

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.
UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NOROESTE DE LA PROVINCIA DE BUENOS
AIRES

Tesis de grado
-Licenciatura en Genética-

**ASPECTOS MOLECULARES DE LOS HANTAVIRUS CAUSANTES
DEL SÍNDROME PULMONAR POR HANTAVIRUS EN LA PROVINCIA
DE JUJUY, ARGENTINA.
DIVERSIDAD GENÉTICA Y REASOCIACIÓN GENÓMICA.**

-MELINA BELIERA-

Directora: **Dra. Silvana Levis**

Co-director: **Dr. Jorge García**

Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas

“Dr. Julio I. Maiztegui”

-Pergamino, Buenos Aires. Diciembre de 2012-

A mi madre, Beatriz y al amor de mi vida, Martín.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi directora, Silvana Levis, por permitirme trabajar con ella y brindarme los recursos para concretar este trabajo. Por la paciencia y el tiempo invertido. También a mi co-director, Jorge García, por su participación en este proyecto.

A todo el personal del Instituto Maiztegui, principalmente al equipo de virología, por su constante ayuda y compañerismo. A Verónica Fasciani y Carina Sen por transmitirme todo sus conocimientos y ser mis guías en este camino.

A la Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires, y particularmente al personal de la Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales por el apoyo constante que me brindaron a lo largo de mi carrera.

A mis profesores, por su dedicación y esfuerzo en cada clase, por transmitirme su conocimiento y experiencia como profesionales y, por hacer de esta carrera una experiencia inolvidable.

A mis compañeros y amigos por cada risa compartida, por estar a mi lado siempre, alentándome a ir por más.

A mi madre, donde quiera que este, gracias por tanto esfuerzo y sacrificio, por ofrecerme un futuro y por ser siempre lo que necesite que fuera.

Y por último, al amor de mi vida, Martín. Gracias por apoyarme, ser mi guía en la vida y nunca dejarme bajar los brazos.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1.1. Agentes etiológicos	3
1.2. Ciclo replicativo	5
1.3. Epidemiología de los hantavirus	9
1.3.1. Hantavirus del Viejo Mundo	9
1.3.2. Hantavirus del Nuevo Mundo	11
1.3.2.1. Hantavirus de Argentina	14
1.4. Ecología de los hantavirus	15
1.4.1. Infección en los roedores reservorios	15
1.4.2. Transmisión viral al hombre	19
1.5. Enfermedades causadas por los hantavirus	19
1.5.1 Fiebre hemorrágica con Síndrome Renal (FHSR)	19
1.5.2 Síndrome Pulmonar por Hantavirus (SPH)	21
1.6. Diagnostico por estudios de laboratorio	22
1.7. Antecedentes en Argentina	23
HIPÓTESIS	25
OBJETIVOS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	29
4.1. Selección de las muestras	30
4.2. Extracción del ARN total	30
4.3. RT-PCR Anidada	31
4.4. Visualización del ADN	33
4.5. Purificación del ADN y secuenciación	33

RESULTADOS	35
5.1. Comparación de secuencias y análisis filogenético	39
5.1.1. Análisis de las secuencias correspondientes al segmento genómico M	47
5.1.2. Análisis de las secuencias correspondientes al segmento genómico S	51
DISCUSIÓN	55
CONCLUSIONES	61
RESUMEN	63
BIBLIOGRAFÍA	66

ABREVIATURAS

aa	Aminoacídica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNc	ARN complementario
ARNv	ARN viral
cm	Centímetro
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
FHSR	Fiebre hemorrágica con síndrome renal
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
kDA	KiloDaltons
mg	Miligramo
ml	Mililitro
mM	Milimolar
nm	Nanometros
nt	Nucleotídica
ORF	Open Reading Frame (Marco abierto de Lectura)
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT	Retrotranscripción
SPH	Síndrome pulmonar por hantavirus
μl	Microlitro

INTRODUCCIÓN

Los hantavirus son miembros del género *Hantavirus*, perteneciente a la familia *Bunyaviridae*. El genoma viral está compuesto de tres segmentos de ácido ribonucleico (ARN) de polaridad negativa (Schmaljohn C and Nichol S, 2007). Estos virus causan dos grandes síndromes, correspondientes a sus filogenias: la Fiebre Hemorrágica con Síndrome Renal (FHSR) en Asia y en los países europeos, y el denominado Síndrome Pulmonar por Hantavirus (SPH) descrito por primera vez en 1993 en las Américas (Lee H and Van der Groen G, 1989, Duchin J et al., 1994).

La transmisión viral a los humanos ocurre a través de la exposición e inhalación de aerosoles de excreciones y secreciones de roedores infectados.

Recientemente se han identificado nuevos hantavirus en múltiples especies de pequeños mamíferos insectívoros (musarañas) pertenecientes al orden *Soricomorpha* (familia *soricidae*), aunque su papel como agentes patógenos para los seres humanos aún no se ha aclarado (Okumura M et al., 2007)

Desde 1993, diferentes hantavirus y sus roedores reservorios se han descubierto en una amplia región geográfica que va desde Canadá hasta Argentina. Muchos de estos virus son agentes etiológicos de SPH con más de 3000 casos documentados. El principal agente etiológico en América del Norte es el virus Sin Nombre (SNV).

Dada la creciente importancia de las infecciones por hantavirus y el impacto sanitario que genera su alta letalidad, resulta de la mayor importancia la realización de estudios genéticos orientados a conocer mejor la distribución geográfica, la diversidad genética y la epidemiología de los hantavirus en uno de los principales focos endémicos de infección humana por hantavirus en Argentina.

1. AGENTES ETIOLÓGICOS

La familia *Bunyaviridae* incluye más de 300 miembros serológicamente distintos, divididos en 5 géneros: *Hantavirus*, *Bunyavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus*, cuyos miembros infectan animales y el género *Tospovirus* asociado a plantas (Webster Robert G and Granoff A, 1994, Gonzales–Scarano F and Nathanson N, 1996, Schmaljohn C, 1996).

Todos los géneros de esta familia están integrados por virus que son transmitidos por artrópodos, a excepción de los hantavirus, que son transmitidos principalmente por roedores aunque, más recientemente, han sido asociados también a musarañas (Jin-Won Song et al, 2007).

Morfológicamente, los hantavirus, son de forma esférica u oval con un tamaño entre 80 y 120 nm de diámetro y poseen una envoltura lipídica de entre 5 y 7 nm de espesor. En la envoltura se encuentran las glicoproteínas de superficie Gn (antiguamente denominada G1) y Gc (antiguamente denominada G2). (Figura 1).

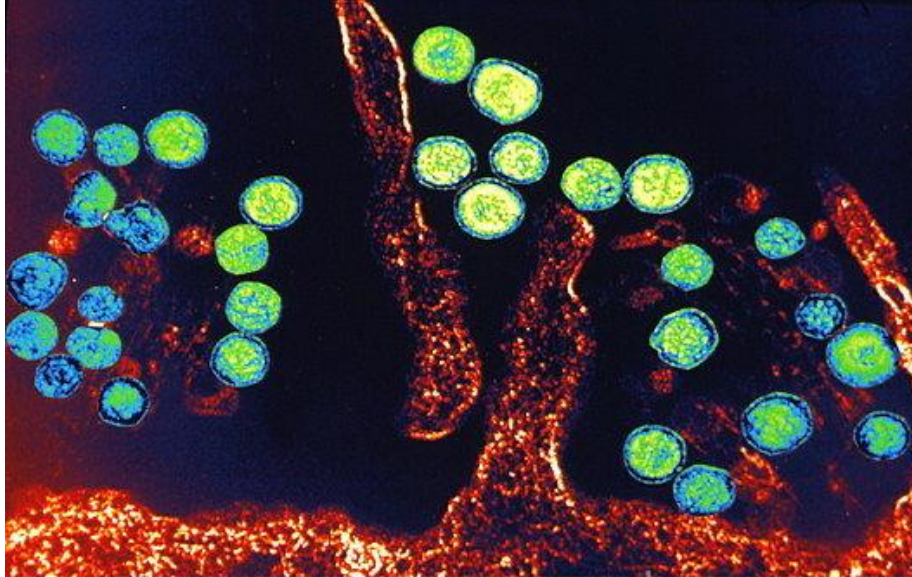


Figura 1: Micrografía electrónica de partículas virales emergiendo de una célula. (Virus Hantaan). Tomado de Scott Camazine/Science photo library.

El genoma viral está compuesto de tres segmentos de ARN de polaridad negativa: L o grande (large: L), M o mediano (medium: M), S o pequeño (small: S).

El segmento L tiene una longitud de 6.500 a 7.000 nucleótidos. Codifica una proteína de 246 kDa: la ARN polimerasa viral dependiente de ARN; a través de un intermediario de ARN de polaridad positiva (ARN copia o ARNc).

El segmento M tiene una longitud aproximada de 3.700 nucleótidos. Codifica un precursor de glicoproteínas, el cual es posteriormente procesado en las glicoproteínas de la envoltura viral Gn, de 68 a 76 kDa, y Gc, de 52 a 58 kDa, a partir de un marco de lectura abierto, siguiendo el orden 5' – G1 – G2 – 3'.

El segmento S tiene una longitud de 1.600 a 2.060 nucleótidos. Codifica la proteína N de la nucleocápside, de 50 a 54 kDa. Este paso también se lleva a cabo a través de un intermediario de ARN de polaridad positiva (ARNc).

El genoma de ARN desnudo de los hantavirus no es infeccioso. (Plyusnin A et al., 1996, Schmaljohn CS et al., 1985, Schmaljohn C and Hjelle B, 1997, Elliott RM, 1990, Schmaljohn CS et al., 1986, Schmaljohn CS et al., 1987).

Los distintos ARNs de la partícula viral, se encuentran formando complejos con la proteína N dando lugar a nucleocápsides de simetría helicoidal (Obijeski J et al., 1976).

2. CICLO REPLICATIVO

Los hantavirus infectan células endoteliales, epiteliales, macrófagos, células dendríticas foliculares y linfocitos a través de la unión de las glicoproteínas de la superficie viral (Gn y Gc) a su co-receptor en la célula huésped (Figura 2) (Mackow E and Gavrillovskaia I, 2001, Markotic A et al., 2007, Raftery M et al., 2002, Spiropoulou C 2001, Zaki S et al., 1995). Varios estudios sugieren que estos receptores serían una superfamilia de glicoproteínas llamadas integrinas. Las integrinas $\beta 1$ estarían más relacionadas a hantavirus no patogénicos y las integrinas $\beta 3$ a hantavirus patogénicos, causantes de la fiebre hemorrágica con síndrome renal (FHSR); o el síndrome pulmonar por Hantavirus (SPH) (Gavrillovskaia I et al., 1998, Gavrillovskaia I et al., 1999, Larson R et al., 2005). Sin embargo estos podrían no ser los únicos receptores, ya que células sin integrinas $\beta 3$ permiten la infección (Mou D et al., 2006, Song J et al., 2005).

Los hantavirus pueden entrar a sus células blanco tanto por la superficie de la membrana basal, como de la apical (Ravkov E et al., 1997, Rowe R and Pekosz A, 2006). Esta entrada se produce a través de la endocitosis en vesículas recubiertas de clatrina, seguido por el paso a los endosomas tempranos y subsecuentemente entregados a los endosomas tardíos o lisosomas (Jin M et al., 2002). Dentro del compartimiento endosomal, los virus son despojados de su cubierta para liberar las 3 ribonucleoproteínas al citoplasma. La ARN polimerasa viral dependiente de ARN inicia entonces la transcripción para dar lugar a los mARNs S, M y L. La traducción de los mARNs S y L ocurre en ribosomas libres, y la de los mARNs M ocurre en ribosomas anclados a membranas.

La proteína N es la proteína viral más abundante, y es sintetizada en etapas tempranas del proceso de infección (Schmaljohn C and Hooper J, 2001). Esta proteína juega un rol clave en varios pasos importantes del ciclo viral, incluyendo la traducción, el tráfico y el ensamblaje (Bernshtein A et al., 1999, Jonsson C and Schmaljohn C, 2001, Mir M et al., 2008, Panganiban A and Mir M, 2009, Ramanathan H et al., 2007, Ramanathan H and Jonsson C, 2008, Severson W et al., 1999, Severson W et al., 2001). Por otra parte, evidencia reciente sugiere que la proteína N puede modular la respuesta inmune del huésped frente a la infección (Taylor S et al., 2009). El precursor de las glicoproteínas es proteolíticamente procesado en Gn y Gc durante su importación en el retículo endoplasmático (Ruusala A et al., 1992, Spiropoulou C, 2001). En este orgánulo ambas proteínas son glicosiladas y posteriormente son transportadas al complejo de golgi (Antic D et al., 1992, Ravkov E et al., 1998, Ruusala A et al., 1992, Schmaljohn C, 1996, Vapalahti O et al., 1995).

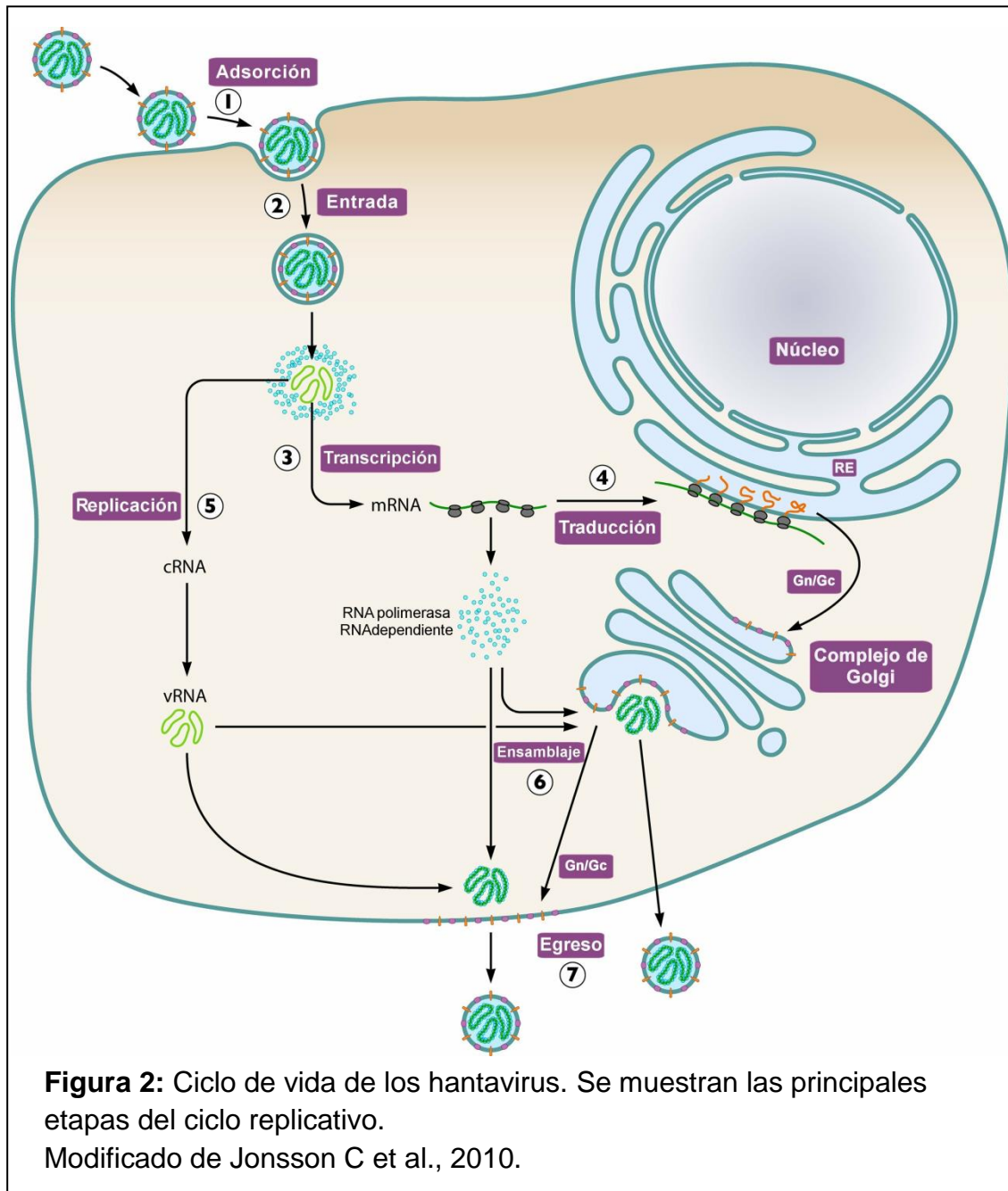
Poco después del arranque inicial de la transcripción, la polimerasa viral cambia su actividad de transcripción a replicación del ARN genómico S, M y L (Figura 2). Los recientemente

sintetizados ARNs virales son encapsidados por la proteína N para formar las nuevas ribonucleoproteínas (Schmaljohn C and Hooper J, 2001).

