Oxymycterus spp.</i>	Arroyo El Renegado, Maldonado
690	<i>Oxymycterus spp.</i>	Arroyo El Renegado, Maldonado
696	<i>Oxymycterus spp.</i>	Arroyo Las Flores, Maldonado
701	<i>Oxymycterus spp.</i>	Arroyo Las Flores, Maldonado
617	<i>Oxymycterus spp.</i>	Arroyo La Paloma, Rocha
695	<i>Oxymycterus spp.</i>	Arroyo Las Flores, Maldonado
629	<i>Oxymycterus spp.</i>	Arroyo La Paloma, Rocha
618	<i>Oxymycterus spp.</i>	Arroyo La Paloma, Rocha
616	<i>Oxymycterus spp.</i>	Arroyo La Paloma, Rocha
575	<i>Scapteromys tumidus</i>	Arroyo La Paloma, Rocha
576	<i>Scapteromys tumidus</i>	Arroyo Las Flores, Maldonado
580	<i>Scapteromys tumidus</i>	Arroyo Las Flores, Maldonado
577	<i>Akodon azarae</i>	Arroyo Las Flores, Maldonado
578	<i>Akodon azarae</i>	Arroyo Las Flores, Maldonado
579	<i>Akodon azarae</i>	Arroyo Las Flores, Maldonado
739	<i>Akodon azarae</i>	Arroyo La Paloma, Rocha
691	<i>Akodon azarae</i>	Arroyo Las Flores, Maldonado
692	<i>Akodon azarae</i>	Arroyo Las Flores, Maldonado
718	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	Laguna Negra, Rocha
719	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	Laguna Negra, Rocha
720	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	Laguna Negra, Rocha
721	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	Laguna Negra, Rocha
724	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	Laguna Negra, Rocha
1026	<i>Rattus rattus</i>	Ciudad Vieja, Montevideo

3.4 Detección de anticuerpos anti-hantavirus en roedores.

La detección anticuerpos IgG anti hantavirus en los sueros de los roedores se realizó mediante la técnica de ELISA. Este es un ensayo no comercial, puesto a punto en la Sección de Virología de Facultad de Ciencias. Se recubrieron placas de microtitulación de polivinil cloride (PVC) (Thermo Technologies, Chantilly, VA) de 96 pocillos con una suspensión de antígeno de virus Maciel, y se incubaron toda la noche a 4°C. El antígeno fue obtenido cultivando el virus en células Vero E6, lisado

e inactivado por irradiación gamma. Como control de la especificidad de la reacción de los sueros problema se utilizó además un antígeno negativo (lisado de células Vero E6 sin infectar). Ambos antígenos fueron cedidos gentilmente por la Dra. Silvana Levis, el Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas (INEVH) Dr. Julio Maiztegui, Pergamino, Buenos aires, Argentina. A continuación se realizaron cuatro lavados con tampón fosfato salino (PBS)-Tween 0,1%. Se bloqueó la placa utilizando PBS-leche descremada al 10%-Tween 0,1% durante una hora a 37°C. Luego se realizaron ocho lavados con PBS-Tween 0,1%, se procedió a la colocación de los sueros de los roedores a una dilución 1:400 para el tamizaje y diluciones seriadas (1:100, 1:400, 1:1.600, 1:6.400) para los controles positivos (sueros roedores positivos) y los controles negativos (sueros de ratones Balb-C). Se incubaron por una hora a 37°C y al finalizar se realizaron ocho lavados con PBS-Tween 0,1%. El conjugado utilizado en el paso siguiente fue una mezcla de IgG(Cabra) anti *R. rattus* e IgG(Cabra) anti *P. leucopus*, ambas conjugadas con peroxidasa (Kirkegaard y Perry Laboratories, Gaithersburg, MD), en una dilución de 1:1.500 cada uno, incubándose por una hora a 37°C. Seguidamente se realizaron ocho lavados con PBS-Tween 0,1% y se reveló la reacción utilizando el sustrato ABTS (2'-azino-di[3-etil-benzotiazolina sulfonato]) y H₂O₂ partes iguales (1:1) (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD). La densidad óptica de la reacción inmunoenzimática se midió a 405 nm en un espectrofotómetro para placas de 96 pocillos (Varioskan™). Se consideró reactivos aquellos sueros cuya densidad óptica medida con el antígeno Maciel resulte $\geq$ a 2 veces la densidad óptica medida con el antígeno negativo (células Vero E6 sin infectar).

Los sueros reactivos en el tamizaje fueron posteriormente titulados en diluciones seriadas (1:100, 1:400, 1:1.600, 1:6.400). Se considera hantavirus positivo a aquel suero que resulte reactivo con los criterios antes mencionados a una dilución $\geq$ 1:400. Para todos los ensayos se utilizaron sueros control positivo (hantavirus positivos de la colección del laboratorio) y sueros control negativos (ratones de laboratorio Balb-C).

3.5 Extracción de ARN total de los órganos de los roedores seropositivos.

La extracción de ARN se realizó a partir de los tres órganos (pulmón, riñón e hígado) de todos los roedores que resultaron seropositivos, utilizando para cada caso 100 mg de tejido. Se utilizó el reactivo comercial TRIzol[®], de acuerdo al protocolo del fabricante. El tejido se disgregó mediante cortes con bisturí, se le agregó 1 ml de Trizol[®] y se resuspendió mediante agitación con vórtex y pipeteo. Posteriormente se colocaron 300µl de cloroformo, se homogeneizó y se dejó reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se realizó una centrifugación

a 13.000rpm a 4°C durante 15 minutos para separar ambas fases, obteniendo el sobrenadante y descartando la interfase y fase orgánica. Luego se adicionó 1 ml de isopropanol 100% y se incubó a temperatura ambiente por media hora. A continuación se realizó una centrifugación por 15 minutos a 13.000rpm a 4°C. El pellet obtenido se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 40 µl de agua estéril libre de ARNasas.

3.6 Realización de Ensayos Moleculares: RT-PCR.

A. Amplificación genómica de las muestras de roedores seropositivos y estudio retrospectivo.

Las amplificaciones parciales de los segmentos S y M de los roedores positivos para hantavirus se realizaron con diferentes juegos de oligonucleótidos listados en la tabla 5.

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para los ensayos moleculares.

Nombre	Secuencia(5'-3')	Segmento	Ubicación
Han 1	AGCACATTACAAAGCAGACGGCA	S	166-189
Han 2	CCAGTTGATCCAACAGGG	S	274-291
Han 11	TATGATATTCCTTGCCCTTCACTTGGGC	S	690-664
Han 28	AGCCATGATTGTGTTGCG	S	1071-1054
HanCu 1	TGGGTITTYKCWKIGICCCWGA	S	958-984
Han Cu 1	TTIRIGGYTGRTTIGAIATYTC	S	1324-1301
Han Cu 2	CAGGAYATGMGRAAYACMATIATGGC	S	1052-1073
Han Cu 2	TCIGGRTCCATRTCRTICCC	S	1257-137
3348	CTGTCCAGATTAGTGTTCCA	M	3327-3348
3221	TCAGAAGAGCAGTCAGTGTCATG	M	3199-3221
2765	CTGTATGTGAGTACCAAG	M	2765-2782

Para la realización de la retrotranscripción (RT) se utilizó la transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis aviar (MMLV-reverse transcriptase, Gibco-BRL). Se colocaron 5 µl de ARN total, 1 µl de primer específico antisentido 10 mM o 1µl de random primer, 1 µl dideoxinucleótidos(DNTPs) 10 mM y 7 µl de agua ultrapura libre de ARNasas (GIBCO-BRL). La mezcla se calentó a 65°C por 5 minutos y luego se colocó en hielo. A dicha mezcla se le adicionó 4 µl de buffer "First strand" 5X y 1 µl de enzima (200U), y se incubó a 50°C por una hora.

Para las amplificaciones por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó 5 µl de la RT.

La mezcla de reacción consistió en: buffer de PCR 10X llevándolo a una concentración de 1X, oligonucleótidos específicos en concentraciones de 10 mM, dNTPs 10 mM, MgCl₂ 50 mM, 2 unidades de Taq ADNpolimerasa y agua ultrapura libre de ARNasas (GIBCO-BRL) hasta un volumen final de 50 µl. Se realizó luego una

PCR anidada para la cual se utilizó de 1 a 2 µl de la primera PCR, manteniendo las mismas concentraciones finales de la primera PCR.

Los ciclos de temperatura fueron: para el segmento M: 94°C/2 minutos, más 35 ciclos de: 94°C/30 segundos, 37°C/30 segundos, 72°C/2 minutos y finalmente una extensión final de 72°C/5 minutos. Para el segmento S: 94°C/2 minutos más 40 ciclos de 94°C/30 segundos, 50°C/30 segundos, 72°C/1 minuto y una extensión final de 72°C/5 minutos. Para las PCR anidadas se utilizaron los mismos ciclados.

La visualización de los productos de RT-PCR se realizó mediante electroforesis en agarosa 1%- TBE y la tinción se llevó a cabo con bromuro de etidio.

B. Amplificación genómica a partir de ARN de casos de SPH positivas confirmados para hantavirus.

Las muestras de pacientes hantavirus positivos fueron cedidas por la Unidad de Virología del Departamento de Laboratorio de Salud Pública (DLSP) (Ministerio de Salud Pública) en el marco de un proyecto conjunto con la Sección Virología de Facultad de Ciencias (CSIC I+D). Se analizaron un total de 39 muestras de ARN total extraídas de plasma de pacientes con SPH confirmados para hantavirus por prueba de ELISA. Este banco de muestras data desde 2006 hasta la fecha. La extracción de ARN se realizó con el kit comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN Inc.) y se conservaron a -80°C. La amplificación genómica de hantavirus para estas muestras se realizó utilizando los protocolos descritos en el punto A.

3.7 Secuenciación y análisis filogenéticos.

Los productos de RT-PCR obtenidos a partir de las muestras de roedores y de los casos de SPH se enviaron a purificar y secuenciar al servicio de secuenciación del Instituto Pasteur de Montevideo y/o a la empresa MacroGen.

Las secuencias obtenidas fueron procesadas, editadas y alineadas con el programa BioEdit 4.7. En nuestro conjunto de muestras se utilizaron secuencias de hantavirus previamente reportados en Uruguay y secuencias de hantavirus representativos de las Américas tomadas de las bases de datos de dominio público (GenBank).

Para inferir el modelo que mejor se ajustó a nuestro conjunto de muestras se utilizó el programa ModelGenerator (Keane et al., 2006). Los análisis filogenéticos se realizaron por el método de máxima verosimilitud, dichos análisis se llevaron a cabo con el programa PhyML (Guindon et al., 2010)

Los porcentajes de homología nucleotídica y aminoacídica y los análisis filogenéticos de distancia se realizaron con el programa MEGA 6 (Tamura et al., 2013).

Se calcularon las tasas de sustitución no sinónima vs sinónima (dN/dS) para la región del segmento S y el segmento M estudiadas, para ello se utilizó el programa SLAC del servidor Datamonkey (Delpont et al., 2010).

3.8 Distribución potencial de la especie *Oligoryzomys flavescens* reservorio de hantavirus.

Los 55 registros georreferenciados (Anexo 1) para la especie *Oligoryzomys flavescens* se obtuvieron de las campañas de trampeo llevadas a cabo a través de todo este proyecto y de las capturas realizadas previamente en la Sección. También se recabaron datos de la colección científica de la Facultad de Ciencias y del Museo de Historia Natural. Se incluyeron en el análisis los registros positivos y negativos para hantavirus.

Para modelar la distribución potencial de la especie se utilizó el programa Maxent versión 3.3.3k (Phillips *et al.*, 2006). Este programa implementa un algoritmo de máxima entropía para calcular la distribución geográfica más probable. A partir de variables ambientales, topográficas (altitud, pendiente, relieve) y antrópicas (por ejemplo uso de suelo) el algoritmo establece la idoneidad del hábitat para la especie estudiada (Phillips *et al.*, 2006). Se utilizaron las 19 variables bioclimáticas de la base de datos WorldClim (Hijmans *et al.*, 2005; <<http://www.worldclim.org>>), más la altitud obtenida de la base SRTM 90 m de la NASA (Jarvis *et al.*, 2008; <<http://www.cgiar-csi.org>>) con una resolución de 30 arcs (1 × 1 km). A estas variables se le agregaron un conjunto de 12 variables geográficas y 14 variables antrópicas. La salida logística de Maxent da como resultado valores que pueden interpretarse como de idoneidad del hábitat, área debajo de la curva (AUC) y de la característica operativa del receptor (ROC) para analizar la discriminación del modelo. Este índice varía entre 0 y 1; valores de 0,5 indican que la predicción no es distinta al azar, y en general se considera que valores por encima de 0,70 indican un buen ajuste del modelo. Para la corrida de los modelos de distribución se seleccionó aleatoriamente el 75% de los registros para entrenar el modelo y el 25% restante para testear su desempeño (Phillips *et al.*, 2006). A las 19 variables bioclimáticas se les aplicó el coeficiente de Spearman para obtener la correlación entre las mismas y eliminar aquellas redundantes entre sí ($R \geq 0,75$; ver Torres & Jayat, 2010). Una vez eliminadas se volvió a correr el modelo sólo con las variables seleccionadas, realizando una sola corrida para la especie. La extensión de la corrida abarcó todo el territorio uruguayo.

4. Resultados.

4.1 Descripción de las aéreas de trampeo.

Se realizaron 10 campañas de trampeo en diferentes localidades del país (figura 8).

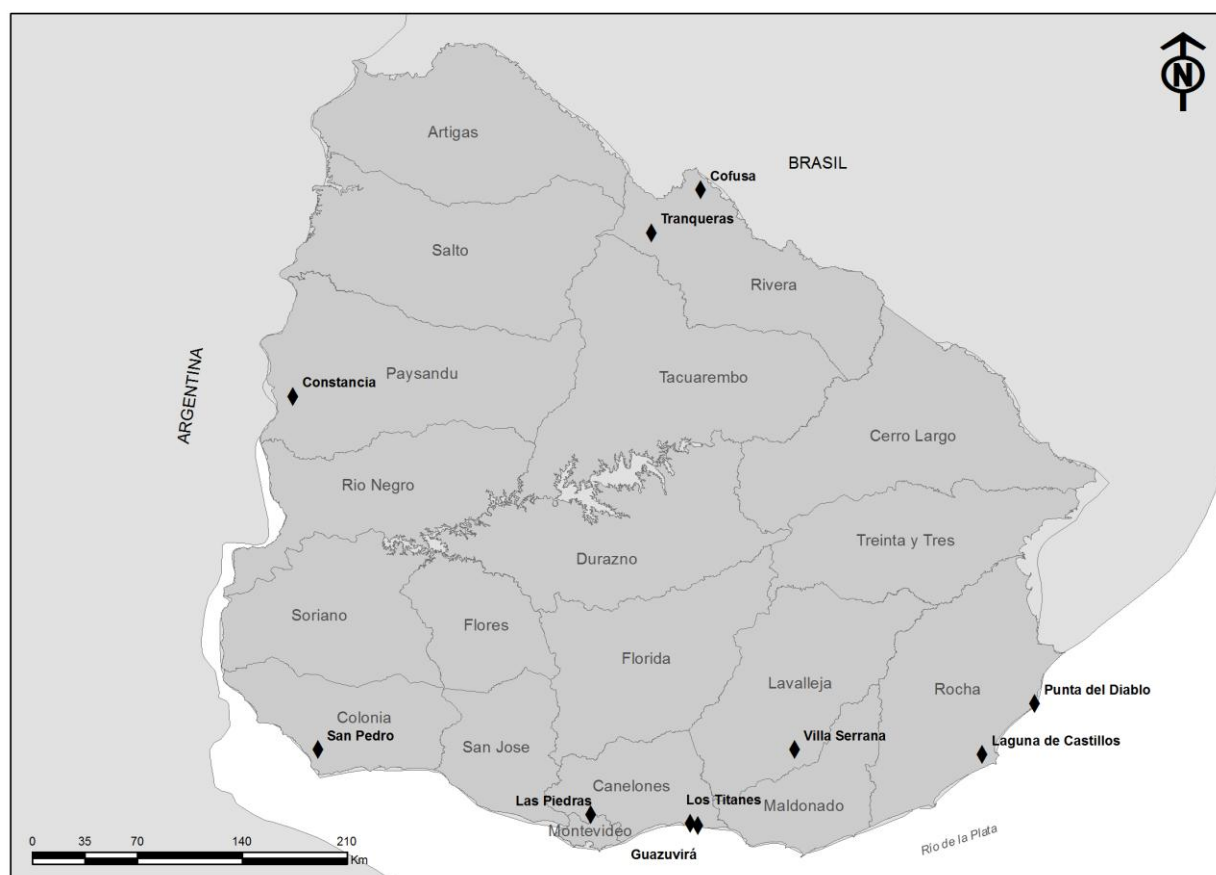


Figura 8. Mapa del Uruguay donde se señalan las localidades de muestreo de roedores para este estudio.

La primera salida fue realizada en el mes de octubre en el año 2008, el área explorada fue la reserva natural de la Laguna de Castillos, es una zona dominada con praderas naturales y zonas inundables, con una presencia de pequeños parches de montes nativos. Las especies nativas predominantes son: el ombú (*Phytolacca dioica*), pitanga (*Eugenia uniflora*), entre otros. Es un área protegida por lo cual no existen actividades económicas (figura 9).

La segunda salida fue realizada en el mes de marzo del año 2012 en la localidad de Punta del Diablo, ésta estuvo asociada a un caso de SPH. Se realizó el trampeo de roedores en el peridomicilio donde estuvo la persona afectada por el virus, así como en varias zonas (humedales, pajonales, montes de acacias y parches de vegetación cercanos a la costa) del poblado de pescadores (figura 9). Es una zona urbana en pleno crecimiento poblacional. La vegetación natural predominante son los montes de

Acacia spp., algunas zonas de bañado con juncos y dunas. Las principales actividades económicas son la pesca y el turismo local. En la captura se pudo observar varias viviendas en construcción en terrenos vírgenes de la zona.

En julio de 2012 se capturaron roedores en la localidad de Villa Serrana en el departamento de Lavalleja. Esta salida estuvo asociada a un caso de SPH, este episodio ocurrió en la semana de turismo de ese mismo año. Esta localidad se caracteriza por un paisaje de sierras con monte nativo serrano y campo natural. Las especies nativas que forman parte de este paisaje son Canelón (*Drimys winteri*), Coronilla (*Scutia buxifolia*), Tala (*Celtis spinosa*), espina de la cruz (*Colletia paradoxa*) y formación de chircales. Existe un embalse de agua, en los márgenes de dicho curso se forman pajonales muy densos. La principal actividad económica de esta localidad es la explotación forestal y el turismo. Se puede apreciar edificaciones de pequeño porte y separadas entre sí (figura 9).

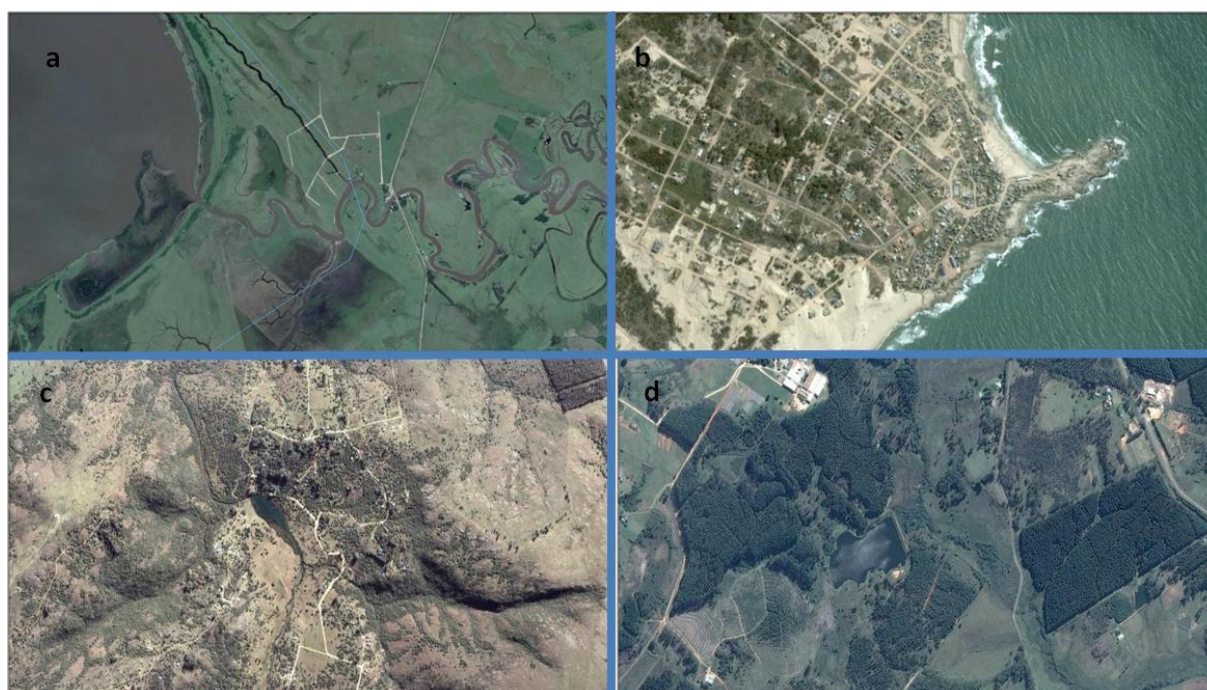


Figura 9. Visualización satelital de las diferentes áreas de trampeo. a) Laguna de Castillos, Rocha; b) Punta del Diablo, Rocha; c) Villa Serrana, Lavalleja; d) Cerro Chapeu, Rivera.

La cuarta salida transcurrió a las afuera de la ciudad de Rivera en el mes de diciembre del año 2012, en una zona de explotación forestal intensiva (Cerro Chapeu). En dicha salida se pudo apreciar una fragmentación del ambiente y su modificación relacionada a dicha actividad económica. En esta localidad predominaron las plantaciones a gran escala de *Eucalyptus spp.*, entre las plantaciones existían caminos rurales para el traslado de la madera donde en sus márgenes se formaban chircales (figura 9). Se observó parches de campo natural y varios tajamares como fuente de agua. Se constató poca población en el lugar quedando reducida solamente al personal que trabaja en la zona.

En abril del año 2013 se llevó a cabo una salida de muestreo en la localidad de San Pedro, departamento de Colonia. La salida estuvo relacionada con un caso de SPH en un trabajador rural que se dedicaba al desmonte. La localidad antes mencionada se caracteriza por ser una zona agrícola destinada fundamentalmente al cultivo de secano, donde en invierno se planta trigo y cebada, y en verano soja y maíz (figura 10). En ella se alojan una serie de tambos de pequeña y mediana producción. Es una zona muy fragmentada por las diferentes actividades económicas, se puede observar un arroyo en cuyas márgenes se observa monte nativo. También se observa campo natural y pradera artificial para el pastoreo del ganado lechero.

En el mismo año en los primeros días de diciembre se realizaron dos salidas al departamento de Canelones. La primera se llevó a cabo en la ciudad de Las Piedras (ubicada a 24 Km de Montevideo). Es una ciudad de aproximadamente 71 mil habitantes, en su periferia se caracteriza por tener pequeñas superficies de tierras destinadas fundamentalmente a la horto-fruticultura (chacras y huertas)(figura 10). La modificación del paisaje por el hombre es notoria y se puede apreciar la fragmentación del campo natural reduciéndolo a parches de chircales y arbustos de baja talla. Se pudo observar en los lugares de trampeo las plantaciones de tomates, zapallo, maíz entre otros, así como la producción de durazno, ciruela, manzanas y peras. Se visualizó en el área importante cantidad de mano de obra rural.

A finales del mes de diciembre del año 2013, se realizó una salida de trampeo a los balnearios turísticos de Los Titanes y Guazuvirá. Ambos balnearios se caracterizan por tener una escasa población en los meses de invierno pero sufren un drástico aumento de habitantes en los meses de verano debido al movimiento turístico local. En Los Titanes se puede apreciar una zona urbana dispersa con montes de *Eucalyptus*, así como monte psamófilo asociado a la zona costera formado principalmente de arrayán (*Blepharocalyx salicifolius*), cactus (*Cereus uruguayanus*), coronilla (*Scutia buxifolia*), espina de la cruz (*Colletia paradoxa*), molle (*Schinus longifolia*), tala (*Celtis spinosa*) y tuna (*Opuntia arechavaletae*)(figura 10).



Figura 10. Fotografías satelitales de las aéreas involucradas en las salidas de campos. e) San Pedro, Colonia; f) Los Titanes, Canelones; g) Las Piedras, Canelones; h) Constancia, Paysandú.

En el balneario Guazuvirá la captura fue realizada en el bañado, el cual se extiende a ambos lados de la ruta Interbalnearia y en su periferia, donde existe una asociación de montes de acacias y pinos. Cerca de este gran bañado se puede visualizar pequeñas construcciones locales, las cuales aumentan en número hacia la zona costera (Figura 10).

La siguiente captura se realizó en la localidad de Constancia, en el departamento de Paysandú. Se desarrolló en el mes de marzo del año 2014 y estuvo asociada a un caso de SPH que afectó a un trabajador rural. En esta localidad se puede apreciar una marcada actividad lechera con tambos de mediano y gran porte de producción. El paisaje se caracterizó por grandes extensiones de praderas artificiales tanto perennes como anuales y cultivos para reserva (maíz y sorgo), todo relacionado con la actividad ganadera. No se observaron montes nativos (Figura 10).

La última captura fue realizada en el mes de diciembre de 2014 en la localidad de Tranqueras, un pequeño poblado en el departamento de Rivera. En esta localidad se destacan dos tipos de plantaciones: la forestal y la dedicada a la plantación de tabaco y sandía. Se caracteriza por ser un ambiente medianamente modificado por las actividades económicas mencionadas anteriormente.

4.2 Distribución de roedores por especie y por sitio de captura.

Se capturaron un total de 430 micromamíferos pertenecientes a tres subfamilias (*Sigmodontinae*, *Muridae* y *Caviidae*) y un ejemplar de la familia *Didelphidae*. En la siguiente tabla se desglosan las especies y el número de individuos capturados por localidad (tabla 6).

En la captura realizada en la Laguna de Castillos se capturaron un total de 34 individuos, con un esfuerzo de trampeo de 320 trampas/noche y una eficiencia de trampeo del 10%.

Tabla 6. Especies capturadas en las diferentes localidades.

Especie	Laguna de Castillos	Punta del Diablo	Villa Serrana	Cerro Chapeu	San Pedro	Las Piedras	Los Titanes-Guazuvirá	Constancia	Tranqueras
<i>Akodon azarae</i>	2	2	0	5	30	30	3	8	11
<i>Oxymycterus spp.</i>	1	10	0	8	25	0	21	0	13
<i>Scapteromys tumidus</i>	3	0	0	0	22	16	20	3	1
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	13	7	2	2	15	6	3	2	9
<i>Mus musculus</i>	0	0	0	0	7	21	0	22	0
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	11	0	1	1	26	0	0	0	0
<i>Necomys obscurus</i>	0	0	0	0	10	10	0	0	0
<i>Holochilus brasiliensis</i>	1	0	1	0	0	0	4	0	3
<i>Deltamys kemp</i>	3	2	0	1	0	0	0	0	1
<i>Rattus rattus</i>	0	4	0	0	1	0	1	0	0
<i>Cavia aperea</i>	0	0	0	0	0	0	3	0	0
<i>Calomys laucha</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Reithrodon spp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	1	0
<i>Monodelphis dimidiata</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Total de ejemplares capturados	34	25	4	17	136	83	55	37	39
Total de especies capturadas	7	5	3	5	8	5	7	6	7
Eficiencia de trampeo(%)	10	3	0,43	3	15	9	6	4	5

En la salida de campo efectuada en Punta del Diablo, Rocha se lograron recolectar un total de 25 individuos, con un esfuerzo de trampeo 900 trampas/noche y la eficiencia de captura fue de un 3%.

En la localidad de Villa Serrana, Lavalleja se capturaron muy pocos individuos (N=4) con un esfuerzo de captura de 850 trampas/noche. La eficiencia de trampeo fue de 0.43%.

En la localidad de Cerro Chapeu en el departamento de Rivera se capturaron un total de 17 individuos, con un esfuerzo de captura de 650 trampas/noche, y una eficiencia de captura de 3%.

En la captura llevada a cabo en el departamento de Colonia, en la localidad de San Pedro, se colectaron 136 individuos con un esfuerzo de trampeo de 900 trampas/noche y una eficiencia de captura de 15%.

Las salidas de campo realizadas en el departamento de Canelones totalizaron 138 individuos colectados. En las afueras de la ciudad de Las Piedras se capturaron 83 individuos con un esfuerzo de trapeo de 920 trampas/noche y una eficiencia de 9%. En la zona de Los Titanes – Guazuvira se capturaron un total de 55 roedores, con un esfuerzo de trapeo de 900 trampas/noche y una eficiencia 6%.

