

Maestría en Bioinformática y Biología de Sistemas

**Análisis filodinámico de los hantavirus
(género *Orthohantavirus*, familia Hantaviridae)
de Argentina**

Trabajo presentado como requisito para la obtención del título de:
Magíster en Bioinformática y Biología de Sistemas

Tesista: Lic. Carina Noé Sen
Director de tesis: Dr. Jorge Braulio García

Instituto de Posgrado – UNNOBA

Maestría interinstitucional

UNNOBA - UNQ

Pergamino, abril de 2022

AGRADECIMIENTOS

En algún momento leí la frase: *“Debemos encontrar el tiempo para detenernos y agradecer a las personas que hacen la diferencia en nuestras vidas”*. Creo que esas palabras encierran mucha verdad. No siempre somos lo suficientemente agradecidos con todo aquello y aquellos que hacen una diferencia en nuestras vidas y me pareció oportuna para este momento.

Este es mi agradecimiento hacia todos los que me acompañaron e hicieron posible este trabajo de tesis:

A la UNNOBA y al Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas (INEVH) “Dr. Julio I. Maiztegui” por permitirme realizar esta Maestría y haberme brindado los elementos necesarios durante esta etapa de mi formación académica.

Agradezco profundamente a mi director el Dr. Jorge García por confiar en mí, por los consejos, sus sugerencias y el tiempo dedicado a esta tesis. Por las charlas compartidas y ser mi guía en este camino de la bioinformática. Por tener siempre tanto para enseñarme... ¡Cuánto me falta por aprender!

Gracias a mis compañeros del INEVH de los cuales he aprendido y continúo aprendiendo, por el compromiso y enseñanzas transmitidas. Con el correr del tiempo algunos de ellos se han transformado en grandes amigos que han estado a mi lado en las buenas y en las no tan buenas.

A la Dra. Silvana Levis por todas sus enseñanzas a lo largo de este tiempo en el Instituto.

Y por último, quiero agradecer a mis tres pilares fundamentales. Mis padres Cristina e Ismael y mi hermana Manuela que siempre estuvieron y están brindándome su cariño, consejos, compañía y apoyo incondicional a lo largo de toda mi vida. Mis amigas del alma, Viviana y Diana; quienes siempre con sus palabras sinceras me han impulsado y sostenido, y lo siguen haciendo. A Diego, mi eterno compañero y el amor de mi vida; porque sin él no soy nada y sin su amor incondicional, apoyo y contención no estaría donde estoy hoy. Sos mi lugar seguro, mi refugio y mi paz.

***“Jovencita, no puedes cambiar el pasado; aunque déjame decirte algo:
Podrías aprender algo de él.”***

***- El Tiempo -
Adaptación cinematográfica de Alicia a través del espejo***

AGRADECIMIENTOS	2
ÍNDICE	4
ÍNDICE DE TABLAS	6
1. CAPÍTULO INTRODUCTORIO	7
INTRODUCCIÓN	7
Agente etiológico	7
Biología celular y molecular de los hantavirus.....	7
Historia de los hantavirus.....	10
Ecología y epidemiología de los hantavirus asociados a roedores	12
Enfermedades causadas por los hantavirus.....	16
Fiebre Hemorrágica con Síndrome Renal (FHSR).....	16
Síndrome Pulmonar por Hantavirus (SPH).....	16
Diagnóstico y tratamiento	17
Hantavirus en Argentina	18
Evolución de los hantavirus	20
Mecanismos de evolución.....	20
Filogenia de los hantavirus.....	21
Modelos evolutivos de los hantavirus	23
<i>Co-evolución de los hantavirus con sus hospedadores</i>	23
<i>Evolución reciente de los hantavirus</i>	24
PLANTEO DEL PROBLEMA	25
OBJETIVOS	25
Objetivo general.....	25
Objetivos particulares	25
TRABAJO EXPERIMENTAL	26
METODOLOGIA	26
SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS	26
Muestras humanas.....	26
Muestras de roedores.....	27
TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	28
Extracción de ARN total	28
RT-PCR anidada	28
Visualización de los productos de amplificación	30

Purificación de ácidos nucleicos	30
Secuenciación genómica.....	30
Purificación de los productos de PCR de secuencia.....	31
ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	31
Análisis de los electroferogramas	31
Análisis de las secuencias para los segmentos genómicos S y M	32
Filogenia para los segmentos genómicos S y M.....	32
Análisis filodinámico para los segmentos genómicos S y M.....	32
RESULTADOS.....	34
TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	34
ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO	35
Análisis de las secuencias.....	35
Filogenia para los segmentos genómicos S y M.....	43
Evaluación de la señal filogenética	43
Cálculo del modelo evolutivo.....	44
Filogenias para los segmentos genómicos S y M	44
Análisis de coalescencia para los segmentos genómicos S y M.....	47
Evaluación temporal de los árboles filogenéticos	47
Generación de los archivos de entrada para BEAST	48
Muestreo de árboles y parámetros con BEAST.....	50
Evaluación de la performance de las corridas, selección de modelos y análisis de parámetros.....	51
Generación, anotación y visualización del MCCT	52
DISCUSIÓN	59
2. CAPÍTULO DE CONCLUSIONES.....	65
3. NOMENCLATURA.....	67
4. BIBLIOGRAFÍA	69
5. ANEXO I.....	78

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Hantavirus, abreviaturas, reservorios roedores, enfermedad asociada y rango geográfico.....	13
Tabla 2. Hantavirus de Argentina, abreviaturas, roedores reservorio, enfermedad asociada conocida y distribución geográfica.....	20
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la reacción de RT-PCR anidada y secuenciación parcial de fragmentos de los segmentos genómicos S (N) y M (Gc) de los hantavirus analizados	29
Tabla 4. Reactivos y volúmenes empleados en la reacción de RT-PCR anidada.....	29
Tabla 5. Reactivos y volúmenes utilizados en la reacción de secuenciación.....	31
Tabla 6. Muestras asociadas a casos de SPH con resultados positivos por serología (ELISA IgM) y por técnicas moleculares	37
Tabla 7. Muestras de roedores con resultados positivos por serología (ELISA IgG) y por técnicas moleculares	40
Tabla 8. Secuencias de hantavirus de América incluidos en los análisis para los segmentos genómicos S y M obtenidas en GenBank	41
Tabla 9. Resolución las topologías obtenidas	43
Tabla 10. Interpretación del Factor de Bayes (FB).....	51
Tabla 11. Resultados de FB para el alineamiento SEGMENTO_S	51
Tabla 12. Valores de logaritmo probabilidad marginal (PM) calculados con path sampling (PS) para el alineamiento SEGMENTO_S.....	52
Tabla 13. Tiempos de divergencia con el ancestro común más reciente (tMRCA) estimados para los diferentes genotipos de hantavirus que circulan en Argentina	53
Tabla 14. Tiempos de separación estimados para algunos grupos inferidos en las filogenias calibradas a partir del alineamiento SEGMENTO_S.....	53

1. CAPÍTULO INTRODUCTORIO

INTRODUCCIÓN

Agente etiológico

Los orthohantavirus o hantavirus¹ (género *Orthohantavirus*) son miembros de la familia Hantaviridae. En la actualidad existen 38 especies reconocidas hasta el momento por el Comité Internacional en Taxonomía de Virus (ICTV del Inglés *International Committee on Taxonomy of Viruses*) (ICTV, 2022).

Los hantavirus son virus de distribución mundial y son mantenidos en la naturaleza por mamíferos pequeños (roedores, topos, musarañas y murciélagos) que actúan como reservorios, siendo los de roedores los únicos asociados a enfermedad en humanos hasta el momento.

En América, la enfermedad se presenta como un síndrome febril agudo con gran malestar general, seguido de un inicio repentino de dificultad respiratoria e hipotensión y frecuentemente asociado con afecciones gastrointestinales. Se han reportado casos de síndrome pulmonar por hantavirus (SPH) en nueve países de Centro y Sudamérica: Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Panamá, Paraguay, Perú, Uruguay y Venezuela, y en Norteamérica: Estados Unidos, Canadá y México. En otras áreas del mundo los hantavirus causan otras presentaciones clínicas relacionadas con afecciones renales.

Biología celular y molecular de los hantavirus

Los hantavirus son virus envueltos de ARN, generalmente esféricos con un tamaño que varía de 80-120 nm de diámetro. El genoma está formado por tres segmentos genómicos de polaridad negativa. Cada uno de ellos se encuentra recubierto por trímeros de proteína N, formando los complejos de ribonucleoproteínas y presentan una ARN polimerasa dependiente de ARN viral (RdRp) asociada. En la envoltura lipídica se encuentran los tetrámeros de glicoproteínas formados por heterodímeros Gn-Gc, que contiene los sitios de unión para los receptores celulares y epítopes para la neutralización de la infectividad mediada por anticuerpos. Cada virión contiene generalmente cantidades equimolares de los tres segmentos de ARN (Figura 1) (Khaiboullina *et al.*, 2005; Fulhorst *et al.*, 2011; Hepojoki *et al.*, 2012).

¹ A fines de facilitar la lectura, en este trabajo de tesis los orthohantavirus serán llamados hantavirus, nombre por el cual son conocidos tradicionalmente.

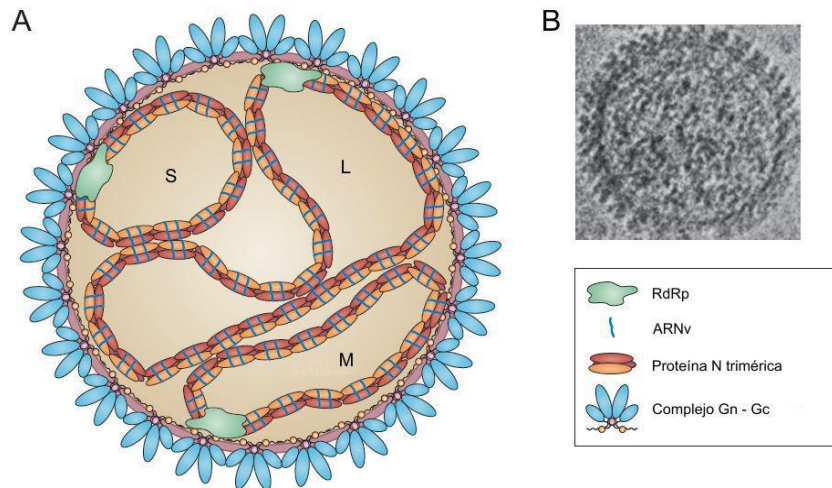


Figura 1. A) Representación esquemática de un virión de hantavirus. Cada partícula viral contiene el genoma de ARN viral trisegmentado (ARNv). Estos segmentos son encapsidados por la proteína N. En la parte externa del virión se encuentran los complejos tetraméricos formados por las glicoproteínas Gn y Gc. El genoma viral se replica y transcribe por la ARN polimerasa dependiente de ARN viral (RdRp). **B)** Partícula de hantavirus vista por microscopía electrónica (*Modificada de Vaheri et al., 2013*).

El segmento genómico L (del inglés *Large*) (~ 6500 nt) codifica para la proteína L o RdRp de ~250 kDa, la cual participa en los procesos de transcripción y replicación viral. Se supone que esta enzima tiene actividad endonucleasa, transcriptasa, replicasa y ARN-helicasa (Plyusnin *et al.*, 1996; Khaiboullina *et al.*, 2005).

El segmento genómico M (del inglés *Medium*) (~ 3600 nt) codifica para el precursor de glicoproteínas (GPC). Este es sintetizado en los ribosomas que se encuentran unidos al retículo endoplasmático (RE). El GPC contiene un péptido señal que permite su traslocación al lumen del RE, donde luego es procesado cotraduccionalmente generando las glicoproteínas de transmembrana Gn (porción N-terminal de GPC – 72 kDa) y Gc (porción C-terminal de GPC – 54 kDa). El sitio de clivaje se encuentra altamente conservado (motivo WAASA), a pesar que estas glicoproteínas son considerablemente variables. Estas proteínas son glicosiladas en el RE y se forman los dímeros Gn-Gc, luego son transportadas al complejo de Golgi donde completan la maduración. Estas proteínas median la unión y entrada de las partículas virales a las células. (Khaiboullina *et al.*, 2005; Fulhorst *et al.*, 2011).

El segmento genómico S (del inglés *Small*) (1800 – 2100 nt) codifica para la proteína N o nucleoproteína, proteína no glicosilada de aproximadamente 50 kDa. Tanto la proteína N como la RdRp son necesarias para la replicación, de modo que la transcripción y la traducción del ARNm preceden al inicio de la replicación. El segmento S de algunos hantavirus presenta un marco de lectura adicional que codifica para una proteína no estructural NSs. Esta proteína inhibe la expresión del interferón β (INF- β), del factor nuclear kappa B (NF-kB) y del factor regulador de interferón 3 (INF-3) (Fulhorst *et al.*, 2011; Hepojoki *et al.*, 2012).

Cada uno de estos segmentos posee en los extremos 3' y 5' regiones no codificantes de al menos 17 nt de longitud, las cuales se encuentran altamente conservadas. Estas regiones tienen la capacidad de formar estructuras de *panhandle* mediante complementariedad nucleotídica, la cual podría actuar como un promotor viral en la replicación (Plyusnin *et al.*, 1996; Hepojoki *et al.*, 2012).

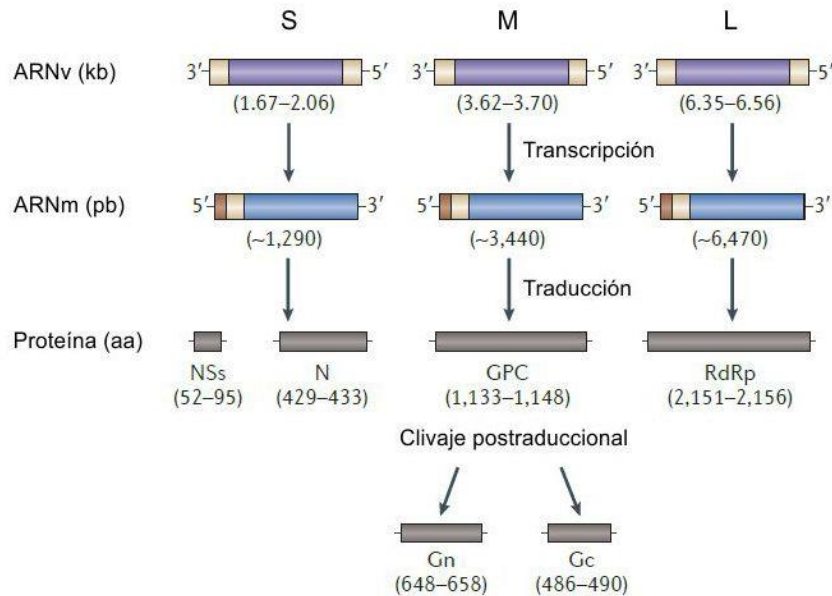


Figura 2. Organización genómica de los hantavirus. Para producir las proteínas virales, cada segmento de ARN viral de cadena simple y polaridad negativa (ARNv) debe ser transcrito a ARNm viral. El segmento S codifica para la proteína N, asociada estructuralmente a los ARN virales; y en algunos hantavirus para la proteína NSs, a partir de un marco de lectura solapado. El segmento M codifica para las glicoproteínas Gn y Gc, asociadas a la envoltura viral. El segmento L codifica para la ARN polimerasa dependiente de ARN viral (RdRp) (*Modificada de Vaheiri et al., 2013*).

La replicación de los hantavirus ocurre en el citoplasma de la célula infectada. Los hantavirus infectan principalmente las células endoteliales y la infección se inicia mediante la unión del virión a la superficie celular. La entrada de las partículas virales a la célula se encuentra mediada por las familias de las integrinas $\beta 1$ y $\beta 3$, que desencadenan un proceso de endocitosis dependiente de clatrina. También se han descrito vías alternativas de entrada que no involucran clatrina. La replicación viral se inicia después de que los complejos de ribonucleoproteína se liberan en el citoplasma de la célula infectada. Cada segmento de ARN se transcribe por la R_pRd asociada a cada complejo de ribonucleoproteína. Los ARNm de la R_pRd y de la proteína N se traducen en los ribosomas libres mientras que el ARNm de GPC lo hace en los ribosomas unidos al RE. Se desconocen los mecanismos implicados en el cambio de la transcripción y traducción del ARNm viral a la replicación del ARN genómico, pero este proceso podría estar desencadenado por un aumento en la concentración de proteína N libre. El ensamblaje del virión comienza cuando se han sintetizado cantidades suficientes de proteínas estructurales y de ARN genómico. Las secuencias de nucleótidos altamente conservadas en los extremos 3' y 5' de los segmentos de ARN genómico pueden ser críticas para el inicio de la encapsidación. Los hantavirus maduran a través

del aparato de Golgi, pero algunos también pueden ser liberados por brotación directamente de la membrana plasmática (Fulhorst *et al.*, 2011; Hepojoki *et al.*, 2012; Vaheri *et al.*, 2013).

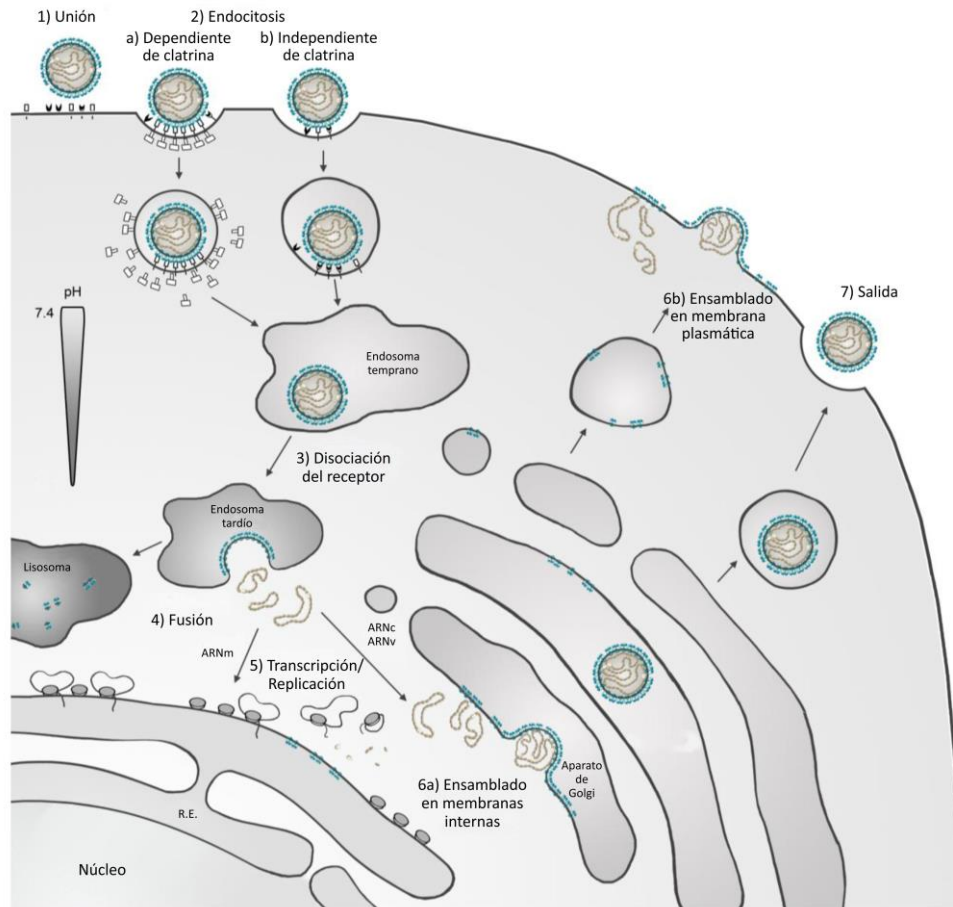


Figura 3. Ciclo de vida de los hantavirus. Unión de las partículas de hantavirus a los receptores de la superficie celular mediada por las glicoproteínas (1). Endocitosis mediada por clatrina (2a) o vías alternativas que no involucran clatrina (2b). Se produce el desprendimiento de las glicoproteínas virales de los receptores celulares (3), una maduración de los endosomas mediante disminución de pH, la fusión de las membranas virales con las membranas endosomales y la liberación de los ARN virales al citosol (4). Transcripción/replicación y síntesis de proteínas virales (5). Ensamblaje de todos los componentes en el aparato de Golgi (6a). Salida de las partículas virales maduras a través de la fusión de las vesículas de Golgi con la membrana plasmática (7). Alternativamente, la salida de las partículas virales maduras puede darse por brotación directa de la membrana plasmática (6b) (Modificado de Cifuentes-Muñoz *et al.*, 2014).

Historia de los hantavirus

Las enfermedades causadas por los hantavirus permanecieron desconocidas para la medicina occidental hasta los inicios de la década de 1950 y se creía solo ocurrían en Eurasia, siendo ampliamente conocidas por los médicos soviéticos, chinos y japoneses. Históricamente, estas enfermedades eran conocidas con diferentes nombres: fiebre hemorrágica de Corea, fiebre hemorrágica epidémica, nefritis epidémica, entre otros; presentándose con compromiso renal grave (Lee H., 1982).

Durante la guerra de Corea (1950-1953) aproximadamente 3000 soldados de las Naciones Unidas fueron diagnosticados con fiebre hemorrágica de Corea. En la década de 1970 se propuso

que el agente etiológico de esta patología podía ser un virus asociado a roedores y en 1976 se logró el aislamiento y la caracterización de este virus a partir de *Apodemus agrarius*. El hantavirus recibió el nombre de virus Hantaan (HTNV) por el río del mismo nombre cercano a la localidad donde ocurrieron los primeros casos y se lo caracterizó como el agente etiológico de la fiebre hemorrágica con síndrome renal (FHSR); (Lee *et al.*, 1978; Simmons & Riley, 2002).

En la década de 1940, se describió una patología con implicancia renal pero de forma más leve en algunos países de Europa. Se propuso el nombre de nefropatía epidémica (NE) para esta enfermedad. El agente etiológico de la NE se denominó virus Puumala (PUUV) y en 1980 se demostró que estaba asociado a *Myodes glareolus*. La NE es una forma leve de FHSR (Brummer-Korvenkontio *et al.*, 1980).

Una forma severa de FHSR fue reportada en la región de los Balcanes en la década de 1950. El agente etiológico, el virus Dobrava (DOBV) fue aislado en 1992 a partir de su reservorio hospedador *Apodemus flavicollis*, capturado en la villa de Dobrava, Eslovenia (Avsic-Zupanc *et al.*, 1992)

En la década de 1980, se aisló el hantavirus Seoul (SEOV) de roedores del género *Rattus* de distintas zonas urbanas de Seoul (Lee *et al.*, 1982). Este hantavirus se encuentra asociado a formas leves de FHSR y presenta distribución mundial, resultado de la dispersión cosmopolita de su reservorio hospedador.

Hacia finales de la década de 1980, el único hantavirus reconocido en América era el virus Prospect Hill (PHV) aislado de *Microtus pennsylvanicus*. Este virus no está asociado a enfermedad en humanos (Parrington *et al.*, 1990). En 1993 se identificó un brote de una enfermedad pulmonar grave en Estados Unidos en la región denominada *Four Corners* (unión entre los estados de Utah, Colorado, Arizona y New Mexico). El agente etiológico se denominó virus Sin Nombre (SNV) y se encuentra asociado a *Peromyscus maniculatus*. Actualmente a esta enfermedad se la conoce como síndrome pulmonar por hantavirus (SPH) y numerosos hantavirus asociados a esta enfermedad han sido identificados en toda América a partir de 1993 (Nichol *et al.*, 1993).

El virus Thottapalayam (TPMV), a pesar de haber sido el primer hantavirus identificado en 1964; no fue considerado como tal en ese momento dado que fue aislado de la musaraña *Suncus murinus* en lugar de un roedor (Carey *et al.*, 1971). Posteriormente mediante estudios de microscopía electrónica y de serología por reacción cruzada TPMV fue finalmente clasificado como un hantavirus, a pesar de ser antigénicamente distante del resto de los hantavirus aislados de roedores (Chu *et al.*, 1994). Además, los estudios filogenéticos realizados a partir de un fragmento pequeño del segmento genómico S demostraron gran divergencia en comparación con los hantavirus asociados a roedores, sugiriendo que TPMV presentaba un reservorio diferente (Yadav *et al.*, 2007). A partir de 2006 se han logrado identificar nuevos hantavirus en topos y musarañas (familias Soricidae y Talpidae, orden Soricomorpha) y en murciélagos (orden Chiroptera), en diferentes localizaciones de Asia, Europa, África y América del Norte; dejando en evidencia la gran biodiversidad que presentan los hantavirus respecto de sus hospedadores (Guo

et al, 2013; Bennett *et al*, 2014). Hasta el momento los hantavirus asociados a topos, musarañas y murciélagos no se encuentran asociados a enfermedad en humanos.

Ecología y epidemiología de los hantavirus asociados a roedores

Los hantavirus se mantienen en la naturaleza por la infección crónica asintomática y sin evidencia de enfermedad de sus reservorios naturales. La infección crónica de los reservorios y la eliminación del virus en orina, heces y saliva son la clave para el mantenimiento a largo plazo de los hantavirus en la naturaleza. También se ha observado transmisión horizontal de este virus (encuentros agresivos, apareamiento y otras actividades que impliquen contacto estrecho entre los reservorios) (Enria & Levis, 2004; Fulhorst *et al.*, 2011). Las crías de hembras infectadas han mostrado anticuerpos maternos, pero no hay prueba de transmisión vertical del virus (Jonsson *et al.*, 2010).

Los hantavirus han sido detectados en roedores de la familia Muridae, subfamilia Murinae (ratas y ratones del Viejo Mundo, en Europa y Asia) y en roedores de la familia Cricetidae, subfamilias Arvicolinae (topillos y lemmings distribuidos en todo el Hemisferio Norte), Neotominae y Sigmodontinae (ratas y ratones del Nuevo Mundo, en América). Los roedores murinos son los hospedadores principales de los hantavirus causantes de FHSR mientras que los roedores neotominos y sigmodontinos son los hospedadores de los hantavirus asociados a SPH (Tabla 1) (Fulhorst *et al.*, 2011).

Se ha observado que los hantavirus presentan una estrecha asociación con una especie o especies hospedadoras muy relacionadas, y generalmente la distribución geográfica de estos virus está directamente relacionada con la distribución de sus reservorios naturales (Peters *et al.*, 1999; Simmons & Riley, 2002). A pesar de que el paradigma “un hantavirus – una especie de roedor hospedador” en un principio fue considerado cierto, estas relaciones son mucho más complejas. Actualmente puede observarse que un hantavirus puede estar asociado a más de una especie hospedadora (Por ejemplo, SEOV asociado a *Rattus rattus* y *Rattus norvegicus*) y que una especie hospedadora puede tener asociados distintos hantavirus (Por ejemplo, *Apodemus agrarius* – el virus Hantaan (HTNV) y virus Saarema (SAAV)) (Plyusnin A., 2002)

Tabla 1. Hantavirus, abreviaturas, reservorios roedores, enfermedad asociada y rango geográfico

HANTAVIRUS	ABREVIATURA	RESERVORIO	ENFERMEDAD EN HUMANO	RANGO GEOGRÁFICO
Hantavirus asociados a roedores de la familia Muridae, subfamilia Murinae				
Dabieshan*	DBSV	<i>Apodemus confucianus</i>	Desconocida	Asia
Dobrava-Belgrade*	DOBV	<i>Apodemus flavicolis</i>	FHSR	Europa
Gou	GOUV	<i>Rattus rattus</i>	Desconocida	Mundial
Hantaan*	HTNV	<i>Apodemus agrarius</i>	FHSR	Asia
Saarema	SAAV	<i>Apodemus agrarius</i>	FHSR	Europa y Asia
Sangassou*	SANGV	<i>Hylomyscus simus</i>	Desconocida	África
Seoul*	SEOV	<i>Rattus norvegicus</i> <i>Rattus rattus</i>	FHSR	Mundial
Thailand*	THAIV	<i>Bandicota indica</i>	Desconocida	Sur de Asia
Tigray*	TIGV	<i>Stenocephalemys albipes</i>	Desconocida	África
Hantavirus asociados a roedores de la familia Cricetidae, subfamilia Arvicolinae				
Fusong*	FUSV	<i>Microtus fortis</i>	Desconocida	Asia
Hokkaido	HOKV	<i>Myodes rufocanus</i>	Desconocida	Asia (Japón)
Isla Vista	ISLAV	<i>Microtus californicus</i>	Desconocida	América del Norte
Khabarovsk*	KHAV	<i>Microtus fortis</i>	Desconocida	Rusia
Luxi*	LUXV	<i>Eothenomys miletus</i>	FHSR	Asia (China)
Muju	MUJV	<i>Myodes regulus</i>	FHSR	Asia (Corea)
Prospect Hill*	PHV	<i>Microtus pennsylvanicus</i>	Desconocida	América del Norte
Puumala*	PUUV	<i>Myodes glaerolus</i>	FHSR	Europa
Tatenale*	TATV	<i>Microtus agrestis</i>	Desconocida	Europa
Topografov	TOPV	<i>Lemmus sibiricus</i>	Desconocida	Rusia
Tula*	TULV	<i>Microtus arvalis</i> <i>Microtus levis</i>	Desconocida	Europa y Asia
Hantavirus asociados a roedores de la familia Cricetidae, subfamilia Neotominae				
Carrizal	CARV	<i>Reithrodontomys sumichrasti</i>	Desconocida	América Central
El Moro Canyon*	ELMCV	<i>Reithrodontomys megalotis</i>	Desconocida	América del Norte
Huitzilac	HUIV	<i>Reithrodontomys megalotis</i>	Desconocida	América del Norte
Montano*	MTNV	<i>Peromyscus beatae</i>	Desconocida	América del Norte
New York	NYV	<i>Peromyscus leucopus</i>	SPH	América del Norte
Rio Segundo	RIOSV	<i>Reithrodontomys mexicanus</i>	Desconocida	América Central
Sin Nombre*	SNV	<i>Peromyscus maniculatus</i>	SPH	América del Norte
Hantavirus asociados a roedores de la familia Cricetidae, subfamilia Sigmodontinae				
Alto Paraguay	ALPV	<i>Holochilus chararius</i>	Desconocida	América del Sur (Paraguay)
Anajatuba	ANJV	<i>Oligoryzomys fornesi</i>	SPH	América del Sur (Brasil)
Andes*	ANDV	<i>Oligoryzomys longicaudatus</i>	SPH	América del Sur (Argentina y Chile)
Araraquara	ARAV	<i>Necromys lasiurus</i>	SPH	América del Sur (Brasil)
Araucaria	ARAUV	<i>Oligoryzomys nigripes</i> <i>Oxymycterus judex</i> <i>Akodon montensis</i>	SPH	América del Sur (Brasil)
Bayou*	BAYV	<i>Oryzomys palustris</i>	SPH	América del Norte
Black Creek Canal*	BCCV	<i>Sigmodon hispidus</i>	SPH	América del Norte
Bermejo	BMJV	<i>Oligoryzomys occidentalis</i>	SPH	América del Sur (Bolivia, Paraguay y Argentina)
Calabazo		<i>Zygodontomys brevicauda</i>	Desconocida	América del Sur (Panamá)
Caño Delgadito*	CADV	<i>Sigmodon alstoni</i>	Desconocida	América del Sur (Venezuela)
Castelo dos Sonhos	CASV	<i>Oligoryzomys eliurus</i> <i>Oligoryzomys utiariensis</i>	SPH	América del Sur (Brasil)
Catacamas	CATV	<i>Oryzomys couesi</i>	Desconocida	América Central

Central Plata	CPV	<i>Oligoryzomys flavescens</i> <i>Oligoryzomys nigripes</i>	SPH	América del Sur (Uruguay)
Choclo*	CHOV	<i>Oligoryzomys costaricensis</i>	SPH	América del Sur (Panamá)
HU39694		<i>Oligoryzomys flavescens</i>	SPH	América del Sur (Argentina)
Itapua	ITPV	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	SPH	América del Sur (Paraguay)
Jaborá	JABV	<i>Akodon montensis</i> <i>Akodon paranaensis</i>	Desconocida	América del Sur (Brasil y Paraguay)
Juquitiba	JUQV	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	SPH	América del Sur (Brasil, Uruguay, Paraguay y Argentina)
Laguna Negra*	LANV	<i>Calomys laucha</i> <i>Calomys callosus</i> <i>Calomys callidus</i> <i>Calomys fecundus</i>	SPH	América del Sur (Paraguay, Bolivia, Brasil y Argentina)
Lechiguanas	LECV	<i>Oligoryzomys flavescens</i> <i>Oligoryzomys nigripes</i>	SPH	América del Sur (Argentina)
Maciel	MCLV	<i>Necomys lasiurus</i>	Desconocida	América del Sur (Argentina)
Maporal*	MAPV	<i>Oligoryzomys delicatus</i>	SPH	América del Sur (Venezuela)
Maripa	MARV	<i>Oligoryzomys fulvescens</i> <i>Zygodontomys brevicauda</i>	SPH	América del Sur (Guyana Francesa)
Muleshoe	MULV	<i>Sigmodon hispidus</i>	Desconocida	América del Norte
Necocli*	NECV	<i>Zygodontomys cherriei</i>	Desconocida	América del Sur (Colombia)
Neembucu		<i>Oligoryzomys chacoensis</i>	SPH	América del Sur (Paraguay)
Orán	ORNV	<i>Oligoryzomys chacoensis</i>	SPH	América del Sur (Argentina)
Paranoa	PARV	Desconocido	SPH	América del Sur (Brasil)
Pergamino	PRGV	<i>Akodon azarae</i>	Desconocida	América del Sur (Argentina)
Rio Mamore	RIOMV	<i>Oligoryzomys microtis</i>	SPH	América del Sur (Brasil, Bolivia y Perú)
Rio Mearim	RIOMMV	<i>Holochilus sciureus</i>	Desconocida	América del Sur (Brasil)
Tunari	TUNV	Desconocido	SPH	América del Sur (Bolivia)

* Hantavirus que han sido reconocidos como especies dentro del género *Orthohantavirus*.