Una de las características más interesantes de los *Bunyaviridae*, que los diferencian de otros virus de polaridad negativa es que luego del ensamblaje los viriones maduros emergen por brotación al lumen del aparato de golgi, esto ha sido demostrado para varios géneros, aunque también se cree que los hantavirus del Nuevo Mundo se ensamblan y maduran en la membrana plasmática (como esta esquematizado en la figura 2), sin embargo en la actualidad no hay evidencias al respecto. Esta hipótesis se basa en hecho de que no se observan partículas intracelulares en células infectadas con los virus SNV o Black Creek Canal.

Otra diferencia es la ausencia de una proteína matriz, presente en muchos virus de ARN de polaridad negativa, cuya función es colaborar en el ensamblaje de la partícula viral interactuando entre ribonucleocápsides y las proteínas de envoltura. En los *Bunyaviridae*, ocurre una interacción directa entre las ribonucleocápsides, en particular la proteína N y el dominio transmembrana de las glicoproteínas Gn y Gc.

Una vez en el lumen del aparato de golgi, los viriones son transportados hacia el exterior de la célula por exocitosis (Figura 2).



3. EPIDEMIOLOGÍA DE LOS HANTAVIRUS

3.1 Hantavirus del Viejo Mundo

Los hantavirus del Viejo Mundo son transmitidos principalmente por roedores de la subfamilia *Murinae* y *Arvicolinae* (Orden: Rodentia, Familia: Muridae y Cricetidae); recientemente se ha identificado un número creciente de hantavirus asociados a musarañas, cuyo miembro prototipo es el virus Thottapalayam (Carey D et al., 1971).

Los hantavirus fueron descubiertos en la década del 50, durante la Guerra entre Corea del Norte y Corea del Sur (Johnson K, 2001). En ese momento una enfermedad febril aguda diezmó las tropas de las Naciones Unidas. La enfermedad fue denominada inicialmente como Fiebre Hemorrágica de Corea (KHF), actualmente es conocida como Fiebre hemorrágica con Síndrome Renal (FHSR) (Lee H et al., 1982).

El virus causal fue aislado por primera vez en 1976 del pulmón del roedor *Apodemus agrarius*. Se lo denominó virus Hantaan (HTN), por el río del mismo nombre, cercano a la localidad donde ocurrieron los primeros casos de FHSR y constituye el virus prototipo del género que lleva su nombre (Lee H, 1982, Lee H et al., 1978).

A partir de este aislamiento inicial se comenzaron a reconocer un número creciente de nuevos serotipos en Europa y Asia (Tabla 1).

Tabla 1: Hantavirus del Viejo Mundo.

Hantavirus	Abrev.	Enfermedad	Subfamilia/Tribu	Húesped	Distribución
Hantaan	HTN	FHSR	<i>Murinae</i>	<i>Apodemus agrarius</i>	Asia
Seoul	SEO	FHSR	<i>Murinae</i>	<i>Rattus norvegicus</i> <i>Rattus rattus</i>	Cosmopolita
Dobrava/ Belgrade	DOB	NE	<i>Murinae</i>	<i>Apodemus flavicollis</i>	Europa
Saaremaa	SAA	NE	<i>Murinae</i>	<i>Apodemus agrarius</i>	Europa
Thailand	THAI	NP	<i>Murinae</i>	<i>Bandicota indica</i>	India
Puumala/ Kamiiiso	PUU	NE	<i>Arvicolinae</i>	<i>Clethrionomys</i> <i>glareolus</i>	Europa, Japón, Rusia
Tula	TUL	NP	<i>Arvicolinae</i>	<i>Microtus arvalis</i>	Europa
Khavarovsk	KBR	NP	<i>Arvicolinae</i>	<i>Microtus fortis</i>	Asia (Rusia)
Topografov	TOP	NP	<i>Arvicolinae</i>	<i>Lemmus sibiricus</i>	Asia (Rusia)

Referencias: FHSR: Fiebre hemorrágica con síndrome renal, SPH: Síndrome pulmonar por hantavirus, NE: Nefropatía epidémica, NP: No patogénico

Estudios clínico-epidemiológicos demostraron que en Corea, China y Japón ocurría una forma menos severa de FHSR. El agente causal en estos casos era el virus Seoul (SEO), cuyo reservorio natural son los roedores *Rattus norvegicus* y *Rattus rattus* (Lee H et al., 1980). Este virus presenta una distribución mundial, debido a sus huéspedes asociados.

En los países escandinavos se describió una enfermedad similar al FHSR, a la cual se llamó nefropatía epidémica (NE). El agente causal de la misma es el virus Puumala (PUU), y su roedor reservorio es *Clethrionomys glareolus* (Brummer-Koverkontio M et al., 1980). También se aisló y caracterizó el virus Dobrava (DOB) asociado a *Apodemus flaviscollis* (Nemirov K et al., 1999).

3.2 Hantavirus del Nuevo Mundo

Los hantavirus del Nuevo Mundo (Tabla 2) son transmitidos principalmente por roedores de la subfamilia *Sigmodontinae* (Orden: Rodentia, Familia: Muridae). Estos son divididos en dos grupos: neotominos-peromyscinos, los cuales se encuentran principalmente en América del Norte, y los sigmodontinos en América del Sur. Un número menor de hantavirus son transmitidos por roedores microtinos de la subfamilia *Arvicolinae* (Orden: Rodentia, Familia: Muridae), y mamíferos insectívoros (Tabla 3).

Tabla 2: Hantavirus del Nuevo Mundo.

Hantavirus	Abrev.	Enfermedad	Subfamilia	Húésped	Distribución
Sin Nombre	SN	SPH	<i>Sigmodontinae</i>	<i>Peromyscus sonoriensis</i>	EE.UU, Canadá
Monongahela	MGH	SPH	<i>Sigmodontinae</i>	<i>Peromyscus maniculatus</i>	EE.UU, Canadá
New York	NY	SPH	<i>Sigmodontinae</i>	<i>Peromyscus leucopus (NE)</i>	EE.UU
Blue River	BR	NP	<i>Sigmodontinae</i>	<i>Peromyscus leucopus (NO)</i>	EE.UU
Limestone Canyon	LSC	NP	<i>Sigmodontinae</i>	<i>Peromyscus boylii</i>	EE.UU
Bayou	BAY	SPH	<i>Sigmodontinae</i>	<i>Oryzomys palustris</i>	EE.UU
Black creek Canal	BCC	SPH	<i>Sigmodontinae</i>	<i>Sigmodon hispidus</i>	EE.UU
Muleshoe	MUL	NP	<i>Sigmodontinae</i>	<i>Sigmodon hispidus</i>	EE.UU
El Moro Canyon	ELMC	NP	<i>Sigmodontinae</i>	<i>Rheithrodontomys megalotis</i>	EE.UU, México
Río Segundo	RIOS	NP	<i>Sigmodontinae</i>	<i>Rheithrodontomys mexicanus</i>	Costa Rica
Prospect Hill	PH	NP	<i>Arvicolinae</i>	<i>Microtus pennsylvanicus</i>	Norteamérica
Isla Vista	ILV	NP	<i>Arvicolinae</i>	<i>Microtus californicus</i>	EE.UU, México
Bloodland lake	BLL	NP	<i>Arvicolinae</i>	<i>Microtus ochrogaster</i>	Norteamérica
Andes	AND	SPH	<i>Sigmodontinae/</i> <i>Oryzomyini</i>	<i>Oligoryzomys longicaudatus</i>	Sur de Argetina, Chile
Orán	ORN	SPH	<i>Sigmodontinae/</i> <i>Oryzomyini</i>	<i>Oligoryzomys chacoensis</i>	Noroeste de Argentina
Lechiguanas	LEC	SPH	<i>Sigmodontinae/</i> <i>Oryzomyini</i>	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	Argentina, zona central
Hu 39694	-	SPH	<i>Sigmodontinae/</i> <i>Oryzomyini</i>	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	Argentina, zona central
Bermejo	BMJ	SPH	<i>Sigmodontinae/</i> <i>Oryzomyini</i>	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	Noroeste de Argentina, Bolivia

Río Mamoré	RM	Se desconoce	<i>Sigmodontinae/ Oryzomyini</i>	<i>Oligoryzomys microtis</i>	Noroeste de Perú, Bolivia
Juquitiba	JUQ	SPH	<i>Sigmodontinae/ Oryzomyini</i>	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Brasil
Itapúa	-	Se desconoce	<i>Sigmodontinae/ Oryzomyini</i>	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Paraguay
Araucaria	-	SPH	-	-	Brasil
Choclo	-	SPH	<i>Sigmodontinae/ Oryzomyini</i>	<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	Panamá
Anajatuba	ANAJ	Se desconoce	<i>Sigmodontinae/ Oryzomyini</i>	<i>Oligoryzomys fornesi</i>	Brasil
Castelo dos Sonhos	CAS	SPH	-	-	Brasil
Río Mearim	RIME	Se desconoce	<i>Sigmodontinae/ Oryzomyini</i>	<i>Holochilus sciureus</i>	Brasil
Calabazo	-	Se desconoce	<i>Sigmodontinae/ Oryzomyini</i>	<i>Zygodontomys brevicauda</i>	Panamá
Maciel	MAC	NP	<i>Sigmodontinae/ Akodontini</i>	<i>Akodon azarae</i>	Argentina, zona central
Pergamino	PGM	NP	<i>Sigmodontinae/ Akodontini</i>	<i>Necomys obscurus</i>	Argentina, zona central
Araraquara	ARA	SPH	<i>Sigmodontinae/ Akodontini</i>	<i>Bolomys lasiurus</i>	Brasil
Laguna Negra	LN	SPH	<i>Sigmodontinae/ Phyllotini</i>	<i>Calomys fecundus</i> <i>Calomys laucha</i>	Noroeste Argentino, Paraguay, Bolivia
Caño Delgadito	CDG	Se desconoce	<i>Sigmodontinae/ Sigmodontini</i>	<i>Sigmodon alstoni</i>	Venezuela

Referencias: FHSR: Fiebre hemorrágica con síndrome renal, SPH: Síndrome pulmonar por hantavirus, NP: No patogénico.

Tabla 3: Hantavirus asociados a mamíferos insectívoros.

Hantavirus	Abrev.	Huésped	Familia	Distribución
Ash River	ARRV	<i>Sorex cinereus</i>	Soricidae	EE.UU (Minnesota)
Azagny	AZGV	<i>Crocidura obscurior</i>	Soricidae	África
Camp Ripley	RPLV	<i>Blarina brevicauda</i>	Soricidae	EE.UU
Cao Bang	CBNV	<i>Anourosorex squamipes</i>	Soricidae	China
Imjin	MJNV	<i>Crocidura lasiura</i>	Soricidae	Asia
Jemez Springs	JMSV	<i>Sorex monticolus</i>	Soricidae	EE.UU (Nuevo México, Colorado)
Kenkeme	KKMV	<i>Sorex roboratus</i>	Soricidae	Rusia
Seewis	SWSV	<i>Sorex araneus</i>	Soricidae	Europa, Asia
Tanganya	TGNV	<i>Crocidura theresae</i>	Soricidae	África
Tottapalayam	TPMV	<i>Suncus murinus</i>	Soricidae	Asia
Asama	ASAV	<i>Urotrichus talpoides</i>	Talpidae	Japón
Nova	NVAV	<i>Talpa europaea</i>	Talpidae	Europa (Hungría)
Oxbow	OXBV	<i>Neurotrichus gibbsii</i>	Talpidae	EE.UU (Oregon)
Rockport	RKPV	<i>Scalopus aquaticus</i>	Talpidae	EE.UU (Texas)

En 1993, en el sudeste de los Estados Unidos, ocurrió una epidemia de síndrome de distrés respiratorio de etiología desconocida asociada, serológicamente, a una infección por hantavirus. La enfermedad fue denominada como Síndrome Pulmonar por hantavirus (SPH). El agente causal fue el virus Sin Nombre (SN) y se identificó al roedor *Peromyscus maniculatus* como su reservorio primario (Nichol S et al., 1993, Childs J et al., 1994).

Luego de esta identificación inicial se detectaron, serológicamente, otros hantavirus asociados a roedores autóctonos de Norteamérica como son El Moro Canyon, asociado a *Reithrodontomys megalotis* y Río Segundo asociado a *R. mexicanus*, encontrado en Costa Rica (Hjelle B et al., 1994, Hjelle B et al., 1995).

Otro grupo de hantavirus de Norteamérica se asocian a los géneros *Oryzomys* y *Sigmodon*, este último considerado una rama basal de los sigmodontinos sudamericanos. Entre ellos se encuentran los virus Black Creek Canal y Muleshoe, asociados a *Sigmodon hispidus*. El pariente sudamericano más cercano de los virus derivados de *Sigmodon* es el virus Caño Delgadito, cuyo reservorio es *S. alstoni*.

En Norteamérica se encuentra un grupo de hantavirus, que a diferencia de los anteriores, no son patógenos para el ser humano. Estos están asociados a roedores de la subfamilia *Arvicolinae*. Entre ellos se encuentran el virus Isla Vista, asociado a *Microtus ochrogaster* y el virus Bloodland Lake, asociado a *M. californicus* (Schmaljohn C and Hjelle B, 1997).

En Brasil circulan vario tipos virales. Entre ellos: Jujutiba, asociado a *Oligoryzomys nigripes*; Anajatuba, asociado a *O. fornesi* y Río Mearim, asociado a *Holochilus sciureus*.

El virus Laguna Negra, asociado al roedor *Calomys laucha* es responsable de casos de SPH en Paraguay y Bolivia (Johnson A et al., 1997)

Se han reconocido un número creciente de serotipos/genotipos de hantavirus distribuidos en distintos países americanos como son: Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Canadá, Costa Rica, Panamá, Paraguay, Perú, Venezuela y Uruguay (Tabla 2).

3.2.1 Hantavirus de Argentina

En Argentina se conocía la circulación de hantavirus desde la década del '80 tanto en poblaciones humanas como en roedores, pero no se los había asociado a enfermedad. Este conocimiento se basaba en estudios serológicos donde se utilizaban como antígenos serotipos del Viejo Mundo (Hantaan, Puumala y Seoul). El primer reporte de un brote de hantavirus ocurrió en el año 1996, en El Bolsón, provincia de Río Negro. Allí se identificó como agente causal al virus Andes y al roedor *O. longicaudatus* como su reservorio (Lopez N et al., 1996). Este hantavirus es el único donde se ha descrito la transmisión persona a persona (Wells R et al., 1997, Padula P et al., 1998).

En el norte argentino, en las provincias de Salta y Jujuy, circulan distintos genotipos, todos asociados a casos de SPH, a saber: Orán, asociado a *O. chacoensis*, Bermejo asociado a *O. flavescens*, y el virus Laguna Negra que se lo encuentra asociado a *C. callosus* (denominación actual: *C. fecundus*). El virus LN fue caracterizado originariamente de *C. laucha* en Paraguay, y es el agente etiológico de SPH en Paraguay y Bolivia (Johnson A et al., 1997, Levis S et al., 2004). En la zona central están presentes los virus Lechiguanas y Hu39694, asociados a *O. flavescens*. Cabe destacar que el responsable de la mayoría de los casos de SPH en esta región es el virus Lechiguanas, con una letalidad aproximada al 26%. En la zona central de la Argentina se encuentran dos hantavirus no patogénicos: el virus Maciel, asociado a *Akodon azarae* y el virus Pergamino, asociado a *Necromys obscurus* (Levis S et al., 1998) (Tabla 2).

4. ECOLOGÍA DE LOS HANTAVIRUS

4.1 Infección en los roedores reservorios

La epidemiología de todas las infecciones por hantavirus está básicamente relacionada a la infección de los roedores, la eliminación viral por parte de los reservorios a través de sus secreciones y excreciones, y al contacto del hombre con el roedor.

La infección por hantavirus en los roedores se manifiesta de forma crónica y asintomática, y parece no tener un efecto deletéreo en la reproducción y sobrevivencia de los mismos. Se piensa que la eliminación viral puede ocurrir durante toda la vida del roedor.

Cada hantavirus se encuentra asociado, predominantemente, con una especie de roedor en particular.

