



MAESTRÍA EN PREVENCIÓN Y CONTROL DE LAS ZONOSIS

Universidad Nacional del Noroeste
de la Provincia de Buenos Aires

**Caracterización genómica de cepas humanas y
de roedores del virus de la Coriomeningitis
Linfocitaria (género *Mammarenavirus*, familia
Arenaviridae) en Argentina.**

Tesista: Bioq. Julia Brignone

Directora de tesis: Dra. Silvana Levis

Pergamino, octubre de 2021.-

AGRADECIMIENTOS

- En primer lugar a mi familia, Anita, Juan y Coqui por su paciencia y constante apoyo y estímulo para continuar y finalizar mi trabajo de tesis.
- A la Dra. Silvana Levis por el apoyo recibido para la realización de este trabajo.
- A la Lic. Carina Sen y Dr. Jorge García por su colaboración y aportes realizados en todo momento.
- A mis amigas de la vida por su apoyo incondicional.
- A las Dras. Gladys Calderón y Carmen Saavedra por cederme las cepas virales y poder ampliar los estudios.
- Al personal de cómputos del INEVH, Diego Bonano, Marcelo Biglieri y Pablo Lanzillotta por su colaboración en temas de informática.
- A mis compañeros del laboratorio de virología del INEVH que de uno u otro modo contribuyeron a la realización de este trabajo.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1-CAPÍTULO INTRODUCTORIO	6
ESTADO DEL ARTE	6
Género <i>Mammarenavirus</i>	7
Reservorios en la naturaleza	8
Infecciones en roedores	11
Enfermedad en humanos	11
Diagnóstico de laboratorio	16
Diagnósticos diferenciales	17
Morfología y estructura del virión.....	17
Organización genómica	18
PLANTEO DEL PROBLEMA	20
OBJETIVOS	20
TRABAJO EXPERIMENTAL	21
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Selección de cepas virales humanas y animales	21
Estudios moleculares.....	22
Extracción del RNA total.....	22
RT-PCR anidada	23

Visualización del DNA.....	24
Purificación del DNA.....	24
Secuenciación nucleotídica	24
Diseño de <i>primers</i>	25
Análisis filogenético.....	25
RESULTADOS	28
2-CAPÍTULO DE CONCLUSIONES	39
DISCUSIÓN	39
CONCLUSIONES	43
3-ANEXOS	44
ANEXO I	44
ANEXO II.....	56
4-NOMENCLATURA	59
5-BIBLIOGRAFÍA	60

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Miembros y reservorios del género <i>Mammarenavirus</i>	9
Tabla 2.	Cepas seleccionadas de vLCM de origen humano y de roedores.....	21
Tabla 3.	Cepas vLCM incluidas en el análisis filogenético	26
Tabla 4.	<i>Primers</i> disponibles y diseñados para la amplificación y secuenciación del segmento genómico S de las cepas de vLCM	29
Tabla 5.	<i>Primers</i> disponibles y diseñados para la amplificación y secuenciación del segmento genómico L de la cepa de vLCM	31
Tabla 6.	Comparación de las secuencias nt y aa de la GPC y NP del gen S, y de las proteínas Z y L del gen L entre las cepas argentinas y del mundo de vLCM.....	34

1- CAPÍTULO INTRODUCTORIO

ESTADO DEL ARTE

El virus de la Coriomeningitis Linfocitaria (vLCM) es el prototipo del género *Mammarenavirus* (Familia *Arenaviridae*) por ser el primer miembro de este grupo reconocido como patógeno para humanos. El vLCM fue aislado en el año 1933 durante una epidemia de encefalitis de San Luis, en E.E.U.U. (Armstrong *et al.*, 1934). En 1935, Traub identificó al roedor *Mus musculus* como el huésped reservorio del virus en la naturaleza (Traub, E., 1935). Debido a su carácter cosmopolita, el vLCM es el único mammarenavirus que tiene una amplia distribución geográfica, comprendiendo América, Europa, Asia, África y Oceanía.

La infección adquirida por el vLCM en personas inmunocompetentes se presenta generalmente como asintomática, o una enfermedad febril auto limitada; aunque también podría progresar a una meningitis o meningoencefalitis, en todos los casos con una evolución favorable. En cambio, en pacientes inmunocomprometidos la infección podría presentarse con falla multiorgánica y con evolución fatal mayoritariamente. La transmisión de la infección en donaciones de órganos suele ser un modo de adquirir la enfermedad. Las mujeres embarazadas que adquieren la infección durante el embarazo podrían transmitir el virus al feto a través de la placenta. Son varios los riesgos a causa de la infección intrauterina, aborto espontáneo, muerte fetal e infección congénita con secuelas neurológicas severas. Más allá de la transmisión vertical durante el embarazo, no se ha reportado la transmisión interhumana de vLCM.

Las terapias antivirales disponibles actualmente no son eficientes para las infecciones por el vLCM a pesar de los esfuerzos de investigación.

La infección por el vLCM es una zoonosis con una baja incidencia en la población y, por ende, con una baja sospecha clínica de los casos. El diagnóstico de las infecciones por vLCM se debería considerar como diagnóstico diferencial de todas aquellas patologías con síntomas compatibles con la enfermedad.

Género *Mammarenavirus*

Los miembros del género *Mammarenavirus* (familia *Arenaviridae*) (Radoshitzky *et al.*, 2015) se clasifican de acuerdo a sus propiedades antigénicas en dos grupos: a) arenavirus del Viejo Mundo, distribuidos en Europa y África, que incluye los virus: Lassa, Mopeia, Mobala, Ippy, Lujo, Luna, Lunk, Merino Walk, y el virus LCM de distribución mundial; y b) arenavirus del Nuevo Mundo en América (Clegg, 2002; Charrel *et al.*, 2008). Estos últimos se agrupan en 3 linajes: linaje A incluye los virus Pichindé, Paraná, Flexal, Whitewater Arroyo, Pirital y Allpahuayo; el linaje B incluye los virus Sabiá y Tacaribe junto con Junín, Machupo, Chapare, Amaparí, Cupixi y Guanarito, y en el linaje C se agrupan los virus Latino y Oliveros. Un cuarto linaje D tentativo incluye los virus Bear Canyon y Tamiani (Figura1).

Entre los miembros del género *Mammarenavirus* se encuentran varios virus patógenos para el hombre causantes de fiebres hemorrágicas: en Sudamérica, virus Junín (fiebre hemorrágica argentina), virus Machupo (fiebre hemorrágica boliviana), virus Chapare (fiebre hemorrágica de Bolivia), virus Guanarito (fiebre hemorrágica venezolana) y virus Sabiá (fiebre hemorrágica de Brasil); en América del Norte, el virus Whitewater Arroyo (síndrome febril); en África, el virus Lassa (fiebre de Lassa) y virus Lujo (fiebre hemorrágica en África); y con una distribución mundial, el vLCM (Coriomeningitis Linfocitaria).

En el año 2015, surge el género *Reptarenavirus* (Radoshitzky *et al.*, 2015) como segundo miembro de la familia *Arenaviridae*, la cual fue reorganizada taxonómicamente por el Comité Internacional en Taxonomía Viral (ICTV) reemplazando a los *Arenavirus*, único género de la familia hasta ese momento. En 2019, una nueva reorganización taxonómica de la familia *Arenaviridae* incorpora dos nuevos géneros a los ya existentes, el *Antennavirus* y el género *Hartamanivirus* (Radoshitzky *et al.*, 2019).

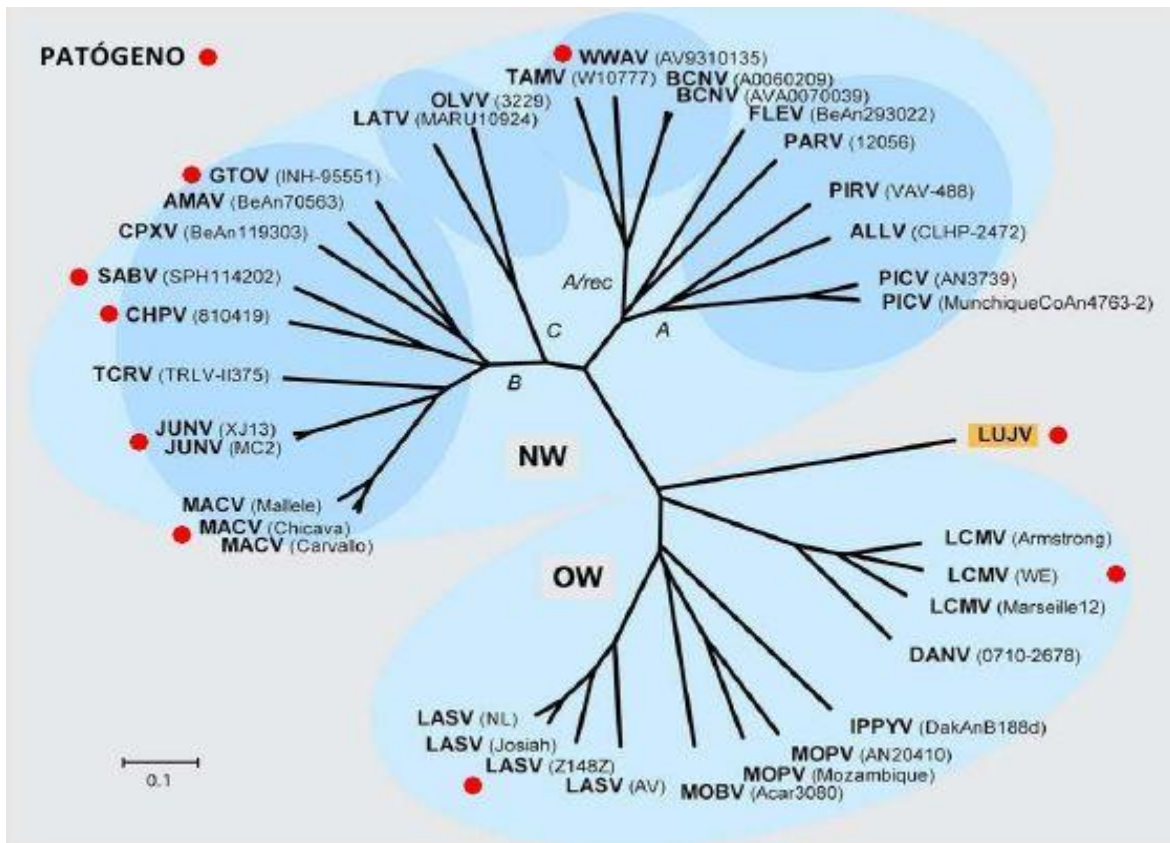


Figura 1 – Filogenia del género *Mammarenavirus*, basada en la secuencia aminoacídica completa de la nucleoproteína. Se indican los virus del Viejo Mundo (OW) y los tres linajes (A, C y B) de los virus del Nuevo Mundo (NW). (Briese *et al.*, 2009).

Reservorios en la naturaleza

Todos los mammarenavirus reconocidos por el ICTV (Ninth Report 2011-ICTV) están asociados a roedores, a excepción del virus Tacaribe que fue aislado de murciélagos (Salvato *et al.*, 2012). Los mammarenavirus del Viejo Mundo infectan a roedores de la familia *Muridae*, subfamilia *Murinae*; y los mammarenavirus del Nuevo Mundo incluyen virus de Sudamérica y Norteamérica que infectan a roedores de la familia *Muridae*, subfamilia *Sigmodontinae*.

La distribución geográfica de los roedores reservorios determina la distribución de los virus asociados, generalmente focalizados geográficamente.

El vLCM es el único mammarenavirus que tiene una amplia distribución geográfica, comprendiendo América, Europa, Asia, África y Oceanía, debido al carácter cosmopolita

de los roedores mridos a los que se encuentra asociado (*Mus musculus* y *M. domesticus*) (figura 2) (Childs *et al.*, 1993). Los roedores conviven con humanos tanto en áreas urbanas como rurales.

Los *Reptarenavirus* se asocian a serpientes como reservorios de virus en la naturaleza, los *Antennavirus* a los peces y el género *Hartamanivirus* a las serpientes al igual que *Reptarenavirus*.



Figura 2. *Mus musculus*, roedor reservorio del vLCM.

<i>Mammarenavirus</i> del Viejo Mundo		
Virus	Reservorios en la naturaleza	Enfermedad en el hombre
virus de la Coriomeningitis Linfocitaria (Armstrong <i>et al.</i> 1941)	<i>Mus musculus</i>	Coriomeningitis linfocitaria
virus Ippy (Swanepoel <i>et al.</i> , 1985)	<i>Arvicanthis sp.</i>	no asociado a enfermedad en humanos
virus Lassa (Buckley <i>et al.</i> , 1970)	<i>Mastomys sp.</i>	fiebre de Lassa
virus Mobala (Gonzalez <i>et al.</i> , 1983)	<i>Praomys sp.</i>	no asociado a enfermedad en humanos
virus Mopeia (Johnson <i>et al.</i> , 1981)	<i>Mastomys natalensis</i>	no asociado a enfermedad en humanos
virus Lujo (Paweska <i>et al.</i> , 2009)	DESCONOCIDO	fiebre hemorrágica de África

Mammarenavirus del Nuevo Mundo		
Virus	Reservorios en la naturaleza	Enfermedad en el hombre
virus Paraná (Webb <i>et al.</i> , 1970)	<i>Oryzomys buccinatus</i>	no asociado a enfermedad en humanos
virus Pichindé (Trapido <i>et al.</i> , 1971)	<i>Oryzomys albigularis</i>	no asociado a enfermedad en humanos
virus Flexal (Pinheiro <i>et al.</i> , 1977)	<i>Oryzomys spp.</i>	no asociado a enfermedad en humanos
virus Pirital (Fulhorst <i>et al.</i> , 1997)	<i>Sigmodon alstoni</i>	no asociado a enfermedad en humanos
virus Allpahuayo (Moncayo <i>et al.</i> , 2001)	<i>Oecomys bicolor</i>	no asociado a enfermedad en humanos
virus Tacaribe (Downs <i>et al.</i> , 1963)	<i>Artibeus spp.</i>	no asociado a enfermedad en humanos
virus Junín (Parodi <i>et al.</i> , 1958)	<i>Calomys musculinus</i>	fiebre hemorrágica argentina
virus Machupo (Johnson <i>et al.</i> , 1965)	<i>Calomys callosus</i>	fiebre hemorrágica boliviana
virus Amaparí (Pinheiro <i>et al.</i> , 1966)	<i>Oryzomys capito</i> <i>Neacomys guianae</i>	no asociado a enfermedad en humanos
virus Guanarito (Salas <i>et al.</i> , 1991)	<i>Zygodontomys brevicauda</i>	fiebre hemorrágica venezolana
virus Cupixi (Bowen <i>et al.</i> , 1998)	<i>Oryzomys sp.</i>	no asociado a enfermedad en humanos
virus Sabiá (Coimbra <i>et al.</i> , 1994)	DESCONOCIDO	fiebre hemorrágica de Brasil
virus Chapare (Delgado <i>et al.</i> , 2008)	DESCONOCIDO	fiebre hemorrágica de Bolivia
virus Latino (Murphy <i>et al.</i> , 1970)	<i>Calomys callosus</i>	no asociado a enfermedad en humanos
virus Oliveros (Mills <i>et al.</i> , 1996)	<i>Necomys obscurus (VER)</i>	no asociado a enfermedad en humanos
virus Tamiami (Calisher <i>et al.</i> , 1970)	<i>Sigmodon hispidus</i>	no asociado a enfermedad en humanos
virus Whitewater Arroyo (Fulhorst <i>et al.</i> , 1996)	<i>Neotoma albigula</i>	síndrome febril
virus Bear Canyon (Fulhorst <i>et al.</i> , 2002)	<i>Peromyscus californicus</i>	no asociado a enfermedad en humanos

Tabla 1. Miembros y reservorios del género *Mammarenavirus*. (Ninth Report 2011-ICTV)

Infección en roedores

En la naturaleza, la infección por vLCM se mantiene por transmisión transovárica principalmente siendo la transmisión horizontal epidemiológicamente poco importante. Las hembras de ratón crónicamente infectadas transmiten la infección a su descendencia, que a su vez adquieren una infección crónica y persistente. La persistencia permite la perpetuación del virus en la naturaleza de modo que los roedores contaminan en forma continua el ambiente con sus excretas (Johnson K. 1981b).

Numerosos estudios en animales de experimentación (*Mus albino*) han permitido determinar que la infección del ratón adulto con el vLCM conduce a una enfermedad aguda que culmina con la muerte del animal, la recuperación del animal con respuesta inmune protectora o una infección persistente asociada a una supresión inmune generalizada. Y por el contrario, la inoculación de ratones recién nacidos o ratones inmosuprimidos resulta en una infección persistente asociada a una variedad de patologías tales como alteraciones en las funciones tiroideas, deficiencia en la hormona de crecimiento, entre otras. En todos los casos, la infección de los roedores depende de la edad, la dosis administrada, la inmunocompetencia y la vía de inoculación utilizada (Borrow, Oldstone, 1997).

Enfermedad en humanos

El principal mecanismo de transmisión del vLCM a los humanos es a través de la inhalación de los aerosoles generados por las excretas de roedores infectados o a través de mordeduras de los mismos, ya sea en actividades recreativas o laborales en ambientes donde circula el reservorio; también se han documentado infecciones en personal de laboratorio manipulando animales infectados con vLCM (Buchmeier and Zajac, 1999; Dykewicz *et al.*, 1992, Emonet *et al.*, 2007).

La coriomeningitis linfocitaria (LCM) es una zoonosis generalmente asintomática o puede resultar en una enfermedad auto limitada leve en el caso de individuos inmunocompetentes. Se caracteriza clínicamente por presentar 2 fases: a) fase aguda, con

fiebre y viremia, seguida por b) una fase neurológica, sin viremia pero con aparición de virus en el sistema nervioso central y detección de anticuerpos en suero. Durante la primera fase, los síntomas más frecuentes son fiebre, escalofríos, náuseas, vómitos, mialgias y dolores de garganta y de cabeza, los cuales aparecen de 1-3 semanas luego de la exposición al virus (Armstrong *et al.*, 1941; Blanc *et al.*, 1951; Baum *et al.*, 1966; Hirsch *et al.*, 1974; Vanzee *et al.*, 1975). En la mayoría de los casos, la infección se resuelve sin tratamiento, en pocos días. Durante esta fase se observa leucopenia, trombocitopenia y elevación de las enzimas LDH y AST.

En ciertos pacientes, la infección puede progresar a una meningitis aséptica o meningoencefalitis, aunque esta forma de presentación no es la habitual (Adair *et al.*, 1953; Meyer *et al.*, 1960; Asnis *et al.*, 2010; Folk *et al.*, 2011). En esta segunda fase de la enfermedad el LCR puede presentar una concentración de glucosa normal o levemente disminuida, un recuento celular muy elevado con predominio de linfocitos y un incremento moderado de las proteínas (Farmer, Janeway, 1942). También se han reportado otras complicaciones neurológicas asociadas a las infecciones por el vLCM en adultos, como la mielitis (Ackermann *et al.*, 1972; Park *et al.*, 1997b), síndrome de Guillain-Barré e hidrocefalia (Hirsch *et al.*, 1974; Larsen *et al.*, 1993; Kunz *et al.*, 2008). Las manifestaciones no neurológicas de la enfermedad como pancreatitis, orquitis, artritis, parotiditis y pericarditis son poco comunes (Jamieson *et al.*, 2006). En la mayoría de los casos, la infección por el vLCM en pacientes adultos humanos se recupera completamente aunque requiere de algunos meses para lograrlo. Muy rara vez la infección es letal.

No se ha reportado la transmisión persona a persona, con excepción de la transmisión a través de trasplante de órganos sólidos y la transmisión vertical de madre a feto, ya que el vLCM atraviesa la placenta (CDC, 2005; Fischer *et al.*, 2006; MacNeil *et al.*, 2012; Palacios *et al.*, 2008; Barton, *et al.*, 2002).

La infección por el vLCM durante el embarazo puede causar aborto espontáneo o malformaciones congénitas como hidrocefalia, calcificaciones intracraneales y corioretinitis, según el período de infección durante el embarazo. En un estudio realizado

en 20 niños con confirmación serológica de infección por vLCM, con un seguimiento de 11 años, observaron diferentes anomalías en las imágenes; microcefalia, ventrículomegalia, hipoplasia cerebral, paquigiria, quistes porencefálicos y periventriculares e hidrocefalia. Los niños presentaban desde retardo mental, epilepsia, ceguera y desórdenes motrices (Bonthius *et al.*, 2007b). Según los investigadores, la amplia variabilidad de presentaciones clínicas que se observaron en este grupo de niños refleja los diferentes estadios de gestación en los que ocurrió la infección con vLCM, ya que realizaron un estudio en animales inoculando ratones hembras en diferentes estadios gestacionales y se observó la misma variedad de patologías clínicas en sus crías (Bonthius *et al.*, 2007a).

En las últimas décadas se han documentado varios agrupamientos de enfermedad letal en receptores de trasplante de órganos provenientes de donantes infectados con el vLCM en EEUU (Albariño *et al.*, 2010). Las secuencias genéticas que se obtuvieron de las muestras de receptores de órganos fueron analizadas filogenéticamente para identificar la cepa de vLCM y asociarlas a la muerte de dichos pacientes. En uno de los casos estudiados se pudo determinar que la secuencia del vLCM caracterizada a partir del órgano receptor era idéntica a la secuencia viral caracterizada de un hámster propiedad del donante. Si bien no se aisló vLCM de tejidos del donante, sí se aisló, secuenció y analizó filogenéticamente el vLCM de la mascota (Amman *et al.*, 2007). De esta manera, se confirmó la asociación del trasplante letal y la infección con el vLCM.

