



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

RELACIÓN ENTRE LA ESTRUCTURA DE COMUNIDADES Y LA INFECCIÓN POR HANTAVIRUS EN DOS ESCALAS ESPACIALES EN ROEDORES DEL NOROESTE DE CHIHUAHUA, MÉXICO.

TESIS

**QUE PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**PRESENTA
ANA LAURA VIGUERAS GALVÁN**

TUTOR PRINCIPAL: DR. RAFAEL ÁVILA FLORES
Maestría en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal

COMITÉ TUTOR: DRA. ROSA ELENA SARMIENTO SILVA
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

DR. GERARDO SUZÁN AZPIRI.
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM

México D. F.

Noviembre 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIAS

Con todo mi amor y dedicación a mi querida familia.

A mis padres por su amor incondicional, alentarme en cada paso y darme una vida plena.

A mis hermanas por su gran cariño y acompañarme en los momentos de alegría y retos de la vida.

A mi sobrino-hermano por darme tantas alegrías y soportar mi ausencia.

A mis abuelas y abuelo por ser ejemplo de vida.

Gracias por enseñarme la lucha constante y libertad eterna.

Con cariño y lealtad a mis amigas.

Liliana Suárez, Montserrat García, Marina Orozco, María José Tolsá, Paola Martínez y Yatzry Linares, gracias por todo su cariño y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

Mi infinito agradecimiento a mis tutores:

Rosa Elena Sarmiento, por recibirme en el laboratorio, la paciencia y confianza, por ser mi mentora en el maravilloso mundo de la virología y alentarme a dar siempre lo mejor.

Gerardo Suzán, por haberme recibido en su equipo de trabajo hace unos cuantos años, invitarme a este proyecto, la confianza, consejos y asesoría para lograr este trabajo. Por la convivencia y amistad.

Rafael Ávila, por sus consejos, paciencia, asesoría, amistad y convivencia amena en este trayecto.

A los miembros del jurado

Dra. Susana Mendoza, Dr. Francisco Galindo y

Dr. Joel Vázquez, por su apoyo en el análisis molecular en el laboratorio de virología del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias.

Al Dr. Tony Schountz por su apoyo en el diagnóstico serológico y estancia en el laboratorio de Enfermedades Infecciosas Transmitidas por Artrópodos de la Universidad del Estado de Colorado.

Al equipo Janitos, André Rubio (Jefe) por siempre orientarme y aconsejarme en este trabajo, por ser amigo y símbolo de confianza. Adriana Fernández por ser parte de este reto, por tu comprensión y confianza. A mis amigos del grupo de *Ecología de Enfermedades*, Paola Martínez y Oscar Rico por su orientación en la parte estadística

Al Laboratorio de Virología de la FMVZ-UNAM, amigos y compañeros del mismo Liliana Suárez, Marina Orozco, Montserrat García, Tere López y Mario Palma, a los técnicos del laboratorio Armando, Alejandra, Manuel y Don Mario.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el financiamiento otorgado para esta investigación.

RESUMEN

Algunos estudios sugieren que los hantavirus pueden incrementar la prevalencia de la infección en los roedores hospederos que habitan en comunidades con una diversidad baja (efecto de dilución). El objetivo de este estudio fue evaluar la relación entre la prevalencia de anticuerpos de hantavirus y la estructura de las comunidades de roedores en dos escalas espaciales en el noroeste de Chihuahua, México. Se colectaron muestras de roedores de la región de Janos-Casas Grandes (escala regional), en cinco localidades (escala local) en dos temporadas (primavera y otoño) del 2012. Se colectaron un total de 385 muestras de roedores pertenecientes a 13 especies, la prevalencia de anticuerpos en la región fue de 9.87%. Se analizaron mediante RT-PCR muestras de órganos de 34 individuos de 11 especies de las cuales no se identificó el genoma viral. Se realizaron Modelos Lineales Generalizados (MLG) para establecer la relación entre los parámetros comunitarios con la prevalencia de anticuerpos en ambas escalas espaciales. Se observó una relación negativa estadísticamente significativa a escala regional, mientras que a escala local no se encontró ninguna relación estadísticamente significativa. Este estudio apoya el efecto de dilución de hantavirus a escala regional, demostrando la importancia de abordar la relación entre los patógenos zoonóticos con la diversidad y composición de especies de comunidades de roedores a distintas escalas espaciales, así como también considerar las interacciones interespecíficas en escalas más finas, que podrían tener un papel importante en la transmisión de este virus entre especies que no se han reportado como reservorios del virus.