Fuente: Levis *et al.*, 1997, 1998; Enrí & Levis, 2004; Fullhorst *et al.*, 2011; Firth *et al.*, 2012; Gonzalez-Iltig *et al.*, 2014a; Gonzalez-Iltig *et al.*, 2014b; Rivera *et al.*, 2015, 2018, 2019; Maes *et al.*, 2018; Milholland *et al.*, 2018; Laenen *et al.*, 2019; ICTV, 2022.

Las infecciones en humanos son accidentales y surgen como consecuencia de la exposición a roedores infectados y se dan principalmente por inhalación de aerosoles a partir de la excretas infectadas (saliva, orina, heces). Otros medios de transmisión descritos incluyen heridas por mordedura de roedores infectados, contaminación de lesiones cutáneas o membranas mucosas con partículas virales. La transmisión al ser humano generalmente ocurre al introducirse en el hábitat de los roedores en zonas suburbanas y ambientes rurales, durante el desarrollo de actividades laborales, recreativas, o en lugares cerrados como galpones o depósitos infestados por roedores (Figura 3) (Enría & Levis, 2004; Fulhorst *et al.*, 2011; Enría *et al.*, 2014). La transmisión persona a persona fue descrita para el virus Andes (ANDV) en Argentina y Chile. En 1995 se notificó el primer caso de brote de SPH por transmisión interhumana en El Bolsón, Río Negro, en el cual 2 de los 4 miembros afectados murieron (Lázaro *et al.*, 1995; Enría *et al.*, 1996; Wells *et al.*, 1997); entre octubre de 2018 y principios de 2019 se registró un brote de SPH con transmisión interhumana en la localidad de Epuypén, Chubut; en donde se registraron 34 casos confirmados, de los cuales 11 fallecieron (Boletín Integrado de Vigilancia N°445, 2019). También se ha documentado un caso de transmisión interhumana en el centro de nuestro país asociado al virus HU39694; desde un caso primario a un contacto estrecho y sin propagación del contacto infectado a nuevos contactos (Martínez *et al.*, 2005).

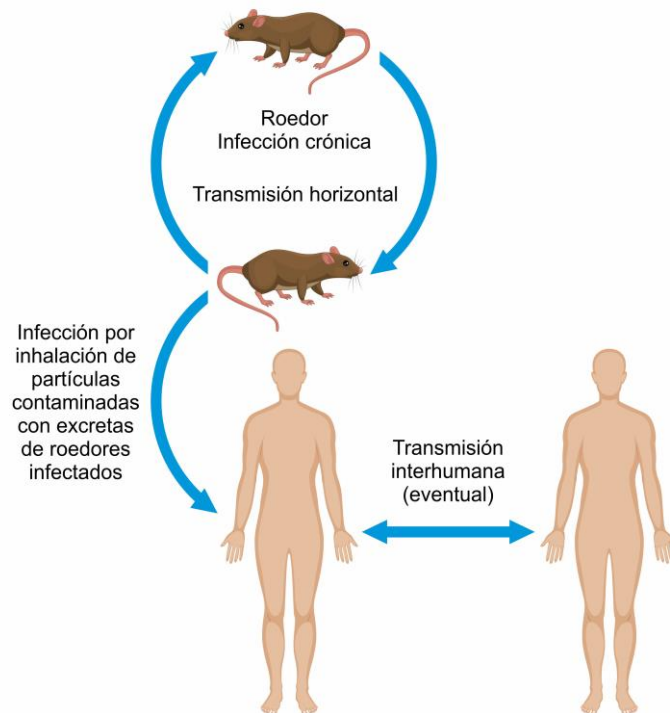


Figura 4. Ciclo de transmisión de los orthohantavirus e infección en humanos. La transmisión horizontal del virus puede ocurrir durante encuentros agresivos, apareamiento y otras actividades que implican un contacto físico cercano entre roedores. Los seres humanos son huéspedes accidentales que suelen infectarse por inhalación de gotas de saliva en aerosol, orina de roedores infectados o por inhalación de partículas de polvo contaminadas con secreciones o excreciones de roedores infectados. Existe evidencia de transmisión persona a persona del virus Andes (Sur de Argentina y Chile) y del virus HU39694 en el centro de Argentina. (*Adaptado de Fulhorst et al., 2011*).

Enfermedades causadas por los hantavirus

Fiebre Hemorrágica con Síndrome Renal (FHSR)

Las presentaciones clínicas de la FHSR varían de formas leves (tasa de mortalidad <1%) a moderadas y severas con tasas de mortalidad que varían de 5-15%; dependiendo del agente causal. En general, el período de incubación para la FHSR suele ser de 2 a 4 semanas pero puede variar de 1 a 8 semanas. El curso clínico de esta enfermedad puede ser dividido en cinco fases: prodrómica o febril, hipotensiva, oligúrica, diurética y de convalecencia. Luego del período de incubación la enfermedad comienza de manera abrupta con fiebre alta, escalofríos, dolor de cabeza, dolor de espalda, dolor abdominal, náuseas y vómitos. La fase febril puede durar de 3 a 7 días. Luego se da inicio a la fase hipotensiva y algunas de las manifestaciones hemorrágicas incluyen petequias en piel y mucosas, trombocitopenia y leucocitosis, sufusión conjuntival, hematuria y epistaxis. Esta etapa puede durar hasta 48 horas. La fase oligúrica se caracteriza por disminución en las funciones renales provocando oliguria, proteinuria, sedimentos urinarios anormales, entre otros síntomas y puede durar de 3 a 7 días. Los casos más severos de falla renal suelen ser tratados con hemodiálisis en esta etapa. En la fase diurética se recuperan las funciones renales normales y esta etapa puede durar días o semanas. En la fase de convalecencia, la cual puede durar semanas o meses, se recuperan los parámetros clínicos y bioquímicos normales. La muerte, de ocurrir, generalmente se da por falla renal en la fase oligúrica o por shock en las fases hipotensiva, oligúrica o diurética (Fulhorst *et al.*, 2011; Avsic-Zupanc *et al.*, 2019).

Síndrome Pulmonar por Hantavirus (SPH)

El SPH puede presentarse como un cuadro leve con un síndrome febril inespecífico o llegar hasta la manifestación más grave con insuficiencia respiratoria grave y shock cardiogénico. Las tasas de mortalidad alcanzan el 30-50%. El período de incubación del SPH suele ser entre 4 y 42 días (rango medio de 9 a 12 días). El curso clínico de la enfermedad puede dividirse en 4 fases: prodrómica o febril, cardiopulmonar, diurética y de convalecencia. Luego del período de incubación aparece la fase prodrómica. Esta fase se extiende entre 3 a 5 días y se caracteriza por fiebre elevada, astenia, escalofríos y mialgias. Puede observarse náuseas con o sin vómitos, cefaleas, mareos, artralgias, dolor torácico, sudoración, petequias. En esta etapa también se observan trombocitopenia y leucocitosis. Los síntomas respiratorios superiores están frecuentemente ausentes en la etapa febril. La fase cardiopulmonar se caracteriza por la presentación de shock y edema pulmonar que puede progresar rápidamente (entre 4 a 24 horas), con el consecuente distrés respiratorio. Esta fase comienza con tos progresiva, disnea, taquipnea, taquicardia, fiebre e hipotensión. El cuadro puede evolucionar a un shock con hipotensión y oliguria. Se presenta hipoxemia y puede observarse manifestaciones hemorrágicas y compromiso renal. Una vez instalada la fase cardiopulmonar, la enfermedad evoluciona rápidamente y puede llevar a la muerte en 24 a 48 horas. La estabilización hemodinámica y respiratoria ocurre durante las primeras 48 horas de tratamiento, seguida de una rápida mejoría del edema pulmonar y de los parámetros de laboratorio. La fase diurética está caracterizada por una rápida reabsorción del

edema pulmonar, eliminación del líquido, resolución de la fiebre y del shock. La fase de convalecencia puede durar hasta 2 meses y la función respiratoria de los pacientes que presentan SPH se reconstituye en forma completa (Enfermedades infecciosas | Hantavirus, Guía para el equipo de salud N° 10, 2012).

La tasa de letalidad reportada para nuestro país es aproximadamente de 21,4% (Alonso *et al.*, 2019).

Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico de las infecciones por hantavirus se basa en los datos clínicos y epidemiológicos. Las metodologías más ampliamente utilizadas para el diagnóstico etiológico de las infecciones por hantavirus son:

- a) Detección serológica: es el método más utilizado para realizar el diagnóstico de las infecciones por hantavirus. La detección de anticuerpos del tipo inmunoglobulinas M (IgM) por ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) es la técnica más utilizada para el diagnóstico y confirmación de las infecciones por hantavirus dado que la mayoría de los casos presentan niveles detectables de IgM en muestras de suero del período agudo de la enfermedad. En algunos casos también es posible la detección de IgG en muestras del período agudo. La reactividad cruzada que presenta esta prueba permite la búsqueda inicial de nuevos hantavirus (Ksiazek *et al.*, 1995).
- b) Detección de material genético viral: las técnicas que habitualmente se emplean son RT-PCR y RT-PCR en tiempo real a partir de muestras de suero, coágulo o tejidos obtenidos en los primeros 10 días de la enfermedad. (Enria & Levis., 2004; Avsic-Zupanc *et al.*, 2019). La detección de material genético viral además de utilizarse para la confirmación de infección por hantavirus también se encuentra asociada a casos que presenten un interés particular como puede ser la gravedad del caso o nueva localización geográfica de un caso. La amplificación genética seguida de secuenciación nucleotídica se emplea para conocer el genotipo asociado a la infección por hantavirus.
- c) Detección de antígeno viral mediante la técnica de inmunohistoquímica en muestras de tejidos fijados, particularmente en casos fatales en los que no se dispone de otro tipo de muestra (Zaki *et al.*, 1995).

En el periodo 1996-2021, 760 casos de SPH fueron confirmados por el laboratorio de Diagnóstico Referencial y Laboratorial del Instituto Nacional de Enfermedades Virales (INEVH) "Dr. Julio I. Maiztegui", laboratorio Nacional de Referencia para esta patología.

En relación al tratamiento de las infecciones por hantavirus, no existe en la actualidad tratamiento específico para FHSR y SPH. Éste radica principalmente en aplicar medidas de sostén adecuadas (mantenimiento de los fluidos corporales y balance de electrolitos) con ingreso a cuidados intensivos en los casos más graves. Los pacientes con FHSR con falla renal severa pueden necesitar diálisis y en los casos graves de SPH es necesaria la ventilación mecánica. La

ribavirina ha sido utilizada como tratamiento en las infecciones causadas por HTNV en China y se demostró que redujo notablemente la tasa de mortalidad cuando se administró en forma temprana en el curso de la enfermedad. En el caso de SPH no está demostrada la eficacia del tratamiento con ribavirina (Enria & Levis., 2004; Avsic-Zupanc *et al.*, 2019).

Para los reservorios naturales de los hantavirus, la detección de anticuerpos tipo IgG mediante la técnica de ELISA es considerada un indicio de infección dado que esta se caracteriza por ser una infección persistente, con presencia conjunta de virus y anticuerpos en sangre. También puede realizarse la detección de material genético a partir de tejidos de roedores infectados seguida de secuenciación nucleotídica para conocer el genotipo asociado a la infección por hantavirus (Nichol *et al.*, 1993).

Hantavirus en Argentina

En Argentina las primeras evidencias de circulación de hantavirus datan de la década de 1980 con la detección de anticuerpos en roedores silvestres, de laboratorio y en humanos utilizando antígenos de hantavirus del Viejo Mundo (Maiztegui *et al.*, 1983). Estas evidencias llevaron al diseño por parte del INEVH de diferentes estrategias de búsqueda e identificación de casos de infección por hantavirus en aquellas patologías que constituyen su diagnóstico diferencial y que presentaron resultados virológicos negativos (fiebre hemorrágica argentina (FHA), coriomeningitis linfocitaria (LCM), leptospirosis) o cuadros (insuficiencias renales e insuficiencias respiratorias) que podrían haber quedado sin diagnosticar. En estos estudios se empleó la técnica de ELISA con el antígeno del virus Hantaan (HTNV) y permitieron detectar retrospectivamente casos de infección por hantavirus en tres regiones distantes de Argentina:

- a) Región Noroeste: desde principios de 1980 han sido identificados casos clínicos de una enfermedad pulmonar aguda compatible con síndrome de distrés respiratorio del adulto de etiología desconocida en la localidad de Orán, provincia de Salta. En 1993, en el INEVH se identificaron en forma retrospectiva casos de infección por hantavirus mediante detección de anticuerpos IgM por ELISA en el marco del diagnóstico diferencial con leptospirosis (Cortes *et al.*, 1994; 1995).
- b) Región Centro: en la década del 1990, se confirmaron serológicamente los primeros casos de SPH a través un estudio retrospectivo llevado a cabo entre pacientes notificados para FHA sin confirmación virológica en el norte de la provincia de Buenos Aires y sur de Santa Fe. Los primeros casos de SPH diagnosticados clínicamente en forma prospectiva se presentaron en 1994 (Parisi *et al.*, 1995).
- c) Región Patagónica: en marzo de 1995 ocurrió un brote familiar de una enfermedad pulmonar aguda en la localidad cordillerana de El Bolsón, provincia de Río Negro, en el cual 2 de los 4 miembros afectados murieron. La sospecha clínica de SPH fue confirmada serológicamente en el INEVH en todos los casos mediante detección de anticuerpos IgM por técnica de ELISA (Lázaro *et al.*, 1995; 2000).

La detección de los primeros casos de infección por hantavirus en regiones geográficas distantes indicaba una amplia distribución geográfica de los hantavirus involucrados en la transmisión, con el consiguiente impacto potencial en salud pública.

A partir de la década del 1980 se realizaron las primeras comunicaciones de detección de anticuerpos para virus Seoul (SEOV) en *Rattus norvegicus* y *R. rattus* capturados en el puerto de Buenos Aires, roedores salvajes de diversas regiones, roedores de laboratorio y personal de laboratorio (Maiztegui *et al.*, 1983, LeDuc *et al.*, 1985; Weissenbacher *et al.*, 1990). En función de esos primeros hallazgos y continuando con los estudios de este hantavirus; se ha encontrado evidencia serológica de este virus en *R. norvegicus* y *R. rattus* en asentamientos precarios de la ciudad de Buenos Aires en 2001 (Seijo *et al.*, 2003), en zonas residenciales y áreas marginales de la misma entre 2003 y 2005 (Cueto *et al.*, 2008), en el Parque Natural Lago Lugano de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires en el año 2017 (Hercolini *et al.*, 2018) y en la zona urbana del Gran La Plata (Fitte, 2019).

La amplia distribución geográfica de los hantavirus y la capacidad de alguno de ellos de producir enfermedad en humanos severa y/o fatal; determinaron su impacto en la salud pública en nuestro país, con el consecuente aumento de interés en el estudio de estos virus.

Al presente, se ha descrito la circulación de 11 hantavirus en Argentina distribuidos en cuatro regiones geográficas del país; registrándose casos de SPH en 14 provincias:

- a) Región Noroeste (NOA): Salta, Jujuy y Tucumán
- b) Región Noreste (NEA): Misiones, Corrientes, Formosa y Chaco.
- c) Región Centro: Buenos Aires, Santa Fe y Entre Ríos.
- d) Región Patagónica: Neuquén, Río Negro, Chubut y Santa Cruz.

De los 11 hantavirus, solo 8 (Bermejo, Orán, Laguna Negra, Jujuitiba, Lechiguanas, HU39694, Alto Paraguay y Andes) fueron caracterizados como agentes etiológicos de SPH. Hasta el momento, no se ha asociado a los virus Maciel y Pergamino con enfermedad en el hombre. Tampoco se han encontrado evidencias de infección en humanos por virus Seoul en Argentina (Levis *et al.*, 1997, 1998, 2004, 2005; Rivera *et al.*, 2007, 2015, 2018, 2019; Padula *et al.*, 2007; Casas *et al.*, 2008; Bellomo *et al.*, 2009; Gonzalez-Iltig *et al.*, 2014a, 2014b; Sen *et al.*, 2017; Calderón *et al.*, 2018; Colombo *et al.*, 2019, Villafañe *et al.*, 2021; Bellomo *et al.*, 2021) (Tabla 2).

Actualmente, el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) reconoce 2 especies de hantavirus asociadas a SPH circulando en Argentina: *Andes orthohantavirus* y *Laguna Negra orthohantavirus*. En nuestro país, la especie *Andes orthohantavirus* está representada por los virus Andes, Lechiguanas y Orán; mientras que la especie *Laguna Negra orthohantavirus* está representada por el virus Laguna Negra. Otros virus circulantes en nuestro país no pueden ser incorporados a esta clasificación por no existir la información necesaria. Entre ellos se encuentran los virus Jujuitiba, Bermejo, HU39694 y Alto Paraguay (Laenen *et al.*, 2019; ICTV, 2022).

Tabla 2. Hantavirus de Argentina, abreviaturas, roedores reservorio, enfermedad asociada conocida y distribución geográfica

Hantavirus	Abreviatura	Reservorio	Enfermedad	Distribución Geográfica
Andes	ANDV	<i>Oligoryzomys longicaudatus</i>	SPH	Neuquén, Río Negro, Chubut, Santa Cruz
Alto Paraguay	ALPV	Desconocido	SPH	Santa Fe
Bermejo	BMJV	<i>Oligoryzomys occidentalis</i>	SPH	Salta, Jujuy, Formosa, Chaco
HU39694		<i>Oligoryzomys flavescens</i>	SPH	Buenos Aires, Tucumán (a)
Juquitiba	JUQV	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	SPH	Misiones
Laguna Negra	LANV	<i>Calomys fecundus</i>	SPH	Salta, Jujuy, Formosa (b)
Lechiguanas	LECV	<i>Oligoryzomys flavescens</i> <i>Oligoryzomys nigripes</i>	SPH	Santa Fe, Buenos Aires, Entre Ríos y Corrientes
Maciel	MCLV	<i>Necromys lasiurus</i>	Desconocida	Santa Fe
Orán	ORNV	<i>Oligoryzomys chacoensis</i>	SPH	Salta, Jujuy
Pergamino	PRGV	<i>Akodon azarae</i>	Desconocida	Buenos Aires, Entre Ríos
Seoul	SEOV	<i>Rattus norvegicus</i> <i>Rattus rattus</i>	Desconocida	Buenos Aires

(a) Se desconoce reservorio del virus HU39694 en Tucumán

(b) Virus Laguna Negra, en Formosa asociado a roedores del género *Calomys*

Fuente: Levis *et al.*, 1997, 1998, 2004, 2005; Rivera *et al.*, 2007, 2015, 2018, 2019; Gonzalez-Ittig *et al.*, 2014a, 2014b; Casas *et al.*, 2008; Padula *et al.*, 2007; Bellomo *et al.*, 2009; Sen *et al.*, 2017; Calderón *et al.*, 2018; Colombo *et al.* 2019, Villafañe *et al.*, 2021; Bellomo *et al.*; 2021.

Evolución de los hantavirus

Mecanismos de evolución

El principal mecanismo involucrado en la evolución de los hantavirus y en la generación de diversidad genética es la deriva genética, la cual implica la acumulación de mutaciones puntuales e inserciones/delecciones de uno o varios nucleótidos, principalmente en las regiones no codificantes de los extremos 5' y 3' de sus genomas (Pluysnin A., 2002).

Los eventos de reasociación y recombinación genética también se encuentran asociados a la evolución de los hantavirus. La reasociación genética ocurre en los virus que presentan genomas segmentados, como es el caso de los hantavirus. Para ello, dos partículas virales deben co-infectar la misma célula y la progenie generada presentarán segmentos genómicos de ambas partículas virales parentales. Se ha reportado la presencia de eventos de reasociación genética en la naturaleza para el virus Sin Nombre, el virus Puumala y el virus Doobrava (Henderson *et al.*, 1995; Pluysnin A., 2002; Klempa B., 2018, Jonsson *et al.*, 2010). La recombinación en los virus ARN se produce cuando dos partículas virales co-infectan una misma célula y la progenie generada tendrá moléculas de ARN híbridas. Este fenómeno es un evento poco común en la evolución de los hantavirus aunque se ha reportado la ocurrencia de estos eventos in vivo e in vitro. Se ha demostrado que este proceso de recombinación ha estado involucrado en la evolución del virus Tula (Sibold *et al.*, 1999; Pluysnin A., 2002) y se ha documentado la existencia de eventos de recombinación para los virus Hantaan, Seoul, Andes y Puumala (Kabwe *et al.*, 2020). Los eventos de reasociación y recombinación genética pueden ser detectados mediante análisis filogenéticos. Los primeros pueden evidenciarse a través de incongruencias entre las filogenias

inferidas a partir de cada segmento genómico individual, mientras que los segundos pueden identificarse como incongruencias entre las filogenias inferidas a partir de diferentes regiones de un mismo segmento genómico (Bennett *et al.*, 2014).

Los fenómenos de cambios de huésped (*host-switching*) y coespeciación también juegan un papel importante en la evolución y en la diversidad genética actual de los hantavirus. Estos fenómenos implican la transmisión de un patógeno de un hospedador a otro relacionado seguido de eventos de especiación en ambos. El nuevo virus y el original evolucionan independientemente y esto puede observarse en las filogenias como dos clados monofiléticos hermanos. Lo mismo ocurre al analizar las filogenias de los hospedadores (Plyusnin & Morzunov, 2001).

Filogenia de los hantavirus

Los análisis filogenéticos basados en las secuencias completas disponibles para los segmentos S y M han demostrado que los hantavirus pueden dividirse en cuatro filogrupos (Figura 5). En las filogenias basadas en el segmento S, el filogrupo I se encuentra representado por los hantavirus asociados a insectívoros de la familia Soricidae (orden Soricomorpha). El filogrupo II está formado por los hantavirus asociados a murciélagos (orden Chiroptera) e insectívoros de la familia Talpidae (orden Soricomorpha). El filogrupo III contiene otros hantavirus asociados a insectívoros (orden Soricomorpha) y a roedores de subfamilia Murinae, formando dos clados bien diferenciados. El filogrupo IV incluye dos grupos monofiléticos que corresponden a los hantavirus asociados a roedores de las subfamilias Arvicolinae y Sigmodontinae/Neotominae, respectivamente. Los hantavirus asociados a insectívoros en el filogrupo III están más relacionados con los hantavirus asociados a roedores murinos que al filogrupo II. Esta falta de monofilia sugiere historias evolutivas diferentes con un posible evento de *host-switching* ancestral entre roedores murinos e insectívoros. Cuando se realizan comparaciones de las filogenias obtenidas con los segmentos S y M completos es posible observar una diferencia en la posición basal de los árboles. En la filogenia obtenida con el segmento S se observa que el filogrupo I ocupa una posición basal respecto de los otros filogrupos, mientras que en la filogenia obtenida a partir del segmento M se observa que el filogrupo II ocupa una posición basal. Esta incongruencia filogenética sugiere un posible evento de reasociación genética ancestral entre los hantavirus de los filogrupos I y II. A partir de estudios filogenéticos realizados por varios autores, se puede sugerir que los roedores no serían el hospedador original de los hantavirus, sino que el ancestro común a todos los hantavirus puede haber estado asociado a murciélagos y/o insectívoros (Guo *et al.*, 2013; Zhang Y., 2014; Bennett *et al.*, 2014; Plyusnin & Sironen, 2014; Castel *et al.*, 2017).

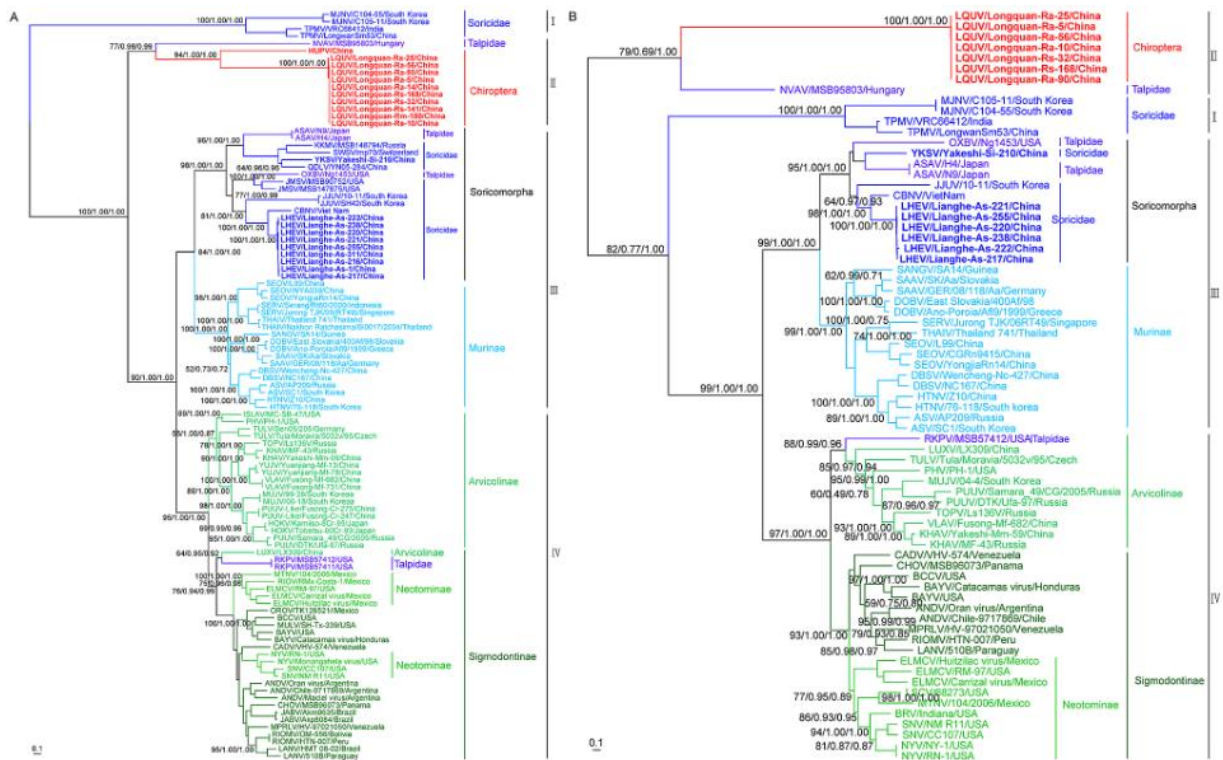


Figura 5. Árboles filogenéticos obtenidos a partir de secuencias completas para los segmentos S (A) y M (B) mediante máxima verosimilitud, BEAST e inferencia bayesiana. Los colores indican hantavirus asociados a Soricidae y Talpidae (azul y violeta), Chiroptera (rojo), Soricomorpha (negro), Murinae (celeste), Arvicolinae (verde claro) y Sigmodontinae/Neotominae (verde) (Tomada de Guo et al., 2013).