Es aceptado que un roedor actúa como reservorio principal para un determinado hantavirus cuando se determina que:

- El roedor pertenece a la especie más abundante en la región
- La prevalencia de infección por hantavirus en esa especie es la más elevada
- Se logra la amplificación de ARN viral por PCR en forma consistente, indicando una persistencia de la infección viral (Plyusnin A and Morzunov S, 2001)

Se considera que la vía principal de perpetuación de los virus en la naturaleza es la transmisión horizontal del virus entre animales adultos, y los encuentros agresivos entre machos en período de apareamiento proveen múltiples oportunidades para la misma. Hasta el momento no existen datos que prueben la transmisión vertical del virus, y se cree que las ratas recién nacidas estarían protegidas por anticuerpos maternos (Morita C et al., 1993).

Estudios llevados a cabo en poblaciones de reservorios demuestran que existe una correlación positiva entre la edad y la prevalencia de anticuerpos dirigidos contra los hantavirus; estas son mayores en machos adultos, principalmente en aquellos con heridas o lesiones en la piel (Childs J et al., 1985, Glass G et al., 1988, Mills J et al., 1997). La prevalencia de la infección también varía temporal y espacialmente en las poblaciones reservorios. La infección suele ser focal.

Los hantavirus existen como poblaciones heterogéneas, estando mezclados virus nativos con variantes o cuasi-especies. La base de este fenómeno reside en pequeños errores que comete la ARNpolimerasa dependiente de ARN, en ausencia de un mecanismo corrector o reparador. La naturaleza de las cuasi- especies dentro de la población de ARN viral permite la rápida evolución, resultando en mutantes alteradas que pueden coexistir mejor en un

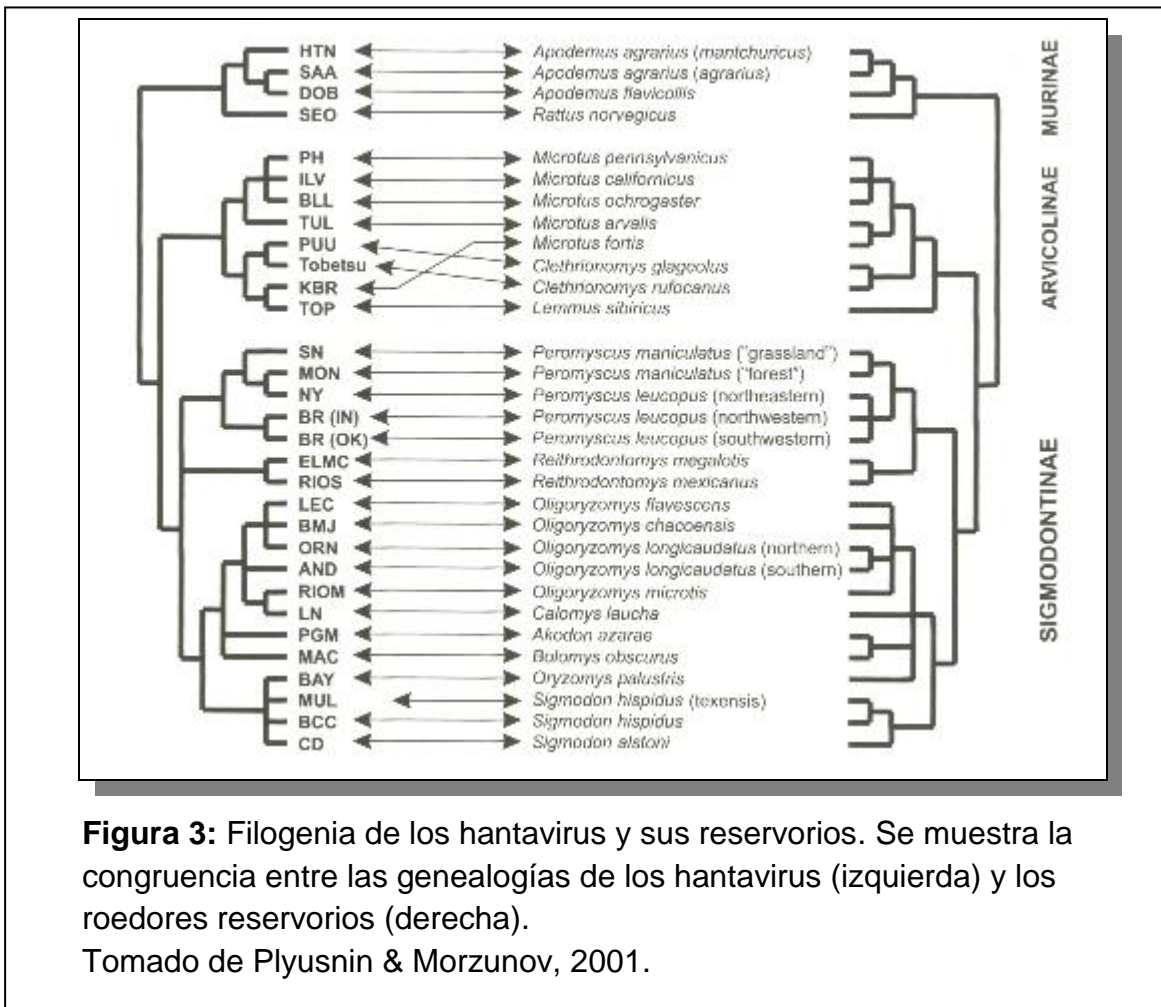
nuevo ambiente. Pero generalmente las sustituciones entre las diferentes cepas son silentes (generalmente por aminoácidos sinónimos).

En roedores, se ha descrito la ocurrencia de reasociaciones genómicas entre variante genéticas de un mismo virus pero no así entre diferentes virus (Li D et al., 1995, Rodriguez L et al., 1998). Si un virus tiene un genoma segmentado y si dos variantes de ese virus infectan un mismo huésped, los viriones progenie pueden resultar con algunos segmentos de un progenitor, y con otros segmentos de otro progenitor.

Las variantes genéticas dentro de un mismo tipo de hantavirus, mostraron agrupaciones geográficas (Henderson W et al., 1995, Razzauti M et al., 2009). Se observa un aumento en la virulencia hacia humanos cuando hay variantes por reasociación de hantavirus patogénicos (Rodriguez L et al., 1998).

En la naturaleza, los hantavirus, se mantienen a través de infecciones persistentes en sus roedores huéspedes. Cada hantavirus se encuentra predominantemente asociado con una especie de roedor en particular, o con unas pocas especies cercanamente relacionadas.

Como resultado de millones de años de asociación virus-huésped, se dice que los mismos han co-evolucionado, lo cual se pone en evidencia por la alta concordancia de la filogenia de los virus y la de sus huéspedes reservorios que refleja la co-evolución con los mismos (Figura 3) (Plyusnin A and Morzunov S, 2001).



Si bien existen limitaciones biológicas que favorecen el mantenimiento de cada tipo viral en determinada especie de roedor, eventualmente estas barreras pueden ser sobrepasadas, dando lugar a lo que se denomina “cambio de huésped” (host switch) (Levis S et al., 1998).

La distribución actual de los hantavirus refleja una compleja historia de eventos de co-especiación y migraciones de los roedores reservorios. En consecuencia, distintos hantavirus circulan por los continentes y virus similares coexisten en determinadas áreas geográficas dando lugar a agrupamientos geográficos de las variantes virales.

Por otro lado, el ser humano es un huésped secundario, y constituye una “vía muerta” para el proceso evolutivo de estos virus.

4.2 Transmisión viral al hombre

La principal entrada del virus en el cuerpo humano se produce por el sistema respiratorio, a través de la inhalación de aerosoles de excreciones y secreciones de roedores infectados. Otra vía de transmisión, menos frecuente, es a través de la saliva de roedores infectados en casos de mordeduras.

Hasta 1996, no se había documentado la transmisión persona a persona de los hantavirus. En un brote inusual de SPH en El Bolsón, Bariloche, se documenta por primera vez la transmisión interhumana (Wells R et al., 1997, Padula P et al., 1998). El mecanismo específico de la transmisión es desconocido, y pese a que este fenómeno no parece ser generalizado, no se puede predecir si representa un evento aislado, de presentación muy infrecuente, o si podría ser un hecho más generalizado.

Existen actividades que aumentan el riesgo de exposición y posible infección humana. Entre ellas se encuentran las actividades rurales, agrícolas y los conflictos bélicos.

5. ENFERMEDADES CAUSADAS POR LOS HANTAVIRUS

5.1 Fiebre Hemorrágica con Síndrome Renal (FHSR)

La Fiebre Hemorrágica con Síndrome Renal es causada por hantavirus de origen eurasiático. Se presenta en cinco etapas progresivas: fase febril, fase hipotensiva, fase oligúrica, fase diurética y fase convaleciente.

La aparición de los síntomas casi siempre es repentina. La fase febril dura de tres a siete días. El paciente presenta fiebre, escalofríos, malestar general, debilidad, anorexia, cefalea, vértigos y dolor retro-ocular. También se puede presentar dolor abdominal intenso, dolor de espalda y en la región renal. Se evidencian los primeros síntomas hemorrágicos conjuntivales y petequias diseminadas en axilas, cuello, cara, paladar blando y tórax anterior.

Después de la etapa febril se desarrolla la hipotensión, que puede durar algunas horas o días y, durante la cual, puede haber taquicardia, hipotensión, náuseas, vómitos, disminución de la conciencia, confusión y hemorragias capilares. Hay además proteinuria, hematuria, elevación de la urea y de la creatinina séricas. Alrededor de 30% de las muertes ocurre en esta etapa debido a la permeabilidad vascular y choque agudo. Los pacientes que sobreviven y progresan a la fase diurética muestran mejoría de la función renal, pero existe el riesgo de morir por complicaciones pulmonares o choque.

A diferencia de la mayoría de las fiebres hemorrágicas, la respuesta inmunitaria, en pacientes con FHSR, se presenta en las etapas tempranas de la infección; hay evidencias que sugieren que la reacción inmunitaria puede ser un mecanismo inductor de la patogenia de la FHSR.

La fase oligúrica dura de tres a siete días. Hay hipertensión causada por hipervolemia debido a la oliguria. Aparecen hemorragias cerebrales, conjuntivales, digestivas, genitales y púrpura. La muerte se puede producir debido al daño vascular y el shock agudo.

Cuando se resuelven las complicaciones hemorrágicas y renales, se ingresa en la fase diurética y, finalmente, en la fase convaleciente que se caracteriza por hipostenuria de varias semanas (Peters C et al., 1999).

5.2 Síndrome Pulmonar por Hantavirus (SPH)

El Síndrome Pulmonar por Hantavirus es causado por hantavirus de origen americano. Su reconocimiento precoz resulta difícil debido a lo inespecífico de los síntomas. Se presenta en cuatro etapas progresivas: fase prodrómica, fase cardio-respiratoria, fase diurética y fase de convalecencia.

La primera fase o prodrómica, en forma típica, dura de cuatro a seis días, y es idéntica a otros pródromos virales. Se caracteriza por fiebre, mialgias, escalofríos, astenia, mareos, cefaleas, anorexia, náuseas, vómitos, dolor abdominal y diarrea. En general los signos típicos de enfermedad respiratoria alta, tales como faringitis, rinorrea, sinusitis y dolor de oídos, no se presentan. En los comienzos del pródromo no se han señalado manifestaciones como tos, taquipnea y disnea con el ejercicio, pero aparecen en una etapa ulterior y anticipan el comienzo del edema pulmonar.

La fase cardio-respiratoria se caracteriza por la evolución rápida de la hipotensión y el edema pulmonar. La radiografía de tórax es típica y muestra la aparición de líneas de Kerley B, manguitos peribronquiales y líquido alveolar-intersticial en los segmentos basales del pulmón. En este punto se manifiesta la hipoxemia, la tos y la taquipnea. El incremento extraordinario de la permeabilidad de los capilares pulmonares ocasiona edema pulmonar, en el que el líquido tiene abundantes proteínas. La hipovolemia resultante del paso de líquido de la sangre circulante a los planos intersticiales del pulmón y a los espacios aéreos contribuye a la hipotensión arterial. El deterioro que se produce en esta fase puede causar la muerte del paciente en menos de 48 horas.

En la fase diurética el edema pulmonar comienza a resolverse, ocurre diuresis espontánea, la fiebre y el shock ceden y el paciente comienza a recuperarse.

La convalecencia se extiende de dos semanas a dos meses. La recuperación al parecer es completa, aunque en algunos casos se han encontrado secuelas, tales como disminución del calibre de las vías aéreas menores. En América del Sur se han descrito otros aspectos clínicos como complicaciones hemorrágicas y manifestaciones renales, así como también la aparición de la enfermedad en niños, lo cual es poco frecuente en América del Norte (Duchin J et al., 1994, Peters C 1998, Pini N et al., 1998).

6. DIAGNÓSTICO POR ESTUDIOS DE LABORATORIO

La confirmación del diagnóstico de laboratorio de infección por hantavirus se lleva a cabo mediante varias técnicas:

- Detección serológica: el método más práctico para el diagnóstico en el laboratorio de infección por hantavirus en los humanos es la detección de anticuerpos IgM en muestras de suero de casos agudos utilizando la técnica ELISA de captura de IgM. Si bien se puede recurrir a la técnica ELISA para detectar anticuerpos IgG y así confirmar el diagnóstico, es necesario obtener dos muestras de suero con una diferencia de dos a tres semanas para advertir los títulos crecientes de los anticuerpos IgG.
- Detección de material genético viral, reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR): esta técnica se utiliza para detectar ARN viral en sangre entera, coágulos o tejidos obtenidos en los primeros 10 días de la enfermedad, como así también en tejidos de roedores infectados. (Nichol S et al., 1993)
- Inmunohistoquímica: detección de antígenos virales en células infectadas presentes en tejidos fijados. Esta técnica cobra particular importancia en casos fatales en los que no se dispone de otro tipo de muestras (Zaki S et al., 1995).

7. ANTECEDENTES EN ARGENTINA

En Argentina, los casos de SPH fueron identificados a principio de los años 80. Desde entonces, han sido reconocidas tres áreas endémicas de SPH geográfica y ecológicamente distintas: la zona noroeste subtropical de Orán, entre las provincias de Salta y Jujuy, cerca de la frontera con Bolivia; la región templada central de las pampas, entre las provincias de Buenos Aires, Santa Fe y Entre Ríos, y la región boscosa y fría de El Bolsón, Provincia de Río Negro en el suroeste Argentino, cerca al rango Andino (Levis SC et al., 1995).

Después del brote de 1993 en América del Norte, se emprendió la vigilancia activa, prospectiva y retrospectiva de enfermos con un cuadro inicial de fiebre y un síndrome de insuficiencia respiratoria inexplicada entre 1987 y 1995.

Un incremento en el número de casos de SPH fue hallado entre 1995 y 1999. Sin embargo, los porcentajes de letalidad identificados durante este período disminuyeron notablemente desde el primer brote de SPH en El Bolsón en 1996.

Hasta 1995, no se habían detectado en Argentina casos de SPH en niños menores de 12 años. Sin embargo, posteriormente se ha encontrado una proporción de casos, mayor que la observada en los EE.UU (Pini N et al., 1998).

Durante la primavera de 1996, un brote importante en El Bolsón, Río Negro, afectó a 18 personas. Durante el mismo, los datos epidemiológicos, moleculares y ecológicos confirmaron la transmisión persona a persona y al virus Andes como el agente causal (Wells R et al., 1997, Padula P et al., 1998).

Desde 1997 hasta 2001, las notificaciones de casos compatibles con SPH se mantuvieron en un rango de 51 a 82 casos, que ocurrieron particularmente en las provincias de Salta,

Jujuy, Santa Fe, Buenos Aires, Río Negro, Chubut y Neuquén (Enría D et al., 1997, Piudo L et al., 2005, Enría D 1998). Salta continúa siendo la provincia de Argentina con el número más alto de casos de SPH notificados por año, excepto para 1996, cuando un evento de transmisión interhumana de SPH que involucró 18 casos ocurrió en el sur del país (Gonzalez Della Valle M et al., 2002).

Actualmente, Argentina posee el mayor número notificado de casos de SPH en las Américas, el cual hasta finales del año 2004 se había incrementado a más de 500 casos, con tasas de letalidad que variaron de acuerdo a la región: norte: 19%; sur : 21% y centro: 28.1%.

Hipótesis

La diversidad genética observada en la región endémica noroeste de Argentina es posible fuente de fenómenos de reasociación genómica.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento de aspectos moleculares y epidemiológicos de los hantavirus asociados a SPH en la provincia de Jujuy, Argentina.