Debido a la distribución cosmopolita de su huésped reservorio, el vLCM se distribuye mundialmente (Figura 3).

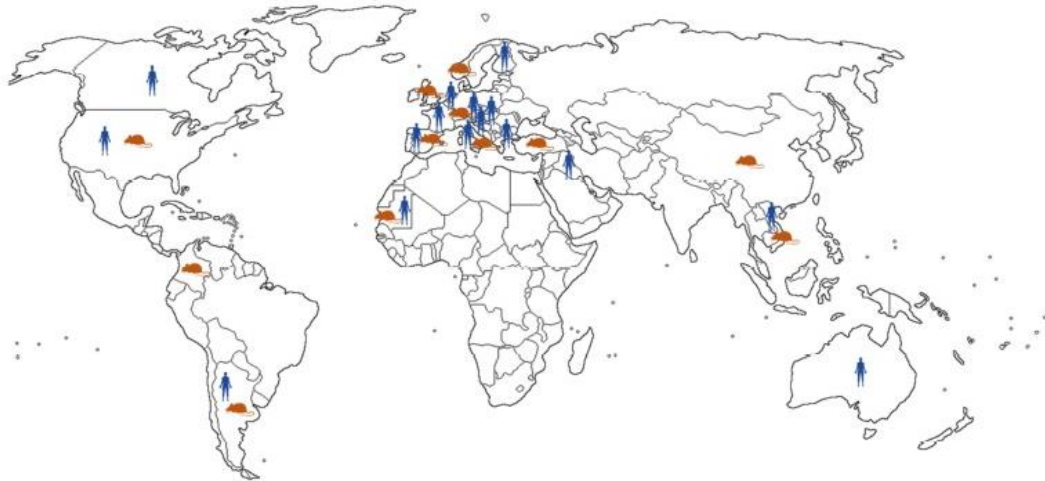


Figura 3. Distribución mundial de la infección de vLCM reportada en humanos y roedores. (Vilibic-Cavlek T. *et al.*, 2021).

Sin embargo, se desconoce la verdadera prevalencia de las infecciones por vLCM en humanos debido a la presentación asintomática o leve de los casos. En la década del 50, diferentes estudios realizados confirmaron al vLCM como agente causal de enfermedades neurológicas: a) el 8% (58/713) de pacientes con meningitis aséptica fueron diagnosticados como infecciones por vLCM en EEUU (Meyer *et al.*, 1960), b) se detectó en el 8% de pacientes hospitalizados con enfermedad neuroinvasiva especialmente durante los meses de invierno, cuando los roedores buscan abrigo en el interior de las viviendas (Adair *et al.*, 1953). Más recientemente, estudios realizados en Finlandia (2013-2014) pusieron en evidencia la presencia de anticuerpos de tipo IgG para vLCM en el 5% de pacientes con enfermedad neuroinvasiva (Fevola *et al.*, 2018). En un grupo de pacientes también con enfermedad neuroinvasiva estudiados en Irak (2012-2013) se detectó RNA de vLCM en el 5,1% de las muestras de LCR analizadas (Barakat *et al.*, 2015). En otro estudio serológico realizado en la misma región en 2012-2016 en pacientes con enfermedad febril aguda y manifestaciones neurológicas, se observó una seroprevalencia para vLCM del 8,8%, y se caracterizaron genéticamente dos cepas de vLCM, indicando que las infecciones por vLCM son comunes en Irak, y están asociadas a enfermedad neurológica. (Alburkat *et al.*, 2020). Asimismo, estudios serológicos realizados en distintos países europeos

mostraron una elevada prevalencia de anticuerpos para vLCM. En España, en la década del 2000, muestran una seropositividad del 1.7% (Lledó *et al.*, 2003). Una seropositividad del 37,5% fue reportada en los habitantes de Bratislava en Eslovaquia en 1999 (Reiserova *et al.*, 1999), y del 36% en la población rural de la isla Vir en el litoral croata, en 2006 (Dobec *et al.*, 2006). Sin embargo, en estudios más recientes se observó una seroprevalencia del 6.8% en la región continental de Croacia, siendo del 3.9% en población no expuesta a riesgo y 9.8% personas expuestas laboralmente al contacto con roedores (Vilibic-Cablek T., Oreski T., *et al.*, 2021; Vilibic-Cablek T., Barbic L., *et al.*, 2021).

En Argentina, la actividad del vLCM se documentó por primera vez a comienzos de la década del 70, mediante la detección de anticuerpos tanto en humanos como en roedores en el área endémica de fiebre hemorrágica argentina (FHA). Se detectaron anticuerpos para vLCM en más de 20 *Mus musculus* capturados en la ciudad de Pergamino. Al mismo tiempo se confirmó el primer aislamiento y caracterización de una cepa de vLCM a partir de su reservorio *Mus musculus* en el sur de la provincia de Córdoba, durante estudios de investigación sobre la participación de los roedores en la ecología del virus Junín en el área endémica de la FHA (Barrera Oro *et al.*, 1970; Maiztegui *et al.*, 1972; Sabbatini *et al.*, 1974).

En 1988-1989 se realizó un estudio cuyo objetivo principal fue medir la eficacia protectora de la vacuna contra la FHA, Candid #1, en hombres, entre 15-65 años de edad, que vivían o trabajaban en el campo, en 41 localidades al sur de la provincia de Santa Fe. La detección de anticuerpos para vJun y vLCM, los dos arenavirus endémicos en la región de estudio, en muestras de suero previas a la inmunización con Candid #1, demostraron una prevalencia de infección por vLCM del 2,38 % (172/7227 individuos). (Ambrosio *et al.*, 1994).

Años más tarde, mediante un estudio realizado por Ambrosio *et al.* se confirmó la co-circulación del vLCM y el virus Junín en el área endémica de FHA (Ambrosio *et al.*, 1996). En 1996, se confirmó por seroconversión un caso pediátrico de LCM de la ciudad de Pergamino. Un estudio serológico en individuos con domicilio en el potencial sitio de

infección del caso mostró una prevalencia de infección por vLCM del 10,28% (11/107). (Riera *et al.*, 1996).

Estudios virológicos posteriores realizados retrospectivamente en muestras de casos sospechosos de FHA y de roedores reservorios en un período de 19 años (1980-1999), confirmaron la actividad del vLCM mediante el aislamiento de cepas de vLCM de humanos y roedores *M. musculus* de las provincias de Córdoba, Buenos Aires y Santa Fe (Saavedra *et al.* 2001; Saavedra *et al.*, 2002). Posteriormente se realizó un estudio serológico en roedores y humanos en la ciudad de Río Cuarto en un período de 6 años (1998-2003). La prevalencia observada para vLCM fue del 7.3% en roedores (76/1038 total de animales capturados), todos ellos de la especie *M. musculus*. Con respecto a los humanos, 85 muestras resultaron positivas de un total de 2594 (3,3%) muestras estudiadas, obteniendo una mayor prevalencia de infección en los hombres (4,6%) con respecto a las mujeres (2,6%). Además, se estudiaron 432 mujeres embarazadas de las cuales 7 presentaron anticuerpos IgG para vLCM, pero en ninguno de los recién nacidos se detectaron anticuerpos para este virus lo cual confirma que las mamás fueron infectadas por el vLCM previo al embarazo (Riera *et al.*, 2005).

Desde que se implementó la vigilancia epidemiológica sistemática de los casos clínicos de FHA que determinó la inclusión de rutina de la detección del vLCM como parte del diagnóstico etiológico diferencial de la FHA, se diagnosticaron casos de LCM. En el período 1970-2020 se confirmaron 20 casos de LCM mediante detección de anticuerpos IgG específicos en muestras de suero pareados.

Respecto de la identidad genética de las cepas de vLCM de Argentina, existe escasa información. Sólo se dispone de la información de un pequeño fragmento de 359 nucleótidos (Saavedra, 2004).

Diagnóstico de laboratorio

La viremia en LCM ocurre a lo largo del período febril agudo previo a la aparición de los síntomas neurológicos. Por lo tanto, la detección de genoma viral por RT PCR como

método de diagnóstico de infección por vLCM se realiza en una muestra de suero del período agudo de la enfermedad, y en una muestra de LCR, en una evolución más tardía con la aparición de la fase neurológica. La técnica de ELISA es el método de elección para el diagnóstico serológico mediante el estudio de sueros pareados, una muestra de suero del período agudo y una segunda muestra del período de convalecencia.

Diagnósticos diferenciales

Durante la primera semana de la enfermedad, las manifestaciones clínicas de LCM no son específicas y puede confundirse con otras patologías. Entre los diagnósticos diferenciales deben considerarse los síndromes febriles agudos con mialgias, trombocitopenia y leucopenia como la FHA; y además, con aquellos que desarrollan manifestaciones neurológicas tardíamente. La meningitis granulomatosa sería un diagnóstico diferencial para aquellos pacientes que presenten altos niveles de linfocitos y baja concentración de glucosa en el LCR. Por otro lado, en los pacientes recién nacidos que presenten hidrocefalia o coriorretinitis se debería tener en cuenta el testeo de vLCM como diagnóstico diferencial de las TORCH (toxoplasmosis, rubeola, citomegalovirus y herpes simple).

Morfología y estructura del virión

Los viriones son esféricos a pleomórficos, tienen un diámetro de 50 a 300 nm de diámetro (media de 110 a 130 nm), y están envueltos en una bicapa lipídica que deriva de las membranas celulares. En esta bicapa lipídica se encuentran insertadas unas proyecciones denominadas espículas de 8 a 10 nm de longitud, las cuales están compuestas de glicoproteína viral (GPC). Un tetrámero de GPC1 forma la cabeza de la espícula y un tetrámero de GPC2 forma el tallo de la espícula. La proteína estructural más importante en el virión es la nucleoproteína (NP), esencial para la transcripción y replicación viral; la cual asociada al ARN forma la nucleocápside (Pinschewer *et al.*, 2003). La proteína L tiene actividad transcriptasa y replicasa y es un componente menor en la

nucleocápside (Buchmeier *et al.*, 1987; Iapalucci *et al.*, 1989). La proteína viral Z es una proteína pequeña estructural con un dominio de unión a zinc (Salvato *et al.*, 1992).

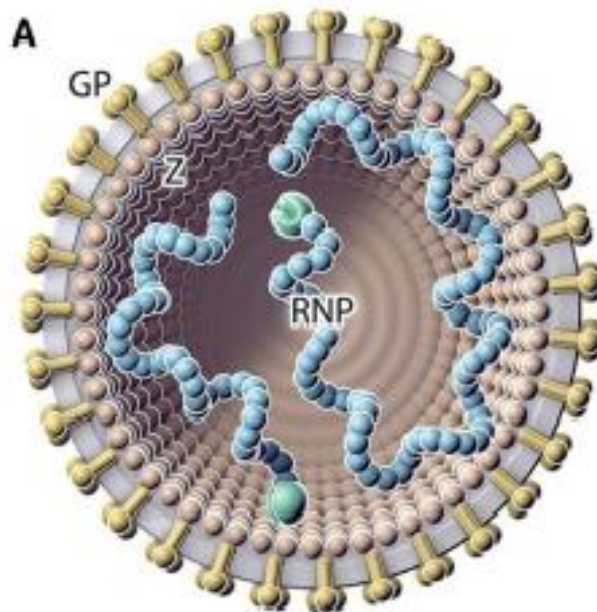


Figura 4. Esquema de una partícula de arenavirus (Radoshitsky *et al.*, 2015).

Organización genómica

El genoma de los mammarenavirus es ARN, bisegmentado L y S (grande y pequeño respectivamente), de cadena simple que codifica 4 proteínas virales en un modo ambisentido. El segmento S de aproximadamente 3400 nucleótidos (nt) codifica el precursor de la GPC y la NP que son los inmunógenos más importantes del virus. Las secuencias de la GPC y de la NP están separadas por una región intergénica no codificante. El precursor GPC es procesado en las glicoproteínas GPC1 y GPC2.

El segmento L de aproximadamente 7200 nt codifica una pequeña proteína (Z) y una proteína denominada L que es una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp); estas proteínas están separadas también por una región intergénica no codificante (Zapata J.C and Salvato M, 2013).

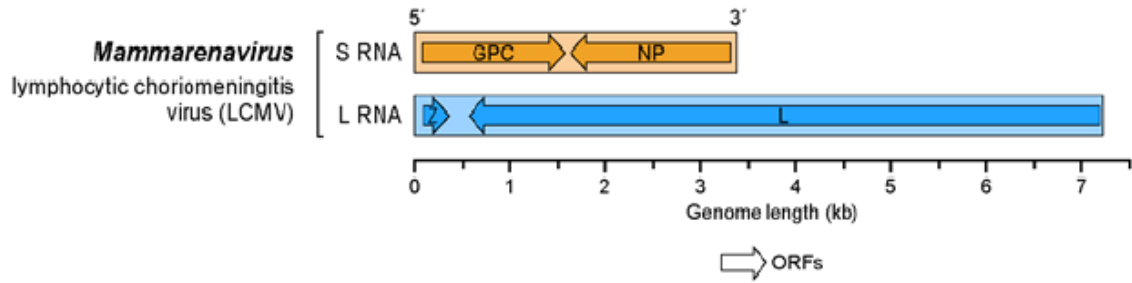


Figura 5. Mammarenavirus. Representación esquemática de la organización del genoma bisegmentado del vLCM. GPC, precursor de glicoproteína; L, ARN polimerasa dependiente de ARN; NP, nucleoproteína; Z, proteína de unión a zinc. Las regiones intergénicas (IGR), que forman estructuras en horquilla (no mostradas), separan marcos de lectura abiertos (ORF). (Radoshitzky *et al.*, 2019)

PLANTEO DEL PROBLEMA

En Argentina, las escasas cepas de vLCM aisladas han sido exhaustivamente caracterizadas por métodos serológicos. Sin embargo, la información genética disponible de las mismas es escasa, y se limita solamente a un pequeño fragmento del segmento S de 359 nt.

OBJETIVOS

Caracterizar genéticamente las regiones codificantes de las proteínas GPC y NP del segmento genómico S de cepas de vLCM aisladas de origen humanos y de roedores de diferentes localidades de la provincia de Santa Fe, Argentina; y las regiones codificantes de las proteínas Z y L del segmento genómico L de una de las cepas de origen humano. El análisis filogenético de las cepas permitirá analizar la relación que existe entre las cepas de origen humano con las asociadas a roedores circulantes en Argentina, y su relación con las cepas de vLCM que circulan en el mundo.

TRABAJO EXPERIMENTAL

El desarrollo del presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de biología molecular del Departamento de investigación del INEVH (Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas) “Dr. Julio I. Maiztegui”, de la ciudad de Pergamino; cuyos laboratorios cuentan con el equipamiento y nivel de bioseguridad requeridos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Selección de las muestras humanas y animales

Las cepas de vLCM seleccionadas pertenecen a colecciones del INEVH “Dr. Julio I. Maiztegui” y se conservaron a -70°C hasta el momento de su estudio.

Se seleccionaron para la extracción de ARN viral y posterior amplificación y secuenciación tres cepas aisladas de casos humanos de LCM registrados en diferentes localidades al sur de la provincia de Santa Fe. Las cepas de roedores seleccionadas corresponden a la especie *Mus musculus* capturados en la provincia de Santa Fe (Tabla 2).

Cepas	Origen	Fecha muestra (año)	Localidad y departamento de procedencia	Provincia
21904	Humano	1985	Casilda, Caseros	Santa Fe
23435	Humano	1987	Elortondo, Gral López	Santa Fe
44416	Humano	2001	Fighera, Rosario	Santa Fe
2856	Roedor	1990	Los Quirquinchos, Caseros	Santa Fe
16255	Roedor	1993	Alcorta, Constitución	Santa Fe

Tabla 2. Cepas seleccionadas de vLCM de origen humano y de roedores.

Las cepas de origen humano (número de identificación #21904_Hu, #23435_Hu y #44416_Hu) fueron obtenidas por aislamiento viral en animales. La muestra original utilizada para realizar el aislamiento fue sangre entera heparinizada del período agudo de

pacientes confirmados con infección por vLCM. La muestra original se inoculó por vía intracerebral (ic) en ratones recién nacidos (rrn) de no más de 48 horas de vida, y ratones adultos (rad) de 30 a 35 días (1° pasaje). Al 7° día se realizó un 2° pasaje con una suspensión al 20% de los cerebros de los rrn del 1° pasaje a otro grupo de la misma edad y a rad.

La cepa #44416_Hu fue aislada al 9° día del 2° pasaje de rad donde los animales enfermaron o murieron, la cepa #21904_Hu se aisló al 7° y 8° día del 1° pasaje de rad y la cepa #23435_Hu se aisló al 7° y 8° día del 2° pasaje donde en ambos casos los animales enfermaron o murieron. En los 3 casos se cosecharon los ratones enfermos y muertos y se obtuvo una suspensión de cerebro al 20%. En ninguno de los casos la muestra original de los pacientes enfermó ni mató ratones lactantes del 1° y 2° pasaje (Saavedra *et al.*, 2001).

Con respecto a las cepas de origen animal, se trabajó a partir del bazo, órgano del roedor original en el caso de la muestra #2856_Ro y una suspensión de cerebro al 20% en el caso de la muestra #16255_Ro.

Estudios moleculares

Extracción del ARN total

Todas las muestras fueron procesadas en gabinetes de seguridad biológica (GSB) clase II en el laboratorio de seguridad biológica nivel 2. Los procedimientos de extracción de ARN viral y posterior transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) se realizaron en GSB ubicados en laboratorios separados a los efectos de minimizar el riesgo a las contaminaciones cruzadas. El ARN total se extrajo de muestras de suspensión al 20% de tejidos de roedores y órganos obtenidos de necropsia de roedores (Chomczynski, 1995). Para ello, se alicuotaron 100 µl de suspensión de tejidos, o 50-100 mg de tejido fueron homogeneizados y tratados con 1000 µl de TRIzol®. El reactivo TRIzol® mantiene la integridad del ARN gracias a la inhibición altamente eficaz de la actividad de ARNasa, al tiempo que destruye las células y disuelve los componentes celulares durante la homogeneización de muestras. El reactivo TRIzol® es una solución monofásica de fenol

e isotiocianato de guanidina diseñado para el aislamiento de ARN total de alta calidad. Después de la homogeneización de la muestra con el reactivo TRIzol®, se añade cloroformo y se permite al homogeneizado separarse en una clara capa acuosa superior (que contiene ARN) y en capas orgánica roja y de interfase inferiores (que contienen ADN y proteínas). El ARN se precipita desde la capa acuosa con isopropanol. Finalmente se realiza un lavado con etanol al 70% para eliminar impurezas, se deja secar a temperatura ambiente y se resuspende con 20 µl de agua libre de ribonucleasas para su posterior uso.

Las muestras se conservaron a -70°C hasta su procesamiento.

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 *et al.*, 1993). Para evitar las contaminaciones cruzadas, se utilizaron GSB 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 reacción de PCR (1° *round*) se realizó en un volumen de 30 µl, con buffer de reacción 10X y MgCl₂ 50mM provistos por la enzima, deoxinucleótidos (dATP, dCTP, dTTP y dGTP) en una concentración 20 mM, *Taq Platinum* ADN polimerasa 5U/µl (Invitrogen), transcriptasa reversa *SuperScrip* III RT 20 U/µl (Invitrogen), 100 ng de cada *primer* y se adicionó 1 µl de ARN genómico. La reacción de PCR anidada (2° *round*) 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 (BioRad) y sometidos a diferentes ciclos de temperatura, dependiendo del tamaño de los fragmentos a amplificar. Se utilizaron los siguientes programas:

i) Para fragmentos menores de 600 pb:

1° *round*: 50°C – 60 min + 94° - 2 min + 30 ciclos (94°C x 30 seg + 37°C x 30 seg + 72°C x 1 min) + 10 ciclos (94°C – 30 seg + 37°C – 30 seg + 72°C – 2 min) + 15°C ∞.

2° round: 94° - 2 min + 30 ciclos (94°C x 30 seg + 37°C x 30 seg + 72°C x 1 min) + 10 ciclos (94°C – 30 seg + 37°C – 30 seg + 72°C – 2 min) + 15°C ∞.

ii) Para fragmentos mayores de 600 pb:

1° round: 50°C – 60 min + 94° - 2 min + 30 ciclos (94°C x 30 seg + 37°C x 30 seg + 72°C x 3 min) + 10 ciclos (94°C – 30 seg + 37°C – 30 seg + 72°C – 4 min) + 15°C ∞.

2° round: 94° - 2 min + 30 ciclos (94°C x 30 seg + 37°C x 30 seg + 72°C x 3 min) + 10 ciclos (94°C – 30 seg + 37°C – 30 seg + 72°C – 4 min) + 15°C ∞.