Particularmente para los hantavirus asociados a roedores, la estrecha asociación hospedador-hantavirus se refleja en la concordancia entre las filogenias de los roedores hospedadores de las familias Muridae y Cricetidae y sus respectivas especies de hantavirus asociados (Figura 6). Pero este patrón puede verse ocasionalmente alterado por eventos de *host-switching*. Al menos tres eventos han sido documentados a partir de diferentes estudios realizados:

- El virus Saaremaa (SAAV) está más relacionado genéticamente con Dobrava (DOBV) que con Hantaan (HTNV), a pesar de que SAAV y HTNV están asociados a *Apodemus agrarius*. SAAV parece ser producto de un evento de *host-switching* ancestral a partir de DOBV de *Apodemus flavicollis* a una especie de roedor relacionada (Nemirov et al., 2002)
- Los virus Khabarovsk (KHAV) y Topografov (TOPV) comparten un ancestro común con el PUUV. KHAV (antes KBRV) sería producto de dos eventos de *host-switching* consecutivos: inicialmente un ancestro de *Clethrionomys* transmitió a *Lemmus* un virus el cual se convirtió en el ancestro común de TOPV y KHAV y, posteriormente este fue transmitido a *Microtus* resultando en KHAV (Vapalahti et al., 1999)
- El virus New York (NYV) puede haberse originado por un evento de *host-switching* de un ancestro del SNV de *Peromyscus maniculatus* a una especie de roedor relacionada (*Peromyscus leucopus*) (Morzunov et al., 1998)

Además, es posible observar relaciones filogenéticas estrechas entre algunas especies de hantavirus relacionadas asociados a roedores distribuidos en regiones geográficas distantes. Los virus Prospect Hill (PHV) y TULV se encuentran relacionados filogenéticamente pero separados geográficamente. PHV es un hantavirus del Nuevo Mundo, mientras que TULV es un hantavirus del Viejo Mundo y ambos se encuentran asociados a roedores del género *Microtus*. Estos roedores se han distribuido en diferentes continentes hace 1-2 millones de años; lo que sugiere un proceso evolutivo antiguo entre los hantavirus y sus roedores reservorios (Plyusnin *et al.*, 1996; Plyusnin & Morzunov, 2001; Plyusnin A., 2002; Jonsson *et al.*, 2010; Bennett *et al.*, 2014).

En América de Sur, se han reportado eventos de reasociación genética y *host-switching* para hantavirus con circulación en Paraguay asociados a roedores del género *Akodon* (Chu *et al.*, 2011), y eventos de *host-switching* para el virus Lechiguanas (LECV) en roedores del género *Oligoryzomys* (Colombo *et al.*, 2019).

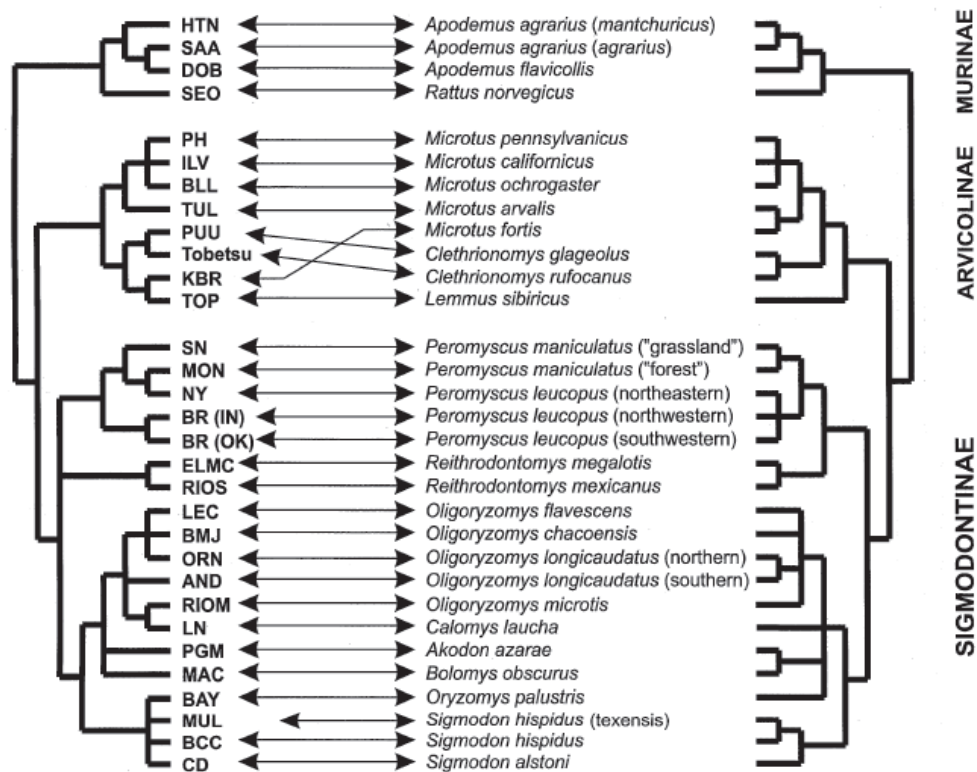


Figura 6. Comparación simplificada entre las filogenias de los hantavirus, basado en el segmento M (derecha) y sus hospedadores roedores (izquierda) (Tomada de Plyusnin A., 2001).

Modelos evolutivos de los hantavirus

Co-evolución de los hantavirus con sus hospedadores

La congruencia observada entre las filogenias de los hospedadores roedores con sus hantavirus asociados, respalda la idea de que los hantavirus son virus antiguos que ya existían en el punto de diversificación de los principales clados placentarios, aproximadamente en 90-100

millones de años (Ma). Esta es la base de la hipótesis de la co-evolución de los hantavirus con sus hospedadores y, este concepto ha sido históricamente muy utilizado en la investigación y descubrimiento de nuevos hantavirus (Plyusnin *et al.*, 1996; Plyusnin & Morzunov, 2001; Plyusnin A., 2002; Jonsson *et al.*, 2010; Plyusnin & Sironen 2014; Bennett *et al.*, 2014; Holmes & Zhang, 2015).

Para poder calcular las tasas evolutivas de los hantavirus e inferir el origen de los mismos, se utilizan modelos basados en el registro fósil de hospedador debido a la falta de un registro fósil para los hantavirus y metodologías basadas en máxima verosimilitud. Se asume que las escalas de tiempo en las que tanto el virus como el hospedador divergen son congruentes, debido al proceso evolutivo antiguo entre los hantavirus y sus roedores reservorios. Las tasas evolutivas calculadas de esta manera están en el orden de 10^{-6} a 10^{-7} sustituciones/sitio/año, generando tiempos de divergencia en la escala de millones de años (Sironen *et al.*, 2001; Plyusnin & Sironen 2014; Bennet *et al.*, 2014; Castel *et al.*, 2017).

Los patrones de co-evolución pueden verse afectados por eventos de *host-switching* (generalmente en especies de roedores relacionadas) introduciendo algunas alteraciones en las topologías de las filogenias. A pesar de que estos eventos son más frecuentes de lo pensado, por si solos no serían suficientes para la generación de topologías congruentes entre los hantavirus y sus reservorios y, por lo tanto la co-evolución parecería ser la fuerza predominante en la evolución a largo plazo de los hantavirus (Plyusnin & Morzunov, 2001; Plyusnin A., 2002; Holmes & Zhang, 2015).

Evolución reciente de los hantavirus

En algunas publicaciones se han realizado análisis evolutivos de los hantavirus empleando relojes moleculares y metodologías bayesianas. Éstos han revelado altas tasas de sustitución nucleotídica generando tiempos de divergencia de miles o cientos de años; proporcionando un modelo diferente de evolución del hantavirus. Este modelo sugiere que no existe co-evolución entre los hantavirus y sus hospedadores, presentando una evolución más reciente. El paralelismo observado entre las filogenias de los hantavirus con sus hospedadores se debería a una reciente colonización de los roedores por estos virus, seguida de eventos de *host-switching* hacia especies diferentes y adaptación local. Para calcular las tasas evolutivas de los hantavirus e inferir el origen de los mismos se utilizan modelos bayesianos generando tasas evolutivas en el orden de 10^{-2} a 10^{-4} sustituciones/sitio/año, similares a las obtenidas para otros virus ARN (Ramsden *et al.*, 2008; Ramsden *et al.*, 2009; Jonsson *et al.*, 2010; Souza *et al.*, 2014). Sin embargo, estudios recientes sugieren que los tiempos cortos de divergencia inferidos con reloj molecular pueden deberse a un mal ajuste entre los datos y el modelo de evolución elegido, generando de esta manera una subestimación de los tiempos de divergencia (Zhang Y., 2014).

PLANTEO DEL PROBLEMA

La filodinamia es una metodología ampliamente utilizada para el estudio de la dinámica de los virus pero existen escasos estudios en dónde se haya modelado el comportamiento evolutivo de los hantavirus en América (Torres-Perez *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2014; Guterres *et al.*, 2019). Este trabajo de tesis intenta predecir el comportamiento evolutivo de los hantavirus en las diferentes regiones de Argentina y pretende ser un aporte al conocimiento de la historia evolutiva de estos virus en América.

OBJETIVOS

Objetivo general

- Realizar un análisis filogenético y filodinámico de los distintos genotipos de hantavirus circulantes en la Región Centro y Norte (Noreste y Noroeste) de Argentina.

Objetivos particulares

- Realizar la caracterización genética de hantavirus a partir de muestras obtenidas de roedores y de suero de casos de SPH confirmados serológicamente.
- Generar juegos de datos que incluyan secuencias de los diferentes genotipos virales que circulan en nuestro país así como también variantes genéticas de América, para los segmentos genómicos S y M.
- Evaluar el contenido filogenético de los juegos de datos generados.
- Realizar los análisis filogenéticos mediante máxima verosimilitud.
- Evaluar la presencia de señal temporal en los árboles filogenéticos generados.
- Construir las filogenias datadas empleando una metodología basada en relojes moleculares.
- Estimar las tasas de sustitución nucleotídica (sustituciones/sitio/año).
- Inferir los tiempos del ancestro común más cercano para los juegos de datos analizados.

TRABAJO EXPERIMENTAL

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

METODOLOGIA

SELECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Se seleccionaron muestras de roedores con anticuerpos IgG anti-hantavirus y de casos de SPH estudiados el INEVH abarcando el período 2005 – 2017.

Muestras humanas

Se seleccionaron para el estudio un total de 130 muestras de origen humano provenientes de casos confirmados de SPH mediante detección de anticuerpos IgM anti-hantavirus por la técnica de ELISA. Algunas de las muestras seleccionadas presentaban estudios moleculares previos. Se incluyeron muestras de tres regiones geográficas de Argentina.

De aquellos casos de SPH que sólo presentaron resultados por serología se seleccionaron, cuando fue posible, muestras de suero conservadas a -82 °C para la extracción de ARN viral, amplificación por RT-PCR anidada y posterior secuenciación de los fragmentos amplificados por el método de dideoxinucleótidos terminales.

Por otro lado, las muestras que también presentaron resultados positivos por RT-PCR anidada y se conocía su genotipo asociado, fueron incluidas directamente en el estudio.

Se registró para cada una de las muestras incluidas en el estudio el genotipo asociado, la fecha de toma de muestra completa cuando fuera posible y lugar de procedencia, consignando localidad, provincia.

- **Región Centro**

Se seleccionaron 56 muestras provenientes de casos de SPH para ser incluidas en este análisis. 37 casos de SPH pertenecían a la provincia de Buenos Aires de las localidades de 25 de Mayo, 9 de Julio, Arrecifes, Arroyo Dulce, Azul, Balcarce, Baradero, Bragado, Carmen de Areco, Chivilcoy, Coronel Vidal, General Rojo, Junín, Las Flores, Lobos, Longchamps, Luján, Mar del Plata, Mercedes, Miramar, Morse, Navarro, Necochea, Pergamino, Ramallo, Rauch, Rojas, San Pedro y Tandil. Se seleccionaron 4 muestras de la provincia de Entre Ríos (Gualeduay, Rosario del Tala, Nogoyá y Victoria) y 15 muestras de Santa Fe (Granadero Baigorria, Hersilia, Pavón, Rosario, Tortugas, Villa Constitución, Villa Gobernador Gálvez y Wheelwright).

- **Región Noroeste (NOA)**

Se incluyeron un total de 65 muestras pertenecientes al Noroeste de nuestro país, de las cuales 60 pertenecían a la provincia de Jujuy (Agua Salada, Caimancito, El Piquete, El Acheral, El Carmen, El Palmar, El Saladillo, El Talar, Fraile Pintado, La Mendieta, Ledesma, Libertador General San Martín, Los Manantiales, Palma Sola, Perico, San Antonio, San Pedro, San Salvador de Jujuy y Yuto). Una muestra pertenecía a la provincia de Salta (Orán) y 4 muestras pertenecían a la provincia de Tucumán de las localidades de Tafí Viejo, Burruyacú, Yerba Buena, Villa de Leales.

- **Región Noreste (NEA)**

Se incluyeron un total de 9 muestras pertenecientes al Noreste de nuestro país, de las cuales 4 pertenecían a la provincia de Chaco (San Bernardo, Roque Saenz Peña, Tres Isletas, Pampa del Infierno), 3 a la provincia de Formosa (Buena Vista, Formosa y Pirané) y 2 muestras pertenecían a la provincia de Misiones.

Muestras de roedores

Se seleccionaron para el estudio 41 muestras de roedores que presentaron anticuerpos IgG anti-hantavirus por la técnica de ELISA y resultados positivos por RT-PCR anidada, conociéndose su genotipo asociado. Se incluyeron muestras de roedores provenientes de tres regiones geográficas de Argentina.

Se registró para cada una de las muestras incluidas el genotipo asociado, fecha de toma de muestra completa cuando fuera posible y lugar de captura, consignando localidad y provincia.

- **Región Centro**

Se seleccionaron muestras de 12 roedores capturados en la provincia de Buenos Aires en las localidades de Campana, Castelli, Chillar, Crotto, Doudignac, La Plata, San Miguel del Monte (1 *Akodon azarae*, 6 *Oligoryzomys flavescens*, 4 *Oligoryzomys nigripes* y 1 *Oxymycterus rufus*).

Se seleccionaron 2 *Oligoryzomys flavescens* capturados en CABA.

- **Región Noroeste (NOA)**

Se seleccionaron muestras de 17 roedores capturados en Jujuy (San Antonio y Yuto) y 2 de la provincia de Salta (Salta y Orán) (2 *Oligoryzomys chacoensis*, 12 *Calomys fecundus*, 1 *Calomys ssp.*, 3 *Akodon simulator* y 1 *Euryzomys legatus*).

- **Región Noreste (NEA)**

Se seleccionaron muestras de 5 roedores capturados en Formosa (Buena Vista) y 3 en Misiones (Puerto Iguazú y Wanda) (5 *Oligoryzomys occidentalis*, 1 *Akodon sp.* y 2 *Oligoryzomys nigripes*).

TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Todos los procedimientos involucrados en la manipulación de muestras biológicas fueron realizados en gabinetes de seguridad biológica clase II en un laboratorio de bioseguridad de nivel 2. Los procedimientos de extracción del ARN viral, la reacción de RT-PCR anidada, visualización de los productos de amplificación y posterior secuenciación se llevaron a cabo en ambientes diferentes, separados físicamente con el objetivo de minimizar el riesgo de contaminaciones cruzadas.

Extracción de ARN total

El ARN total se extrajo a partir de muestras de suero de humanos con resultados positivos por serología (ELISA IgM) utilizando el kit comercial QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante y de manera automatizada en el equipo QIAcube (Qiagen). Este método permite la extracción de ARN a partir de muestras biológicas por el método de columnas de afinidad basados en membranas de sílica. El ARN extraído se conservó a -82 °C hasta su utilización.

RT-PCR anidada

La amplificación del material genético se realizó mediante una reacción conjunta de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), modalidad anidada (Nichol *et al.*, 1993; Levis *et al.*, 1998). Esta técnica tiene la ventaja de aumentar la sensibilidad de la detección. En un primer ciclo de amplificación (1º vuelta) se realizó la retro-transcripción del ARN viral a ADN complementario (ADNc) seguido de un primer ciclo de amplificación, ambos procesos en un único paso. El producto de amplificación de la 1º vuelta se utilizó como molde en el segundo ciclo de amplificación (2º vuelta) en donde los oligonucleótidos empleados en la 2º vuelta se unen a una región interna del producto de la 1º vuelta de amplificación.

Se utilizaron dos juegos de oligonucleótidos para la amplificación de fragmentos correspondientes a los segmentos genómicos S (N) y M (Gc) (Tabla 3). Las secuencias de estos oligonucleótidos se basaron en regiones conservadas de los segmentos genómicos S y M de hantavirus de Argentina previamente caracterizados. Se generaron fragmentos de 513 pb y 447 pb para los segmentos M y S, respectivamente (Levis *et al.*, 1998; Calderón *et al.*, 2018).

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la reacción de RT-PCR anidada y secuenciación parcial de fragmentos de los segmentos genómicos S (N) y M (Gc) de los hantavirus analizados

Segmento genómico	Vuelta de amplificación	Nombre	Secuencia	Tamaño
S (N)	1	143F	TGGACCC(G/T)GATGA(A/G)GTTAACAA	832 pb
		975R	(A/T)GG(G/T)GCACATGCAAIIACCCA	
	2	286F	ACAGGGCTTGAGCCTGATGA	447 pb
		733R	TC(A/T)AT(C/T)C(T/G)TTCCATCCA(A/G)TC	
M (Gc)	1	2609F	GGGCC(C/T)TTAGAGCAAGGIGG	739 pb
		3348R	CTGTCCAGATTTAGTGTCCAGC	
	2	2708F	ATGAG(C/T)TG(A/G)CCTGA(C/T)CA(A/G)ACTGG	513 pb
		3221R	TCAGAAGAGCAGTCAGTGTTCATG	

F: oligonucleótido directo (del inglés *forward*)

R: oligonucleótido reverso (del inglés *reverse*)

Como control positivo se utilizó un ARN viral previamente caracterizado cuyo genotipo era conocido. Como control negativo se usó agua de calidad biología molecular (libre de DNAsas y RNAsas). Para todos los procesos de amplificación se utilizaron termocicladores MyCycler™ (ThermalCycler, BioRad) y tubos de reacción de 0,2 ml de pared delgada estériles, libres de DNAsas y RNAsas.

En la Tabla 4 se especifican los reactivos y volúmenes empleados en la reacción de RT-PCR anidada.

Tabla 4. Reactivos y volúmenes empleados en la reacción de RT-PCR anidada

Reactivos	Volumen en mezcla de reacción (1x) en la 1ª vuelta	Volumen en mezcla de reacción (1x) en la 2ª vuelta
H ₂ O	21,06 µl	21,46 µl
Buffer (10X) (Invitrogen)	3 µl	3 µl
MgCl ₂ (50 mM) (Invitrogen)	1,1 µl	1,1 µl
dNTP (dATP, dCTP, dGTP y dTTP) (20 mM c/u) (Invitrogen)	4 x 0,3 µl	4 x 0,3 µl
Oligonucleótido F (100 ng/ul)	1 µl	1 µl
Oligonucleótido R (100 ng/ul)	1 µl	1 µl
Taq Platinum ADN polimerasa (5U/µl) (Invitrogen)	0,24 µl	0,24 µl
Super Script III RT polimerasa (200 U/µl) (Invitrogen) dilución 1/10	0,4 µl	-
ARN	1 µl	1 µl
Volumen total	30 µl	30 µl

Las condiciones de ciclado fueron las siguientes:

1º vuelta

50 °C - 1h + 94 °C - 2 min + 40 x (94 °C - 30 seg + 37 °C - 30 seg + 72 °C - 1 min) + 72 °C - 7 min + 15 °C - ∞.

2º vuelta

94 °C - 2 min + 40 x (94 °C - 30 seg + 37 °C - 30 seg + 72 °C - 1 min) + 72 °C - 7 min + 15 °C - ∞.

Visualización de los productos de amplificación

La visualización de los productos de amplificación obtenidos se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa. Para ello, se prepararon geles de agarosa al 2%, en buffer tris-acético-EDTA (TAE) (40 mM Tris, 20 mM ácido acético glacial, 1 mM EDTA), teñidos con SYBR Safe (Invitrogen). A cada muestra se agregó 1% colorante (solución preparada con 0,5% de azul de bromofenol y 0,5% de xileno-cianol en glicerol) y luego se sembraron 25 µl del producto de la 2º vuelta de amplificación en cada calle del gel. El marcador de peso molecular empleado fue un patrón de ADN de 100 pb comercial a una concentración de 100 ng/µl, que permite también la estimación de la masa en ng. La electroforesis se desarrolló en una solución de buffer TAE a 80 voltios durante 60 minutos, visualizándose los productos de amplificación bajo luz LED. Las bandas fueron cuantificadas por comparación con el marcador empleado y los fragmentos del tamaño esperado fueron cortados del gel, transferidos a tubos tipo eppendorf de 2 ml y conservados a -20 °C hasta su posterior purificación.

Purificación de ácidos nucleicos

Los productos de amplificación detectados en el gel de agarosa fueron purificados para su posterior secuenciación. Para la purificación se usó el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante y de manera automatizada. Este método permite la purificación de ácidos nucleicos por el método de columnas de afinidad basados en membranas de sílica. El ADN purificado se conservó a -20 °C hasta su utilización.

Secuenciación genómica

El ADN purificado previamente se colocó durante 1 hora aproximadamente en una centrifuga refrigerada conectada a una bomba de vacío que permite concentrar la muestra debido a que se logra la evaporación del buffer de elución para dejar el ADN libre del mismo. Teniendo en cuenta la masa estimada, el ADN se rehidrató con un volumen adecuado agua libre de DNAsas y RNAsas hasta lograr una concentración de ADN de 20 ng/µl.

Las dos hebras de los productos purificados fueron secuenciadas utilizando el kit BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems) y tubos de reacción de 0,2 ml de pared delgada estériles, libres de DNAsas y RNAsas. Se utilizaron los oligonucleótidos correspondientes

a las 2^o vueltas de amplificación correspondientes a cada segmento genómico, tal como se indica en la Tabla 5. Para cada reacción de secuenciación se utilizó un oligonucleótido. La cantidad de ADN molde utilizado en cada reacción de secuenciación fue de 80 ng. Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en termocicladores MyCycler™ (ThermalCycler, Bio Rad). En la Tabla 5 se especifican los reactivos y volúmenes utilizados en la reacción de secuenciación.

Tabla 5. Reactivos y volúmenes utilizados en la reacción de secuenciación.

Reactivo	Volumen por muestra
H ₂ O	2 µl
BigDyeTerminator	2 µl
Buffer 5 X	1 µl
Oligonucleótido (25 ng/ul)	1 µl
DNA molde (80 ng)	4 µl
Volumen total	10 µl

Las condiciones de amplificación fueron las siguientes:

96 °C 1 min + 25 x (96 °C - 10 min + 55 °C - 5 min + 60 °C - 4 min).

Purificación de los productos de PCR de secuencia

Luego de la reacción de secuenciación se realizó la purificación de los productos obtenidos empleando el kit BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems). Este método remueve los terminadores BigDye que no fueron incorporados durante la reacción de secuenciación. Se agregó a cada tubo conteniendo 10 µl de la reacción de secuenciación 45 µl de solución SAM y 10 µl de solución BigDye XTerminator. Debido a que esta última solución tiene una consistencia no homogénea y espesa, fue necesario agitar el frasco de reactivo la suspensión previo a su uso y cortar la punta para micropipeta con una tijera para el pipeteo de la misma. Luego los tubos fueron colocados en un vortex Genie 2 Digital (Scientific Industries) y mantenidos en agitación constante durante 30 minutos a 2900 rpm. Una vez finalizado este paso, los tubos fueron centrifugados 2 minutos a 13000 rpm. Finalmente se pipetearon 12 µl del sobrenadante, el cual contiene el producto purificado, a una placa de 96 pocillos (Applied Biosystems) y esta fue llevada directamente al equipo secuenciador automático ABI PRISM 3100Avant (Applied Biosystems).

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Análisis de los electroferogramas

Para el análisis de todas las secuencias obtenidas se utilizaron los programas Sequencing Analysis (v.5.1.1) (Applied Biosystems), con el cual se evaluó la calidad de las señales generadas y el ruido de la reacción de secuenciación; y BioEdit (v.7.2.5) (Hall, T.A. 1999). Con este último se visualizaron y editaron manualmente todas las secuencias de nucleótidos obtenidas y, a partir de

las dos reacciones de secuenciación (oligonucleótidos F y R) se generó una secuencia consenso para cada muestra.

Análisis de las secuencias para los segmentos genómicos S y M

Para la identificación del genotipo de hantavirus asociado, las secuencias nucleotídicas obtenidas se compararon con las secuencias depositadas en la base de datos no redundante del banco de genes del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) mediante la utilización de la aplicación BLASTn (*Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool*, disponible en <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Posteriormente, las secuencias de nucleótidos obtenidas a partir de las muestras de humanos y roedores fueron alineadas entre sí y con otros genotipos de hantavirus de América previamente publicados, obtenidas del GenBank (disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Se incluyeron secuencias provenientes de roedores de las subfamilias Sigmodontinae y Neotominae. Los alineamientos de las secuencias de nucleótidos para los segmentos genómicos S y M fueron realizados con el programa BioEdit (v.7.2.5) utilizando el método de ClustalW y luego sometidos a edición manual.

Filogenia para los segmentos genómicos S y M

La evaluación del contenido filogenético de los alineamientos generados para los segmentos S y M se realizó con el programa TREE-PUZZLE (v.5.3.rc16), mediante la construcción de mapas de máxima verosimilitud (Strimmer *et al.*, 1997; Schmith *et al.*, 2002).

Los modelos de sustitución nucleotídica que mejor se adaptan a cada uno de los alineamientos se determinaron mediante el programa JModelTest (v.2.1.4), siguiendo el Criterio de Información de Akaike (Darriba *et al.*, 2012).

Se realizó una evaluación de la filogenia para los segmentos genómicos S y M mediante máxima verosimilitud (ML, del inglés *Maximum Likelihood*) con la herramienta W-IQ-TREE (disponible en <http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>), empleando los modelos evolutivos calculados previamente en JModelTest (v.2.1.4) y los alineamientos generados con las secuencias de roedores y humanos. Como grupo externo se incluyeron secuencias de hantavirus del Viejo Mundo. El soporte estadístico de los clados fue calculado mediante un análisis de bootstrap ultra rápido con la realización de 2000 pseudoréplicas (Trifinopoulos *et al.*, 2016; Minh *et al.*, 2013). Los árboles fueron visualizados y editados para su impresión con el programa FigTree (v.1.4) (disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). Se analizó la topología general de los árboles obtenidos, la presencia de grupo monofiléticos y la localización de los diferentes genotipos virales en los árboles.

Análisis filodinámico para los segmentos genómicos S y M

Se realizó una evaluación de la de la señal temporal en los árboles de ML mediante el programa TempEst (v.1.5.1), a través del cual se obtienen gráficos de regresión lineal en donde se

relacionan las fechas de datación de las muestras con las distancias genéticas desde la raíz a la punta de los árboles de ML. Se puede determinar de esta manera si los juegos de datos analizados son adecuados para los análisis filodinámicos empleado reloj molecular (Rambaut *et al.*, 2016).

Para la estimación de las tasas de sustitución nucleotídica (sustituciones/sitio/año) y los tiempos del ancestro común más cercano (tMRCA, del inglés *time to Most Recent Common Ancestor*) se utilizó el enfoque bayesiano mediante las cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC, del inglés *Markov chain Monte Carlo*) utilizando el paquete BEAST (*Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees*) (v.1.8.3) (Drummond & Rambaut, 2007).

El programa BEAUti (v.1.8.3) fue utilizado para la creación de los archivos con formato .xml para cada uno de los alineamientos generados. Se evaluaron dos relojes moleculares, estricto y relajado lognormal no correlacionado para modelar la velocidad de evolución de las ramas, bajo el modelo de coalescencia Bayesian Skyline, según lo publicado en la literatura (Ramsden *et al.*, 2008; Ramsden *et al.*, 2009; Souza *et al.* 2013; Guo *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2020). Se utilizó una combinación de diferentes criterios tomados de la literatura para la calibración del reloj molecular (Sironen *et al.*, 2001; Ramsden *et al.*, 2008; Ramsden *et al.*, 2009; Bennett *et al.*, 2014; Castel *et al.*, 2017).

Los archivos .xml generados fueron analizados por el programa BEAST (v.1.8.3). Para cada reloj molecular evaluado, se analizaron los parámetros estadísticos de cada corrida en el programa Tracer (v.1.6) (Rambaut *et al.*, 2018) Se eliminó el 10% inicial de las muestras para cada corrida (*burn-in*). La selección del reloj molecular que mejor describía los alineamientos analizados se realizó mediante inspección de los valores de logaritmo de probabilidad marginal obtenidos y mediante el cálculo del Factor de Bayes (FB). Mediante el programa TreeAnnotator (v.1.8.3) se obtuvo como resultado el árbol de mayor credibilidad (MCCT del inglés *Maximum Clade Credibility Tree*). Los árboles se visualizaron y editaron con el programa FigTree (v.1.4).

RESULTADOS

TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Inicialmente fueron seleccionadas 130 muestras de origen humano provenientes de casos confirmados de SPH por diagnóstico serológico para hantavirus (ELISA IgM positivo). De ellas, un total de 45 muestras de suero de pacientes fueron seleccionadas para ser procesadas por técnicas de biología molecular, identificadas en negrita en la tabla 6. La selección de estas muestras se realizó teniendo en cuenta aquellos años, localidades de las regiones en estudio y genotipos virales para los cuales había escasa o no existía información molecular disponible. Las 85 muestras restantes tenían información del genotipo asociado, previamente identificado en INEVH.

Región Centro: se seleccionaron 19 muestras de la provincia de Buenos Aires (Rojas, Mar del Plata, San Pedro, Tandil, Pergamino, Miramar, 9 de Julio, 25 de Mayo, Las Flores, Baradero, Chivilcoy, Necochea, Luján, Arroyo Dulce y Carmen de Areco), 4 de Entre Ríos (Gualeguay, Rosario del Tala, Nogoyá y Victoria) y 10 de la provincia de Santa Fe (Rosario, Wheelwright, Villa Constitución, Villa Gobernador Gálvez y Granadero Baigorria).

Región NOA: se seleccionaron 11 muestras de la provincia de Jujuy (San Pedro, San Salvador de Jujuy, Fraile Pintado, La Mendieta, Libertador General San Martín, El Piquete y El Talar) y 1 muestras de Salta (Orán).