2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Amplificar un fragmento del segmento genómico M mediante la técnica de RT-PCR anidada utilizando *primers* consenso para la detección molecular de los hantavirus circulantes en Argentina (Levis S.comunicación personal).
- Amplificar un fragmento del segmento genómico S mediante la técnica de RT-PCR anidada utilizando *primers* consenso para la detección molecular de los hantavirus circulantes en Argentina (Levis S.comunicación personal).
- Analizar y comparar la filogenia en los fragmentos obtenidos.



MATERIALES Y MÉTODOS

Los estudios moleculares se realizaron mediante extracción del ARN viral, amplificación por la técnica de RT-PCR y posterior secuenciación de los fragmentos amplificados. Se seleccionaron muestras humanas de coágulos de casos de SPH registrados en la provincia de Jujuy, confirmados mediante la detección de anticuerpos IgM por ELISA.

1. SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Para la extracción de ARN viral y posterior amplificación y secuenciación viral se seleccionaron muestras humanas de coágulos de casos de SPH confirmados serológicamente mediante detección de anticuerpos IgM reactivos para hantavirus entre los años 2000 y 2010. Las muestras de pacientes internados en centros hospitalarios de la provincia de Jujuy fueron remitidas refrigeradas al INEVH, donde se conservaron a -86°C hasta el momento de su estudio. En general, las muestras sufrieron una demora de, al menos, 48 hs en ser recibidas en el INEVH.

2. EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL

Todas las muestras fueron procesadas en gabinetes de seguridad biológica, en laboratorios de nivel de bioseguridad BSL2. Los procedimientos de extracción del ARN viral y la posterior reacción de RT-PCR se realizaron en campanas de flujo laminar y ambientes diferentes, a los efectos de minimizar el riesgo de contaminaciones cruzadas.

El ARN total se extrajo de muestras humanas de coágulo, utilizando el método de TRIzol (Chomczynski P and Mackey K, 1995). Para ello, 50-100 mg de coágulo fueron homogeneizados y tratados con 1 ml de Trizol, cuya función es la desnaturalización de proteínas y ruptura de las estructuras celulares. A continuación, al homogeneizado se lo trató

con 200 µl de cloroformo, el cual separa la solución en una fase acuosa, donde se encuentra el ARN y, una interfase donde se encuentran los restos de proteínas. Mediante el agregado de 500 µl de isopropanol a la fase acuosa, se deshidrata el ARN. Posteriormente, se logra la precipitación del ARN mediante el lavado del mismo con 800 µl de etanol 70%. Finalmente éste se rehidrata con 20 µl de agua despirogenada libre de ARNasa. Las muestras se conservaron a -70°C hasta su procesamiento.

3. RT-PCR ANIDADA

La amplificación del material genético se realizó mediante reacción conjunta en un tubo de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), modalidad anidada (Nichol S et al., 1993). Para evitar las contaminaciones cruzadas, se utilizaron gabinetes de seguridad biológica y laboratorios diferentes para la preparación de la mezcla de reactivos, así como para el agregado del molde de ácido nucleico viral a la primera reacción de PCR y a la reacción de PCR anidada. La transcripción reversa y primera ronda de la reacción de PCR se realizó en un volumen de final 30 µl, con buffer de PCR con 1,8 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada deoxinucleótido (dATP, dCTP, dTTP y dGTP), 1,2 unidades de *Taq* ADN polimerasa, 1 unidad de transcriptasa reversa y 100 ng de cada *primer*. Se colocó una gota de aceite mineral sobre la mezcla de reacción y en un ambiente diferente, se adicionó 1 µl de ARN genómico. La reacción de PCR anidada (segunda ronda de PCR) se realizó en las mismas condiciones, utilizando 1 µl del producto de la primera PCR y sin el agregado de la transcriptasa reversa.

Los tubos fueron colocados en un termociclador y sometidos a diferentes ciclos de temperaturas, dependiendo del tamaño de los fragmentos a amplificar. Se utilizaron los siguientes programas:

1. Para fragmentos menores de 600pb:

RT-PCR: 41°C – 1 hora + 94°C – 2 minutos + 30 x (94°C – 30 segundos + 37°C – 30 segundos + 72°C – 1 minuto) + 10 x (94°C – 30 segundos + 37°C – 30 segundos + 72°C – 2 minutos) + 72°C – 7 minutos + 15°C - ∞

PCR ANIDADA: 94°C – 2 minutos + 30 x (94°C – 30 segundos + 37°C – 30 segundos + 72°C – 1 minuto) + 10 x (94°C – 30 segundos + 37°C – 30 segundos + 72°C – 2 minutos) + 72°C – 7 minutos + 15°C - ∞

2. Para fragmentos mayores de 600pb:

RT- PCR: 41°C – 1 hora + 94°C – 2 minutos + 30 x (94°C – 30 segundos + 37°C – 30 segundos + 72°C – 3 minutos) + 10 x (94°C – 30 segundos + 37°C – 30 segundos + 72°C – 4 minutos) + 72°C – 7 minutos + 15°C - ∞

PCR ANIDADA: 94°C – 2 minutos + 30 x (94°C – 30 segundos + 37°C – 30 segundos + 72°C – 3 minutos) + 10 x (94°C – 30 segundos + 37°C – 30 segundos + 72°C – 4 minutos) + 72°C – 7 minutos + 15°C - ∞

Primers: Se utilizaron dos juegos de *primers* para la amplificación de fragmentos diagnósticos correspondientes a los segmentos genómicos M (Gn y Gc) y S (Nucleoproteína) (Tabla 4).

Tabla 4: *Primers* utilizados para la reacción de RT-PCR anidada, para la amplificación y secuenciación parcial de fragmentos de los segmentos genómicos M (Gn y Gc) y S (N) de los hantavirus caracterizados de muestras de casos de SPH.

Segmento genómico	Ronda de RT-PCR	Nombre del primer	Secuencia del primer [5'-3']	Tamaño del fragmento	Especificidad
M-Gc	1	2609 F	GGGCC(C/T)TTAGAGCAAGGI ² GG	740 nt	Genérico
		3348 R	CTGTCC AGATTTAGTGTCCAGA		
	2	2708 F	ATGAG(C/T)TG(A/G)CCTGA(C/T)CA(A/G)ACTGG	513 nt	
		3221 R	TCAGAAGAGCAGTCAGTGTCATG		
S-N	1	143 F	TGGACCC(G/T)GATGA(A/G)GTTAACA A	848 nt	Genérico
		990 R	AGGGGCACATGAGAAGACCCA		
	2	276 F	ACAGGGCTTGAGCCTGATGA	461 nt	
		736 R	TC(A/T)AT(A/G)C(T/G)TTCCATCCA(C/T)TC		

4. VISUALIZACIÓN DEL ADN

Los productos de PCR anidada fueron analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%. Los geles se prepararon con buffer TAE 1X y Bromuro de Etidio (BrEt-concentración de 0.5 µg/ml) o Syber Green (10.000X) al 10%. Se utilizó un marcador de peso molecular, DNA Ladder 100 pb. El gel con las muestras fue sometido a electroforesis (80V) durante 60 minutos. La visualización de las bandas se realizó con transiluminador de luz ultravioleta (300 nm) en el caso del Bromuro de Etidio y un transiluminador de luz LED en el caso del Syber Green. Los fragmentos del tamaño esperado fueron cortados del gel y conservados a -20°C hasta su posterior purificación.

5. PURIFICACIÓN DEL ADN Y SECUENCIACIÓN

Las bandas de ADN fueron purificadas de los geles utilizando el kit de Qiagen que emplea columnas de sílica, de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. La cantidad de ADN

fue determinada mediante electroforesis en condiciones similares a las descritas previamente, y por comparación visual con un marcador de ADN estándar de concentración conocida (DNA mass-ladder, Gibco, Rockville, MD, EE.UU.). La secuenciación nucleotídica de los fragmentos de ADN se realizó directamente mediante la técnica de secuenciación automática "dideoxy" en un secuenciador Abiprism 3100 utilizando los mismos *primers* usados en la amplificación por PCR.

Las secuencias nucleotídicas obtenidas se analizaron comparándolas con las secuencias de otras cepas de hantavirus caracterizadas en distintas partes del mundo, disponibles en el GenBank, utilizando el buscador BLAST® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

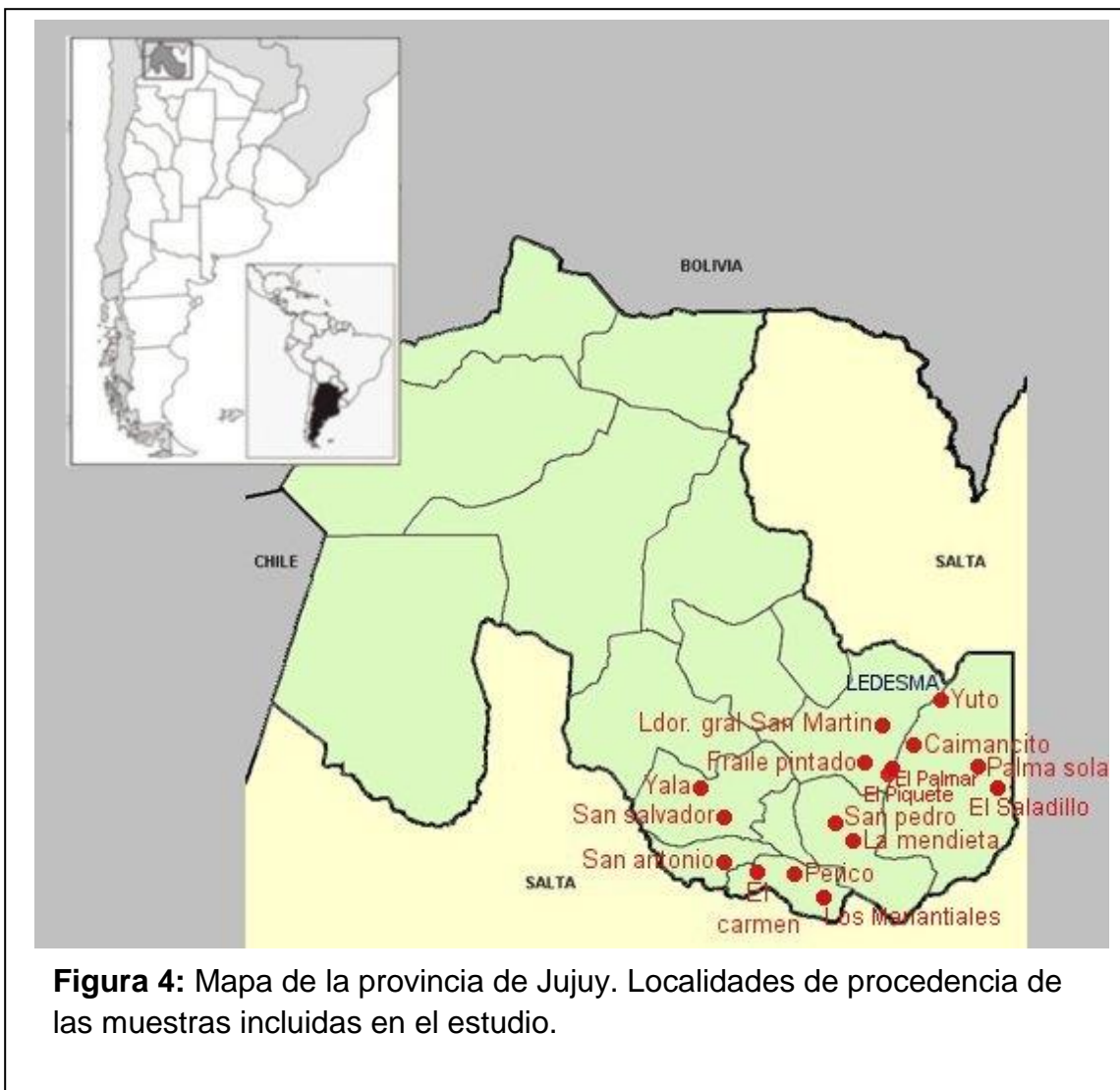
Las secuencias nucleotídicas se alinearon utilizando ClustalW (Thompson J et al., 1994). El análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas se realizó utilizando el método de Neighbour-Joining implementado en MEGA 5.05 (Saitou N and Nei M, 1987).

RESULTADOS

En el estudio se incluyeron 46 muestras correspondientes a casos de SPH confirmados serológicamente por técnica de ELISA IgM. Los casos se registraron en el período 2000-2010, y procedían de 17 localidades de la provincia de Jujuy. En 1 caso no se consignaba la localidad de procedencia (*sin determinar) (Tabla 5, Figura 4).

Tabla 5: Procedencia de los casos de SPH incluidos en el estudio.

Localidad	Numero de muestras
Caimancito	2
El Carmen	3
El Palmar	1
El Piquete	1
El Saladillo	1
Fraile Pintado	4
*Sin determinar	1
La Mendieta	1
Ldor. Gral. San Martín	3
Ledesma	3
Los Manantiales	1
Palma Sola	6
Perico	1
San Antonio	2
San Pedro	7
San Salvador	3
Yala	1
Yuto	5
Total	46

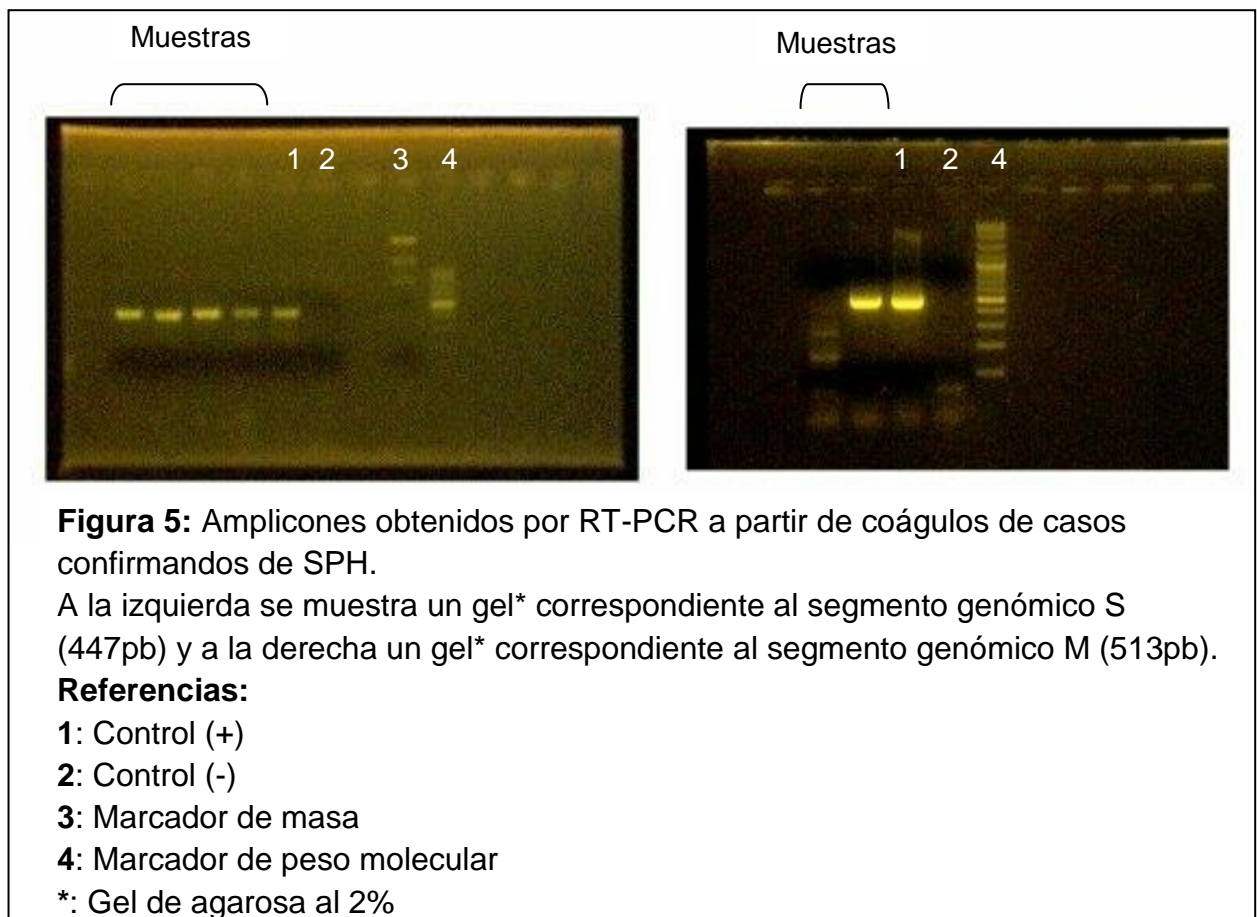


Se realizó la extracción de ARN total de 46 muestras de coágulo. Las muestras fueron luego procesadas por RT-PCR anidada para amplificar fragmentos del ARN viral de los segmentos genómicos S y M de 447 pb y 513 pb, respectivamente). Sobre un total de 46 muestras de casos de SPH estudiadas, se amplificaron fragmentos del tamaño esperado de 37 muestras para el segmento genómico S y 39 muestras para el segmento genómico M. En la figura 5 se muestran ejemplos de reacciones de PCR positivas y los controles utilizados en la reacción.