Visualización del ADN

Los productos de PCR anidada se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con SYBR Safe al 10% (Invitrogen – 10000X en DMSO). Se utilizó marcador de masa (Fermentas - *Mass Ruler Low* – 60.8 ng/ul) para estimar la masa del producto amplificado y marcador de peso molecular (Fermentas - *Gene Ruler* – 100bp DNA Ladder 0.5 ug/ul) como control en cada corrida. El gel con las muestras sembradas se sometió a una corrida electroforética a 80 voltios durante 60 minutos. La observación del gel se realizó por exposición del mismo sobre un transiluminador de luz LED. Los fragmentos del tamaño esperado se cortaron del gel y se conservaron en un vial rotulado a -40°C hasta su posterior purificación.

Purificación del ADN

Las bandas obtenidas se purificaron utilizando el kit de purificación de gel – *QIAquick* de Qiagen de acuerdo a las recomendaciones del fabricante.

Secuenciación nucleotídica

La secuenciación nucleotídica de los fragmentos de ADN se realizó en un equipo ABI PRISM 3100 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystem) mediante la técnica de Sanger de secuenciación dideoxinucleótidos en forma automática. En base a las secuencias obtenidas utilizando los juegos de *primers* iniciales, se diseñaron *primers* específicos así

como también *primers* consenso basados en regiones conservadas tanto del fragmento genómico S como L.

Diseño de *primers*

Para la amplificación inicial de un fragmento del segmento S se utilizó un set de *primers* disponible en el INEVH que amplifican un fragmento de 359 nt, 16V (Weaver y Calderón comunicación personal) y 19C (5'-CGCACAGTGGATCCTAGGC-3') (Bowen *et al.*, 1996) para la primera reacción de PCR. Los mismos se basan en regiones conservadas del gen de la NP que amplifican todos los mammarenavirus. Para la segunda reacción se utilizaron los *primers* específicos 2835V y 3194C (Weaver y Calderón comunicación personal) basados en la secuencias nucleotídicas de vLCM en la misma región del genoma. A medida que se obtenían secuencias para las distintas muestras de humanos y roedores, se diseñaron sets de *primers* específicos en base a las mismas para amplificar fragmentos de las regiones que codifican para las GPC1 y GPC2 del segmento genómico S.

Para la secuenciación del segmento genómico L se diseñaron sets de *primers* en base al alineamiento de las cepas del vLCM de diferentes partes del mundo disponibles en el *GenBank*.

Análisis filogenético

Los análisis filogenéticos de las secuencias de nucleótidos se realizaron mediante el alineamiento de las secuencias obtenidas para las regiones codificantes de la GPC y la NP del segmento genómico S para las 3 cepas de origen humano (#21904_Hu, #23435_Hu y #44416_Hu) y las cepas de roedores (#2856_Ro y #16255_Ro), y para las regiones codificantes de las proteínas Z y L del segmento genómico L de una de las cepas de origen humano (#23435_Hu). Para ello, se incluyeron distintas secuencias de vLCM publicadas en *GenBank* circulantes en el mundo (Tabla 3). Los alineamientos múltiples se realizaron con el algoritmo ClustalW implementada en BioEdit (v7.2.5) (Hall., 1999). La determinación de los modelos evolutivos se realizó con el programa JModelTest 2 (v2.1.6) (Darriba *et al.*,

2012). Los análisis filogenéticos fueron realizados con cuatro metodologías diferentes a fin de analizar consistencia entre las filogenias obtenidas:

- Maximum Likelihood con la herramienta IQ-TREE. El soporte estadístico de los clados fue calculado mediante un análisis de bootstrap ultra rápido con la realización de 2000 réplicas (Trifinopoulos *et al.*, 2016) (Minh *et al.*, 2013).
- Neighbor-Joining con el programa MEGA (v.6.05). El soporte estadístico de los clados fue calculado mediante un análisis de bootstrap con la realización de 1000 réplicas (Tamura *et al.*, 2013).
- Inferencia bayesiana empleando el programa MrBayes (v.3.1.2). Para ello se corrieron dos cadenas de 10 millones de generaciones para las regiones codificantes de la GPC y L, y se corrieron dos cadenas de 15 millones de generaciones para las regiones codificantes de la NP y la proteína Z. El soporte estadístico de los clados fue calculado mediante probabilidad posterior (Ronquist & Hueselnbeck, 2003).
- Máxima parsimonia empleando el programa TNT (v.1.5). (Goloboff & Catalano, 2016). El soporte estadístico fue calculado por análisis de bootstrap con 1000 réplicas.

Los árboles obtenidos fueron visualizados y editados con el programa FigTree (v1.4.3) (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Cepa	Lugar de origen, año	N° acceso <i>Gen Bank</i>	Clado
Ohio-200504261	Ohio, EEUU, 2005	FJ607037/FJ607026	I
Wisconsin-810362	Wisconsin, EEUU, 2003	FJ607038/FJ607027	I
California-810366	California, EEUU, 2003	FJ607028/FJ607019	I
Michigan-810885	Michigan, EEUU, 2005	FJ607032/FJ607023	I
Massachusetts-811316	Massachusetts, EEUU, 2008	FJ607031/FJ607022	I
201102714	EEUU, 2011	JN687949	I
Armstrong	Geneva	KY514257	I
Armstrong	Missouri, EEUU, 1933	M20869	I
CH-5692	Alemania, 1999	DQ868483/DQ868484	I

Douglas-4707	New York, EEUU, 1947	FJ607035/FJ607024	I
IN-2012(M435)	EEUU, 2012	KF732824	I
Marseille#12	Francia, 2004	DQ286931/DQ285932	I
OQ28	Japón, 1990	AB627952/AB62755	I
Traub	EEUU, 1936	DQ868487/DQ868488	I
WHI-5107	New York, EEUU, 1949	FJ607033	I
EEB-7	España, 2008	JN872495/JN872494	I
Pasteur	Francia, desconocido	DQ868485/DQ868486	I
WE UBC A-337	New York, EEUU, 1935	FJ607034	I
WE NIID	Japón, desconocido	LC413283	I
WE UBC 57135	New York, EEUU, 1935	FJ607025	I
WE	New York, EEUU, 1935	AF004519	I
Aggresive-strain	2007	EU480451	I
Docile-strain	2007	EU480453	I
Rhode Island-200501927	Rhode Island, EEUU, 2005	FJ607021	I
HP65-2009/1	Francia, 2009	JF912084	I
MX ESLOVAQUIA	Eslovaquia, 1998	EU195889	I
IGS32	EEUU	KJ603307	I
BRC	Japón, 2005	AB627953	II
M1	Austria, 2005	AB261991	II
Dandenong	Former Yugoslavia, 2006	EU136038/EU136039	II
Bulgaria	Bulgaria, 1956	GQ862982/GQ86281	II
Georgia-Lyles-810935	Georgia, EEUU, 1984	FJ607029/FJ607020	III
SN05	España, 2004	FJ895884	IV
GR01	España, 2004	FJ895883	IV
CABN	España, 2004	FJ895882	IV

Tabla 3. Cepas vLCM incluidas en el análisis filogenético.

RESULTADOS

Se realizó la extracción de ARN viral de 3 cepas de casos humanos confirmados de LCM y de 2 cepas de vLCM de roedores *Mus musculus* (Tabla 2).

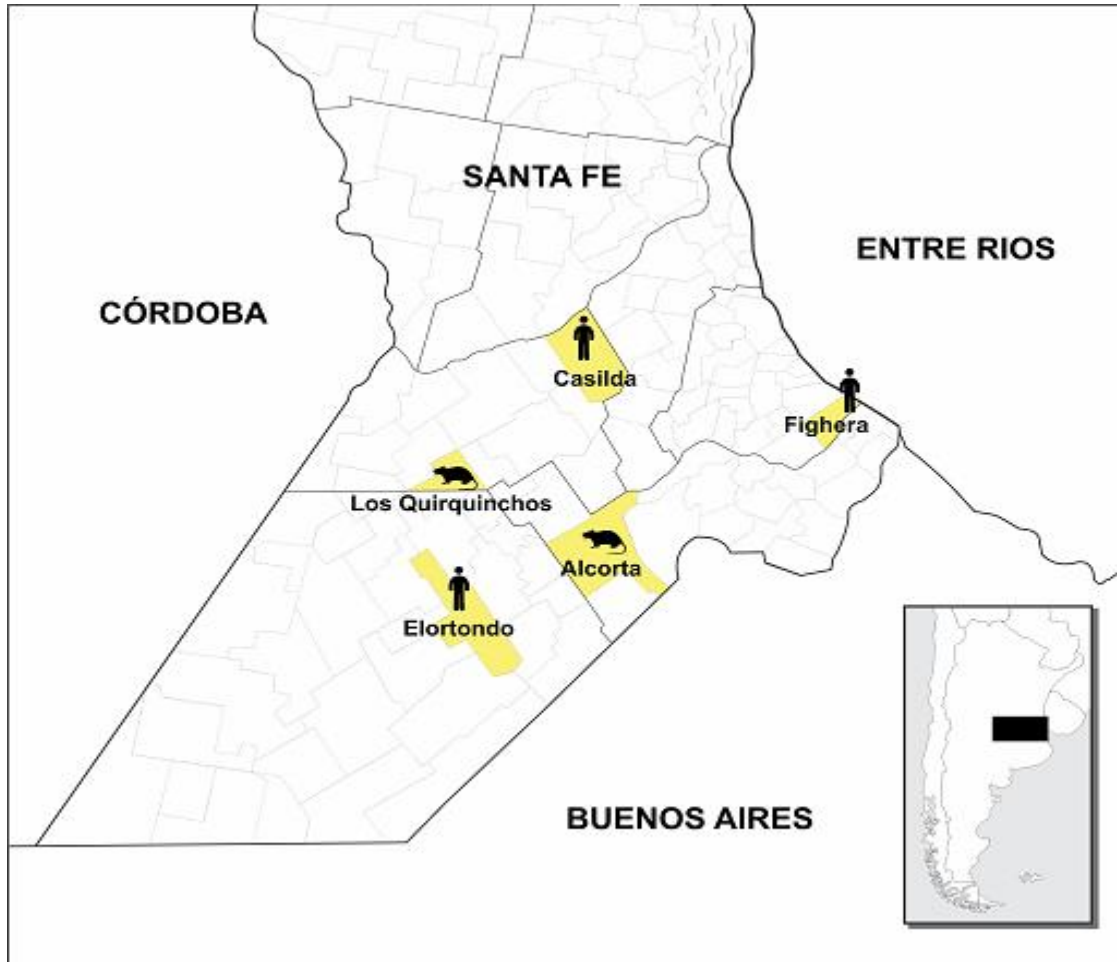


Figura 6. Ubicación de las localidades de las cepas de humanos y roedores estudiadas.

Inicialmente se trabajó con la cepa humana #23435_Hu, para la amplificación de los fragmentos genómicos iniciales. Se utilizaron set de *primers* disponibles en el INEVH mediante los cuales se obtuvieron productos del tamaño esperado correspondiente a la región codificante de la NP del segmento genómico S. Los *primers* 16V y 19C, y 2835F y 3194R para la primera y segunda reacción de RT PCR, respectivamente, se usaron para

amplificar un fragmento de 359 nt.; y los *primers* 1696V y 1010C (Bowen *et al*; 1996) que amplificaron un fragmento de 650 nt de una porción del gen que codifica la NP.

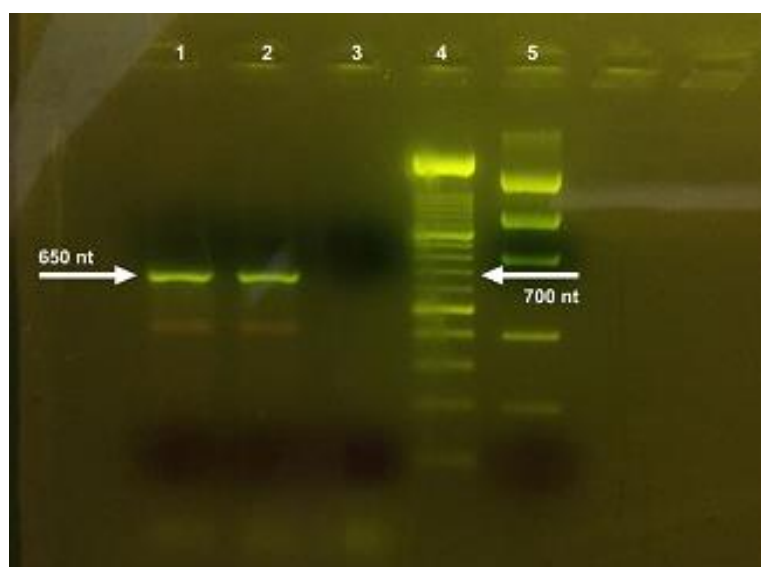


Figura 7. Productos de RT-PCR de fragmentos del segmento genómico S en gel de agarosa al 2%. Calles: 1 y 2 fragmentos de 650 nt (*primers* 1696-1010C), 3 vacía, 4 marcador de peso molecular (PM) y 5 marcador de masa (MM).

En base a las secuencias específicas obtenidas y al alineamiento con cepas de vLCM disponibles en el *GenBank* se diseñaron sets de *primers* para el segmento genómico S y L para amplificar y secuenciar las cepas propuestas en el estudio. (Tablas 4 y 5).

Segmento genómico	Ronda de reacción	Nombre del <i>primer</i>	Secuencia del <i>primer</i> 5'-3'
S	1era	19C	(Bowen <i>et al</i> ; 1996)
		962R	WCTGCAGCRAGRATCATCCA
	2da	19C	(Bowen <i>et al</i> ; 1996)
		255R	ACATACCACAAGACCTACCAGC
S	1era	19C	(Bowen <i>et al</i> , 1996)
		962R	WCTGCAGCRAGRATCATCCA
	2da	16F	TAGGCTTKTTGGATTGCGCT
		706R	CAGCCCCAACCCTYTCAT
S	1era	16F	TAGGCTTKTTGCATTGCGCT

		1738R	TGARAGYGCYTCYAARGCAAG
	2da	501F	GTCTCAAGCCTACATCTCA
		998R	GCATTTTGCAACAGCTGT
S	1era	16F	TAGGCTTKTTGGATTGCGCT
		1738R	TGARAGYGCYTCYAARGCAAG
	2da	870F	GCRGGYACRTTCACTTGGAC
		1696R	CACAACATCYTRCCACATGA
S	1era	870F	GCRGGYACRTTCACTTGGAC
		1010C	(Bowen <i>et al</i> , 1996)
	2da	1465F	TGAAGATACCAACACACAGA
		1969R	TGGTTCTAAGTTGTCAGGATG
S	1era	1696V	(Bowen <i>et al</i> , 1996)
		1010C	(Bowen <i>et al</i> , 1996)
S	1era	2224F	CATTGTCTGACTRTAGCTYARGCC
		19C	(Bowen <i>et al</i> , 1996)
	2da	2321F	GTTGTRTTYCCCATGCTCTCC
		3194R	(Weaver y Calderón comunicación personal)
S	1era	2224F	CATTGTCTGACTRTAGCTYARGCC
		19C	(Bowen <i>et al</i> , 1996)
	2da	2835F	(Weaver y Calderón comunicación personal)
		19C	(Bowen <i>et al</i> , 1996)
S	1era	2224F	CATTGTCTGACTRTAGCTYARGCC
		19C	(Bowen <i>et al</i> , 1996)
	2da	3010F	GCAAGGGACATCAACTCT
		19C	(Bowen <i>et al</i> , 1996)

Tabla 4. *Primers* disponibles y diseñados en este trabajo para la amplificación y secuenciación de las regiones codificantes del segmento genómico S de las cepas de vLCM.

Segmento genómico	Ronda de reacción	Nombre del primer	Secuencia del primer 5'-3'
L	1era	19C	(Bowen <i>et al</i> , 1996)
		677R	GGAAGTCYTGGAIGAYTGG
	2da	19C	(Bowen <i>et al</i> , 1996)
		257R	TGTCTRCAVAARTARTGRTCAT
L	1era	19C	(Bowen <i>et al</i> , 1996)
		677R	GGAAGTCYTGGAIGAYTGG
	2da	19C	(Bowen <i>et al</i> , 1996)
		372R	TYACTCYTCRTAGGGRRGGHGG
L	1era	19C	(Bowen <i>et al</i> , 1996)
		861R	GGTTATGATAGGATTGGTG
	2da	19C	(Bowen <i>et al</i> , 1996)
		764R	AGATCTGTTCTGTTGGCAC
L	1era	201F	ATGTTGGCAAAGGTTTCGAC
		1147R	GGWRGACCCYYTGATACTHGG
	2da	294F	CCCTCTCTGTAAGCATCCA
		1047R	CTGAVTGGGARCCTGTRC
L	1era	253F	AGACATTGCCTAACCTCCT
		1147R	GGWRGACCCYYTGATACTHGG
	2da	294F	CCCTCTCTGTAAGCATCCA
		1047R	CTGAVTGGGARCCTGTRC
L	1era	811F	AATCGGTGTAGAAGAAGGC
		1805R	AGAGAGATGAGCACTACAC
	2da	836F	GAACATCACCAATCCTATC
		1766R	CTAACTCTCATCAGCGTTC

L	1era	2173F	ACCCAVACACCYARYTCAAADGA
		2895R	ACTGATGTGAAGGACTGG
	2da	1474F	GARAACCAWCCRAAICCRAAYTG
		2298R	GACCTGGCTTTGGATGAACA
L	1era	1949F	GGRCTCCAYCTCATRTTTTTWGA
		2934R	GCCAATTTCCCGTTAGACC
	2da	2173F	ACCCAVACACCYARYTCAAADGA
		2895R	ACTGATGTGAAGGACTGG
L	1era	2711F	GCYTCBTTYTTBTCYTTRTT
		3472R	MTCCAGCYTYATTGAYATG
	2da	2762F	TCHCCATTYTTRAGYTTRTG
		3393R	CAYAACGCHTCTGAYTTYTAYGG
L	1era	3146F	GCAAACCGCCCAACTACT
		4206R	GATTGGTTTTCDTGYATGA
	2da	3242F	TCACTATCAACCAACTCACT
		3900R	GTYGGDGGAAATAGRGARCTYTA
L	1era	3242F	TCACTATCAACCAACTCACT
		4758R	CTTGTTAGTGCTGTRAGYCARAT
	2da	3674F	AACCCTTCCCGCACATTG
		4383R	TTATCAGGCAAATGGC
L	1era	4148F	CCTGARTATGCRTTKGC
		5481R	TGGATYAGRTRCRTGYCC
	2da	4187F	TTCATRCAWGAGARCCAATC
		4758R	CTTGTTAGTGCTGTRAGYCARAT
L	1era	4672F	GCCCTCTGAAATTTGACTC
		6631R	AAGACTACTGTTGACAAGCG
	2da	4628F	TCGTAATCTGAGTGACTTAG
		6485R	CTCTCTTTTCAGCAGGTTTAG

L	1era	4672F	GCCCTCTGAAATTTGACTC
		6631R	AAGACTACTGTTGACAAGCG
	2da	4436F	CCTCATTGAACCCCTTTGTC
		6341R	TTAAGCAAAGAGGCAGTYG
L	1era	5768F	GCYARRCAAACAGAAGACA
		19C	(Bowen <i>et al</i> , 1996)
	2da	6128F	TCATTCACACTRCTRTRCAVCC
		6783R	ATAGTAGATGGTCGCTGTGA
L	1era	6551F	ACCACATCATCACAACATCAT
		19C	(Bowen <i>et al</i> , 1996)
	2da	6645F	TCATRGARTCCATRCCDGA
		19C	(Bowen <i>et al</i> , 1996)
L	1era	5768F	GCYARRCAAACAGAAGACA
		19C	(Bowen <i>et al</i> , 1996)
	2da	7055	CAGCGTGACAGCAGTTTGAG
		19C	(Bowen <i>et al</i> , 1996)

Tabla 5. *Primers* disponibles y diseñados en este trabajo para la amplificación y secuenciación de las regiones codificantes del segmento genómico L de la cepa de vLCM.

Se analizaron por PCR y secuencia los productos de tamaño esperado tanto para las cepas de origen humano como para las cepas de roedores propuestas en este trabajo (#23435_Hu, #44416_Hu, #21904_Hu, #2856_Ro y #16255_Ro).

Se realizó el alineamiento de las secuencias obteniéndose las secuencias completas de las regiones codificantes de la GPC (1497 nt) y de la NP (1398 nt). Y con respecto al segmento L, se obtuvo la secuencia completa de las región codificante de la proteína Z (269 nt) y un fragmento de 6597 nt de la proteína L.

En la tabla 6 se observa el porcentaje de identidad nucleotídica (nt) y aminoacídica (aa) entre las cepas argentinas, entre las argentinas y el clado I, y la comparación con los diferentes clados de las cepas de vLCM.

El mayor porcentaje de identidad de los 4 genes y sus proteínas virales correspondientes de las cepas argentinas se observa con las cepas del clado I. En el Anexo II se detallan las identidades nt y aa de las 4 proteínas virales de las cepas argentinas estudiadas y otras cepas referentes de vLCM.

	% Identidad nt				% Identidad aa			
	GPC	NP	L	Z	GPC	NP	L	Z
Entre cepas argentinas	88.3	89.3	N/A	N/A	96.3	97.4	N/A	N/A
Cepas argentinas con Clado I	83.9	85.1	81.2	78.0	94.7	96.3	88.8	83.6
Cepas argentinas con Clado II	79.2	79.6	73.0	68.3	91.2	93.5	80.3	75.5
Cepas argentinas con Clado III	77.6	78.9	72.5	73.7	89.6	92.5	80.4	80.7
Cepas argentinas con Clado IV	74.3	78.0	N/A	N/A	81.7	89.9	N/A	N/A

Tabla 6. Comparación de las secuencias nt y aa de la GPC y NP del gen S, y de las proteínas Z y L del gen L, entre 5 cepas argentinas y otras cepas de vLCM conocidas.