Palabras clave: Diversidad, Hantavirus, Efecto de Dilución, Escala Espacial.

ABSTRACT

Some studies suggest that hantavirus may increase the prevalence of infection in the host rodents living in communities with low diversity (dilution effect). The aim of this study was to evaluate the relationship between the prevalence of hantavirus antibodies and community structure of rodents in two spatial scales in northwestern Chihuahua, Mexico. Rodent samples from the region of Janos-Casas Grandes (regional scale) were collected into five localities (local scale) in two seasons (spring and autumn) 2012. A total of 385 samples from 13 rodent species were collected, the prevalence of antibodies in the region was 9.87%. Were analyzed by RT-PCR organ samples of 34 individuals of 11 species of which no viral genome was identified. Generalized Linear Models (GLM) were performed to establish the relationship between community parameters with the prevalence of antibodies in both spatial scales. A statistically significant negative relationship at regional level was observed, while locally it is no statistically significant relationship was found. This study supports the dilution effect of hantavirus regional scale, demonstrating the importance of addressing the relationship between zoonotic pathogens to diversity and species composition of rodent communities at different spatial scales, as well as consider interspecific interactions on scales more fine, which could have an important role in the transmission of this virus between species that have not been reported as reservoirs of the virus.

Keywords: Diversity, Hantavirus, Scale Space.

ÍNDICE

DEDICATORIAS	I
AGRADECIMIENTOS	II
RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
ÍNDICE	V
LISTA DE CUADROS	VI
LISTA DE FIGURAS	VI
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
DIVERSIDAD Y ENFERMEDADES INFECCIOSAS	3
HANTAVIRUS	6
HIPÓTESIS	9
OBJETIVOS	9
OBJETIVO GENERAL	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
METODOLOGÍA	10
ÁREA DE ESTUDIO	10
DISEÑO DE MUESTREO EN ESCALAS ESPACIALES	10
MANEJO DE INDIVIDUOS Y OBTENCIÓN DE MUESTRAS	12
ANÁLISIS DE LABORATORIO	13
ANÁLISIS DE DATOS	14
RESULTADOS	17
ANÁLISIS DE DIVERSIDAD	17
ANÁLISIS DE LABORATORIO	22
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	24
DISCUSIÓN	29
CONCLUSIONES	37
ABREVIATURAS Y SIGLAS	38
REFERENCIAS	40
ANEXO I. ENSAYO INMUNO-ENZIMÁTICO PROTEÍNA A/G PARA MUESTRAS CONSERVADAS EN TIRAS NOBUTO	49
ANEXO II. DIAGNÓSTICO MOLECULAR MEDIANTE RT-PCR	52