En la localidad de Tranqueras, Rivera se capturaron 39 individuos con un esfuerzo de trapeo de 800 trampas /noche y una eficiencia de captura de 5%.

En las diez salidas realizadas se capturaron un total de 430 ejemplares de 14 especies diferentes. Los roedores más capturados fueron *A. azarae* con 91 ejemplares (21%), seguido por los ratones horticudos (*Oxymycterus spp.*) con 78 especímenes (18%), las ratas de los pantano (*S. tumidus*) con 65 individuos (15%), los ratones colilargos chicos (*O. flavescens*) con 59 ejemplares (14%) y los ratones domésticos (*M. musculus*) con 50 especímenes (12%). Las demás especies fueron *O. nigripes* con 39 individuos (9%), *N. obscurus* con 20 ejemplares (4,5%), *H. brasilensis* con 9 especímenes (2%), *D. kemp* con 7 individuos (1,6%) y la especie exótica *R. rattus* con 6 ejemplares (1,4%). También se capturó un ejemplar de *Calomys laucha* y uno de *Reihrodon spp*, siendo las menos abundantes. De la subfamilia *Caviidae* se recolectaron 3 ejemplares de *Cavia aperea*. El único marsupial de la familia *Didelphidae* capturado fue un ejemplar de comadreja colorada chica (*Monodelphis dimidiata*) (Tabla 7). El esfuerzo de trapeo en la totalidad de las salidas fue de 7.155 trampas/noche con una eficiencia de trapeo promedio de 6,3%.

Tabla 7. Total de micromamíferos capturados por especie en este estudio.

Especie	Número de individuos
<i>Akodon azarae</i>	91
<i>Oxymycterus spp.</i>	78
<i>Scapteromys tumidus</i>	65
<i>Oligoryzomys flavescens</i>	59
<i>Mus musculus</i>	50
<i>Oligoryzomys nigripes</i>	39
<i>Necromys obscurus</i>	20
<i>Holochilus brasilensis</i>	9
<i>Deltamys kemp</i>	7
<i>Rattus rattus</i>	6
<i>Cavia aperea</i>	3
<i>Calomys laucha</i>	1
<i>Reihrodon spp.</i>	1
<i>Monodelphis dimidiata</i>	1
Total de individuos	430

4.3 Detección de roedores seropositivos para hantavirus.

Los 430 sueros de los roedores capturados, se procesaron para la detección de anticuerpos tipo IgG específicos anti hantavirus por la técnica de ELISA. En la tabla 8 se detallan los resultados de estos ensayos. En base a los criterios de positividad descritos en materiales y métodos se detectaron en el tamizaje un total de cinco individuos seropositivos: cuatro ratones colilargos chicos (*O. flavescens*) y un ratón de azara (*Akodon azarae*).

Las localidades donde se capturaron los *O. flavescens* positivos fueron Laguna de Castillos y Punta del Diablo (Rocha), Las Piedras (Canelones) y San Pedro (Colonia) cada una de ellas con un ejemplar.

El único ejemplar positivo para *Akodon azarae* fue capturado en San Pedro, Colonia. En las demás localidades (Villa Serrana, Cerro Chapeu, Los Titanes – Guazuvirá, Constanica y Tranqueras) no se detectaron roedores seropositivos.

De los ratones colilargos chicos, 3 ejemplares resultaron ser machos y un ejemplar hembra con 8 embriones en avanzado estado de desarrollo. Los ambientes donde se capturaron fueron diversos: dos se capturaron en ambientes naturales (monte de ombúes y bañado) y los otros dos en ambientes modificados por el hombre (borde de camino y quinta de tomates). Tanto el ejemplar capturado en bañado como los capturados en ambientes antropizados se ubicaban a menos de 150 metros de actividades humanas.

Tabla 8. Especímenes seropositivos encontrados en las diferentes localidades. Se indica especie, sexo, ambiente donde se capturaron y título de anticuerpos específicos anti hantavirus.

Localidad	Especie	Sexo	Hábitat	Título de anticuerpos
Laguna de Castillos	<i>O. flavescens</i>	Macho	Monte de Ombú	>1:6.400
Punta del Diablo	<i>O. flavescens</i>	Hembra	Bañado	>1:6.400
San Pedro	<i>O. flavescens</i>	Macho	Borde Camino	1:1.600
San Pedro	<i>A. azarae</i>	Hembra	Borde Camino	1:1.600
Las Piedras	<i>O. flavescens</i>	Macho	Quinta	>1:6.400

El ejemplar hembra de *Akodon azarae* se capturó en el borde del camino y a 10 metros de un individuo positivo de *O. flavescens*, en la localidad de San Pedro (Figura 11).



Figura 11. Ambiente donde se capturaron los dos roedores seropositivos de diferentes especies (*Akodon azarae* y *Oligoryzomys flavescens*) en San Pedro, Colonia.

Las pruebas de titulación mostraron que tres de los cinco ejemplares seropositivos presentaban títulos de anticuerpos IgG mayores a 1:6.400 (Laguna de Castillos, Punta del Diablo y Las Piedras), mientras que dos ejemplares presentaron títulos 1:1.600 (San Pedro).

Las prevalencias de infección en *O. flavescens* calculadas para las diferentes zonas se muestran en la tabla 9. La seroprevalencia de infección en la reserva natural de Laguna de Castillos fue de un 7,7%, en la localidad de Punta del Diablo la seroprevalencia de infección detectada fue de un 14%, para la localidad de San Pedro, Colonia la prevalencia de infección fue de un 6,7% y la mayor prevalencia de esta especie se observó en Las Piedras (Canelones) con un 17%.

La prevalencia de infección en los *Akodon azarae* capturados en San Pedro, Colonia fue de 3,3%.

Tabla 9. Ejemplares seropositivos encontrados en las diferentes localidades. Se indica especie, abundancias relativas y seroprevalencias.

Localidad	Especie	Abundancia relativa (%)	Seroprevalencia (%)
Laguna de Castillos	<i>O. flavescens</i>	38	7,7
Punta del Diablo	<i>O. flavescens</i>	28	14
San Pedro	<i>O. flavescens</i>	11	6,7
San Pedro	<i>A. azarae</i>	22	3,3
Las Piedras	<i>O. flavescens</i>	7	17

4.4 Infección por hantavirus en roedores. Amplificación parcial del genoma viral.

A) Roedores seropositivos para hantavirus capturados en las salidas de campo.

Se realizó la extracción de ARN total a partir de tejidos de los cinco ejemplares seropositivos para hantavirus. Utilizando diferentes combinaciones de oligonucleótidos (Tabla 5) fue posible amplificar diferentes regiones del segmento S y/o el segmento M de los individuos positivos. Estas secuencias parciales son informativas para estimar la filogenia viral, reproduciendo los grupos filogenéticos principales que se obtienen analizando secuencias completas de los segmentos S y M. Para todos los ratones *O. flavescens* seropositivos se logró amplificar regiones parciales de los segmento S y M. En cambio para el ejemplar de *Akodon azarae* (San Pedro, Colonia) se logró amplificar una secuencia parcial de 200 pares de bases del segmento S, y no fue posible amplificar el segmento M.

B) Análisis retrospectivo de tejidos de roedores.

Se llevo a cabo la extracción de ARN total a partir de los 29 tejidos de roedores conservados a -80°C de la colección del Laboratorio de Evolución. Se utilizaron diferentes combinaciones de oligonucleótidos (Tabla 5) para amplificar el segmento S de hantavirus. No se obtuvo resultados positivos para ninguna de las muestras analizadas.

4.5 Infección por hantavirus en casos de SPH. Amplificación del genoma viral.

Se procesaron para la amplificación parcial del segmento S un total de 39 muestras de ARN total, proveniente de muestras confirmadas serológicamente como SPH entre los años 2005-2013 (Tabla 10). Del total de muestras procesadas fue posible amplificar 21 (54%) con la combinación de los oligonucleótidos (Han1, Han2, Han11 y Han28), obteniéndose una banda de 450 pares de bases (pb) correspondiente al segmento S (posición 274 -690 respecto a la secuencia Lechiguanas AF482714).

Las muestras que no fueron amplificadas por esta combinación de oligonucleótidos fueron analizadas con el par HanCu (tabla 5), éstos amplifican otra región más pequeña del segmento S (205 pares de bases) correspondiente a la posición 1052-1257 en relación a la secuencia del virus Lechiguanas (AF482714). Éstos son oligonucleótidos genéricos, que permiten la amplificación genómica de hantavirus divergentes. Con este ensayo fue posible amplificar una muestra más de las 18 previamente negativas.

Tabla 10. Listado de muestras positivas para los ensayos moleculares de hantavirus.

Muestra	Año	Localidad
7	2006	Suárez
41	2006	Suárez
73	2006	Montevideo
6	2007	Sin datos
92	2010	Rocha
279	2010	Rocha
349	2010	Artigas
144	2010	San Ramón
148	2010	Sauce
431	2010	Sin datos
121	2011	Canelones
154	2011	Sin datos
1	2012	Sin datos
38	2012	Varios datos
328	2012	Colonia
334	2012	Sin datos
338	2012	Toledo
410	2012	Montevideo
418	2012	Maldonado
8	2013	Colonia
17	2013	Monetvideo
87	2013	Sauce

Como se mencionó en materiales y métodos, las secuencias parciales del segmento M de los pacientes de SPH confirmados analizadas en este trabajo fueron cedidas por la Unidad de Virología del Departamento de Laboratorio de Salud Pública (DLSP) en el marco de un proyecto conjunto con la Sección Virología de Facultad de Ciencias.

Las secuencias obtenidas de roedores y SPH fueron purificadas y secuenciadas por la empresa Macrogen y/o el Servicio de Secuenciación del Instituto Pasteur Montevideo. Las mismas fueron procesadas, editadas y alineadas con el programa BioEdit v 4.7 para luego realizar los análisis filogenéticos correspondientes.

4.6 Comparación de secuencias y análisis filogenético de los hantavirus de roedores y humanos.

Análisis del segmento S.

El modelo que mejor se ajustó para el conjunto de secuencias a analizar fue el GTR+I+G (generalized-time-reversible) con proporción de sitios invariantes y distribución gamma de la variación entre sitio. Para estimar la confiabilidad de los nodos se utilizó el soporte estadístico aLRT (approximate likelihood ratio-test).

Los resultados de los análisis filogenéticos realizados para el segmento S a partir de una región de 450 pares de bases se muestran en la figura 12. En este análisis se incluyó en el set de datos de secuencias obtenidas en el presente trabajo (roedores y SPH), junto con secuencias de Uruguay y las Américas reportadas en GenBank. Como grupo externo se utilizó la secuencia del virus Sin Nombre.

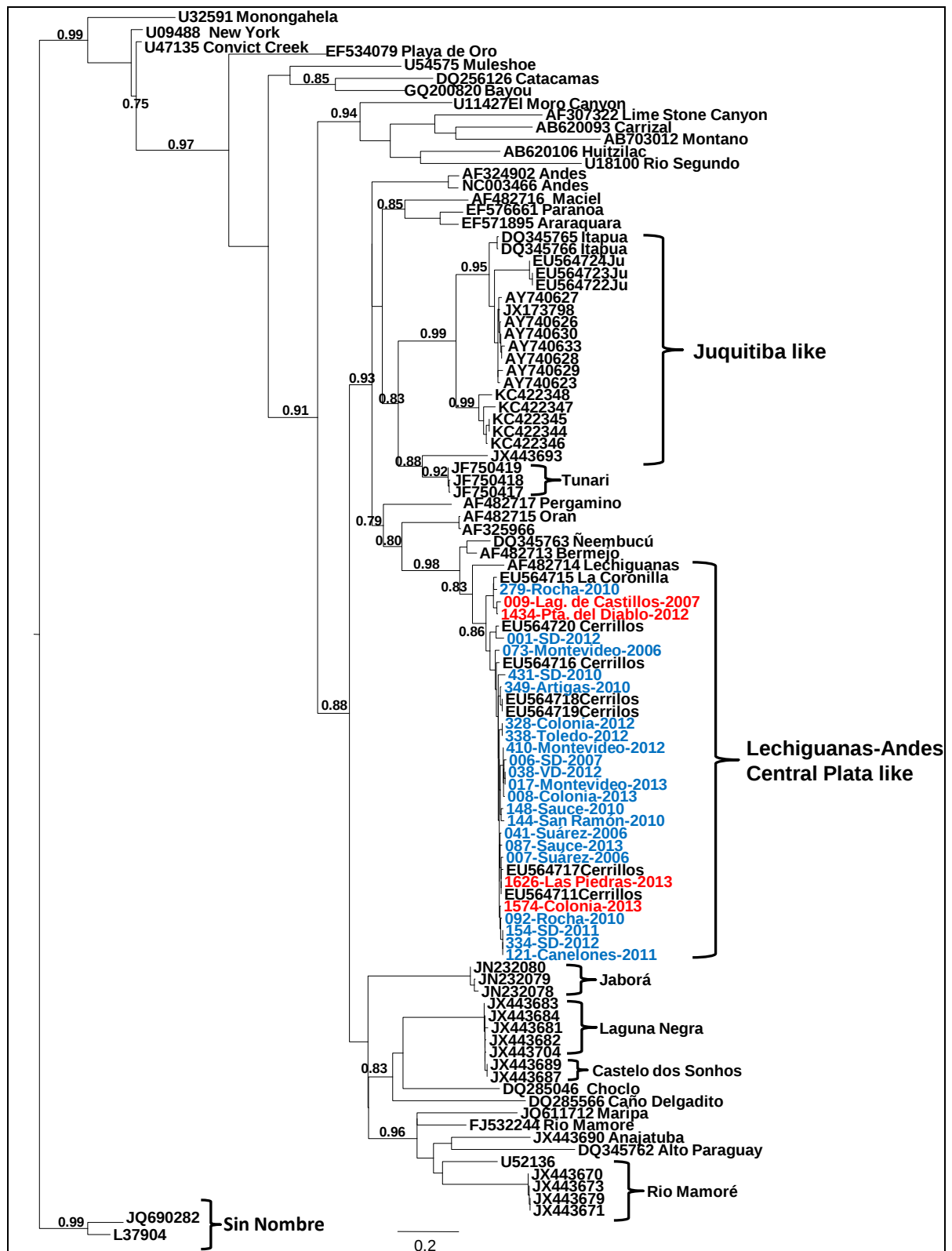


Figura 12. Análisis filogenético del fragmento S (450pb) de hantavirus. El método utilizado fue máxima verosimilitud y el modelo evolutivo que mejor se ajustó al set de secuencias fue GTR+G+I. El análisis incluye secuencias de hantavirus con sus respectivos números de acceso. En color rojo se puede visualizar las muestras de roedores y en color azul los casos de SPH, el código es el siguiente Muestra/Localidad/Año. VD-Varios datos, SD-Sin datos epidemiológicos.

A nivel general este análisis refleja la gran diversidad de hantavirus que existen en el continente americano.

Se observa que los hantavirus encontrados en Uruguay forman un grupo monofilético con los previamente descritos como Lechiguanas / Andes Central Plata. Este grupo posee un apoyo estadísticamente significativo, con un aLRT de 0,88. También se puede observar que los virus Bermejo y Ñeembucú son hermanos a este clado y comparten un ancestro común. Este grupo muestra un soporte de aLRT= 0,98.

Dentro del grupo monofilético donde se incluyen las variantes uruguayas se pueden distinguir dos subclados apoyados con un alto grado de confiabilidad (aLRT=0,86) donde se agrupan por un lado las muestras del Este del territorio (Punta del Diablo, Laguna de Castillos, La Coronilla, Rocha) y en el otro clado las muestras del sur y oeste del territorio, donde encontramos los departamentos de Montevideo, Canelones, San José y Colonia. En este clado se encuentra además la única muestra del norte del territorio (Artigas). La cual agrupa con las variantes virales del sur del país.

Con el fin de estudiar el grado de homología de las secuencias incluidas en este análisis se calculó la distancia p intra y entre cada grupo filogenético representado por los principales genotipos virales. El análisis se realizó para nucleótidos y aminoácidos. Los resultados obtenidos dentro del grupo de las variantes uruguayas con la secuencia de la variante Lechiguanas mostraron una elevada homología entre dichas secuencias. Las secuencias de este estudio y la cepa Lechiguanas (AF482714) proveniente de Argentina, señaladas en la filogenia como el grupo Lechiguanas/Central Plata poseen un alto grado de homología tanto a nivel nucleotídico como de aminoácidos, a nivel de secuencias nucleotídica es de 96% y a nivel de aminoácidos es de un 99%.

La distancia entre los grupos filogenéticos (Anexo 2) descritos en este estudio, nos indica que los grupos con mayor grado de homología de secuencia con nuestras variantes son Bermejo y Ñeembucú. Ambas secuencias comparten una homología de 89% y 86% a nivel nucleotídico, a nivel aminoácido la homología es de 99% para ambas.

Debido a que nuestras secuencias (Lechiguanas/Central Plata) presentaron una homología con mayor grado con las variantes Bermejo y Ñeembucú y siendo grupos hermanos, se recalculó la distancia p intragrupo incluyendo los tres genotipos. El resultado fue una homología nucleotídica de 95% y una homología de aminoácidos de 99%.

En la figura 13 se muestra con más detalle las relaciones filogenéticas dentro del clado monofilético Lechiguanas / Andes Central Plata, donde se ubican las secuencias del Uruguay.

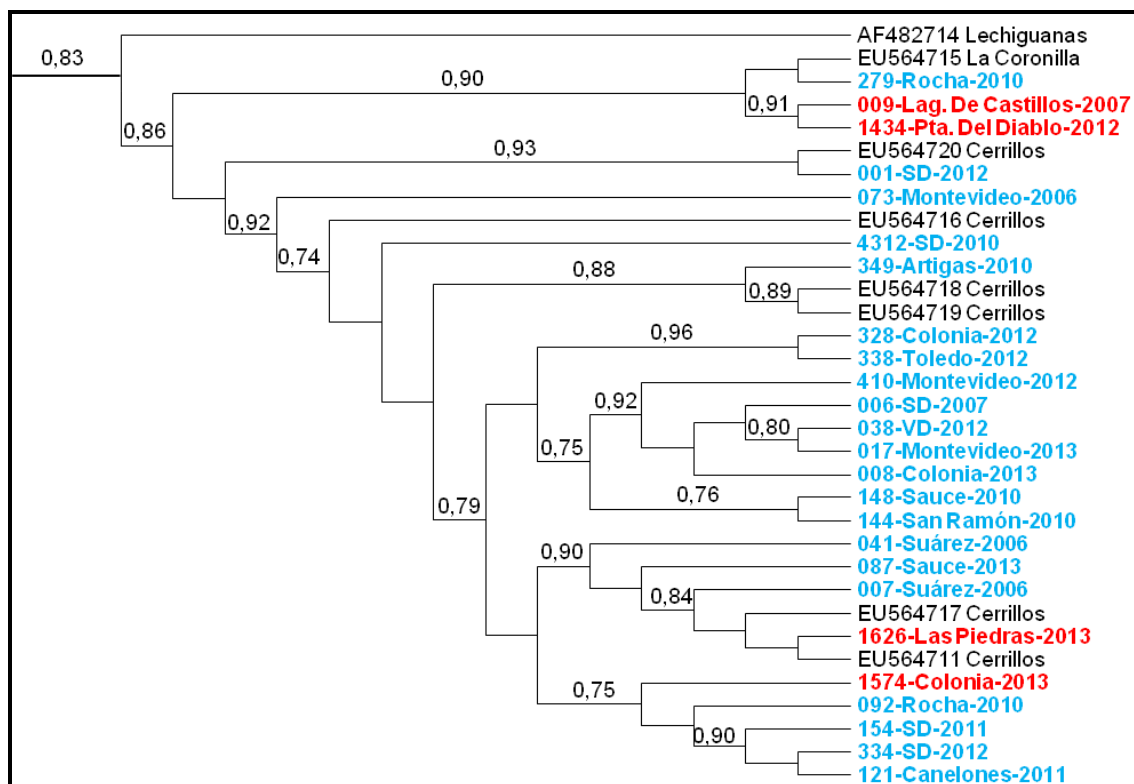


Figura 13. Cladograma de las relaciones filogenéticas obtenidas a partir del segmento S de las muestras de hantavirus circulantes en Uruguay Figura 12. El análisis incluye secuencias de hantavirus con sus respectivos números de acceso. En color rojo se puede visualizar las muestras de roedores y en color azul los casos de SPH, el código es el siguiente Muestra/Localidad/Año. VD-Varios datos, SD-Sin datos epidemiológicos.

Con el fin de que se puedan observar con más detalle nuestros clados de interés se rediseñó el árbol en forma de cladograma (figura 13). En éste se puede apreciar la división en dos grandes clados ya mencionada: el clado que agrupa la mayoría de las secuencias provenientes del Este del país (Rocha) y el clado correspondiente a los virus de la zona sur y oeste del territorio (Colonia, Canelones y Montevideo). Aunque podemos encontrar una secuencia del este del país y la única secuencia reportada del norte.

Se realizó por métodos de distancia un segundo análisis filogenético para el segmento S utilizando 200 pares de bases, lo que nos permitió analizar la información de secuencia de los hantavirus aislados del roedor *Akodon azarae* y de una muestra de SPH proveniente de Maldonado que no había sido posible amplificar en los ensayos anteriores.

Este análisis se representa en la figura 14, allí se observa que las muestras de roedores provenientes de las localidades del Este (Rocha) del país se agrupan en un clado con un fuerte apoyo estadístico.

La secuencia viral encontrada en el roedor *Akodon azarae* (1586) capturado en la localidad de San Pedro, Colonia pertenece también al genotipo Lechiguanas/Central

Plata y comparte una homología de 100% con la secuencia obtenida de *O. flavescens*, capturado en la misma colecta (1574).

Se observa que el virus Bermejo se asocia con los roedores del este del país y con las antiguas variantes del departamento de Canelones, aunque esta relación no está soportada por un bootstrap significativo.

La muestra 418, proveniente de un paciente del departamento de Maldonado se agrupa con el genotipo "Juquitiba like", éste es un grupo que incluye hantavirus Juquitiba (descrito para Uruguay sólo en roedores), Itapua de Paraguay y Araucaria de Brasil.

Utilizando las secuencias codificantes de las cepas analizadas en la figura 12 se estimó la tasa de sustitución no sinónima vs. sinónima en base al algoritmo SLAC del servidor Datamonkey. Los resultados se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. Tasa de Sustitución Nucleotídica y selección de codones.

Tasa de Sustitución Promedio		(dN/dS):0,05	
Número total de codones	Codones con selección positiva	Codones con selección negativa	Codones neutrales
94	0	88	6

De un total de 94 codones, 88 codones se encuentran sometidos a la selección purificadora y los seis restantes fueron codones neutrales (tabla 11). No se observaron codones bajo selección positiva en las secuencias analizadas.

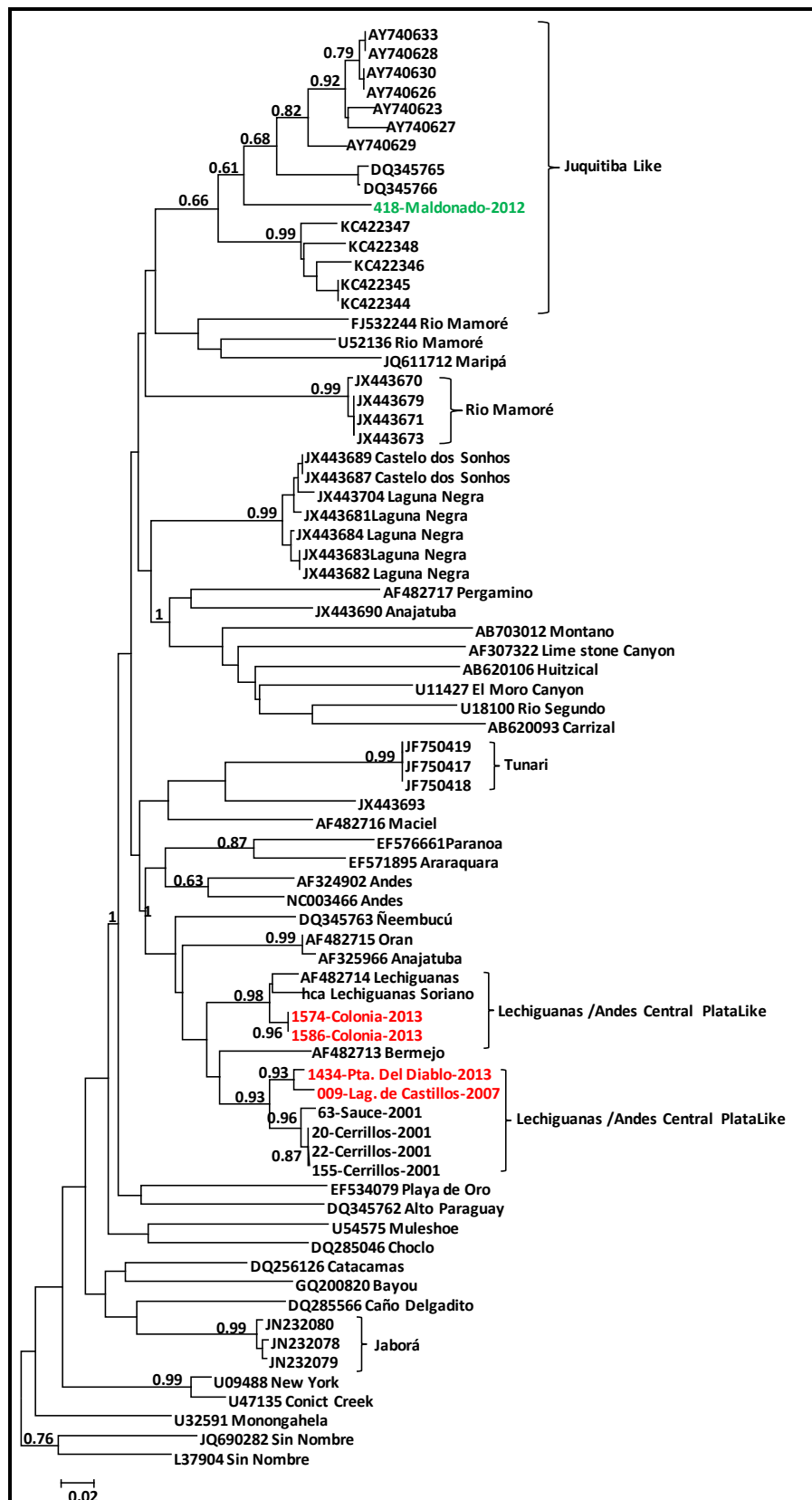


Figura 14. Análisis filogenético del fragmento S (205pb) de hantavirus. El método utilizado fue máxima verosimilitud y el modelo evolutivo que mejor se ajustó al set de secuencias fue GTR+G+I. El análisis incluye secuencias de hantavirus con sus respectivos números de acceso. En color rojo se puede visualizar las muestras de roedores y en color verde la única muestra de SPH, el código es el siguiente Muestra/Localidad/Año. VD-Varios datos, SD-Sin datos epidemiológicos.

Análisis del segmento M.

Se realizó el estudio filogenético de acuerdo a las secuencias parciales (456 pares de bases) del segmento M a partir de las muestras de roedores y casos de SPH.

El modelo que mejor se ajustó para el conjunto de secuencias del segmento M fue el GTR+I+G (generalized-time-reversible) con proporción de sitios invariantes y distribución gamma de la variación entre sitio. Para estimar la confiabilidad de los nodos se utilizó el soporte estadístico aLRT (approximate likelihood ratio-test).

En la figura 15 muestra el análisis filogenético correspondiente al segmento M. Las secuencias de roedores y casos de SPH se agrupan en un grupo monofilético, junto con los hantavirus previamente descritos en el país y con una secuencia del hantavirus Lechiguanas de Argentina, formando lo que se conoce como el clado Lechiguanas/Andes Central Plata. El valor estadístico asociado a este nodo es de aLRT = 0,86.

Dentro de este clado aparece un subclado formado por cepas originarias de las localidades más esteñas del país, con un aLRT=0,94.

Una de las muestras humanas provenientes de Rocha (092) y la única muestra que se reportó al norte del territorio (349-Artigas) están más relacionadas con las muestras del sur y oeste del país.

Para profundizar el análisis se calculó distancia p intra y entre los principales genotipos virales. El genotipo Lechiguanas/Andes central plata posee una homología nucleotídica de 94% y a nivel aminoácido de 99%. Los resultados de distancia entre los grupos filogenéticos (Anexo 3), indican que el hantavirus más emparentado al grupo de estudio es Bermejo que posee una homología de 84% a nivel nucleotídico y 98% aminoácido.

El estudio de selección de codones (120) mostró un valor de tasa de sustitución promedio compatible con selección negativa, con 113 codones bajo selección purificadora y siete neutrales. Ninguno mostró selección positiva. (tabla 12).

Tabla 12. Tasa de Sustitución Nucleotídica y selección de codones.