N/A: no aplica. Sólo 1 cepa argentina para segmento L. No hay secuencias de clado IV para segmento L.

En función de los análisis filogenéticos realizados mediante inferencia bayesiana para las regiones codificantes de la NP y de la GPC, las cepas argentinas agrupan juntas, y junto a otras cepas del clado I. Dentro del clado I, las cepas de roedores se encuentran agrupadas y junto a ellas las 3 cepas humanas (Figuras 8 y 9). Resultados similares se obtuvieron con los otros métodos propuestos. (Anexo I).

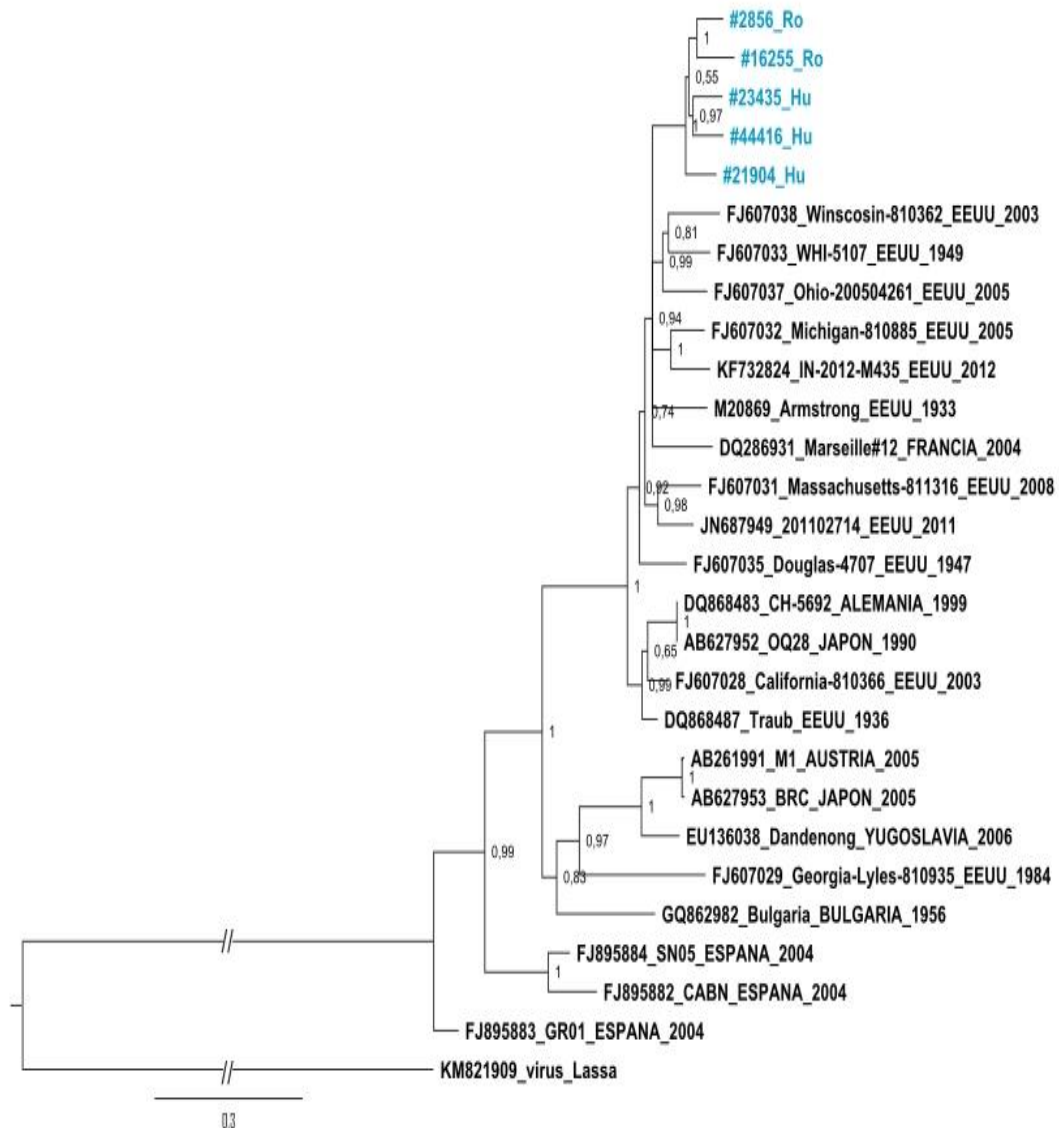


Figura 8. Árbol filogenético basado en la región codificante para la nucleoproteína del segmento genómico S construido con inferencia bayesiana (MrBayes v.3.1.2), siguiendo el modelo evolutivo GTR+G. Los números en los nodos del árbol indican valores de probabilidad posterior. La raíz del árbol fue establecida con el virus Lassa. La barra de escala en la parte inferior del árbol indica sustituciones de nucleótidos por sitio. Las ramas interrumpidas, indicadas por barras dobles, se acortaron en un 50 % para una mejor representación gráfica.

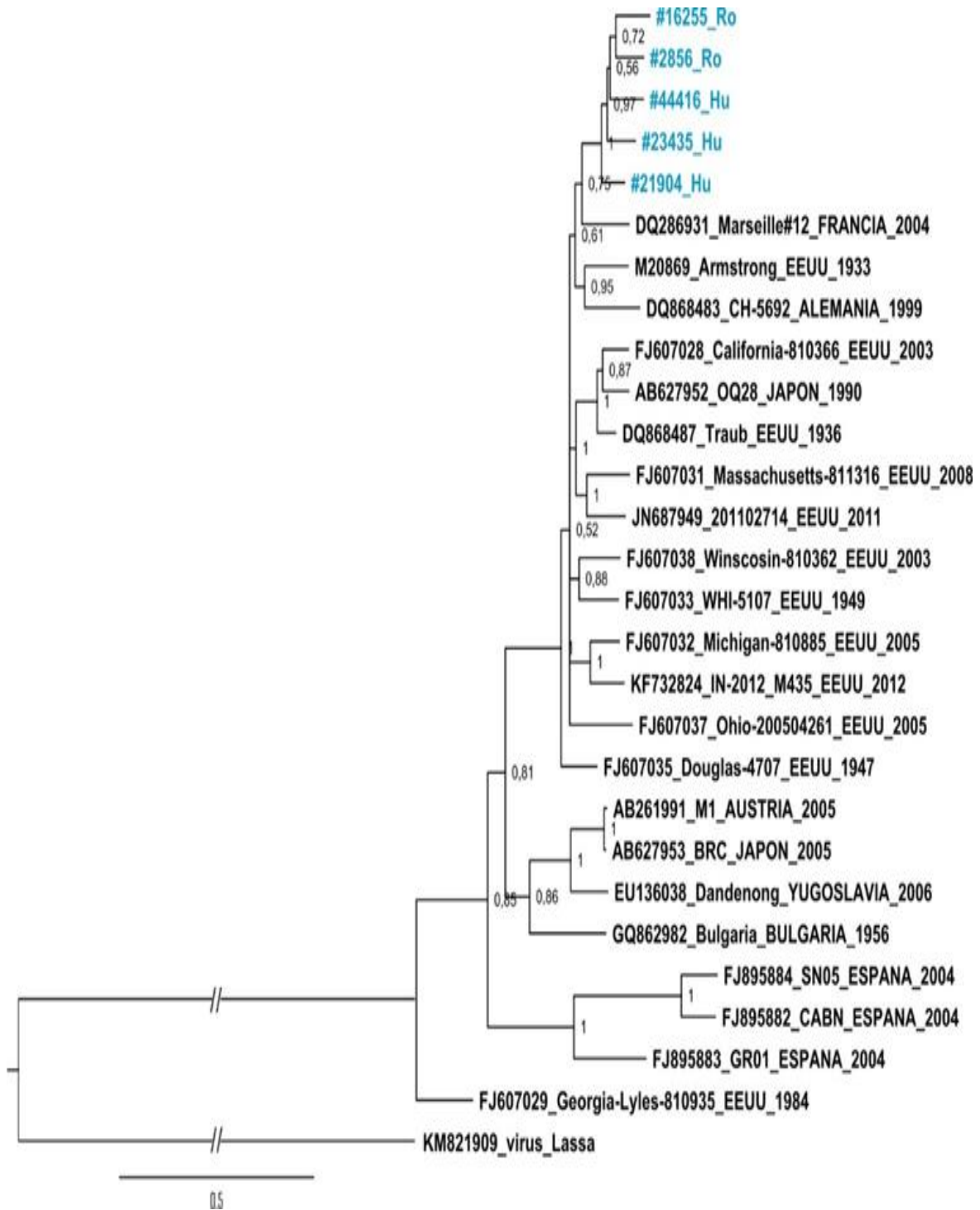


Figura 9. Árbol filogenético basado en la región codificante para la glicoproteína del segmento genómico S construido con inferencia bayesiana (MrBayes v.3.1.2), siguiendo el modelo evolutivo GTR+I+G. Los números en los nodos del árbol indican valores de probabilidad posterior. La raíz del árbol fue establecida con el virus Lassa. La barra de escala en la parte inferior del árbol indica sustituciones de nucleótidos por sitio. Las ramas interrumpidas, indicadas por barras dobles, se acortaron en un 50 % para una mejor representación gráfica.

En el análisis filogenético de las 2 regiones codificantes, proteínas Z y L, correspondientes al segmento genómico L, se obtuvo que la cepa #23435_Hu agrupa con otras cepas pertenecientes al clado I (Figuras 10 y 11).

El árbol filogenético obtenido para la proteína Z sí bien no tiene una buena resolución debido a la longitud de nucleótidos se puede ver que agrupa en el clado I.

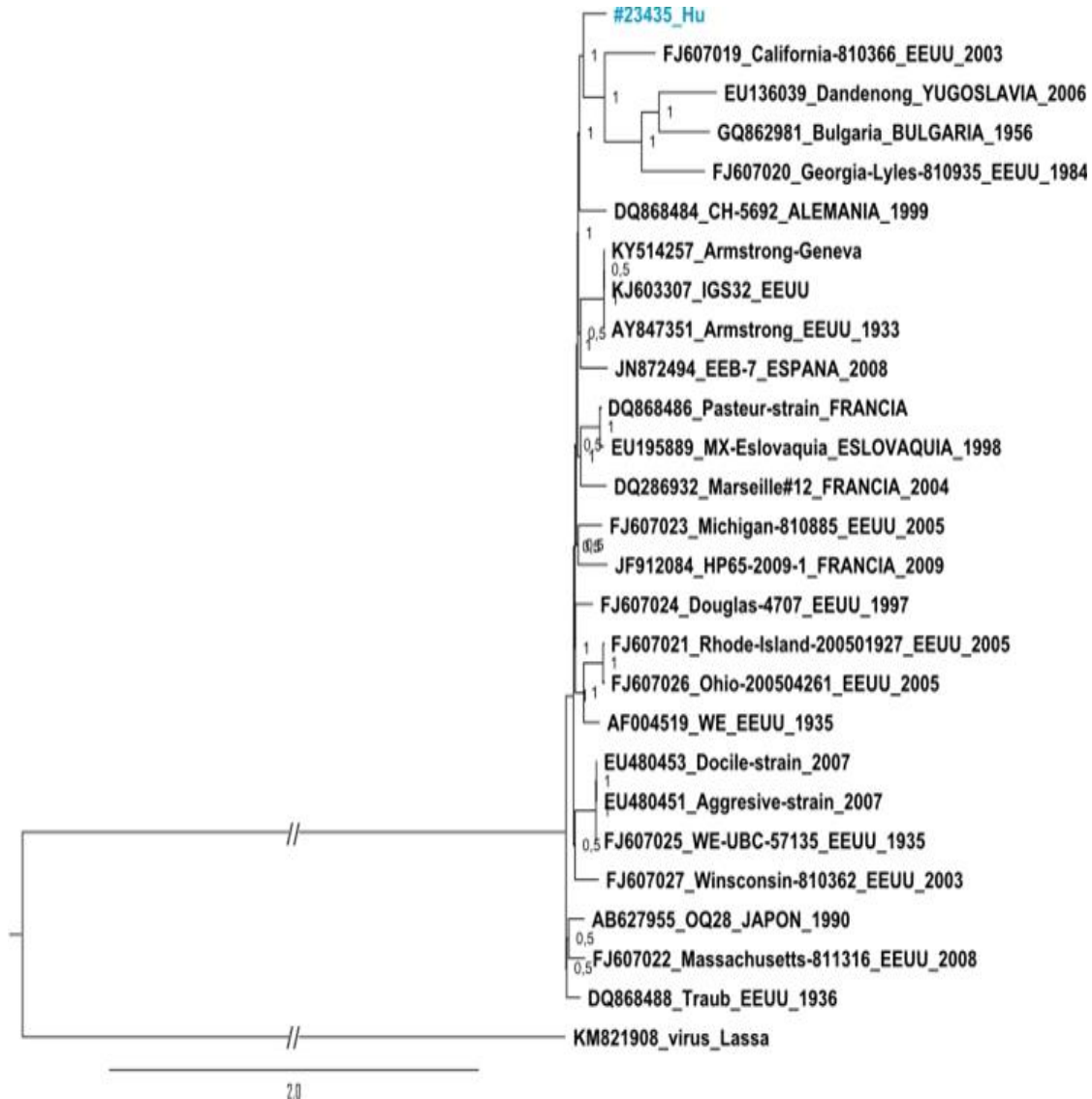


Figura 10. Árbol filogenético basado en el fragmento de la región codificante para la proteína L del gen L, construido con inferencia bayesiana (MrBayes v.3.1.2), siguiendo el modelo evolutivo GTR+G. Los números en los nodos del árbol indican valores de probabilidad posterior. La raíz del árbol fue establecida con el virus Lassa. La barra de escala en la parte inferior del árbol indica sustituciones de nucleótidos por sitio. Las ramas interrumpidas, indicadas por barras dobles, se acortaron en un 50% para una mejor representación gráfica.

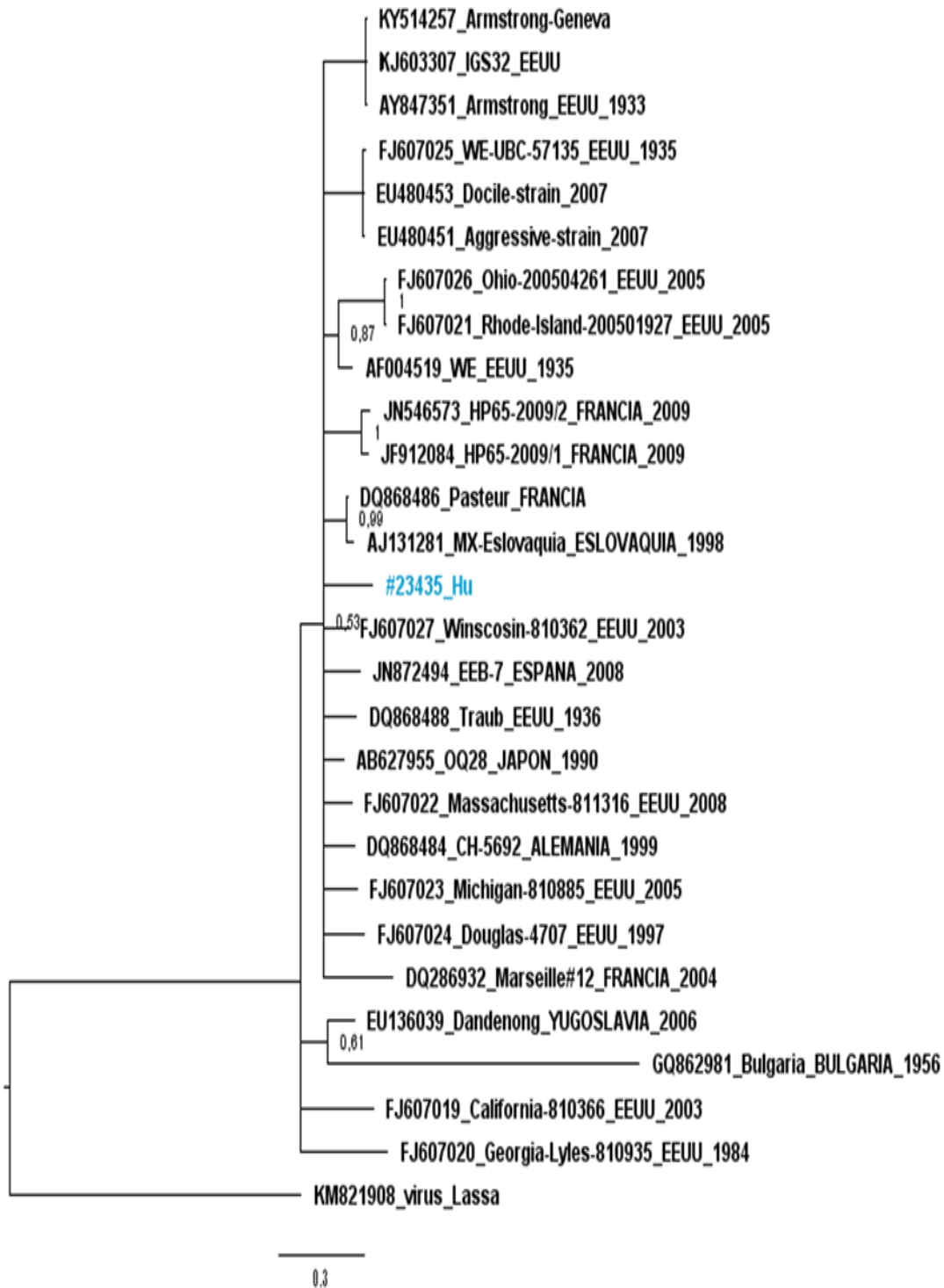


Figura 11. Árbol filogenético basado en la región codificante para la proteína Z del gen L, construido con inferencia bayesiana (MrBayes v.3.1.2), siguiendo el modelo evolutivo TIM2+I+G. Los números en los nodos del árbol indican valores de probabilidad posterior. La raíz del árbol fue establecida con el virus Lassa. La barra de escala en la parte inferior del árbol indica sustituciones de nucleótidos por sitio.

2- CAPÍTULO DE CONCLUSIONES

DISCUSIÓN

El vLCM tiene el mayor potencial geográfico de todos los mammarenavirus y puede presentarse en cualquier lugar donde se encuentre su reservorio natural, el roedor *Mus musculus*. El vLCM es el agente etiológico de una enfermedad con una baja incidencia a nivel mundial. El índice de prevalencia varía entre 1,7% en España (Lledó, 2003) y un 36% en el Norte de Croacia, Isla de Vir (Dobec, 2006). En Argentina, la región endémica de FHA es la única región estudiada en cuanto a la circulación de vLCM, observándose una prevalencia del 2,3% al sur de la provincia de Santa Fe (Ambrosio *et al.*, 1994), un 3,3% en la población de la ciudad de Río Cuarto y del 7,3% en roedores de la especie *Mus musculus* en dicha ciudad (Riera *et al.*, 2005).

Desde la identificación de la enfermedad en Argentina en la década del 70 hasta el año 2020, se confirmaron 20 casos de LCM, 17 de ellos se diagnosticaron durante el período 1970-2010 (Ambrosio *et al.*, 2010) y 3 entre los años 2010-2020. El diagnóstico se realizó por conversión serológica y/o aislamiento viral en base al diagnóstico diferencial en pacientes con sospecha de FHA. Los estudios serológicos se realizaron por diferentes metodologías, inmunofluorescencia indirecta, ELISA y/o test de neutralización. La presentación clínica de 19/20 casos confirmados con LCM fue leve con síntomas inespecíficos diagnosticados inicialmente como casos leves de FHA. Sólo 1/20 casos fue diagnosticado con LCM en la fase neurológica de la enfermedad cuando se manifestó como una meningitis aséptica. Todos los casos tuvieron una recuperación total sin secuelas posteriores. De los 20 casos humanos diagnosticados con LCM en los últimos 50 años sólo se lograron aislar 4 cepas y 3 fueron caracterizadas molecularmente en el presente trabajo. La procedencia de los casos estudiados es principalmente de origen rural por lo que se podría estimar que la infección se contrajo por contacto directo con el roedor reservorio y/o con las excretas infectadas con vLCM. Según datos bibliográficos se han documentado otros tipos de transmisión como la transmisión de madre a feto (CDC

2005; Fisher *et al.*, 2006; Mac Neil *et al.*, 2012; Palacios *et al.*, 2008; Barton *et al.*, 2002). En Argentina, no hay reportes de transmisión feto materna de vLCM hasta el momento. En una investigación realizada por Riera y colaboradores se estudiaron 7 muestras de suero de embarazadas con detección de anticuerpos tipo IgG para vLCM pero sin detección de anticuerpos en los recién nacidos (Riera *et al.*, 2005).

El presente trabajo de tesis aporta por primera vez en Argentina información molecular en base a la caracterización completa de las 4 proteínas virales del vLCM, la GPC y la NP del gen S, y las proteínas Z y L del gen L, correspondientes a 5 cepas aisladas de humanos (3) y roedores *M. musculus* (2) del área endémica de FHA. Esta información amplía el conocimiento existente en base a un pequeño fragmento de 359 nt de la NP del gen S de cepas de vLCM de Argentina (Saavedra *et al.*, 2004).