LISTA DE CUADROS

- Cuadro 1. Genotipos de hantavirus y sus reservorios de Norteamérica.
- Figura 2. Mapa de localización de los sitios de muestreo.
- Cuadro 3. Número de cuadrantes por tipo de hábitat.
- Cuadro 4. Riqueza y diversidad de especies por localidad.
- Cuadro 5. Prevalencia de anticuerpos por región.
- Cuadro 6. Muestras utilizadas para el análisis molecular
- Cuadro 7. Modelo a escala regional.
- Cuadro 8. Modelo de especies del complejo JCNG
- Cuadro 9. Modelo de cricétidos.
- Cuadro 10. Modelo de reservorios.
- Cuadro 11. Modelo de heterómidos.
- Cuadro 12. Modelos de la localidad Rancho Ojitos.
- Cuadro 13. Modelos de la localidad Monte Verde.
- Cuadro 14. Modelos de la localidad El Cuervo.
- Cuadro 15. Modelos de la localidad Mata Ortiz.
- Cuadro 16. Modelos de la localidad Pancho Villa.
- Cuadro 17. Modelo por Localidad.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Diseño del muestreo.
- Figura 2. Mapa de localización de los sitios de muestreo.
- Figura 3. Manejo de individuos.
- Figura 4. Composición de especies del complejo JCNG.
- Figura 5. Dendrograma de similitud del complejo JCNG
- Figura 6. Composición de especies por localidad.
- Figura 7. Dendrograma de similitud de las subregiones.
- Figura 8. Prevalencia de anticuerpos por especies del complejo JCNG.
- Figura 9. Prevalencia de anticuerpos por especie por región.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años se han reportado enfermedades emergentes y reemergentes alrededor del mundo, la mayoría de ellas de son zoonóticas (Jones *et al.*, 2008). Entre las enfermedades zoonóticas, el mayor porcentaje tuvo su origen en fauna silvestre (Jones *et al.*, 2008). En América varias de estas enfermedades son reportadas con frecuencia, como malaria, dengue, leishmaniasis, oncocercosis, lepra, peste bubónica, tripanosomiasis, leptospirosis, rickettsiosis, fiebre y encefalitis del oeste del Nilo, fiebres hemorrágicas por arenavirus (FHA), síndrome pulmonar por hantavirus (SPH), entre otras (Gubler *et al.*, 2001, Peterson *et al.*, 2008, Suzán *et al.*, 2009).

La relación entre la diversidad de especies y la transmisión de enfermedades es dinámica y compleja. Se ha evidenciado que la diversidad de especies es relevante en la transmisión de patógenos (Keesing F. *et al.*, 2010), por ejemplo, cambios en la composición de la comunidad de especies hospedadoras pueden alterar la dinámica de los patógenos, aumentando (efecto de amplificación) o disminuyendo (efecto de dilución) potencialmente la prevalencia de los agentes infecciosos (Keesing *et al.*, 2006). Se ha sugerido que el efecto de dilución ocurre en diferentes ambientes y patógenos transmitidos por vectores como *Borrelia burgdorferi* y virus del Oeste del Nilo (Ostfeld y Keesing, 2000, Ezenwa *et al.*, 2006) y patógenos de transmisión directa como el parásito *Ribeiroia ondatrae* en anfibios y enfermedades fúngicas en plantas y anfibios (Johnson *et al.*, 2008, Searlea *et al.*, 2011) sin embargo este fenómeno ha sido escasamente estudiado en patógenos de transmisión directa como los hantavirus.

La escala espacial puede darnos una percepción de la dinámica de los patógenos en las comunidades de hospedadores. La escala espacial es una aproximación para entender mejor la dinámica hospedadores-patógenos (Hess, 2002, Ostfeld *et al.*, 2005) y para evaluar el posible papel de la diversidad a distintos niveles. En el

estudio de ecología de enfermedades son importantes los patrones espaciales ya que pueden determinar la presencia y distribución de los patógenos, por ejemplo, la dispersión del patógeno puede estar influenciada por la distribución de sus reservorios o vectores, (Ostfeld *et al.*, 2005). Los patrones espaciales como la distancia entre las comunidades de hospederos infectados con comunidades de hospederos susceptibles, también influye en los patrones de dispersión de los patógenos ya que la probabilidad de transmisión disminuye con la distancia entre un huésped infectado y el susceptible (Ostfeld *et al.*, 2005, Suzuki *et al.*, 2004). Es necesario realizar estudios a diferentes escalas espaciales para observar la relación entre la prevalencia de los patógenos y los atributos de las comunidades, como la composición de las especies, la abundancia de las especies y de los reservorios en hábitats heterogéneos dentro de una misma región geográfica.