Tasa de Sustitución Promedio		(dN/dS):0,02	
Número total de codones	Codones con selección positiva	Codones con selección negativa	Codones neutrales
120	0	113	7

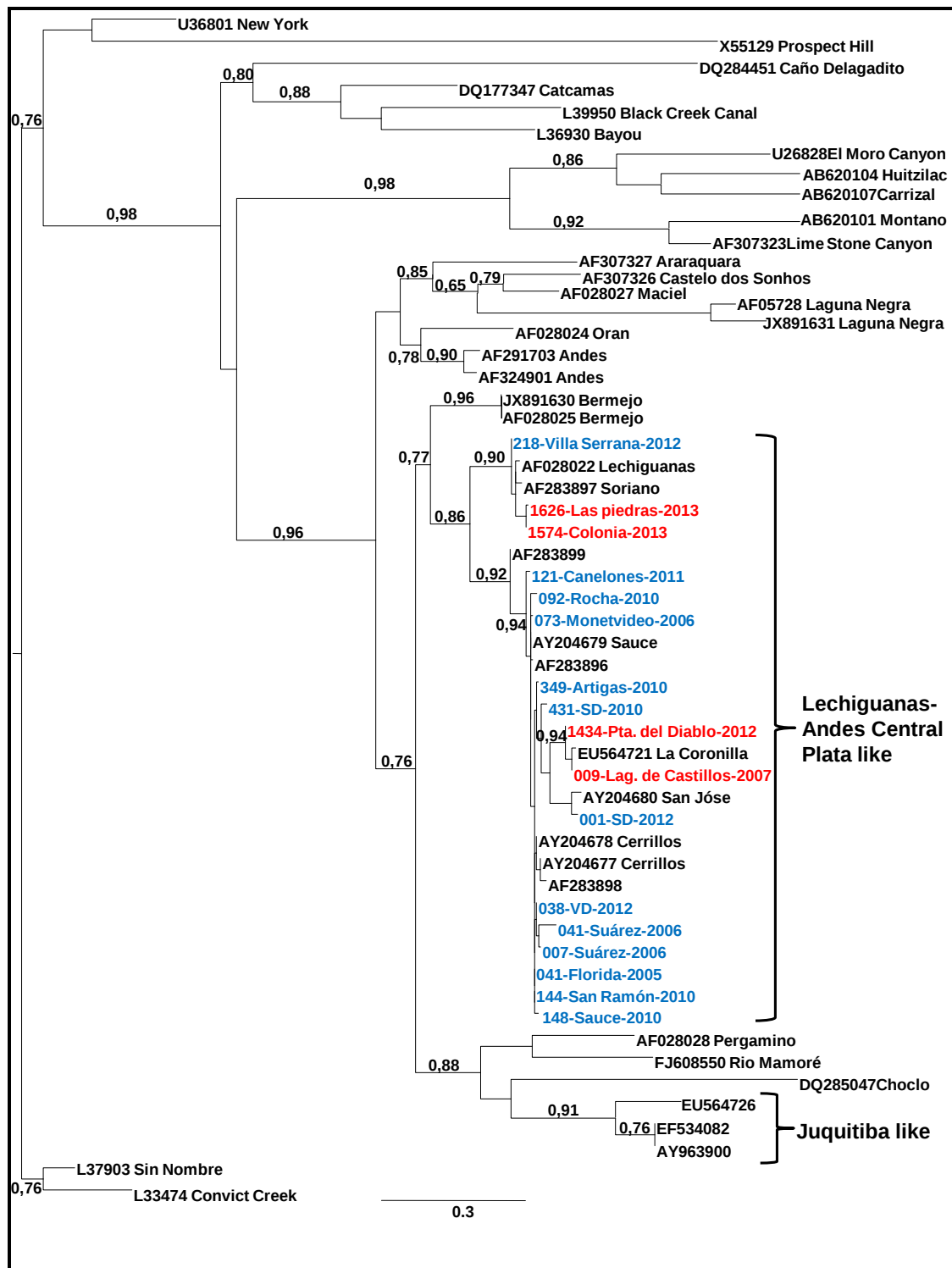


Figura 15. Análisis filogenético del segmento M (456pb) de hantavirus. El método utilizado fue máxima verosimilitud y el modelo evolutivo que mejor se ajustó al set de secuencias fue GTR+G+I. El análisis incluye secuencias de hantavirus con sus respectivos números de acceso. En color rojo se puede visualizar las muestras de roedores y en color azul los casos de SPH, el código es el siguiente Muestra/Localidad/Año. VD-Varios datos, SD-Sin datos epidemiológicos.

4.7 Modelo de distribución potencial para *Oligoryzomys flavescens*.

Se utilizaron un total de 55 registros de presencia obtenidos de salidas de campo, colecciones científicas del Museo Nacional de Historia Natural y de la Facultad de Ciencias (Anexo 1). Para la ejecución de los modelos se utilizaron un total de 45 variables, las cuales se dividen en 19 variables bioclimáticas (11 variables de precipitación y 8 variables relacionadas con la temperatura), 12 variables geográficas y 14 variables antrópicas (Anexo 4). En base a esos 55 registros se obtuvieron los siguientes mapas de la distribución potencial de la especie estudiada.

En la figura 16 se muestra el mapa de distribución potencial global de *O. flavescens* utilizando todas las variables (bioclimáticas, geográficas y antrópicas).

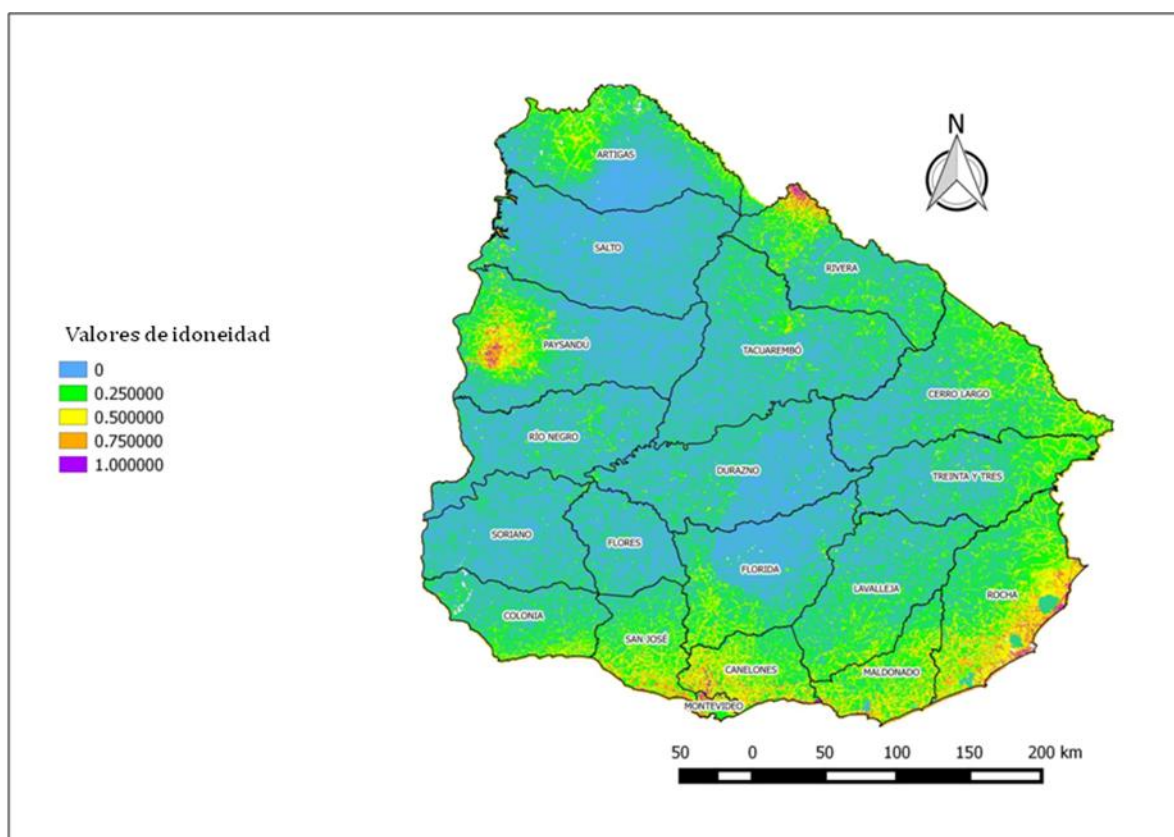


Figura 16. Mapa de la distribución potencial de *O. flavescens* obtenido para el factor global.

En el mismo se pueden observar varias zonas de color amarillo (0.5) a violáceo (1), esta serie de colores representan zonas de alta idoneidad (0,75 - 1) donde se puede encontrar a la especie. Las mismas se encuentran al sur del territorio, incluyendo toda la zona costera desde el este del departamento de Colonia, San José, Montevideo, Canelones, Maldonado y Rocha. En los departamentos de Montevideo, Canelones y Rocha las áreas de color rojo representan una elevada idoneidad de encontrar al reservorio, sus valores varían entre 0.75 y 1. En los departamentos de Treinta y Tres y

Cerro Largo el modelo predice una idoneidad media representada con el color amarillo (0,75). Al norte del territorio se identifican puntos de alta probabilidad (rojo-violáceo) en los departamentos de Artigas, Paysandú y Rivera. Las variables que más contribuyeron al modelo fueron la caminería departamental y la temperatura anual media (BIO1). El rendimiento de este modelo fue muy bueno con un valor de AUC (área debajo de la curva) de 0,880, y el valor de AUC de los datos de prueba fue de 0,850 (tabla 13). Resumiendo, la zona con mayor idoneidad de encontrar a la especie reservorio según este modelo son las zonas costeras del sur del país (Colonia, San José, Montevideo, Canelones, Maldonado y Rocha) y algunos puntos en el norte del país (Paysandú, Rivera y Artigas).

Luego se estimó otro modelo utilizando sólo las variables ambientales (bioclimáticas y geográficas) y los 55 registros de presencia, en este análisis el modelo dio como resultado el mapa representado en la figura 17.

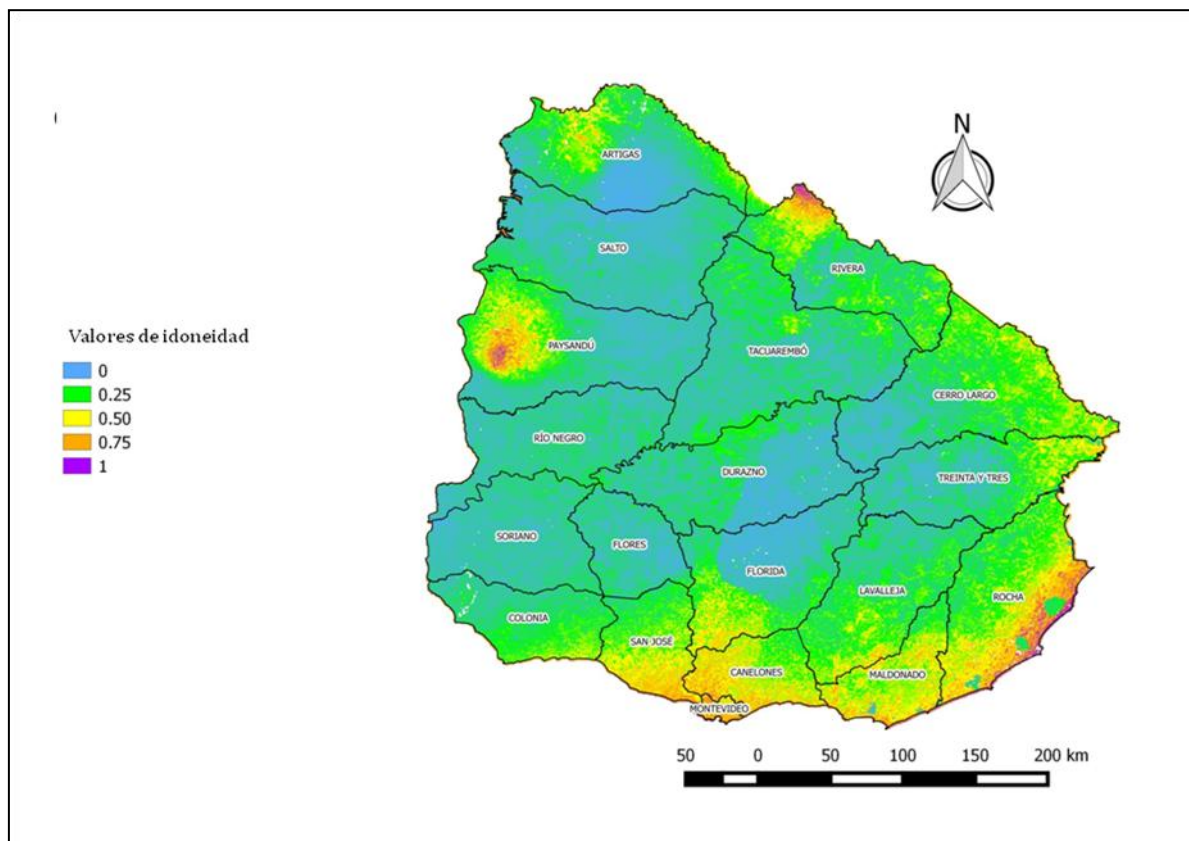


Figura 17. Mapa de la distribución potencial del reservorio *O. flavescens* considerando únicamente con las variables ambientales.

Bajo este modelo se pudo observar que la mayor idoneidad de encontrar la especie estudiada es en especial cerca de la zona costera al sur del territorio. Los departamentos más idóneos en albergar esta especie fueron San José, Montevideo, Canelones, Maldonado y principalmente se observa un aumento de idoneidad en las

costas de Rocha. Al norte del Río Negro el modelo pronosticó varias zonas de alta idoneidad de encontrar a la especie en los departamentos de Paysandú, Artigas y Rivera. En este análisis varios departamentos alcanzaron la idoneidad media de encontrar a la especie, entre ellos se encuentran Tacuarembó, Florida, Lavalleja, Cerro Largo y Treinta y Tres. La variable ambiental que aportó más a este modelo fue la precipitación estacional (BIO15), seguida por la altitud (alt). El rendimiento de este modelo (AUC) fue de 0,871, el valor de AUC de los datos de prueba fue de 0,879 (tabla 13).

Tabla 13. Valores del AUC (Datos de entrenamientos y Datos de prueba) obtenidos para cada uno de los modelos de distribución potencial (global y ambiental) de la especie *O. flavescens* y se reseña el porcentaje de contribución de la variable más importante en cada modelo (código de la variable ver Anexo 4).

Factor	Datos de entrenamiento	Datos de prueba	% de contribución
Ambiental	0,880	0,850	Bio15 = 54,3
Global	0,871	0,879	Bio1 = 35,5

En el siguiente análisis se calculó el modelo de distribución potencial pero solamente para los registros de presencia de los roedores seropositivos encontrados en este estudio y los reportados en estudios previos realizados en nuestro laboratorio.

El mapa global de distribución potencial para el conjunto de datos de los roedores seropositivos con todas las variables (ambientales, antrópicas y geográficas), está representado en la figura 18.

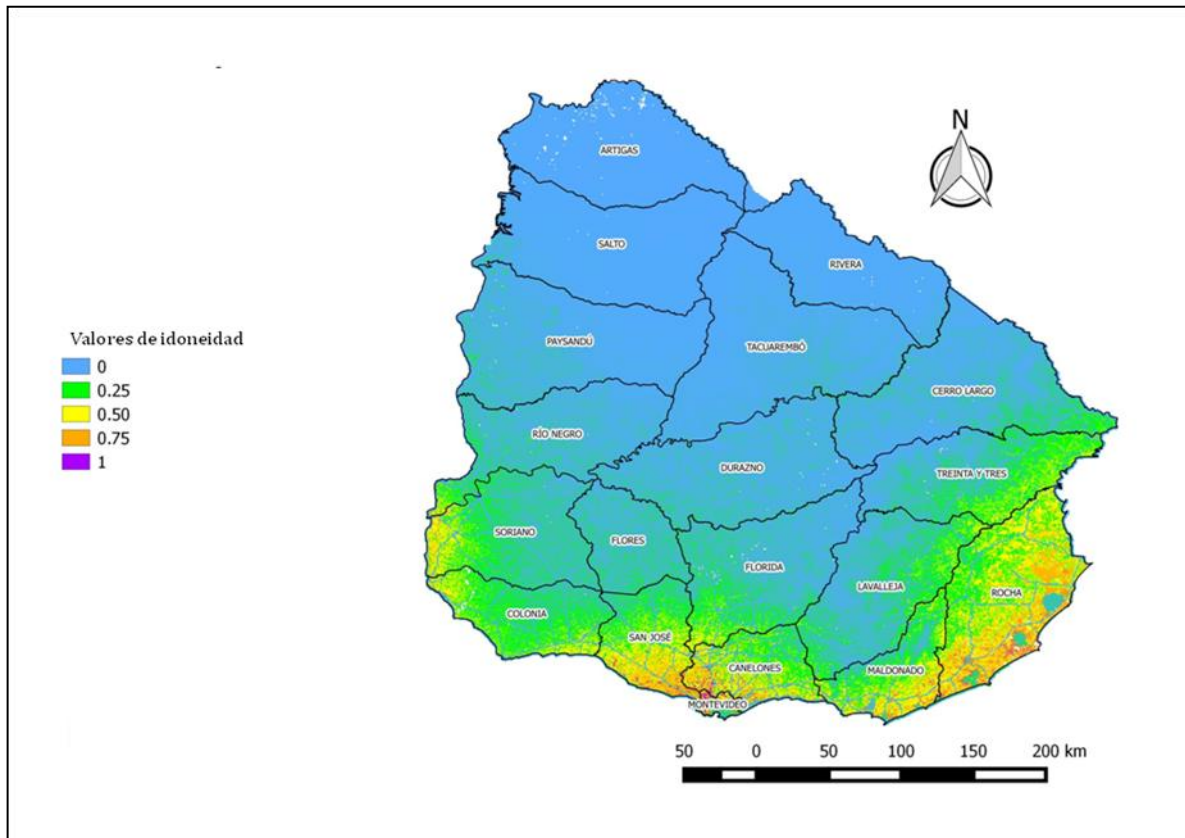


Figura 18. Mapa de la distribución potencial de los individuos de *O. flavescens* positivos para Hantavirus según factores ambientales, antrópicos y geográficos.

En este modelo se observa que la distribución potencial de los roedores infectados se restringe al sur del Río Negro. Las máximas áreas de idoneidad de encontrar un ratón seropositivo para hantavirus se ubican en la zona sur del territorio y muy vinculadas a la zona costera. La misma abarca los departamentos de San José, Montevideo, Canelones, Maldonado y Rocha. Al norte del Río Negro la idoneidad de encontrar roedores infectados con el virus es casi nula según el modelo. Las variables que más contribuyeron al modelo fueron la temperatura anual media (BIO1) y la altitud (alt). El AUC para este modelo fue de 0,974, con un ajuste de prueba de AUC=0,984 (tabla 14).

También se estimó el modelo para los ratones seropositivos pero utilizando solamente las variables ambientales y el mapa de dicha distribución se aprecia en la figura 19.

En la figura 19 podemos observar un patrón similar al mapa anterior, con una distribución netamente al sur del Río Negro y una franja de alta probabilidad de encontrar a la especie en las zonas costeras, con puntos de alto riesgo en los departamentos de Montevideo, Canelones y Rocha. Los puntos de más alta idoneidad se encuentran en la zona costera de Rocha y en el límite entre Montevideo y Canelones con valores de 1 respectivamente. Se observa que con este set de datos no encontraríamos ratones seropositivos en los departamentos del norte del país. Las variables que más contribuyeron al modelo fueron la temperatura anual media (BIO1) y la altitud (alt).

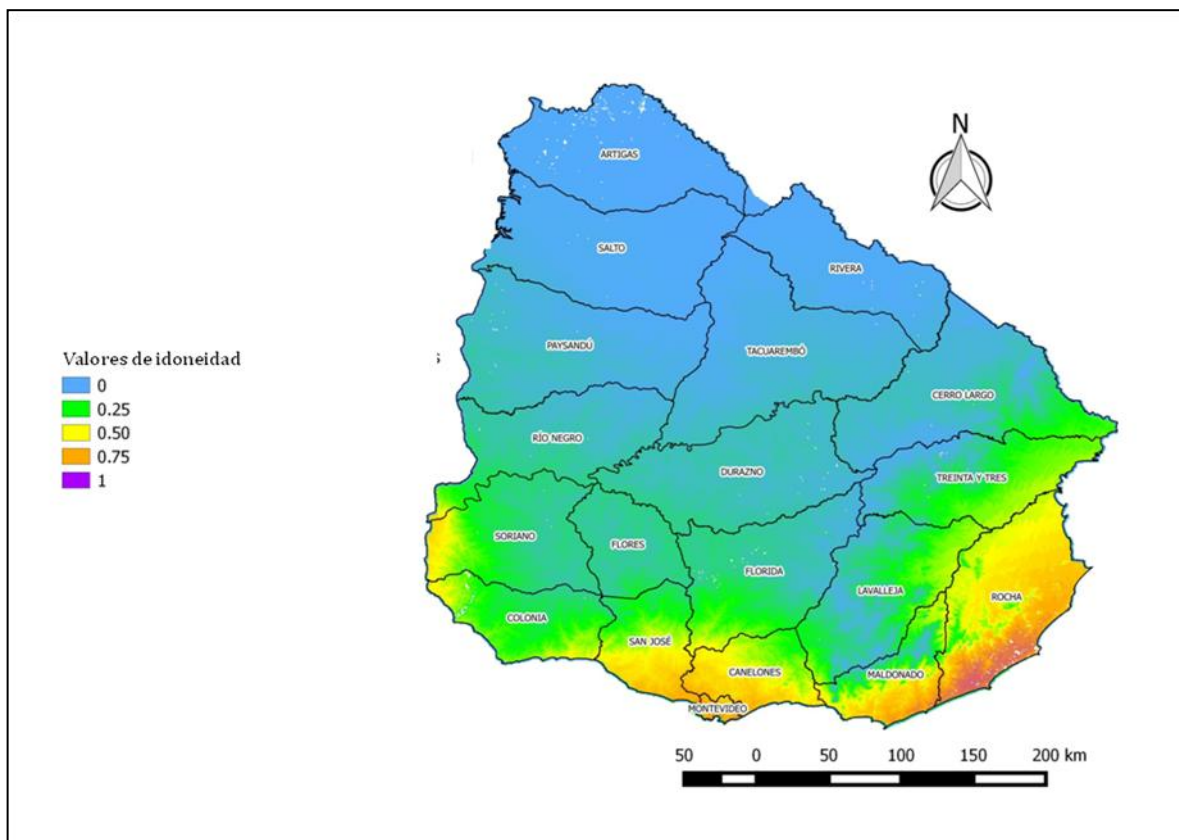


Figura 19. Mapa de la distribución potencial de *O. flavescens* positivos para hantavirus basado únicamente en variables ambientales.

Este modelo de distribución potencial presentó un ajuste estadístico (AUC) de 0,944 y sus datos de prueba se ajustaron con un AUC de 0,965 (tabla 14).

Tabla 14. Valores del AUC (Datos de entrenamientos y Datos de prueba) obtenidos para cada uno de los modelos de distribución potencial (global y ambiental) de la especie *O. flavescens* de los individuos seropositivos y se reseña el porcentaje de contribución de la variable más importante en cada modelo (código de la variable ver Anexo 4).

Factor	Datos de entrenamiento	Datos de prueba	% de contribución
Ambiental	0,944	0,965	Bio1 = 49
Global	0,974	0,984	Bio1 = 35

5. Discusión.

5.1 Infección por hantavirus en roedores del Uruguay.

Las campañas de trapeo de micromamíferos se llevaron a cabo en los lugares más probables de infección para los casos de SPH, en particular en ambientes peridomésticos, ecosistemas naturales rurales y agroecosistemas. Además se realizaron capturas en los departamentos norteros de Rivera (Cerro Chapeu y Tranqueras) y Paysandú (Constancia) con el objetivo de buscar evidencias de circulación de virus. También se realizó una salida a una reserva natural (Laguna del Castillo) donde el impacto de las actividades humanas es bajo.

Las mayoría de la áreas de colecta en este trabajo estaban modificadas por el hombre en menor o mayor medida. Como ejemplo podemos mencionar las grandes modificaciones sufridas por el terreno en Rivera por parte de las grandes forestales así como la modificación del paisaje en la localidad de Punta del Diablo por la construcción de viviendas.

Tomando en cuenta la totalidad de las campañas de trapeo realizadas en un total de 430 individuos capturados, la especie más abundante fue *Akodon azarae* con 91 ejemplares (21%). Le siguen los ratones hocicudos (*Oxymycterus spp.*) con 78 especímenes (18%), las ratas del pantano (*S. tumidus*) con 65 ejemplares (15%) y los ratones colilargos chicos (*O. flavescens*) con 59 individuos (14%). Los ratones domésticos (*M. musculus*) fueron la especie exótica mas capturada con 50 individuos (11%)(ver tabla).

Si se considera las tres especies de roedores reservorio para hantavirus descriptas previamente en Uruguay (Delfraro et al., 2003; 2008), se logró capturar 176 ejemplares (41%) (*O. flavescens*, *O. nigripes* y *Oxymycterus spp.*), en todas las capturas siempre estuvo presente alguna de estas tres especies.

En cuanto a las capturas por localidad, los ratones colilargos chicos fueron la especie más abundante en Laguna de Castillos (Rocha) y Villa Serrana (Lavalleja) aunque en esta localidad la eficiencia de trapeo fue la más baja obtenida en todas las campañas. Esta especie fue la segunda en importancia en la localidad de Punta del Diablo (Rocha). Los ratones hocicudos (*Oxymycterus spp.*) fueron la especie más capturada en Punta del Diablo (Rocha), Cerro Chapeu (Rivera), Tranqueras (Rivera) y Los Titanes-Guazuvirá (Canelones), siendo la segunda en importancia solamente en Laguna de Castillos (Rocha). El ratón de campo común (*Akodon azarae*) fue la principal especie capturada en las localidades de Las Piedras (Canelones) y San Pedro (Colonia), donde uno de los ejemplares resultó seropositivo siendo el primer hallazgo de infección por hantavirus en esta especie para Uruguay. En Constancia (Paysandú) fue la segunda especie capturada. La especie exótica *Mus musculus* fue la más frecuentemente colectada en

Constancia (Paysandú); en Las Piedras (Canelones) este mismo roedor fue el segundo en abundancia.

Como se observa en las tablas 8 y 9, la mayoría de los roedores seropositivos para hantavirus (4 en 5) correspondieron a la especie *O. flavescens*, provenientes de las localidades donde fueron la especie mayoritaria o la segunda especie más abundante (Laguna de Castillo y Punta del Diablo). En las localidades de San Pedro y Las Piedras se capturaron *O. flavescens* seropositivos pero fueron la quinta especie en abundancia, siendo desplazada en la primera posición por *A. azarae* en ambas localidades. La mayoría mostró altos títulos de anticuerpos, donde tres de ellos alcanzaron títulos mayores a 1:6.400, mientras que uno solo dio un título de 1:1.600. Los títulos de anticuerpos encontrados en *O. flavescens* en este estudio son muy similares a los encontrados en estudios previos para esta especie en el país (Delfraro et al., 2003). Estudios realizados en la variación de los títulos de anticuerpos de hantavirus en diferentes reservorios roedores demuestran que a medida que transcurre la infección por el virus los títulos de anticuerpos aumentan significativamente y se mantienen a lo largo de la vida del roedor (Botten et al., 2003; Pearce-Duvet et al., 2006). Los altos títulos de anticuerpos encontrados en *O. flavescens* indicarían que la infección en ellos ya estaba avanzada.

De los ejemplares de *O. flavescens* seropositivos solamente dos fueron capturados en ambientes modificados por el hombre (borde de camino y quinta), los otros dos restantes lo fueron en ambientes naturales (bañado y monte de ombúes). Sin embargo todos se encontraban a distancias menores de 150 metros de actividades humanas, estos hallazgos indican un elevado riesgo de exposición a la infección por hantavirus para los habitantes de la zona. Por ejemplo, el ratón capturado en el bañado estaba a menos de 100 metros de una casa en construcción en la localidad de Punta del Diablo. El roedor capturado en el borde del camino en la localidad de San Pedro estaba a 50 metros de una vivienda precaria (nylon y piso de tierra) donde un trabajador rural la usaba como abrigo en la noche, dicho trabajador se enfermó de SPH y falleció. Por último, el ratón capturado en una quinta de tomates en la localidad de Las Piedras estaba en un área de contacto estrecho con los trabajadores rurales de la zona.

Los ratones colilargos seropositivos capturados fueron tres machos en estado adulto y una hembra con ocho embriones en su interior, en varios de los especímenes se pudo observar cicatrices en las orejas, los cuales son signos de peleas con otros individuos. Esto indicaría que el virus es mantenido predominantemente en las poblaciones de roedores reservorios fundamentalmente por transmisión horizontal, probablemente a través de encuentros agresivos entre machos adultos en concordancia con lo reportado por varios autores (Calderon et al., 1999; Delfraro et al., 2003; Kuenzi et al., 2001; Yahnke et al., 2001). Si bien la detección del genoma viral en los embriones resultó ser negativa, la infección podría ocurrir en el parto o después de éste, ya que

las crías son cuidadas por la madre durante varios meses pudiendo transmitir la infección a la nueva camada.