Se realizó la extracción de ARN total de 19 muestras de suero. Además se incluyeron en el estudio 26 ARN que habían sido previamente extraídos y se encontraban almacenados a -82 °C.

Para el segmento M se realizaron 45 RT-PCR anidadas obteniéndose 31 resultados positivos, de las cuales fueron secuenciadas exitosamente 30 de ellas.

Para el segmento S se realizaron 30 RT-PCR anidadas obteniéndose solamente 11 resultados positivos, de las cuales solo pudieron ser secuenciadas 5 de ellas debido a una falla técnica en el equipo secuenciador.

En la figura 7 se observa uno de los geles de agarosa obtenidos. Las bandas fueron comparadas con el marcador de peso molecular y de masa para confirmar que tenían el tamaño esperado y estimar su masa, fueron cortadas del gel y se conservaron a -20 °C hasta su utilización. Luego de la reacción de secuenciación y purificación de los productos obtenidos, se cargaron las muestras directamente en el secuenciador Avant 3100 disponible en el INEVH (Figura 8) para la realización de la reacción de secuenciación basada en el método de Sanger.

En total, entre las muestras que presentaban información previa del genotipo asociado y las que fueron seleccionadas para su procesamiento por técnicas de biología molecular se recuperaron 77 secuencias de origen humano y 33 secuencias provenientes de muestras de roedores para el segmento genómico S y; 113 secuencias de origen humano y 36 secuencias asociadas a roedores para el segmento genómico M (Tablas 6 y 7).

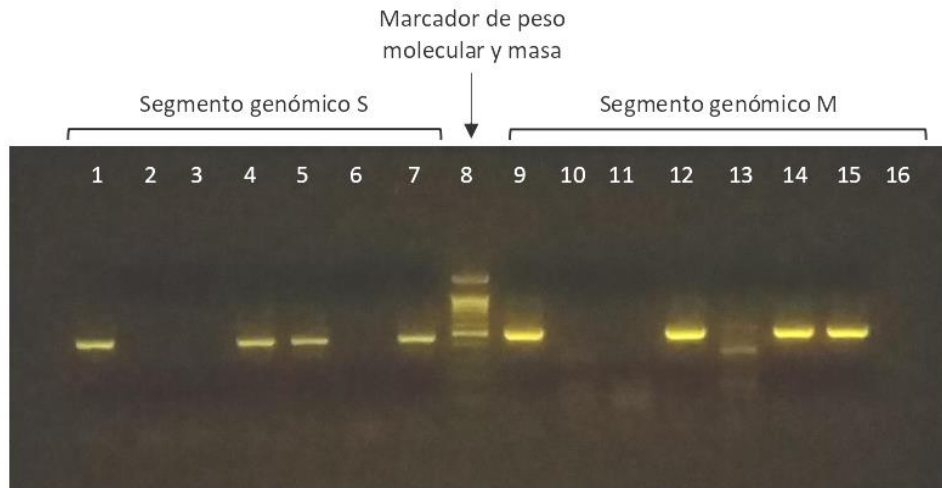


Figura 7. Gel de agarosa teñido con SybrSafe. Calles 1 y 9: 99173, calles 2 y 10: 96788, calles 3 y 11: 97102, calles 4 y 12: 98983, calles 5 y 13: 99306, calles 6 y 14: 99310, calle 7 y 15: control positivo, calle 16: control negativo, calle 8: marcador de peso molecular y de masa.



Figura 8. Secuenciador ABI PRISM 3100 Avant (Applied Biosystems) utilizado para la secuenciación.

ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO

Análisis de las secuencias

Para determinar los genotipos de hantavirus asociados a las muestras analizadas, se realizó un BLASTn para cada una de las secuencias obtenidas contra la base de datos no redundante del GenBank. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 6 y 7.

Las siguientes muestras presentaron las siguientes particularidades:

- La muestra con N° INEVH 68433 tiene registrada la ciudad de Mar del Plata como localidad de residencia pero el genotipo viral asociado a esta muestra fue Orán, genotipo presente en NOA. No existían datos registrados en la ficha epidemiológica asociada a la muestra relacionados con antecedentes de viajes al noroeste de Argentina, por lo tanto el sitio de exposición a la infección no pudo ser identificado.
- La muestra con N° INEVH 52686 tiene registrado Hersilia, provincia de Santa Fe como localidad de procedencia y el genotipo viral asociado fue HU39694. Existían antecedentes de viaje a la provincia de Tucumán durante el período de incubación de la enfermedad.
- La única muestra de Córdoba incluida en este análisis (N° INEVH 64814) tiene registrado Río III como localidad de procedencia y el genotipo viral asociado fue Laguna Negra. Existía evidencia de antecedente de viaje a Las Lomitas, provincia de Formosa durante el período de incubación de la enfermedad.
- La muestra con N° INEVH 87006 tiene registrado Tafí Viejo como localidad de procedencia y el genotipo viral asociado fue Orán. Existía registro de antecedentes de viaje a las provincias de Salta, Jujuy y a Bolivia durante el período de incubación de la enfermedad.

Una vez identificados los genotipos virales, se utilizó el método ClustalW contenido en el programa BioEdit para la generación de los alineamientos. En cada uno de ellos, además de las secuencias derivadas de muestras humanas y de roedores, se incluyeron secuencias de diferentes genotipos de hantavirus circulantes en América (se incluyeron secuencias derivadas de roedores de las subfamilias Sigmodontinae y Neotominae). En la tabla 8 se encuentran detallados los números de acceso de GenBank, el genotipo viral asociado, procedencia, año y origen de las secuencias empleadas para los análisis de los segmentos genómicos S y M.

Se realizó un alineamiento preliminar incluyendo todas las secuencias obtenidas tanto para el segmento genómico S como M para obtener una aproximación de la cantidad de pares de bases a incluir en los análisis posteriores. Se determinó que incluyendo todas las secuencias los fragmentos obtenidos luego del alineamiento eran de muy pequeño tamaño por lo tanto se decidió excluir aquellas secuencias más cortas. Finalmente los análisis para los segmentos S (428 nt) y M (373 nt) incluyeron en total 158 y 154 secuencias, respectivamente. Las secuencias fueron parametrizadas consignando n° de registro, genotipo, localidad y provincia de procedencia y fecha completa cuando fuera posible, en el caso de las muestras de origen humano. Para las muestras de roedores, las secuencias se parametrizaron consignando especie y n° de registro, genotipo, localidad y provincia de captura y fecha completa cuando fuera posible.

Tabla 6. Muestras asociadas a casos de SPH con resultados positivos por serología (ELISA IgM) y por técnicas moleculares

REGIÓN	Nº REGISTRO INEVH	LOCALIDAD DE RESIDENCIA	PROVINCIA	FECHA TOMA DE MUESTRA	GENOTIPO VIRAL	SEGMENTO ANALIZADO
CENTRO	80447	Miramar	Buenos Aires	05/05/2010	HU39694	M
CENTRO	81442	Mar del Plata	Buenos Aires	s/f 25/11/2010	HU39694	M
CENTRO	81582	9 de Julio	Buenos Aires	30/12/2011	HU39694	S / M
CENTRO	83094	Morse	Buenos Aires	14/02/2012	HU39694	S / M
CENTRO	84275	25 de Mayo	Buenos Aires	25/10/2012	HU39694	M
CENTRO	85715	Las Flores	Buenos Aires	21/03/2013	HU39694	M
CENTRO	87495	Azul	Buenos Aires	s/f 25/04/2014	HU39694	M
CENTRO	88257	Necochea	Buenos Aires	s/f 07/11/2014	HU39694	S
CENTRO	88742	Luján	Buenos Aires	s/f 11/03/2015	HU39694	S
CENTRO	90217	Rauch	Buenos Aires	s/f 08/10/2015	HU39694	S / M
CENTRO	94335	Junín	Buenos Aires	26/04/2016	HU39694	S / M
CENTRO	94432	Azul	Buenos Aires	06/05/2016	HU39694	S / M
CENTRO	95614	25 de Mayo	Buenos Aires	27/10/2016	HU39694	S / M
CENTRO	95729	Navarro	Buenos Aires	16/11/2016	HU39694	S / M
CENTRO	96533	Longchamps	Buenos Aires	01/02/2017	HU39694	M
CENTRO	97273	Balcarce	Buenos Aires	s/f 27/04/2017	HU39694	M
CENTRO	97364	Coronel Vidal	Buenos Aires	s/f 05/05/2017	HU39694	S / M
CENTRO	97534	Bragado	Buenos Aires	05/06/2017	HU39694	S / M
CENTRO	98953	Lobos	Buenos Aires	29/09/2017	HU39694	M
CENTRO	52686*	Hersilia	Santa Fe	29/11/2000	HU39694	S / M
CENTRO	64814**	Río III	Córdoba	17/08/2005	LAGUNA NEGRA	S / M
CENTRO	65182	San Pedro	Buenos Aires	19/06/2005	LECHIGUANAS	M
CENTRO	66945	Rojas	Buenos Aires	18/11/2005	LECHIGUANAS	M
CENTRO	68520	San Pedro	Buenos Aires	10/11/2006	LECHIGUANAS	M
CENTRO	76445	Pergamino	Buenos Aires	05/05/2009	LECHIGUANAS	M
CENTRO	86241	Pergamino	Buenos Aires	16/05/2013	LECHIGUANAS	M
CENTRO	86728	Arrecifes	Buenos Aires	02/09/2013	LECHIGUANAS	M
CENTRO	88113	Chivilcoy	Buenos Aires	21/09/2014	LECHIGUANAS	M
CENTRO	88401	Pergamino	Buenos Aires	08/01/2015	LECHIGUANAS	M
CENTRO	89287	Arroyo Dulce	Buenos Aires	07/05/2015	LECHIGUANAS	M
CENTRO	96143	Mercedes	Buenos Aires	s/f 06/01/2017	LECHIGUANAS	S / M
CENTRO	97165	Ramallo	Buenos Aires	13/04/2017	LECHIGUANAS	S / M
CENTRO	97266	Carmen de Areco	Buenos Aires	24/04/2017	LECHIGUANAS	S / M
CENTRO	98802	General Rojo	Buenos Aires	21/09/2017	LECHIGUANAS	M
CENTRO	98983	San Pedro	Buenos Aires	11/10/2017	LECHIGUANAS	S / M
CENTRO	99236	Carmen de Areco	Buenos Aires	10/11/2017	LECHIGUANAS	S / M
CENTRO	99306	Tandil	Buenos Aires	11/11/2017	LECHIGUANAS	S
CENTRO	99310	Baradero	Buenos Aires	18/11/2017	LECHIGUANAS	S / M
CENTRO	68400	Guaaleguay	Entre Ríos	24/10/2006	LECHIGUANAS	M
CENTRO	81416	Rosario del Tala	Entre Ríos	10/11/2010	LECHIGUANAS	M
CENTRO	81658	Nogoyá	Entre Ríos	02/02/2011	LECHIGUANAS	M
CENTRO	89310	Victoria	Entre Ríos	07/05/2015	LECHIGUANAS	M
CENTRO	70866	Rosario	Santa Fe	04/12/2007	LECHIGUANAS	M
CENTRO	71909	Rosario	Santa Fe	18/09/2008	LECHIGUANAS	M
CENTRO	72055	Wheelwright	Santa Fe	12/12/2008	LECHIGUANAS	M
CENTRO	78044	Villa Constitución	Santa Fe	16/09/2009	LECHIGUANAS	M
CENTRO	80706	Villa Gobernador Gálvez	Santa Fe	27/06/2010	LECHIGUANAS	M
CENTRO	82130	Granadero Baigorria	Santa Fe	26/04/2011	LECHIGUANAS	M

CENTRO	82199	Villa Constitución	Santa Fe	28/04/2011	LECHIGUANAS	M
CENTRO	82940	Tortugas	Santa Fe	26/12/2011	LECHIGUANAS	M
CENTRO	83932	Rosario	Santa Fe	13/09/2012	LECHIGUANAS	S / M
CENTRO	84448	Villa Constitución	Santa Fe	26/11/2012	LECHIGUANAS	M
CENTRO	85491	Rosario	Santa Fe	11/03/2013	LECHIGUANAS	M
CENTRO	95431	Pavón	Santa Fe	27/09/2016	LECHIGUANAS	M
CENTRO	97449	Rosario	Santa Fe	28/04/2017	LECHIGUANAS	M
CENTRO	99173	Sin información	Santa Fe	s/f 06/11/2017	LECHIGUANAS	S
CENTRO	68433***	Mar del Plata	Buenos Aires	23/10/2006	ORAN	M
NEA	83273	San Bernardo	Chaco	25/03/2012	BERMEJO	S / M
NEA	83776	Tres Isletas	Chaco	15/07/2012	BERMEJO	M
NEA	79649	Buena Vista	Formosa	12/02/2010	BERMEJO	S / M
NEA	81963	Formosa	Formosa	31/03/2011	BERMEJO	M
NEA	97956	Pirané	Formosa	09/07/2017	BERMEJO	S
NEA	63189	Wanda	Misiones	20/10/2004	JUQUITIBA	S / M
NEA	100105	Sin información	Misiones	27/02/2018	JUQUITIBA	S / M
NEA	83518	Roque Saenz Peña	Chaco	04/05/2012	LAGUNA NEGRA	S
NEA	89672	Pampa del Infierno	Chaco	03/07/2015	LAGUNA NEGRA	S / M
NOA	68550	Yuto	Jujuy	s/f 22/11/2006	BERMEJO	M
NOA	77225	San Salvador de Jujuy	Jujuy	s/f 02/06/2009	BERMEJO	S
NOA	91578	Burruyacú	Tucumán	09/02/2016	HU39694	S / M
NOA	93569	Yerba Buena	Tucumán	29/03/2016	HU39694	S / M
NOA	97641	Villa de Leales	Tucumán	01/06/2017	HU39694	S / M
NOA	68172	El Carmen	Jujuy	s/f 11/07/2006	LAGUNA NEGRA	M
NOA	68344	San Salvador de Jujuy	Jujuy	27/09/2006	LAGUNA NEGRA	S / M
NOA	68351	San Salvador de Jujuy	Jujuy	s/f 10/10/2006	LAGUNA NEGRA	S / M
NOA	70649	San Pedro	Jujuy	s/f 20/07/2007	LAGUNA NEGRA	S / M
NOA	71617	San Pedro	Jujuy	s/f 15/05/2008	LAGUNA NEGRA	S / M
NOA	97875	Libertador General San Martín	Jujuy	06/06/2017	LAGUNA NEGRA	S / M
NOA	63584	Palmasola	Jujuy	01/02/2005	ORAN	S / M
NOA	63794	La Mendieta	Jujuy	24/02/2005	ORAN	S / M
NOA	63942	Yuto	Jujuy	23/03/2005	ORAN	S
NOA	64306	San Pedro	Jujuy	s/f 13/05/2005	ORAN	M
NOA	64357	El Palmar	Jujuy	27/05/2005	ORAN	S / M
NOA	64374	El Piquete	Jujuy	s/f 08/06/2005	ORAN	S / M
NOA	65014	Palmasola	Jujuy	s/f 13/09/2005	ORAN	S
NOA	67055	El Carmen	Jujuy	09/12/2005	ORAN	S / M
NOA	67333	Ledesma	Jujuy	s/f 26/01/2006	ORAN	S / M
NOA	67510	San Antonio	Jujuy	16/02/2006	ORAN	S / M
NOA	67815	Palma Sola	Jujuy	21/04/2006	ORAN	S / M
NOA	67980	Agua Salada	Jujuy	05/05/2006	ORAN	S
NOA	68034	Fraile Pintado	Jujuy	20/05/2006	ORAN	S / M
NOA	68076	Yuto	Jujuy	29/05/2006	ORAN	S
NOA	68127	Yuto	Jujuy	13/06/2006	ORAN	S
NOA	68131	Fraile Pintado	Jujuy	08/06/2006	ORAN	S / M
NOA	68174	Palma Sola	Jujuy	s/f 11/07/2006	ORAN	S / M
NOA	68304	Yuto	Jujuy	s/f 14/09/2006	ORAN	S / M
NOA	68373	El Saladillo	Jujuy	21/10/2006	ORAN	S
NOA	68407	Caimancito	Jujuy	18/10/2006	ORAN	S / M
NOA	68448	Caimancito	Jujuy	s/f 07/11/2006	ORAN	M
NOA	68946	Yuto	Jujuy	14/02/2007	ORAN	M
NOA	69680	Fraile Pintado	Jujuy	23/03/2007	ORAN	M

NOA	70929	San Pedro	Jujuy	s/f 17/01/2008	ORAN	S / M
NOA	71861	San Salvador de Jujuy	Jujuy	26/08/2008	ORAN	M
NOA	78881	Libertador General San Martín	Jujuy	28/01/2010	ORAN	S / M
NOA	79433	Palma Sola	Jujuy	02/02/2010	ORAN	M
NOA	80016	San Salvador de Jujuy	Jujuy	07/04/2010	ORAN	M
NOA	80250	San Pedro	Jujuy	19/04/2010	ORAN	S
NOA	80252	Perico	Jujuy	25/04/2010	ORAN	S
NOA	80704	Libertador General San Martín	Jujuy	14/06/2010	ORAN	S
NOA	81545	Los Manantiales	Jujuy	13/12/2010	ORAN	S / M
NOA	81547	Libertador General San Martín	Jujuy	20/12/2010	ORAN	S / M
NOA	84460	La Mendieta	Jujuy	20/11/2012	ORAN	M
NOA	84469	La Mendieta	Jujuy	s/f 04/12/2012	ORAN	M
NOA	84487	San Pedro	Jujuy	03/12/2012	ORAN	M
NOA	86320	Libertador General San Martín	Jujuy	25/05/2013	ORAN	M
NOA	86865	Libertador General San Martín	Jujuy	23/10/2013	ORAN	M
NOA	88768	El Piquete	Jujuy	11/03/2015	ORAN	S / M
NOA	89036	El Talar	Jujuy	06/04/2015	ORAN	S / M
NOA	89074	El Piquete	Jujuy	10/04/2015	ORAN	M
NOA	94565	San Pedro	Jujuy	s/f 18/05/2016	ORAN	S / M
NOA	94568	Fraile Pintado	Jujuy	02/05/2016	ORAN	S / M
NOA	97870	San Pedro	Jujuy	05/01/2017	ORAN	S / M
NOA	97871	San Pedro	Jujuy	19/01/2017	ORAN	S / M
NOA	97872	Sin información	Jujuy	21/03/2017	ORAN	S / M
NOA	97873	El Talar	Jujuy	29/03/2017	ORAN	S / M
NOA	97874	Fraile Pintado	Jujuy	04/05/2017	ORAN	S / M
NOA	99737	El Acheral	Jujuy	20/09/2017	ORAN	S / M
NOA	99738	Libertador General San Martín	Jujuy	09/11/2017	ORAN	S / M
NOA	99739	Yuto	Jujuy	18/12/2017	ORAN	S
NOA	71499	Orán	Salta	25/04/2008	ORAN	M
NOA	87006****	Tafí Viejo	Tucumán	02/01/2014	ORAN	M

En negrita se encuentran identificadas las muestras que fueron procesadas por técnicas moleculares.

s/f: sin fecha de toma de muestra, la fecha registrada corresponde a la fecha de ingreso al INEVH.

52686 *: Presentó antecedentes de viaje a la provincia de Tucumán durante el período de incubación de la enfermedad.

64814 **: Presentó antecedente de viaje a Las Lomitas, provincia de Formosa durante el período de incubación de la enfermedad.

68433 ***: Sin datos relacionados con antecedentes de viajes al NOA en la ficha epidemiológica asociada a la muestra.

87006 ****: Presentó antecedentes de viaje a las provincias de Salta, Jujuy y a Bolivia durante el período de incubación de la enfermedad.

Tabla 7. Muestras de roedores con resultados positivos por serología (ELISA IgG) y por técnicas moleculares

REGIÓN	Nº REGISTRO INEVH	ESPECIE	LOCALIDAD DE CAPTURA	PROVINCIA	FECHA TOMA DE MUESTRA	GENOTIPO VIRAL	SEGMENTO ANALIZADO
CENTRO	1536	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	La Plata	Buenos Aires	08/08/2002	HU39694	M
CENTRO	208	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	San Miguel del Monte	Buenos Aires	22/01/1999	HU39694	S / M
CENTRO	23966	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	Crotto	Buenos Aires	15/05/2007	HU39694	S / M
CENTRO	24667	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	Castelli	Buenos Aires	13/08/1997	HU39694	S / M
CENTRO	266	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	La Plata	Buenos Aires	19/02/1999	HU39694	S / M
CENTRO	278	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	Doudignac	Buenos Aires	04/03/1999	HU39694	S / M
CENTRO	500	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	CABA	Buenos Aires	11/04/2015	LECHIGUANAS	S / M
CENTRO	547	<i>Oligoryzomys flavescens</i>	CABA	Buenos Aires	16/06/2017	LECHIGUANAS	S / M
CENTRO	371	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Campana	Buenos Aires	20/11/2011	LECHIGUANAS	M
CENTRO	454	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Campana	Buenos Aires	25/02/2012	LECHIGUANAS	S / M
CENTRO	60	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Campana	Buenos Aires	05/12/2012	LECHIGUANAS	S / M
CENTRO	697	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Campana	Buenos Aires	18/06/2012	LECHIGUANAS	S / M
CENTRO	36425	<i>Akodon azarae</i>	Chillar	Buenos Aires	04/05/2011	PERGAMINO	S
CENTRO	36367	<i>Oxymycterus rufus</i>	Chillar	Buenos Aires	03/05/2011	PERGAMINO	S
NEA	36140	<i>Oligoryzomys occidentalis</i>	Buena Vista	Formosa	31/05/2010	BERMEJO	S / M
NEA	36145	<i>Oligoryzomys occidentalis</i>	Buena Vista	Formosa	31/05/2010	BERMEJO	S / M
NEA	36152	<i>Oligoryzomys occidentalis</i>	Buena Vista	Formosa	02/06/2010	BERMEJO	M
NEA	36162	<i>Oligoryzomys occidentalis</i>	Buena Vista	Formosa	03/06/2010	BERMEJO	M
NEA	36163	<i>Oligoryzomys occidentalis</i>	Buena Vista	Formosa	03/06/2010	BERMEJO	S
NEA	34925	<i>Akodon sp.</i>	Puerto Iguazú	Misiones	14/12/2004	JABORÁ-like	S
NEA	34913	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Wanda	Misiones	11/12/2004	JUQUITIBA	S / M
NEA	34917	<i>Oligoryzomys nigripes</i>	Wanda	Misiones	11/12/2004	JUQUITIBA	M
NOA	35515	<i>Akodon simulator</i>	San Antonio	Jujuy	02/11/2006	LAGUNA NEGRA	S / M
NOA	35540	<i>Akodon simulator</i>	San Antonio	Jujuy	03/11/2006	LAGUNA NEGRA	S / M
NOA	35603	<i>Akodon simulator</i>	San Antonio	Jujuy	05/11/2006	LAGUNA NEGRA	M
NOA	35543	<i>Calomys fecundus</i>	San Antonio	Jujuy	03/11/2006	LAGUNA NEGRA	S / M
NOA	35544	<i>Calomys fecundus</i>	San Antonio	Jujuy	03/11/2006	LAGUNA NEGRA	S / M
NOA	35585	<i>Calomys fecundus</i>	San Antonio	Jujuy	04/11/2006	LAGUNA NEGRA	S / M
NOA	35590	<i>Calomys fecundus</i>	San Antonio	Jujuy	04/11/2006	LAGUNA NEGRA	S / M
NOA	35599	<i>Calomys fecundus</i>	San Antonio	Jujuy	04/11/2006	LAGUNA NEGRA	S / M
NOA	35602	<i>Calomys fecundus</i>	San Antonio	Jujuy	05/11/2006	LAGUNA NEGRA	S / M
NOA	36539	<i>Calomys fecundus</i>	Yuto	Jujuy	17/05/2017	LAGUNA NEGRA	S / M
NOA	36553	<i>Calomys fecundus</i>	Yuto	Jujuy	17/05/2017	LAGUNA NEGRA	S / M
NOA	36556	<i>Calomys fecundus</i>	Yuto	Jujuy	17/05/2017	LAGUNA NEGRA	S / M
NOA	36557	<i>Calomys fecundus</i>	Yuto	Jujuy	17/05/2017	LAGUNA NEGRA	S / M
NOA	36578	<i>Calomys fecundus</i>	Yuto	Jujuy	17/05/2017	LAGUNA NEGRA	S / M
NOA	36638	<i>Calomys fecundus</i>	Yuto	Jujuy	18/05/2011	LAGUNA NEGRA	S / M
NOA	35537	<i>Calomys sp.</i>	San Antonio	Jujuy	03/11/2006	LAGUNA NEGRA	S
NOA	36546	<i>Euryoryzomys legatus</i>	Yuto	Jujuy	17/05/2017	LAGUNA NEGRA	S / M
NOA	22552	<i>Olygoryzomys chacoensis</i>	Orán	Salta	23/07/1995	ORAN	M
NOA	817	<i>Olygoryzomys chacoensis</i>	Salta	Salta	s/f 04/2005	ORAN	M

Tabla 8. Secuencias de hantavirus de América incluidos en los análisis para los segmentos genómicos S y M obtenidas en GenBank

Nº DE ACCESO SEGMENTO S	Nº DE ACCESO SEGMENTO M	GENOTIPO VIRAL	PROCEDENCIA	PROVINCIA/ ESTADO	PAIS	AÑO	ORIGEN
DQ451829		ANAJATUBA	Anajatuba	Maranhao	Brasil	2000	<i>Oligoryzomys fornesi</i>
JX443690		ANAJATUBA	Maranhao	Maranhao	Brasil	2009	humano
AF004660	AF324901	ANDES	El Bolsón	Río Negro	Argentina	1995	humano
AY228237	AY228238	ANDES	Los Angeles	Bio Bio	Chile	1999	humano
AF307325	AF307327	ARARAQUARA	Araraquara	Sao Paulo	Brasil	1996	humano
KP202360		ARARAQUARA	Sin información	Goias	Brasil	2006	<i>Necromys lasiurus</i>
	AY970821	ARARAQUARA	Franca	Sao Paulo	Brasil	2001	<i>Necromys lasiurus</i>
AY740624		ARAUCARIA	General Carneiro	Paraná	Brasil	2002	humano
AY740623		ARAUCARIA	Guarapuava	Paraná	Brasil	2001	humano
AY740630		ARAUCARIA	Guarapuava	Paraná	Brasil	2003	humano
HQ337905		ARAUCARIA	Itambaraca	Paraná	Brasil	2008	<i>Oligoryzomys nigripes</i>
HQ337906		ARAUCARIA	Jaguariaíva	Paraná	Brasil	2009	<i>Oligoryzomys nigripes</i>
AY740632		ARAUCARIA	Pato Branco	Paraná	Brasil	2004	humano
AY740622		ARAUCARIA	Pinhao	Paraná	Brasil	2001	humano
AY740628		ARAUCARIA	Pinhao	Paraná	Brasil	2003	humano
AY740627		ARAUCARIA	Porto Victoria	Paraná	Brasil	2002	humano
AY740629		ARAUCARIA	Sao Mateus do Sul	Paraná	Brasil	2003	humano
L36929	GQ244521	BAYOU	Sin información	Sin información	Estados Unidos	1996	humano
GQ200820		BAYOU	Sin información	Sin información	Estados Unidos	1996	<i>Oryzomys palustris</i>
AF482713	AF028025	BERMEJO	Orán	Salta	Argentina	1995	<i>Oligoryzomys occidentalis</i>
	JX891630	BERMEJO	Fraile Pintado	Jujuy	Argentina	2000	humano
DQ285566	DQ284451	CAÑO DELGADITO	Caño Delgadito	Portuguesa	Venezuela	2001	<i>Sigmodon alstoni</i>
AB620103	AB620104	CARRIZAL	Sin información	Sin información	México	12/05/2006	<i>Reithrodontomys sumichrasti</i>
	AF307326	CASTELO DOS SONHOS	Castelo dos Sonhos	Para	Brasil	1995	humano
JX443693	JX443699	CASTELO DOS SONHOS	Sin información	Novo Progresso	Brasil	2008	humano
	KF581135	CASTELO DOS SONHOS	Puerto Maldonado	Madre de Dios	Peru	2010	<i>Neacomys spinosus</i>
JX443691		CASTELO DOS SONHOS 2	Campo Novos dos Peréis	Mato Grosso	Brasil	2006	<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>
	JX443702	CASTELO DOS SONHOS 2	Sin Información	Alto Paraíso	Brasil	2005	<i>Oligoryzomys utiaritensis</i>
DQ256126	DQ177347	CATACAMAS	Sin información	Sin información	Honduras	2001	<i>Oryzomys couesi</i>
DQ285046	KT983772	CHOCLO	Las Tablas	Los Santos	Panamá	2000	<i>Oligoryzomys fulvescens</i>
KM597161		CHOCLO	Las Tablas	Los Santos	Panamá	2014	humano
AF482711	AF028023	HU39694	Pergamino	Buenos Aires	Argentina	21/01/1994	humano
JN232080		JABORÁ	Jaborá	Santa Catarina	Brasil	2005	<i>Akodon paranaensis</i>
JN232079		JABORÁ	Jaborá	Santa Catarina	Brasil	2006	<i>Akodon paranaensis</i>
MG575411		JABORÁ	Reserva Mbaracayu	Canindeyu	Paraguay	2014	<i>Akodon montensis</i>
GU205325		JABORÁ	Reserva Mbaracayu	Canindeyu	Paraguay	2006	<i>Akodon montensis</i>
GU205332		JABORÁ	Reserva Mbaracayu	Canindeyu	Paraguay	2007	<i>Akodon montensis</i>
GU205335		JABORÁ	Reserva Mbaracayu	Canindeyu	Paraguay	2003	<i>Akodon montensis</i>