Los hantavirus son agentes infecciosos emergentes, que pueden ser estudiados para analizar el efecto de dilución en patógenos de transmisión directa en patrones espaciales locales y regionales. Los hantavirus se caracterizan por tener como reservorios a roedores de la familia Muridae. Estos virus generalmente presentan pocos reservorios competentes y su transmisión entre los roedores es horizontal mediante el contacto directo (Mills, 2006, Yates *et al.*, 2002). Los hantavirus son causantes de la Fiebre Hemorrágica con Síndrome Renal (FHSR) en humanos, se distribuye en países de Asia y Europa, mientras que el Síndrome Pulmonar por Hantavirus (SPH) se distribuye en el continente americano. Los reservorios de hantavirus son roedores de la subfamilia Sigmodontinae. En Estados Unidos de América (EUA) la mayoría de los reportes de hantavirus en roedores corresponden a los estados de Florida, Texas, Oklahoma, Nuevo México, Colorado, Utah, Arizona y California. En México existen reportes de roedores seropositivos al hantavirus Sin Nombre Virus en diferentes estados del país (Castro-Arellano *et al.*, 2009, Suzán *et al.*, 2001, Chu *et al.*, 2008), así como evidencia molecular de nuevos hantavirus (Kariwa *et al.*, 2012, Chu *et al.*, 2008). Algunas investigaciones han encontrado que para más de 120 especies de

roedores pertenecientes a la subfamilia de sigmodontinos en México, aproximadamente 80 pertenecen a géneros que son reservorios para hantavirus (Ramos, 2008). Es necesario ampliar el estudio en la región noroeste de México, por la similitud de composición de especies de roedores con la región suroeste de EUA donde se han reportado casos de Síndrome Pulmonar por Hantavirus.

El presente estudio aborda la importancia de la escala espacial, como una aproximación para entender la relación entre la estructura de las comunidades de roedores y la prevalencia de anticuerpos, considerando atributos comunitarios como la diversidad, la abundancia relativa y la composición de especies, así como la abundancia de los roedores por familia y por especies.

ANTECEDENTES

Diversidad y enfermedades infecciosas.

La diversidad biológica que encontramos en una región es resultado de diferentes procesos ecológicos y evolutivos que se llevan a cabo a través del tiempo (Dirzo and Raven., 2003). Los atributos de la biodiversidad determinan la magnitud de los procesos ecosistémicos y su capacidad para brindar servicios al modular la productividad, el reciclaje de nutrientes, los ciclos biogeoquímicos, así como la regulación de enfermedades y/o sus vectores (Díaz *et al.*, 2006, Hooper *et al.*, 2005, Balvanera *et al.*, 2006).

En la regulación de las enfermedades, el mantenimiento de las relaciones entre los componentes de la biodiversidad y de las interacciones bióticas es importante (Díaz *et al.*, 2006). La relación entre biodiversidad y las enfermedades infecciosas es dinámica y compleja, se ha evidenciado que la diversidad de especies juega un papel relevante en la transmisión de patógenos (Keesing F. *et al.*, 2010). La

dinámica de la enfermedad depende de la riqueza y composición de especies de la comunidad en cuestión ya que la presencia y abundancia de especies reservorios del patógeno regulan su transmisión dentro de la comunidad así como también el potencial riesgo de su transmisión al humano en el caso de agentes zoonóticos. Esta regulación se ve amenazada por las altas tasas de pérdida de biodiversidad, esto puede derivar en impactos ecológicos y epidemiológicos de magnitud considerable (Peixoto y Abramson, 2006).

Keesing y Ostfeld (2006) desarrollaron modelos del papel de la diversidad en la transmisión de enfermedades en los que implican las interacciones entre patógeno-hospedero, patógeno-vector-hospedero y patógeno-multihospederos. Estos modelos dan una visión del potencial riesgo de la enfermedad, explican los mecanismos de transmisión que pueden resultar en dos posibles efectos, amplificación o reducción de la prevalencia de los agentes infecciosos (Keesing *et al.*, 2006).