Las 5 cepas estudiadas corresponden a cepas aisladas en el INEVH, derivadas de casos humanos y roedores procedentes de localidades del sur de la provincia de Santa Fe, a saber: cepa #23435_Hu de Elortondo año 1987, cepa #44416_Hu de Fighera año 2001, cepa #21904_Hu de Casilda año 1985, cepa #2856_Ro de Los Quirquinchos año 1990 y la cepa #16255_Ro de Alcorta año 1993.

Las secuencias nucleotídicas obtenidas codifican el gen completo de las proteínas GPC y NP, de 1497 y 1398 nt respectivamente, correspondientes al segmento genómico S de las 5 cepas estudiadas, y el gen completo de la proteína Z de 269 nt y un fragmento de 6597 nt de la proteína L, correspondientes al segmento genómico L de la cepa humana #23435_Hu.

La comparación de secuencias completas de los genes que codifican para la NP de las cepas argentinas con otras cepas de vLCM que circulan en el mundo revela que comparten un porcentaje de identidad nucleotídica de 86,4% con una cepa de Ohio, EEUU, identificada en el año 2005 y con otra cepa denominada Traub 1936, identificada también en EEUU con un 86.2% de identidad (Anexo II). Similarmente se muestra un alto porcentaje de identidad aminoacídica con la cepa Traub 1936 (97.6%). La secuencia

completa de la GPC muestra también un alto porcentaje de identidad nucleotídica del 85,7% con la cepa Marseille, Francia identificada en el año 2004 y aminoacídica del 96.4% con la misma cepa y la cepa Traub 1936. Con respecto al fragmento de la proteína L, el mayor porcentaje de identidad se observa con la cepa denominada Douglas, identificada en EEUU en 1947 (82.4 % y 90.7 % nucleotídica y aminoacídica, respectivamente). La secuencia completa de la proteína Z muestra un 80.8% de identidad nucleotídica con las cepas Wisconsin de EEUU y la cepa francesa denominada Pasteur y un 87,5% de identidad aminoacídica con la cepa americana WE UBC identificada en 1935.

Todas las cepas mencionadas anteriormente, con las cuales las cepas argentinas incluidas en este trabajo presentan los valores más altos de identidad nucleotídica y aminoacídica pertenecen al clado I.

La topología general de los árboles filogenéticos obtenidos en el estudio de las cepas argentinas concuerda en cuanto a la distribución de los clados reportados en la literatura (Ledesma *et al.*, 2009, Albariño *et al.*, 2010; Knust *et al.*, 2014, Lavergne *et al.*, 2015, Alburkat *et al.*, 2020; Vilibic-Cavlek *et al.*, 2021).

Los análisis filogenéticos basados en los 4 genes de las proteínas virales muestran que las 5 cepas argentinas estudiadas agrupan dentro del clado I, coincidiendo con lo observado previamente en base al análisis de las secuencias nt de un pequeño fragmento del gen S de cepas argentinas de vLCM (Saavedra *et al.*, 2004). En el caso de los genes de la GPC y de la NP, las 5 cepas estudiadas, agrupan en un mismo subclado con buen soporte estadístico. En el clado I agrupan también secuencias de diferentes partes del mundo, principalmente de EEUU, Francia y Alemania; asociadas con casos humanos severos (Albariño *et al.*, 2010).

La procedencia de las cepas estudiadas en este trabajo delimita un área de estudio restringida de alrededor de 15.000 km² aproximadamente, mientras que la distribución del roedor reservorio es mucho más amplia, abarcando extensas regiones de nuestro país donde se desconoce la circulación del vLCM. Por lo tanto, contar con un mayor número de

secuencias de cepas de origen humano y de roedores provenientes de diferentes regiones geográficas de Argentina, permitiría establecer áreas de circulación viral y determinar zonas de riesgo a los fines de implementar medidas de prevención.

CONCLUSIONES

Los resultados moleculares obtenidos en el presente trabajo de tesis sobre la caracterización genómica de cepas humanas y de roedores de vLCM permitieron:

- Caracterizar molecularmente por primera vez en Argentina, el fragmento genómico completo que codifica para las proteínas GPC y NP del segmento S, de 3 cepas aisladas de casos humanos y 2 cepas de roedores.
- Caracterizar molecularmente por primera vez en Argentina, el fragmento genómico completo que codifica para la proteína Z del segmento L de una cepa aislada de origen humano.
- Caracterizar molecularmente por primera vez en Argentina, un fragmento de 6597 nt que codifica para la proteína L del segmento L de una cepa aislada de origen humano.
- Comparar la identidad nucleotídica y aminoacídica entre las cepas argentinas y con las cepas de vLCM circulantes en otros países.
- Confirmar que todas las cepas argentinas pertenecen al mismo clado (clado I).

3- ANEXOS

Anexo I

- a) Árboles filogenéticos realizados para la región codificante de la NP con los demás métodos propuestos.

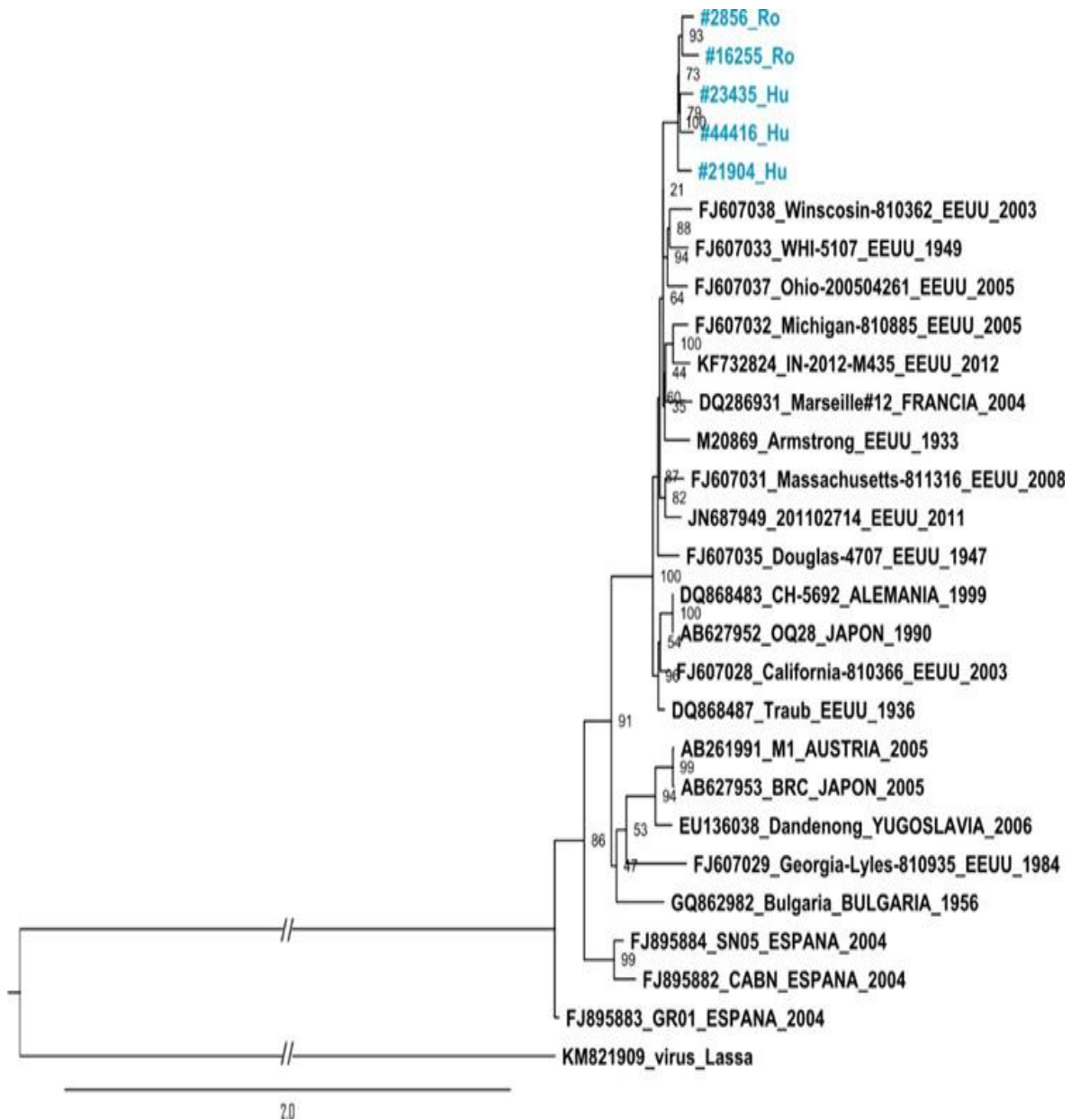


Figura 12. Árbol filogenético basado en la región codificante para la proteína NP construido con Maximum Likelihood (IQ-Tree Web Server), siguiendo el modelo evolutivo GTR+G. Los números en los nodos del árbol indican valores de soporte (%). La raíz del árbol fue establecida en función de virus Lassa. La barra de escala

en la parte inferior del árbol indica sustituciones de nucleótidos por sitio. Las ramas interrumpidas, indicadas por barras dobles, se acortaron en un 50 % para una mejor representación gráfica.

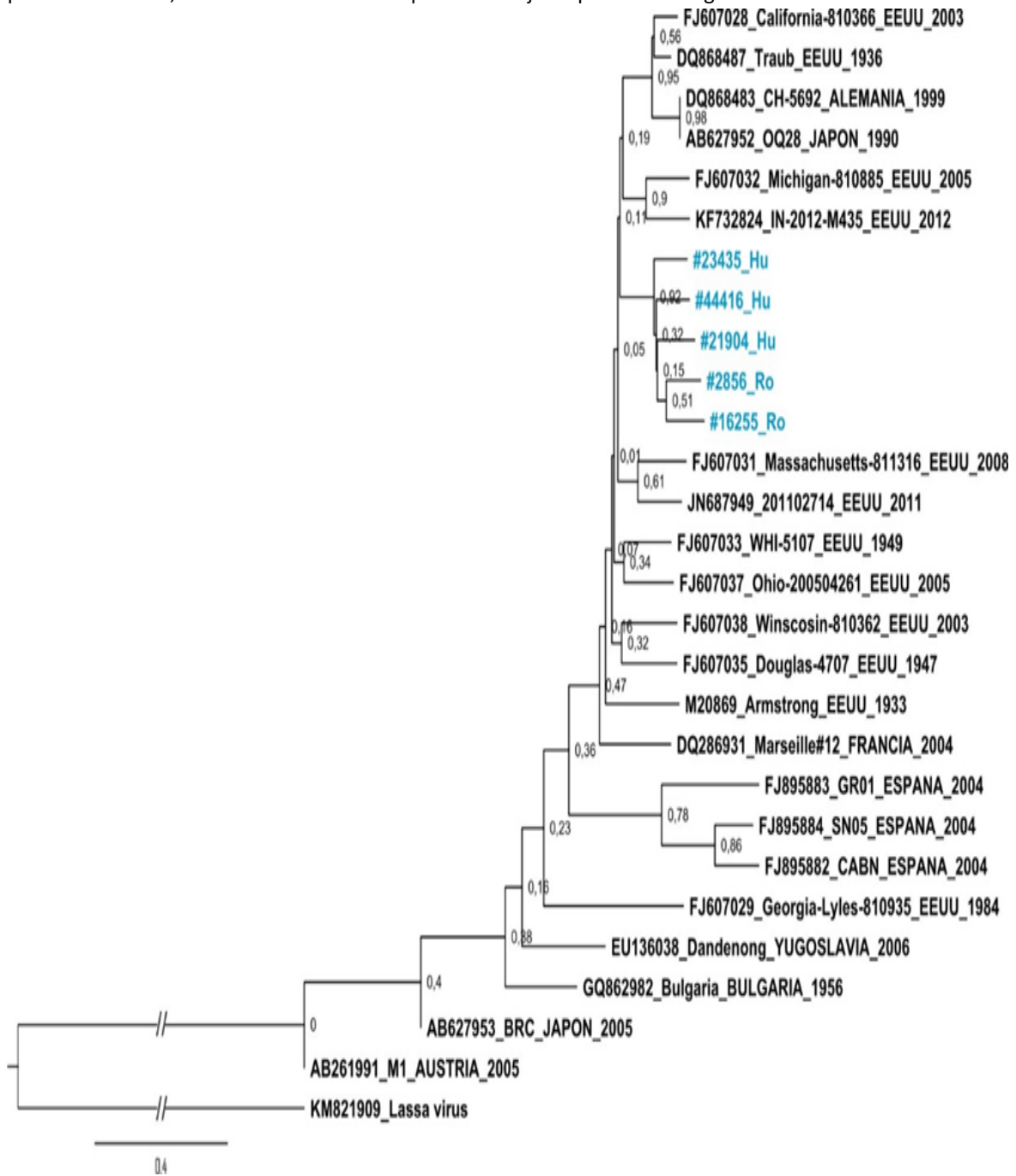


Figura 13. Árbol filogenético basado en la región codificante para la proteína NP construido con Neighbor-Joining (MEGA v.6.05), siguiendo el modelo evolutivo GTR+G. Los números en los nodos del árbol indican valores de soporte. La raíz del árbol fue establecida en función de virus Lassa. La barra de escala en la parte inferior del árbol indica sustituciones de nucleótidos por sitio. Las ramas interrumpidas, indicadas por barras dobles, se acortaron en un 50 % para una mejor representación gráfica.

Group freqs., 1000 replicates, cut=50 (tree 0) - Poisson Bootstrap

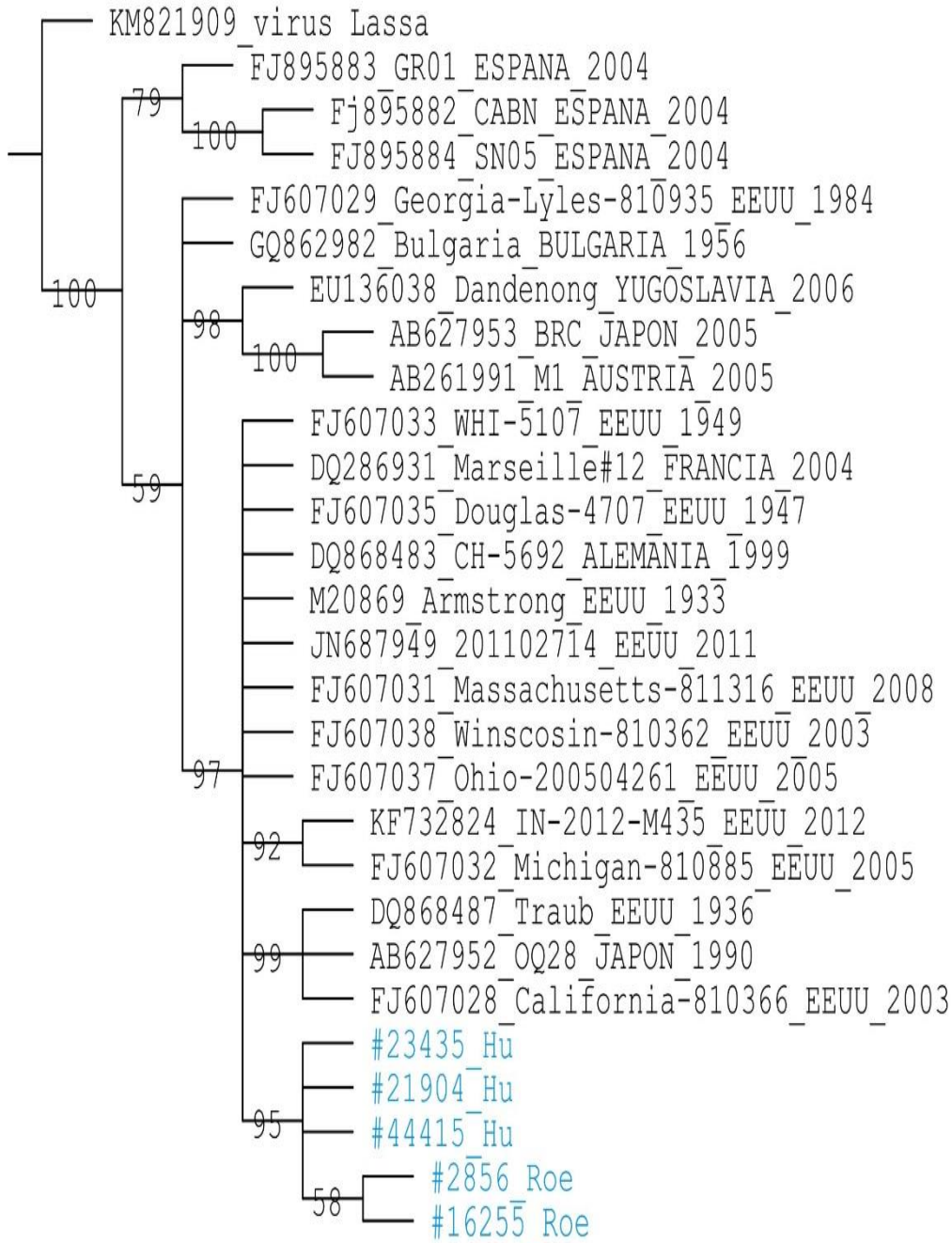


Figura 14. Árbol filogenético basado en la región codificante para la proteína NP construido con máxima parsimonia (TNT v.1.5), siguiendo el modelo evolutivo GTR+G. Los números en los nodos del árbol indican valores de soporte.

b) Árboles filogenéticos realizados para la región codificante de la GPC con los demás métodos propuestos.



Figura 15. Árbol filogenético basado en la región codificante para la proteína GPC construido con Maximun Likelihood (IQ-Tree Web Server), siguiendo el modelo evolutivo GTR+I+G. Los números en los nodos del árbol indican valores de soporte (%). La raíz del árbol fue establecida en función de virus Lassa. La barra de escala en la parte inferior del árbol indica sustituciones de nucleótidos por sitio. Las ramas interrumpidas, indicadas por barras dobles, se acortaron en un 50 % para una mejor representación gráfica.

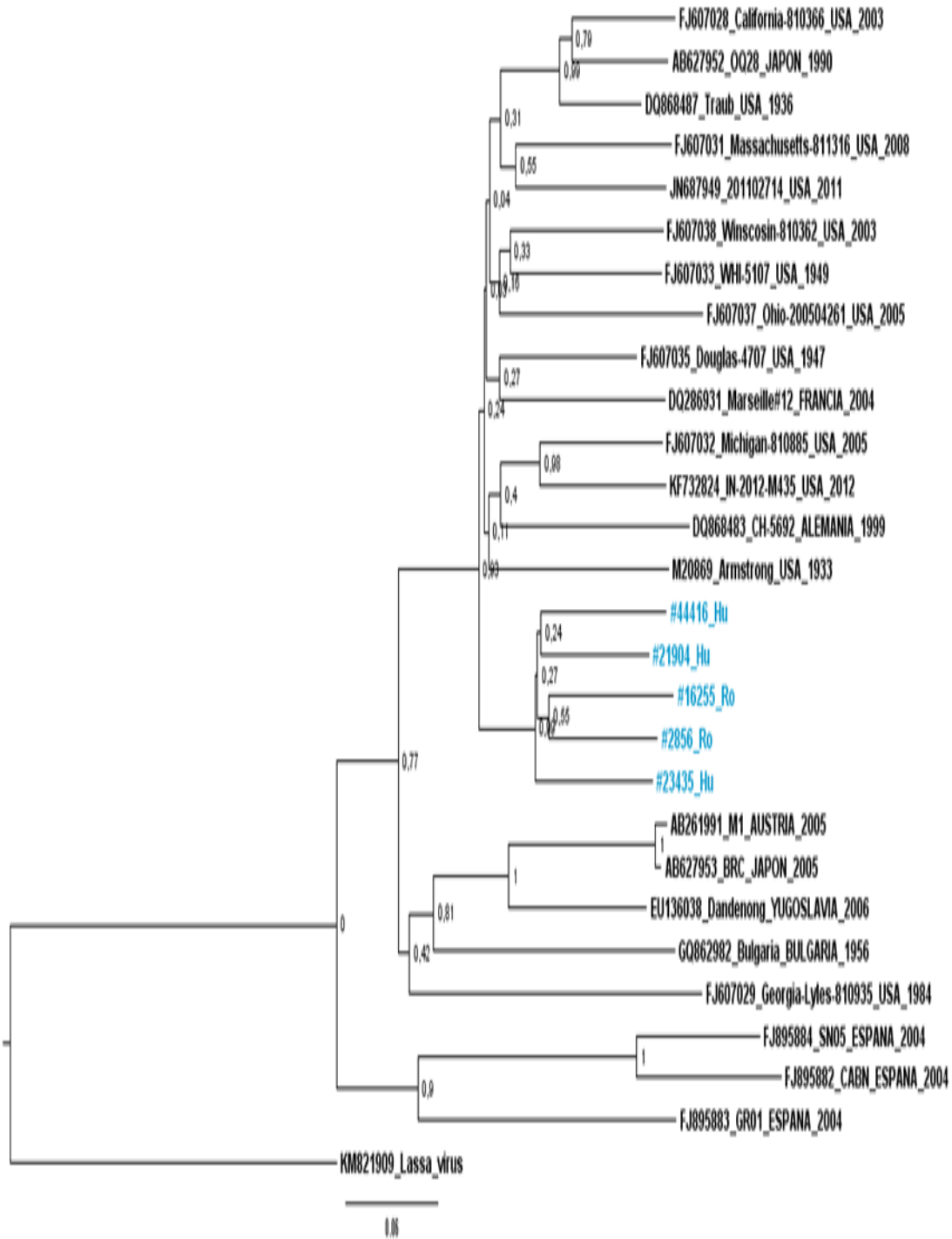


Figura 16. Árbol filogenético basado en la región codificante para la proteína GPC construido con Neighbor-Joining (MEGA v.6.05), siguiendo el modelo evolutivo GTR+G. Los números en los nodos del árbol indican valores de soporte. La raíz del árbol fue establecida en función de virus Lassa. La barra de escala en la parte inferior del árbol indica sustituciones de nucleótidos por sitio.