Se purificaron las bandas en gel de agarosa y posteriormente se secuenciaron utilizando los mismos *primers* usados en las PCRs anidadas correspondientes al segmento M (M2708F y M3221R) y S (S276F y S736R) (ver tabla 4).

Se obtuvieron las secuencias nucleotídicas específicas de 34 muestras correspondientes al segmento genómico S y 35 correspondientes al segmento genómico M. De las 3 muestras faltantes del segmento genómico S, 2 se excluyeron del estudio por ser secuencias inespecíficas, y 1 por no lograr una correcta secuenciación a causa de insuficiencia del producto de PCR.

Respecto a las 4 muestras faltantes del segmento genómico M, no se logró una correcta secuenciación por insuficiencia del producto de PCR.




1. COMPARACION DE SECUENCIAS Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Las 69 secuencias nucleotídicas obtenidas de las muestras estudiadas fueron comparadas con las secuencias disponibles en el Genbank utilizando la herramienta *Blast* (*Basic Local Alignment Search Tool*). El análisis puso en evidencia la existencia de 3 genotipos de hantavirus patógenos para el hombre en las muestras estudiadas: a) genotipo Orán, virus cuyo reservorio roedor fue identificado como *Oligoryzomys chacoensis*; b) genotipo Bermejo, asociado a *O. flavescens*, y c) el virus Laguna Negra, asociado a *C. fecundus* en la región de estudio.

A continuación se brindan ejemplos de los resultados obtenidos mediante la búsqueda por *Blast* de tres secuencias obtenidas:

a. Caso de SPH 67085: el genotipo identificado fue Orán.

```
>  gb|AF482715.1| Oran virus strain 22996 segment S, complete sequence

Length=1919

Score = 656 bits (355), Expect = 0.0
Identities = 396/416 (95%), Gaps = 1/416 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1      TGACTGGTCCTGATGATATTCCTGGCTTTCACCTTGTGCAGGGAAGAGCCCACATGCAATT 60
            |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct 700     TGACTGG-ACTGATGATGTTTCTGGCTTTCACCTTGTGCAGGGAAGAGTCCACATGCAATT 642

Query 61     GTCCTGAACCGTCCAGGTGTTATCTCTTCAGCCTTCATTGTTGATTGTGCAGTTGGCATT 120
            |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct 641     GTCCTGAACCGTCCAGGTGTTATCTCTTCAGCCTTCATTGTTGATTGTGCAGTTGGCATT 582

Query 121    GACACATATAGATGCTTTGGTTTTTCGGATACCGTTAACCTCTTCAAATGATGAGTCGTCC 180
            |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct 581     GACACATAGAGATGCTTCGGTTTTCCGGATACCGTTGACCTCTTCAAATGATGAGTCATCC 522

Query 181    TTGAACCTTATTCTAGTCCCCTTGTTGTCTTTGACAGTTTGTCTCCCACGGGTGGAAAGC 240
            |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct 521     TTGAACCTTATTCTAGTCCCCTTGTTGTCTTTGACAGTTTGTCTCCCACGGGTGGAAAGC 462

Query 241    ATGTAGAGAGCTTTCAGGATGATTGGAATGGCAAATCCTAATATATAGGCCCAATAGCT 300
            |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
Sbjct 461     ATGTAGAGAGCTTTCAGGATGATTGGTATGGCAAATCCTAATATGTAGGCCCAATAGCT 402

Query 301    TTCCAATCTGCAGTTTGACCCTTGGTTCTTCAAGATCAATGGAGTTGACATCCAGGACA 360
            |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||  |||
```

```

Sbjct  401  TTCCAATCAGCAGTTTGACCACTTGGCTCTTCAAGATCAATGGAGTTGACATCCAGGACA  342
Query  361  TTCCCATAGCGAAGAGATGATTTTTTCTTTCAGATGGTCATCAGGTTCAATCACTGT  416
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct  341  TTCCCATAACGGAGAGATGATTTTTTCTTTCAGATGATCATCAGGCTCAAGCCCTGT  286

```

>

b. Caso de SPH 68344: el virus identificado fue Laguna Negra.

> **gb|JQ775500.1|** Laguna Negra virus strain AN650204 nucleocapsid protein (N) gene, partial cds
Length=435

Score = 468 bits (253), Expect = 2e-128
Identities = 359/412 (87%), Gaps = 0/412 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query  8      TATGGGAATGTTCTGGATGTCAATGCAATTGATCTTGAAGAACCCAGCGGTCAGACAGCT  67
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct  7      TATGGGAATGTCTTGGATGTGAATGCAATTGACCTTGAAGAACCAAGTGGTCAAACAGCG  66

Query  68      GACTGGAAGGCAATTGGAGCTTATATCTTGGGCTTTGTGATACCTATAATCCTCAAAGCC  127
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct  67      GATTGGAAGGCAATTGGAGCTTATATCCTAGGCTTTGTGATACCTATAATCCTTAAGGCC  126

Query  128     CTATATATGCTATCAACAAGAGGTAGGCAGACTGTTAAGGAAAACAAAGGAACCCGGATT  187
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct  127     TTATATATGCTTTCAACAAGAGGTAGGCAGACTGTTAAAGAGAACAAGGGACCCGGATT  186

Query  188     CGATTCAAGGATGATTCTTCATTTGAAGAAGTTAATGGTATCAGGAAACAAAACATCTA  247
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct  187     CGATTCAAGGATGACTCCTCGTTTTGAAGAAGTCAATGGCATCAGGAAGCCTAAACATCTG  246

Query  248     TATGTGTCAATGCCTACTGCGCAATCAACAATGAAAGCAGATGAGATAACACCAGGAAGA  307
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct  247     TATGTTTCATGCCACTGCCAATCTACAATGAAAGCAGATGAGATAACACCAGGGAGG  306

Query  308     TTTAGGACAATCGCATGTGGGTTATTTCCAGCTCAGATCAAGGCCAGGAATATCATAAGT  367
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct  307     TTTAGGACGATAGCGTGTGGCCTATTCCTGCACAAATCAAAGCTCGGAATATCATAAGT  366

Query  368     CCTGTTATGGGTGTCATTGGGTTTAGCCATTTTGTAAAAGATTGGATGGAAA  419
      ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| ||| |||
Sbjct  367     CCAGTGATGGGTGTCATTGGCTTTGGTCACTTTGTGAAGGATTGGATGGAAA  418

```

c. Caso de SPH 77225: el genotipo identificado fue Bermejo.

> **gb|AF482713.1|** Bermejo virus strain Oc22531 segment S, complete sequence
Length=1933

Score = 699 bits (378), Expect = 0.0
Identities = 396/405 (98%), Gaps = 0/405 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 2 ACAGGGATTGAGCCTGATGATCATCTAAAGGAAAAGTCATCCTTAAGGTATGGCAATGTC 61
      ||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 285 ACAGGGCTTGAGCCTGATGATCATCTAAAGGAAAAGTCATCCTTAAGGTATGGCAATGTC 344

Query 62 CTGGATGTCAACTCCATTGATCTGGAAGAACCAAGTGGACAGACTGCTGATTGGAGGTCC 121
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 345 CTGGATGTCAACTCCATTGATCTGGAAGAACCAAGTGGACAGACTGCTGATTGGAGGTCT 404

Query 122 ATTGGGGCTTACATACTAGGCTTTGCAATCCCAATCATCCTAAAGGCCTTGTATATGCTT 181
      ||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 405 ATTGGGGCTTATATACTAGGCTTTGCAATCCCAATCATCCTAAAGGCCTTGTATATGCTT 464

Query 182 TCTACCCGCGGGCGTCAAACGTCAAGGACAATAAAGGGACTAGAAATACGGTTTAAGGAT 241
      ||||||||| ||||||| ||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 465 TCTACCCGCGGGCGTCAGACTGTCAAAGACAATAAAGGGACTAGAAATACGGTTTAAGGAT 524

Query 242 GATTCATCATTTGAAGAGGTCAATGGCATCCGAAAGCCCAAGCACTTGTATGTGTCCATG 301
      ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 525 GATTCATCATTTGAAGAGGTCAATGGCATCCGAAAGCCCAAGCACTTGTATGTGTCCATG 584

Query 302 CCGACAGCACAGTCAACAATGAAGGCTGAGGAGATAACACCAGGAAGGTTTCAGAACAATT 361
      || |||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||
Sbjct 585 CCAACAGCACAGTCAACAATGAAGGCTGAGGAGATAACACCAGGGAGGTTTCAGAACAATT 644

Query 362 GCATGTGGCCTTTTCCCTGCACAAGTCAAGGCAAGAAACATCATT 406
      ||||||||| ||||||||| ||||||||| |||||||||
Sbjct 645 GCATGTGGCCTCTTCCCTGCACAAGTTAAGGCAAGAAACATCATT 689

```

Se obtuvieron secuencias correspondientes a fragmentos del segmento genómico M de 29 cepas del genotipo Orán, 1 cepa del genotipo Bermejo, y 5 cepas del virus Laguna Negra; y del segmento genómico S se obtuvieron 28 cepas del genotipo Orán, 1 cepa del genotipo Bermejo, y 5 cepas del virus Laguna Negra.

En la tabla 6 se muestra la distribución de los genotipos virales de acuerdo a la procedencia de los casos de SPH incluidos en este estudio.

Tabla 6: Distribución de los genotipos virales según el lugar de procedencia de los casos de SPH estudiados.

Localidad	Número de muestras
Caimancito	ORN (2)
El Carmen	LN (2), ORN (1)
El Palmar	ORN (1)
El Piquete	ORN (1)
El Saladillo	ORN (1)
Fraile Pintado	ORN (3)
*Sin determinar	ORN (1)
La Mendieta	ORN (1)
Ldor. Gral. San Mart	ORN (3)
Ledesma	ORN (3)
Los Manantiales	ORN (1)
Palma Sola	ORN (5)
San Antonio	LN (2)
San Pedro	LN (2), ORN (4)
San Salvador	BMJ (1)
Yuto	ORN (5)
Total	39

Referencias: ORN: Genotipo Oran, LN: Genotipo Laguna Negra y BMJ: Genotipo Bermejo.

Con la información de las secuencias nucleotídicas obtenida, a partir de los casos de SPH estudiados, se realizó el análisis filogenético utilizando el método de Neighbour-Joining implementado en MEGA 5.05 (Saitou N and Nei M, 1987).

El análisis filogenético (Figura 6) de las diferencias nucleotídicas de un fragmento de 513 pb correspondiente al segmento genómico M reveló la existencia de 3 linajes diferentes entre las muestras de diferentes localidades de la provincia de Jujuy estudiadas. Dos de estos linajes, a saber, Orán y Bermejo, se agrupan con los otros linajes argentinos formados por el virus

Andes y el genotipo Hu39694, asociados todos ellos a roedores del género *Oligoryzomys*, formando un clado con un buen soporte de *bootstrap* (80%). Dentro de este clado, las cepas del genotipo Oran del presente estudio se posicionan con la cepa previamente caracterizada disponible en el genbank con un elevado valor de *bootstrap* (99%), al igual que la cepa Bermejo del presente estudio con la cepa caracterizada previamente (99% *bootstrap*). Sin embargo, la relación de Orán con el virus Andes y éstos a su vez con Lechiguanas y Bermejo, no se resuelven en el presente análisis.

Estos linajes asociados a *Oligoryzomys* a su vez, aunque divergentes, se agrupan con el subclado formado por el virus Laguna Negra, asociado a roedores del género *Calomys*. Todas las cepas del virus LN del presente estudio se agrupan con un elevado valor de *bootstrap* (100%), aunque divergentes del virus LN previamente caracterizado en Paraguay.

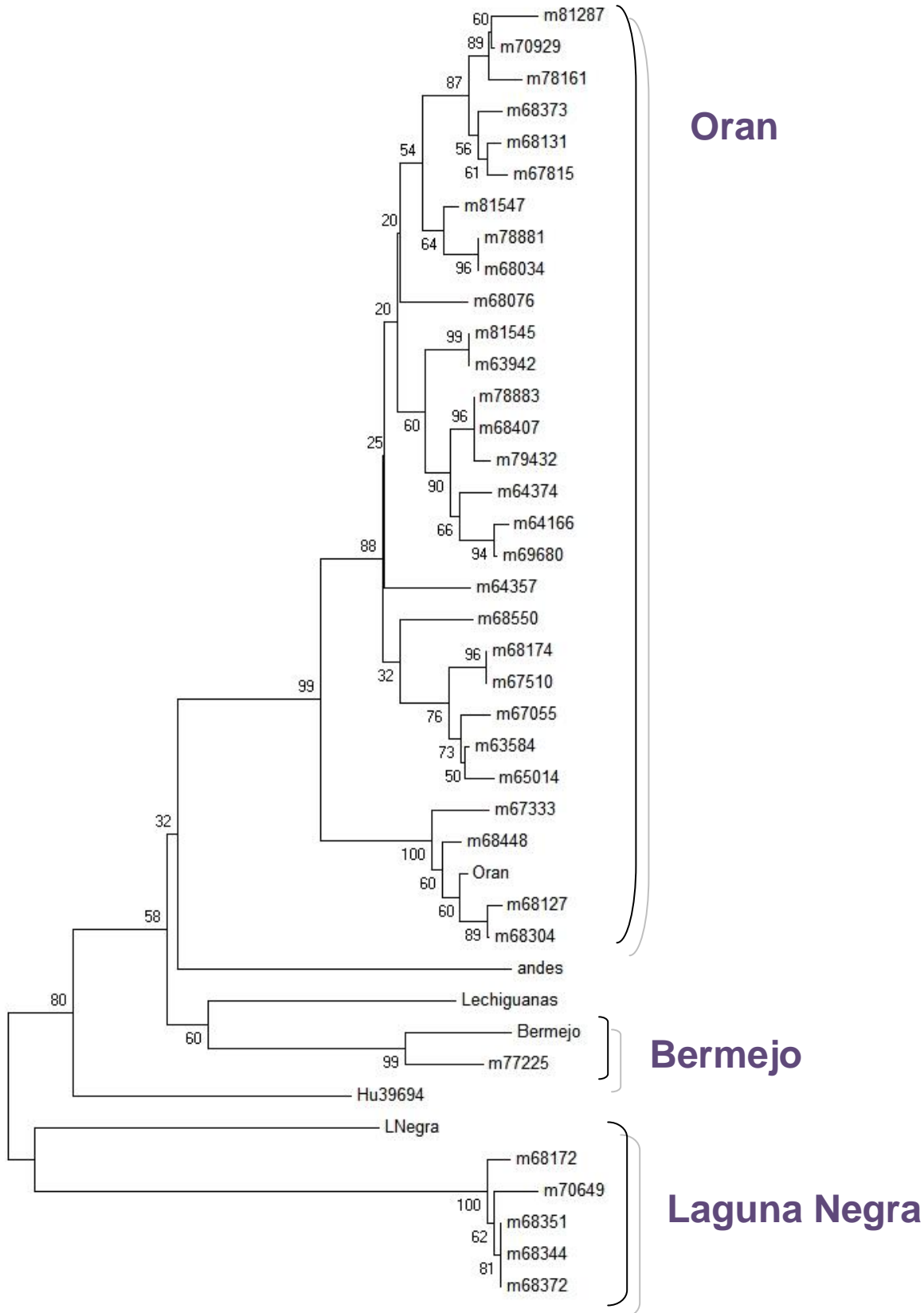


Figura 6: Análisis filogenético de un fragmento de 513 pb del segmento genómico M mediante el método de Neighbour-Joining. Cepas de referencia de Genbank: ANDV: Virus Andes, cepa CHI-7913 (Número acceso AY228238); ORNV: Virus Orán, cepa OI22996 (Número acceso: AF028024); PERV: Virus Pergamino, cepa Aa14403 (Número acceso: AF028028); Genotipo Hu39694 (Número acceso: AF028023); LECV: Virus Lechiguanas, cepa Of22819 (Número acceso: AF028022); BJOV: Virus Bermejo, cepa Oc2253 (Número acceso: AF028025); LNV: virus Laguna Negra (Número acceso: AF005728)

El árbol filogenético obtenido en base a las diferencias nucleotídicas de un fragmento de 447 pb del segmento genómico S (Figura 7) reveló una topología similar al obtenido para el segmento genómico M.