EU373729		JUQUITIBA	Leandro N Alem	Misiones	Argentina	2003	humano
EU373731		JUQUITIBA	Sin información	Misiones	Argentina	2005	<i>Oligoryzomys nigripes</i>
KC422344		JUQUITIBA	Santa Teresa	Espirito Santo	Brasil	2005	<i>Oligoryzomys nigripes</i>
KC422347		JUQUITIBA	Teresopolis	Rio de Janeiro	Brasil	2004	<i>Oligoryzomys nigripes</i>
KC422348		JUQUITIBA	Teresopolis	Rio de Janeiro	Brasil	2008	<i>Oligoryzomys nigripes</i>
GU213197		JUQUITIBA	Reserva Mbaracayu	Canindeyu	Paraguay	2003	<i>Oligoryzomys nigripes</i>
GU213195		JUQUITIBA	Reserva Mbaracayu	Canindeyu	Paraguay	2006	<i>Oligoryzomys sp.</i>
	AY963900	JUQUITIBA-like	General Carneiro	Parana	Brasil	2004	<i>Oligoryzomys nigripes</i>
	JX891631	LAGUNA NEGRA	Yuto	Jujuy	Argentina	2000	<i>Calomys fecundus</i>
KP202359		LAGUNA NEGRA	Sin información	Mato Grosso	Brasil	2010	<i>Calomys callidus</i>
FJ816031		LAGUNA NEGRA	Campo Novo dos Percis	Mato Grosso	Brasil	2008	humano
AF005727	AF005728	LAGUNA NEGRA	Monte Palma	Presidente Hayes	Paraguay	1995	<i>Calomys laucha</i>
JX443685		LAGUNA NEGRA 2	Santo Alfonso	Mato Grosso	Brasil	2006	humano
JX443689		LAGUNA NEGRA 2	Campo Novo dos Percis	Mato Grosso	Brasil	2006	humano
JX443681		LAGUNA NEGRA 2	Sin información	Mato Grosso	Brasil	2007	humano
JX443684		LAGUNA NEGRA 2	Tangara da Serra	Mato Grosso	Brasil	2007	humano
JX443704	JX443703	LAGUNA NEGRA 2	Nueva Olimpia	Mato Grosso	Brasil	2007	humano
AF482714	AF028022	LECHIGUANAS	Islas Lechiguanas	Entre Ríos	Argentina	18/05/1996	<i>Oligoryzomys flavescens</i>
AF482716	AF028027	MACIEL	Maciel	Santa Fe	Argentina	1997	<i>Necomys lasiurus</i>
NC034566	NC034552	MAPORAL	Hato Maporal	Portuguesa	Venezuela	1997	<i>Oligoryzomys fulvescens</i>
MF101866		MARIPA	Iracoubo	Cayenne	Guinea Francesa	2016	humano
KC876041		MARIPA	Macouria Tonate	Cayenne	Guinea Francesa	2008	humano
MF101864		MARIPA	Macouria Tonate	Cayenne	Guinea Francesa	2010	humano
MF101865		MARIPA	Macouria Tonate	Cayenne	Guinea Francesa	2013	humano
JQ611712	JQ611714	MARIPA	Maripa	Cayenne	Guinea Francesa	2009	humano
AB620100	AB620101	MONTANO	Sin información	Sin información	México	12/05/2006	<i>Peromyscus beatae</i>
KF481954	KF494345	NECOCLI	Necocli	Antioquia	Colombia	2011	<i>Zygodontomys brevicauda</i>
AF482715	AF028024	ORAN	Orán	Salta Salta	Argentina	23/10/1996	<i>Oligoryzomys chacoensis</i>
AF325966		ORAN	Orán	Salta	Argentina	1997	<i>Oligoryzomys chacoensis</i>
	JX891632	ORAN	Fraile Pintado	Jujuy	Argentina	2000	humano
EF576661		PARANOA	Paranoa	Distrito Federal	Brasil	2004	humano
AF482717	AF028028	PERGAMINO	Pergamino	Buenos Ríos	Argentina	24/02/1994	<i>Akodon azarae</i>
FJ532244	FJ608550	RIO MAMORE	Sin información	Iquitos	Perú	1996	<i>Oligoryzomys microtis</i>
JX443667	JX443700	RIO MAMORE 3	Itacotiara	Amazonas	Brasil	2004	<i>Oligoryzomys microtis</i>
JX443668	JX443701	RIO MAMORE 4	Alto Paraiso	Rondonia	Brasil	2005	<i>Oligoryzomys sp.</i>
JX443679		RIO MAMORE 4	Alto Paraiso	Rondonia	Brasil	2005	<i>Oligoryzomys sp.</i>
L37904	L37903	SIN NOMBRE	Sin información	Sin información	Estados Unidos	1993	<i>Peromyscus maniculatus</i>
JF750419		TUNARI	Villa Tunari	Cochabamba	Bolivia	2008	humano
JF750417		TUNARI	Villa Tunari	Cochabamba	Bolivia	2009	humano

Filogenia para los segmentos genómicos S y M

Evaluación de la señal filogenética

La evaluación de la señal filogenética se realizó mediante la construcción de mapas de verosimilitud empleando el programa TREE-PUZZLE (v.5.3.rc16). Este método se basa en el análisis de los valores de máxima verosimilitud obtenidos para las tres topologías posibles que se pueden construir a partir de cuatro secuencias (cuartetos). Estos valores se representan como puntos dentro de un triángulo equilátero, el cual está dividido en diferentes regiones. La región central representa las topologías poco resueltas (*star-like*), los vértices del triángulo equilátero representan filogenias bien resueltas y las regiones que corresponden a los laterales del triángulo equilátero reflejan la situación en la que es difícil distinguir entre topologías. La distribución de puntos resultante muestra si los datos son adecuados para una reconstrucción filogenética o no.

En la figura 9 se pueden observar los mapas de verosimilitud obtenidos para los alineamientos en estudio y en la tabla 9 se muestran los resultados (%) obtenidos para cada región del mapa de verosimilitud.

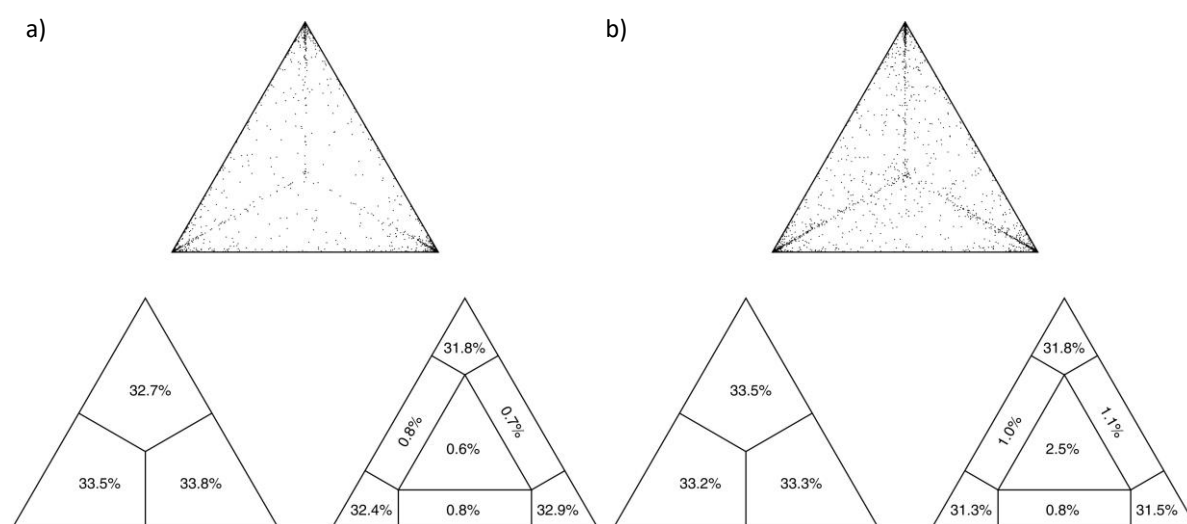


Figura 9. Mapas de verosimilitud para los alineamientos a) SEGMENTO_S, b) SEGMENTO_M

Tabla 9. Resolución las topologías obtenidas

Alineamiento	Topologías resueltas	Topologías poco resueltas	Topologías no resueltas
SEGMENTO_S	9708 (97,08 %)	228 (2,28 %)	64 (0,64 %)
SEGMENTO_M	9460 (94,60 %)	291 (2,91 %)	249 (2,49%)

Tal como puede observarse en la figura y en la tabla 9, el mayor porcentaje de las posibles topologías para los dos alineamientos en estudio se encuentran en la región de buena resolución, indicando que en los alineamientos evaluados hay evidencia de señal filogenética y pueden ser empleados para las reconstrucciones filogenéticas.

Cálculo del modelo evolutivo

Los modelos evolutivos calculados con JModelTest (v.2.1.4) para los alineamientos generados, siguiendo el criterio de información de Akaike fueron los siguientes:

- **SEGMENTO_S**: GTR+I+G (partición: 012345)
- **SEGMENTO_M**: TIM3+I+G (partición: 012032)

Filogenias para los segmentos genómicos S y M

Se realizaron las filogenias para los segmentos S y M mediante máxima verosimilitud (ML) con la herramienta W-IQ-TREE, empleando los modelos evolutivos correspondientes para cada alineamiento. Estos árboles filogenéticos fueron utilizados posteriormente para la evaluación de la señal temporal.

En la figura 10 y 11 se observan los árboles filogenéticos obtenidos a partir de los alineamientos para los segmentos genómicos S y M, respectivamente. En los nodos de los árboles se muestran los valores de soporte y solo se muestran los valores mayores o iguales a 60%. Para facilitar la visualización y localización de los diferentes genotipos de hantavirus en los árboles filogenéticos, en este trabajo de tesis estos fueron identificados con letras, pero no es lo que está reportado en la literatura.

Los árboles filogenéticos sin editar pueden verse en:

<https://drive.google.com/drive/folders/1r4Kan8eod20DNElhzyxX2Nipt-zv9Op0?usp=sharing>.

En el texto que se presenta a continuación, los números que están entre paréntesis corresponden a los valores de soporte para los nodos (*bootstrap*), expresados como %.

En el árbol filogenético obtenido a partir del alineamiento SEGMENTO_S (Figura 10), las secuencias correspondientes al virus Jaborá (grupo A) formaron un clado bien diferenciado con un soporte de 99% de confianza, dentro del mismo y relacionada con secuencias provenientes de Paraguay se ubicó una cepa de Jaborá identificada en Puerto Iguazú (provincia de Misiones). La misma presentó aproximadamente un 92% de identidad nucleotídica con las secuencias provenientes de Paraguay y un 85,6% con la identificada en Brasil, para el fragmento genómico estudiado (Anexo I). La relación de esta secuencia con el genotipo Jaborá fue identificada a partir de este análisis. En este trabajo la variante que circula en nuestro país se denominó en principio Jaborá-like dada su semejanza con este genotipo en el fragmento analizado, pero hacen falta más estudios para la caracterización genómica completa de esta cepa.

Los virus Maporal y Necocli agruparon juntos con 94% de soporte (grupo B).

Luego se observaron dos clados principales (62%). El primero de ellos está compuesto por los virus Caño Delgadito y Choclo formando un clado con un 73% soporte (grupo C); por los virus Río Mamoré y sus variantes genéticas Río Mamoré 3 y 4, Maripa y Anajatuba (95%) (grupo D); y por el virus Laguna Negra y su variante genética Laguna Negra 2 (100%) (grupo E). Las cepas argentinas del genotipo Laguna Negra incluidas en este trabajo identificadas en el NEA agruparon

con la secuencia derivada de Paraguay (100%) y presentaron aproximadamente un 98% de identidad nucleotídica entre ellas y con la secuencia de Paraguay. Las secuencias identificadas en el NOA agruparon con la variante de Brasil (99%) y presentaron entre ellas aproximadamente un 98-100% de identidad nucleotídica y aproximadamente un 88% con las secuencias de Brasil. Entre las secuencias del NEA y NOA hubo aproximadamente un 85% de identidad nucleotídica (Anexo I). Estos resultados estarían indicando que en el NEA y NOA estarían circulando dos variantes diferentes de Laguna Negra, una de ellas más relacionada con la que circula en Paraguay pero hacen falta más estudios de caracterización genética (Anexo I).

El segundo clado principal está formado por dos subclados. En el primero de ellos (soporte menor a 60%) se observó, por un lado que los virus Tunari, Castelo dos Sonhos y su variante genética Castelo dos Sonhos 2 agruparon juntos con un soporte de 99% (grupo F) y por otro lado, las secuencias de los virus Jucitiba y Araucaria también agruparon juntas (100%) (grupo G). Las cepas argentinas del virus Jucitiba identificadas en distintas localidades de la provincia de Misiones se encontraron dentro de este grupo (99%). En el segundo subclado se puede encontrar los grupos formados por los virus Pergamino, Maciel, Araracuara y Paranoa (98% - grupo H). Las secuencias para el virus Andes agruparon juntas (100% - grupo I). Por otro lado se ubican los virus Orán (grupo J), Bermejo (grupo K), Lechiguanas (grupo L) y HU39694 (grupo M); cada uno de ellos formando grupos bien diferenciados y todos los nodos presentaron buen soporte (>85%). Los virus Bermejo y Lechiguanas se encuentran más relacionados entre sí (97%) y junto con HU39694 forman un grupo relacionado con Orán.

La topología del árbol filogenético obtenido a partir del alineamiento SEGMENTO_M (Figura 11) presentó algunas diferencias con respecto a la obtenida a partir del alineamiento del segmento S. Se sigue observando que los virus Rio Mamoré (91%) y Laguna Negra (100% - grupos D y E) y sus respectivas variantes genéticas se mantuvieron juntos formando clados hermanos, pero el soporte fue menor (72%). Nuevamente todas las cepas argentinas del virus Laguna Negra agruparon juntas dentro del grupo E y se mantuvo la relación entre las secuencias del NEA con la secuencia derivada de Paraguay (98%), con un 95-97% de identidad nucleotídica entre ellas; y las secuencias del NOA con las secuencias derivadas de Brasil (98%). Las secuencias de este genotipo viral identificado en el NOA presentan entre ellas aproximadamente un 98-100% de identidad nucleotídica y aproximadamente un 84% con las secuencias de Brasil. Entre las secuencias del NEA y NOA hay aproximadamente un 83% de identidad nucleotídica (Anexo I).

Las secuencias para los virus Bermejo (grupo K) y Lechiguanas (grupo L) siguen agrupando juntos con un alto soporte (98%) junto los genotipos virales HU39694 (99%) y Orán (94%) (grupos M y J, respectivamente), aunque la relación entre estos cuatro genotipos virales ya no es tan clara respecto del árbol para el segmento S.

Las grandes diferencias con respecto al árbol filogenético para el segmento S se observaron para los siguientes grupos:

- El grupo que incluye el genotipo de hantavirus Jucitiba (grupo G) presentó una ubicación diferente dentro del árbol, más relacionada con los virus Maporal y Necoclí (grupo B).

- Los genotipos virales Maciel y Araraquara (grupo H) agrupan con el virus Castelo dos Sonhos (grupo J), y el virus Pergamino, dentro del grupo H en el árbol para el segmento S; presentó una ubicación diferente dentro del árbol filogenético para el segmento M, ubicándose en la parte superior del mismo.
- El virus Caño Delgadito, relacionado con el genotipo viral Choclo en el árbol para segmento S (grupo C), agrupa con los virus Catacamas y Bayou.

En general los valores de soporte obtenidos en el árbol filogenético para el segmento M fueron más bajos respecto del obtenido para el segmento S.

Al momento de realizar los análisis no existían en GenBank secuencias correspondientes a los genotipos virales Anajatuba, Araucaria, Jaborá y Tunari para el segmento M compatibles con la región amplificada en este trabajo, por lo que no pudieron ser incluidas en el análisis filogenético.

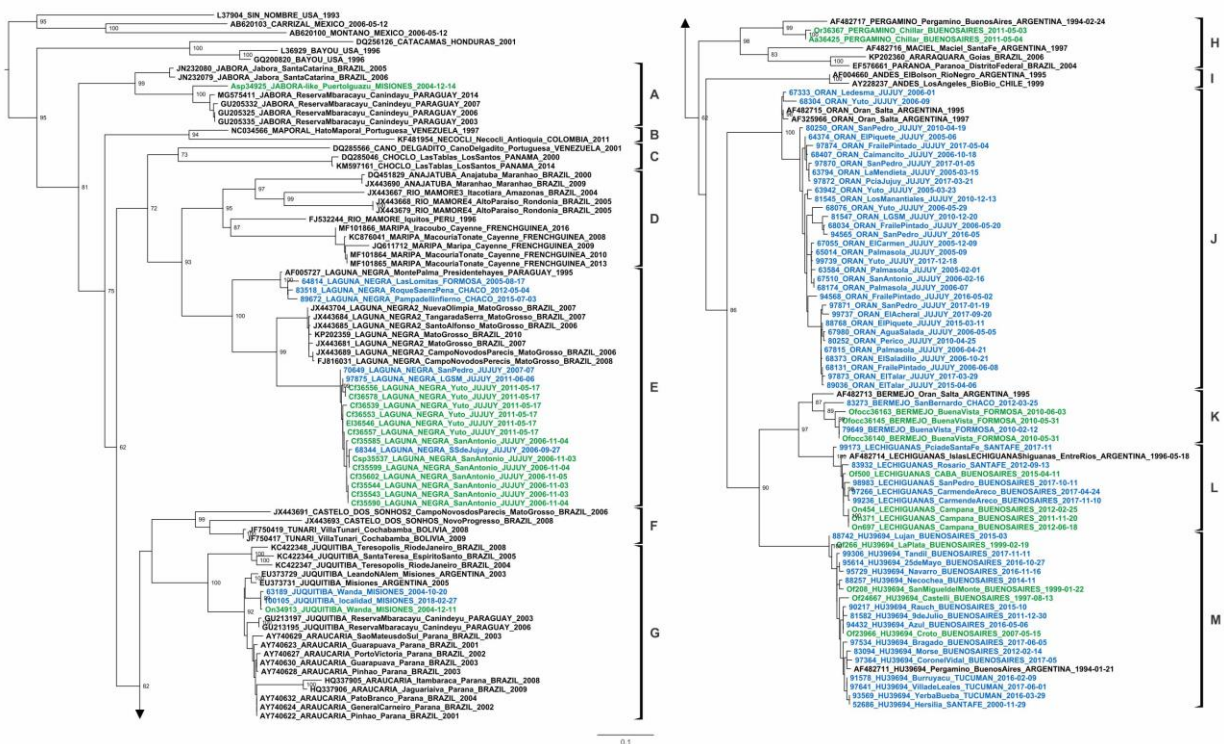


Figura 10. Árbol filogenético obtenido mediante máxima verosimilitud (W-IQ-Tree) a partir del alineamiento SEGMENTO_S (428 nt), siguiendo el modelo evolutivo GTR+I+G. Los números en los nodos del árbol representan los valores de soporte (%), se muestran los valores $\geq 60\%$. La raíz fue establecida con las secuencias para los virus Sin Nombre, Montano y Carrizal. La barra de escala en la parte inferior del árbol indica sustituciones de nucleótidos por sitio. En verde y azul se encuentran resaltadas las secuencias derivadas de roedores y humanos incluidas en este estudio, respectivamente. Las secuencias en negro corresponden a las tomadas del GenBank.

Árbol sin editar disponible en:

<https://drive.google.com/drive/folders/1r4Kan8eod20DNElhzyxX2Nipt-zv9Op0?usp=sharing>

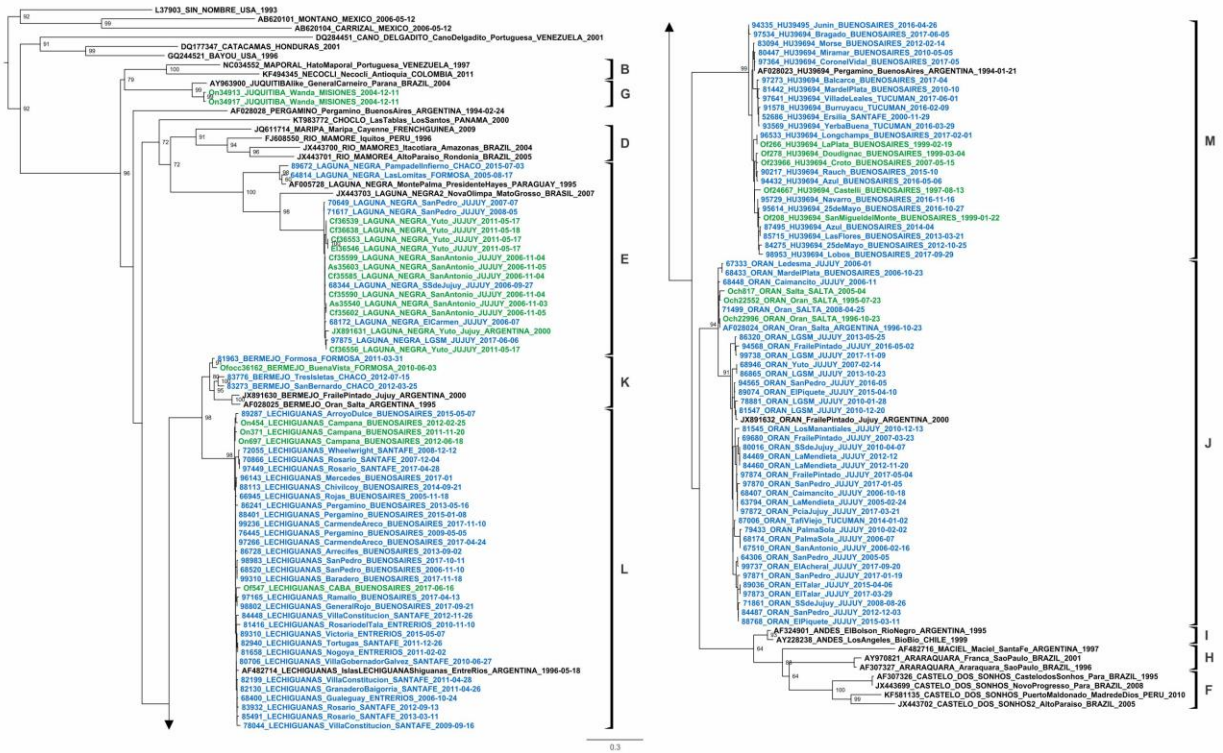


Figura 11. Árbol filogenético obtenido mediante máxima verosimilitud (W-IQ-Tree) a partir del alineamiento SEGMENTO_M (373 nt), siguiendo el modelo evolutivo TIM3+H+G. Los números en los nodos del árbol representan los valores de soporte (%), se muestran los valores $\geq 60\%$. La raíz fue establecida con las secuencias para los virus Sin Nombre, Montano y Carrizal. La barra de escala en la parte inferior del árbol indica sustituciones de nucleótidos por sitio. En verde y azul se encuentran resaltadas las secuencias derivadas de roedores y humanos incluidas en este estudio, respectivamente. Las secuencias en negro corresponden a las tomadas del GenBank.

Árbol sin editar disponible en:
<https://drive.google.com/drive/folders/1r4Kan8eod20DNELhzyxX2Nipt-zv9Op0?usp=sharing>

Análisis de coalescencia para los segmentos genómicos S y M

Evaluación temporal de los árboles filogenéticos

En la figura 12 se muestran los gráficos de regresión lineal para los árboles de ML obtenidos a partir de los alineamientos SEGMENTO_S y SEGMENTO_M, obtenidas con el programa TempEst (v.1.5.1).

El análisis de la señal temporal evolutiva del árbol obtenido para el segmento genómico S mostró una recta con tendencia a presentar pendiente positiva aunque la correlación entre la divergencia genética y el tiempo de muestreo no alcanzó a ser significativa. Los puntos no están distribuidos uniformemente a lo largo de la curva de regresión sino que se encuentran agrupados en un corto período de tiempo y presentaron una asociación muy débil entre las distancias genéticas y las fechas de datación (coeficiente de correlación = 0,132 y $R^2 = 1,7432 \times 10^{-2}$). A pesar de esto, el alineamiento SEGMENTO_S será empleado en los análisis de coalescencia con reloj molecular.

Para el árbol obtenido con el alineamiento SEGMENTO_M no se observa una correlación positiva en el gráfico de regresión (coeficiente de correlación = -0,1746 y $R^2 = 3,047 \times 10^{-2}$), indicando la falta de señal temporal y haciendo que este alineamiento no sea adecuado para realizar el análisis de coalescencia con reloj molecular.

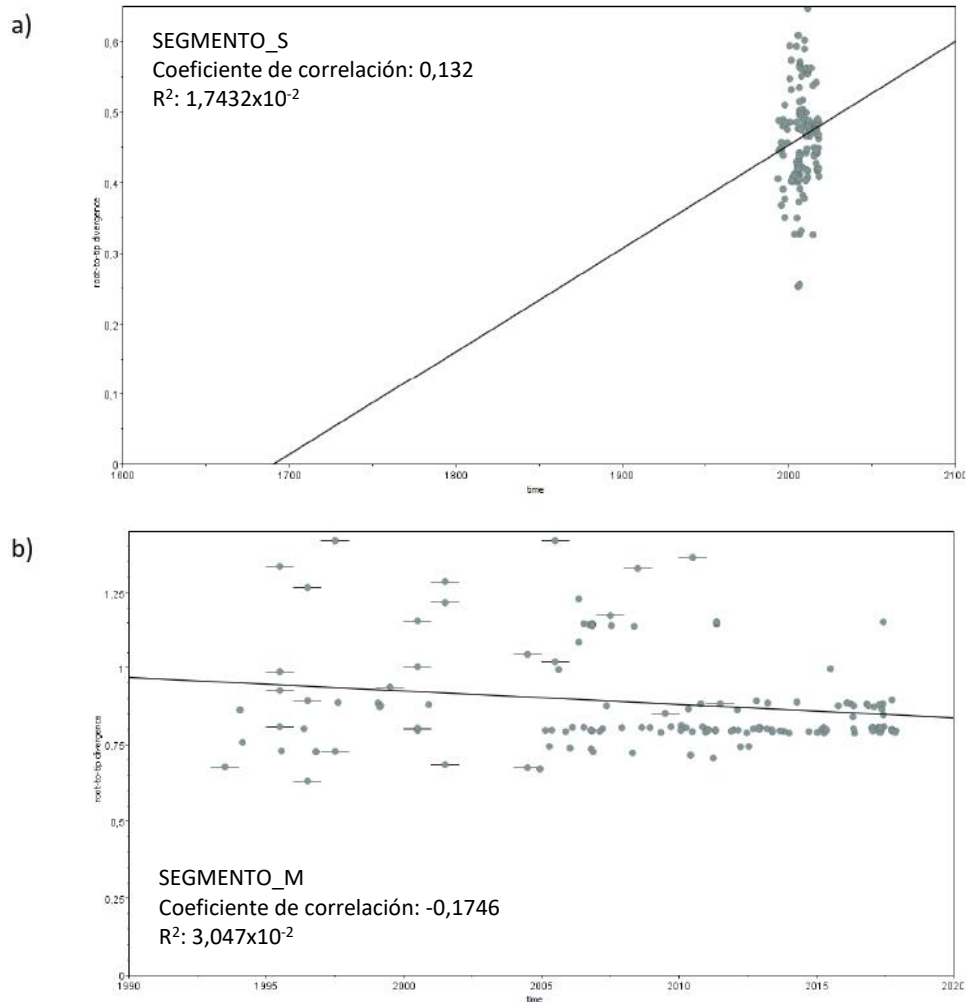
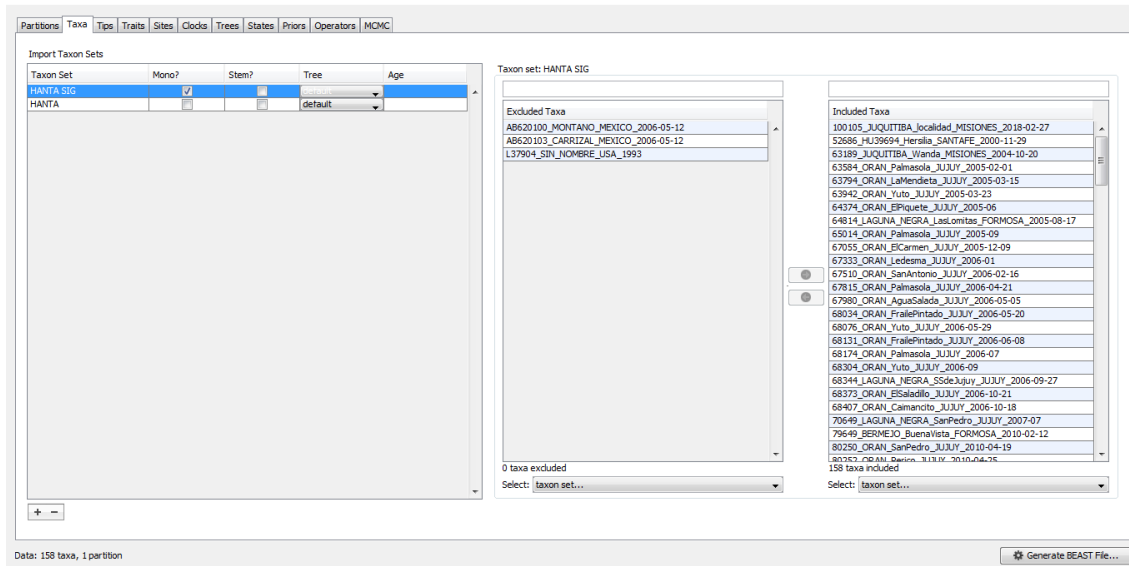


Figura 12. Análisis de regresión lineal de la distancia genética de la raíz a la punta del árbol ML en función del tiempo de muestreo a partir de los árboles obtenidos con a) SEGMENTO_S y b) SEGMENTO_M. Las fechas de datación se muestran como años antes del presente.

Generación de los archivos de entrada para BEAST

El programa BEAUti (v.1.8.3) fue utilizado para la creación de los archivos con formato .xml, el cual permite ingresar los diferentes parámetros para las corridas.

Se generaron dos taxones denominados HANTA (contenía todas las secuencias estudiadas) y HANTA SIG (contenía las secuencias asociadas a roedores sigmodontinos). Se forzó la monofilia en el grupo HANTA SIG.



El alineamiento fue analizado siguiendo el modelo de sustitución GTR+I+G, con 4 categorías gamma.

Se evaluó el desempeño de un reloj molecular estricto y reloj molecular relajado lognormal no correlacionado para modelar la velocidad de evolución de las ramas. En función de trabajos previamente publicados se asumió el modelo de coalescencia Bayesian Skyline (Ramsden *et al.*, 2008; 2009; Guo *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2020).