Group freqs., 100 replicates, cut=50 (tree 0) - Poisson Bootstrap

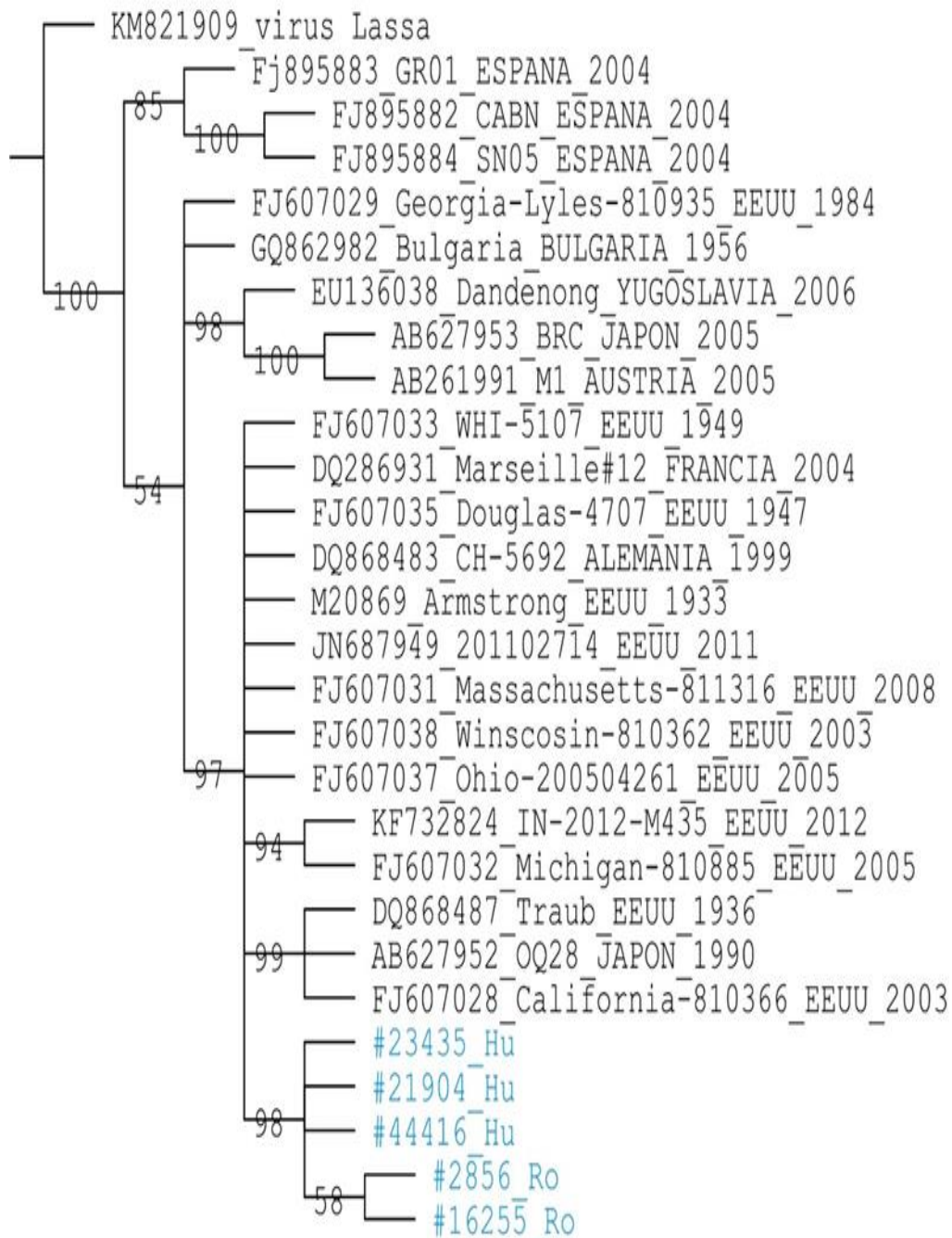


Figura 17. Árbol filogenético basado en la región codificante para la proteína GPC construido con máxima parsimonia (TNT v.1.5), siguiendo el modelo evolutivo GTR+G. Los números en los nodos del árbol indican valores de soporte.

- c) Árboles filogenéticos realizados para la región codificante de la proteína L con los demás métodos propuestos.

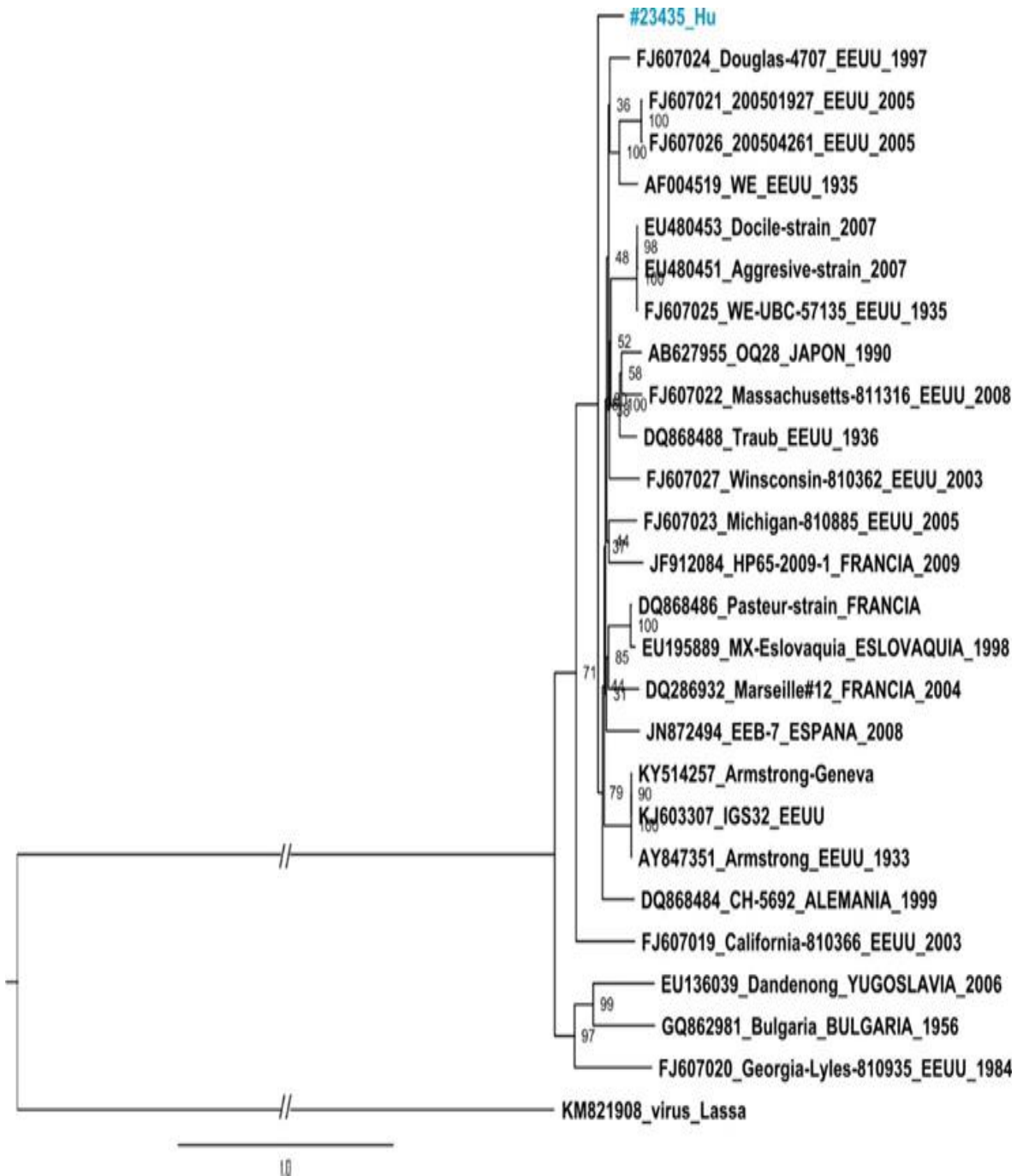


Figura 18. Árbol filogenético basado en la región codificante para la proteína L construido con Maximun Likelihood (IQ-Tree Web Server), siguiendo el modelo evolutivo GTR+G. Los números en los nodos del árbol indican valores de soporte (%). La raíz del árbol fue establecida en función de virus Lassa. La barra de escala en la parte inferior del árbol indica sustituciones de nucleótidos por sitio. Las ramas interrumpidas, indicadas por barras dobles, se acortaron en un 50 % para una mejor representación gráfica.

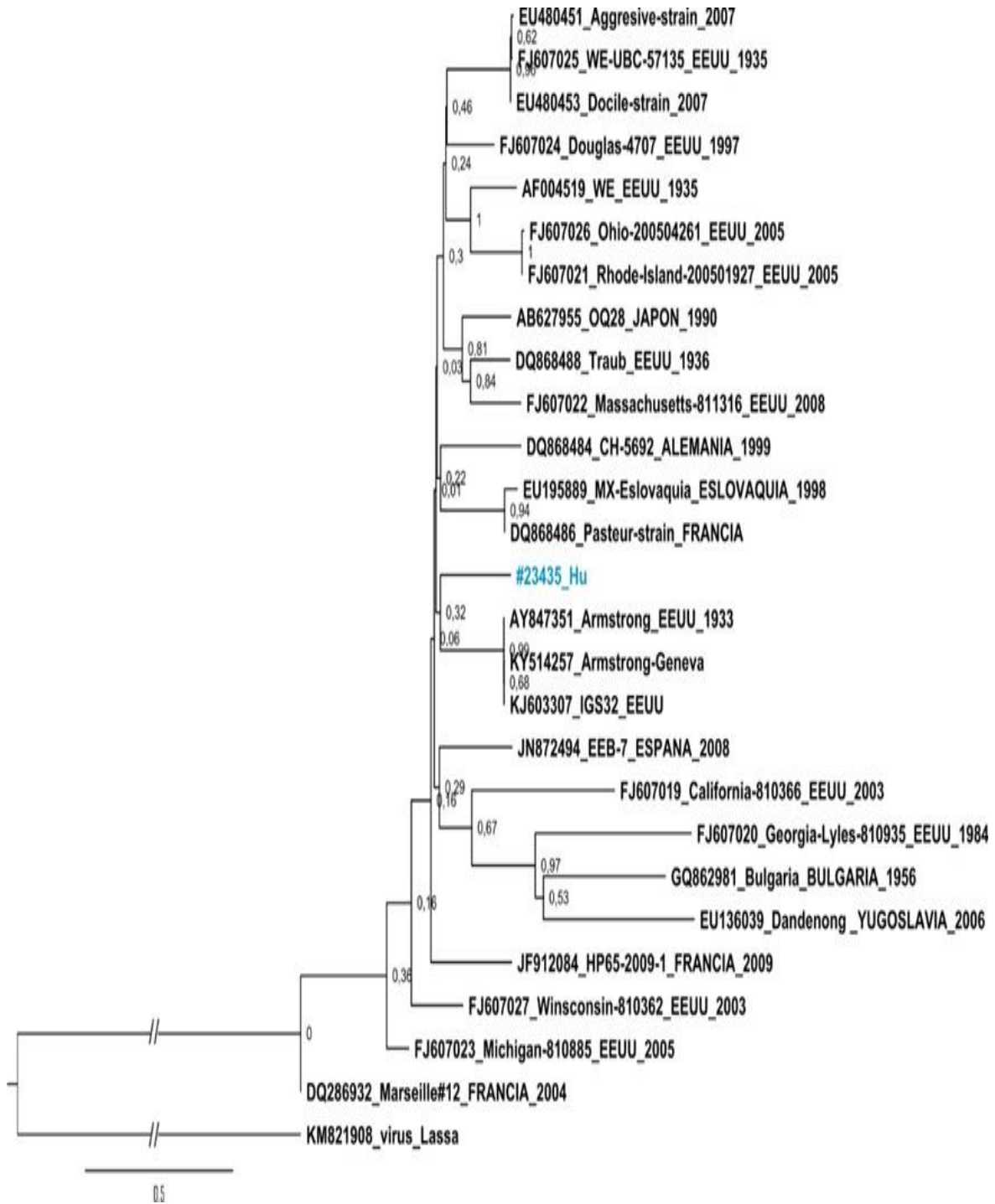


Figura 19. Árbol filogenético basado en la región codificante para la proteína L construido con Neighbor-Joining (MEGA v.6.05), siguiendo el modelo evolutivo GTR+G. Los números en los nodos del árbol indican valores de soporte. La raíz del árbol fue establecida en función de virus Lassa. La barra de escala en la parte inferior del árbol indica sustituciones de nucleótidos por sitio. Las ramas interrumpidas, indicadas por barras dobles, se acortaron en un 50 % para una mejor representación gráfica.

Group freqs., 100 replicates, cut=50 (tree 0) - Poisson Bootstrap

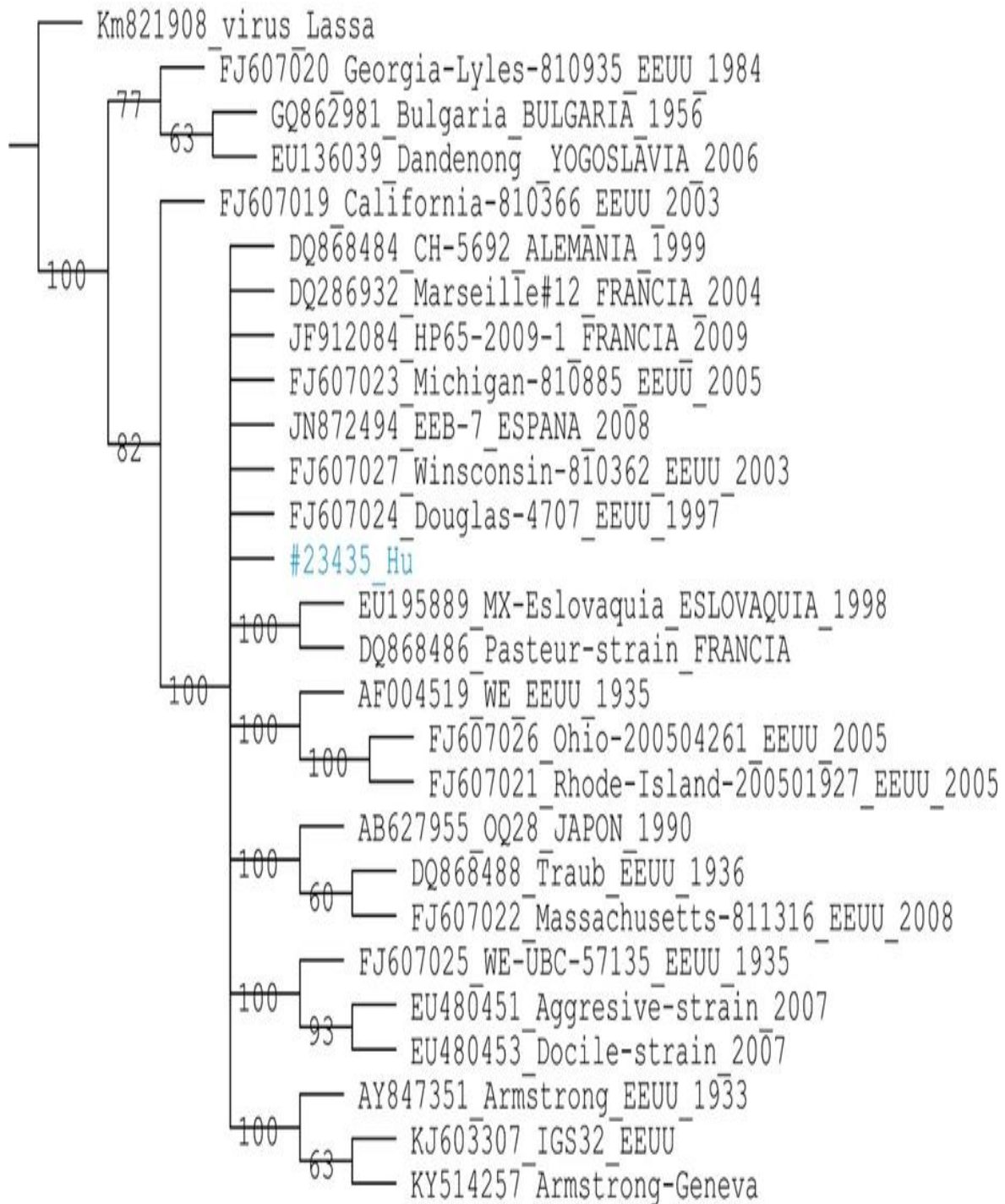


Figura 20. Árbol filogenético basado en la región codificante para la proteína L construido con máxima parsimonia (TNT v.1.5), siguiendo el modelo evolutivo GTR+G. Los números en los nodos del árbol indican valores de soporte.

- d) Árboles filogenéticos realizados para la región codificante de la proteína Z con los demás métodos propuestos.



Figura 21. Árbol filogenético basado en la región codificante para la proteína Z construido con Maximun Likelihood (IQ-Tree Web Server), siguiendo el modelo evolutivo TIM2+I+G. Los números en los nodos del árbol indican valores de soporte (%). La raíz del árbol fue establecida en función de virus Lassa. La barra de escala en la parte inferior del árbol indica sustituciones de nucleótidos por sitio.

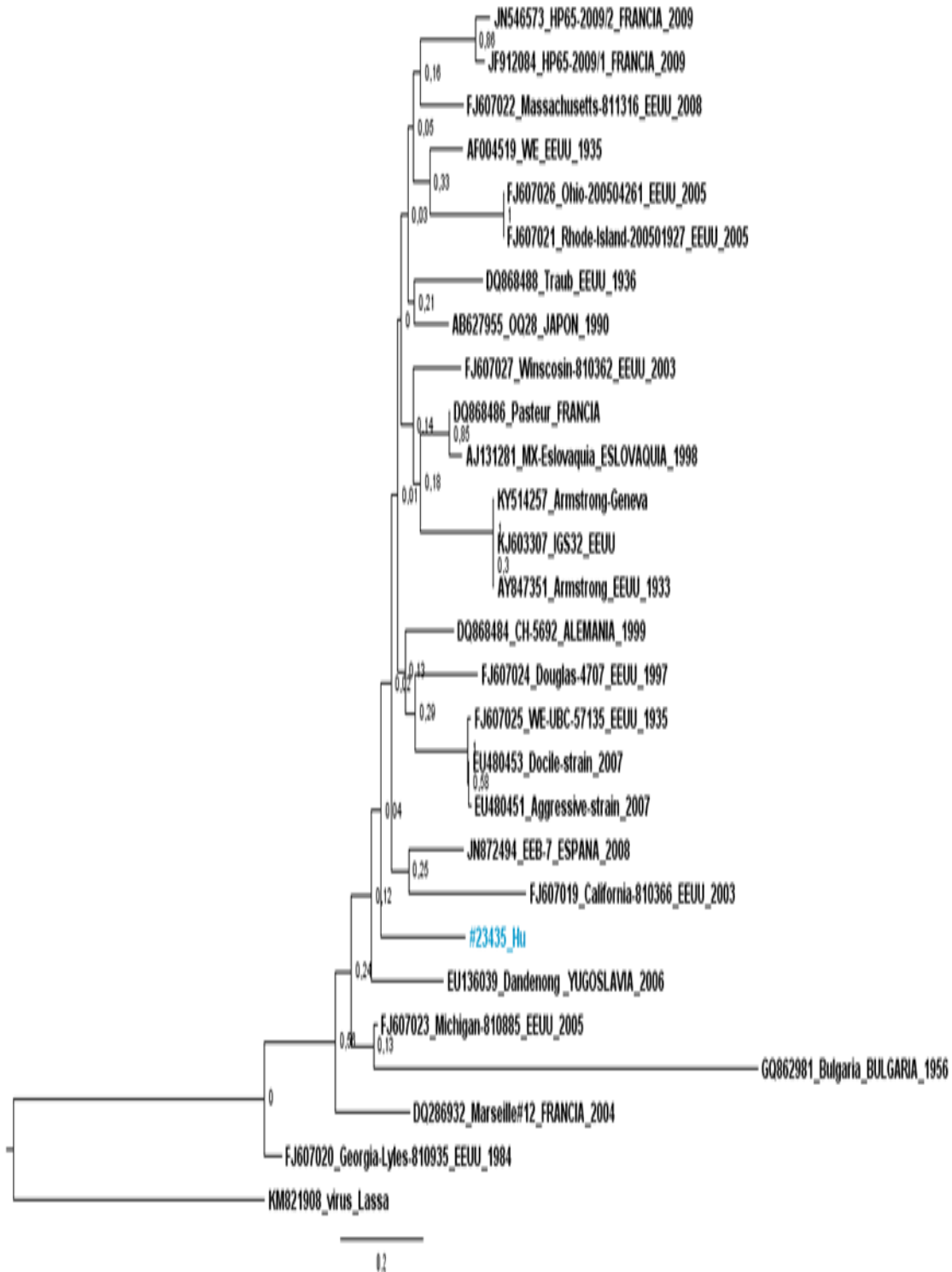


Figura 22. Árbol filogenético basado en la región codificante para la proteína Z construido con Neighbor-Joining (MEGA v.6.05), siguiendo el modelo evolutivo TIM2+I+G. Los números en los nodos del árbol indican valores de soporte. La raíz del árbol fue establecida en función de virus Lassa. La barra de escala en la parte inferior del árbol indica sustituciones de nucleótidos por sitio.