La prevalencia de infección por hantavirus para la especie *O. flavescens* previamente reportada en Uruguay varió en el entorno de 1,7% a 2,9% (Delfraro et al., 2003). En el presente estudio las prevalencias de infección por hantavirus fueron sensiblemente mayores y variaron considerablemente entre 6.7% hasta un máximo de 17%. Ésta seroprevalencia para hantavirus en roedores (17%), detectada en la localidad de Las Piedras, es la más elevada descrita para el país hasta el momento.

Si se compara con estudios previos en el departamento de Canelones (Cerrillos y Sauce) los antecedentes de seroprevalencias de infección en este roedor fueron siete veces menores, variando entre 2,1% y 2,4% (Delfraro et al., 2003).

En la zona Este del país las prevalencias de infección en *O. flavescens* encontradas fueron de 7,7% en la reserva natural de Laguna de Castillos y 14% en la localidad de Punta del Diablo. Los registros previos en esta zona del país (La Coronilla), reportaron una seroprevalencia en el ratón colilargo chico de 1,7% (Delfraro et al., 2003), éste valor es de 4,5 a 8 veces menor que los detectados en este trabajo.

En relación a la situación regional los primeros trabajos sobre las prevalencias de infección de *O. flavescens* se realizaron en Argentina, más concretamente en la región Central, reportándose prevalencias de infección en esta especie de 4,5% en la provincia de Buenos Aires y 4.7% en la provincia de Entre Ríos (Calderon et al., 1999).

Estudios posteriores realizados en la misma región de Argentina, demostraron que la prevalencia de infección en dicha especie es de 13,5% (Suarez et al., 2003).

Más recientemente, estudios realizados en varias reservas naturales ubicadas en la región central de Argentina describieron una variación de las prevalencias de infección en *O. flavescens* entre un 6% a 13%, dependiendo de los ambientes naturales y la época del año (Vadell et al., 2011).

Por lo tanto, las prevalencias de infección en esta especie encontradas en este trabajo se encuentran en los rangos previamente documentados a nivel regional.

La seroprevalencia para hantavirus en colilargos *O. flavescens* en las localidades de Las Piedras y Punta del Diablo presentaron los valores más altos desde que se comenzó a estudiar este virus en nuestro país (17% y 14%); ambas localidades están en un proceso de continuo crecimiento demográfico y esto implica un cambio en los ambientes naturales involucrados en sus alrededores. En estas localidades la fragmentación del ambiente natural, dada principalmente por la construcción de casas (Punta del Diablo) y la explotación agropecuaria (Las Piedras) es notoria, como lo visualizamos en ambas capturas (Figura 9 y 10).

Este tipo de modificaciones de hábitat fueron visualizadas en la mayoría de las áreas estudiadas (figura 9 y 10), y en general llevan a cambios en los hábitats de los

pequeños mamíferos. Solamente en la reserva natural de Laguna de Castillos no se observó este fenómeno. En varios trabajos previos se documentó que la fragmentación del hábitat afecta directamente la riqueza de especies en la comunidad de pequeños mamíferos, este fenómeno está acompañado en una disminución de la riqueza en la comunidad de roedores y el aumento de la abundancia de los posibles reservorios de hantavirus dentro de la comunidad (Langlois, 2001; Mackelprang et al., 2001; Suzan et al., 2008). También ha sido establecido que un aumento en la diversidad de roedores en la comunidad actúa como un efecto de dilución, disminuyendo la prevalencia de infección por hantavirus en los roedores reservorios y viceversa (Clay et al., 2009; Disney and Ruedas, 2009; Suzan et al., 2009; Tersago et al., 2008). La fragmentación del hábitat ocurre cuando el hombre modifica el paisaje para su uso ya sea para la producción agropecuaria (Rivera, Las Piedras, Constanica, San Pedro) o la construcción de viviendas (Punta del Diablo, Villa Serrana, Los Titanes, Guazuvirá).

Las localidades de Las Piedras y Punta del Diablo, ambas con notoria fragmentación de hábitat, fueron las que presentaron menor riqueza de especies (5 especies en cada localidad). Varios trabajos realizados en diferentes regiones del globo demuestran que los cambios en la diversidad de la riqueza de micromamíferos en la comunidad explicarían el aumento o la disminución de las seroprevalencias de infección de la especie reservorios (Clay et al., 2009; Disney & Ruedas, 2009; Rubio et al., 2014; Suzan et al., 2008; Suzan et al., 2009; Tersago et al., 2011).

En dos estudios de campo realizado en Norteamérica, donde se compararon las prevalencias de infección en las poblaciones de la especie *Peromyscus maniculatus* (reservorio del hantavirus Sin Nombre) con la fragmentación del ambiente se demostró que un aumento en la fragmentación del hábitat está vinculado directamente con un aumento significativo en la prevalencia de infección del reservorio (Langlois, 2001; Mackelprang et al., 2001). Estudios complementarios en el estado de Montana (USA) sobre la evolución de la prevalencia de infección en *Peromyscus maniculatus* muestran que cuando variaba la abundancia de otras especies (*Microtus spp*), las prevalencias de infección en la especie reservorio decrecían por la sola presencia de individuos de la especie *Microtus* independientemente de su abundancia. Este aumento en la riqueza de la comunidad de roedores fue asociada a una reducción de la prevalencia del patógeno en el reservorio provocando un efecto de dilución (Carver et al., 2011).

En otro trabajo realizado sobre la fragmentación del bosque tropical en Panamá, se describió que la abundancia de los roedores *O. fulvescens* y *Zygodontomys brevicauda* (reservorios de los virus Choclo y Calabazo) aumenta considerablemente cuando la diversidad de los otros micromamíferos disminuye, esta disminución de la diversidad en la comunidad de roedores está directamente relacionada a la fragmentación del bosque tropical (Suzan et al., 2008).

En un trabajo reciente donde se realizó un meta-análisis incluyendo cinco países (USA, Brasil, Chile, Canada y Venezuela) y 14 estudios de abundancia de los reservorios (ocho especies) y riqueza de especies, se encontró que la fragmentación del hábitat se asocia con mayores abundancias de los reservorios para hantavirus y con la disminución de la riqueza de la comunidad de micromamíferos. De acuerdo con estos resultados, la fragmentación del hábitat en las Américas debe ser considerada como un factor de riesgo epidemiológico para la transmisión de hantavirus a los seres humanos (Rubio et al., 2014).

De acuerdo a los antecedentes expuestos, una posible explicación a las altas prevalencias de infección en la especie *O. flavescens* en las localidades de las Piedras y Punta del Diablo, es la fragmentación del hábitat en estas localidades, coincidiendo con la disminución de la riqueza de especies en la comunidad de roedores.

En cambio la seroprevalencia de infección para *O. flavescens* en la reserva natural de Laguna de Castillo fue de 7,7%. Si bien este valor es elevado en relación a los antecedentes de estudios en el depto. de Rocha, la reserva natural de Laguna de Castillos no está bajo los efectos de la fragmentación del hombre y, por ello, es un buen ejemplo de cómo varia la influencia de los factores antrópicos sobre la seroprevalencia de infección de *O. flavescens*. La comunidad de roedores presentó una riqueza mayor (siete especies) a la encontrada en las localidades de Las Piedras y Punta del Diablo. Las especies capturadas en la localidad de Punta del Diablo coincidieron parcialmente con las encontradas en la reserva, aunque en Punta del Diablo se encontró la especie exótica *Rattus rattus* la cual no fue documentada para la laguna. En cambio, en la reserva natural encontramos tres especies más que en Punta del Diablo, todas ellas autóctonas (*S. tumidus*, *H. brasiliensis* y *O. nigripes*). La especie introducida *Rattus rattus* presente en Punta del Diablo está involucrada directamente con la antropización del paisaje. La composición de la comunidad de roedores y la casi nula fragmentación del ambiente natural constatada en la Laguna de Castillos estarían favoreciendo una menor tasa de infección por hantavirus en los reservorios, que se reflejaría en una seroprevalencia menor en los reservorios capturados en dicho ambiente.

En este estudio se muestrea por primera vez una localidad del departamento de Colonia, de donde no se tenía información hasta el momento. En la localidad de San Pedro, encontramos una prevalencia de infección en ratones colilargos de un 6,7% y la riqueza de especie más alta de todas las salidas de campo realizadas, con ocho especies capturadas.

En esta misma localidad se capturó un individuo seropositivo de la especie *Akodon azarae*, siendo de las más abundantes con 91 ejemplares. La prevalencia de infección por hantavirus en esta especie fue de un 3,3% y su título de anticuerpos fue de 1:1600. Este es el primer hallazgo para el país de *A. azarae* como portador de anticuerpos anti-hantavirus. Estos roedores se han asociado como reservorio del hantavirus no

patogénico Pergamino, distribuido fundamentalmente en la región central de Argentina (Calderon et al., 1999; Levis et al., 1998). El mencionado ejemplar seropositivo fue capturado en el mismo borde de camino donde se capturó el ejemplar seropositivo de *O. flavescens*. De acuerdo a la “Guía de campo de mamíferos del Uruguay” se documenta que la distribución y eco-etología para los roedores *A. azarae* y *O. flavescens* es muy similar (González & Martínez-Lafranco, 2010). En la misma se detalla que ambas especies son generalistas y se las puede encontrar en sistemas agrarios, bordes de camino, pastizales, etc. Sus distribuciones geográficas abarcan todo el territorio uruguayo. Otro punto en común entre ambas especies es su dieta, la cual se basa básicamente en vegetales verdes, semillas y pequeños animales.

La seroprevalencia de infección por hantavirus en su reservorio principal (*O. flavescens*) fue de un 6,7%, mientras que la seroprevalencia de infección para *A. azarae* fue de un 3,3%. Si consideramos la seroprevalencia de infección para hantavirus sumando las abundancias de ambas especies positivas en la localidad nos da un valor de 4,5%. Este valor indica una disminución de más de dos puntos porcentuales en comparación con la seroprevalencia en *O. flavescens*, dando lugar al denominado “efecto de dilución” entre especies, el cual da como resultado una baja en la carga viral presente en el ambiente. Bajo esta hipótesis, roedores no reservorio se enfrentarían a la fuente de infección, infectándose con el virus pero no dando lugar a una infección persistente, disminuyendo así la posibilidad de que el virus llegue a sus hospedadores naturales (Dizney & Ruedas, 2009; Langlois, 2001; Mackelprang et al., 2001). Como se menciona más arriba, esta localidad presentó la mayor riqueza de especies de todas las estudiadas en este trabajo (ocho). Según se observa en el área de captura (Figura 9 y 10), se trata de un ambiente medianamente modificado por el hombre, observándose una fragmentación parcial por el cultivo extensivo de soja, con parches de campo natural y borde de camino. Esta captura fue realizada a partir de un registro de un caso de SPH fatal en un trabajador rural. Los ratones seropositivos capturados se hallaron en el borde del camino, localizados a no más de 10 metros donde se encontraba el lugar del campamento donde pernoctaba el trabajador (véase figura 11).

En las salidas realizadas al norte del río Negro (Cerro Chapeu, Tranqueras y Constanica) se capturaron las tres especies implicadas en la circulación de hantavirus, pero ningún individuo resultó ser positivo en las pruebas de tamizaje. Durante el transcurso de este trabajo se han confirmado únicamente solo dos casos de SPH al norte del país, en los departamentos de Artigas (2010) y Paysandú (2014), de acuerdo a datos del DLSP y epidemiología del Ministerio de Salud Pública.

Esta desigualdad en la distribución de los casos de SPH al norte del río Negro y al sur del mismo puede explicarse por diferentes causas, relacionadas tanto con el comportamiento del hombre como con la distribución del reservorio y su capacidad de permanecer persistentemente infectado.

En cuanto a los factores antrópicos, es posible que las diferencias en la densidad demográfica a lo largo del territorio aumenten o disminuyan las chances de encuentro entre el reservorio y el hospedador humano. Al norte del río Negro la densidad poblacional es menor que al sur del río Negro, ya que en la región sur se encuentran los departamentos con mayor población del país (Montevideo y Canelones), la densidad demográfica al norte del río Negro oscila entre 6 y 10 habitantes por km² (<http://www.ine.gub.uy/>).

Otro posible factor implicado se relaciona con las diferentes actividades económicas que se realizan en estas dos regiones del país: al norte del río Negro las actividades económicas más frecuentes son la ganadería y agricultura extensiva, en cambio al sur del río Negro las actividades económicas predominan la ganadería y agricultura intensiva.

En relación a los reservorios, otra posible explicación para este fenómeno podría deberse a diferencias genéticas en las poblaciones de *O. flavescens* presentes al norte y al sur del río Negro, sean subespecies o especies crípticas. Sin embargo estudios filogeográficos realizados en poblaciones de *O. flavescens* donde se incluyeron ejemplares de todo el país muestran que dicha especie es una única entidad biológica en toda su distribución en Uruguay (Rego et al, 2008).

Otra posible explicación para este fenómeno podría estar vinculada con la viabilidad de los hantavirus en el ambiente, punto que retomaremos más adelante en este trabajo.

5.2 Detección de genoma viral en muestras de roedores seropositivos y muestras humanas.

El estudio retrospectivo realizado a las muestras (n=29) cedidas por el laboratorio de Evolución de la Facultad de Ciencias no dio lugar a resultados positivos. Las muestras de roedores conservadas -80°C, pasaron por varios procesos de descongelación para el estudio genético de las poblaciones, estos procesos de congelación y descongelación podrían estar involucrados en la alteración de las muestras incidiendo directamente en la degradación del material genético del virus. Este resultado también puede explicarse por el bajo número de muestras analizadas, sumado a la posibilidad de que en esos años y en esas localidades el número de roedores infectados era muy bajo o nulo. Se le agrega el bajo número de individuos de *O. flavescens* analizados. Si bien se analizó un número importante de individuos del género *Oxymycterus* es posible que muchos de ellos fueran de la especie *josei*, especie críptica que se diferencia genéticamente de *Oxymycterus nasutus* (Hoffmann et al., 2002). Como se mencionó anteriormente la variante viral Juititaba la encontramos en Uruguay relacionada a *O. nasutus*. (Delfraro et al., 2008).

Todos los roedores seropositivos encontrados en este estudio fueron sometidos a extracción de ARN total y RT-PCR a partir de tejidos, utilizando varios juegos de oligonucleótidos con el fin de amplificar regiones filogenéticamente informativas de los segmentos S y M. De las cuatro muestras de los roedores *O. flavescens* se logró amplificar regiones de los segmentos S y M. En cambio para la muestra del roedor *A. azarae* solo se logró amplificar una secuencia parcial de segmento S de 200 pares de bases.

En cuanto a las muestras de casos de SPH, en el presente estudio se logró amplificar una secuencia parcial de 416 pb del segmento S, la cual es informativa para filogenia (Delfraro et al., 2003; Delfraro et al., 2008). De un total de 39 muestras se logró amplificar 21 muestras (54%). Las secuencias del segmento M analizadas en este estudio fueron cedidas por el DLSP.

La cinética de la infección viral comprende varias etapas pero generalmente sigue un patrón aunque puede variar según la variante viral y el estado inmunológico del individuo. En las primeras etapas de la infección viral (3-5 días) es donde ocurre la viremia y simultáneamente el aumento en el título de las inmunoglobulinas M. Todas las muestras tuvieron una serología positiva para las inmunoglobulinas M anti-hantavirus. La literatura disponible sobre el curso de la viremia en SPH, menciona que la detección de ARN viral declina rápidamente en los primeros días de la infección, generalmente después de la fiebre y aproximadamente al quinto día del inicio de los síntomas. Considerando este patrón, es posible que en algunas de las muestras humanas la viremia no fuera lo suficientemente alta para poder amplificar una parte del genoma viral (Hjelle & Torres-Perez, 2010; Vapalahti et al., 2001). A esta variabilidad en la carga viral se le puede agregar otra posible explicación relacionada con las condiciones de conservación de las muestras, entre la recolección y la llegada al laboratorio de diagnóstico donde no siempre es posible mantener la cadena de frío, contribuyendo a la degradación del ARN viral.

5.3 Comparación de secuencias y análisis filogenéticos.

Las secuencias parciales obtenidas del segmento S y el segmento M de hantavirus de los roedores seropositivos capturados en este estudio así como las obtenidas de los casos de SPH se analizaron a través de diferentes métodos como se detalla en el capítulo materiales y métodos con el fin de identificar los genotipos circulantes en el país. Las nuevas secuencias virales se compararon con las ya existentes en el país y con las de hantavirus de la región, con el fin de establecer las relaciones filogenéticas.

Los análisis filogenéticos del segmento S como del segmento M de los hantavirus locales y regionales muestran que estos virus poseen una gran diversidad a lo largo del

continente americano, como ya lo demostraron diferentes trabajos (Guo et al., 2013; Montoya-Ruiz et al., 2014; Padula et al., 2000; Plyusnin and Morzunov, 2001).

Desde la aparición de los primeros casos de SPH en Uruguay (1997) y posteriormente la definición de los principales reservorios de hantavirus para el país, la base de datos de las secuencias de hantavirus tanto para roedores como para las muestras humanas es amplia y diversa (Delfraro et al., 2003; 2008; Padula et al., 2000). Desde la identificación de los primeros hantavirus humanos hasta la fecha, las variantes descritas para el país son los virus Lechiguanas y Andes Central Plata ambas en *O. flavescens* y asociadas a casos de SPH. Si bien este Andes Central Plata se describió originalmente como un virus distinto a Lechiguanas, ambos comparten reservorio, son monofiléticos y presentan una elevada homología de secuencia nucleotídica y aminoacídica, por lo tanto se trataría del mismo virus. La variante Juititaba, sólo ha sido detectada en roedores en nuestro país (*O. nigripes* y *O. nasutus*), pero se encuentra asociada a SPH en Brasil y Paraguay (Chu et al., 2003; Delfraro et al., 2003; Delfraro et al., 2008; Padula et al., 2000; Raboni et al., 2012).

Los análisis filogenéticos del segmento S realizados en este trabajo de las muestras de casos de SPH así como de origen roedor nos indican que los hantavirus predominantes que circulan en el país pertenecen a la variante Lechiguanas-Andes Central Plata, confirmando los hallazgos descritos anteriormente.

Las secuencias del segmento S de Uruguay previamente descritas y las secuencias de hantavirus estudiadas en los roedores *O. flavescens* y los casos de SPH a lo largo de este trabajo forman un grupo monofilético ($aLRT=0,8$) con hantavirus pertenecientes al genotipo Lechiguanas/Andes Central Plata. Este grupo incluye una de las primeras secuencias descritas de este genotipo (AF482714), obtenida de un ejemplar de *O. flavescens* proveniente de la zona central de Argentina (Levis et al., 1998).

El análisis de distancia p intra grupo para este clado muestra que estos virus poseen un 96% de homología a nivel nucleotídico y 99% a nivel aminoacídico (Anexo 2). Esta elevada homología de secuencia, junto con la monofilia del grupo, soportada por un apoyo estadístico significativo, indican que estos virus se encuentran altamente emparentados.

El análisis de distancia p entre los grupos filogenéticos descritos en este estudio indicó que los grupos con mayor grado de homología de secuencia con Lechiguanas/Andes Central Plata fueron Bermejo y Ñeembucú (Anexo 2). La homología a nivel nucleotídico fue de 89% y 86% respectivamente, en cuanto a nivel aminoacídico su homología es mayor, un 99% en ambos. Este resultado nos llevó a plantearnos la posibilidad de incluir ambas variantes en el grupo Lechiguanas/Andes Central Plata y realizar nuevamente el análisis de la p distancia intragrupo. El nuevo resultado fue, como era esperable, un alto grado de homología a nivel de secuencia nucleotídica con un 95% y un alto porcentaje de homología a nivel de aminoácidos con un 99%. Además, como

puede observarse en la filogenia (figura 12), Bermejo y Ñeembucú son especies hermanas de Lechiguanas / Andes Central Plata, y estas relaciones se soportan con valores de aLRT de 0,98. Si bien a Bermejo y Ñeembucú se les asignó originalmente como reservorio al roedor *O. chacoensis*, estudios posteriores de genética de poblaciones confirmaron que dichos ejemplares debían asignarse a la especie *O. flavescens*, al igual que los virus Lechiguanas y Andes Central Plata (Rego et al, 2008). Por todas las pruebas mencionadas anteriormente y los resultados de los análisis filogenéticos descritos en este estudio se podría redefinir el grupo y agregar estas dos variantes virales al mismo, el cual por precedencia en la nomenclatura debería denominarse Lechiguanas.

Del análisis filogenético del segmento S (450 pb) se observa además que los virus de Uruguay se dividen en dos subclados. Uno de los clados contiene muestras de casos de SPH proveniente de Rocha y roedores capturados en las diferentes localidades del mismo departamento, junto con hantavirus previamente identificados en el este del país. El otro clado agrupa a las muestras de casos de SPH y roedores del suroeste del territorio (Colonia, San José, Montevideo, Canelones). Esta subdivisión es interesante ya que podría indicar que pequeñas diferencias genéticas pueden correlacionarse con la distribución geográfica de los virus dentro de la zona endémica del sur del río Negro. La única muestra de Rocha (092) que no agrupa con las variantes de ese departamento, se puede explicar esta incoherencia en la filogenia debido a que no se conoce la epidemiología del paciente por lo tanto no sabemos donde estuvo expuesto al virus, si que las manifestaciones clínicas del mismo fueron en el hospital de Rocha. Por lo tanto no podemos atribuirle una zona geográfica concreta donde pudo estar en contacto con el virus. También a nivel epidemiológico es útil para ubicar geográficamente casos de SPH positivos cuando no se conoce con precisión el lugar donde ocurrió la exposición con el virus.

En el marco de este trabajo se capturó en Colonia un ejemplar de *Akodon azarae* el cual resultó positivo en las pruebas de tamizaje y de titulación para la búsqueda de anticuerpos de hantavirus, presentando un título de 1:1.600.

Los análisis moleculares realizados a este ejemplar permitieron la amplificación de una secuencia de 200 pb del segmento S, después de varios intentos con diferentes juegos de oligonucleótidos. La conservación de la muestra no estaría implicada en el poco éxito en la amplificación de porciones mayores del genoma viral, ya que la misma fue adecuadamente transportada y conservada en el laboratorio. Una posible explicación sería la existencia de mutaciones puntuales en el genoma viral que se está intentando amplificar, resultando en una deficiente hibridación de alguno de los oligonucleótidos. El otro factor involucrado podría ser una baja carga viral, ya sea porque se trata de una infección reciente o bien por ser una infección aguda donde la viremia se encuentra en su curva descendente.

Cuando se realizaron los análisis filogenéticos la secuencia de 200 pb del segmento S del ejemplar de *Akodon azarae* (1586) éste se agrupa con una secuencia proveniente de un ejemplar de *O. flavescens* (1574), con la que comparte un 100% de homología nucleotídica y un soporte de bootstrap de 96%. A su vez, ambas secuencias se agrupan con secuencias de Uruguay pertenecientes al genotipo Lechiguanas, con un bootstrap de 98% (figura 14). Consistentemente, este mismo ejemplar *O. flavescens* en el análisis mostrado en la figura 12 (450 pb) también agrupa con el genotipo Lechiguanas/Andes Central Plata.

En este análisis la cepa de hantavirus Bermejo se ubica internamente a las muestras Lechiguanas/Andes Central Plata con un soporte de bootstrap no significativo, esta inconsistencia se debe a la menor longitud de secuencia analizada respecto a la filogenia de la figura 12.

De la información de secuencia obtenida de la muestra 1586 podemos inferir entonces que el virus encontrado en el roedor *Akodon azarae* pertenece al genotipo Lechiguanas/Andes Central Plata, siendo entonces la primera descripción de esta variante en Uruguay asociada a esta especie de roedor. Como se ha mencionado en la introducción, esta especie de roedor es el natural reservorio del virus Maciel, un hantavirus no patógeno cuya distribución geográfica abarca la zona central de Argentina (Levis et al., 1998).

Como se discutió antes, la prevalencia de infección en *O. flavescens* fue de 6,7%, mientras que la prevalencia de infección de *A. azarae* fue de 3,3%. En esta colecta la especie *A. azarae* fue la más capturada con 30 ejemplares, en cambio el ratón colilargo chico fue la quinta especie más capturada.

La infección por una misma variante viral en roedores de especies o géneros distintos es un evento relativamente frecuente, el cual se puede explicar como una infección secundaria, “spillover” o “derrame”, o sea una infección incidental de un roedor por parte de un roedor reservorio, pero sin dar lugar a una infección persistente. Este fenómeno puede ocurrir en los roedores simplemente por el hecho de vivir en simpatria y suele ocurrir desde el reservorio primario (el cual en general es la especie mayoritaria) a la especie no reservorio (especie minoritaria). En este caso los individuos de *A. azarae* capturados fueron exactamente el doble de los *O. flavescens* (30/15), pero si lo analizamos desde el punto de vista probabilístico es más probable que la especie con mayor número de individuos se infecte incidentalmente que otra con menor número (Delfraro et al., 2008; Levis et al., 2004; Raboni et al., 2012). Aunque se cree en general que este proceso ocurre desde la especie más abundante (habitualmente la especie reservorio) a una menos representada, en nuestro trabajo la especie *A. azarae* fue la más abundante o sea que el proceso ocurrió a la inversa. Sin embargo, la cercanía del lugar de captura de ambos ejemplares, la diferencia de un día en el tiempo de captura entre un individuo y otro, los análisis serológicos y

moleculares así como los análisis filogenéticos robustos apoyarían la hipótesis de “spillover”.

En cambio otros autores proponen otra explicación, la del salto de huésped o “host switch” un evento relativamente común entre roedores que viven en simpatria. Dicho fenómeno se revela examinando las filogenias de virus y roedores, en las cuales se observan incongruencias entre las mismas, es decir que virus cercanamente relacionados son detectados en especies o géneros de roedores filogenéticamente distantes (Arai et al., 2012; Kang et al., 2009; Monroe et al., 1999; Nemirov et al., 2002; Plyusnin & Morzunov, 2001; Plyusnin & Sironen, 2014; Vapalahti et al., 2001; Vapalahti et al., 2003). En nuestro caso virus del mismo genotipo estarían asociados a roedores de géneros diferentes y además de tribus diferentes: *A. azarae* pertenece a la tribu Akodontini mientras que *O. flavescens* pertenece a la tribu Oryzomyini.

Esta situación ya fue descrita para Uruguay, en este caso las especies implicadas fueron *Oligoryzomys nigripes* y *Oxymycterus nasutus* y la variante viral encontrada en ambas fue Juquitiba. También en este caso los roedores implicados no sólo difieren en género y especie, sino que pertenecen además a tribus diferentes (Akodontini y Oryzomyini) (Delfraro et al., 2008).

Este tipo de eventos también se han reportado en estudios realizados en Brasil (Paraná) donde se documentó a la especie *A. montensis* como reservorio principal del hantavirus Jaborá pero se ha encontrado además al mismo virus en otras dos especies de roedores (*A. paranaensis* y *A. serrensis*), asumiendo este evento como un posible “spillover”. Adicionalmente, estos estudios han detectado genoma del hantavirus Juquitiba en el roedor *A. paranaensis*, cuyo reservorio principal es el roedor *O. nigripes*. Se observa en este caso que más de un tipo viral se puede encontrar asociado a una misma especie de roedor (Juquitiba y Jaborá en *A. paranaensis*), reafirmando la complejidad de la relación virus reservorio en una misma área geográfica. La infección por “spillover” en hospederos secundarios podría estar jugando un rol importante en el mantenimiento de estos virus en la naturaleza en periodos donde la prevalencia de infección en los hospedadores primarios es baja (Raboni et al., 2012; Teixeira et al., 2014). El ejemplar de *A. azarae* podría estar actuando como un hospedador secundario manteniendo la circulación de estos virus en la naturaleza, nótese que la captura de este ejemplar fue en otoño (mes de abril) época del año de mayor actividad de roedores comparada con el invierno. Por el contrario algunos autores piensan en la situación inversa, este fenómeno de “spillover” actuaría provocando un efecto negativo en la prevalencia de infección de la especie reservorio principal ya que estos eventos estarían “barriando” la carga viral del ambiente, ya que dichos roedores “secundarios” no se infectarían de forma persistente, cortando así el ciclo del virus en la naturaleza (Delfraro et al., 2008; Easterbrook & Klein, 2008; Jonsson et al., 2010; Kang et al., 2011; Teixeira et al., 2014). Por ello, para determinar si *A. azarae* es un reservorio natural y puede aportar virus a la naturaleza o simplemente un caso de

infección incidental con el virus, se debería realizar otro tipo de estudios, como enfrentar esta cepa viral al roedor en cuestión y monitorear la infección y la respuesta inmune y definir si se trata de una infección aguda o persistente. El hallazgo a futuro de más roedores de esta especie infectados con el virus en la misma o en otras áreas del país, puede también ser indicativo de que éstos tienen incidencia en el mantenimiento del virus en la naturaleza.