Debido a la existencia de hipótesis diferentes con respecto a la evolución de los hantavirus se realizaron dos análisis independientes. En el caso del análisis siguiendo la hipótesis de la co-evolución de los hantavirus con sus hospedadores; se utilizó la combinación de los siguientes criterios:

1. Utilización de calibradores externos. Para esto se utilizó información de la edad de un nodo interno previamente publicada en la literatura, correspondiente al primer registro fósil documentado para los roedores sigmodontinos (9,5 Ma), siguiendo una distribución normal (Castel *et al.*, 2017).
2. Utilización de una tasa de sustitución nucleotídica de 10^{-7} sustituciones/sitio/año siguiendo una distribución gamma con parámetro alfa de $0,23 \pm 0,01$; datos previamente publicada en la literatura (Sironen *et al.*, 2001; Bennett *et al.*, 2014).

Parameter	Prior	Bound	Description
tmrca(HANTA SIG)	Uniform [0, 9.5E6], initial=9.5E6	n/a	tmrca statistic for taxon set unttitled1 on tree SEGMENTO_S_12-11-21 alineado editado
tmrca(HANTA)	* Using Tree Prior	n/a	tmrca statistic for taxon set unttitled2 on tree SEGMENTO_S_12-11-21 alineado editado
ac	* Gamma [0.05, 10], initial=1	[0, ∞]	GTR A-C substitution parameter
ag	* Gamma [0.05, 10], initial=1	[0, ∞]	GTR A-G substitution parameter
at	* Gamma [0.05, 10], initial=1	[0, ∞]	GTR A-T substitution parameter
cg	* Gamma [0.05, 10], initial=1	[0, ∞]	GTR C-G substitution parameter
ct	* Gamma [0.05, 10], initial=1	[0, ∞]	GTR C-T substitution parameter
alpha	* Exponential [0.5], initial=0.5	[0, ∞]	gamma shape parameter
pinv	* Uniform [0, 1], initial=0.5	[0, 1]	proportion of invariant sites parameter
clock.rate	Gamma [0.23, 1], initial=1E-7	[0, ∞]	substitution rate
treeModel.rootHeight	* Using Tree Prior in [25, 156164, ∞]	[25, 156164, ∞]	root height of the tree
skyline.popSize	* Uniform [0, 1E100], initial=250	[0, 1E100]	Bayesian Skyline population sizes

3. Edades conocidas de las secuencias. Para esto se utilizaron las fechas con las que fueron parametrizadas las muestras y que se encontraban al final del nombre de la secuencia.

Name	Date	Uncertainty	Height
63584_ORAN_Palmasola_JULIY_2005-02-01	2005.0849315068492	0.0	13.071232876712429
63794_ORAN_LeMendieta_JULIY_2005-03-15	2005.2	0.0	12.9561643835616
63942_ORAN_Yuto_JULIY_2005-03-23	2005.2219178082191	0.0	12.934246575342513
64374_ORAN_EPIquete_JULIY_2005-06	2005.4136986301369	0.08333333333333333	12.742465753424767
65014_ORAN_Palmasola_JULIY_2005-09	2005.6657534246576	0.08333333333333333	12.490410958904022
67055_ORAN_ElCarmen_JULIY_2005-12-09	2005.9369863013699	0.0	12.219178082191775
67333_ORAN_Ledema_JULIY_2006-01	2006.0	0.08333333333333333	12.156164383561645
67510_ORAN_SanAntonio_JULIY_2006-02-16	2006.1260273972603	0.0	12.030136986301386
67815_ORAN_Palmasola_JULIY_2006-04-21	2006.3013698630136	0.0	11.854794520548012
67980_ORAN_AguasSalada_JULIY_2006-05-05	2006.3397260273973	0.0	11.816438356164326
68034_ORAN_FrailePintado_JULIY_2006-05-20	2006.3808219178081	0.0	11.775246575342513
68076_ORAN_Yuto_JULIY_2006-05-29	2006.4054794520548	0.0	11.7058493150684
68131_ORAN_FrailePintado_JULIY_2006-06-08	2006.4328767123288	0.0	11.72328767123281
68174_ORAN_Palmasola_JULIY_2006-07	2006.495890410959	0.08333333333333333	11.660273972602681
80250_ORAN_SanPedro_JULIY_2010-04-19	2010.295890410959	0.0	7.860273972602727
80252_ORAN_Perico_JULIY_2010-04-25	2010.3123287671233	0.0	7.843835616438355
81545_ORAN_LosManantiales_JULIY_2010-12-13	2010.9479452054795	0.0	7.208219178082118
81547_ORAN_LosRios_JULIY_2010-12-20	2010.9671232876713	0.0	7.1890410958903885
86304_ORAN_Yuto_JULIY_2006-09	2006.6657534246576	0.08333333333333333	11.490410958904022
94565_ORAN_SanPedro_JULIY_2016-05	2016.3306010958904	0.08333333333333333	1.8255632906655137
97871_ORAN_SanPedro_JULIY_2017-01-19	2017.0493150684931	0.0	1.10684931506853
97872_ORAN_PoaJujuy_JULIY_2017-03-21	2017.2164383561644	0.0	0.9397260273972279
97873_ORAN_Pitala_JULIY_2017-03-29	2017.2383561643835	0.0	0.9178082191781414
97874_ORAN_FrailePintado_JULIY_2017-05-04	2017.33698630137	0.0	0.8191780821916836
94568_ORAN_FrailePintado_JULIY_2016-05-02	2016.3333333333333	0.0	1.822810502283875
68373_ORAN_ElSaladillo_JULIY_2006-10-21	2006.8027397260273	0.0	11.353424657534333
68407_ORAN_Caimancito_JULIY_2006-10-18	2006.7945205479452	0.0	11.361643835616405
97870_ORAN_SanPedro_JULIY_2017-01-05	2017.0109589041097	0.0	1.1452054794519881

Considerando que los hantavirus presentan una velocidad de evolución más rápida, se tuvieron en cuenta los siguientes criterios:

1. Utilización de una tasa de sustitución nucleotídica previamente publicada en la literatura siguiendo una distribución uniforme con límites superior e inferior de 10^{-2} y 10^{-4} (sustituciones/sitio/año), respectivamente (Ramsden *et al.*, 2008; Ramsden *et al.*, 2009).

Parameter	Prior	Bound	Description
tmrca(HANTA SIG)	* Using Tree Prior	n/a	tmrca statistic for taxon set HANTA SIG on tree default
tmrca(HANTA)	* Using Tree Prior	n/a	tmrca statistic for taxon set HANTA on tree default
gtr.rates	* Dirichlet [1, 1]	[0, ∞]	GTR transition rates parameter
#sequences	* Dirichlet [1, 1]	[0, ∞]	base frequencies
alpha	* Exponential [0, 1], initial=0.5	[0, ∞]	gamma shape parameter
pinv	* Uniform [0, 1], initial=0.5	[0, 1]	proportion of invariant sites parameter
ucld.mean	* Approx. Reference Prior, initial=1	[0, ∞]	uncorrelated lognormal relaxed clock mean
ucld.stdev	* Uniform [1E-4, 0.01], initial=0.01	[1E-4, 0.01]	uncorrelated lognormal relaxed clock stdev
treeModel.rootHeight	* Using Tree Prior in [25.156164, ∞]	[25.156164, ∞]	root height of the tree
skyline.popSize	* Uniform [0, 1E100], initial=1	[0, 1E100]	Bayesian Skyline population sizes

2. Edades conocidas de las secuencias tomadas de las fechas con las que fueron parametrizadas las muestras, tal como se mencionó anteriormente.

Para el resto de los parámetros se mantuvieron los valores que estaban configurados por defecto. Se generaron en total 4 archivos .xml.

Muestreo de árboles y parámetros con BEAST

Los archivos .xml generados fueron analizados por el programa BEAST (v.1.8.3). Para los análisis bayesianos se corrieron dos MCMC de $5,0 \times 10^8$ generaciones cada una tomando una muestra cada 50.000 generaciones. Como resultado se obtuvieron para cada corrida los archivos de salida .log, .ops y .trees.

Evaluación de la performance de las corridas, selección de modelos y análisis de parámetros

Una vez finalizadas las corridas para cada modelo de coalescencia evaluado, se analizaron los parámetros estadísticos de los archivos .log de cada corrida en el programa Tracer (v.1.6). Se eliminó el 10% inicial de las muestras para cada corrida (*burn-in*). Se analizaron cada uno de los estadísticos y se observó que las muestras tomadas habían sido correctamente mezcladas y no existía evidencia de autocorrelación entre ellas; determinándose que se había alcanzado la convergencia ($ESS > 200$).

Una vez alcanzada la convergencia, la selección del reloj molecular que mejor haya modelado las velocidades de sustitución nucleotídica para el alineamiento analizado se realizó mediante el cálculo del Factor de Bayes (FB) en el programa Tracer (v.1.6) y mediante análisis de los valores de probabilidad marginal (expresados como logaritmos) obtenidos con path sampling (PS) / stepping-stone sampling (SS). Los análisis fueron realizados en la plataforma virtual CIPRES Science Gateway v.3.3 (disponible en: <https://www.phylo.org/>) debido la alta demanda computacional que implicaban. Solo estaba disponible la opción de *path sampling*, por lo que en este trabajo solo se mostrarán dichos resultados.

Para el análisis en función del FB, la interpretación de los resultados se realizó teniendo en cuenta la tabla 10.

Tabla 10. Interpretación del Factor de Bayes (FB)

FB	Ln (FB)	Log ₁₀ (FB)	Interpretación
1 – 3	0 – 1,1	0 – 0,5	Evidencia pobre a favor de H ₀
3 – 20	1,1 – 3	0,5 – 13	Evidencia positiva para H ₀
20 – 150	3 – 5	1,3 – 2,2	Evidencia fuerte para H ₀
> 150	> 5	> 2,2	Evidencia decisiva a favor de H ₀

H₀: hipótesis nula

Fuente: Kass & Raftery, 1995

En las tablas 11 y 12 se muestran los resultados obtenidos teniendo en cuenta ambas hipótesis de evolución de los hantavirus con sus reservorios.

Tabla 11. Resultados de FB para el alineamiento SEGMENTO_S

HIPÓTESIS	RELOJ MOLECULAR	H ₁	
		Estricto	Lognormal no correlacionado
CO-EVOLUCIÓN	H ₀ Estricto	-	0,126
	H ₀ Lognormal no correlacionado	7,967	-
EVOLUCIÓN RECIENTE	H ₀ Estricto	-	0,005
	H ₀ Lognormal no correlacionado	212,3	-

H₀: hipótesis nula

H₁: hipótesis alternativa

Tabla 12. Valores de logaritmo probabilidad marginal (PM) calculados con *path sampling* (PS) para el alineamiento SEGMENTO_S

HIPÓTESIS	RELOJ MOLECULAR	log PM usando PS
CO-EVOLUCIÓN	Estricto	- 14220,47
	Lognormal no correlacionado	- 6849,09
EVOLUCIÓN RECIENTE	Estricto	- 5487,45
	Lognormal no correlacionado	- 5060,14

Tanto por análisis del FB como por PS se obtuvieron resultados concordantes. En los análisis mediante FB se obtuvieron valores que indican evidencia a favor del reloj molecular lognormal no correlacionado. Para los análisis mediante PS, este modelo fue el que presentó los mayores valores de logaritmo de la probabilidad posterior. De esta manera se determinó que para el alineamiento en estudio, el reloj molecular lognormal no correlacionado es el que mejor modela la velocidad de evolución de las ramas bajo las hipótesis de la co-evolución y evolución reciente de los hantavirus con sus reservorios.

Generación, anotación y visualización del MCCT

Una vez seleccionado el reloj molecular que mejor describió los datos analizados se procedió a la generación y anotación de los árboles de mayor credibilidad (MCCT). Para esto, los archivos .trees fueron analizados con el programa TreeAnnotator (v1.8.3). Las raíces de los MCCT fueron calculadas automáticamente sin necesidad de incorporar un grupo externo. Los árboles resultantes fueron visualizados y editados con el programa FigTree (v1.4).

Las estimaciones de las tasas de sustitución nucleotídica calculadas a partir de las de filogenias datadas fueron $4,50 \times 10^{-8}$ (DS = $9,23 \times 10^{-11}$) sustituciones/sitio/años para la hipótesis de co-evolución de los hantavirus con sus reservorios y $3,77 \times 10^{-4}$ (DS = $3,52 \times 10^{-6}$) sustituciones/sitio/años para la hipótesis de evolución reciente.

En la tabla 13 se muestran los tiempo de divergencia con el ancestro común más reciente (tMRCA) estimado para cada genotipo de hantavirus donde se encontraban incluidas secuencias de Argentina. Se puede ver que los intervalos de confianza del 95% para cada grupo incluye el valor de tMRCA estimado. En la tabla 14 se muestran los tiempos de divergencias para el genotipo Laguna Negra. Además se incluyeron los tiempos de separación para los genotipos Orán, HU39694, Lechiguanas y Bermejo.

Tabla 13. Tiempos de divergencia con el ancestro común más reciente (tMRCA) estimados para los diferentes genotipos de hantavirus que circulan en Argentina

GENOTIPO HANTAVIRUS	HIPÓTESIS DE CO-EVOLUCIÓN		HIPÓTESIS DE EVOLUCIÓN RECIENTE	
	tMRCA (Ma)	IC (95%)	tMRCA (años)	IC (95%)
ANDES	0,35	[0,16-0,59]	64	[37-99]
BERMEJO	1,08	[0,69-1,55]	142	[82-221]
HU39694	0,37	[0,24-0,55]	63	[42-94]
JABORÁ-like	1,08	[0,63-1,58]	142	[76-237]
JUQUITIBA	0,44	[0,26-0,64]	65	[39-102]
LAGUNA NEGRA (NEA)	0,26	[0,14-0,41]	41	[22-67]
LAGUNA NEGRA (NOA)	0,19	[0,01-0,30]	29	[138-413]
LECHIGUANAS	0,38	[0,22-0,56]	53	[30-84]
MACIEL	4,15	[3,03-5,39]	404	[229-643]
ORAN	0,89	[0,60-1,24]	117	[70-186]
PERGAMINO	1,39	[0,82-2,07]	185	[103-309]

Ma: millones de años

Tabla 14. Tiempos de separación estimados para algunos grupos inferidos en las filogenias calibradas a partir del alineamiento SEGMENTO_S

PUNTOS DE DIVERGENCIA	HIPÓTESIS DE CO-EVOLUCIÓN		HIPÓTESIS DE EVOLUCIÓN RECIENTE	
	Ma	IC (95%)	años	IC (95%)
LAGUNA NEGRA	3,37	[2,43-4,50]	409	[240-652]
LAGUNA NEGRA PARAGUAY/NEA	0,36	[0,19-0,57]	58	[34-93]
LAGUNA NEGRA BRASIL/NOA	2,02	[1,33-2,84]	249	[138-413]
ORAN y HU39694/LECHIGUANAS/BERMEJO	4,29	[3,21-5,53]	527	[310-801]
HU39694 y LECHIGUANAS/BERMEJO	3,2	[2,28-4,16]	395	[234-615]
LECHIGUANAS y BERMEJO	1,7	[1,17-2,34]	217	[124-340]

Ma: millones de años

En la figura 13 se observa el MCCT obtenido a partir de los alineamientos SEGMENTO_S considerando la hipótesis de la co-evolución de los hantavirus con sus reservorios. El MCCT con todos los nombres de las secuencias para cada genotipo viral incluidos en este estudio y los valores de probabilidad posterior para cada nodo se encuentra disponible en: <https://drive.google.com/drive/folders/1r4Kan8eod20DNElhzyxX2Nipt-zv9Op0?usp=sharing>

Las secuencias incluidas en este estudio para los diferentes genotipos virales que circulan en Argentina siguen agrupando, en general de la misma manera que lo observado en el árbol de ML (Figura 10). A pesar de que las raíces para los MCCT fueron determinadas automáticamente, las topologías observadas en los MCCT son similares a las obtenidas por máxima verosimilitud.

Analizando el MCCT obtenido teniendo en cuenta que los hantavirus han co-evolucionado con sus reservorios a lo largo del tiempo se observó que:

- La separación entre los hantavirus asociados a roedores de las subfamilias Sigmodontinae y Neotominae habría ocurrido hace aproximadamente 10,3 Ma (PP = 1). En la figura 13, en rosa se encuentra marcada la fecha del primer registro fósil documentado para los roedores sigmodontinos empleada como uno de los parámetros para la calibración del reloj molecular (9,5 Ma). Los hantavirus asociados a roedores de la subfamilia Sigmodontinae se encuentran formando un gran clado monofilético.
- El clado para Jaborá presentó dos subclados, formados por secuencias provenientes de Paraguay y Brasil (PP = 1). La secuencia argentina, denominada Jaborá-like asociada a un roedor del género *Akodon*, agrupó con la secuencia de Paraguay, tal como se pudo observar en la figura 10. El tMRCA fue de aproximadamente 1,08 millones de años (Ma). La divergencia entre las variantes genéticas de Jaborá que circularían en Brasil y en Paraguay pudo haberse dado hace aproximadamente 2,72 Ma.
- Las secuencias del virus Laguna Negra identificadas en el NEA agrupan con una secuencia proveniente de Paraguay (PP = 1) y la separación entre ellas podría haber ocurrido hace 0,36 Ma, siendo el tMRCA para la variante que circularía en el NEA de 0,26 Ma. La variante que circularía en el NOA estaría relacionada con la variante de Laguna Negra de Brasil pero no serían lo mismo. La separación de estos dos grupos dentro del genotipo viral Laguna Negra pudo haberse dado hace aproximadamente 2,02 Ma y a partir de ese momento habrían evolucionado por separado hasta la aparición de cada uno de sus ancestros comunes y posterior diversificación de cada una de las variantes (tMRCA NOA = 0,19 Ma y tMRCA Brasil = 0,17 Ma). Tanto en los árboles filogenéticos ML (Figuras 10 y 11) como en la filogenia datada estos dos grupos aparecen como clados hermanos. Las secuencias del virus Laguna Negra identificadas en el NEA son de origen humano (3), no teniendo secuencias asociadas a roedores disponibles para incluir en el análisis. Las secuencias identificadas en el NOA se encuentran asociadas a *Calomys fecundus* (12), *Euryoryzomys legatus* (1) y también a casos humanos (3). La identificación del genotipo viral Laguna Negra en un roedor de la especie *E. legatus* podría tratarse de un *spill-over* dado que no es un reservorio reportado hasta el momento de este virus; pero hacen falta más estudios para confirmar o descartar esto.
- El clado correspondiente a Juquitiba incluye secuencias de provenientes de Brasil y Paraguay (PP = 1). Las secuencias de este genotipo viral que circulan en la provincia de Misiones (2 asociadas a *Oligoryzomys nigripes* y 1 de origen humano) nuevamente agrupan juntas (PP = 0,94) y el tMRCA fue de 0,44 Ma.

- Las secuencias correspondientes a los virus Maciel, Pergamino, Araraquara y Paranoa forman un clado bien definido (PP = 0,95). La secuencia correspondiente al virus Maciel (no patógeno para el hombre hasta el momento) asociado a *Necomys lasiurus* agrupa con Araraquara, genotipo asociado al reservorio de la misma especie, siendo este uno de las variantes más virulentas en Brasil. El tMRCA para el virus Maciel sería de 4,15 Ma. Las secuencias correspondientes al genotipo Pergamino agrupan juntas (PP = 1) con un tMRCA de 1,39 Ma. Este genotipo viral está asociado a dos especies diferentes de reservorios: *Akodon azarae* y *Oxymycterus rufus*.
- Las secuencias correspondientes a los genotipos virales Orán, Bermejo, Lechiguanas y HU39694 agrupan juntas, formando un gran clado bien definido (PP = 0,98) y todos ellos se encuentran asociados a roedores del género *Oligoryzomys*. El tMRCA para el genotipo Orán fue de 0,89 Ma pero la separación con respecto a los otros genotipos virales pudo haber ocurrido mucho antes, hace 4,29 Ma. Las secuencias incluidas en el análisis son de origen humano y las secuencias que fueron tomadas del GenBank para este genotipo estaban asociadas a *O. chacoensis*. La separación de los subclados que incluyen por un lado las secuencias de HU39694 (tMRCA = 0,37 Ma) y por otro lado las secuencias de Bermejo (tMRCA = 1,08 Ma) y Lechiguanas (tMRCA = 0,38 Ma) podría haber ocurrido hace 3,2 Ma, mientras que la separación de los virus Lechiguanas y Bermejo podría haberse dado hace 1,7 Ma. Para estos tres genotipos virales se incluyeron secuencias de origen humano y asociadas a roedores. El reservorio para los virus HU39694 y Lechiguanas es *O. flavescens* y el reservorio del virus Bermejo es *O. occidentalis*; pertenecientes al gran complejo de especies *O. flavescens* (Rivera *et al.*, 2018).

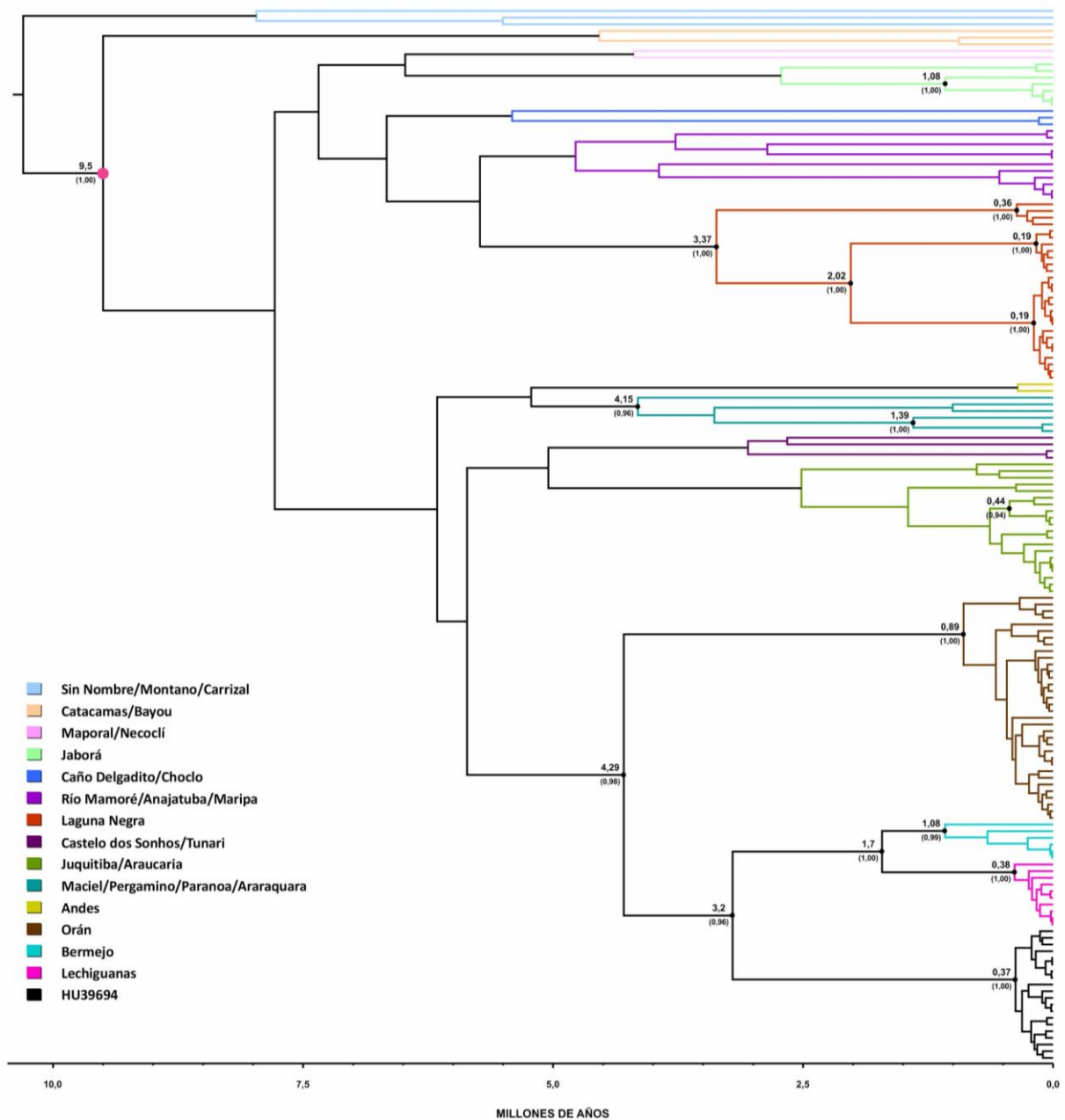


Figura 13. MCCT obtenido a partir del alineamiento SEGMENTO_S (428 nt) considerando la hipótesis de la co-evolución de los hantavirus con sus reservorios. El eje X representa la escala de tiempo en millones de años al presente (Ma). Los colores representan los diferentes genotipos virales, tal como lo muestra la leyenda. Los valores en los nodos corresponden a los tMRCA o tiempos de separación de los grupos, según corresponda (valor superior) y probabilidad posterior (valor inferior).

MCCT editado y sin editar disponible en:

<https://drive.google.com/drive/folders/1r4Kan8eod20DNElhzyxX2Nipt-zv9Op0?usp=sharing>

En la figura 14 se observa el MCCT obtenido a partir del alineamiento SEGMENTO_S considerando que los hantavirus han tenido una evolución reciente. El MCCT con todos los nombres de las secuencias para cada genotipo viral incluidos en este estudio y los valores de probabilidad posterior para cada nodo se encuentra disponible en: <https://drive.google.com/drive/folders/1r4Kan8eod20DNEIhzyxX2Nipt-zv9Op0?usp=sharing>

Para este análisis solo se tuvieron en cuenta las fechas en que fueron tomadas las muestras y una tasa de sustitución nucleotídica del orden 10^{-2} - 10^{-4} sustituciones/sitio/años para la calibración del reloj molecular. La topología fue similar a la obtenida considerando que los hantavirus co-evolucionaron con sus reservorios con la diferencia que los tiempos de separación para los diferentes grupos y los tiempos de divergencia con el ancestro común más reciente para todas las variantes virales mencionadas anteriormente fueron menores, mucho más cercanos al tiempo actual. Los tiempos de separación para los grupos analizados fueron de aproximadamente 58-527 años atrás, mientras que los tMRCA estimados para los diferentes genotipos de hantavirus que circulan en Argentina fue de 29-404 años (Tablas 13 y 14).

El clado que comprende los genotipos Jujuy, Araucaria, Castelo dos Sonhos y Tunari fue conflictivo con respecto a su localización en el MCCT para la co-evolución de los hantavirus con sus reservorios y difiere respecto del árbol ML (grupos F-M – Figura 10) y del MCCT para evolución reciente de los hantavirus. En el MCCT obtenido para la hipótesis de la co-evolución de los hantavirus con sus reservorios (Figura 13) se observó que estos genotipos están más relacionados con el clado formado por los genotipos Orán, HU39694, Lechiguana y Bermejo; mientras que en el MCCT para la evolución reciente de los hantavirus este clado se comportó como clado hermano del clado que incluye los genotipos Maciel, Pergamino, Parana, y Araraquara, Andes, Orán, HU39694, Lechiguana y Bermejo; topología similar a la observada en el árbol ML (Figura 10). Los valores de PP de los nodos que implica la separación de estos grupos no fueron estadísticamente significativas. Algo similar ocurrió con el clado formado por los genotipos Maciel, Pergamino, Araraquara y Parana, en donde no hay coincidencia en la localización del mismo entre los árboles ML (grupo H – Figura 10) y el MCCT de la figura 14.

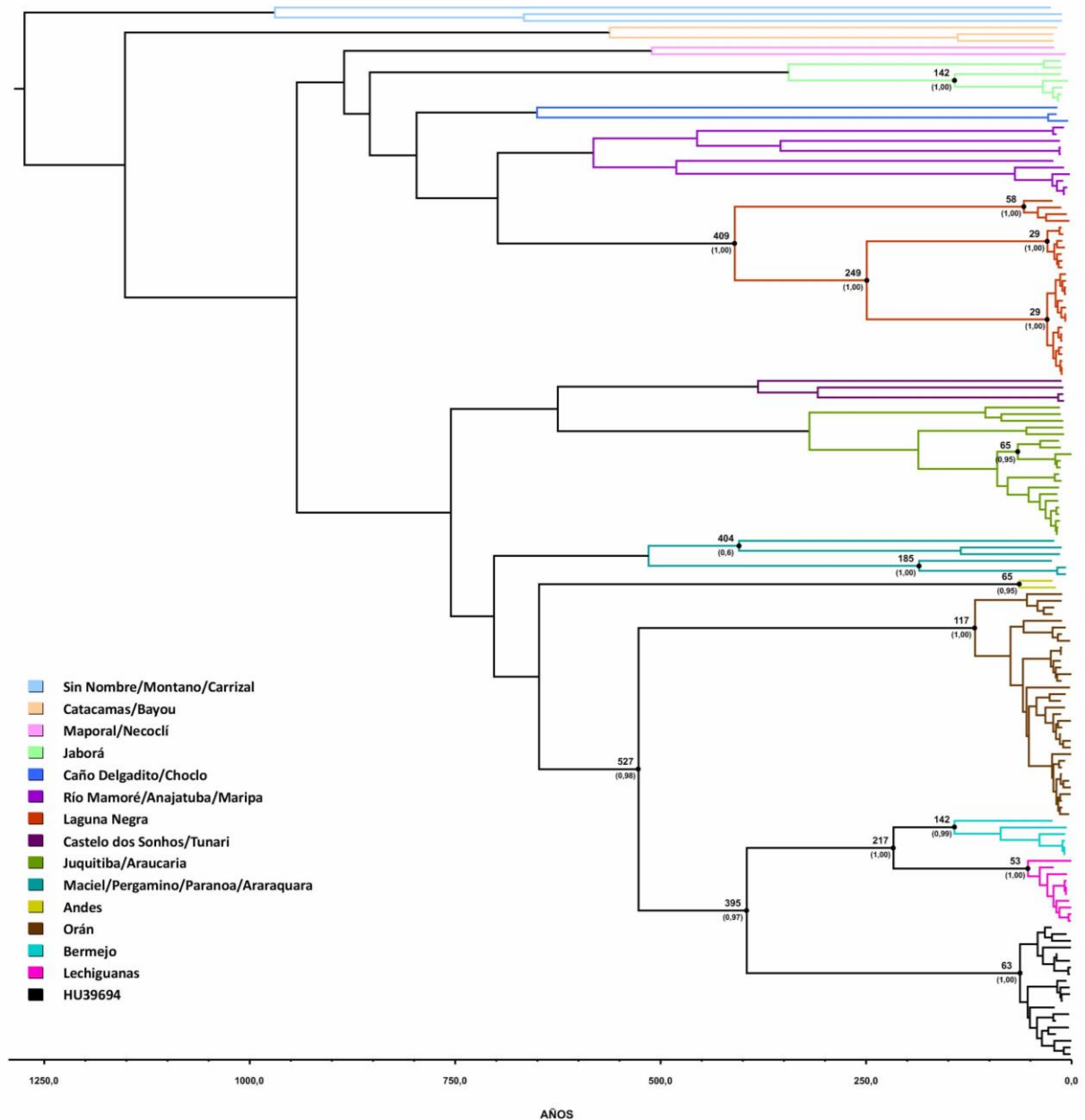


Figura 14. MCCT obtenido a partir del alineamiento SEGMENTO_S (428 nt) considerando la hipótesis de la evolución reciente de los hantavirus. El eje X representa la escala de tiempo en años al presente. Los colores representan los diferentes genotipos virales, tal como lo muestra la leyenda. Los valores en los nodos corresponden a los tiempos de divergencia con el ancestro común más reciente o tiempos de separación de los grupos, según corresponda (valor superior) y probabilidad posterior (valor inferior).