Group freqs., 100 replicates, cut=50 (tree 0) - Poisson Bootstrap

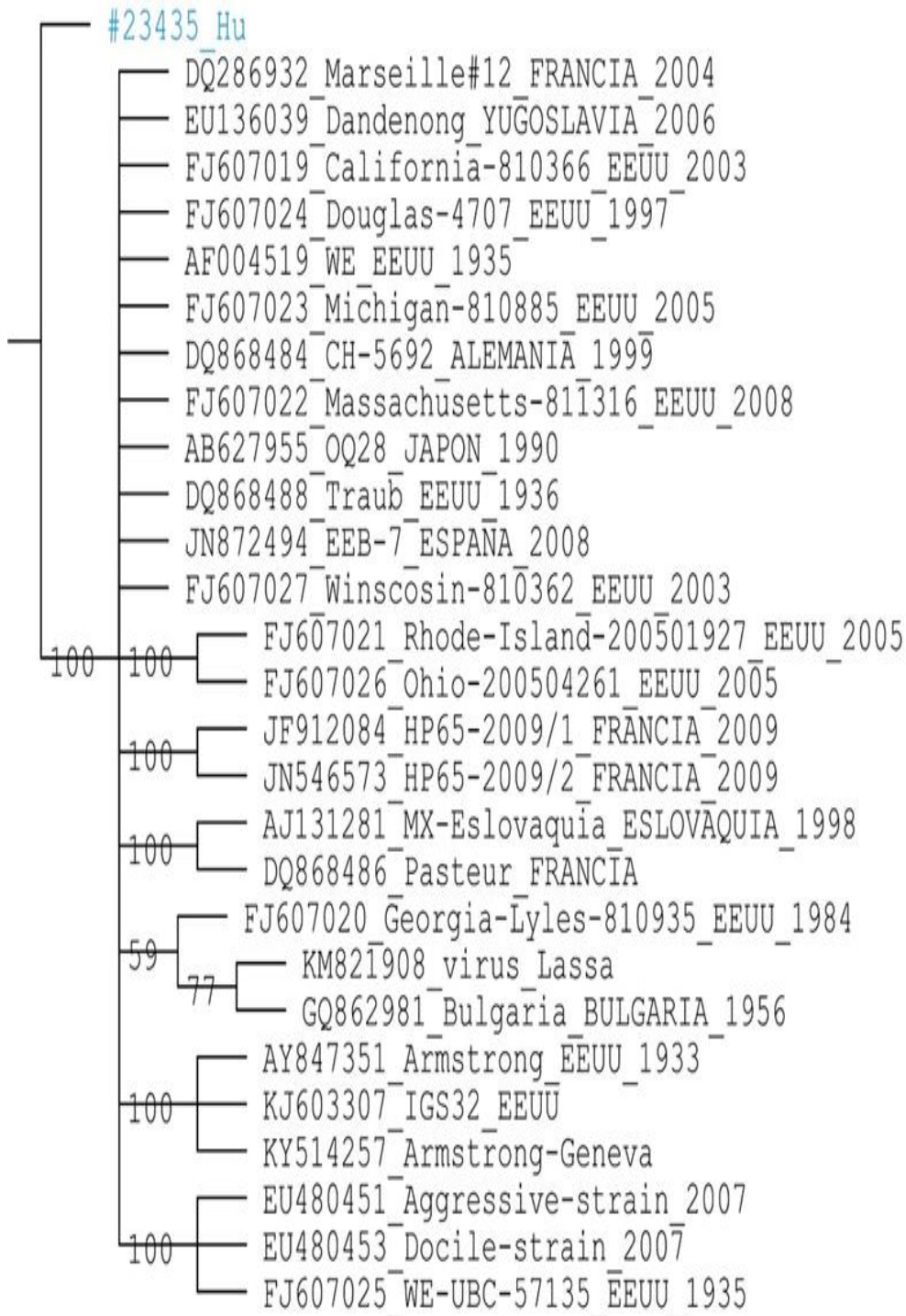


Figura 23. Árbol filogenético basado en la región codificante para la proteína Z construido con máxima parsimonia (TNT v.1.5), siguiendo el modelo evolutivo TIM2+I+G. Los números en los nodos del árbol indican valores de soporte.

Anexo II

a) Comparación (%) de las secuencias nt y aa de la NP del gen S, entre las cepas argentinas y otras cepas representativas de vLCM.

	ARN (nt)					Proteínas (aa)				
	#23435_Hu	#44416_Hu	#21905_Hu	#2856_Ro	#16255_Ro	#23435_Hu	#44416_Hu	#21905_Hu	#2856_Ro	#16255_Ro
#23435_Hu										
#44416_Hu	89,6					97,6				
#21905_Hu	90,0	89,7				98,1	97,6			
#2856_Ro	88,8	89,8	89,6			97,0	97,2	98,1		
#16255_Ro	89,3	88,2	88,2	89,4		96,8	96,5	97,6	97,2	
FJ607038_Wisconsin_810362_EEUU_2003	85,4	85,1	84,8	84,8	84,5	96,1	95,9	96,8	95,9	95,2
FJ607028_California_810366_EEUU_2003	86,0	84,8	86,0	85,4	85,3	97,0	95,2	96,8	96,1	95,5
FJ607032_Michigan_810885_EEUU_2005	86,2	85,8	85,3	85,8	85,3	97,2	96,3	97,2	96,3	96,8
FJ607031_Massachusetts_811316_EEUU_200	86,1	85,6	85,5	84,9	83,9	95,7	96,1	96,5	95,7	95,7
JN687949_201102714_EEUU_2011	85,1	85,6	85,8	85,2	83,8	97,2	97,0	98,3	97,2	96,3
M20869_Armstrong_EEUU_1993	85,3	85,3	84,7	84,0	84,3	95,5	95,0	96,3	94,6	95,7
DQ_868483_CH-5692_ALEMANIA_1999	86,3	85,2	85,7	84,6	84,5	97,4	96,5	97,0	96,1	96,1
FJ607035_Douglas-4707_EEUU_1947	84,9	85,5	85,3	85,3	84,7	96,8	96,3	97,4	96,8	96,1
KF732824_IN-2012-M435_EEUU_2012	84,9	84,9	84,8	85,1	84,1	97,0	96,5	97,2	97,0	96,5
DQ286931_Marseille#12_FRANCIA_2004	84,2	83,7	84,3	83,5	84,1	95,5	94,2	96,1	95,0	94,8
AB627952_OQ28_JAPON_1990	86,3	85,2	85,7	84,6	84,5	97,4	96,5	97,0	96,1	96,1
DQ868487_Traub_EEUU_1936	86,3	85,6	86,2	85,1	85,3	97,4	96,1	97,6	97,0	96,3
FJ607033_WHI-5107_EEUU_1949	84,7	85,4	85,3	84,5	84,1	96,5	96,1	97,0	96,3	95,7
FJ607037_Ohio-200504261_EEUU_2005	86,0	86,1	86,4	85,3	85,2	96,8	96,1	97,0	96,5	95,9
GQ862982_Bulgaria_BULGARIA_1956	79,2	79,2	77,9	78,3	79,0	93,1	93,5	93,9	92,9	93,7
AB627953_BRC_JAPON_2005	80,6	80,2	78,8	79,4	80,7	93,1	92,9	94,2	93,1	93,3
AB261991_MAI-M1_AUSTRIA_2005	80,5	80,3	78,8	79,3	80,5	92,9	92,9	93,9	92,9	93,1
EU136038_Dandenong_YUGOSLAVIA_2006	79,8	80,5	79,6	79,6	79,3	93,9	93,7	94,8	93,7	94,4
FJ607029_Georgia-Lyles-810935_EEUU_1984	79,0	78,8	78,0	79,7	79,1	92,2	92,2	93,1	92,2	92,6
FJ895884_SN05_ESPANA_2004	78,6	78,5	78,1	77,6	78,3	90,0	89,8	90,3	89,4	89,0
FJ895882_CABN_ESPANA_2004	79,0	78,0	77,4	76,9	78,1	90,3	89,8	90,3	89,6	89,6
FJ895883_GR01_ESPANA_2004	78,0	77,9	78,0	77,0	78,0	90,5	90,3	90,7	89,8	89,4
KM821909_virus_Lassa	63,2	61,6	62,6	62,7	63,2	65,3	64,4	65,3	64,9	64,6

b) Comparación (%) de las secuencias nt y aa de la GPC del gen S, entre las cepas argentinas y otras cepas representativas de vLCM.

	ARN (nt)					Proteínas (aa)				
	#44416_Hu	#21904_Hu	#23435_Hu	#16255_Ro	#2856_Ro	#44416_Hu	#21904_Hu	#23435_Hu	#16255_Ro	#2856_Ro
#44416_Hu										
#21904_Hu	88,7					95,2				
#23435_Hu	88,0	89,0				96,0	96,6			
#16255_Ro	86,8	88,5	87,9			94,6	96,0	96,4		
#2856_Ro	88,4	88,6	88,0	88,6		97,0	97,4	97,2	96,6	
FJ607037_Ohio-200504261_EEUU_2005	82,7	83,2	84,2	82,6	82,8	92,6	94,0	93,2	93,2	93,6
FJ607038_Wisconsin_810362_EEUU_2003	83,6	85,1	83,4	83,4	82,8	94,6	94,8	94,6	93,6	94,8
FJ607028_California_810366_EEUU_2003	82,4	83,4	84,3	82,7	83,1	93,0	93,6	93,8	93,0	94,2
FJ607032_Michigan_810885_EEUU_2005	84,7	84,0	84,8	82,6	84,4	94,2	94,4	95,2	93,8	95,2
FJ607031_Massachusetts_811316_EEUU_2008	84,1	84,2	84,2	82,8	83,6	94,6	95,2	95,8	94,0	95,6
JN687949_201102714_EEUU_2011	83,1	83,8	85,0	84,0	84,2	94,8	95,4	95,8	94,4	96,2
M20869_Armstrong_EEUU_1993	83,0	84,5	83,9	82,9	84,3	93,8	95,0	95,2	94,2	95,4
DQ_868483_CH-5692_ALEMANIA_1999	84,0	84,2	83,8	83,1	82,6	94,0	94,6	94,8	94,6	94,8
FJ607035_Douglas-4707_EEUU_1947	84,1	84,8	84,1	84,4	84,6	94,4	95,0	95,4	95,0	95,4
KF732824_IN-2012-M435_EEUU_2012	83,6	83,8	83,8	83,8	84,2	94,6	94,8	95,2	94,2	95,4
DQ286931_Marseille#12_FRANCIA_2004	85,7	85,3	84,4	83,5	85,4	94,6	96,2	96,4	94,6	96,0
AB627952_OQ28_JAPON_1990	83,2	84,2	84,6	83,3	83,3	94,4	94,8	95,2	94,2	95,6
DQ868487_Traub_EEUU_1936	83,8	85,4	85,2	84,8	84,2	95,0	95,6	95,8	94,8	96,4
FJ607033_WHI-5107_EEUU_1949	83,6	84,0	83,6	84,6	84,6	93,6	94,4	94,4	94,2	94,6
AB627953_BRC_JAPON_2005	80,4	79,7	79,8	78,8	80,0	91,8	91,4	92,0	90,8	91,4
AB261991_MAI-M1_AUSTRIA_2005	80,3	79,5	79,2	78,6	79,6	91,4	90,8	91,2	90,2	90,8
EU136038_Dandenong_YUGOSLAVIA_2006	80,1	79,1	79,8	79,2	79,4	91,0	92,2	93,0	91,6	92,0
GQ862982_Bulgaria_BULGARIA_1956	78,5	78,5	78,0	77,6	78,4	91,2	90,6	90,8	90,2	90,6
FJ607029_Georgia-Lyles-810935_EEUU_1984	77,7	77,9	77,6	77,3	77,8	89,2	90,4	89,2	90,0	89,4
FJ895884_SN05_ESPAÑA_2004	75,2	73,5	73,5	74,1	73,3	81,7	80,7	81,1	81,5	80,9
FJ895883_GR01_ESPAÑA_2004	76,0	75,3	75,9	76,1	75,6	82,3	81,9	82,1	82,9	82,5
FJ895882_CABN_ESPAÑA_2004	73,9	73,1	73,5	73,5	72,5	81,9	81,1	81,3	81,9	81,1
Lassa_virus	62,0	62,6	62,1	61,9	62,7	60,1	59,5	60,5	60,7	60,1

c) Comparación (%) de las secuencias nt y aa de las proteínas Z y L del gen L, entre la cepa argentina y otras cepas representativas de vLCM.

	L		Z	
	nt	aa	nt	aa
	#23435_Hu	#23435_Hu	#23435_Hu	#23435_Hu
#23435_Hu				
FJ607024_Douglas-4707_EEUU_1947	82,4	90,7	75,6	80,7
KY514257_Armstrong-Geneva	82,2	89,5	75,6	84,1
KJ603307_IGS32_EEUU	82,2	89,4	75,6	84,1
AY847351_Armstrong_USA_1933	82,2	89,5	75,6	84,1
EU480453_Docile-strain_2007	81,7	89,3	79,7	86,4
FJ607027_Wisconsin_810362_EEUU_2003	81,6	88,9	80,8	85,2
FJ607025_WE-UBC-57135_EEUU_1935	81,6	89,3	80,1	87,5
AB627955_OQ28_JAPON_1990	81,6	89,6	78,6	83,0
EU480451_Aggressive-strain_2007	81,5	89,1	79,3	86,4
DQ868486_Pasteur-strain	81,5	89,2	80,8	86,4
FJ607022_Massachusetts_811316_EEUU_2008	81,3	89,7	78,9	81,8
FJ607023_Michigan_810885_EEUU_2005	81,3	89,8	78,6	84,1
DQ868488_Traub_EEUU_1936	81,1	89,6	78,6	84,1
FJ607021_Rhode Island-200501927_EEUU_2005	81,0	88,5	77,1	83,0
JF912084_HP65-2009-1_FRANCIA_2009	81,0	87,5	77,8	83,0
FJ607026_Ohio-200504261_EEUU_2005	81,0	88,5	77,1	83,0
DQ286932_Marseille#12_FRANCIA_2004	80,8	88,2	77,8	80,7
EU195889_MX_ESLOVAQUIA_1998	80,8	88,0	80,1	86,4
DQ868484_CH-5692_ALEMANIA_1999	80,8	88,2	79,3	84,1
AF004519_WE_EEUU_1935	80,7	88,2	77,4	79,5
FJ607019_California_810366_EEUU_2003	76,3	84,2	72,2	78,4
JN872494_EEB-7_ESPANA_2008	81,4	89,0	79,7	86,4
GQ862981_Bulgaria_BULGARIA_EEUU_1956	73,5	89,0	60,5	68,2
EU136039_Dandenong_YUGOSLAVIA_2006	72,6	80,5	76,0	82,8
FJ607020_Georgia-Lyles-810935_EEUU_1984	72,5	80,4	73,7	80,7
KM821908_virus_Lassa	53,2	48,6	54,0	52,9

4- NOMENCLATURA

vLCM: virus de la Coriomeningitis Linfocitaria.

LCM: Coriomeningitis Linfocitaria.

ICTV: Comité Internacional en Taxonomía Viral.

ARN: ácido ribonucleico.

nt: nucleótidos.

aa: aminoácido.

GPC: glicoproteína C.

NP: nucleoproteína.

RdRp: RNA polimerasa dependiente de RNA.

CDC: Centro de Control y Prevención de Enfermedades.

INEVH: Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. Julio I. Maiztegui".

rad: ratón adulto.

rrn: ratón recién nacido.

ic: intra cerebral.

GSB: gabinete de seguridad biológica.

RT-PCR: transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa.

μl: microlitro.

μg: microgramo.

pb: pares de bases.

LDH: lactato deshidrogenasa.

AST: aspartato transferasa.

nm: nanómetro.

5- BIBLIOGRAFÍA

- Armstrong C., Lillie R.D. (1934). Experimental lymphocytic choriomeningitis of monkeys and mice produced by a virus encountered in studies of the 1933 St. Louis encephalitis epidemic. Public Health Rep 49: 1019-27.
- Traub, E. (1935). A filterable virus recovered from white mice. Science 81, 298-299.
- Radoshitzky SR, Bào Y, Buchmeier MJ, Charrel RN, Clawson AN, Clegg CS, DeRisi JL, Emonet S, Gonzalez JP, Kuhn JH, Lukashevich IS, Peters CJ, Romanowski V, Salvato MS, Stenglein MD, de la Torre JC. (2015). Past, present, and future of arenavirus taxonomy. Arch Virol. 160(7):1851-74.
- Clegg J.C. (2002). Molecular phylogeny of the arenaviruses. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 262: 1-24.
- Charrel R.N de Lamballerie X, Emonet S. (2008). Phylogeny of the genus Arenavirus. Curr. Opin. Microbiol. 11: 362-8.
- Radoshitzky SR, Buchmeier MJ, Charrel RN, Clegg JCS, Gonzalez JJ, Günther S, Hepojoki J, Kuhn JH, Lukashevich IS, Romanowski V, Salvato MS, Sironi M, Stenglein MD, de la Torre JC, (2019) Ictv Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Arenaviridae. J Gen Virol. 100(8):1200-1201.
- Briese T, Paweska JT, McMullan LK, Hutchison SK, Street C, *et al.* (2009). Genetic Detection and Characterization of Lujo Virus, a New Hemorrhagic Fever - Associated Arenavirus from Southern Africa. PLoS Pathog 5(5): e1000455.
- Ninth Report 2011-ICTV.
- Salvato M.S., Clegg J.C.S., Buchmeier M.J., Charrel R.N., Gonzalez J.P., Lukashevich I.S., Peters C.J., Romanowski V. (2012). Arenaviridae. In Virus Taxonomy, Ninth Report of

the International Committee on Taxonomy of Viruses; King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J., Ed: Elsevier: San Diego, CA, USA. 715–23.

- Childs JE, Peters CJ. (1993). Ecology and epidemiology of arenaviruses and their hosts. In: Salvato MS, editor. *The Arenaviridae*. New York: Plenum Press. p 331-84.
- Swanepoel R, Leman PA, Shepherd AJ, Shepherd SP, Kiley MP, *et al.* (1985). Identification of Ippy as a Lassa-fever-related virus. *Lancet* 1: 639.
- Buckley SM, Casals J (1970). Lassa fever, a new virus disease of man from West Africa. 3. Isolation and characterization of the virus. *Am J Trop Med Hyg* 19: 680–691.
- Gonzalez JP, McCormick JB, Saluzzo JF, Herve JP, Georges AJ, *et al.* (1983). An arenavirus isolated from wild-caught rodents (*Pramys* species) in the Central African Republic. *Intervirology* 19: 105–112.
- Johnson, K. M., Taylor, P., Elliott, L. H., & Tomori, O. (1981). Recovery of a Lassa-Related Arenavirus in Zimbabwe. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 30(6), 1291-1293.
- Paweska JT, Sewlall NH, Ksiazek TG, Blumberg LH, Hale MJ, Lipkin WI, Weyer J, Nichol ST, Rollin PE, McMullan LK, Paddock CD, Briese T, Mnyaluzza J, Dinh TH, Mukonka V, Ching P, Duse A, Richards G, de Jong G, Cohen C, Ikalafeng B, Mugero C, Asomugha C, Malotle MM, Nteo DM, Misiani E, Swanepoel R, Zaki SR. (2009). Outbreak Control and Investigation Teams. Nosocomial outbreak of novel arenavirus infection, southern Africa. *Emerg Infect Dis.* 15(10):1598-602.
- Webb PA, Johnson KM, Hibbs JB, Kuns ML. (1970). Parana, a new Tacaribe complex virus from Paraguay. *Arch Gesamte Virusforsch.* 32(4):379-88.
- Trapido H, Sanmartin C (1971). Pichindé virus, a new virus of the Tacaribe group from Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 20:631-641.