Como se ha mencionado en la introducción cuando nos referimos a los hantavirus circulantes en Uruguay, se constató la circulación del virus Juitiba en dos especies de roedores (*O. nigripes* y *O. nasutus*) en el departamento de Maldonado (Delfraro et al., 2008). En el presente trabajo se ha identificado la presencia del hantavirus Juitiba en un caso de SPH ocurrido también en el departamento de Maldonado. La secuencia obtenida a partir del segmento S agrupa en la filogenia con las secuencias del genotipo “Juitiba-like” (figura 14). El valor de bootstrap de todo el grupo es apenas significativo en este análisis, probablemente debido al tamaño de secuencia utilizada. De todos modos este genotipo muestra valores de soporte altos cuando se analizan secuencias mayores (ver figura 12) y la nueva secuencia se ubica a la interna del grupo, por lo cual creemos que la asignación a este genotipo es correcta. El genotipo “Juitiba-like” está formado por los hantavirus Juitiba, descritos para Uruguay sólo en roedores, Itapúa de Paraguay y Araucaria y Juitiba de Brasil (figura 12). La muestra analizada en este estudio provino de un paciente con SPH confirmado por serología, el cual se dedicaba a la jardinería en el departamento de Maldonado. Éste sería entonces el primer reporte del hantavirus Juitiba en pacientes de SPH de Uruguay. El virus Juitiba fue el primer hantavirus asociado a casos de SPH en el estado de San Pablo, Brasil en el año 1999 (Johnson et al., 1999). Luego se identificaron nuevas variantes de este virus en diferentes estados brasileños como Santa Catalina, Minas Gerais, Paraná y Rio Grande del Sur (Raboni et al., 2014; Raboni et al., 2009; Suzuki et al., 2004; Teixeira et al., 2014).

En relación al análisis de tasas de sustitución nucleotídica y selección de codones en ambos segmentos (S y M) no se detectaron sitios sometidos a selección positiva (ver tablas 19 y 20). Por otro lado, se encontraron numerosos sitios sometidos a selección purificadora, indicando que en estas secuencias, si bien son parciales, existe una fuerte resistencia al cambio aminoacídico. De acuerdo con la literatura, existe una región hipervariable dentro de la secuencia del segmento S que comprende los nucleótidos 242 al 281 (Horling et al., 1996; Plyusnin et al., 1994a). La misma resulta ser un sitio antigénico de la proteína justificando la variación existente en esta parte de la proteína, en nuestro caso las secuencias analizadas no incluyen ese sitio variable. Un trabajo reciente realizado en nuestro laboratorio (Dini et al, 2015), donde se logró el secuenciado total del segmento S de muestras de SPH y el análisis de donde se analizaron tasas de sustitución y regiones variables concuerdan con nuestros resultados y con lo mencionado en la literatura (Dini, 2015; Horling et al., 1996;

Jaaskelainen et al., 2008; Kaukinen et al., 2001; Plyusnin et al., 1994b). En el segmento M existen varios sitios potenciales de n-glicosilación (relacionados con residuos de asparagina) tanto en la proteína Gn como en la Gc (Cifuentes-Muñoz et al., 2014). Las secuencias parciales del segmento M (456 pb) analizadas en este trabajo incluyen uno de esos sitios descritos en la literatura (nucleótidos 2.787-2.790). En todas las secuencias analizadas, este sitio se encuentra conservado indicando probablemente una fuerte presión hacia la conservación del mismo entre variantes que difieren tanto en su distribución geográfica como en los reservorios naturales.

Los análisis filogenéticos realizados con las secuencias parciales (456 pb) del segmento M concuerdan en general con los resultados obtenidos a través del estudio de las secuencias parciales del segmento S. Esta coherencia es significativa, ya que discordancias en la topología entre ambos segmentos pueden indicar reordenamientos genéticos o recombinación, fenómeno que está ampliamente descrito en estos virus.

En los estudios filogenéticos del segmento M reafirmamos que la variante Lechiguanas/Andes Central Plata es el principal hantavirus que circula en el país y el causante de la mayoría de los casos de SPH estudiados en este trabajo.

Al igual que el segmento S, el segmento M mostró que las variantes uruguayas encontradas en este estudio poseen una gran homología con la cepa AF482715 del genotipo Lechiguanas (Argentina). Dentro de nuestro grupo de estudio la homología a nivel de secuencias fue de un 94% y a nivel aminoácidico de un 99% (Anexo 3).

El análisis de distancia p entre los grupos filogenéticos Lechiguanas/Andes Central Plata y Bermejo indicó que la homología entre estos grupos a nivel nucleotídico fue de 84%, en cuanto a nivel aminoácidico su homología fue de 98% (Anexo 3). Estos resultados, al igual que para el segmento S, reafirman que la variante Bermejo debería ser incluida en este grupo. No se encontraron en la base de datos secuencias del segmento M del virus Ñeembucú, por lo cual no pudo ser incluido en el análisis.

Las muestras de casos de SPH y roedores forman un grupo monofilético con soporte aLRT=0,86, incluyendo los hantavirus Lechiguanas de Argentina y los hantavirus descritos previamente para Uruguay. En una posición diferente de la que se observa para el segmento S, también podemos apreciar que la mayoría de las muestras de Rocha se agrupan en un subclado (aLRT=0,94), indicando un mayor grado de identidad entre muestras de esta región del país.

La cepa patrón del genotipo Lechiguanas de Argentina (AF482714) se agrupa con tres de las muestras analizadas en este trabajo (Figura 15). Estas provienen de un caso de SPH asignado a la localidad de Villa Serrana y a dos roedores (*O. flavescens*) capturados en las localidades de Las Piedras y Colonia. En el análisis del segmento S, estas secuencias agruparon en otro subclado el cual no se asocia directamente con la cepa Lechiguanas de Argentina. Estas pequeñas diferencias en la topología intra grupo para los segmentos genómicos S y M no afectan la homogeneidad del mismo, ya que los

valores de homología nucleotídica y aminoacídica son elevados tanto para el segmento M como para el S.

En relación a la única muestra de SPH (349) proveniente del norte del país (Artigas) los análisis filogenéticos del segmento S y M la agrupan con las muestras del suroeste del país. El estudio epidemiológico de este caso de SPH reveló que el paciente no permaneció solamente en su domicilio de la ciudad de Artigas dentro de los 45 días previos al inicio de los síntomas, habiendo realizado otras actividades fuera del departamento como la recolección de naranjas en Salto y la visita de familiares en la ciudad de Montevideo. Debido a la complejidad del caso no es posible determinar con precisión donde ocurrió la exposición al virus, pero del análisis de secuencia se deduce que el virus está emparentado con las variantes de la zona sur del país. No se obtuvieron roedores seropositivos en la captura realizada en la cercanía del domicilio del paciente, por tanto no es de descartar que el paciente se haya infectado en la cercanía de Montevideo.

Algo muy similar sucedió con el estudio de la muestra 038. El estudio epidemiológico realizado por el Ministerio de Salud Pública, constató que el paciente estuvo expuesto al contacto con roedores en tres lugares diferentes dentro de los 45 días de incubación previstos para esta afección viral: El Fortín (Canelones), Punta del Diablo (Rocha) y la Barra de Maldonado (Maldonado). Nuestro equipo solamente realizó capturas de roedores en el peridomicilio y en los lugares donde estuvo expuesta en la localidad de Punta del Diablo, Rocha. La salida de trampeo fue exitosa ya que se capturó un ejemplar positivo de *O. flavescens*. Como se observa en los análisis filogenéticos (figura 12 y 15) los virus encontrados en el roedor y en la muestra del paciente mostraban diferencias, indicando que la paciente no se habría infectado con el virus en esa localidad. Se realizó el estudio epidemiológico de los demás lugares, pero debido a las modificaciones que sufrieron (limpieza de terreno, construcción de vivienda y control de plagas) se decidió no realizar capturas de roedores en los mismos, ya que dichas modificaciones afectaron la probabilidad de encontrar roedores.

Esto nos muestra la gran importancia de realizar los estudios epidemiológicos y moleculares en los pacientes infectados, así como la realización de capturas de roedores en los lugares de posible exposición al virus. Este tipo de estudios interdisciplinarios son esenciales para determinar las áreas de riesgo aportando datos relevantes para la prevención y el control de esta afección.

5.4 Distribución potencial del reservorio (*O. flavescens*).

La información disponible sobre la distribución de la especie *O. flavescens* indica una distribución geográfica que abarca desde el estado de Rio Grande do Sul (sur del Brasil), pasando por todo el territorio uruguayo y comprendiendo el centro y este de la

República Argentina (González & Martínez-Lafranco, 2010). Los resultados de nuestros mapas de distribución de la especie realizados con los registros obtenidos nos indican que la especie se encuentra en todo el territorio uruguayo como está documentado.

En todas las salidas de campo realizadas en los diferentes lugares del territorio se encontró al menos un individuo de la especie, coincidiendo plenamente con el modelo aplicado. La mayor idoneidad de encontrar a la especie estudiada que nos proporcionó este modelo (0,75 a 1), nos indicó que algunas regiones de los departamentos del sur del país (Colonia, San José, Montevideo, Canelones, Maldonado y Rocha) así como algunas regiones del norte del país (Paysandú, Salto, Artigas y Rivera) son las preferidas por la especie (figura 16).

Si se toma como referencia que más de la mitad de la población uruguaya está distribuida en los departamentos al sur del río Negro (en la zona costera), y que los departamentos de Montevideo y Canelones son aquéllos con mayor número de ciudadanos es más probable que haya un encuentro entre la especie reservorio (distribuida en todo el territorio) y las poblaciones humanas al sur del río Negro solamente contemplando el factor estadístico, por ende, más población más posibilidades de encontrarse con el reservorio.

Si a lo anteriormente mencionado, le agregamos los efectos de las actividades humanas sobre las comunidades de micromamíferos, las cuales generan cambios importantes a nivel de la riqueza de especies disminuyéndola y aumentando la abundancia de la especie reservorio esta realidad se vuelve más complejo (Langlois, 2001; Mackelprang et al., 2001; Rubio et al., 2014; Suzan et al., 2008).

Un ejemplo de estas modificaciones son las infraestructuras viales (rutas, carreteras, caminos, puentes, etc.) las cuales afectan negativamente a las poblaciones de micromamíferos provocando la fragmentación de hábitats, favoreciendo la dispersión de especies exóticas y promocionando el efecto de barrera (Fahrig & Rytwinski, 2009). En uno de nuestros modelos una de las variables antrópicas que estaba fuertemente relacionada con la distribución de la especie reservorio era la caminería departamental. La asociación entre la especie estudiada y esta variable se explicaría por los cambios en el paisaje ocasionados por la caminería departamental, creando bordes de chircales y otras especies de plantas (borde de camino) que generan un microhábitat favorable a esta especie. Estos bordes de caminos son utilizados por varias especies de roedores como corredores para poder trasladarse de una zona a otra aumentando su dispersión. También son utilizados como vías alternativas para conseguir alimento o vencer barreras del paisaje (ríos, arroyos, etc.) siendo así una manera más fácil de colonizar nuevos territorios. Esta modificación del paisaje estaría promoviendo la adaptación de nuestra especie reservorio y aumentando su distribución lo que ayudaría a expandir la infección con estos virus. En la práctica se pudo asociar a esta especie a los bordes del camino ya que fue muy frecuentemente capturada en estos lugares.

Otra diferencia que se visualizó en las salidas de campo y en las imágenes satelitales (Figura 9 y 10) fue que los departamentos del norte del país poseen actividades económicas extensiva como por ejemplo ganadería extensiva (Paysandú) o grandes plantaciones forestales (Rivera), mientras que las actividades agropecuarias en los departamentos del sur se basan en pequeños emprendimientos económicos como chacras, huertas, pequeñas plantaciones (Las Piedras, Canelones) y pequeños establecimientos lecheros (San Pedro, Colonia). Estas diferencias en las actividades económicas en las diversas zonas del país influyen directamente en la mano de obra rural, ya que en las poblaciones rurales del sur implica que el contacto con el suelo es mayor, y dicho modelo económico necesita más mano de obra. En cambio el manejo de esas actividades en el norte del país requiere menos mano de obra pues en los trabajos extensivos se utiliza maquinaria pesada. Por eso los trabajadores rurales de los departamentos del sur estarían más expuestos al contacto con roedores debido a las actividades económicas relacionadas con el uso de suelo.

Otra actividad humana es el turismo, que en varios meses del año mueve un considerable número de personas (Ministerio de Turismo). En nuestro país se puede apreciar estos grandes movimientos poblacionales en los meses de verano y la principal atracción turística son los departamentos con franja costera. Por ende la aglomeración de personas y las actividades relacionadas con el turismo (caza, pesca, camping, actividades al aire libre, entre otras) pueden llevar al contacto directo o indirecto con los roedores reservorios.

Los mapas de distribución potencial obtenidos en este trabajo, nos indican que la zona costera del sur del territorio es la de mayor idoneidad de encontrar a la especie reservorio. Con las consideraciones antes mencionadas (trabajo rural, uso del suelo, turismo) podemos delimitar a esta región del país como la más propensa a que las poblaciones humanas estén en contacto con los roedores. Esta hipótesis coincide plenamente con lo que ocurre en la realidad, ya que está documentado por el Ministerio de Salud Pública que los casos de SPH ocurren en el sur del río Negro, el 84% de los casos (figura 7).

Al estimar el modelo de distribución utilizando los registros de los roedores positivos para hantavirus las variables que tienen un aporte significativo al modelo fueron la altitud y la temperatura media anual.

En relación a la variable altitud, el óptimo obtenido para la especie se asoció a regiones geográficas con poca altitud. Geográficamente Uruguay se caracteriza por ser una penillanura y no poseer en su relieve grandes alturas. El roedor *O. flavescens* es una especie que se encuentra relacionada principalmente con cursos de agua y bañados (González & Martínez-Lafranco, 2010). Estos ambientes generalmente están a una altitud menor o igual que el nivel del mar. También las regiones costeras del sur del país en su mayoría no presentan regiones muy elevadas, presentando estas regiones índices de humedad mayores que otras partes del país debido a su cercanía con la

costa. Estudios de la prevalencia de infección en la principal especie reservorio del hantavirus Sin Nombre (*Peromyscus maniculatus*) a lo largo de diferentes biomas y a diferentes altitudes sobre el nivel del mar, registraron variaciones significativas en las prevalencias. Estas prevalencias de infección variaron de ser nulas en el desierto de Sonora, un 4% en los biomas asociados a chaparral y por ultimo un 17%, en bosques de piñones (Mills et al., 1997). Estudios genéticos y de genómica funcional describieron varias adaptaciones de esta especie a las altas altitudes (Cheviron et al., 2014; Natarajan et al., 2015; Scott et al., 2015).

En nuestro modelo la variable altitud es explicativa de la distribución tanto de la especie en general como para los seropositivos (Tablas 21 y 22). Esto podría explicarse por una preferencia y una mayor adaptación de estos roedores por terrenos de baja altitud.

La otra variable que contribuyó fuertemente a la distribución potencial del reservorio infectado por el virus fue la temperatura media anual (BIO1). El área con mayor idoneidad de encontrar a la especie reservorio infectado con el virus se acotó a la franja costera del sur del territorio (Figura 18 y 19). En esta región del país las temperaturas medias anuales son menores que en los departamentos del norte del país donde hay idoneidad para la especie, pero no para los roedores infectados por el virus. Esta sensible baja en las temperaturas medias anuales y el alto grado de humedad asociado a la zona costera del sur del país podrían influir ayudando a la viabilidad de la partícula viral en el ambiente e incrementando las probabilidades de infección en los reservorios. En este mismo sentido, mayores temperaturas medias anuales y menores índices de humedad, podrían contribuir a la inactivación de los virus en el ambiente y explicar en parte la ausencia de roedores seropositivos en el norte del país.

No son muchos los trabajos que analizan la viabilidad de estos virus en el ambiente ya que es muy complejo trabajar con ellos desde el punto de vista de la bioseguridad y su reproducibilidad en el laboratorio. En el trabajo de Hardestam y colaboradores del año 2007 se compara la viabilidad de una serie de virus de la familia Bunyaviridae. Los virus estudiados fueron un flebovirus (Sicilian virus), un nairovirus (Crimean Congo virus) y por ultimo un hantavirus (Hantaan virus). Los tres virus fueron expuestos a las mismas condiciones de temperatura y humedad en diferentes de tiempos para evaluar cómo dichos factores actuaban sobre su viabilidad. La disminución de la temperatura era un factor clave para la viabilidad de todos los virus, ellos demostraron que los hantavirus se mantenían estables hasta 8 días después que se le aplicara una temperatura de 37°C. Al disminuir la temperatura a 20°C aumentaban su estabilidad por 9 días y esa viabilidad llegaba a 96 días si la temperatura bajaba a 4°C. La humedad fue otro factor que afectó su viabilidad: se comprobó que a medida que ésta disminuía con ella disminuía la viabilidad de la partícula viral. Del mismo modo cuando a todos los virus

se los enfrentó a condiciones nulas de humedad por 24 horas o más, todos los géneros evaluados no presentaron partículas infecciosas activas.

En otro trabajo Eva Kallio y colaboradores demostraron que la viabilidad de los virus Puumala y Tula (hantavirus del viejo mundo) era afectada directamente por la temperatura y la humedad del ambiente. Ambos virus se inactivaban 24 horas después de ser sometidos a una temperatura de 37°C, en tanto mantenían viables en el ambiente hasta 18 días sometidos a una temperatura de 4°C. Se comprobó también que ambos virus mantenían su infectividad entre 5 y 11 días a una temperatura ambiente de 23°C. Propusieron que no sólo el contacto directo entre los roedores es una vía de infección sino la carga viral en el ambiente es un factor que juega un rol importante. En resumen no sólo la temperatura y la humedad son relevantes para la viabilidad del virus en el ambiente sino que factores físicos y químicos como las radiaciones ultravioletas o el pH del suelo también resultan relevantes. En los países donde las bajas temperaturas ayudarían a la estabilidad del virus en el ambiente, adicionalmente, las capas de hielo que se forman durante el invierno actuarían como una especie de escudo ante los rayos ultravioletas generando un microclima de alta humedad y bajas temperaturas. En estudios realizados en bosques de dosel denso, donde se crea un microclima de bajas temperatura y alto índice de humedad a nivel del suelo, a lo que se suma la poca penetración de los rayos ultravioletas, se encontró una carga viral mayor que en espacios con vegetación dispersa (Goodin et al., 2009). Estudios realizados por Sauvage et al (2002) en la región montañosa de Ardennes (Francia) describieron que existía mayor seroprevalencia en los roedores capturados en la cara norte de la montaña que en la zona sur, este fenómeno lo asoció con la diferencia de humedad en las dos caras de la montaña.

En cuanto a especies virales de Sudamérica, estudios recientes de investigadores argentinos realizados con el virus Andes, demostraron que la viabilidad estaba relacionada directamente con la temperatura y humedad del ambiente. Observaron que a una temperatura de 37°C el virus Andes tiene una viabilidad de una semana, en cambio, cuando se lo expone a una temperatura promedio de 22°C, éste puede mantener su infectividad por 22 días (Bellomo et al., 2015).

Estudios ecológicos realizados en *O. longicaudatus* reservorio natural del virus Andes en Argentina y Chile, indican que la temperatura y las precipitaciones juegan un rol fundamental en su distribución (Andreo et al., 2011).

Los datos aportados por el modelo y las variables que apoyan los datos del mismo, así como los argumentos expuestos anteriormente nos llevan a pensar que la zona sur del Uruguay, por su temperatura e índice de humedad es un área propicia para el mantenimiento de la estabilidad de las partículas virales de los hantavirus en el ambiente. Además, el modelo predice que los roedores reservorios se asocian predominantemente a regiones de baja altitud.

Este tipo de aproximaciones son de gran interés, porque dan lugar a modelos predictivos que pueden utilizarse como herramientas para prevención, especialmente importantes para agentes infecciosos como los hantavirus, que no poseen profilaxis específicas para su control.

6. Conclusiones.

- 1.- El presente trabajo muestra que los roedores *Oligoryzomys flavescens* son el reservorio principal de hantavirus en Uruguay, en concordancia con trabajos previos realizados en el país.
- 2.-Adicionalmente se obtuvo un ejemplar de *Akodon azarae* seropositivo, especie que no había sido descrita previamente como potencial reservorio de hantavirus en Uruguay.
- 3.- Las prevalencias de infección en *O. flavescens* en varias localidades relevadas de los departamentos de Colonia, Rocha y Canelones fueron significativamente mayores a las reportadas previamente en el país, la máxima prevalencia de infección se encontró en Las Piedras (Canelones), llegando a un 17%.
- 4.- Se capturaron roedores de la especie *O. flavescens* en todas las salidas de campo realizadas en este trabajo. La riqueza de especies de roedores fue variable y podría afectar directamente la prevalencia de infección en las especies reservorio. Esta variación en la riqueza de las comunidades de roedores en las diferentes localidades podría estar asociada a modificaciones del ambiente causadas por las actividades humanas.
- 5.- El análisis de las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de los segmentos S y M de las muestras de roedores y casos de SPH comprobaron que la mayor parte de los hantavirus circulantes en Uruguay son variantes relacionadas con el genotipo Lechiguanas/ Andes Central Plata previamente descritas para el país.
- 6.- Los análisis de homología de secuencias y filogenéticos de los segmentos S y M indican que existe un alto grado de homología entre los genotipos Lechiguanas/Andes Central Plata, Bermejo y Ñeembucú. Adicionalmente, estas variantes comparten el mismo reservorio natural: el roedor *O. flavescens*. Por tanto proponemos que estas variantes se denominen “Lechiguanas Like”.
- 7.- En el presente trabajo se identificó por primera vez al virus Juquitiba asociado a un caso de SPH ocurrido en el departamento de Maldonado, coincidiendo con estudios previos donde se reportó este virus en dos especies de roedores, en el mismo departamento.
- 8.- Se obtuvo un mapa de distribución potencial de *O. flavescens*, principal reservorio de hantavirus en nuestro país, lo que nos permitió identificar las zonas más idóneas de encontrar a la especie reservorio causante de hantavirosis.
- 9.- Los análisis de distribución potencial de roedores seropositivos para hantavirus revelaron que las variables ambientales que más aportaron a los modelos fueron la temperatura media anual y la altitud. La incidencia de la temperatura en la viabilidad

de la partícula viral en el ambiente, puede contribuir a explicar entre otros factores la actual distribución de las hantaviriosis en nuestro país. Esta información es un insumo importante, que permitirá orientar las políticas de prevención a las zonas de “alto riesgo” contribuyendo a la vigilancia y control de esta zoonosis.

7. Perspectivas

Las perspectivas del siguiente trabajo es realizar nuevas campañas de trampeo de roedores en los departamentos del norte del país, con la esperanza de encontrar la circulación de nuevos variantes virales.

Estudiar la infección de la variante Lechiguana en el ratón de campo (*Akodon zarae*), con el fin de establecer si es un posible reservorio de para este hantavirus.

Realizar nuevos mapas de distribución potencial incluyendo todas las especies de reservorio para hantavirus en el país.

7. Bibliografía.

- Andreo, V., Glass, G., Shields, T., Provencal, C. and Polop, J. (2011) Modeling potential distribution of *Oligoryzomys longicaudatus*, the Andes virus (Genus: *Hantavirus*) reservoir, in Argentina. *Ecohealth* 8(3), 332-48.
- Andreo, V., Neteler, M., Rocchini, D., Provencal, C., Levis, S., Porcasi, X., Rizzoli, A., Lanfri, M., Scavuzzo, M., Pini, N., Enria, D. and Polop, J. (2014) Estimating hantavirus risk in southern Argentina: a GIS-based approach combining human cases and host distribution. *Viruses* 6(1), 201-22.
- Antic, D., Kang, C.Y., Spik, K., Schmaljohn, C., Vapalahti, O. and Vaheri, A. (1992) Comparison of the deduced gene products of the L, M and S genome segments of hantaviruses. *Virus Res* 24(1), 35-46.
- Arai, S., Bennett, S.N., Sumibcay, L., Cook, J.A., Song, J.W., Hope, A., Parmenter, C., Nerurkar, V.R., Yates, T.L. and Yanagihara, R. (2008) Phylogenetically distinct hantaviruses in the masked shrew (*Sorex cinereus*) and dusky shrew (*Sorex monticolus*) in the United States. *Am J Trop Med Hyg* 78(2), 348-51.
- Arai, S., Gu, S.H., Baek, L.J., Tabara, K., Bennett, S.N., Oh, H.S., Takada, N., Kang, H.J., Tanaka-Taya, K., Morikawa, S., Okabe, N., Yanagihara, R. and Song, J.W. (2012) Divergent ancestral lineages of newfound hantaviruses harbored by phylogenetically related crocidurine shrew species in Korea. *Virology* 424(2), 99-105.
- Arai, S., Nguyen, S.T., Boldgiv, B., Fukui, D., Araki, K., Dang, C.N., Ohdachi, S.D., Nguyen, N.X., Pham, T.D., Boldbaatar, B., Satoh, H., Yoshikawa, Y., Morikawa, S., Tanaka-Taya, K., Yanagihara, R. and Oishi, K. (2013) Novel bat-borne hantavirus, Vietnam. *Emerg Infect Dis* 19(7), 1159-61.
- Arai, S., Song, J.W., Sumibcay, L., Bennett, S.N., Nerurkar, V.R., Parmenter, C., Cook, J.A., Yates, T.L. and Yanagihara, R. (2007) Hantavirus in northern short-tailed shrew, United States. *Emerg Infect Dis* 13(9), 1420-3.
- Avsic-Zupanc, T., Petrovec, M., Furlan, P., Kaps, R., Elgh, F. and Lundkvist, A. (1999) Hemorrhagic fever with renal syndrome in the Dolenjska region of Slovenia--a 10-year survey. *Clin Infect Dis* 28(4), 860-5.
- Belshaw, R., Sanjuan, R. and Pybus, O.G. (2011) Viral mutation and substitution: units and levels. *Curr Opin Virol* 1(5), 430-5.
- Bernshtein, A.D., Apekina, N.S., Mikhailova, T.V., Myasnikov, Y.A., Khlyap, L.A., Korotkov, Y.S. and Gavrillovskaya, I.N. (1999) Dynamics of Puumala hantavirus infection in naturally infected bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Arch Virol* 144(12), 2415-28.
- Bharadwaj, M., Botten, J., Torrez-Martínez, N. and Hjelle, B. (1997) Rio Mamore virus: genetic characterization of a newly recognized hantavirus of the pygmy rice rat, *Oligoryzomys microtis*, from Bolivia. *Am J Trop Med Hyg* 57(3), 368-74.
- Blanco, P., Arroyo, S., Corrales, H., Pérez, J., Alvarez, L. and Castellar, A. (2012) Serological evidence of hanta virus infection (Bunyaviridae: Hantavirus) in rodents from the Sucre Department in Colombia. *Rev Salud Publica (Bogota)* 14(5), 755-64.
- Botten, J., Mirowsky, K., Kusewitt, D., Ye, C., Gottlieb, K., Prescott, J. and Hjelle, B. (2003) Persistent Sin Nombre virus infection in the deer mouse (*Peromyscus maniculatus*) model: sites of replication and strand-specific expression. *J Virol* 77(2), 1540-50.
- Bouloy, M., Plotch, S.J. and Krug, R.M. (1978) Globin mRNAs are primers for the transcription of influenza viral RNA in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75(10), 4886-90.
- Bowler, M.G. (2013) Species abundance distributions, statistical mechanics and the priors of MaxEnt. *Theor Popul Biol* 92, 69-77.