MCCT editado y sin editar disponible en:

<https://drive.google.com/drive/folders/1r4Kan8eod20DNElhzyxX2Nipt-zv9Op0?usp=sharing>

DISCUSIÓN

Los hantavirus son considerados uno de los mejores ejemplos de asociación a largo plazo entre los virus de ARN y sus hospedadores. Los análisis iniciales revelaron congruencias entre las filogenias de los hantavirus y sus hospedadores de las subfamilias Murinae, Arvicolinae, Neotominae y Sigmodontinae sugiriendo una co-evolución con sus roedores reservorios a lo largo de millones de años. Este concepto ha sido muy utilizado en la investigación y descubrimiento de nuevos hantavirus a lo largo de la historia. En muchos de los trabajos publicados se han utilizado modelos basados en el registro fósil del hospedador debido a la falta del mismo para los hantavirus y, debido al proceso evolutivo antiguo que existiría entre ambos se asumió que las escalas de tiempo en las que tanto el virus como el hospedador divergen son congruentes (Plyusnin et al., 1996; Plyusnin & Morzunov, 2001; Plyusnin A., 2002; Jonsson et al., 2010; Plyusnin & Sironen 2014; Bennett *et al.*, 2014; Holmes & Zhang, 2015). La hipótesis de la co-evolución fue apoyada por Sironen *et al.*, (2001) quien demostró, mediante modelos basados en reloj molecular y una metodología basada en máxima verosimilitud; que los segmentos genómicos S y M del virus Puumala evolucionan lentamente con una tasa de evolución en el orden de 10^{-7} a 10^{-6} sustituciones/sitio/año, generando tiempos de divergencia en la escala de millones de años.

Es muy frecuente encontrar eventos de *host-switching* y de reasociación genética que producen algunas incongruencias en las filogenias, como los publicadas por Morzunov *et al.* (1998), Vapalahti *et al.* (1999), Nemirov *et al.* (2002) y Chu *et al.* (2011). Esto ha generado ciertas controversias con respecto a la hipótesis de la co-evolución de los hantavirus con sus reservorios; pero aparentemente estos fenómenos no serían suficientes para dirigir la evolución de los hantavirus sino que sería un mecanismo mucho más complejo.

En función de la creciente aplicación de los análisis bayesianos empleando BEAST para los estudios evolutivos, Ramsden *et al.* en 2008 y 2009 propusieron que los hantavirus tendrían una aparición mucho más reciente y que su evolución no estaría asociada a la de sus reservorios. En estos trabajos se utilizaron relojes moleculares empleando para su calibración las fechas en la que fueron tomadas las muestras generando tasas evolutivas en el orden de 10^{-2} a 10^{-4} sustituciones/sitio/año, similares a las obtenidas para otros virus ARN. En estos trabajos los tiempos de divergencia de los diferentes hantavirus están en el orden de 200 – 1500 años. Resultados similares fueron obtenidos por Souza *et al.* en 2014.

En este trabajo de tesis se realizó un análisis filogenético y filodinámico de los distintos genotipos de hantavirus circulantes en la Región Centro y Norte (Noreste y Noroeste) de Argentina que permitió inferir tiempos del ancestro común más cercano y tiempos de divergencia para los datos analizados; realizando un análisis bayesiano con el programa BEAST mediante el empleo de reloj molecular. Se abarcó el periodo 2005-2017.

Para los segmentos genómicos S y M se emplearon 158 y 154 secuencias, respectivamente. Además de las secuencias derivadas de este trabajo de tesis, se incluyeron en los análisis

secuencias de otros genotipos de hantavirus de América que fueron tomadas del GenBank. Se incluyeron aquellas secuencias en la que los datos del origen de la muestra (humano o roedor), fecha y sitio de toma de muestra estaban completos, datos que eran necesarios para los análisis posteriores. Se generaron dos alineamientos de 428 nt y 373 nt, para los segmentos S y M, respectivamente con el programa BioEdit.

En los alineamientos se analizaron de manera conjunta tanto secuencias asociadas a casos de SPH como secuencias derivadas de roedores dado que está propuesto que los seres humanos actuarían como hospedadores finales para los hantavirus y por lo tanto no contribuirían al proceso evolutivo del virus (Plyusnin & Morzunov, 2001).

Antes de la generación de las filogenias datadas y el cálculo de las posibles fechas ancestrales y tiempos de divergencia para los diferentes hantavirus que circulan en Argentina se realizó una serie de análisis para evaluar tanto la señal filogenética de los alineamientos para los segmentos S y M, como así también la señal temporal de los árboles filogenéticos obtenidos a partir de estos alineamientos.

La señal filogenética fue calculada mediante la construcción de mapas de verosimilitud. Se observó que ambos alineamientos presentaron suficiente señal filogenética a pesar de estar trabajando con alineamientos que contenían pocos nucleótidos. Se construyeron ambos árboles filogenéticos con el método de máxima verosimilitud.

En general la topología del árbol filogenético obtenido con el alineamiento para el segmento S fue altamente concordante con las publicadas en la literatura tanto con fragmentos genómicos, como con la región codificante completa para la proteína N (Chu *et al.*, 2001; Bohlman *et al.*, 2002; Firth *et al.*, 2012; Figueiredo *et al.*, 2014; Guterres *et al.*, 2015) y sus nodos presentaron buen soporte con valores superiores al 90%.

Con respecto al análisis filogenético del segmento M, se observaron diferencias respecto al árbol obtenido para el segmento S en la ubicación de algunos genotipos (virus Jujuitiba, Maciel, Araraquara, Pergamino, Caño Delgadito). Es importante destacar que la cantidad de secuencias disponibles en el GenBank para los diferentes genotipos de hantavirus para este segmento es mucho menor que para el segmento S. En muchos casos no existen secuencias disponibles para algunos genotipos o las existentes no eran compatibles con las incluidas en este trabajo, por lo que la variabilidad genética para el análisis se vio reducida y esto también podría explicar las diferentes topologías de los árboles obtenidos. En general los valores de soporte de los nodos para este árbol filogenético fueron menores respecto de los obtenidos con el segmento S. La variación en la localización de algunos clados también puede observarse en publicaciones de otros autores (Levis *et al.*, 1998; Vincent *et al.*, 2000; Chu *et al.*, 2001; Firth *et al.*, 2012).

Luego se analizó la presencia de señal temporal a lo largo de las ramas de los árboles construidos para ambos segmentos genómicos por máxima verosimilitud, para determinar si estos eran adecuados para la construcción de las filogenias datadas mediante el empleo de reloj molecular. Se estudió la correlación entre las fechas en la que fueron obtenidas las muestras y la

divergencia de la raíz de los árboles filogenéticos mediante la construcción de gráficos de regresión lineal con el programa TempEst.

El conjunto de datos empleado para el segmento S mostró una curva de regresión lineal con tendencia a una pendiente positiva pero la señal temporal no fue significativa. Esto podría deberse a que los puntos no se encontraban distribuidos uniformemente a lo largo de toda la recta sino que estaban contenidos en un período corto (coeficiente de correlación = 0,132). Posiblemente el tamaño pequeño del fragmento analizado haya influido en este comportamiento. Al trabajar con secuencias completas sería esperable tener una mejora en la señal temporal evolutiva dado que se tendría mayor cantidad de sitios informativos para analizar. Pero en el trabajo publicado por Li *et al.* (2020) en donde se analizó la señal temporal evolutiva para el árbol ML construido con secuencias completas para segmento S del virus Hantaan también se observó una señal baja (coeficiente de correlación = 0,5888); a pesar de haber empleado secuencias que abarcaron un periodo mayor al empleado en este trabajo de tesis (1976-2017). Esto podría ser un indicio de que para aquellos virus donde existiría una relación de largo plazo con sus hospedadores; el uso de relojes moleculares calibrados únicamente con la fecha de toma de muestra no sería suficiente para realizar los análisis.

A pesar de haber obtenido una correlación temporal débil para el segmento S, este fue empleado en los análisis posteriores. El conjunto de datos empleado para el análisis del segmento M mostró una pérdida completa de la correlación indicando la falta de señal temporal evolutiva (coeficiente de correlación = -0,1746), por lo tanto fue descartado de los análisis posteriores.

Debido a la existencia de hipótesis diferentes con respecto a la evolución de los hantavirus con sus reservorios en este trabajo de tesis se realizaron dos análisis independientes y se compararon dos relojes moleculares (estricto y relajado lognormal no correlacionado). Un reloj molecular es un modelo estadístico que describe la relación que existe entre la distancia genética y el tiempo evolutivo (Pybus & Rambaut, 2009). El reloj molecular estricto presenta una velocidad constante de sustitución a lo largo de las ramas de la filogenia mientras que en el reloj molecular relajado lognormal no correlacionado la velocidad es diferente e independiente para cada rama (Ho & Duchene, 2014).

Se empleó además el modelo de coalescencia Bayesian skyline para configurar la distribución a priori de los tiempos de los nodos en los árboles, en función de los trabajos publicados por Ramsden *et al.* (2009); Souza *et al.* (2014) y Li *et al.* (2020). A pesar de que en estos trabajos se propuso la aparición reciente de los hantavirus, fueron en los que se realizaron análisis evolutivos siguiendo esta metodología bayesiana.

La selección del reloj molecular que mejor modeló la velocidad de evolución de las ramas se realizó mediante el Factor de Bayes y por estimación de valores de logaritmo de probabilidad posterior (análisis de *path sampling*). El resultado obtenido (reloj molecular relajado lognormal no correlacionado) fue similar al obtenido en los trabajos de Ramsden *et al.* (2009); Souza *et al.*

(2014) y Li *et al.* (2020). Una vez seleccionado el reloj molecular se procedió a la calibración del mismo.

En el caso del análisis siguiendo la hipótesis de la co-evolución de los hantavirus con sus hospedadores se utilizó una combinación de criterios para calibrarlo:

1. Utilización de calibradores externos. Se utilizó información de la edad de un nodo interno correspondiente al primer registro fósil documentado para los roedores sigmodontinos (9,5 Ma), siguiendo una distribución normal (Castel *et al.*, 2017).
2. Utilización de una tasa de sustitución nucleotídica. En este trabajo la tasa de sustitución empleada fue de 10^{-7} sustituciones/sitio/año (Sironen *et al.*, 2001; Bennett *et al.*, 2014).
3. Edades conocidas de las secuencias. Se utilizaron las fechas con las que fueron parametrizadas las muestras.

En el caso del análisis siguiendo la hipótesis de evolución reciente de los hantavirus se utilizaron para la calibración del reloj molecular los siguientes criterios:

1. Utilización de tasas de sustitución nucleotídica en el orden de 10^{-2} y 10^{-4} (sustituciones/sitio/año) (Ramsden *et al.*, 2008; Ramsden *et al.*, 2009)
2. Edades conocidas de las secuencias, como se describió anteriormente.

Los árboles datados (MCCT) obtenidos a partir de ambos análisis mostraron topologías similares entre ellas y con el obtenido mediante máxima verosimilitud para el segmento S (Figura 10) y los valores de probabilidad posterior de los nodos para los clados que incluían secuencias de Argentina fueron superiores a 0,96 (Figura 13) y a 0,6 (Figura 14). A diferencia de lo que se observa en el árbol para la evolución reciente de los hantavirus y filogenia por ML, el árbol de la figura 13 muestra que el clado que contiene los genotipos Maciel, Pergamino, Araraquara y Paranoa presenta una localización diferente pero el valor de probabilidad posterior para ese nodo es bajo (PP = 0,33). De manera similar, la localización del clado que incluye los genotipos Jujutiba, Araucaria, Castelo dos Sonhos y Tunari fue conflictiva presentando un valor PP = 0,06. Los diferentes criterios que se emplearon para la calibración de los árboles pueden haber influido en estos resultados.

La mayoría de los trabajos que avalan la hipótesis de la co-evolución de los hantavirus con sus reservorios están basados en la metodología de máxima verosimilitud y se emplea el registro fósil para la calibración del reloj molecular (Sironen *et al.*, 2001; Nemirov *et al.*, 2002; Plyusnin & Sironen 2014; Castel *et al.*, 2017). En este trabajo de tesis, se propuso realizar para esta hipótesis un análisis bayesiano empleando más calibradores además de emplear las fechas en la que fueron tomadas las muestras (Drummond *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos mostraron que la tasa de sustitución nucleotídica estimada fue de $4,50 \times 10^{-8}$ (DS = $9,23 \times 10^{-11}$) sustituciones/sitio/año, generando tiempos de ancestro común más reciente (tMRCA) y tiempos de

divergencia en la escala de millones de años. Los virus Orán, Jaborá-like, Bermejo y Pergamino habrían tenido su origen hace 0,89 – 1,39 millones de años, mientras que los virus Laguna Negra, Andes, HU39694, Juquitiba y Lechiguanas habrían tenido un origen un poco más reciente, hace 0,19 – 0,38 millones de años. El virus Maciel habría tenido un origen mucho más antiguo, alrededor de los 4,15 millones de años. Los resultados obtenidos cuando se incluyeron más parámetros para calibrar el análisis estuvieron más cercanos a la escala de tiempo postulada para la co-evolución de los hantavirus con sus reservorios; reforzando la idea de que la fecha de las muestras no sería suficiente para la calibración del reloj molecular en los análisis para virus que tendrían una relación a largo plazo con su hospedador.

Yates *et al.* en su trabajo publicado en 2002 propusieron que los hantavirus del Nuevo Mundo habrían tenido un origen asiático y muy probablemente llegaron a América del Norte hace más de 20 millones de años con sus roedores reservorios de una tribu ahora extinta de los roedores muridos tempranos. Los primeros hantavirus norteamericanos se distribuyeron con sus roedores reservorios por toda América del Norte y la entrada a América del Sur habría sido hace 7-9 millones de años a través del Archipiélago panameño o puente terrestre. En este trabajo de tesis se observó que la separación entre los hantavirus asociados a roedores de las subfamilias Sigmodontinae y Neotominae habría ocurrido hace aproximadamente 10,3 millones de años. Estos resultados estarían en concordancia con lo postulado por Yates *et al.* Además la estrecha relación filogenética que existe entre algunos hantavirus que se encuentran en regiones geográficas muy distantes y que infectan roedores relacionados estaría apoyando esta relación virus-hospedador de largo plazo. Un ejemplo de esto es el caso de los virus Prospect Hill (América del Norte) y Tula (Europa) asociados a roedores del género *Microtus*, cuya migración debió haber ocurrido antes de la separación de los continentes, hace 1-2 millones de años (Jonsson *et al.*, 2010).

Los resultados obtenidos siguiendo la hipótesis de la aparición reciente de los hantavirus mostraron que la tasa de sustitución nucleotídica inferida a partir de los datos analizado fue de $3,77 \times 10^{-4}$ (DS = $3,52 \times 10^{-6}$) sustituciones/sitio/año. El tMRCA más antiguo corresponde nuevamente al virus Maciel (404 años al presente) mientras que el virus Laguna Negra habría aparecido hace 29 – 41 años atrás, siendo el de más reciente aparición. Estos valores son demasiados cercanos a la actualidad si consideramos que para la década de 1980 ya se había identificado al virus Prospect Hill como el único hantavirus reconocido en América y que en 1993 se identificaron por primera vez en Estados Unidos casos de SPH (Parrington *et al.*, 1990; Nichol *et al.*, 1993). Además en un estudio retrospectivo llevado a cabo en ese país se lograron confirmar casos de SPH a partir de muestras de tejidos preservados de pacientes hospitalizados que presentaron síntomas similares con la enfermedad y que databan de la década de 1970 (Yates *et al.*, 2002).

El tMRCA inferido para los hantavirus asociados a roedores sigmodontinos fue de 1152 años atrás y la divergencia entre los hantavirus asociados a roedores sigmodontinos y neotominos habría ocurrido hace 1274 años. Es importante mencionar que en los trabajos de Ramsden *et al.*

(2009) y Souza *et al.* (2014), la divergencia entre los hantavirus asociados a roedores sigmodontinos y neotominos habría ocurrido hace aproximadamente 550 años y el tMRCA para los hantavirus asociados a roedores sigmodontinos fue de aproximadamente 220 años atrás; tiempos que si bien están en la escala de años son mucho más recientes que los obtenidos en este trabajo de tesis.

En relación al uso de los relojes moleculares siguiendo una metodología bayesiana, una posible explicación para la obtención de tiempos recientes de aparición y la variabilidad observada entre las diferentes publicaciones fue realizada por Zhang (2014), quien sugiere que las estimaciones realizadas con programas como BEAST son muy dependientes del nivel de diversidad de las secuencias empleadas, de los períodos de tiempo de las muestras y de los parámetros que se utilizan para calibrar los análisis. Los tiempos cortos de divergencia inferidos pueden deberse a un mal ajuste entre los datos y el modelo de evolución elegido, generando una subestimación de los tiempos de divergencia. Además en el trabajo de Zhang (2014) al igual que en el trabajo de Li *et al.* (2020); se evidenció poca o la falta de señal temporal infiriendo que no es posible estimar tasas de sustitución y tiempos de divergencia únicamente a partir de las fechas de las muestras para virus que tendrían una relación de largo tiempo con sus reservorios.

A partir de los estudios filogenéticos y filodinámicos realizados en este trabajo de tesis se derivaron, además, dos posibilidades de continuación de trabajo. Por un lado, la caracterización genómica completa de la variante del virus Jaborá presente en Argentina, cuya circulación no había sido reportada. Por otro lado, la caracterización genómica completa de las diferentes variantes del virus Laguna Negra que circulan en la Región Norte de nuestro país. Se podrían llevar a cabo análisis en donde se puedan ver las relaciones filogeográficas para estas variantes individualmente y ver como fue el movimiento de cada genotipo viral a lo largo de la historia y profundizar los estudios para estos virus.

2. CAPÍTULO DE CONCLUSIONES

El objetivo principal de este trabajo fue realizar un análisis filogenético y filodinámico de los distintos genotipos de hantavirus circulantes en la Región Centro y Norte de Argentina. Se realizó la puesta a punto de diversos programas bioinformáticos, que luego fueron empleados para el análisis de los juegos de datos. Se empleó un reloj molecular relajado lognormal no correlacionado, el cual se calibró empleando dos estrategias diferentes en función de las dos hipótesis de evolución de los hantavirus propuestas en la literatura.

Para el análisis siguiendo la hipótesis de la co-evolución de los hantavirus con sus hospedadores se utilizaron los siguientes criterios para calibrar el reloj molecular: información de la edad de un nodo interno correspondiente al primer registro fósil documentado para los roedores sigmodontinos (9,5 Ma), utilización de la tasa de sustitución nucleotídica de 10^{-7} sustituciones/sitio/año y edades conocidas de las secuencias. La tasa de sustitución nucleotídica estimada fue de $4,50 \times 10^{-8}$ (DS = $9,23 \times 10^{-11}$) sustituciones/sitio/año, generando tiempos de ancestro común más reciente (tMRCA) y tiempos de divergencia en la escala de millones de años para los diferentes genotipos de hantavirus que circulan en Argentina.

Para el análisis siguiendo la hipótesis de evolución reciente de los hantavirus se utilizaron para la calibración del reloj molecular: las edades conocidas de las secuencias y una tasa de sustitución nucleotídica en el orden de 10^{-2} y 10^{-4} sustituciones/sitio/año. La tasa de sustitución nucleotídica inferida fue de $3,77 \times 10^{-4}$ (DS = $3,52 \times 10^{-6}$) sustituciones/sitio/año generando tiempos de ancestro común más reciente (tMRCA) y tiempos de divergencia en la escala de años para los diferentes genotipos de hantavirus que circulan en Argentina.

Sigue existiendo una gran incógnita respecto a cuál de las dos hipótesis de evolución de los hantavirus es la correcta y este trabajo de tesis no pretende esclarecer cuál de las dos es la más apropiada. Hasta el momento no hay publicaciones realizadas en donde se describan tiempos de ancestros para los hantavirus que circulan en Argentina ni tampoco los tiempos de divergencia. A pesar de que se trabajó con fragmentos genómicos pequeños (428 nt y 373 nt, para los segmentos S y M, respectivamente) este trabajo de tesis podría ser un punto de partida para profundizar estos análisis mediante diferentes enfoques como por ejemplo, realizar secuenciación completa de muestras seleccionadas de cada genotipo viral que circula en nuestro país, emplear otras herramientas bioinformáticas para inferir tiempos de ancestros y de divergencia, establecer posibles locaciones ancestrales. También sería interesante poder ampliar el estudio al análisis del segmento L y analizar que comportamiento sigue en relación a los otros dos segmentos presentados en este trabajo.

De manera conjunta, los resultados permitirán ampliar los conocimientos relacionados con los aspectos evolutivos de los hantavirus y serán una contribución en esta temática.

3. NOMENCLATURA

ABREVIATURA	PALABRAS EN INGLÉS	SIGNIFICADO
aa		Aminoácido
ADN		Ácido desoxirribonucleico
ADNc		ADN complementario
ARN		Ácido ribonucleico
ARNc		ARN complementario
ARNm		ARN mensajero
ARNv		ARN viral
BLASTn	<i>Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool</i>	Herramienta básica de búsqueda de alineación local de nucleótidos.
	<i>Burn-in</i>	Parte inicial de una corrida en la que el MCMC puede haberse atascado en una región de baja probabilidad del espacio de parámetros.
BEAST	<i>Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees</i>	Muestreo de árboles mediante análisis evolutivo bayesiano.
DNasa		Desoxirribonucleasa
dNTP		Desoxirribonucleótido trifosfato
DS		Desvío estándar
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
ESS	<i>Effective Sample Size</i>	Tamaño de muestra efectivo. Es un cálculo del número de muestras independientes de una distribución posterior en una MCMC.
F	<i>Forward</i>	Directo
FB		Factor de Bayes
FHA		Fiebre Hemorrágica Argentina
FHSR		Fiebre Hemorrágica con Síndrome Renal
Gc		Glicoproteína c (Porción C-terminal de GPC)
Gn		Glicoproteína n (Porción N-terminal de GPC)
GPC		Precursor de glicoproteína
	<i>Host-switching</i>	Cambio de huésped
IC		Intervalo de confianza
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>	Comité Internacional de Taxonomía de Virus
IgG		Inmunoglobulinas G
IgM		Inmunoglobulinas M
INEVH		Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas
kb		Kilobase
kDA		Kilo Dalton
L	<i>Large</i>	Grande
Ln		Logaritmo natural

Log ₁₀		Logaritmo base 10
M	<i>Medium</i>	Mediano
Ma		Millones de años
MCCT	<i>Maximun Clade Credibility Tree</i>	Árbol de mayor credibilidad
MCMC	<i>Markov chain Monte Carlo</i>	Cadenas de Markov Monte Carlo
ML	<i>Maximum Likelihood</i>	Máxima verosimilitud
N		Porteína N o nucleoproteína
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>	Centro Nacional de Información Biotecnológica
NE		Nefropatía epidémica
NEA		Noreste Argentina
NOA		Noroeste Argentina
nt		Nucleótidos
R	<i>Reverse</i>	Reverso
S	<i>Small</i>	Pequeño
	<i>Panhandle</i>	Estructura de asa de sartén
pb		Pares de bases
PM		Probabilidad marginal
PP		Probabilidad posterior
PS/SS	<i>Path sampling/stepping-stone sampling</i>	Dos metodologías que se utilizan para estimar la probabilidad marginal de un conjunto de datos pero lo hacen de manera diferente
RdRp		ARN polimerasa dependiente de ARN viral
RE		Retículo endoplasmático
RNasa		Ribonucleasa
RT-PCR	<i>Reverse transcription - polymerase chain reaction</i>	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa
SPH		Síndrome Pulmonar por Hantavirus
	<i>Star-like</i>	Con forma de estrella. En filogenia, multifurcación con muchas ramas conectadas en el nodo interno
	<i>Spill-over</i>	Fenómeno en donde los virus pueden "saltar" de una especie hospedadora a otra
TAE		Tris-acético-EDTA
tMRCA	<i>time to Most Recent Common Ancestor</i>	Tiempo del ancestro común más cercano

4. BIBLIOGRAFÍA

- Alonso, D. O., Iglesias, A., Coelho, R., Periolo, N., Bruno, A., Córdoba, M. T., Filomarino, N., Quipildor, M., Biondo, E., Fortunato, E., Bellomo, C., & Martínez, V. P. (2019). Epidemiological description, case-fatality rate, and trends of Hantavirus Pulmonary Syndrome: 9 years of surveillance in Argentina. *Journal of medical virology*, 91(7), 1173–1181.
- Avsic-Zupanc, T., Xiao, S. Y., Stojanovic, R., Gligic, A., Van der Groen, G., & Leduc, J. W. (1992). Characterization of Dobrava virus: a hantavirus from Slovenia, Yugoslavia. *Journal of medical virology*, 38(2), 132-137.
- Avsic-Zupanc, T., Saksida, A., & Korva, M. (2019). Hantavirus infections. *Clinical Microbiology and Infection*, 21, e6-e16.
- Bellomo, C., Nudelman, J., Kwaszka, R., Vazquez, G., Cantoni, G., Weinzettel, B., ... & Padula, P. (2009). Geographic expansion of hantavirus pulmonary syndrome in Argentina. The southernmost case report. *Medicina*, 69(6), 647-650.
- Bellomo, C., Alonso, D. O., Ricardo, T., Coelho, R., Kehl, S., Periolo, N., Azogaray, V., Casas, N., Ottonelli, M., Bergero, L. C., Cudós, M. C., Previtali, M. A., & Martinez, V. P. (2021). Emerging hantaviruses in Central Argentina: First case of Hantavirus Pulmonary Syndrome caused by Alto Paraguay virus, and a novel hantavirus in *Scapteromys aquaticus* rodent. *PLoS neglected tropical diseases*, 15(11), e0009842.
- Bennett, S. N., Gu, S. H., Kang, H. J., Arai, S., & Yanagihara, R. (2014). Reconstructing the evolutionary origins and phylogeography of hantaviruses. *Trends in microbiology*, 22(8), 473-482.
- BLASTn (Nucleotide Basic Local Alignment Search Tool): disponible en <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- Brummer-Korvenkontio, M., Vaheri, A., Hovi, T., Von Bonsdorff, C. H., Vuorimies, J., Manni, T., ... & Lähdevirta, J. (1980). Nephropathia epidemica: detection of antigen in bank voles and serologic diagnosis of human infection. *Journal of infectious diseases*, 141(2), 131-134.
- Calderón, G. E., Brignone, J., Martin, M. L., Calleri, F., Sen, C., Casas, N., ... & Levis, S. (2018). Brote de síndrome pulmonar por hantavirus, Tucumán, argentina. *Revista Medicina*, 78(3).
- Carey, D. E., Reuben, R., Panicker, K. N., Shope, R. E., & Myers, R. M. (1971). Thottapalayam virus: a presumptive arbovirus isolated from a shrew in India. *Indian Journal of Medical Research*, 59(11), 1758-60.

- Casas, N., Ojeda, A., Rios Manchuca, L., Hertlein, C., Madariaga, J., Montiel, N. & Calderón, G. (2008). Investigación epidemiológica de un caso de Hantavirus en la provincia de Corrientes, Argentina. III Congreso Latinoamericano de Zoonosis. VI Congreso Argentino de Zoonosis. Buenos Aires.
- Castel, G., Tordo, N., & Plyusnin, A. (2017). Estimation of main diversification time-points of hantaviruses using phylogenetic analyses of complete genomes. *Virus research*, 233, 60-69.
- Chu, Y. K., Rossi, C., Leduc, J. W., Lee, H. W., Schmaljohn, C. S., & Dalrymple, J. M. (1994). Serological relationships among viruses in the Hantavirus genus, family Bunyaviridae. *Virology*, 198(1), 196–204.
- Chu, Y. K., Owen, R. D., & Jonsson, C. B. (2011). Phylogenetic exploration of hantaviruses in Paraguay reveals reassortment and host switching in South America. *Virology journal*, 8, 399.
- Cifuentes-Muñoz, N., Salazar-Quiroz, N., & Tischler, N. D. (2014). Hantavirus Gn and Gc envelope glycoproteins: key structural units for virus cell entry and virus assembly. *Viruses*, 6(4), 1801-1822.
- CIPRES Science Gateway v.3.3: disponible en <https://www.phylo.org/>
- Colombo, V. C., Brignone, J., Sen, C., Previtali, M. A., Martin, M. L., Levis, S., Monje, L., González-Iltig, R., & Beldomenico, P. M. (2019). Hantavirus genotype Lechiguanas in *Oligoryzomys nigripes* (Rodentia: Cricetidae): New evidence of host-switching. *Acta tropica*, 191, 133–138.
- Cortés, J., Cacace, M. L., Seijo, A., Parisi, M. N., & Ayala, L. T. (1994) Distress respiratorio del adulto en Orán, Salta. Iº Congreso Interamericano de Infectología, Córdoba.
- Cortés, J., Supaga, M. E., Cacace, M. L., Gonzalez, G., Seijo, A., Levis, S., & Enria, D. Síndrome Pulmonar por Hantavirus y Leptospirosis en Orán, Salta. I Congreso Argentino de Zoonosis. I Congreso Latinoamericano de Zoonosis. Buenos Aires, 14 al 17 de agosto de 1995.
- Cueto, G. R., Cavia, R., Bellomo, C., Padula, P. J., & Suárez, O. V. (2008). Prevalence of hantavirus infection in wild *Rattus norvegicus* and *R. rattus* populations of Buenos Aires City, Argentina. *Tropical Medicine & International Health*, 13(1), 46-51.
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., & Posada, D. (2012) JModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat Methods*. 9: 772.
- Drummond, A. J., Ho, S. Y., Phillips, M. J., & Rambaut, A. (2006). Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS biology*, 4(5), e88.
- Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC evolutionary biology*, 7(1), 1-8.