- FP Pinheiro, JP Woodall Amélla, PA Travassos Da Rosa, JF Travassos Da Rosa. (1977). Studies on Arenaviruses in Brazil. *Medicina (Buenos Aires)* 37: Supl. 3, 175-181.
- Fulhorst, C. F., Bowen, M. D., Salas, R. A., De Manzione, N. M. C., Duno, G., Utrera, A., Ksiazek, T. G., Peters, C. J., Nichol, S. T., De Miller, E., Tovar, D., Ramos, B., Vasquez, C., & Tesh, R. B. (1997). Isolation and Characterization of Pirital Virus, a Newly Discovered South American Arenavirus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 56(5): 548-553.
- Moncayo AC, Hice CL, Watts DM, Travassos de Rosa AP, Guzman H, Russell KL, Calampa C, Gozalo A, Popov VL, Weaver SC, Tesh RB. (2001). Allpahuayo virus: a newly recognized arenavirus (arenaviridae) from arboreal rice rats (*Oecomys bicolor* and *Oecomys paricola*) in northeastern Peru. *Virology*. 284(2):277-86.
- Abelardo C. Moncayo, Christine L. Hice, Douglas M. Watts, Amelia P. A. Travassos de Rosa, Hilda Guzman, Kevin L. Russell, Carlos Calampa, Alfonso Gozalo, Vsevolod L. Popov, Scott C. Weaver, and Robert B. Tesh. (2001). *Virology* 284, 277-286.
- Downs WG, Anderson CR, Spence L, Aitken TH, Greenhall AH (1963). Tacaribe virus, a new agent isolated from Artibeus bats and mosquitoes in Trinidad, West Indies. *Am J Trop Med Hyg* 12:640–646.
- Parodi AS, Greenway DJ, Rugiero HR, Frigerio M, De La Barrera JM, Mettler N, Garzón F, Boxaca M, Guerrero L, Nota N. (1958). Concerning the epidemic outbreak in Junin. *Dia Med* 30(62):2300–01.
- Johnson KM, Wiebenga NH, Mackenzie RB, Kuns ML, Tauraso NM, Shelokov A, Webb PA, Justines G, Beye HK (1965). Virus isolations from human cases of hemorrhagic fever in Bolivia. *Proc Soc Exp Biol Med* 118:113–118.

- Pinheiro FP, Shope RE, Deandrad Ah, Bensabat G, Cacios GV, Casals J (1966). Amapari, a new virus of the Tacaribe group from rodents and mites of Amapari Territory, Brazil. *Proc Soc Exp Biol Med* 122:531.
- Salas R, de Manzione N, Tesh RB *et al.* (1991). Venezuelan haemorrhagic fever. *Lancet* 338: 1033–1036.
- Bowen M., Ksiazk T., Rollin P., Pinheiro F., Goldsmith C., Zaki S., Nichol S., Peters C., Travassos de Rosa A. (1998). Characterization of Cupixi virus, a newly recognized New World group B arenavirus. In: *Proceedings of the Program and Abstracts of 47th Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene, San Juan, Puerto Rico, Abstract 429.*
- Coimbra TLM, Nassar ES, Burattini MN, de Souza LTM, Ferreira IB, Rocco IM, da Rosa AP, Vasconcelos PF, Pinheiro FP, *et al.* (1994). New arenavirus isolated in Brazil. *Lancet* 343(8894): 391–2.
- Delgado S, Erickson BR, Agudo R, Blair PJ, Vallejo E, Albariño CG, Vargas J, Comer JA, Rollin PE, Ksiazek TG, Olson JG, Nichol ST. (2008). Chapare virus, a newly discovered arenavirus isolated from a fatal hemorrhagic fever case in Bolivia. *PLoS Pathog* 18; 4(4).
- Murphy FA, Webb PA, Johnson KM, Whitfield SG, Chappell WA (1970). Arenaviruses in Vero cells: ultrastructural studies. *J. Virol* 6:507–518.
- Mills JN, Barrera Oro JG, Bressler DS, Childs JE, Tesh RB, Smith JF, Enria DA, Geisbert TW, McKee KT Jr, Bowen MD, Peters CJ, Jahrling PB. (1996). Characterization of Oliveros virus, a new member of the Tacaribe complex (Arenaviridae: Arenavirus). *Am J Trop Med Hyg.* 54(4):399-404.
- Calisher CH, TzianaboT Lord RD, Coleman PH (1970). Tamiami virus, a new member of Tacaribe group. *Am J Trop Med Hyg* 19:520.

- Fulhorst CF, Bowen MD, Ksiazek TG, *et al.* (1996). Isolation and characterization of Whitewater Arroyo virus, a novel North American arenavirus. *Virology* 224:114-20.
- Fulhorst CF, Bennett SG, Milazzo ML, Murray HL Jr, Webb JP Jr, Cajimat MN, Bradley RD. (2002). Bear Canyon virus: an arenavirus naturally associated with the California mouse (*Peromyscus californicus*). *Emerg Infect Dis.* 8(7):717-21.
- Johnson KM. (1981b). Arenaviruses: diagnosis of infection in wild rodents. En Kurstak, E y C Kurstak (Eds). *Comparative diagnosis of viral diseases*, vol 4. Nueva York, Academic Press Maurer, F.D. Lymphocytic choriomeningitis. *Lab Anim Care* 14:415-419.
- Borrow P, Oldstone MB. (1997). Lymphocytic choriomeningitis virus. In: *Viral pathogenesis*. Neal Nathanson *et al.* eds. cap.25, p 593-627. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia.
- Buchmeier M.J, Zajac A.J. In Ahmed R; Chen ISY (Ed.): *Persistent Viral Infections*. John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex, pp. 1999; 575-605.
- Dyckewicz C.A., Dato V. M., Fisher-Hoch S.P., Howarth M.V., Perez-Oronoz G. I., Ostroff S. M., Gary H. Jr., Schonberger L. B., Mc-Cormick J. B. (1992). Lymphocytic choriomeningitis outbreak associated with nude mice in a research institute. *JAMA*; 267: 1349-53.
- Emonet S., Retornaz K., Gonzalez J. P., de Lamballerie X., Charrel R. N. (2007). Mouse-to-human transmission of variant lymphocytic choriomeningitis virus. *Emerg. Infect. Dis.* 13: 472-5.
- Armstrong C (1941). Studies on choriomeningitis and poliomyelitis: Harvey lecture. *Bull N Y Acad Med* 17: 295–318.
- Blanc G, Bruneau J, Delage B *et al.* (1951). Pneumopathy in the guinea pig and lymphocytic choriomeningitis. *Bull Acad Natl Med* 135: 255–262.

- Baum SG, Lewis Jr AM, Rowe WP *et al.* (1966). Epidemic nonmeningitic lymphocytic-choriomeningitis-virus infection. An outbreak in a population of laboratory personnel. *N Engl J Med* 274: 934–936.
- Hirsch MS, Moellering Jr RC, Pope HG, Poskanzer DC. (1974). Lymphocytic-choriomeningitis-virus infection traced to a pet hamster. *N Engl J Med* 291(12):610–2.
- Vanzee BE, Douglas RG, Betts RF *et al.* (1975). Lymphocytic choriomeningitis in university hospital personnel. Clinical features. *Am J. Med* 58: 803–809.
- Adair, C.V.; Gauld, R.L.; Smadel, J.E. (1953). Aseptic meningitis, a disease of diverse etiology: Clinical and etiologic studies on 854 cases. *Ann. Intern. Med.* 39: 675–704.
- Meyer, H.M.; Johnson, R.T.; Crawford, I.P.; Dascomb, H.E.; Rogers, N.G. (1960). Central nervous system syndromes of “viral” etiology. A study of 713 cases. *Am. J. Med.* 29, 334–347.
- Asnis DS, Muana O, Kim do G *et al.* (2010). Lymphocytic choriomeningitis virus meningitis, New York, NY, USA, 2009. *Emerg Infect Dis* 16: 328–330.
- Folk S, Steinbecker S, Windmeyer J, Macneil A, Campbell S, Rollin PE. (2011). Lymphocytic choriomeningitis with severe manifestations, Missouri, USA. *Emerg Infect Dis* 17(10): 1973–74.
- Farmer TW, Janeway CA (1942). Infections with the virus of lymphocytic choriomeningitis. *Medicine* 21: 1–63.
- Ackermann R, Stille W, Blumenthal W, *et al.* (1972). Syrische Goldhamster als U“bertra“ger von lymphozyta“rer Choriomeningitis. *Dtsch Med Wochenschr* 97: 1725–1731.
- Park JY, Peters CJ, Rollin PE, Ksiazek TG, Katholi CR, Waites KB, Gray B, Maetz HM, Stephensen CB. (1997). Age distribution of lymphocytic choriomeningitis virus serum

antibody in Birmingham, Alabama: evidence of a decreased risk of infection. *Am J Trop Med Hyg.* 57(1):37-41.

- Larsen PD, Chartrand SA, Tomashek KM, Hauser LG, Ksiazek TG. (1993). Hydrocephalus complicating lymphocytic choriomeningitis virus infection. *Pediatr Infect Dis J.* 12(6):528-31.
- Kunz S., de la Torre JC. (2008). In Shoshkes Reiss C (Ed.): *Neurotropic Viral Infections.* Cambridge University Press, New York. pp. 75-93.
- Jamieson D.J., Kourtis A.P., Bell M., Rasmussen S.A. (2006). Lymphocytic choriomeningitis virus: an emerging obstetric pathogen? *Am. J. Obstet. Gynecol.* 194: 1532-6.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2005). Lymphocytic choriomeningitis virus infection in organ transplant recipients – Massachusetts, Rhode Island. *MMWR Morb.*
- Fisher S.A, Grahan M.B, Kuehnert M.J., Kotton C.N., Srinivasan A., Marty F.M., Comer J.A., Guarner J., Paddock C.D., DeMeo D.L., Shieh W.J., Erickson B.R., Bandy U. De Maria Jr., A., Davis J.P., Delmonico F.L., Pavlin B., Likos A., Vincent M.J., Sealy T.K., Goldsmith C.S., Jernigan D.B., Rollin P.E., Packard M.M., Patel M., Rowland C., Helfand R.F., Nichol S.T., Fishman J.A., Ksiazek T., Zaki S.R. (2006). LCMV in Transplant Recipients Investigation Team. Transmission of lymphocytic choriomeningitis virus by organ transplantation. *N. Engl.J. Med.* 354: 2235-49.
- MacNeil A., Stroher U., Farnon E., Campbell S., Cannon D., Paddock C. D., Drew C. P., Kuehnert M., Knust B., Gruenenfelder R., Zaki S. R., Rollin P. E., Nichol S.T. (2012). Solid organ transplant-associated lymphocytic choriomeningitis, United States, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* 18: 1256-62.

- Palacios G., Druce J., Du L., Tran T., Birch C., Briese T., Conlan S., Quan P.L., Hui J., Marshall J., Simon J.F., Egholm M., Paddock C.D., Shieh W.J., Goldsmith C.S., Zaki S.R., Catton M., Lipkin W.I., (2008). A new arenavirus in a cluster of fatal transplant-associated diseases. *N. Engl. J. Med.* 358: 991-8.
- Barton L.L., Mets M.B., Beaucamp C.L., (2002). Lymphocytic choriomeningitis virus: emerging fetal teratogen. *Am J Obstet Gynecol.* 187:1715-6.
- Bonthius DJ, Wright R, Tseng B *et al.* (2007b). Congenital lymphocytic choriomeningitis virus infection: spectrum of disease. *Ann Neurol* 62: 347–355.
- Bonthius DJ, Nichols B, Harb H *et al.* (2007a). Lymphocytic choriomeningitis virus infection of the developing brain: critical role of host age. *Ann Neurol* 62: 356–374.
- Albariño C.G., 1 Palacios G., 1 Khristova M.L., Erickson B., Carroll S.A., Comer J.A., Hui J., Briese T., St. George K., Ksiazek T.G., 2 Ian Lipkin W. and Nichol S.T. (2010). High Diversity and Ancient Common Ancestry of Lymphocytic Choriomeningitis Virus. *Emerging Infectious Diseases.* 16: Nº 7.
- Amman BR, Pavlin BI, Albariño CG, Comer JA, Erickson BR, Oliver JB, Sealy TK, Vincent MJ, Nichol ST, Paddock CD, Tumpey AJ, Wagoner KD, Glauer RD, Smith KA, Winpisinger KA, Parsely MS, Wyrick P, Hannafin CH, Bandy U, Zaki S, Rollin PE, Ksiazek TG. (2007). Pet rodents and fatal lymphocytic choriomeningitis in transplant patients. *Emerg Infect Dis.* 13(5):719-25.
- Vilibic-Cavlek, T.; Savic, V.; Ferenc, T.; Mrzljak, A.; Barbic, L.; Bogdanic, M.; Stevanovic, V.
- Tabain, I.; Ferencak, I.; Zidovec-Lepej, S. (2021). Lymphocytic Choriomeningitis—Emerging Trends of a Neglected Virus: A Narrative Review. *Trop. Med. Infect. Dis.* 6, 88.

- Fevola, C.; Kuivanen, S.; Smura, T.; Vaheri, A.; Kallio-Kokko, H.; Hauffe, H.C.; Vapalahti, O.; Jääskeläinen, A.J. (2018). Seroprevalence of lymphocytic choriomeningitis virus and Ljungan virus in Finnish patients with suspected neurological infections. *J. Med. Virol.* 90: 429–435.
- Barakat, A.M.; Lapahat, O.; Hasoni, H.J. (2015). Lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) in Southern Iraq. *Int. J. Sci. Eng. Res.* 6, 1523–1535.
- Alburkat, H.; Jääskeläinen, A.J.; Barakat, A.M.; Hasony, H.J.; Sironen, T.; Al-Hello, H.; Smura, T.; Vapalahti, O. (2020). Lymphocytic choriomeningitis virus infections and seroprevalence, Southern Iraq. *Emerg. Infect. Dis.* 26: 3002–3006.
- Lledó, L.; Gegúndez, M.I.; Saz, J.V.; Bahamontes, N.; Beltrán, M. (2003). Lymphocytic choriomeningitis virus infection in a province of Spain: Analysis of sera from the general population and wild rodents. *J. Med. Virol.* 70: 273–275.
- Reiserova, L.; Kaluzova, M.; Kaluz, S.; Willis, A.C.; Zavada, J.; Zavodsk, E.; Zavadova, Z.; Ciampor, F.; Pastorek, J.; Pastorekova, S. (1999). Identification of MaTu-MX agent as a new strain of lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) and serological indication of horizontal spread of LCMV in human population. *Virology* 257: 73–83.
- Dobec, M.; Dzelalija, B.; Punda-Polic, V.; Zoric, I. (2006). High prevalence of antibodies to lymphocytic choriomeningitis virus in a murine typhus endemic region in Croatia. *J. Med. Virol.* 78: 1643–1647.
- Vilibic-Cavlek T, Oreski T, Korva M, Kolaric B, Stevanovic V, Zidovec-Lepej S, Tabain I, Jelcic P, Miklausic-Pavic B, Savic V, Barbic L, Avsic-Zupanc T. (2021). Prevalence and Risk Factors for Lymphocytic Choriomeningitis Virus Infection in Continental Croatian Regions. *Trop Med Infect Dis.* 6(2):67.
- Vilibic-Cavlek T, Barbic L, Mrzljak A, Brnic D, Klobucar A, Ilic M, Janev-Holcer N, Bogdanic M, Jemersic L, Stevanovic V, Tabain I, Krcmar S, Vucelja M, Prpic J, Boljfecic

M, Jelacic P, Madic J, Ferencak I, Savic V. (2021). Emerging and Neglected Viruses of Zoonotic Importance in Croatia. *Pathogens*. 10(1):73.

- Barrera Oro J.G., Maiztegui J.I., Sabattini M.S., Garre M.E., (1970). Evidencias serológicas preliminares de la actividad de un arenavirus relacionado con el de la coriomeningitis liofocítica (LCM) en presuntos enfermos de Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA). *Rev Asoc Arg Microbiol* 2: 184.
- Maiztegui J.I., Sabatini M.S., Barrera Oro J.G. (1972). Actividad del virus de la Coriomengitis Linfocitaria (LCM) en el área endémica de la Fiebre Hemorrágica Argentina. Estudios serológicos en redores capturados en la ciudad de Pergamino. *Medicina (Buenos Aires)* 32: 131-7.
- Sabattini M., Barrera Oro J., Maiztegui J., Ferradas B. (1974). Actividad del Virus de la Coriomeningitis Linfocítica en el área endémica de Fiebre Hemorrágica Argentina. *Medicina XXXIV N°4*: 313-9.
- Ambrosio A.M., Feuillade M.R., Gamboa G., Maiztegui J.I. (1994). Prevalence of lymphocytic coriomeningitis virus infection in human population of Argentina. *Am J Trop Med Hyg* 50: 381-6.
- Ambrosio A.M., Riera L., Saavedra M.C., Sottosanti., Sabattini M. (1996). Seroconversión para los arenavirus Junín (VJ) y coriomeningitis linfocitaria (vLCM) en pacientes de fiebre hemorrágica argentina. *Medicina (Buenos Aires)* 56: 563.
- Riera L., Saavedra M.C., Briggiler A.M., Calderón G., Schuster M., Ambrosio A.M. (1996). Foco de infección por virus de la coriomeningitis Linfocitaria (LCMV) en la ciudad de Pergamino (Buenos Aires) Argentina V Congreso Argentino de Virología. II Encuentro de Virólogos Latinoamericanos. Tandil, Buenos Aires.

- Saavedra M.C, Ambrosio A. M, Riera L., Levis S., Sottosanti J., Sabattini M. (2001). Aislamiento del virus de la Coriomeningitis Linfocitaria en seres Humanos. *Medicina (Buenos Aires)* 61: 837-842.
- Saavedra M.C., Riera L., Castillo E., Sottosanti J., Sabattini M., Ambrosio A. (2002). Aislamiento de cepas de virus de la Coriomeningitis Linfocitaria (LCM) de roedores capturados en la ciudad de Río Cuarto. *Medicina (Buenos Aires)* 62: 472.
- Riera L, Castillo E, Del Carmen Saavedra M, Priotto J, Sottosanti J, Polop J, Ambrosio AM. (2005). Serological study of the lymphochoriomeningitis virus (LCMV) in an inner city of Argentina. *J Med Virol.* 76(2):285-9.
- Saavedra M.C. (2004). Caracterización de cepas argentinas del virus de la Coriomeningitis Linfocitaria. Tesis doctoral. Universidad Nacional del Litoral. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.
- Pinschewer DD, Perez M, de la Torre JC (2003). Role of the virus nucleoprotein in the regulation of lymphocytic choriomeningitis virus transcription and RNA replication. *J Virol* 77:3882–3887.
- Buchmeier MJ, Parekh BS. (1987). Protein structure and expression among arenaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol.* 133:41-57.
- Iapalucci S, Lopez R, Rey O, Lopez N, Franze-Fernandez MT, Cohen GN, Lucero M, Ochoa A, Zakin MM. (1989). Tacaribe virus L gene encodes a protein of 2210 amino acid residues. *Virology.* 170(1):40-7.
- Salvato MS, Schweighofer KJ, Burns J, Shimomaye EM (1992). Biochemical and immunological evidence that the 11 kDa zincbinding protein of lymphocytic choriomeningitis virus is a structural component of the virus. *Virus Res* 22:185–198.
- Zapata J.C and Salvato M. (2013). Arenavirus Variations Due to Host-Specific Adaptation. *Viruses* 5: 241-78.

- Chomczynski, P., & Mackey, K. (1995). Short technical reports. Modification of the TRI reagent procedure for isolation of RNA from polysaccharide-and proteoglycan-rich sources. *Biotechniques*, 19(6) 942-945.
- Nichol ST, Spiropoulou CF, Morzunov S, Rollin PE, Ksiazek TG, Feldmann H, Sanchez A, Childs J, Zaki S, Peters CJ. (1993). Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science*. 262(5135):914-7.
- Bowen M., Peters C., Nichol S. (1996). The phylogenetic of New World (Tacaribe complex) arenavirus. *Virology*. 219; 285-90.
- Hall TA. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series (Oxf) 1999*; 41: 95-8.
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D. (2012). JModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods*. 9: 772.
- Trifinopoulos J, Nguyen LT, von Haeseler A, Minh BQ. (2016). W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Res*. 44(W1):W232-5.
- Minh BQ, Nguyen MA, von Haeseler A. (2013). Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Mol Biol Evol* 30 (5):1188-95.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular biology and evolution*, 30(12), 2725–2729.
- Ronquist F, Huelsenbeck J.P. (2003). MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models, *Bioinformatics* 19, (12):1572–1574.
- Goloboff, P; Catalano, S. (2016). TNT, version 1.5, with a full implementation of phylogenetic morphometrics. *Cladistics* 32 (2016) 221–238.

- Ledesma J, Fedele CG, Carro F, Lledó L, Sánchez-Seco MP, Tenorio A, Soriguer RC, Saz JV, Domínguez G, Rosas MF, Barandika JF, Gegúndez MI. (2009). Independent lineage of lymphocytic choriomeningitis virus in wood mice (*Apodemus sylvaticus*), Spain. *Emerg Infect Dis.* 15(10):1677-80.
- Knust B, Ströher U, Edison L, Albariño CG, Lovejoy J, Armeanu E, House J, Cory D, Horton C, Fowler KL, Austin J, Poe J, Humbaugh KE, Guerrero L, Campbell S, Gibbons A, Reed Z, Cannon D, Manning C, Petersen B, Metcalf D, Marsh B, Nichol ST, Rollin PE. (2014). Lymphocytic choriomeningitis virus in employees and mice at multipremises feeder-rodent operation, United States, 2012. *Emerg Infect Dis.* 20(2):240-7.
- Lavergne A, de Thoisy B, Tirera S, Donato D, Bouchier C, Catzeflis F, Lacoste V. (2016). Identification of lymphocytic choriomeningitis mammarenavirus in house mouse (*Mus musculus*, Rodentia) in French Guiana. *Infect Genet Evol.* 37:225-30.