- Broennimann, O. and Guisan, A. (2008) Predicting current and future biological invasions: both native and invaded ranges matter. *Biol Lett* 4(5), 585-9.
- Brummer-Korvenkontio, M., Vaheri, A., Hovi, T., von Bonsdorff, C.H., Vuorimies, J., Manni, T., Penttinen, K., Oker-Blom, N. and Lahdevirta, J. (1980) Nephropathia epidemica: detection of antigen in bank voles and serologic diagnosis of human infection. *J Infect Dis* 141(2), 131-4.
- Calderón, G., Pini, N., Bolpe, J., Levis, S., Mills, J., Segura, E., Guthmann, N., Cantoni, G., Becker, J., Fonollat, A., Ripoll, C., Bortman, M., Benedetti, R. and Enria, D. (1999) Hantavirus reservoir hosts associated with peridomestic habitats in Argentina. *Emerg Infect Dis* 5(6), 792-7.
- Calisher, C.H., Childs, J.E., Field, H.E., Holmes, K.V. and Schountz, T. (2006) Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin Microbiol Rev* 19(3), 531-45.
- Campos, G.M., Borges, A.A., Badra, S.J., Figueiredo, G.G., Souza, R.L., Moreli, M.L. and Figueiredo, L.T. (2009) [Pulmonary and cardiovascular syndrome due to hantavirus: clinical aspects of an emerging disease in southeastern Brazil]. *Rev Soc Bras Med Trop* 42(3), 282-9.
- Carey, D.E., Reuben, R., Panicker, K.N., Shope, R.E. and Myers, R.M. (1971) Thottapalayam virus: a presumptive arbovirus isolated from a shrew in India. *Indian J Med Res* 59(11), 1758-60.
- Carver, S., Kuenzi, A., Bagamian, K.H., Mills, J.N., Rollin, P.E., Zanto, S.N. and Douglass, R. (2011) A temporal dilution effect: hantavirus infection in deer mice and the intermittent presence of voles in Montana. *Oecologia* 166(3), 713-21.
- Casapia, M., Mamani, E., García, M.P., Miraval, M.L., Valencia, P., Quino, A.H., Alvarez, C. and Donaires, L.F. (2012) Hantavirus pulmonary syndrome (Rio Mamore virus) in the Peruvian Amazon region. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 29(3), 390-5.
- Cifuentes-Muñoz, N., Salazar-Quiroz, N. and Tischler, N.D. (2014) Hantavirus Gn and Gc envelope glycoproteins: key structural units for virus cell entry and virus assembly. *Viruses* 6(4), 1801-22.
- Clay, C.A., Lehmer, E.M., Jeor, S.S. and Dearing, M.D. (2009) Sin nombre virus and rodent species diversity: a test of the dilution and amplification hypotheses. *PLoS One* 4(7), e6467.
- Cueto, G.R., Cavia, R., Bellomo, C., Padula, P.J. and Suárez, O.V. (2008) Prevalence of hantavirus infection in wild *Rattus norvegicus* and *R. rattus* populations of Buenos Aires City, Argentina. *Trop Med Int Health* 13(1), 46-51.
- Cheviron, Z.A., Connaty, A.D., McClelland, G.B. and Storz, J.F. (2014) Functional genomics of adaptation to hypoxic cold-stress in high-altitude deer mice: transcriptomic plasticity and thermogenic performance. *Evolution* 68(1), 48-62.
- Chu, Y.K., Owen, R.D., González, L.M. and Jonsson, C.B. (2003) The complex ecology of hantavirus in Paraguay. *Am J Trop Med Hyg* 69(3), 263-8.
- Chu, Y.K., Owen, R.D., Sánchez-Hernández, C., Romero-Almaraz, L. and Jonsson, C.B. (2008) Genetic characterization and phylogeny of a hantavirus from Western México. *Virus Res* 131(2), 180-8.
- Chu, Y.K., Rossi, C., Leduc, J.W., Lee, H.W., Schmaljohn, C.S. and Dalrymple, J.M. (1994) Serological relationships among viruses in the Hantavirus genus, family Bunyaviridae. *Virology* 198(1), 196-204.
- Archibald, J.D. (2003) Timing and biogeography of the eutherian radiation: fossils and molecules compared. *Mol Phylogenet Evol* 28(2), 350-9.
- de Oliveira, R.C., Cordeiro-Santos, M., Guterres, A., Fernandes, J., de Melo, A.X., Joao, G.A., Novais, M.A., Travassos da Rosa, E.S., Vasconcelos, P.F., Vilges de Oliveira, S., de Albuquerque, B.C. and de Lemos, E.R. (2014a) Rio Mamore virus and hantavirus pulmonary syndrome, Brazil. *Emerg Infect Dis* 20(9), 1568-70.

- de Oliveira, R.C., Guterres, A., Fernandes, J., D'Andrea, P.S., Bonvicino, C.R. and de Lemos, E.R. (2014b) Hantavirus reservoirs: current status with an emphasis on data from Brazil. *Viruses* 6(5), 1929-73.
- de Thoisy, B., Matheus, S., Catzefflis, F., Clement, L., Barrioz, S., Guidez, A., Donato, D., Cornu, J.F., Brunaux, O., Guitet, S., Lacoste, V. and Lavergne, A. (2014) Maripa hantavirus in French Guiana: phylogenetic position and predicted spatial distribution of rodent hosts. *Am J Trop Med Hyg* 90(6), 988-92.
- Delfraro, A., Clara, M., Tome, L., Achaval, F., Levis, S., Calderón, G., Enria, D., Lozano, M., Russi, J. and Arbiza, J. (2003) Yellow pigmy rice rat (*Oligoryzomys flavescens*) and hantavirus pulmonary syndrome in Uruguay. *Emerg Infect Dis* 9(7), 846-52.
- Delfraro, A., Tome, L., D'Elia, G., Clara, M., Achaval, F., Russi, J.C. and Arbiza Rodonz, J.R. (2008) Juquitiba-like hantavirus from 2 nonrelated rodent species, Uruguay. *Emerg Infect Dis* 14(9), 1447-51.
- Delport, W., Poon, A.F., Frost, S.D. and Kosakovsky Pond, S.L. (2010) Datamonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinformatics* 26(19), 2455-7.
- Dini, P. (2015) Variabilidad genética de hantavirus causantes de síndrome pulmonar en Uruguay. Tesina de grado Licenciatura Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.
- Dizney, L.J. and Ruedas, L.A. (2009) Increased host species diversity and decreased prevalence of Sin Nombre virus. *Emerg Infect Dis* 15(7), 1012-8.
- Easterbrook, J.D. and Klein, S.L. (2008) Immunological mechanisms mediating hantavirus persistence in rodent reservoirs. *PLoS Pathog* 4(11), e1000172.
- Engel, S.R., Hogan, K.M., Taylor, J.F. and Davis, S.K. (1998) Molecular systematics and paleobiogeography of the South American sigmodontine rodents. *Mol Biol Evol* 15(1), 35-49.
- Enria, D.A., Briggiler, A.M., Pini, N. and Levis, S. (2001) Clinical manifestations of New World hantaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 256, 117-34.
- Enria, D.A. and Pinheiro, F. (2000) Rodent-borne emerging viral zoonosis. Hemorrhagic fevers and hantavirus infections in South America. *Infect Dis Clin North Am* 14(1), 167-84, x.
- Escutenaire, S., Chalon, P., Heyman, P., Van der Auwera, G., van der Groen, G., Verhagen, R., Thomas, I., Karelle-Bui, L., Vaheri, A., Pastoret, P.P. and Plyusnin, A. (2001) Genetic characterization of Puumala hantavirus strains from Belgium: evidence for a distinct phylogenetic lineage. *Virus Res* 74(1-2), 1-15.
- Firth, C., Tokarz, R., Simith, D.B., Nunes, M.R., Bhat, M., Rosa, E.S., Medeiros, D.B., Palacios, G., Vasconcelos, P.F. and Lipkin, W.I. (2012) Diversity and distribution of hantaviruses in South America. *J Virol* 86(24), 13756-66.
- Flick, K., Hooper, J.W., Schmaljohn, C.S., Pettersson, R.F., Feldmann, H. and Flick, R. (2003) Rescue of Hantaan virus minigenomes. *Virology* 306(2), 219-24.
- Fontana, J., López-Montero, N., Elliott, R.M., Fernández, J.J. and Risco, C. (2008) The unique architecture of Bunyamwera virus factories around the Golgi complex. *Cell Microbiol* 10(10), 2012-28.
- Fulhorst, C.F., Milazzo, M.L., Duno, G. and Salas, R.A. (2002) Experimental infection of the *Sigmodon alstoni* cotton rat with Cano Delgadito virus, a South American hantavirus. *Am J Trop Med Hyg* 67(1), 107-11.
- Garcin, D., Lezzi, M., Dobbs, M., Elliott, R.M., Schmaljohn, C., Kang, C.Y. and Kolakofsky, D. (1995) The 5' ends of Hantaan virus (*Bunyaviridae*) RNAs suggest a prime-and-realign mechanism for the initiation of RNA synthesis. *J Virol* 69(9), 5754-62.
- Gliwicz, J.T., R.E. (2002) Comparing life histories of shrews and rodents. *Acta Theriol. (Warsz.)* 47(1), 185-208.
- González, E.M.y.Martinez-Lanfranco, J.A. (2010) Mamíferos del Uruguay: Guía de campo e introducción a su estudio y conservación. Vida Silvestre-Museo Nacional de Historia Natural. , 462.

- Goodin, D.G., Paige, R., Owen, R.D., Ghimire, K., Koch, D.E., Chu, Y.K. and Jonsson, C.B. (2009) Microhabitat characteristics of *Akodon montensis*, a reservoir for hantavirus, and hantaviral seroprevalence in an Atlantic forest site in eastern Paraguay. *J Vector Ecol* 34(1), 104-13.
- Guindon, S., Dufayard, J.F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W. and Gascuel, O. (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 59(3), 307-21.
- Guisan, A., Tingley, R., Baumgartner, J.B., Naujokaitis-Lewis, I., Sutcliffe, P.R., Tulloch, A.I., Regan, T.J., Brotons, L., McDonald-Madden, E., Mantyka-Pringle, C., Martin, T.G., Rhodes, J.R., Maggini, R., Setterfield, S.A., Elith, J., Schwartz, M.W., Wintle, B.A., Broennimann, O., Austin, M., Ferrier, S., Kearney, M.R., Possingham, H.P. and Buckley, Y.M. (2013) Predicting species distributions for conservation decisions. *Ecol Lett* 16(12), 1424-35.
- Guo, W.P., Lin, X.D., Wang, W., Tian, J.H., Cong, M.L., Zhang, H.L., Wang, M.R., Zhou, R.H., Wang, J.B., Li, M.H., Xu, J., Holmes, E.C. and Zhang, Y.Z. (2013) Phylogeny and origins of hantaviruses harbored by bats, insectivores, and rodents. *PLoS Pathog* 9(2), e1003159.
- Hanson, J.D., Utrera, A. and Fulhorst, C.F. (2011) The delicate pygmy rice rat (*Oligoryzomys delicatus*) is the principal host of Maporal virus (family *Bunyaviridae*, genus *Hantavirus*). *Vector Borne Zoonotic Dis* 11(6), 691-6.
- Hardestam, J., Karlsson, M., Falk, K.I., Olsson, G., Klingstrom, J. and Lundkvist, A. (2008) Puumala hantavirus excretion kinetics in bank voles (*Myodes glareolus*). *Emerg Infect Dis* 14(8), 1209-15.
- Hepojoki, J., Strandin, T., Lankinen, H. and Vaheri, A. (2012) Hantavirus structure--molecular interactions behind the scene. *J Gen Virol* 93(Pt 8), 1631-44.
- Hepojoki, J., Strandin, T., Vaheri, A. and Lankinen, H. (2010) Interactions and oligomerization of hantavirus glycoproteins. *J Virol* 84(1), 227-42.
- Hjelle, B., Anderson, B., Torrez-Martinez, N., Song, W., Gannon, W.L. and Yates, T.L. (1995) Prevalence and geographic genetic variation of hantaviruses of New World harvest mice (*Reithrodontomys*): identification of a divergent genotype from a Costa Rican *Reithrodontomys mexicanus*. *Virology* 207(2), 452-9.
- Hjelle, B. and Torres-Perez, F. (2010) Hantaviruses in the americas and their role as emerging pathogens. *Viruses* 2(12), 2559-86.
- Hoffmann, F., Lessa, E. and Smith, M. (2002) Systematics of *Oxymycterus* with description of a new species from Uruguay. *Journal of Mammology* 83, 408-420.
- Horling, J., Chizhikov, V., Lundkvist, A., Jonsson, M., Ivanov, L., Dekonenko, A., Niklasson, B., Dzagurova, T., Peters, C.J., Tkachenko, E. and Nichol, S. (1996) Khabarovsk virus: a phylogenetically and serologically distinct hantavirus isolated from *Microtus fortis* trapped in far-east Russia. *J Gen Virol* 77 (Pt 4), 687-94.
- Hugot, J.P., Plyusnina, A., Herbreteau, V., Nemirov, K., Laakkonen, J., Lundkvist, A., Supputamongkol, Y., Henttonen, H. and Plyusnin, A. (2006) Genetic analysis of Thailand hantavirus in *Bandicota indica* trapped in Thailand. *Virol J* 3, 72.
- Huiskonen, J.T., Hepojoki, J., Laurinmaki, P., Vaheri, A., Lankinen, H., Butcher, S.J. and Grunewald, K. (2010) Electron cryotomography of Tula hantavirus suggests a unique assembly paradigm for enveloped viruses. *J Virol* 84(10), 4889-97.
- Hussein, I.T., Haseeb, A., Haque, A. and Mir, M.A. (2011) Recent advances in hantavirus molecular biology and disease. *Adv Appl Microbiol* 74, 35-75.
- Hutchinson, K.L., Rollin, P.E. and Peters, C.J. (1998) Pathogenesis of a North American hantavirus, Black Creek Canal virus, in experimentally infected *Sigmodon hispidus*. *Am J Trop Med Hyg* 59(1), 58-65.
- Hutterer, R. (2005) Mammal Species of the World. In *Mammal Species of the World*. Wilson, D.E., Reeder, D.M., Eds.; Johns Hopkins University Press: Baltimore, MD, USA 1, 220–311.

- Jaaskelainen, K.M., Plyusnina, A., Lundkvist, A., Vaheri, A. and Plyusnin, A. (2008) Tula hantavirus isolate with the full-length ORF for nonstructural protein NSs survives for more consequent passages in interferon-competent cells than the isolate having truncated NSs ORF. *Virology* 375, 3.
- Jackson, A.P. and Charleston, M.A. (2004) A cophylogenetic perspective of RNA-virus evolution. *Mol Biol Evol* 21(1), 45-57.
- Jaynes, E.T. (1957) Information theory and statistical mechanics. *Physical. Rev.* 106, 620–630.
- Jiang, J.F., Zhang, W.Y., Wu, X.M., Zhang, P.H. and Cao, W.C. (2007) Soochong virus and Amur virus might be the same entities of hantavirus. *J Med Virol* 79(11), 1792-5.
- Jin, H. and Elliott, R.M. (1993) Characterization of Bunyamwera virus S RNA that is transcribed and replicated by the L protein expressed from recombinant vaccinia virus. *J Virol* 67(3), 1396-404.
- Jin, M., Park, J., Lee, S., Park, B., Shin, J., Song, K.J., Ahn, T.I., Hwang, S.Y., Ahn, B.Y. and Ahn, K. (2002) Hantaan virus enters cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *Virology* 294(1), 60-9.
- Johnson, A.M., Bowen, M.D., Ksiazek, T.G., Williams, R.J., Bryan, R.T., Mills, J.N., Peters, C.J. and Nichol, S.T. (1997) Laguna Negra virus associated with HPS in western Paraguay and Bolivia. *Virology* 238(1), 115-27.
- Johnson, A.M., de Souza, L.T., Ferreira, I.B., Pereira, L.E., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Peters, C.J. and Nichol, S.T. (1999) Genetic investigation of novel hantaviruses causing fatal HPS in Brazil. *J Med Virol* 59(4), 527-35.
- Jonsson, C.B., Figueiredo, L.T. and Vapalahti, O. (2010) A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clin Microbiol Rev* 23(2), 412-41.
- Kallio, E.R., Begon, M., Henttonen, H., Koskela, E., Mappes, T., Vaheri, A. and Vapalahti, O. (2010) Hantavirus infections in fluctuating host populations: the role of maternal antibodies. *Proc Biol Sci* 277(1701), 3783-91.
- Kallio, E.R., Voutilainen, L., Vapalahti, O., Vaheri, A., Henttonen, H., Koskela, E. and Mappes, T. (2007) Endemic hantavirus infection impairs the winter survival of its rodent host. *Ecology* 88(8), 1911-6.
- Kang, H.J., Arai, S., Hope, A.G., Cook, J.A. and Yanagihara, R. (2010) Novel hantavirus in the flat-skulled shrew (*Sorex roboratus*). *Vector Borne Zoonotic Dis* 10(6), 593-7.
- Kang, H.J., Bennett, S.N., Dizney, L., Sumibcay, L., Arai, S., Ruedas, L.A., Song, J.W. and Yanagihara, R. (2009) Host switch during evolution of a genetically distinct hantavirus in the American shrew mole (*Neurotrichus gibbsii*). *Virology* 388(1), 8-14.
- Kang, H.J., Bennett, S.N., Hope, A.G., Cook, J.A. and Yanagihara, R. (2011) Shared ancestry between a newfound mole-borne hantavirus and hantaviruses harbored by cricetid rodents. *J Virol* 85(15), 7496-503.
- Kariwa, H., Fujiki, M., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I. and Hashimoto, N. (1998) Urine-associated horizontal transmission of Seoul virus among rats. *Arch Virol* 143(1), 15-24.
- Kariwa, H., Yoshida, H., Sanchez-Hernandez, C., Romero-Almaraz Mde, L., Almazan-Catalan, J.A., Ramos, C., Miyashita, D., Seto, T., Takano, A., Totani, M., Murata, R., Saasa, N., Ishizuka, M., Sanada, T., Yoshii, K., Yoshimatsu, K., Arikawa, J. and Takashima, I. (2011) Genetic diversity of hantaviruses in Mexico: identification of three novel hantaviruses from Neotominae rodents. *Virus Res* 163(2), 486-94.
- Kariwa, H., Yoshimatsu, K., Sawabe, J., Yokota, E., Arikawa, J., Takashima, I., Fukushima, H., Lundkvist, A., Shubin, F.N., Isachkova, L.M., Slonova, R.A., Leonova, G.N. and Hashimoto, N. (1999) Genetic diversities of hantaviruses among rodents in Hokkaido, Japan and Far East Russia. *Virus Res* 59(2), 219-28.
- Kaukinen, P., Koistinen, V., Vapalahti, O., Vaheri, A. and Plyusnin, A. (2001) Interaction between molecules of hantavirus nucleocapsid protein. *J Gen Virol* 82(Pt 8), 1845-53.

- Kaukinen, P., Vaheri, A. and Plyusnin, A. (2005) Hantavirus nucleocapsid protein: a multifunctional molecule with both housekeeping and ambassadorial duties. *Arch Virol* 150(9), 1693-713.
- Keane, T.M., Creevey, C.J., Pentony, M.M., Naughton, T.J. and McLnerney, J.O. (2006) Assessment of methods for amino acid matrix selection and their use on empirical data shows that *ad hoc* assumptions for choice of matrix are not justified. *BMC Evol Biol* 6, 29.
- Klein, S.L. and Calisher, C.H. (2007) Emergence and persistence of hantaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 315, 217-52.
- Klempa, B., Fichet-Calvet, E., Lecompte, E., Auste, B., Aniskin, V., Meisel, H., Barriere, P., Koivogui, L., ter Meulen, J. and Kruger, D.H. (2007) Novel hantavirus sequences in Shrew, Guinea. *Emerg Infect Dis* 13(3), 520-2.
- Korva, M., Duh, D., Puterle, A., Trilar, T. and Zupanc, T.A. (2009) First molecular evidence of Tula hantavirus in *Microtus voles* in Slovenia. *Virus Res* 144(1-2), 318-22.
- Kuenzi, A.J., Douglass, R.J., White, D., Jr., Bond, C.W. and Mills, J.N. (2001) Antibody to Sin Nombre virus in rodents associated with peridomestic habitats in west central Montana. *Am J Trop Med Hyg* 64(3-4), 137-46.
- Langlois JP, F.L., Merriam G, Artsob H. (2001) Landscape structure influences continental distribution of hantavirus in deer mice. *Ecology* 16, 255-266.
- Larson, S.R., DeGroot, J.P., Bartholomay, L.C. and Sugumaran, R. (2010) Ecological niche modeling of potential West Nile virus vector mosquito species in Iowa. *J Insect Sci* 10, 110.
- LeDuc, J.W., Smith, G.A., Childs, J.E., Pinheiro, F.P., Maiztegui, J.I., Niklasson, B., Antoniadis, A., Robinson, D.M., Khin, M., Shortridge, K.F. and et al. (1986) Global survey of antibody to Hantaan-related viruses among peridomestic rodents. *Bull World Health Organ* 64(1), 139-44.
- Lee, H.W., Baek, L.J. and Johnson, K.M. (1982) Isolation of Hantaan virus, the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever, from wild urban rats. *J Infect Dis* 146(5), 638-44.
- Lee, H.W., Lee, P.W., Baek, L.J., Song, C.K. and Seong, I.W. (1981) Intraspecific transmission of Hantaan virus, etiologic agent of Korean hemorrhagic fever, in the rodent *Apodemus agrarius*. *Am J Trop Med Hyg* 30(5), 1106-12.
- Lee, P.W., Amyx, H.L., Yanagihara, R., Gajdusek, D.C., Goldgaber, D. and Gibbs, C.J., Jr. (1985) Partial characterization of Prospect Hill virus isolated from meadow voles in the United States. *J Infect Dis* 152(4), 826-9.
- Levis, S., Garcia, J., Pini, N., Calderon, G., Ramirez, J., Bravo, D., St Jeor, S., Ripoll, C., Bego, M., Lozano, E., Barquez, R., Ksiazek, T.G. and Enria, D. (2004) Hantavirus pulmonary syndrome in northwestern Argentina: circulation of Laguna Negra virus associated with *Calomys callosus*. *Am J Trop Med Hyg* 71(5), 658-63.
- Levis, S., Morzunov, S.P., Rowe, J.E., Enria, D., Pini, N., Calderon, G., Sabattini, M. and St Jeor, S.C. (1998) Genetic diversity and epidemiology of hantaviruses in Argentina. *J Infect Dis* 177(3), 529-38.
- Londono, A.F., Diaz, F.J., Agudelo-Florez, P., Levis, S. and Rodas, J.D. (2011) Genetic evidence of hantavirus infections in wild rodents from northwestern Colombia. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11(6), 701-8.
- Lopez, N., Padula, P., Rossi, C., Miguel, S., Edelstein, A., Ramirez, E. and Franze-Fernandez, M.T. (1997) Genetic characterization and phylogeny of Andes virus and variants from Argentina and Chile. *Virus Res* 50(1), 77-84.
- Lozach, P.Y., Mancini, R., Bitto, D., Meier, R., Oestereich, L., Overby, A.K., Pettersson, R.F. and Helenius, A. (2010) Entry of bunyaviruses into mammalian cells. *Cell Host Microbe* 7(6), 488-99.
- Luis, A.D., Douglass, R.J., Hudson, P.J., Mills, J.N. and Bjornstad, O.N. (2012) Sin Nombre hantavirus decreases survival of male deer mice. *Oecologia* 169(2), 431-9.

- Luis, A.D., Hayman, D.T., O'Shea, T.J., Cryan, P.M., Gilbert, A.T., Pulliam, J.R., Mills, J.N., Timonin, M.E., Willis, C.K., Cunningham, A.A., Fooks, A.R., Rupprecht, C.E., Wood, J.L. and Webb, C.T. (2013) A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? *Proc Biol Sci* 280(1756), 20122753.
- Lyubsky, S., Gavrilovskaya, I., Luft, B. and Mackow, E. (1996) Histopathology of *Peromyscus leucopus* naturally infected with pathogenic NY-1 hantaviruses: pathologic markers of HPS viral infection in mice. *Lab Invest* 74(3), 627-33.
- Mackelprang, R., Dearing, M.D. and St Jeor, S. C. (2001) High prevalence of Sin Nombre virus in rodent populations, central Utah: a consequence of human disturbance? *Emerg Infect Dis* 7(3), 480-2.
- Mackow, E.R. and Gavrilovskaya, I.N. (2001) Cellular receptors and hantavirus pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 256, 91-115.
- Mackow, E.R. and Gavrilovskaya, I.N. (2009) Hantavirus regulation of endothelial cell functions. *Thromb Haemost* 102(6), 1030-41.
- Marklewitz, M., Handrick, S., Grasse, W., Kurth, A., Lukashev, A., Drosten, C., Ellerbrok, H., Leendertz, F.H., Pauli, G. and Junglen, S. (2011) Gouleako virus isolated from West African mosquitoes constitutes a proposed novel genus in the family Bunyaviridae. *J Virol* 85(17), 9227-34.
- Marklewitz, M., Zirkel, F., Rwego, I.B., Heidemann, H., Trippner, P., Kurth, A., Kallies, R., Briese, T., Lipkin, W.I., Drosten, C., Gillespie, T.R. and Junglen, S. (2013) Discovery of a unique novel clade of mosquito-associated bunyaviruses. *J Virol* 87(23), 12850-65.
- Martinez, V.P., Bellomo, C., San Juan, J., Pinna, D., Forlenza, R., Elder, M. and Padula, P.J. (2005) Person-to-person transmission of Andes virus. *Emerg Infect Dis* 11(12), 1848-53.
- Mattar, S., Garzon, D., Tadeu, L., Faccini-Martinez, A.A. and Mills, J.N. (2014) Serological diagnosis of hantavirus pulmonary syndrome in a febrile patient in Colombia. *Int J Infect Dis* 25, 201-3.
- Mattar, S. and Parra, M. (2004) Serologic evidence of hantavirus infection in humans, Colombia. *Emerg Infect Dis* 10(12), 2263-4.
- Meredith, R.W., Janecka, J.E., Gatesy, J., Ryder, O.A., Fisher, C.A., Teeling, E.C., Goodbla, A., Eizirik, E., Simao, T.L., Stadler, T., Rabosky, D.L., Honeycutt, R.L., Flynn, J.J., Ingram, C.M., Steiner, C., Williams, T.L., Robinson, T.J., Burk-Herrick, A., Westerman, M., Ayoub, N.A., Springer, M.S. and Murphy, W.J. (2012) Impacts of the Cretaceous Terrestrial Revolution and KPg extinction on mammal diversification. *Science* 334(6055), 521-4.
- Meyer, B.J. and Schmaljohn, C.S. (2000) Persistent hantavirus infections: characteristics and mechanisms. *Trends Microbiol* 8(2), 61-7.
- Milazzo, M.L., Cajimat, M.N., Hanson, J.D., Bradley, R.D., Quintana, M., Sherman, C., Velásquez, R.T. and Fulhorst, C.F. (2006) Catacamas virus, a hantaviral species naturally associated with *Oryzomys couesi* (Coues' oryzomys) in Honduras. *Am J Trop Med Hyg* 75(5), 1003-10.
- Milazzo, M.L., Duno, G., Utrera, A., Richter, M.H., Duno, F., de Manzione, N. and Fulhorst, C.F. (2010) Natural host relationships of hantaviruses native to western Venezuela. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10(6), 605-11.
- Mills, J.N. and Childs, J.E. (1998) Ecologic studies of rodent reservoirs: their relevance for human health. *Emerg Infect Dis* 4(4), 529-37.
- Mills, J.N., Ksiazek, T.G., Ellis, B.A., Rollin, P.E., Nichol, S.T., Yates, T.L., Gannon, W.L., Levy, C.E., Engelthaler, D.M., Davis, T., Tanda, D.T., Frampton, J.W., Nichols, C.R., Peters, C.J. and Childs, J.E. (1997) Patterns of association with host and habitat: antibody reactive with Sin Nombre virus in small mammals in the major biotic communities of the southwestern United States. *Am J Trop Med Hyg* 56(3), 273-84.