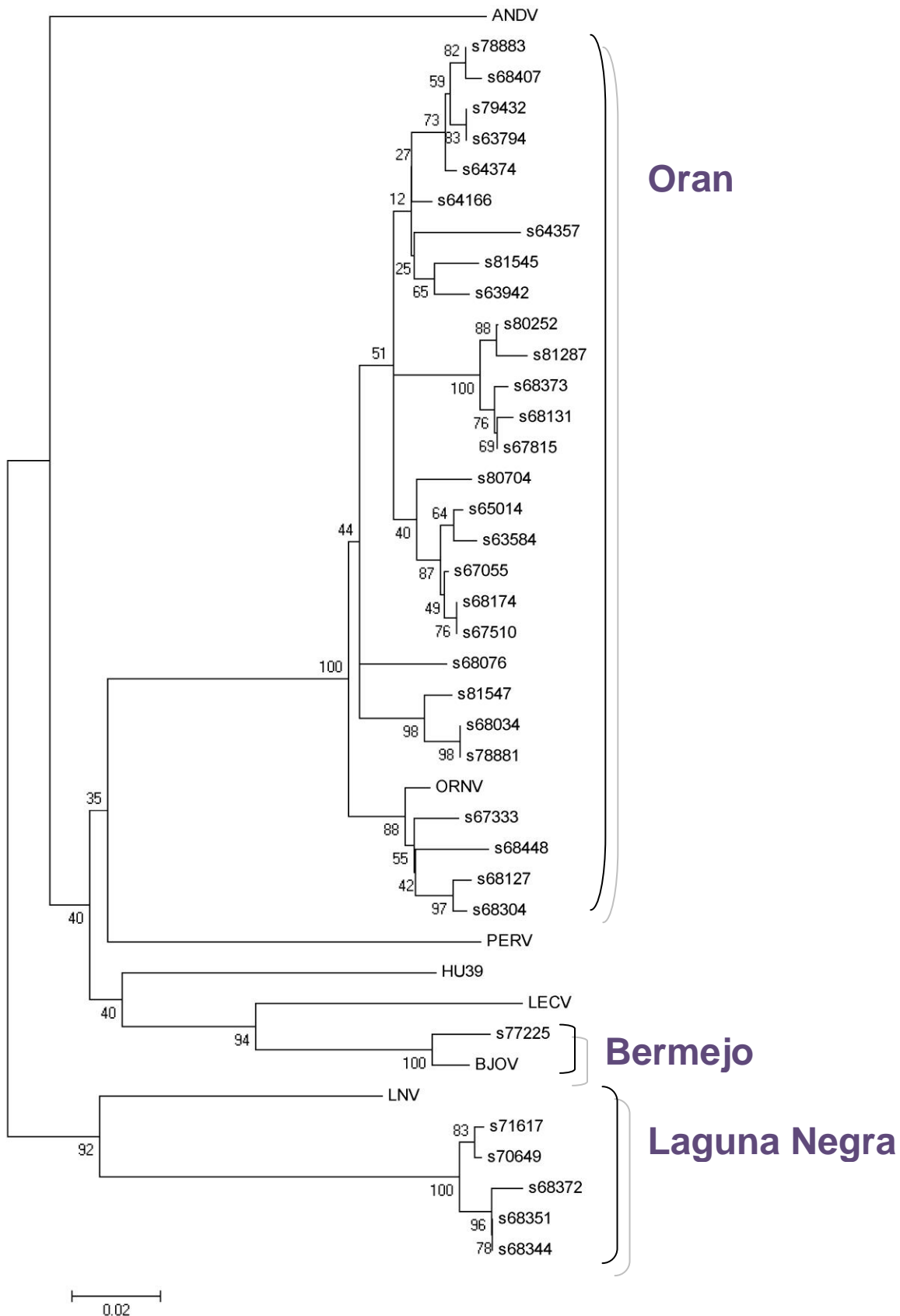


Figura 7: Análisis filogenético de un fragmento de 447 pb del segmento genómico S mediante el método de Neighbour-Joining. Cepas de referencia de Genbank: ANDV: Virus Andes, cepa CHI-7913 (Número acceso AY228237); ORNV: Virus Orán, cepa OI22996 (Número acceso: AF482715); PERV: Virus Pergamino, cepa Aa14403 (Número acceso: AF482717); Hu39: Genotipo Hu39694 (Número acceso: AF482711); LECV: Virus Lechiguanas, cepa Of22819 (Número acceso: AF482714); BJOV: Virus Bermejo, cepa Oc2253 (Número acceso: AF482713); LNV: virus Laguna Negra (Número acceso: AF005727)

1.1 Análisis de las secuencias correspondientes al segmento genómico M:

Las comparación de las secuencias obtenidas de 29 muestras de casos de SPH de 13 localidades diferentes de la provincia de Jujuy, y de una localidad no determinada, demostró que las mismas están genéticamente relacionadas con el genotipo Oran previamente descrito (cepa OI22996, número acceso: AF482715) (0,8%-8,3% divergencia a nivel nucleotídico (nt); 0%-2,4% divergencia a nivel aminoacídico (aa)). Las 29 cepas mostraron una divergencia entre sí de 0%-9,1% nt y 0%-3,7% aa. Estas cepas mostraron una menor divergencia a nt con el genotipo Lechiguanas (13,4%), mientras que la mayor divergencia la presentó con el virus Laguna Negra (22,1%). A nivel aa las cepas obtenidas no mostraron divergencia con los genotipos Lechiguanas y Bermejo, mientras que la mayor divergencia presentada fue con el virus Laguna Negra (9,8%) (Tabla 7).

La comparación de la cepa Bermejo con la cepa de genbank (cepa Oc2253, número acceso: AF482713), a nivel nt, presentó una divergencia de 4,3%; mientras que a nivel aa no presentó diferencias. El tipo viral que mostró menor divergencia a nivel nt con el genotipo Bermejo fue el genotipo Lechiguanas (13,8%), mientras que la mayor divergencia la presentó el genotipo Hu39694 (18,6%). A nivel aa la menor divergencia fue con los genotipos Lechiguanas y Oran (1,2%); mientras que la mayor divergencia fue con el virus Laguna Negra (7,3%).

Finalmente, la comparación de las secuencias nt recuperadas de 5 muestras de casos de SPH de 3 localidades diferentes de la provincia de Jujuy (Tabla 6) demostró que las mismas están genéticamente relacionadas con el virus Laguna Negra previamente descrito (número acceso: AF005728) (19%-19,4% de divergencia nt; 3,7%-4,9% divergencia aa). Las 5 cepas de virus Laguna Negra mostraron una divergencia entre sí de 0%-2%, y 0%-1,2% a nivel nt y aa, respectivamente (Tabla 7). Este tipo viral mostró una menor divergencia nt con el genotipo HU39694 (18,2%), mientras que la mayor divergencia la presentó con el genotipo Bermejo (25,3%). A nivel aa mostró una menor divergencia con los genotipos HU39694, Lechiguana y Orán (8,5%), mientras que la mayor divergencia la presentó con los genotipos Andes y Bermejo (11%).

Tabla 7: Comparación de las secuencias de nucleótidos (1° tabla) y de aminoácidos (2° tabla) de un fragmento de 513 nt del segmento genómico M de 35 cepas de hantavirus de casos de síndrome pulmonar por hantavirus de la provincia de Jujuy, con otros hantavirus conocidos.

m78883	0.000	m81547	
m67333	0.012 0.012	m78883	
m63684	0.000 0.000 0.012	m67333	
m81287	0.024 0.024 0.037 0.024	m63684	
m65014	0.012 0.012 0.024 0.012 0.037	m81287	
m78881	0.000 0.000 0.012 0.000 0.024 0.012	m65014	
m68174	0.000 0.000 0.012 0.000 0.024 0.012 0.000	m78881	
m68850	0.012 0.012 0.024 0.012 0.037 0.024 0.012 0.012	m68174	
m70929	0.000 0.000 0.012 0.000 0.024 0.012 0.000 0.000 0.012	m68850	
m79432	0.012 0.012 0.024 0.012 0.037 0.024 0.012 0.012 0.024 0.012	m70929	
m81545	0.000 0.000 0.012 0.000 0.024 0.012 0.000 0.000 0.012 0.000 0.012	m79432	
m78161	0.000 0.000 0.012 0.000 0.024 0.012 0.000 0.000 0.012 0.000 0.012	m81545	
m68344	0.085 0.085 0.098 0.085 0.098 0.085 0.085 0.098 0.085 0.098 0.085 0.085	m78161	
m68351	0.085 0.085 0.098 0.085 0.098 0.085 0.085 0.098 0.085 0.098 0.085 0.000	m68344	
m70649	0.085 0.085 0.098 0.085 0.098 0.085 0.085 0.098 0.085 0.098 0.085 0.000	m68351	
m68372	0.085 0.085 0.098 0.085 0.098 0.085 0.085 0.098 0.085 0.098 0.085 0.012	m70649	
m67510	0.000 0.000 0.012 0.000 0.024 0.012 0.000 0.000 0.012 0.000 0.000 0.085 0.085 0.085 0.085	m68372	
m68131	0.012 0.012 0.024 0.012 0.037 0.024 0.012 0.012 0.024 0.012 0.024 0.012 0.073 0.073 0.073 0.073 0.085 0.073 0.012	m67510	
m68407	0.000 0.000 0.012 0.000 0.024 0.012 0.000 0.000 0.012 0.000 0.000 0.085 0.085 0.085 0.085 0.098 0.085 0.000 0.012 0.012	m68131	
m67815	0.012 0.012 0.024 0.012 0.037 0.024 0.012 0.012 0.024 0.012 0.012 0.073 0.073 0.073 0.073 0.085 0.073 0.012 0.000 0.012	m68407	
m68034	0.000 0.000 0.012 0.000 0.024 0.012 0.000 0.000 0.012 0.000 0.000 0.085 0.085 0.085 0.085 0.098 0.085 0.000 0.012 0.012	m67815	
m68076	0.012 0.012 0.024 0.012 0.037 0.024 0.012 0.012 0.024 0.012 0.012 0.085 0.085 0.085 0.085 0.098 0.085 0.000 0.012 0.012	m68034	
m68127	0.000 0.000 0.012 0.000 0.024 0.012 0.000 0.000 0.012 0.000 0.000 0.085 0.085 0.085 0.085 0.098 0.085 0.000 0.012 0.012	m68076	
m64374	0.012 0.012 0.024 0.012 0.037 0.024 0.012 0.012 0.024 0.012 0.012 0.085 0.085 0.085 0.085 0.098 0.085 0.000 0.012 0.012	m68127	
m64357	0.000 0.000 0.012 0.000 0.024 0.012 0.000 0.000 0.012 0.000 0.000 0.085 0.085 0.085 0.085 0.098 0.085 0.000 0.012 0.012	m64374	
m67055	0.000 0.000 0.012 0.000 0.024 0.012 0.000 0.000 0.012 0.000 0.000 0.085 0.085 0.085 0.085 0.098 0.085 0.000 0.012 0.012	m64357	
m63942	0.000 0.000 0.012 0.000 0.024 0.012 0.000 0.000 0.012 0.000 0.000 0.085 0.085 0.085 0.085 0.098 0.085 0.000 0.012 0.012	m67055	
m64166	0.012 0.012 0.024 0.012 0.037 0.024 0.012 0.012 0.024 0.012 0.012 0.085 0.085 0.085 0.085 0.098 0.085 0.000 0.012 0.012	m63942	
m68304	0.000 0.000 0.012 0.000 0.024 0.012 0.000 0.000 0.012 0.000 0.000 0.085 0.085 0.085 0.085 0.098 0.085 0.000 0.012 0.012	m64166	
m68448	0.000 0.000 0.012 0.000 0.024 0.012 0.000 0.000 0.012 0.000 0.000 0.085 0.085 0.085 0.085 0.098 0.085 0.000 0.012 0.012	m68304	
m69680	0.012 0.012 0.024 0.012 0.037 0.024 0.012 0.012 0.024 0.012 0.012 0.085 0.085 0.085 0.085 0.098 0.085 0.000 0.012 0.012	m68448	
Hu39694	0.024 0.024 0.037 0.024 0.049 0.024 0.024 0.037 0.024 0.037 0.024 0.037 0.024 0.037 0.024 0.037 0.024 0.037 0.024 0.037 0.024	m69680	
Lechiguans	0.000 0.000 0.012 0.000 0.024 0.012 0.000 0.000 0.012 0.000 0.000 0.085 0.085 0.085 0.085 0.098 0.085 0.000 0.012 0.012 0.012	Lechiguans	
Oran	0.000 0.000 0.012 0.000 0.024 0.012 0.000 0.000 0.012 0.000 0.000 0.085 0.085 0.085 0.085 0.098 0.085 0.000 0.012 0.012 0.012	Oran	
LNegra	0.085 0.085 0.098 0.085 0.098 0.085 0.085 0.098 0.085 0.085 0.098 0.085 0.085 0.085 0.098 0.085 0.085 0.085 0.085 0.085 0.085	LNegra	
Bermejo	0.012 0.012 0.024 0.012 0.037 0.024 0.012 0.012 0.024 0.012 0.012 0.085 0.085 0.085 0.085 0.098 0.085 0.000 0.012 0.012 0.012	Bermejo	
m7725	0.012 0.012 0.024 0.012 0.037 0.024 0.012 0.012 0.024 0.012 0.012 0.085 0.085 0.085 0.085 0.098 0.085 0.000 0.012 0.012 0.012		

1.2 Análisis de las secuencias correspondientes al segmento genómico S:

La comparación de las secuencias nt recuperadas de 28 muestras de casos de SPH de 13 localidades de la provincia de Jujuy, y de una localidad no determinada, demostró que las mismas están genéticamente relacionadas con el genotipo Orán previamente descrito (cepa OI22996, número acceso: AF028024) (1,4 %-6,1% de divergencia a nivel nt; 0%-2,2% divergencia a nivel aa) (Tabla 8). Las 28 cepas pertenecientes al genotipo Oran obtenidas mostraron una divergencia nt entre sí de 0%-8,2%., mientras que a nivel aa mostraron una divergencia de 0%-3,3%. Este genotipo mostró una menor divergencia a nivel nt con el genotipo HU39694 (14,3%), mientras que la mayor divergencia la presentó con el genotipo Andes (21,4%). A nivel aa la menor divergencia la presentaron con los genotipos Andes y Pergamino (0%), mientras que la mayor divergencia fue con el genotipo Laguna Negra (5,4%).

La comparación de la secuencia nt recuperada de 1 muestra de un caso de SPH de la localidad de San Salvador (Jujuy) demostró que la misma está genéticamente relacionada con el genotipo Bermejo previamente descrito (cepa Oc2253, número acceso: AF028025) (2,1% de divergencia nt; 0% divergencia aa). Este genotipo Bermejo mostró una menor divergencia nt con Lechiguanas (11,4%), mientras que la mayor divergencia la presentó con el genotipo Pergamino (19,3%). (Tabla 8). A nivel aa no mostró divergencia con Lechiguanas, mientras que la mayor divergencia la presentó con el genotipo Laguna Negra (6,5%).

Finalmente, la comparación de las secuencias nt recuperadas de 5 muestras de casos de SPH de 3 localidades diferentes de la provincia de Jujuy (Tabla 6) demostró que las mismas están genéticamente relacionadas con el virus Laguna Negra previamente descrito (número

acceso: AF005728) (16,1%-14,6% de divergencia nt; 0-1,1% divergencia aa). Las 5 cepas de virus Laguna Negra mostraron una divergencia entre sí de 0%-2,1%, y 0%-1,1% a nivel nt y aa, respectivamente (Tabla 8). Este tipo viral mostró una menor divergencia nt con el genotipo HU39694 (19,6%), mientras que la mayor divergencia la presentó con el genotipo Bermejo (23,9%). A nivel aa mostró una menor divergencia (4.3%) con los genotipos Andes, Orán y Pergamino, mientras que la mayor divergencia la presentó con los genotipo Bermejo, HU39694 y Lechiguanas (6,5%).

Tabla 8: Comparación de las secuencias de nucleótidos (1° tabla) y de aminoácidos (2° tabla) de un fragmento de 447 nt del segmento genómico S de 34 cepas de hantavirus de casos de síndrome pulmonar por hantavirus de la provincia de Jujuy, con otros hantavirus conocidos.