- Enfermedades infecciosas/Hantavirus. Diagnóstico de hantavirus. Guía para el equipo de salud Nro. 10 (2012). Dirección de Epidemiología - Ministerio de Salud de la Nación. ISSN 1852-1819.
- Enría, D., Padula, P., Segura, E., Pini, N., Edelstein, A., Posse, C., & Weissenbacher, M. (1996). Hantavirus pulmonary syndrome in Argentina. Possibility of person to person transmission. *Medicina*, 709-711.
- Enría, D. A. (1998). Emergencia de los hantavirus en las Américas y en la Argentina. *Medicina (B. Aires)*, 15-8.
- Enría, D. A., & Levis, S. C. (2004). Emerging viral zoonoses: hantavirus infections. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*, 23(2), 595-611.
- Enría, D. A., Lázaro, M. E., & Levis, S. d. (2014). Hantavirus. En G. Carballal, & J. R. Oubiña, *Virología Médica (Cuarta ed., págs. 623-626)*. Ciudad Autónoma de Buenos Aires: Corpus Libros Médicos y Científicos.
- FigTree (v.1.4): disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
- Fitte, B. (2019). Parasitosis de riesgo sanitario en roedores sinantrópicos: una problemática emergente de la urbanización actual. Tesis doctoral, Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, La Plata.
- Firth, C., Tokarz, R., Simith, D. B., Nunes, M. R., Bhat, M., Rosa, E. S., ... & Lipkin, W. I. (2012). Diversity and distribution of hantaviruses in South America. *Journal of virology*, 86(24), 13756-13766.
- Fulhorst, C. F., Koster, F. T., Enría, D. A., & Peters, C. J. (2011). Hantavirus Infections. *Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens and Practice*, 470–480.
- GenBank: disponible en <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>
- González-Ittig, R. E., Rivera, P. C., Levis, S. C., Calderón, G. E., & Gardenal, C. N. (2014a). The molecular phylogenetics of the genus *Oligoryzomys* (Rodentia: Cricetidae) clarifies rodent host–hantavirus associations. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 171(2), 457-474.
- González-Ittig, R. E., Kandel, N., Levis, S., Calderón, G., Salazar-Bravo, J., & Gardenal, C. N. (2014b). Molecular systematics of the South American rodent *Calomys laucha* (Cricetidae: Sigmodontinae), a reservoir of the Laguna Negra hantavirus. *Canadian Journal of Zoology*, 92(12), 1093-1098.

- Guo, W. P., Lin, X. D., Wang, W., Tian, J. H., Cong, M. L., Zhang, H. L., ... & Zhang, Y. Z. (2013). Phylogeny and origins of hantaviruses harbored by bats, insectivores, and rodents. *PLoS pathogens*, 9(2), e1003159.
- Guterres, A., de Oliveira, R. C., Fernandes, J., & de Lemos, E. R. S. (2019). The mystery of the phylogeographic structural pattern in rodent-borne hantaviruses. *Molecular phylogenetics and evolution*, 136, 35-43.
- Hall, T. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic Acids Symp. Ser.* (Vol. 41, pp. 95-98).
- Henderson, W. W., Monroe, M. C., St Jeor, S. C., Thayer, W. P., Rowe, J. E., Peters, C. J., & Nichol, S. T. (1995). Naturally occurring Sin Nombre virus genetic reassortants. *Virology*, 214(2), 602–610.
- Hercolini, C., Bruno, A., Sen, C., Brignone, J., & Levis, L. (2018). Hantavirus Seoul en roedores del Parque Natural Lago Lugano. II Congreso Internacional de Zoonosis. IX Congreso Argentino de Zoonosis, Buenos Aires.
- Hepojoki, J., Strandin, T., Lankinen, H., & Vaheeri, A. (2012). Hantavirus structure–molecular interactions behind the scene. *Journal of General Virology*, 93(8), 1631-1644.
- Ho, S. Y., & Duchêne, S. (2014). Molecular-clock methods for estimating evolutionary rates and timescales. *Molecular ecology*, 23(24), 5947–5965.
- Holmes, E. C., & Zhang, Y. Z. (2015). The evolution and emergence of hantaviruses. *Current opinion in virology*, 10, 27-33.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (2022). Recuperado de <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> (marzo 2022)
- Jonsson, C. B., Figueiredo, L. T. M., & Vapalahti, O. (2010). A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clinical microbiology reviews*, 23(2), 412-441.
- Kabwe, E., Davidyuk, Y., Shamsutdinov, A., Garanina, E., Martynova, E., Kitaeva, K., Malisheni, M., Isaeva, G., Savitskaya, T., Urbanowicz, R. A., Morzunov, S., Katongo, C., Rizvanov, A., & Khaiboullina, S. (2020). Hantaviruses, *Emerging Zoonotic Pathogens*. *Pathogens* (Basel, Switzerland), 9(9), 775.
- Kass, R. E., & Raftery, A. E. (1995). Bayes factors. *Journal of the American Statistical Association*, 90(430), 773–795.
- Khaiboullina, S. F., Morzunov, S. P., & St Jeor, S. C. (2005). Hantaviruses: molecular biology, evolution and pathogenesis. *Current molecular medicine*, 5(8), 773-790.

- Klempa, B. (2018). Reassortment events in the evolution of hantaviruses. *Virus genes*, 54(5), 638-646.
- Ksiazek, T. G., Peters, C. J., Rollin, P. E., Zaki, S., Nichol, S., Spiropoulou, C., ... & Khan, A. S. (1995). Identification of a new North American hantavirus that causes acute pulmonary insufficiency. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 52(2), 117-123.
- Laenen, L., Vergote, V., Calisher, C. H., Klempa, B., Klingström, J., Kuhn, J. H., & Maes, P. (2019). Hantaviridae: current classification and future perspectives. *Viruses*, 11(9), 788.
- Lázaro, M. E., Resa, A. M., Levis, S., Riva Posse, C., Zamengo, L., Mereob, J. C., Rojo, I., Buzzo, F., & Enría, D. Distrés Respiratorio del Adulto en El Bolsón, Río Negro. I Congreso Argentino de Zoonosis. I Congreso Latinoamericano de Zoonosis. Buenos Aires, 14 al 17 de agosto de 1995.
- Lázaro, M. E., Resa, A. J., Barclay, C. M., Calanni, L., Samengo, L., Martinez, L., Padula, P. J., Pini, N., Lasala, M. B., Elsner, B., Enría, D. 2000. Síndrome Pulmonar por Hantavirus en el Sur Andino Argentino. *Medicina (Bs. Aires)*; 60: 289-301.
- LeDuc, J., Smith, G., Pinheiro, F., Vasconcelos, P., Rosa, E., & Maiztegui, J. (1985). Isolation of a Hantaan – related virus from Brazilian rats and serological evidence of its widespread distribution in South America. *Am. J. Trop. Meg. Hyg.*, 34(4), 810-815.
- Lee, H., Lee, P., & Johnson, K. (1978). Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. *J Infect Dis*, 298-308.
- Lee, H., Baek, L., & Johnson, K. (1982). Isolation of Hantaan virus, the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever, from wild urban rats. *J Infect Dis*, 638-644.
- Levis, S., Rowe, J., Morzunov, S., Enría, D., & Jeor, S. (1997). New hantaviruses causing hantavirus pulmonary syndrome in central Argentina. *The Lancet*, 349, 998-999.
- Levis, S., Morzunov, S. P., Rowe, J. E., Enría, D., Pini, N., Calderon, G., ... & St. Jeor, S. C. (1998). Genetic diversity and epidemiology of hantaviruses in Argentina. *The Journal of infectious diseases*, 177(3), 529-538.
- Levis, S., Garcia, J., Pini, N., Calderón, G., Ramírez, J., Bravo, D., ... & Enría, D. (2004). Hantavirus pulmonary syndrome in northwestern Argentina: circulation of Laguna Negra virus associated with *Calomys callosus*. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 71(5), 658-663.
- Levis, S., Pini, N., García, J., Calderón, G., Patiño, O., Pardiñas, U., Estévez, J. & Enría D. (2005) Estudio de reservorios asociados con Síndrome Pulmonar por Hantavirus en Misiones. VIII Congreso Argentino de Virología. Sociedad Argentina de Virología. *Revista Argentina de Microbiología* 37 (1): 28.

- Li, N., Li, A., Liu, Y., Wu, W., Li, C., Yu, D., Zhu, Y., Li, J., Li, D., Wang, S., & Liang, M. (2020). Genetic diversity and evolution of Hantaan virus in China and its neighbors. *PLoS neglected tropical diseases*, 14(8), e0008090.
- Maes, P., Alkhovsky, S. V., Bào, Y., Beer, M., Birkhead, M., Briese, T., ... & Kuhn, J. H. (2018). Taxonomy of the family Arenaviridae and the order Bunyavirales: update 2018. *Archives of virology*, 163(8), 2295-2310.
- Maiztegui, J. I., Becker, J. L., & Le Duc, J. W. (1983). Actividad del virus de fiebre hemorrágica de Corea o virus muroide en ratas del puerto de la ciudad de Buenos Aires. *Medicina*, 871.
- Martinez, V. P., Bellomo, C., San Juan, J., Pinna, D., Forlenza, R., Elder, M., & Padula, P. J. (2005). Person-to-person transmission of Andes virus. *Emerging infectious diseases*, 11(12), 1848.
- Milholland, M. T., Castro-Arellano, I., Suzán, G., Garcia-Peña, G. E., Lee, T. E., Rohde, R. E., ... & Mills, J. N. (2018). Global diversity and distribution of hantaviruses and their hosts. *Ecohealth*, 15(1), 163-208.
- Minh, B.Q., Nguyen, M.A., & von Haeseler, A. (2013). Ultrafast approximation for phylogenetic bootstrap. *Mol Biol Evol* 30 (5):1188-95.
- Morzunov, S. P., Rowe, J. E., Ksiazek, T. G., Peters, C. J., St Jeor, S. C., & Nichol, S. T. (1998). Genetic analysis of the diversity and origin of hantaviruses in *Peromyscus leucopus* mice in North America. *Journal of virology*, 72(1), 57–64.
- Nemirov, K., Henttonen, H., Vaheri, A., & Plyusnin, A. (2002). Phylogenetic evidence for host switching in the evolution of hantaviruses carried by *Apodemus* mice. *Virus research*, 90(1-2), 207–215.
- Nichol, S. T., Spiropoulou, C. F., Morzunov, S., Rollin, P. E., Ksiazek, T. G., Feldmann, H., ... & Peters, C. J. (1993). Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science*, 262(5135), 914-917.
- Padula, P., Martinez, V. P., Bellomo, C., Maidana, S., San Juan, J., Tagliaferri, P., ... & Almiron, M. (2007). Pathogenic hantaviruses, northeastern Argentina and eastern Paraguay. *Emerging Infectious Diseases*, 13(8), 1211.
- Parisi, M., Enría, D., Pini, N., & Sabattini, M. (1996). Detección retrospectiva de infecciones clínicas por Hantavirus en la Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*, 1-13.
- Parrington, M. A., & Kang, C. Y. (1990). Nucleotide sequence analysis of the S genomic segment of Prospect Hill virus: comparison with the prototype hantavirus. *Virology*, 175(1), 167-175.

- Peters, C., Mills, J., Spiropoulou, C., Zaki, S., & P, R. (1999). Hantavirus Infections. En R. Guerrant, D. Walker, & P. Weller, *Tropical infectious diseases: principles, pathogens & practice* (págs. 762-780). Philadelphia
- Plyusnin, A., Vapalahti, O., & Vaheri, A. (1996). Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. *Journal of General Virology*, 77(11), 2677-2687.
- Plyusnin, A., & Morzunov, S. P. (2001). Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts. *Hantaviruses*, 47-75.
- Plyusnin, A. (2002). Genetics of hantaviruses: implications to taxonomy. *Archives of virology*, 147(4), 665-682.
- Plyusnin, A., & Sironen, T. (2014). Evolution of hantaviruses: co-speciation with reservoir hosts for more than 100 MYR. *Virus research*, 187, 22-26.
- Pybus, O. G., & Rambaut, A. (2009). Evolutionary analysis of the dynamics of viral infectious disease. *Nature reviews. Genetics*, 10(8), 540–550.
- Rambaut, A., Lam, T. T., Max Carvalho, L., & Pybus, O. G. (2016). Exploring the temporal structure of heterochronous sequences using TempEst (formerly Path-O-Gen). *Virus evolution*, 2(1), vew007.
- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., & Suchard, M. A. (2018). Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. *Systematic biology*, 67(5), 901–904.
- Ramsden, C., Melo, F. L., Figueiredo, L. M., Holmes, E. C., Zanutto, P. M., & VGDN Consortium. (2008). High rates of molecular evolution in hantaviruses. *Molecular biology and evolution*, 25(7), 1488-1492.
- Ramsden, C., Holmes, E. C., & Charleston, M. A. (2009). Hantavirus evolution in relation to its rodent and insectivore hosts: no evidence for codivergence. *Molecular biology and evolution*, 26(1), 143-153.
- Rivera, P. C., Ittig, R. E. G., Fraire, H. J. R., Levis, S., & Gardenal, C. N. (2007). Molecular identification and phylogenetic relationships among the species of the genus *Oligoryzomys* (Rodentia, Cricetidae) present in Argentina, putative reservoirs of hantaviruses. *Zoologica Scripta*, 36(3), 231-239.
- Rivera, P. C., Gonzalez-Ittig, R. E., & Gardenal, C. N. (2015). Preferential host switching and its relation with Hantavirus diversification in South America. *Journal of General Virology*, 96(9), 2531-2542.

- Rivera, P. C., González-Ittig, R. E., Robainas Barcia, A., Trimarchi, L. I., Levis, S., Calderón, G. E., & Gardenal, C. N. (2018). Molecular phylogenetics and environmental niche modeling reveal a cryptic species in the *Oligoryzomys flavescens* complex (Rodentia, Cricetidae). *Journal of Mammalogy*, 99(2), 363-376.
- Rivera, P.C., Trimarchi, L., Martin, M.L., Brignone, J., Levis, S., Gardenal, C.N., & González-Ittig, R.E (2019). Identificación molecular del hospedador natural del virus Maciel: ¿un hantavirus patogénico y uno no patogénico asociados a la misma especie de roedor?. XII Jornadas científica, Sociedad de Biología de Córdoba, Córdoba.
- Seijo, A., Pini, N., Levis, S., Coto, H., Deodato, B., Cernigoi, B., ... & Enría, D. (2003). Estudio de Hantavirus Seoul en una población humana y de roedores en un asentamiento precario de la Ciudad de Buenos Aires. *Medicina (Buenos Aires)*, 63(3), 193-196.
- Schmidt, H.A., Strimmer, K., Vingron, M., & von Haeseler, A. (2002). TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics*. Mar;18(3):502-4.
- Sen, C., Brignone, J., Calderón, G. L., García, J. & Levis, S. (2017). Caracterización genética del virus Bermejo en un caso de síndrome pulmonar por hantavirus y roedores de la provincia de Formosa. XII Congreso Argentino de Virología. V Simposio de Virología Clínica. III Simposio de Virología Veterinaria, Buenos Aires.
- Sibold, C., Meisel, H., Krüger, D. H., Labuda, M., Lysy, J., Kozuch, O., ... & Plyusnin, A. (1999). Recombination in Tula hantavirus evolution: analysis of genetic lineages from Slovakia. *Journal of Virology*, 73(1), 667-675.
- Simmons, J. H., & Riley, L. K. (2002). Hantaviruses: an overview. *Comparative medicine*, 52(2), 97-110.
- Sironen, T., Vaheri, A., & Plyusnin, A. (2001). Molecular evolution of Puumala hantavirus. *Journal of Virology*, 75(23), 11803-11810.
- Souza, W. M., Bello, G., Amarilla, A. A., Alfonso, H. L., Aquino, V. H., & Figueiredo, L. T. M. (2014). Phylogeography and evolutionary history of rodent-borne hantaviruses. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 198-204.
- Strimmer, K., & von Haeseler, A. (1997). Likelihood-mapping: a simple method to visualize phylogenetic content of a sequence alignment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(13), 6815–6819.

- Torres-Pérez, F., Palma, R. E., Hjelle, B., Holmes, E. C., & Cook, J. A. (2011). Spatial but not temporal co-divergence of a virus and its mammalian host. *Molecular Ecology*, 20(19), 4109-4122.
- Trifinopoulos, J., Nguyen, L.T., von Haeseler, A., & Minh, B.Q. (2016) W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Res.* 44(W1):W232-5. Disponible en <http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>
- Vaheri, A., Strandin, T., Hepojoki, J., Sironen, T., Henttonen, H., Mäkelä, S., & Mustonen, J. (2013). Uncovering the mysteries of hantavirus infections. *Nature Reviews Microbiology*, 11(8), 539-550.
- Vapalahti, O., Lundkvist, A., Fedorov, V., Conroy, C. J., Hirvonen, S., Plyusnina, A., Nemirov, K., Fredga, K., Cook, J. A., Niemimaa, J., Kaikusalo, A., Henttonen, H., Vaheri, A., & Plyusnin, A. (1999). Isolation and characterization of a hantavirus from *Lemmus sibiricus*: evidence for host switch during hantavirus evolution. *Journal of virology*, 73(7), 5586–5592.
- Villafañe, I. E. G., Burgos, E. F., Coelho, R. M., Bellomo, C. M., Amatti, J. G., & Martinez, V. P. (2021). Expanded distribution of hantavirus Pergamino genotype: First record in Entre Rios province, Argentina. *Revista Argentina de Microbiología*.
- Wells, R., Sosa Estani, S., Yadon, Z., Enría, D., Padula, P., Pini, N., ... & Segura, E. (1997). An unusual hantavirus outbreak in southern Argentina: person-to-person transmission? Hantavirus Pulmonary Syndrome Study Group for Patagonia. *Emerg Infect Dis*, 171-174.
- Weissenbacher, M., Merani, M., Hodara, V., de Villafañe, G., Gajdusek, D., Chu, Y., & Lee, H. (1990). Hantavirus infection in laboratory and wild rodents in Argentina. *Medicina*, 50, 43-46.
- Yadav, P. D., Vincent, M. J., & Nichol, S. T. (2007). Thottapalayam virus is genetically distant to the rodent-borne hantaviruses, consistent with its isolation from the Asian house shrew (*Suncus murinus*). *Virology Journal*, 4(1), 1-5.
- Zaki, S. R. (1995). Hantavirus pulmonary syndrome: pathogenesis of an emerging infectious disease. *The American journal of pathology*, 146(3), 552.
- Zhang, Y. Z., & Holmes, E. C. (2014). What is the time-scale of hantavirus evolution?. *Infection, Genetics and Evolution*, 25, 144.
- Zhang Y. Z. (2014). Discovery of hantaviruses in bats and insectivores and the evolution of the genus Hantavirus. *Virus research*, 187, 15–21.

5. ANEXO I

Identidades nucleotídicas para la variante Jaborá-like (Puerto Iguazú, Misiones) obtenidas a partir del alineamiento para el segmento genómico S.

	Asp34925
Asp34925_JABORA-like_Puertolguazu_MISIONES_2004-12-14	
JN232080_JABORA_Jabora_SantaCatarina_BRAZIL_2005	85,6
JN232079_JABORA_Jabora_SantaCatarina_BRAZIL_2006	85,6
MG575411_JABORA_ReservaMbaracayu_Canindayu_PARAGUAY_2014	91,8
GU205325_JABORA_ReservaMbaracayu_Canindeyu_PARAGUAY_2006	91,8
GU205332_JABORA_ReservaMbaracayu_Canindeyu_PARAGUAY_2007	92,2
GU205335_JABORA_ReservaMbaracayu_Canindeyu_PARAGUAY_2003	91,8

Identidades nucleotídicas para las variantes del virus Laguna Negra con circulación en NEA y NOA obtenidas a partir de los alineamientos para los segmentos genómicos S (a) y M (b).

(a)		64814	89672	83518	68344	70649	97875	Csp35537	Cf35543	Cf35544	Cf35585	Cf35590	Cf3559	Cf35602	Cf36539	Cf36553	Cf36556	Cf36557	Cf36578	EI36546
	64814_LAGUNA_NEGRA_LasLomitas_FORMOSA_2005-08-17																			
NEA	89672_LAGUNA_NEGRA_PampadellInfierno_CHACO_2015-07-03	96,7																		
	83518_LAGUNA_NEGRA_RoqueSaenzPena_CHACO_2012-05-04	97,2	97,6																	
	68344_LAGUNA_NEGRA_SsdeJujuy_JUJUY_2006-09-27	85,2	84,7	84,7																
	70649_LAGUNA_NEGRA_SanPedro_JUJUY_2007-07	84,9	84,5	84,5	98,4															
	97875_LAGUNA_NEGRA_LGSM_JUJUY_2011-06-06	84,9	84,5	84,5	98,4	99,5														
	Csp35537_LAGUNA_NEGRA_SanAntonio_JUJUY_2006-11-03	85,2	84,7	84,7	99,5	98,8	98,8													
	Cf35543_LAGUNA_NEGRA_SanAntonio_JUJUY_2006-11-03	85,2	84,7	84,7	98,8	99,1	99,1	99,3												
	Cf35544_LAGUNA_NEGRA_SanAntonio_JUJUY_2006-11-03	85,2	84,7	84,7	98,8	99,1	99,1	99,3	100,0											
	Cf35585_LAGUNA_NEGRA_SanAntonio_JUJUY_2006-11-04	85,2	84,7	85,2	98,8	99,1	99,1	99,3	99,5	99,5										
NOA	Cf35590_LAGUNA_NEGRA_SanAntonio_JUJUY_2006-11-04	85,2	84,7	84,7	98,8	99,1	99,1	99,3	100,0	100,0	99,5									
	Cf35599_LAGUNA_NEGRA_SanAntonio_JUJUY_2006-11-04	85,2	84,7	84,7	99,5	98,8	98,8	100,0	99,3	99,3	99,3	99,3								
	Cf35602_LAGUNA_NEGRA_SanAntonio_JUJUY_2006-11-05	85,4	84,9	84,9	99,1	99,3	99,3	99,5	99,8	99,8	99,8	99,8	99,5							
	Cf36539_LAGUNA_NEGRA_Yuto_JUJUY_2011-05-17	84,7	84,2	84,2	97,6	98,8	98,8	98,1	98,4	98,4	98,4	98,4	98,1	98,6						
	Cf36553_LAGUNA_NEGRA_Yuto_JUJUY_2011-05-17	84,9	84,5	84,5	98,4	99,5	99,5	98,8	99,1	99,1	99,1	99,1	98,8	99,3	99,3					
	Cf36556_LAGUNA_NEGRA_Yuto_JUJUY_2011-05-17	85,4	84,9	84,9	97,9	99,1	99,5	98,4	98,6	98,6	98,6	98,6	98,4	98,8	98,4	99,1				
	Cf36557_LAGUNA_NEGRA_Yuto_JUJUY_2011-05-17	85,2	84,7	84,7	98,6	99,3	99,3	99,1	99,3	99,3	99,3	99,3	99,1	99,5	99,1	99,8	98,8			
	Cf36578_LAGUNA_NEGRA_Yuto_JUJUY_2011-05-17	85,4	84,9	84,9	97,9	99,1	99,5	98,4	98,6	98,6	98,6	98,6	98,4	98,8	98,4	99,1	100,0	98,8		
	EI36546_LAGUNA_NEGRA_Yuto_JUJUY_2011-05-17	84,9	84,5	84,5	98,4	99,5	99,5	98,8	99,1	99,1	99,1	99,1	98,8	99,3	99,3	100,0	99,1	99,8	99,1	
	JX443685_LAGUNA_NEGRA2_SantoAlfonso_MatoGrosso_BRAZIL_2006	84,5	85,9	86,4	87,3	87,8	87,3	87,3	87,3	87,3	87,5	87,3	87,3	87,3	87,5	87,8	87,3	87,5	87,3	87,8
	JX443689_LAGUNA_NEGRA2_CampoNovodosPerecis_MatoGrosso_BRAZIL_2006	84,2	85,2	86,1	88,2	88,5	88,0	88,2	88,2	88,2	88,5	88,2	88,2	88,2	88,2	88,8	88,0	88,2	88,0	88,5
	JX443681_LAGUNA_NEGRA2_MatoGrosso_BRAZIL_2007	83,5	84,9	85,4	87,3	87,8	87,3	87,3	87,3	87,3	87,5	87,3	87,3	87,3	87,3	87,1	87,8	87,3	87,5	87,8
	JX443684_LAGUNA_NEGRA2_TangaradaSerra_MatoGrosso_BRAZIL_2007	84,5	85,9	86,4	87,3	87,8	87,3	87,3	87,3	87,3	87,5	87,3	87,3	87,3	87,1	87,8	87,3	87,5	87,3	87,8
	JX443704_LAGUNA_NEGRA2_NuevaOlimpia_MatoGrosso_BRAZIL_2007	84,5	85,9	86,4	87,8	88,2	87,8	87,8	87,8	87,8	88,0	87,8	87,8	87,8	87,5	88,2	87,8	88,0	87,8	88,2
	KP202359_LAGUNA_NEGRA_MatoGrosso_BRAZIL_2010	84,5	85,9	86,4	87,5	88,0	87,5	87,5	87,5	87,5	87,8	87,5	87,5	87,5	87,5	88,0	87,5	87,8	87,8	88,0
	AF005727_LAGUNA_NEGRA_MontePalma_Presidentehayes_PARAGUAY_1995	96,7	96,7	97,6	84,7	84,5	84,5	84,7	84,7	84,7	85,2	84,7	84,7	84,9	84,2	84,5	84,9	84,7	84,9	84,5
	FJ816031_LAGUNA_NEGRA_CampoNovodosPerecis_MatoGrosso_BRAZIL_2008	84,0	84,9	85,9	88,5	88,7	88,2	88,5	88,5	88,5	88,7	88,5	88,5	88,5	88,0	88,2	88,5	88,2	88,7	88,7

(b)		64814	89672	68172	70649	71617	68344	97875	As35540	As35603	Cf35585	Cf35590	Cf35599	Cf35602	Cf36539	Cf36553	Cf36638	Cf36556	EI36546
	64814_LAGUNA_NEGRA_LasLomitas_FORMOSA_2005-08-17																		
NEA	89672_LAGUNA_NEGRA_PampadellInfierno_CHACO_2015-07-03	95,2																	
	68172_LAGUNA_NEGRA_ElCarmen_JUJUY_2006-07	82,3	81,7																
	70649_LAGUNA_NEGRA_SanPedro_JUJUY_2007-07	82,1	82,1	98,9															
	71617_LAGUNA_NEGRA_SanPedro_JUJUY_2008-05	82,3	82,3	99,2	99,7														
	68344_LAGUNA_NEGRA_SsdeJujuy_JUJUY_2006-09-27	82,1	82,6	99,2	99,2	99,5													
	97875_LAGUNA_NEGRA_LGSM_JUJUY_2017-06-06	82,0	82,0	98,4	98,4	98,7	98,9												
	As35540_LAGUNA_NEGRA_SanAntonio_JUJUY_2006-11-03	82,8	82,8	98,9	98,9	99,2	99,2	98,4											
	As35603_LAGUNA_NEGRA_SanAntonio_JUJUY_2006-11-05	82,3	82,3	99,5	99,5	99,7	99,7	98,9	99,5										
	Cf35585_LAGUNA_NEGRA_SanAntonio_JUJUY_2006-11-04	82,3	82,3	99,5	99,5	99,7	99,7	98,9	99,5	100,0									
NOA	Cf35590_LAGUNA_NEGRA_SanAntonio_JUJUY_2006-11-04	82,0	82,0	99,2	99,2	99,5	99,5	98,7	99,2	99,7	99,7								
	Cf35599_LAGUNA_NEGRA_SanAntonio_JUJUY_2006-11-04	82,0	82,0	99,2	99,2	99,5	99,5	98,7	99,2	99,7	99,7	99,5							
	Cf35602_LAGUNA_NEGRA_SanAntonio_JUJUY_2006-11-05	82,8	82,8	98,9	98,9	99,2	99,2	98,4	100,0	99,5	99,5	99,2	99,2						
	Cf36539_LAGUNA_NEGRA_Yuto_JUJUY_2011-05-17	81,7	81,7	98,9	98,9	99,2	99,2	98,4	98,9	99,5	99,5	99,2	99,2	98,9					
	Cf36553_LAGUNA_NEGRA_Yuto_JUJUY_2011-05-17	81,7	81,7	98,4	98,4	98,7	98,6	97,8	98,4	98,9	98,9	98,7	98,7	98,4	99,5				
	Cf36638_LAGUNA_NEGRA_Yuto_JUJUY_2011-05-18	81,7	81,7	98,9	98,9	99,2	99,2	98,4	98,9	99,5	99,5	99,2	99,2	98,9	100,0	99,5			
	Cf36556_LAGUNA_NEGRA_Yuto_JUJUY_2011-05-17	82,3	82,3	98,9	98,9	99,2	99,2	99,5	98,9	99,5	99,5	99,2	99,2	98,9	98,9	98,4	98,9		
	EI36546_LAGUNA_NEGRA_Yuto_JUJUY_2011-05-17	81,7	81,7	98,4	98,4	98,7	98,6	97,8	98,4	98,9	98,9	98,7	98,7	98,4	99,5	100,0	99,5	98,4	
	JX891631_LAGUNA_NEGRA_Yuto_Jujuy_ARGENTINA_2000	82,5	82,0	98,4	98,1	98,4	98,4	98,1	98,1	98,7	98,7	98,4	98,4	98,1	98,1	98,1	98,1	98,7	98,1
	JX443703_LAGUNA_NEGRA2_NovaOlimpia_MatoGrosso_BRASIL_2007	81,7	82,0	83,9	84,0	84,1	84,2	83,6	83,6	84,1	84,1	83,9	83,9	83,6	84,1	84,1	84,1	83,6	84,1
	AF005728_LAGUNA_NEGRA_MontePalma_PresidenteHayes_PARAGUAY_1995	97,0	95,7	82,0	82,4	82,0	82,3	81,7	82,5	82,0	82,0	81,7	81,7	82,5	81,5	81,5	81,5	82,0	81,5