- Mills, J.N., Schmidt, K., Ellis, B.A., Calderón, G., Enria, D.A. and Ksiazek, T.G. (2007) A longitudinal study of hantavirus infection in three sympatric reservoir species in agroecosystems on the Argentine Pampa. *Vector Borne Zoonotic Dis* 7(2), 229-40.
- Mir, M.A., Duran, W.A., Hjelle, B.L., Ye, C. and Panganiban, A.T. (2008) Storage of cellular 5' mRNA caps in P bodies for viral cap-snatching. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(49), 19294-9.
- Monroe, M.C., Morzunov, S.P., Johnson, A.M., Bowen, M.D., Artsob, H., Yates, T., Peters, C.J., Rollin, P.E., Ksiazek, T.G. and Nichol, S.T. (1999) Genetic diversity and distribution of *Peromyscus*-borne hantaviruses in North America. *Emerg Infect Dis* 5(1), 75-86.
- Montoya-Ruiz, C., Díaz, F.J. and Rodas, J.D. (2014) Recent evidence of hantavirus circulation in the American tropic. *Viruses* 6(3), 1274-93.
- Mughini-Gras, L., Mulatti, P., Severini, F., Boccolini, D., Romi, R., Bongiorno, G., Khoury, C., Bianchi, R., Montarsi, F., Patregnani, T., Bonfanti, L., Rezza, G., Capelli, G. and Busani, L. (2013) Ecological niche modelling of potential West Nile virus vector mosquito species and their geographical association with equine epizootics in Italy. *Ecohealth* 11(1), 120-32.
- Musser, G.C., M.D., . (2005) Superfamily Muroidea. In *Mammal Species of the world: A taxonomic and Geographic Reference*. University Press, 849-1513.
- Mweya, C.N., Kimera, S.I., Kija, J.B. and Mboera, L.E. (2013) Predicting distribution of *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* complex, potential vectors of Rift Valley fever virus in relation to disease epidemics in East Africa. *Infect Ecol Epidemiol* 3. 890-1555
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., da Fonseca, G.A. and Kent, J. (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403(6772), 853-8.
- Natarajan, C., Hoffmann, F.G., Lanier, H.C., Wolf, C.J., Cheviron, Z.A., Spangler, M.L., Weber, R.E., Fago, A. and Storz, J.F. (2015) Intraspecific polymorphism, interspecific divergence, and the origins of function-altering mutations in deer mouse hemoglobin. *Mol Biol Evol* 32(4), 978-97.
- Nemirov, K., Henttonen, H., Vaheri, A. and Plyusnin, A. (2002) Phylogenetic evidence for host switching in the evolution of hantaviruses carried by *Apodemus mice*. *Virus Res* 90(1-2), 207-15.
- Netski, D., Thrall, B.H. and St Jeor, S.C. (1999) Sin Nombre virus pathogenesis in *Peromyscus maniculatus*. *J Virol* 73(1), 585-91.
- Nichol, S.T., Spiropoulou, C.F., Morzunov, S., Rollin, P.E., Ksiazek, T.G., Feldmann, H., Sanchez, A., Childs, J., Zaki, S. and Peters, C.J. (1993) Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science* 262(5135), 914-7.
- Niklasson, B. and LeDuc, J.W. (1987) Epidemiology of nephropathia epidemica in Sweden. *J Infect Dis* 155(2), 269-76.
- Nuzum, E.O., Rossi, C.A., Stephenson, E.H. and LeDuc, J.W. (1988) Aerosol transmission of Hantaan and related viruses to laboratory rats. *Am J Trop Med Hyg* 38(3), 636-40.
- Okumura, M., Yoshimatsu, K., Kumperasart, S., Nakamura, I., Ogino, M., Taruishi, M., Sungdee, A., Pattamadilok, S., Ibrahim, I.N., Erlina, S., Agui, T., Yanagihara, R. and Arikawa, J. (2007) Development of serological assays for Thottapalayam virus, an insectivore-borne Hantavirus. *Clin Vaccine Immunol* 14(2), 173-81.
- Padula, P., Figueroa, R., Navarrete, M., Pizarro, E., Cadiz, R., Bellomo, C., Jofre, C., Zaror, L., Rodríguez, E. and Murua, R. (2004) Transmission study of Andes hantavirus infection in wild sigmodontine rodents. *J Virol* 78(21), 11972-9.
- Padula, P.J., Colavecchia, S.B., Martinez, V.P., González Della Valle, M.O., Edelstein, A., Miguel, S.D., Russi, J., Riquelme, J.M., Colucci, N., Almiron, M. and Rabinovich, R.D. (2000) Genetic diversity, distribution, and serological features of hantavirus infection in five countries in South America. *J Clin Microbiol* 38(8), 3029-35.
- Pamilo, P. and Nei, M. (1988) Relationships between gene trees and species trees. *Mol Biol Evol* 5(5), 568-83.

- Parrington, M.A. and Kang, C.Y. (1990) Nucleotide sequence analysis of the S genomic segment of Prospect Hill virus: comparison with the prototype Hantavirus. *Virology* 175(1), 167-75.
- Pearce-Duvet, J.M., St Jeor, S.C., Boone, J.D. and Dearing, M.D. (2006) Changes in sin nombre virus antibody prevalence in deer mice across seasons: the interaction between habitat, sex, and infection in deer mice. *J Wildl Dis* 42(4), 819-24.
- Pearson, R.G., Dawson, T.P., Lin, C., (2004) Modelling species distributions in Britain: a hierarchical integration of climate and land-cover data. *Ecography* 27, 285–298.
- Peters, C.J., Simpson, G.L. and Levy, H. (1999) Spectrum of hantavirus infection: hemorrhagic fever with renal syndrome and hantavirus pulmonary syndrome. *Annu Rev Med* 50, 531-45.
- Phillips S., S.R. (2005) Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling*. 190, 231–259.
- Pinna, D.M., Martinez, V.P., Bellomo, C.M., Lopez, C. and Padula, P. (2004) [New epidemiologic and molecular evidence of person to person transmission of hantavirus Andes Sout]. *Medicina (B Aires)* 64(1), 43-6.
- Plyusnin, A. and Morzunov, S.P. (2001) Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts. *Curr Top Microbiol Immunol* 256, 47-75.
- Plyusnin, A. and Sironen, T. (2014) Evolution of hantaviruses: co-speciation with reservoir hosts for more than 100 MYR. *Virus Res* 187, 22-6.
- Plyusnin, A., Vapalahti, O., Lankinen, H., Lehvaslaiho, H., Apekina, N., Myasnikov, Y., Kallio-Kokko, H., Henttonen, H., Lundkvist, A., Brummer-Korvenkontio, M. and et al. (1994a) Tula virus: a newly detected hantavirus carried by European common voles. *J Virol* 68(12), 7833-9.
- Plyusnin, A., Vapalahti, O., Ulfves, K., Lehvaslaiho, H., Apekina, N., Gavrilovskaya, I., Blinov, V. and Vaheri, A. (1994b) Sequences of wild Puumala virus genes show a correlation of genetic variation with geographic origin of the strains. *J Gen Virol* 75 (Pt 2), 405-9.
- Plyusnin, A., Vapalahti, O. and Vaheri, A. (1996) Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. *J Gen Virol* 77 (Pt 11), 2677-87.
- Prins, M. and Goldbach, R. (1998) The emerging problem of tospovirus infection and nonconventional methods of control. *Trends Microbiol* 6(1), 31-5.
- Raboni, S.M., Delfraro, A., de Borba, L., Teixeira, B.R., Stella, V., de Araujo, M.R., Carstensen, S., Rubio, G., Maron, A., Lemos, E.R., D'Andrea, P.S. and Duarte dos Santos, C.N. (2012) Hantavirus infection prevalence in wild rodents and human anti-hantavirus serological profiles from different geographic areas of South Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 87(2), 371-8.
- Raboni, S.M., Hoffmann, F.G., Oliveira, R.C., Teixeira, B.R., Bonvicino, C.R., Stella, V., Carstensen, S., Bordignon, J., D'Andrea, P.S., Lemos, E.R. and Duarte Dos Santos, C.N. (2009) Phylogenetic characterization of hantaviruses from wild rodents and hantavirus pulmonary syndrome cases in the state of Parana (southern Brazil). *J Gen Virol* 90, 2166-71.
- Raboni, S.M., Levis, S., Rosa, E.S., Bisordi, I., Delfraro, A., Lemos, E., Correia, D.C. and Duarte Dos Santos, C.N. (2007) Hantavirus infection in Brazil: development and evaluation of an enzyme immunoassay and immunoblotting based on N recombinant protein. *Diagn Microbiol Infect Dis* 58(1), 89-97.
- Ramsden, C., Holmes, E.C. and Charleston, M.A. (2009) Hantavirus evolution in relation to its rodent and insectivore hosts: no evidence for codivergence. *Mol Biol Evol* 26(1), 143-53.
- Ravkov, E.V. and Compans, R.W. (2001) Hantavirus nucleocapsid protein is expressed as a membrane-associated protein in the perinuclear region. *J Virol* 75(4), 1808-15.

- Ravkov, E.V., Rollin, P.E., Ksiazek, T.G., Peters, C.J. and Nichol, S.T. (1995) Genetic and serologic analysis of Black Creek Canal virus and its association with human disease and *Sigmodon hispidus* infection. *Virology* 210(2), 482-9.
- Rawlings, J.A., Torrez-Martinez, N., Neill, S.U., Moore, G.M., Hicks, B.N., Pichuantes, S., Nguyen, A., Bharadwaj, M. and Hjelle, B. (1996) Cocirculation of multiple hantaviruses in Texas, with characterization of the small (S) genome of a previously undescribed virus of cotton rats (*Sigmodon hispidus*). *Am J Trop Med Hyg* 55(6), 672-9.
- Rego, N., Delfraro, A., Tome, L., D'Elia, G., Clara, M., Achaval, F., Russi, J.C. and Arbiza Rodonz, J.R. (2008) *Oligoryzomys flavescens* (Sigmodontinae: Oryzomyini): Distribución geográfica, estructura y hantavirus asociados. . XXII Jornadas Argentinas de Mastozoología.
- Rosa, E.S., Mills, J.N., Padula, P.J., Elkhoury, M.R., Ksiazek, T.G., Mendes, W.S., Santos, E.D., Araujo, G.C., Martinez, V.P., Rosa, J.F., Edelstein, A. and Vasconcelos, P.F. (2005) Newly recognized hantaviruses associated with hantavirus pulmonary syndrome in northern Brazil: partial genetic characterization of viruses and serologic implication of likely reservoirs. *Vector Borne Zoonotic Dis* 5(1), 11-9.
- Rubio, A.V., Avila-Flores, R. and Suzan, G. (2014) Responses of small mammals to habitat fragmentation: epidemiological considerations for rodent-borne hantaviruses in the Americas. *Ecohealth* 11(4), 526-33.
- Santana, C., Campos, G.M., Figueiredo, L.T. and Figueiredo, J.F. (2006) Clinical and laboratory findings related to a favorable evolution of hantavirus pulmonary syndrome. *Rev Soc Bras Med Trop* 39(3), 237-40.
- Sauvage, F., Penalba, C., Vuillaume, P., Boue, F., Coudrier, D., Pontier, D. and Artois, M. (2002) Puumala hantavirus infection in humans and in the reservoir host, Ardennes region, France. *Emerg Infect Dis* 8(12), 1509-11.
- Scott, G.R., Elogio, T.S., Lui, M.A., Storz, J.F. and Cheviron, Z.A. (2015) Adaptive Modifications of Muscle Phenotype in High-Altitude Deer Mice Are Associated with Evolved Changes in Gene Regulation. *Mol Biol Evol* 32(8), 1962-76.
- Schmaljohn, C.S., Hasty, S.E., Dalrymple, J.M., LeDuc, J.W., Lee, H.W., von Bonsdorff, C.H., Brummer-Korvenkontio, M., Vaheri, A., Tsai, T.F., Regnery, H.L. (1985) Antigenic and genetic properties of viruses linked to hemorrhagic fever with renal syndrome. *Science* 227(4690), 1041-4.
- Schountz, T., Quackenbush, S., Rovnak, J., Haddock, E., Black, W.C.t., Feldmann, H. and Prescott, J. (2014) Differential lymphocyte and antibody responses in deer mice infected with Sin Nombre hantavirus or Andes hantavirus. *J Virol* 88(15), 8319-31.
- Seijo, A., Pini, N., Levis, S., Coto, H., Deodato, B., Cernigoi, B., de Bassadoni, D. and Enria, D. (2003) Study of Hantavirus seoul in a human and rodent population from a marginal area in Buenos Aires City. *Medicina (B Aires)* 63(3), 193-6.
- Sharp, P.M. and Simmonds, P. (2011) Evaluating the evidence for virus/host co-evolution. *Curr Opin Virol* 1(5), 436-41.
- Simmons, N.B. (2005) Evolution. An Eocene big bang for bats. *Science* 307(5709), 527-8.
- Sironen, T., Vaheri, A. and Plyusnin, A. (2001) Molecular evolution of Puumala hantavirus. *J Virol* 75(23), 11803-10.
- Smadel, J.E. (1953) Epidemic hemorrhagic fever. *Am J Public Health Nations Health* 43(10), 1327-30.
- Smithburn, K.C., Haddow, A.J. and Mahaffy, A.F. (1946) A neurotropic virus isolated from *Aedes* mosquitoes caught in the Semliki forest. *Am J Trop Med Hyg* 26, 189-208.
- Song, J.W., Gu, S.H., Bennett, S.N., Arai, S., Puorger, M., Hilbe, M. and Yanagihara, R. (2007) Seewis virus, a genetically distinct hantavirus in the Eurasian common shrew (*Sorex araneus*). *Virol J* 4, 114.
- Song, J.W., Kang, H.J., Gu, S.H., Moon, S.S., Bennett, S.N., Song, K.J., Baek, L.J., Kim, H.C., O'Guinn, M.L., Chong, S.T., Klein, T.A. and Yanagihara, R. (2009) Characterization of

- Imjin virus, a newly isolated hantavirus from the Ussuri white-toothed shrew (*Crociodura lasiura*). *J Virol* 83(12), 6184-91.
- Song, W., Torrez-Martinez, N., Irwin, W., Harrison, F.J., Davis, R., Ascher, M., Jay, M. and Hjelle, B. (1995) Isla Vista virus: a genetically novel hantavirus of the California vole *Microtus californicus*. *J Gen Virol* 76 (Pt 12), 3195-9.
- Spengler, J.R., Haddock, E., Gardner, D., Hjelle, B., Feldmann, H. and Prescott, J. (2013) Experimental Andes virus infection in deer mice: characteristics of infection and clearance in a heterologous rodent host. *PLoS One* 8(1), e55310.
- Steppan, S., Adkins, R. and Anderson, J. (2004) Phylogeny and divergence-date estimates of rapid radiations in muroid rodents based on multiple nuclear genes. *Syst Biol* 53(4), 533-53.
- Suarez, O.V., Cueto, G.R., Cavia, R., Gomez Villafane, I.E., Bilenca, D.N., Edelstein, A., Martinez, P., Miguel, S., Bellomo, C., Hodara, K., Padula, P.J. and Busch, M. (2003) Prevalence of infection with hantavirus in rodent populations of central Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98(6), 727-32.
- Sumibcay, L., Kadjo, B., Gu, S.H., Kang, H.J., Lim, B.K., Cook, J.A., Song, J.W. and Yanagihara, R. (2012) Divergent lineage of a novel hantavirus in the banana pipistrelle (*Neoromicia nanus*) in Cote d'Ivoire. *Virol J* 9, 34.
- Suzan, G., Marce, E., Giermakowski, J.T., Armien, B., Pascale, J., Mills, J., Ceballos, G., Gómez, A., Aguirre, A.A., Salazar-Bravo, J., Armien, A., Parmenter, R. and Yates, T. (2008) The effect of habitat fragmentation and species diversity loss on hantavirus prevalence in Panama. *Ann N Y Acad Sci* 1149, 80-3.
- Suzan, G., Marce, E., Giermakowski, J.T., Mills, J.N., Ceballos, G., Ostfeld, R.S., Armien, B., Pascale, J.M. and Yates, T.L. (2009) Experimental evidence for reduced rodent diversity causing increased hantavirus prevalence. *PLoS One* 4(5), e5461.
- Suzuki, A., Bisordi, I., Levis, S., Garcia, J., Pereira, L.E., Souza, R.P., Sugahara, T.K., Pini, N., Enria, D. and Souza, L.T. (2004) Identifying rodent hantavirus reservoirs, Brazil. *Emerg Infect Dis* 10(12), 2127-34.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* 30(12), 2725-9.
- Teeling, E.C., Springer, M.S., Madsen, O., Bates, P., O'Brien S, J. and Murphy, W.J. (2005) A molecular phylogeny for bats illuminates biogeography and the fossil record. *Science* 307(5709), 580-4.
- Teixeira, B.R., Loureiro, N., Strecht, L., Gentile, R., Oliveira, R.C., Guterres, A., Fernandes, J., Mattos, L.H., Raboni, S.M., Rubio, G., Bonvicino, C.R., dos Santos, C.N., Lemos, E.R. and D'Andrea, P.S. (2014) Population ecology of hantavirus rodent hosts in southern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 91(2), 249-57.
- Tersago, K., Schreurs, A., Linard, C., Verhagen, R., Van Dongen, S. and Leirs, H. (2008) Population, environmental, and community effects on local bank vole (*Myodes glareolus*) Puumala virus infection in an area with low human incidence. *Vector Borne Zoonotic Dis* 8(2), 235-44.
- Tersago, K., Verhagen, R. and Leirs, H. (2011) Temporal variation in individual factors associated with hantavirus infection in bank voles during an epizootic: implications for Puumala virus transmission dynamics. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11(6), 715-21.
- Vadell, M.V., Bellomo, C., San Martin, A., Padula, P. and Gomez Villafane, I. (2011) Hantavirus ecology in rodent populations in three protected areas of Argentina. *Trop Med Int Health* 16(10), 1342-52.
- Vaheri, A., Strandin, T., Hepojoki, J., Sironen, T., Henttonen, H., Makela, S. and Mustonen, J. (2013) Uncovering the mysteries of hantavirus infections. *Nat Rev Microbiol* 11(8), 539-50.

- van Knippenberg, I., Frangkoudis, R. and Elliott, R.M. (2013) The transient nature of Bunyamwera orthobunyavirus NSs protein expression: effects of increased stability of NSs protein on virus replication. *PLoS One* 8(5), e64137.
- Vapalahti, O., Lundkvist, A., Fedorov, V., Conroy, C.J., Hirvonen, S., Plyusnina, A., Nemirov, K., Fredga, K., Cook, J.A., Niemimaa, J., Kaikusalo, A., Henttonen, H., Vaheri, A. and Plyusnin, A. (1999) Isolation and characterization of a hantavirus from *Lemmus sibiricus*: evidence for host switch during hantavirus evolution. *J Virol* 73(7), 5586-92.
- Vapalahti, O., Lundkvist, A. and Vaheri, A. (2001) Human immune response, host genetics, and severity of disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 256, 153-69.
- Vapalahti, O., Mustonen, J., Lundkvist, A., Henttonen, H., Plyusnin, A. and Vaheri, A. (2003) Hantavirus infections in Europe. *Lancet Infect Dis* 3(10), 653-61.
- Vasconcelos, M.I., Lima, V.P., Iversson, L.B., Rosa, M.D., da Rosa, A.P., da Rosa, E.S., Pereira, L.E., Nassar, E., Katz, G., Matida, L.H., Zaparoli, M.A., Ferreira, J.J. and Peters, C.J. (1997) Hantavirus pulmonary syndrome in the rural area of Juquitiba, Sao Paulo metropolitan area, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 39(4), 237-8.
- Vincent, M.J., Quiroz, E., Gracia, F., Sanchez, A.J., Ksiazek, T.G., Kitsutani, P.T., Ruedas, L.A., Tinnin, D.S., Caceres, L., Garcia, A., Rollin, P.E., Mills, J.N., Peters, C.J. and Nichol, S.T. (2000) Hantavirus pulmonary syndrome in Panama: identification of novel hantaviruses and their likely reservoirs. *Virology* 277(1), 14-9.
- Virtanen, J.O., Jaaskelainen, K.M., Djupsjobacka, J., Vaheri, A. and Plyusnin, A. (2010) Tula hantavirus NSs protein accumulates in the perinuclear area in infected and transfected cells. *Arch Virol* 155(1), 117-21.
- Weiss, S., Witkowski, P.T., Auste, B., Nowak, K., Weber, N., Fahr, J., Mombouli, J.V., Wolfe, N.D., Drexler, J.F., Drosten, C., Klempa, B., Leendertz, F.H. and Kruger, D.H. (2012) Hantavirus in bat, Sierra Leone. *Emerg Infect Dis* 18(1), 159-61.
- Weissenbacher, M.C., Cura, E., Segura, E.L., Hortal, M., Baek, L.J., Chu, Y.K. and Lee, H.W. (1996) Serological evidence of human Hantavirus infection in Argentina, Bolivia and Uruguay. *Medicina (B Aires)* 56(1), 17-22.
- Xiao, S.Y., Diglisic, G., Avsic-Zupanc, T. and LeDuc, J.W. (1993) Dobrava virus as a new Hantavirus: evidenced by comparative sequence analysis. *J Med Virol* 39(2), 152-5.
- Xiao, S.Y., Leduc, J.W., Chu, Y.K. and Schmaljohn, C.S. (1994) Phylogenetic analyses of virus isolates in the genus *Hantavirus*, family *Bunyaviridae*. *Virology* 198(1), 205-17.
- Yahnke, C.J., Meserve, P.L., Ksiazek, T.G. and Mills, J.N. (2001) Patterns of infection with Laguna Negra virus in wild populations of *Calomys laucha* in the central Paraguayan chaco. *Am J Trop Med Hyg* 65(6), 768-76.
- Yanagihara, R., Amyx, H.L. and Gajdusek, D.C. (1985) Experimental infection with Puumala virus, the etiologic agent of nephropathia epidemica, in bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *J Virol* 55(1), 34-8.
- Zeimes, C.B., Olsson, G.E., Ahlm, C. and Vanwambeke, S.O. (2012) Modelling zoonotic diseases in humans: comparison of methods for hantavirus in Sweden. *Int J Health Geogr* 11, 39.
- Zeller, H.G., Karabatsos, N., Calisher, C.H., Digoutte, J.P., Cropp, C.B., Murphy, F.A. and Shope, R.E. (1989) Electron microscopic and antigenic studies of uncharacterized viruses. III. Evidence suggesting the placement of viruses in the family Reoviridae. *Arch Virol* 109(3-4), 253-61.

Anexo 1.

Lista con los 55 registros de presencia para la especie *O. flavescens*. En rojo se marca los ratones seropositivos para hantavirus.

Latitud	Longitud	Localidad
-34,9073194	-55,0422417	Punta Ballena
-34,5333333	-56,6031566	Punta Valdez
-34,3333333	-55,6529626	Piedritas
-34,6333333	-56,3166667	Cerrillos
-34,7333333	-56,2666667	Melilla
-34,5833333	-56,1333333	Sauce
-34,3619444	-53,86955	Laguna de Castillos
-34,3637167	-53,8692806	Laguna de Castillos
-33,9736083	-53,5312	Santa teresa
-33,8914444	-53,5141611	La coronilla
-32,3355139	-56,4257972	Rimcón del Bonete
-32,8288889	-53,8338556	Rincón Ramirez
-30,5809722	-57,6754722	Colonia Palma
-34,0375806	-53,5482722	Punta de Diablo
-34,0399889	-53,5511472	Punta de Diablo
-34,0399	-53,5510694	Punta de Diablo
-34,0399444	-53,5510278	Punta de Diablo
-34,0358778	-53,5520278	Punta de Diablo
-34,0359389	-53,5512861	Punta de Diablo
-34,3216861	-54,9881556	Villa Serrana
-34,3218278	-54,9879361	Villa Serrana
-30,9824806	-55,4334528	Cofusa
-30,9842889	-55,4474139	Cofusa
-34,3176389	-57,8765194	San Pedro
-34,3166583	-57,8778722	San Pedro
-34,3178056	-57,8763611	San Pedro
-34,3211194	-57,8678333	San Pedro
-34,3178639	-57,8757028	San Pedro
-34,3199028	-57,8780944	San Pedro
-34,3174639	-57,8756694	San Pedro
-34,3133389	-57,8783472	San Pedro
-34,3169083	-57,8760306	San Pedro
-34,3162833	-57,8769278	San Pedro
-34,087475	-53,7413806	Laguna Negra
-34,4668472	-54,9995444	Sierra Carape
-34,7757056	-55,5650917	Los Titanes
-34,7755361	-55,5652722	Los Titanes
-34,7270472	-56,1922583	Las Piedras
-34,7275306	-56,1896611	Las Piedras
-34,7271444	-56,1865417	Las Piedras
-32,2131111	-57,9763611	Constancia
-32,220175	-57,9403222	Constancia
-34,9166667	-54,8516516	Maldonado
-34,9061666	-55,0333333	Punta Ballena
-34,5833333	-56,7032466	Punta Valdez
-34,6333333	-56,3166667	Los Cerrillos
-34,7333333	-56,2666667	Melilla
-34,5833333	-56,1333333	Los Cerillos
-33,9166667	-53,5166667	La Coronilla
-32,750265	-56,2551616	Rincon del bonete
-32,150164	-54,55243	Cerro Largo
-32,0166667	-54,5666667	Cerro Largo
-30,9833333	-55,45535	Cofusa
-31,0501646	-55,755	Cofusa
-30,5333333	-57,8833333	Bella Union

Anexo 2. Distancia p calculada a nivel de nucleótidos (tabla superior) y aminoácidos (Tabla inferior) con sus respectivos desvíos estándar entre cada uno de los grupos analizados. Corresponde a un fragmento del segmento S de 450 pb.

Hantavirus		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Lechiguanas/ Andes Central Plata (1)		0.024	0.029	0.042	0.041	0.046	0.053	0.048	0.052	0.050	0.058	0.056	0.048	0.052	0.055	0.058	0.057	0.072	0.056	0.064	0.054	0.062	0.065	0.054	0.057	0.055	0.059	0.061	0.062	0.056	
Bermejo (2)	0.110		0.018	0.036	0.045	0.042	0.054	0.042	0.046	0.046	0.052	0.056	0.049	0.050	0.053	0.048	0.062	0.065	0.058	0.059	0.058	0.059	0.058	0.060	0.053	0.055	0.061	0.059	0.059	0.054	
Ñeembucu (3)	0.137	0.078		0.043	0.047	0.042	0.052	0.045	0.049	0.050	0.052	0.048	0.054	0.048	0.057	0.051	0.056	0.070	0.057	0.057	0.056	0.056	0.058	0.062	0.058	0.053	0.057	0.064	0.061	0.061	
Oran (4)	0.198	0.167	0.204		0.037	0.044	0.044	0.045	0.042	0.041	0.051	0.049	0.046	0.055	0.051	0.057	0.054	0.073	0.052	0.058	0.055	0.059	0.058	0.057	0.059	0.054	0.058	0.062	0.050	0.064	
Pergamino (5)	0.193	0.212	0.216	0.171		0.041	0.038	0.044	0.042	0.044	0.053	0.053	0.040	0.056	0.052	0.058	0.051	0.061	0.057	0.050	0.061	0.057	0.062	0.059	0.057	0.054	0.058	0.070	0.057	0.064	
Tunari (6)	0.212	0.194	0.187	0.210	0.196		0.042	0.045	0.043	0.046	0.049	0.047	0.055	0.059	0.056	0.043	0.054	0.067	0.057	0.060	0.057	0.064	0.060	0.057	0.054	0.051	0.057	0.062	0.061	0.054	
Paranoa/ Araquara(7)	0.246	0.242	0.236	0.212	0.187	0.187		0.038	0.045	0.044	0.048	0.051	0.053	0.049	0.060	0.053	0.052	0.070	0.069	0.057	0.059	0.052	0.061	0.060	0.058	0.060	0.057	0.055	0.066	0.062	
Maciel (8)	0.226	0.207	0.222	0.212	0.203	0.209	0.170		0.051	0.045	0.049	0.052	0.060	0.058	0.058	0.045	0.057	0.066	0.062	0.062	0.064	0.051	0.057	0.057	0.051	0.063	0.071	0.054	0.070	0.053	
Juquitiba Like (9)	0.238	0.212	0.219	0.197	0.203	0.207	0.215	0.255		0.043	0.045	0.056	0.049	0.053	0.051	0.050	0.058	0.067	0.066	0.057	0.061	0.060	0.058	0.067	0.057	0.060	0.063	0.065	0.059	0.064	
Andes (10)	0.230	0.207	0.232	0.199	0.197	0.204	0.203	0.211	0.212		0.050	0.054	0.054	0.050	0.048	0.050	0.052	0.071	0.059	0.054	0.058	0.050	0.056	0.058	0.050	0.066	0.060	0.062	0.054	0.063	
Jabóira (11)	0.267	0.244	0.233	0.243	0.242	0.233	0.238	0.237	0.217	0.233		0.051	0.049	0.062	0.060	0.056	0.049	0.069	0.059	0.058	0.062	0.059	0.050	0.064	0.049	0.061	0.052	0.057	0.060	0.054	
Laguna Negra/Castelo dos Sonhos (12)	0.261	0.254	0.228	0.239	0.239	0.216	0.238	0.247	0.258	0.253	0.242		0.050	0.054	0.058	0.048	0.047	0.069	0.057	0.066	0.057	0.073	0.063	0.058	0.061	0.062	0.058	0.070	0.066	0.061	
Chodó (13)	0.221	0.224	0.238	0.210	0.187	0.266	0.260	0.287	0.231	0.253	0.228	0.231		0.056	0.050	0.055	0.051	0.059	0.048	0.056	0.065	0.066	0.069	0.067	0.063	0.053	0.072	0.071	0.060	0.063	
Maripa (14)	0.228	0.217	0.209	0.247	0.259	0.265	0.237	0.261	0.250	0.235	0.278	0.238	0.252		0.057	0.050	0.049	0.079	0.061	0.054	0.065	0.051	0.062	0.061	0.066	0.065	0.061	0.057	0.073	0.066	
Caño Delgadito (15)	0.243	0.245	0.257	0.234	0.237	0.242	0.270	0.268	0.249	0.223	0.264	0.259	0.225	0.256		0.060	0.058	0.062	0.062	0.053	0.067	0.065	0.056	0.063	0.053	0.061	0.067	0.074	0.066	0.062	
Rio Mamoré (16)	0.279	0.234	0.249	0.260	0.281	0.208	0.244	0.225	0.236	0.232	0.259	0.222	0.243	0.235	0.261		0.055	0.065	0.064	0.050	0.062	0.062	0.063	0.052	0.058	0.053	0.063	0.061	0.055	0.060	
Alto Paraguay (17)	0.270	0.283	0.263	0.258	0.248	0.254	0.249	0.274	0.270	0.256	0.240	0.231	0.240	0.224	0.264	0.245		0.073	0.057	0.056	0.075	0.063	0.059	0.049	0.061	0.060	0.075	0.061	0.057	0.060	
Rio Segundo (18)	0.314	0.290	0.301	0.311	0.292	0.312	0.320	0.302	0.309	0.322	0.322	0.313	0.280	0.337	0.291	0.295	0.324		0.062	0.065	0.071	0.080	0.072	0.073	0.066	0.061	0.057	0.056	0.063	0.058	
Lime Stone Canyon (19)	0.261	0.259	0.258	0.240	0.257	0.271	0.315	0.287	0.305	0.284	0.280	0.275	0.214	0.271	0.280	0.287	0.270	0.287		0.054	0.060	0.059	0.053	0.068	0.056	0.055	0.044	0.054	0.062	0.049	
Monongahela	0.302	0.273	0.265	0.265	0.238	0.270	0.265	0.287	0.282	0.255	0.274	0.291	0.272	0.268	0.253	0.228	0.264	0.299	0.255		0.060	0.065	0.037	0.065	0.039	0.059	0.061	0.074	0.059	0.050	
Montano (21)	0.265	0.282	0.277	0.272	0.292	0.270	0.291	0.307	0.298	0.264	0.295	0.275	0.298	0.306	0.292	0.286	0.344	0.304	0.269	0.285		0.058	0.062	0.061	0.062	0.059	0.050	0.061	0.074	0.065	
Muleshoe (22)	0.285	0.273	0.260	0.278	0.273	0.293	0.248	0.231	0.287	0.237	0.267	0.320	0.294	0.246	0.283	0.278	0.291	0.347	0.284	0.287	0.261		0.053	0.057	0.052	0.062	0.063	0.053	0.053	0.065	
New York (23)	0.299	0.272	0.274	0.264	0.276	0.267	0.281	0.254	0.280	0.271	0.245	0.271	0.297	0.279	0.239	0.283	0.281	0.319	0.248	0.176	0.280	0.240		0.067	0.014	0.060	0.060	0.069	0.058	0.046	
Catcamas (24)	0.255	0.275	0.281	0.271	0.268	0.257	0.278	0.251	0.312	0.276	0.293	0.276	0.288	0.279	0.281	0.238	0.241	0.304	0.294	0.287	0.283	0.236	0.283		0.063	0.062	0.064	0.063	0.049	0.066	
Convict Creek (25)	0.262	0.247	0.274	0.271	0.259	0.253	0.271	0.240	0.273	0.247	0.245	0.266	0.285	0.292	0.231	0.267	0.302	0.301	0.260	0.180	0.279	0.240	0.053	0.275		0.061	0.057	0.063	0.053	0.044	
El Moro Canyon (26)	0.260	0.266	0.256	0.248	0.253	0.252	0.287	0.291	0.275	0.306	0.278	0.285	0.242	0.297	0.259	0.237	0.277	0.275	0.245	0.285	0.279	0.291	0.269	0.278	0.270		0.057	0.063	0.058	0.063	
Carrizo (27)	0.293	0.293	0.274	0.277	0.274	0.272	0.274	0.317	0.298	0.277	0.251	0.284	0.329	0.276	0.305	0.286	0.331	0.269	0.197	0.279	0.234	0.303	0.286	0.301	0.278	0.266		0.051	0.064	0.053	
Huitzilac (28)	0.291	0.287	0.295	0.291	0.322	0.298	0.266	0.266	0.302	0.296	0.275	0.315	0.321	0.257	0.331	0.275	0.272	0.241	0.260	0.327	0.277	0.248	0.312	0.285	0.304	0.267	0.224		0.068	0.049	
Bayou (29)	0.278	0.263	0.269	0.241	0.276	0.266	0.290	0.298	0.278	0.254	0.259	0.298	0.278	0.297	0.289	0.261	0.262	0.280	0.286	0.257	0.324	0.243	0.263	0.220	0.251	0.272	0.292	0.299		0.062	
Sin Nombre (30)	0.272	0.271	0.295	0.294	0.293	0.266	0.300	0.268	0.302	0.301	0.269	0.289	0.298	0.308	0.291	0.282	0.262	0.279	0.247	0.226	0.297	0.291	0.223	0.294	0.217	0.297	0.257	0.245	0.289		