Discusión

Estudios serológicos en casos humanos de SPH y roedores del noroeste argentino realizados por el INEVH en la década de 1990 permitieron identificar una de las regiones endémicas en donde se registraba el mayor número de casos de SPH de la Argentina. Entre 2005 y 2010 las provincias de Salta y Jujuy concentraron la mayor cantidad de casos de síndrome pulmonar por hantavirus del país (55,4%), constituyendo un importante problema de salud pública en la región (Levis S et al., 1997, Levis S et al., 1998, Pini N et al., 2003). En 1997 se reconocieron los primeros casos autóctonos de SPH en la provincia de Jujuy, la mayoría de los cuales se originaban en la localidad de Yuto y alrededores. El SPH en esta región se caracterizaba por una alta incidencia de la enfermedad (1.46/10000 habitantes), y una baja tasa de letalidad (12.76 %) asociado con un alto porcentaje de enfermedad leve (Pini N et al., 2003).

Los estudios moleculares realizados en 1998 permitieron caracterizar los hantavirus circulantes en la región e identificar los reservorios de los hantavirus responsables de los casos de SPH en la región, a saber: genotipo Orán, asociado a *Oligoryzomys chacoensis*, Bermejo, asociado a *O. flavescens*, y el virus Laguna Negra, asociado a *Calomys fecundus* (Levis et al., 1998, Padula et al., 1998). Estos estudios pusieron en evidencia la gran diversidad genética de estos virus observada en una restringida región geográfica del noroeste argentino. Inicialmente, la identificación de los reservorios de los hantavirus mencionados se basaba en las características morfométricas de los roedores, habiendo sido así identificados los roedores de las especies *O. longicaudatus*, *O. chacoensis* y *C. callosus* como los reservorios de los hantavirus Orán, Bermejo y LN, respectivamente. Estudios recientes de esos mismos reservorios basados en la identificación molecular de los mismos mediante el estudio de DNA mitocondrial de muestras de tejido de los mismos determinaron que esa primera identificación morfométrica había sido errónea, poniendo en evidencia la

importancia de los estudios moleculares en la caracterización de especies (González-Iltig R et al., 2010, Gardenal C et al., 2011).

Con el objeto de monitorear la circulación viral e identificar los hantavirus responsables de los casos de SPH registrados en la década de 2000 en la provincia de Jujuy, se amplificaron y secuenciaron los productos de PCR de muestras de coágulos de casos de SPH confirmados por serología provenientes de la zona en estudio. El análisis filogenético de fragmentos genómicos S (447nt) y M (513 nt) indicaron que persiste una alta diversidad genética de los hantavirus asociados con el SPH en una limitada región geográfica de la provincia de Jujuy, documentándose la circulación de tres hantavirus previamente descritos: LN, ORN y BMJ. Dos de estos linajes, ORN y BMJ, se agrupan con los otros linajes argentinos formados por los virus asociados a roedores del género *Oligoryzomys*, formando un clado con un buen soporte de *bootstrap* (80%). Estos linajes asociados a *Oligoryzomys* a su vez, aunque divergentes, se agrupan con el subclado formado por el virus LN, asociado a roedores del género *Calomys*. Todas las cepas del virus LN del presente estudio se agrupan con un elevado valor de *bootstrap* (100%), aunque divergentes del virus LN previamente caracterizado en Paraguay.

En 32 (82%) de los 39 muestras positivas por PCR del presente trabajo se identificó el virus ORN como el agente etiológico del SPH, mientras que 6 (15 %) correspondieron al virus LN, y en solo un caso (3%) se identificó el genotipo BMJ.

La comparación de las secuencias nucleotídicas correspondientes a los segmentos genómicos M y S mostraron que las divergencias nt observadas entre las cepas del linaje ORN variaron entre 0%-9,1% nt, siendo similares a las observadas en estudios previos (Levis et al., 1998), indicando una escasa variabilidad genética en el período de más de 10 años que separa los estudios mencionados.

El genotipo ORN continua siendo la causa más frecuente de SPH en las localidades estudiadas de la provincia de Jujuy, del mismo modo que estudios previos mostraron que era la causa principal de SPH en la localidad de Orán en Salta (Levis et al., 1998) y en localidades de la provincia de Jujuy (Pini N et al., 2003; Levis et al., 2004). Los datos obtenidos en el presente estudio identificaron el genotipo ORN en el 82% (32/39) de las muestras que fueron positivas por RT-PCR, correspondientes a 13 localidades diferentes de Jujuy, y a una localidad no determinada. Curiosamente, la alta frecuencia del genotipo ORN en casos humanos no se correlaciona con la escasa abundancia (< 3,3% del total de capturas) de roedores de la especie que sirve como reservorio primario de ORN (*O. chacoensis*), tal cual lo muestran los estudios de captura de roedores realizados en 2000 y 2010 que indicaron una mayor frecuencia de captura de roedores de las especies *Akodon spp* y *Calomys fecundus* (antigua denominación *C. callosus*). Más aún, 5 de las secuencias de ORN fueron identificadas en casos de SPH de Yuto, localidad en la que se condujeron las capturas de roedores en 2000 y 2010. Sin embargo, como las comunidades de roedores son influenciadas por factores ecológicos, temporales y ambientales, estudios serológicos más intensivos en la región podrían contribuir a clarificar este punto.

Por otro lado, la comparación de las secuencias nucleotídicas correspondientes a los segmentos genómicos M y S mostraron que las divergencias observadas entre las cepas del virus LN variaron entre 0%-2% (segmento M) y 0%-2,1% (segmento S), mientras que las diferencias encontradas en relación al virus LN previamente descrito en Paraguay (número acceso genbank: AF005728) es mucho mayor (14,6%-16,1% nt, segmento S). El hecho de que las cepas de virus LN de Argentina y Paraguay estén asociadas con diferentes especies de roedores del género *Calomys* (*C. laucha* and *C. fecundus* (ex *callosus*), respectivamente), sugiere una relación co-evolucionaria entre los virus y sus roedores

reservorios, tal como ha sido observada con otros hantavirus del Nuevo Mundo (Plyusnin A and Morzunov S, 2001). Curiosamente, la baja frecuencia del virus LN en las muestras de SPH estudiadas no se correlaciona con la mayor abundancia de los roedores reservorios tanto primarios (*C. fecundus*) como secundarios (*Akodon spp*) de LN, según se observara en los estudios de captura de roedores realizados en 2000 y 2010. Por otro lado, estudios serológicos y epidemiológicos realizados en 2000 en población sana de Yuto, simultáneamente con la captura de roedores (Pini N et al., 2003), pusieron en evidencia una de las prevalencias de anticuerpos para hantavirus más elevadas de Argentina (6,5%). Estos datos se correlacionan con resultados serológicos reportados en comunidades del Gran Chaco de Paraguay y Argentina (Salta) que indican prevalencias del orden del 20-40% (Ferrer J et al., 1998). El rasgo epidemiológico particular observado por la elevada incidencia de infección en humanos en la provincia de Jujuy, la baja tasa de letalidad (12,7%) y la menor severidad clínica de los casos de SPH, soportarían la hipótesis de una menor virulencia y formas inaparentes de infección asociadas al virus LN en la región de estudio.

Finalmente, el genotipo BMJ fue recuperado de una muestra correspondiente a un caso de SPH de San Salvador. La comparación nt de esta cepa con la cepa de BMJ previamente descrita a partir de *O. flavescens* de Salta (cepa Oc22531, número acceso genbank: AF482713), presentó una divergencia de 4,3% (segmento M), mientras que a nivel aa no presentó diferencias. El genotipo BMJ fue reportado previamente solo a partir de un caso fatal de Yuto (Levis S et al., 2004) y de un caso de SPH en Bolivia (Padula P et al., 2002). Esta baja incidencia de infección por este genotipo BMJ se correlaciona con la baja frecuencia de captura de su roedor reservorio *O. flavescens* en la región de estudio (Pini N et al., 2003; Pini N et al., 2012).

Los resultados del presente trabajo permitieron identificar la circulación de los hantavirus ORN, LN y BMJ en 15 localidades de la provincia de Jujuy, en 10 de las cuales no se habían registrado casos de SPH previamente (El Carmen, El Palmar, El Saladillo, La Mendieta, Ledesma, Los Manantiales, Palma Sola, San Antonio, San Pedro, San Salvador).

En referencia a la hipótesis planteada, no se encontraron evidencias de reasociación genómica dado que en la zona de estudio no fue posible identificar variantes genéticas de un mismo virus; sin embargo, la detección de la co-circulación de dos hantavirus, ORN y LN, en una misma localidad geográfica, tales como las observadas en El Carmen y San Pedro, podrían potencialmente determinar fenómenos de este tipo. Estudios más exhaustivos en roedores de la provincia de Jujuy contribuirán a aclarar este aspecto.

Conclusiones

- Sobre un total de 46 muestras de casos de SPH estudiadas, se amplificaron fragmentos del tamaño esperado (513 pb) de 39 muestras para el segmento genómico M.
- Sobre un total de 46 muestras de casos de SPH estudiadas, se amplificaron fragmentos del tamaño esperado (447 pb) de 37 muestras para el segmento genómico S.
- Se obtuvieron secuencias correspondientes a fragmentos del segmento genómico M de 29 cepas del genotipo Orán, 1 cepa del genotipo Bermejo, y 5 cepas del virus Laguna Negra.
- Se obtuvieron secuencias correspondientes a fragmentos del segmento genómico S de 28 cepas del genotipo Orán, 1 cepa del genotipo Bermejo, y 5 cepas del virus Laguna Negra.
- El análisis filogenético de fragmentos genómicos S y M indicó que persiste una alta diversidad genética de los hantavirus asociados con el SPH en una limitada región geográfica de la provincia de Jujuy.
- Se identificó la circulación de los hantavirus ORN, LN y BMJ en 15 localidades de la provincia de Jujuy, en 10 de las cuales no se habían registrado casos de SPH previamente (El Carmen, El Palmar, El Saladillo, La Mendieta, Ledesma, Los manantiales, Palma Sola, San Antonio, San Pedro, San Salvador).
- No se encontraron evidencias de reasociación genómica



Resumen

Los hantavirus son miembros del género *Hantavirus*, perteneciente a la familia *Bunyaviridae*. El genoma viral está compuesto de tres segmentos de ácido ribonucleico (RNA) de polaridad negativa: grande (large: L), mediano (medium: M), pequeño (small: S). El segmento L codifica la RNA polimerasa viral; el segmento M codifica un precursor de glicoproteínas, el cual es posteriormente procesado en las glicoproteínas de la envoltura viral G1 y G2; y el segmento S codifica la proteína N de la nucleocápside. Las enfermedades humanas producidas por los hantavirus se manifiestan en dos grandes síndromes: las Fiebres Hemorrágicas con Síndrome Renal (FHSR), prevalentes en Eurasia, y el Síndrome Pulmonar por Hantavirus (SPH), que es una enfermedad de las Américas.

Los hantavirus son virus asociados principalmente a roedores, aunque recientemente se ha identificado un número creciente de hantavirus asociados a musarañas.

El presente trabajo tiene como objetivo general contribuir al conocimiento de aspectos moleculares y epidemiológicos de los hantavirus asociados a SPH en la provincia de Jujuy, Argentina.

Para la búsqueda de genomas virales se realizó la extracción de ARN total de coágulo, las muestras fueron luego procesadas por RT-PCR anidada, utilizando diferentes conjuntos de *primers* para los segmentos S y M. Los amplicones obtenidos se purificaron y se secuenciaron automáticamente mediante el método “dideoxy” (o método de Sanger). Las secuencias virales obtenidas se compararon entre si y con secuencias de hantavirus obtenidas de las bases de datos de dominio público y se dedujeron las relaciones filogenéticas entre las mismas utilizando programas bioinformáticos.

Como resultado se puso en evidencia la circulación de 3 genotipos de hantavirus patógenos para el hombre en las muestras estudiadas. En 32 (82%) de las 39 muestras positivas por

PCR del presente trabajo se identificó el virus ORN como el agente etiológico del SPH, mientras que 6 (15 %) correspondieron al virus LN, y en solo un caso (3%) se identificó el genotipo BMJ.

La comparación de las secuencias nucleotídicas correspondientes a los segmentos genómicos M y S mostraron que las divergencias nt observadas entre las cepas del linaje ORN variaron entre 0%-9,1% nt. Por otro lado, la comparación de las secuencias nucleotídicas correspondientes a los segmentos genómicos M y S mostraron que las divergencias observadas entre las cepas del virus LN variaron entre 0%-2% (segmento M) y 0%-2,1% (segmento S). Finalmente, el genotipo BMJ fue recuperado de una muestra correspondiente a un caso de SPH de San Salvador. La comparación nt de esta cepa con la cepa de BMJ previamente descrita a partir de *O. flavescens* de Salta (cepa Oc22531, número acceso genbank: AF482713), presentó una divergencia de 4,3% (segmento M), mientras que a nivel aa no presentó diferencias.

Los resultados del presente trabajo permitieron identificar la circulación de los hantavirus ORN, LN y BMJ en 15 localidades de la provincia de Jujuy, en 10 de las cuales no se habían registrado casos de SPH previamente (El Carmen, El Palmar, El Saladillo, La Mendieta, Ledesma, Los manantiales, Palma Sola, San Antonio, San Pedro, San Salvador).

No se encontraron evidencias de reasociación genómica dado que en la zona de estudio no fue posible identificar variantes genéticas de un mismo virus; sin embargo, la detección de la co-circulación de dos hantavirus, ORN y LN, en una misma localidad geográfica, tales como las observadas en El Carmen y San Pedro, podrían potencialmente determinar fenómenos de este tipo.

BIBLIOGRAFÍA

Antic D, Wright KE and Kang CY. (1992). Maturation of Hantaan virus glycoproteins G1 and G2. *Virology* 189: 324–328.

Bernshtein A, Apekina N, Mikhailova T, Myasnikov Y, Khlyap L, Korotkov Y and Gavrilovskaya I. (1999). Dynamics of Puumala hantavirus infection in naturally infected bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Arch Virol* 144: 2415–2428.

Brummer-Koverkontio M, Vaheri A, Hovi T, Hvon Bonsdorff C, Vuorimies J, Manni T, Penttinen K, Oker-Bloom M and Lähdevirta J. (1980). Nephropathia epidémica: detection of antigen in Bank Voles and Serologic diagnosis of human infection. *J Infect Dis* 14: 135-136.

Carey D, Reuben R, Panicker K, Shope R and Myers R. (1971). Thottapalayam virus: a presumptive arbovirus isolated from a shrew in India. *Indian J Med Res* 59: 1758-60.

Childs J, Korch G. and Smith G. (1985). Geographical distribution and age related prevalence of antibody to Hantaan-like virus in rat populations of Baltimore, Maryland, USA. *Am J trop Med Hyg* 34: 385-387.

Childs J, Ksiazek T, Spiropoulou C, Krebs J, Morzunov S, Maupin G, Cage K, Rollin P, Sarisky J, Ensore R, Frey J, Peter C and Nichol S. (1994). Serologic and genetic identification of *Peromyscus maniculatus* as the primary rodent reservoir for a new hantavirus in southwestern United States. *J Infect Dis* 169: 1271-20.

Chomczynski P and Mackey K. (1995). Short technical report. Modification of the TRIZOL reagent procedure for isolation of RNA from Polysaccharide-and proteoglycan-rich sources. *Biotechniques* 19(6): 942-5.

Duchin J, Koster F, Peters C, Simpson B, Tempest S and Zaki T, et.al. (1994). Hantavirus pulmonary syndrome: A clinical description of 17 patients with a newly recognized disease. *N Engl J Med* 330: 949–955.

Elliott R. (1990). Molecular biology of the *Bunyaviridae*. *J Virol* 71: 501-22.

Enría D, Padula P, Segura E, et al. (1997). Hantavirus pulmonary syndrome in Argentina: possibility of person-to-person transmission. *Medicina (Buenos Aires)* 58: 709-11.

Enría D. (1998). Emergencia de los hantavirus en las Américas y en la Argentina. *Medicina (Buenos Aires)* 58: 15-8.

Ferrer J, Jonsson C, Esteban E, Galligan D, Basombrio M, Peralta-Ramos M, Bharadwaj M, Torres-Martínez N, Callahan J, Segovia A and Hjelle B. (1998). High prevalence of hantavirus infection in Indian communities of the Paraguayan and Argentinean Gran Chaco. *Am J Trop Med Hyg* 59: 438–444.

Gardenal C, Gonzalez-Iltig R, Rivera P, Levis S, Salazar-Bravo J, Barquez R. (2011) Natural hosts of different hantavirus genotypes in south America: who is who?. 8th European Vertebrate Pest Management Conference. Berlin, Germany, 26-30.

Gavrilovskaya I, Brown E, Ginsberg M and Mackow E. (1999). Cellular entry of hantaviruses which cause hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by beta3 integrins. *J Virol* 73: 3951–3959.

Gavrilovskaya I, Shepley M, Shaw R, Ginsberg M, and Mackow E. (1998). Beta3 integrins mediate the cellular entry of hantaviruses that cause respiratory failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:7074–7079.

Glass G, Childs J, Korch G and LeDuc J. (1988). Association of intraspecific wounding with hantaviral infection in wild rats (*Rattus norvegicus*). *Epidemiol Infect* 101: 459-472.

Gonzalez-Iltig R, Salazar-Bravo J, Barquez R and Gardenal C. (2010) Phylogenetic relationships among species of the genus *oligoryzomys* (rodentia, cricetidae) from central and south America. *Zoologica Scripta* 39: 511–526.

Gonzalez-Scarano F and Nathanson N. (1996). *Bunyaviridae*. En *Fields Virology*. 1473-1504. Fields B, Knipe D and Howley P. Philadelphia: Lippincott–Raven.

Gonzalez Della Valle M, Edelstein A, Miguel S, et al. (2002). Andes virus associated with hantavirus pulmonary syndrome in Northern Argentina and determination of the precise site of infection. *Am J Trop Med Hyg* 66: 713-720.

Henderson W, Monroe M, St. Jeor S, Thayer W, Rowe J, Peters C and Nichol S. (1995). Naturally occurring Sin Nombre virus genetic reassortants. *Virology* 214: 602–610.

Hjelle B, Anderson B, Torrez-Martinez N, Song W, Gannon W and Yates T. (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: 452-459.

Hjelle B, Chavez-Giles F, Torrez-Martinez N, Yates T, Sarisky J, Webb J and Ascher M. (1994). Genetic identification of a novel hantavirus of the harvest mouse *Reithrodontomys megalotis*. *J Virol* 68: 6751-6754.

Jin M, Park J, Lee S, Park B, Shin J, KSong K, Ahn T, Hwang S, Ahn B and Ahn K. (2002). Hantaan virus enters cells by clathrin-dependent receptor-mediated endocytosis. *Virology* 294: 60–69.

Song J, Baek L, Schmaljohn C and Yanagihara R. (2007). Thottapalayam Virus, a Prototype Shrewborne Hantavirus. *Emerg Infect Dis* 13(7): 980-985.

Johnson A, Bowen M, Ksiazek T, Williams R, Bryan R, Mills J, Peters C and Nichol S. (1997). Laguna Negra virus associated with HPS in western Paraguay and Bolivia. *Virology* 238: 115-127.

Johnson K. (2001). Hantaviruses: History and Overview. En Schmaljohn C and Nichol S, eds. *Curr Top Microbiol Immunol*. 256: 1-14.

Jonsson C and Schmaljohn C. (2001). Replication of hantaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* 256: 15–32.

Larson R, Brown D, Ye C and Hjelle B. (2005). Peptide antagonists that inhibit Sin Nombre virus and Hantaan virus entry through the beta3-integrin receptor. *J Virol* 79: 7319–7326.

Lee H and Van der Groen G. (1989). Hemorrhagic fever with renal syndrome. *Prog Med Virol* 36: 62-102.

Lee H, Baek L and Johnson K. (1982). Isolation of Hantaan virus, the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever, from wild urban rats. *J Infect Dis* 146: 638-44.

Lee H, Bark D, Baek L, Choi K, Whang Y and Woo J. (1980). Korean hemorrhagic fever in urban areas of Seoul. *J Kor Soc Virol* 10: 1-6.

Lee H, Lee P, and Johnson K. (1978). Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. *J Infect Dis* 137: 298-308.

Lee HW. (1982). Korean hemorrhagic fever. *Prog Med Virol* 28: 96-113.

Levis S, Garcia J, Pini N, Calderon G, Ramirez J, Bravo D, St Jeor S, Ripoll C, Bego M, Lozano E, Barquez R, Ksiazek TG 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: 658-663.

Levis S, Morzunov S, Rowe J, Enria D, Pini N, Calderon G, Sabbatini M and St Jeor S. (1998). Genetic diversity and epidemiology of hantaviruses in Argentina. *J Infect Dis* 177: 529-538.

Levis S, Briggiler A, Cacace M, Peters C, Ksiazek T, Cortes J, et al. (1995). Emergence of hantavirus pulmonary syndrome in Argentina. *Am J Trop Med Hyg.* 53: 233.

Levis S, Rowe J, Morzunov S, Enria D and St Jeor S. (1997). New hantaviruses causing hantavirus pulmonary syndrome in central Argentina. *Lancet* 349(9057): 998-999.

Li D, Schmaljohn L, Anderson K and Schmaljohn C. (1995). Complete nucleotide sequences of the M and S segments of two hantavirus isolates from California: evidence for reassortment in nature among viruses related to hantavirus pulmonary syndrome. *Virology* 206: 973–983.

Lopez N, Padula P, Rossi C, Lazaro M and Franze-Fernandez M. (1996). Genetic identification of a new hantavirus causing severe pulmonary syndrome in Argentina. *Virology* 200: 223-226.

Mackow E and Gavrillovskaia I. (2001). Cellular receptors and hantavirus pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 256: 91–115.

Markotic A, Hensley K, Daddario K, Spik K, Anderson and Schmaljohn C. (2007). Pathogenic hantaviruses elicit different immunoreactions in THP-1 cells and primary monocytes and induce differentiation of human monocytes to dendritic-like cells. *Coll Antropol* 31: 1159–1167.

Mills J, Ksiazek T, Ellis B, Rollin P, Nichol S., Yates T, Gannon W, Levi C, Engelthaler D, Davis T, Tanda D., Frampton J, Nichol C, Peters C and Childs J. (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: 273-284.

Mir M, Duran W, Hjelle B, Ye C and Panganiban A. (2008). Storage of cellular 5' mRNA caps in P bodies for viral cap-snatching. *Proc Natl Acad Sci USA*. 105: 19294–19299.

Morita C, Morikawa S, Sugiyama K, Komatsu T, Ueno H and Kitamura T. (1993). Inability of a strain of Seoul virus to transmit itself vertically in rats. *Jpn J Med Sci Biol* 46: 215-219.

Mou D, Wang Y, Huang C, Li G, Pan L, Yang W and Bai X. (2006). Cellular entry of Hantaan virus A9 strain: specific interactions with beta3 integrins and a novel 70kDa protein. *Biochem Biophys Res Commun* 339: 611–617.

Nemirov K, Vapalathi O, Lundkvist A, Vasilenko V, Golovljova I, Plyusnina A, Niemima A, Laakkonen J, Hentonen H and Vaheri A. (1999). Isolation and characterization of Dobrava hantavirus carried by the striped field mouse (*Apodemus agrarius*) in Estonia. *J Gen Virol* 80: 371-379.

Nichol S, Spiropoulou C, Morzunov S Rollin O, Ksiazek T, Feldmann H, Sanchez A, Childs G, Zaki S and Peters C. (1993). Genetic identification of a hantavirus associated with and outbreak of acute respiratory illness. *Science* 262: 914-917.

Niklasson B, Lundkvist A, Rossi C and Ksiazek T. Virus detection and identification with serological tests. En: Schmaljohn C, Calisher C, Lee H, eds. *Manual of hemorrhagic fever*

with renal syndrome and hantavirus pulmonary syndrome, Seoul: Ui-SulMunwhasa; En prensa.

Obijeski J, Bishop D, Murphy F and Palmer E. (1976). Structural proteins of La crosse virus. J Virol 19: 985-997.

Okumura M, Yoshimatsu K, Kumperasart S, Nakamura I, Ogino M and Taruishi M. (2007). Development of serological assays for Thottapalayam virus, an insectivore-borne hantavirus. Clin Vaccine Immunol 14: 173–181.

Padula P, Edelstein A, Miguel S, López M, Rossi C, Rubinovich R. (1998). Hantavirus pulmonary síndrome (HPS) outbreak in Argentina: Molecular evidence of person-to person transmission of Andes virus. Virology 241: 323-330.

Padula P, González Della Valle M, Garcia Alai M, Cortada P, Villagra M and Gianella A. (2002). Andes virus and first case report of Bermejo virus causing fatal pulmonary syndrome. Emerg Infect Dis 8: 437–439.

Panganiban AT and Mir MA. (2009). Bunyavirus N: eIF4F surrogate and cap-guardian. Cell Cycle 8: 1332–1337.

Peters C, Simpson G and Levy H. (1999). Spectrum of hantavirus infection: hemorrhagic fever with renal syndrome and hantavirus pulmonary syndrome. Ann Rev Med 50: 531-545.

Peters C. Hantavirus pulmonary syndrome in the Americas. (1998) En: Scheld W, Craig W and Hughes J, eds. Emerging infections 2. Washington, DC: ASM Pres: 17-63.

Pini N, García J, Sen C, Calderón G, González-Iltig R, Gardenal C, Jayat P, Ripoll C and Levis S. (2012) Identification of *calomys fecundus* (rodentia, *sigmodontinae*) as the truly

rodent reservoir of laguna negra hantavirus in north western Argentina. XXIII Congreso Brasileiro de Virología.

Pini N, Levis S, Calderón G, Ramirez J, Bravo D, Lozano E, Ripoll C, St Jeor S, Ksiazek T, Barquez R and Enria D. (2003). Hantavirus infection in humans and rodents, northwestern Argentina. *Emerg Infect Dis* 9(9): 1070-1076.

Pini N, Resa A, Laime G, Lecot G, Ksiazek T, Levis S and Enria D. (1998). Hantavirus infection in children in Argentina. *Emerg Infec Dis* 4: 85–87.

Piudo L, Monteverde M, Capria S, Padula P and Carmanchahi P. (2005). Distribution and abundance of sigmodontine rodents in relation to hantavirus in Neuquén, Argentina. *J Vector Ecol* 30: 119-125.

Plyusnin A and Morzunov S. (2001). Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent host. *Curr Top Microbiol Immunol* 256: 47-75.

Plyusnin A, Vapalahti O and Vaheri A. (1996). Hantaviruses: Genome structure, expression and evolution. *J Gen Virol* 77: 2677-2687.

Raftery M, Kraus A, Ulrich R, Kruger D and Schonrich G. (2002). Hantavirus infection of dendritic cells. *J Virol* 76: 10724–10733.

Ramanathan H and Jonsson C. (2008). New and Old World hantaviruses differentially utilize host cytoskeletal components during their life cycles. *Virology* 374: 138–150.

Ramanathan H, Chung D, Plane S, Sztul E, Chu Y, Guttieri M, McDowell M, Ali G and Jonsson CB. (2007). Dynein-dependent transport of the Hantaan virus nucleocapsid protein to the endoplasmic reticulum-Golgi intermediate compartment. *J Virol* 81: 8634–8647.

Ravkov E, Nichol S and Compans R. (1997). Polarized entry and release in epithelial cells of Black Creek Canal virus, a New World hantavirus. *J Virol* 71: 1147–1154.

Ravkov E, Nichol S, Peters C and Compans R. (1998). Role of actin microfilaments in Black Creek Canal virus morphogenesis. *J Virol* 72: 2865–2870.

Razzauti M, Plyusnina A, Sironen T, Henttonen H and Plyusnin A. (2009). Analysis of Puumala hantavirus in a bank vole population in northern Finland: evidence for co-circulation of two genetic lineages and frequent reassortment between strains. *J Gen Virol* 90: 1923–1931.

Rodriguez L, Owens J, Peters C, and Nichol S. (1998). Genetic reassortment among viruses causing hantavirus pulmonary syndrome. *Virology* 242: 99–106.

Rowe R and Pekosz A. (2006). Bidirectional virus secretion and nonciliated cell tropism following Andes virus infection of primary airway epithelial cell cultures. *J Virol* 80: 1087–1097.

Ruusala A, Persson R, Schmaljohn C and Pettersson R. (1992). Coexpression of the membrane glycoproteins G1 and G2 of Hantaan virus is required for targeting to the Golgi complex. *Virology* 186: 53–64.

Ruusala A, Persson R, Schmaljohn C and Pettersson R. (1992). Coexpression of the membrane glycoproteins G1 and G2 of Hantaan virus is required for targeting to the Golgi complex. *Virology* 186: 53–64.

Saitou N and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425.

Schmaljohn C and Hjelle B. (1997). Hantaviruses: a global disease problem. *Emerg Infect Dis* 3: 95-104.

Schmaljohn C. (1996). Molecular biology of hantaviruses. 63–90. En Elliot R, ed. *The Bunyaviridae*. Plenum Press, New York, NY.

Schmaljohn C and Hooper J. (2001). *Bunyaviridae: the viruses and their replication*. En Knipe D, Howley P, Griffin D, Lamb R, Martin M, Roizman B, and Straus S, eds. *Fields virology*, 4th ed. 2: 1581–1602. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA.

Schmaljohn C and Nichol S. *Bunyaviridae*. (2007). En Knipe D, Howley P, Griffin D, Lamb R and Martin M, eds. *Fields virology*, 5th ed. 1741–89. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkin.

Schmaljohn C, Jennings G, Hay J and Dalrymple J. (1986). Coding strategy of the S genome segment of Hantaan virus. *Virology* 155: 633-43.

Schmaljohn C, Schmaljohn A and Dalrymple J. (1987). Hantaan virus M RNA: coding strategy, nucleotide sequence, and gene order. *Virology* 157: 31-9.

Schmaljohn C, Hasty S, Dalrymple J, LeDuc J, Lee H, Von Bonsdorff C, Brummer-Korvenkontio M, Vaher A, Tsai T, Regnery H, Goldgaber D and Lee P. (1985). Antigenic and genetic properties of viruses linked to hemorrhagic fever with renal syndrome. *Science* 227: 1041-1044.

Schmaljohn C. (1996). *Bunyaviridae: The Viruses and Their Replication*. En: Fields B, Knipe D, Howley P. *Fields Virology*. Lippincott-Raven Publisher. 3rd edition. Vol. 1. 1447-1465.

Severson W, Partin L, Schmaljohn C, and Jonsson C. (1999). Characterization of the Hantaan nucleocapsid protein-ribonucleic acid interaction. *J Biol Chem* 274: 33732–33739.

Severson W, Xu X and Jonsson C. (2001). cis-Acting signals in encapsidation of Hantaan virus S-segment viral genomic RNA by its N protein. *J Virol* 75: 2646–2652.

Song J, Song K, Baek L, Frost B, Poncz M and Park K. (2005). In vivo characterization of the integrin beta3 as a receptor for Hantaan Virus cellular entry. *Exp Mol Med* 37: 121–127.

Spiropoulou C. (2001). Hantavirus maturation. *Curr Top Microbiol Immunol* 256: 33–46.

Taylor S, Frias-Staheli N, Garcia-Sastre A, and Schmaljohn C. (2009). Hantaan virus nucleocapsid protein binds to importin alpha proteins and inhibits tumor necrosis factor alpha-induced activation of nuclear factor kappa B. *J Virol* 83: 1271–1279.

Taylor S, Krempel R and Schmaljohn C. (2009). Inhibition of TNF-alpha-induced activation of NF-kappaB by hantavirus nucleocapsid proteins. *Ann N Y Acad Sci* 1171. 1: E86–E93.

Thompson J, Higgins D and Gibson T. (1994). CLUSTAL W (1.7): improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choices. *Nucleic Acids Res* 22: 4673–4680.

Vapalahti O, Kallio-Kokko H, Narvanen A, Julkunen I, Lundkvist A, Plyusnin A, Lehvaslaiho H, Brummer-Korvenkontio M, Vaheri A and Lankinen H. (1995). Human B-cell epitopes of Puumala virus nucleocapsid protein, the major antigen in early serological response. *J Med Virol* 46: 293–303.

Webster Robert G and Granoff A. (1994). *Encyclopedia of Virology*. Academic Press. 1: 186-196.

Wells R, Estani S, Yadón Z, et al. (1997). An unusual hantavirus outbreak in southern Argentina: Person-to-person transmission? *Emerg Infect Dis* 3: 171-174.

Zaki S, Greer P, Coffield L, Goldsmith C, Nolte K, Foucar K, Feddersen R, Zumwalt R, Miller G, Khan A, et al. (1995). Hantavirus pulmonary syndrome. Pathogenesis of an emerging infectious disease. *Am J Pathol* 146: 552–579.