Hantavirus		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
Lechiguanas/ Andes Central Plata (1)		0,001	0,008	0,019	0,021	0,019	0,026	0,032	0,009	0,029	0,026	0,026	0,024	0,030	0,035	0,023	0,014	0,014	0,016	0,028	0,014	0,030	0,023	0,018	0,032	0,027	0,033	0,035	0,026	0,025	
Bermejo (2)	0,010		0,008	0,019	0,021	0,019	0,026	0,032	0,009	0,029	0,026	0,026	0,024	0,030	0,035	0,023	0,014	0,014	0,016	0,028	0,014	0,030	0,023	0,018	0,032	0,027	0,033	0,035	0,026	0,026	
Ñeembucu (3)	0,011	0,009		0,020	0,022	0,020	0,027	0,032	0,012	0,031	0,027	0,028	0,025	0,030	0,036	0,023	0,016	0,016	0,018	0,029	0,016	0,031	0,023	0,019	0,033	0,028	0,034	0,035	0,027	0,027	
Oran (4)	0,037	0,036	0,045		0,020	0,017	0,029	0,039	0,016	0,028	0,033	0,026	0,026	0,035	0,028	0,023	0,012	0,012	0,009	0,026	0,012	0,029	0,023	0,027	0,036	0,033	0,033	0,034	0,027	0,032	
Pergamino (5)	0,059	0,058	0,067	0,062		0,019	0,024	0,035	0,020	0,016	0,029	0,017	0,024	0,032	0,026	0,020	0,017	0,017	0,019	0,018	0,017	0,022	0,020	0,021	0,030	0,029	0,034	0,027	0,022	0,027	
Tunari (6)	0,038	0,037	0,046	0,037	0,056		0,029	0,039	0,016	0,027	0,033	0,027	0,027	0,037	0,033	0,023	0,012	0,012	0,012	0,026	0,012	0,028	0,023	0,027	0,036	0,033	0,038	0,032	0,027	0,027	
Paranoa/ Araquara(7)	0,083	0,082	0,092	0,101	0,091	0,100		0,032	0,025	0,027	0,022	0,029	0,016	0,022	0,029	0,018	0,026	0,026	0,028	0,028	0,026	0,024	0,018	0,021	0,022	0,025	0,027	0,025	0,025	0,029	
Maciel (8)	0,132	0,131	0,131	0,161	0,146	0,174	0,111		0,034	0,036	0,025	0,042	0,031	0,026	0,037	0,033	0,036	0,036	0,039	0,040	0,036	0,033	0,033	0,032	0,027	0,024	0,026	0,035	0,040	0,039	
Juquitiba Like (9)	0,010	0,009	0,018	0,027	0,051	0,028	0,073	0,141		0,027	0,028	0,024	0,021	0,031	0,033	0,021	0,010	0,010	0,013	0,025	0,010	0,028	0,021	0,020	0,031	0,028	0,035	0,033	0,024	0,028	
Andes (10)	0,083	0,082	0,092	0,082	0,042	0,084	0,082	0,121	0,073		0,031	0,021	0,021	0,035	0,024	0,020	0,024	0,024	0,027	0,017	0,024	0,021	0,020	0,028	0,029	0,033	0,033	0,026	0,024	0,029	
Jabóna (11)	0,093	0,092	0,101	0,121	0,109	0,129	0,073	0,082	0,101	0,101		0,035	0,024	0,018	0,032	0,027	0,030	0,030	0,033	0,033	0,030	0,029	0,027	0,023	0,022	0,018	0,021	0,030	0,032	0,032	
Laguna Negra/Castelo dos Sonhos (12)	0,072	0,073	0,082	0,063	0,043	0,084	0,101	0,161	0,063	0,054	0,121		0,028	0,038	0,028	0,026	0,024	0,024	0,023	0,018	0,024	0,030	0,026	0,027	0,036	0,036	0,034	0,033	0,022	0,027	
Choclo (13)	0,074	0,073	0,082	0,092	0,081	0,090	0,027	0,101	0,063	0,054	0,082	0,092		0,026	0,028	0,016	0,023	0,023	0,026	0,024	0,023	0,024	0,016	0,023	0,020	0,028	0,025	0,024	0,023	0,028	
Maripa (14)	0,122	0,121	0,131	0,141	0,136	0,160	0,063	0,082	0,131	0,131	0,036	0,151	0,092		0,034	0,029	0,034	0,034	0,036	0,036	0,034	0,030	0,029	0,026	0,027	0,024	0,027	0,030	0,035	0,035	
Caño Delgadito (15)	0,132	0,131	0,141	0,092	0,105	0,133	0,111	0,141	0,121	0,073	0,121	0,101	0,101	0,141		0,029	0,032	0,032	0,029	0,029	0,032	0,020	0,029	0,033	0,028	0,031	0,026	0,022	0,032	0,037	
Río Mamoré (16)	0,074	0,073	0,082	0,073	0,065	0,071	0,036	0,111	0,063	0,054	0,082	0,082	0,027	0,092	0,101		0,019	0,019	0,023	0,023	0,019	0,022	0,010	0,024	0,026	0,030	0,031	0,023	0,021	0,027	
Alto Paraguay (17)	0,019	0,018	0,027	0,018	0,044	0,019	0,082	0,151	0,009	0,063	0,111	0,063	0,073	0,141	0,111	0,054		0,000	0,010	0,022	0,000	0,025	0,019	0,024	0,033	0,031	0,036	0,031	0,024	0,028	
Río Segundo (18)	0,019	0,018	0,027	0,018	0,044	0,019	0,082	0,151	0,009	0,063	0,111	0,063	0,073	0,141	0,111	0,054	0,000		0,010	0,022	0,000	0,025	0,019	0,024	0,033	0,031	0,036	0,031	0,024	0,028	
Lime Stone Canyon (19)	0,032	0,031	0,040	0,013	0,053	0,024	0,097	0,167	0,022	0,077	0,126	0,059	0,087	0,156	0,106	0,068	0,013	0,013		0,025	0,010	0,029	0,023	0,025	0,036	0,033	0,034	0,034	0,025	0,029	
Monongahela	0,082	0,082	0,092	0,082	0,044	0,081	0,092	0,151	0,073	0,036	0,111	0,036	0,063	0,141	0,101	0,063	0,063	0,063	0,077		0,022	0,026	0,023	0,028	0,031	0,036	0,035	0,027	0,024	0,027	
Montano (21)	0,019	0,018	0,027	0,018	0,044	0,019	0,082	0,151	0,009	0,063	0,111	0,063	0,073	0,141	0,111	0,054	0,000	0,000	0,013	0,063		0,025	0,019	0,024	0,033	0,031	0,036	0,031	0,024	0,028	
Muleshoe (22)	0,112	0,111	0,121	0,092	0,086	0,113	0,073	0,101	0,101	0,054	0,101	0,101	0,063	0,101	0,045	0,063	0,092	0,092	0,106	0,082	0,092		0,022	0,029	0,026	0,031	0,031	0,015	0,029	0,035	
New York (23)	0,074	0,073	0,082	0,073	0,065	0,071	0,036	0,111	0,063	0,054	0,082	0,082	0,027	0,092	0,101	0,000	0,054	0,054	0,068	0,063	0,054	0,063		0,024	0,026	0,030	0,031	0,023	0,021	0,027	
Catacamas (24)	0,037	0,036	0,045	0,073	0,054	0,074	0,063	0,111	0,045	0,073	0,073	0,063	0,073	0,101	0,111	0,073	0,054	0,054	0,068	0,073	0,054	0,092	0,073		0,029	0,026	0,030	0,032	0,026	0,027	
Convict Creek (25)	0,122	0,121	0,131	0,131	0,121	0,139	0,073	0,092	0,111	0,092	0,054	0,131	0,063	0,092	0,092	0,092	0,121	0,121	0,136	0,101	0,121	0,092	0,092	0,101		0,023	0,016	0,027	0,032	0,036	
El Morro Canyon (26)	0,102	0,101	0,111	0,131	0,119	0,143	0,092	0,073	0,111	0,111	0,036	0,131	0,101	0,073	0,111	0,111	0,121	0,121	0,136	0,141	0,121	0,111	0,111	0,082	0,054		0,020	0,035	0,034	0,036	
Carrazal (27)	0,112	0,111	0,121	0,121	0,129	0,150	0,082	0,082	0,121	0,101	0,045	0,121	0,073	0,082	0,082	0,101	0,131	0,131	0,126	0,111	0,131	0,101	0,101	0,082	0,027	0,045		0,032	0,036	0,035	
Huitzilac (28)	0,132	0,131	0,141	0,111	0,105	0,129	0,073	0,121	0,121	0,073	0,101	0,121	0,063	0,101	0,054	0,063	0,111	0,111	0,126	0,082	0,111	0,027	0,063	0,111	0,092	0,131	0,101		0,031	0,035	
Bayou (29)	0,074	0,073	0,082	0,082	0,059	0,084	0,092	0,161	0,063	0,063	0,121	0,054	0,082	0,151	0,101	0,063	0,063	0,063	0,077	0,073	0,063	0,111	0,073	0,063	0,131	0,131	0,141	0,121		0,028	
Sin Nombre (30)	0,072	0,073	0,082	0,101	0,081	0,081	0,082	0,151	0,082	0,082	0,092	0,073	0,073	0,121	0,141	0,063	0,082	0,082	0,097	0,063	0,082	0,121	0,063	0,054	0,121	0,121	0,111	0,121	0,092		

Anexo 3. Distancia p calculada a nivel de nucleótidos (tabla superior) y aminoácidos (tabla inferior) con sus respectivos desvíos estándar entre cada uno de los grupos analizados. Corresponde a un fragmento del segmento M de 456pb.

Hantavirus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Montano (1)		0,120	0,120	0,129	0,074	0,153	0,137	0,170	0,137	0,147	0,125	0,107	0,148	0,156	0,168	0,140	0,172	0,173	0,172	0,144	0,136	0,150	0,133	0,116	0,138
Huitzilac (2)	0,371		0,069	0,096	0,103	0,149	0,165	0,150	0,199	0,175	0,161	0,134	0,137	0,153	0,206	0,147	0,174	0,172	0,169	0,131	0,145	0,148	0,149	0,141	0,149
Carrizal (3)	0,386	0,268		0,087	0,098	0,167	0,147	0,203	0,175	0,185	0,149	0,145	0,123	0,159	0,188	0,179	0,187	0,200	0,146	0,135	0,152	0,151	0,158	0,158	0,160
El Moro Canyon (4)	0,410	0,319	0,299		0,114	0,168	0,120	0,138	0,198	0,180	0,143	0,166	0,169	0,196	0,193	0,159	0,159	0,159	0,171	0,146	0,191	0,160	0,135	0,150	0,172
Lime Stone Canyon (5)	0,264	0,346	0,328	0,387		0,151	0,146	0,150	0,164	0,149	0,138	0,121	0,135	0,160	0,223	0,161	0,181	0,183	0,137	0,145	0,136	0,131	0,127	0,144	0,138
Sin Nombre (6)	0,442	0,443	0,497	0,504	0,468		0,038	0,056	0,121	0,124	0,102	0,121	0,131	0,111	0,135	0,095	0,111	0,105	0,109	0,121	0,114	0,100	0,114	0,121	0,101
Convict Creek (7)	0,418	0,480	0,454	0,377	0,460	0,141		0,071	0,137	0,143	0,111	0,131	0,136	0,113	0,144	0,105	0,104	0,096	0,104	0,111	0,121	0,110	0,097	0,110	0,106
New York (8)	0,486	0,446	0,572	0,447	0,450	0,206	0,252		0,152	0,109	0,121	0,117	0,133	0,114	0,125	0,117	0,117	0,108	0,121	0,118	0,142	0,101	0,116	0,123	0,107
Caño Delgadito (9)	0,447	0,549	0,531	0,586	0,531	0,370	0,415	0,477		0,125	0,130	0,152	0,134	0,120	0,197	0,128	0,125	0,166	0,147	0,172	0,159	0,113	0,128	0,138	0,112
Black Creek Canal (10)	0,463	0,510	0,553	0,513	0,469	0,411	0,459	0,346	0,404		0,086	0,073	0,111	0,104	0,193	0,132	0,121	0,139	0,129	0,125	0,114	0,090	0,105	0,119	0,107
Catacamas (11)	0,417	0,513	0,462	0,452	0,442	0,315	0,360	0,380	0,429	0,303		0,077	0,125	0,140	0,174	0,118	0,139	0,114	0,095	0,094	0,126	0,093	0,111	0,115	0,108
Bayou (12)	0,349	0,413	0,438	0,505	0,379	0,381	0,411	0,361	0,477	0,253	0,281		0,140	0,117	0,188	0,124	0,128	0,130	0,129	0,120	0,119	0,134	0,116	0,138	0,110
Choclo (13)	0,483	0,450	0,411	0,549	0,456	0,437	0,447	0,466	0,450	0,409	0,407	0,470		0,093	0,243	0,124	0,111	0,154	0,102	0,083	0,088	0,071	0,095	0,104	0,085
Oran (14)	0,503	0,501	0,513	0,583	0,509	0,379	0,395	0,364	0,402	0,351	0,460	0,389	0,331		0,215	0,071	0,064	0,071	0,071	0,084	0,073	0,043	0,050	0,079	0,056
Prospect Hill (15)	0,501	0,588	0,541	0,569	0,644	0,411	0,426	0,384	0,584	0,565	0,510	0,566	0,707	0,623		0,213	0,214	0,226	0,168	0,229	0,195	0,224	0,222	0,227	0,186
Araraquara (16)	0,454	0,448	0,524	0,473	0,461	0,308	0,338	0,369	0,409	0,425	0,378	0,373	0,397	0,259	0,588		0,065	0,080	0,090	0,074	0,094	0,064	0,069	0,080	0,070
Castelo dos Sonhos (17)	0,554	0,531	0,572	0,519	0,553	0,388	0,367	0,402	0,419	0,372	0,411	0,399	0,371	0,229	0,595	0,254		0,071	0,097	0,087	0,090	0,068	0,074	0,076	0,077
Maciel (18)	0,543	0,548	0,601	0,493	0,568	0,369	0,341	0,382	0,522	0,439	0,347	0,420	0,488	0,263	0,638	0,288	0,234		0,082	0,085	0,092	0,069	0,077	0,096	0,076
Pergamino (19)	0,538	0,534	0,453	0,519	0,451	0,392	0,373	0,419	0,471	0,431	0,315	0,431	0,343	0,261	0,491	0,313	0,321	0,285		0,059	0,066	0,078	0,070	0,089	0,066
Rio Mamore (20)	0,475	0,444	0,435	0,450	0,451	0,408	0,377	0,412	0,556	0,436	0,314	0,394	0,301	0,312	0,661	0,287	0,312	0,304	0,203		0,072	0,074	0,068	0,076	0,062
Juquitiba Like (21)	0,454	0,478	0,471	0,583	0,448	0,393	0,392	0,465	0,516	0,388	0,393	0,382	0,323	0,286	0,576	0,340	0,321	0,322	0,239	0,269		0,076	0,077	0,095	0,075
Andes (22)	0,490	0,465	0,477	0,490	0,431	0,355	0,380	0,361	0,384	0,320	0,325	0,448	0,262	0,168	0,618	0,239	0,229	0,244	0,273	0,275	0,296		0,049	0,083	0,054
Bermejo (23)	0,447	0,478	0,496	0,426	0,421	0,399	0,345	0,392	0,449	0,368	0,376	0,384	0,334	0,196	0,605	0,255	0,264	0,279	0,247	0,255	0,297	0,194		0,071	0,046
Laguna Negra (24)	0,419	0,472	0,507	0,480	0,479	0,405	0,381	0,408	0,446	0,396	0,385	0,437	0,363	0,282	0,637	0,287	0,274	0,320	0,307	0,284	0,348	0,294	0,261		0,089
Lechiguana/Andes Central Plata (25)	0,453	0,484	0,491	0,524	0,438	0,353	0,360	0,360	0,396	0,371	0,361	0,371	0,298	0,210	0,552	0,257	0,266	0,283	0,235	0,240	0,287	0,210	0,161	0,314	

Hantavirus	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Montano (1)		0.043	0.043	0.047	0.027	0.046	0.046	0.046	0.060	0.051	0.050	0.049	0.052	0.057	0.057	0.059	0.058	0.071	0.057	0.056	0.060	0.057	0.059	0.057	0.057
Huitzilac (2)	0.163		0.032	0.032	0.040	0.047	0.047	0.047	0.062	0.054	0.046	0.047	0.053	0.057	0.064	0.054	0.055	0.071	0.057	0.054	0.056	0.057	0.058	0.054	0.057
Carrizal (3)	0.163	0.090		0.026	0.034	0.044	0.044	0.044	0.062	0.056	0.051	0.051	0.052	0.054	0.063	0.052	0.054	0.070	0.052	0.050	0.055	0.054	0.056	0.054	0.054
El Moro Canyon (4)	0.189	0.090	0.067		0.039	0.052	0.052	0.052	0.067	0.053	0.049	0.053	0.057	0.060	0.063	0.056	0.058	0.071	0.056	0.056	0.059	0.060	0.058	0.057	0.060
Lime Stone Canyon (5)	0.067	0.138	0.102	0.138		0.047	0.047	0.047	0.060	0.052	0.048	0.049	0.054	0.057	0.058	0.055	0.052	0.069	0.053	0.052	0.056	0.057	0.059	0.053	0.057
Sin Nombre (6)	0.176	0.176	0.163	0.215	0.176		0.000	0.000	0.054	0.051	0.042	0.044	0.054	0.050	0.055	0.047	0.049	0.061	0.052	0.048	0.050	0.048	0.052	0.047	0.050
Convict Creek (7)	0.176	0.176	0.163	0.215	0.176	0.000		0.000	0.054	0.051	0.042	0.044	0.054	0.050	0.055	0.047	0.049	0.061	0.052	0.048	0.050	0.048	0.052	0.047	0.050
New York (8)	0.176	0.176	0.163	0.215	0.176	0.000	0.000		0.054	0.051	0.042	0.044	0.054	0.050	0.055	0.047	0.049	0.061	0.052	0.048	0.050	0.048	0.052	0.047	0.050
Caño Delgadito (9)	0.284	0.298	0.298	0.328	0.284	0.242	0.242	0.242		0.053	0.053	0.058	0.057	0.056	0.070	0.064	0.056	0.069	0.060	0.063	0.059	0.054	0.058	0.060	0.056
Black Creek Canal (10)	0.215	0.242	0.256	0.229	0.215	0.215	0.215	0.215	0.242		0.033	0.042	0.057	0.048	0.067	0.050	0.048	0.062	0.052	0.056	0.050	0.046	0.046	0.050	0.048
Catacamas (11)	0.202	0.176	0.215	0.202	0.189	0.151	0.151	0.151	0.229	0.102		0.030	0.050	0.044	0.059	0.046	0.041	0.059	0.045	0.046	0.043	0.042	0.046	0.048	0.044
Bayou (12)	0.202	0.189	0.215	0.229	0.202	0.163	0.163	0.163	0.270	0.151	0.078		0.050	0.050	0.060	0.048	0.044	0.061	0.050	0.047	0.049	0.048	0.052	0.048	0.050
Choclo (13)	0.215	0.229	0.229	0.256	0.229	0.229	0.229	0.229	0.256	0.256	0.202	0.215		0.039	0.064	0.042	0.039	0.057	0.041	0.038	0.040	0.039	0.041	0.042	0.039
Oran (14)	0.256	0.256	0.242	0.284	0.256	0.202	0.202	0.202	0.256	0.202	0.176	0.215	0.126		0.067	0.024	0.025	0.045	0.019	0.025	0.017	0.011	0.011	0.029	0.001
Prospect Hill (15)	0.256	0.313	0.313	0.298	0.270	0.229	0.229	0.229	0.374	0.343	0.284	0.298	0.328	0.343		0.064	0.068	0.081	0.065	0.062	0.068	0.065	0.069	0.064	0.067
Araraquara (16)	0.270	0.242	0.229	0.256	0.242	0.189	0.189	0.189	0.328	0.215	0.189	0.202	0.151	0.055	0.328		0.031	0.047	0.027	0.027	0.025	0.027	0.022	0.021	0.024
Castelo dos Sonhos (17)	0.256	0.242	0.242	0.270	0.215	0.202	0.202	0.202	0.256	0.202	0.151	0.163	0.126	0.055	0.358	0.090		0.041	0.022	0.028	0.023	0.021	0.027	0.031	0.025
Maciel (18)	0.298	0.284	0.284	0.284	0.284	0.215	0.215	0.215	0.298	0.229	0.202	0.202	0.176	0.078	0.389	0.090	0.055		0.044	0.047	0.044	0.043	0.044	0.046	0.045
Pergamino (19)	0.256	0.256	0.229	0.256	0.229	0.215	0.215	0.215	0.284	0.229	0.176	0.202	0.138	0.033	0.328	0.067	0.044	0.067		0.044	0.067	0.044	0.067	0.044	0.019
Rio Mamore (20)	0.256	0.242	0.215	0.256	0.229	0.189	0.189	0.189	0.298	0.256	0.176	0.189	0.126	0.055	0.313	0.067	0.067	0.090	0.022		0.024	0.028	0.028	0.027	0.025
Juquitiba Like (21)	0.284	0.256	0.256	0.279	0.256	0.215	0.215	0.215	0.284	0.224	0.176	0.215	0.138	0.033	0.358	0.063	0.055	0.074	0.033	0.055		0.021	0.020	0.027	0.017
Andes (22)	0.256	0.256	0.242	0.284	0.256	0.189	0.189	0.189	0.242	0.189	0.163	0.202	0.126	0.011	0.328	0.067	0.044	0.067	0.044	0.067	0.044		0.015	0.032	0.011
Bermejo (23)	0.270	0.270	0.256	0.270	0.270	0.215	0.215	0.215	0.270	0.189	0.189	0.229	0.138	0.011	0.358	0.044	0.067	0.067	0.044	0.067	0.040	0.022		0.027	0.011
Laguna Negra (24)	0.256	0.242	0.242	0.256	0.229	0.189	0.189	0.189	0.284	0.215	0.202	0.202	0.151	0.078	0.328	0.044	0.090	0.090	0.067	0.067	0.070	0.074	0.090	0.067	0.029
Lechiguanas/Andes Central Plata (25)	0.259	0.259	0.245	0.287	0.259	0.205	0.205	0.205	0.259	0.205	0.213	0.179	0.218	0.130	0.004	0.346	0.059	0.059	0.082	0.037	0.059	0.037	0.033	0.111	0.082

Anexo 4. Variables seleccionadas para modelar la distribución potencial de la especie *O. flavescens*.

Factor	Variable	Código
Climático	Temperatura anual media	BIO1
	Rango diurno medio	BIO2
	Isotermalidad	BIO3
	Temperatura estacional (Desviación estándar*100)	BIO4
	Maxima temperatura del mes más cálido	BIO5
	Temperatura mínima del mes más frío	BIO6
	Rango de temperatura anual	BIO7
	Temperatura media del trimestre más húmedo	BIO8
	Temperatura media del trimestre más seco	BIO9
	Temperatura media del trimestre más cálido	BIO10
	Temperatura media del trimestre más frío	BIO11
	Precipitación anual	BIO12
	Precipitación del mes más húmedo	BIO13
	Precipitación del mes más seco	BIO14
	Precipitación estacional (Coeficiente de variación)	BIO15
	Precipitación del trimestre más húmedo	BIO16
	Precipitación del trimestre más seco	BIO17
	Precipitación del trimestre más cálido	BIO18
	Precipitación del trimestre más frío	BIO19
Geográfico	Altitud	Alt
	Orientación	orientación
	Pendiente	pendiente
	Sombra del relieve	sombra
	Zonas arbustivas	zonas_arbust
	Zonas de arenales	zonas_arenales
	Zonas de palmares	zonas_palmares
	Cuerpos de agua	cuerpo_agua
	Cursos de agua	cursos_agua
	Humedales	humedales
Antrópicos	Montes naturales	montes_naturales
	Áreas sin cobertura	ar_sin_cobert
	Actividad minera	act_minera
	Zonas de agricultura y ganadería	agr_ganad
	Áreas con equipamiento urbano	ar_equip_urb
	Áreas urbanas mayores a 1 millón de habitantes	ar_urb_m_1mill
	Área de influencia de la caminería principal de 100 mts	b_c_princ_100m
	Área de influencia de la caminería principal de 250 mts	b_c_princ_250m
	Área de influencia de la caminería principal de 500 mts	b_c_princ_500m
	Área de influencia de la caminería secundaria de 100 mts	b_c_secun_100m
	Área de influencia de la caminería secundaria de 250 mts	b_c_secun_250m
	Área de influencia de localidades con más de 1 millón de hab.	b_loc_1million
	Área de influencia de localidades entre 100.001 y 1.000.000 de hab	b_loc_100m_1mill
	Área de influencia de localidades entre 10.001 y 100.000 de hab	b_loc_10m_100m
	Área de influencia de localidades entre 1001 y 10.000 de hab	b_loc_1001_10m
	Área de influencia de localidades entre 1 y 1000 de hab	b_loc_1_1000