El efecto de dilución se produce cuando una alta biodiversidad disminuye la prevalencia del patógeno. Este patrón se puede dar por la reducción de la tasa de encuentro entre los individuos infectados y los individuos susceptibles, la reducción de tasa de transmisión, la reducción de la abundancia de los reservorios o el aumento en la mortalidad o recuperación de los individuos infectados (Keesing *et al.*, 2006). El efecto de amplificación se produce cuando existe una relación positiva entre la biodiversidad y la prevalencia del patógeno, esto puede pasar en las comunidades de baja diversidad en que las especies de reservorios competentes son abundantes o la adición de nuevas especies que son capaces de adquirir y transmitir al patógeno fácilmente (Keesing *et al.*, 2006).

En diferentes estudios se ha observado la relación entre de diversidad de especies y la prevalencia de patógenos, principalmente en las transmitidas por vectores, por ejemplo, la enfermedad de Lyme causada por *Borrelia burgdorferi* y transmitida

por garrapatas del género *Ixodes*, las garrapatas se alimentan de diferentes especies de vertebrados pero las especies hospederas difieren en la capacidad de transmitir la infección, los ratones *Promyscus lucopus* son capaces de alimentar e infectar a las garrapatas, mientras que otros vertebrados no son capaces de infectar a la garrapata (LoGiudice et al., 2003, Brisson y Dykhuizen, 2006), en zonas donde este roedor es abundante existe un mayor riesgo de transmisión de la bacteria al humano (Ostfeld y LoGiudice, 2003.). Otro ejemplo es el Virus del Oeste del Nilo (VON) transmitido por mosquitos que infecta a un amplio rango de hospederos vertebrados, en la dinámica de transmisión de este virus se encontró que existe una relación negativa entre la riqueza de especies de aves no paseriformes y la prevalencia de infección en los mosquitos *Culex* en una escala local (Ezenwa et al., 2006), se observó esta misma tendencia en una escala regional y con la incidencia de la enfermedad en humanos a nivel país en Estados Unidos de América (Allan et al., 2009).

Existen otros estudios de patógenos que su transmisión no implica la participación de un vector en los que también se ha demostrado la asociación de la diversidad con la prevalencia del patógeno. El parásito *Ribeiroia ondatrae* el cual afecta a anfibios, se observó experimentalmente que en comunidades monoespecíficas la infección aumentó, mientras que en comunidades en las que se añadieron especies la infección disminuyó significativamente (Johnson et al., 2008). Searle et al., (2011) observó en su estudio experimental del hongo *Batrachochytrium dendrobatidis* que afecta a anfibios, que al aumentar la riqueza de especies reduce el riesgo de la enfermedad en las larvas de anfibios. En el caso de los hantavirus transmitidos por roedores, se ha demostrado que una alta diversidad de especies disminuye la prevalencia del virus en sus hospederos y por lo tanto su transmisión (Dizney y Ruedas, 2009, Suzán et al., 2009)

Hantavirus

Generalidades

Los hantavirus pertenecen a la familia viral *Buyaviridae*; el genoma del virón de hantavirus es ARN trisegmentado de cadena sencilla y sentido negativo. Los segmentos codifican para tres diferentes proteínas, el segmento S (small) para la proteína de nucleocapside (NP), el L (large) para la ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) y el M (medium) para las dos glicoproteínas (Gn y Gc) de la envoltura del virón (Elliott *et al.*, 1994, Schmaljohn and Hjelle., 1997). La NP es el principal componente estructural viral, es abundantemente expresado en el citoplasma de las células infectadas, por lo que se considera como el antígeno viral más predominante en la respuesta inmune a la infección (Hussein *et al.*, 2011)

Los hantavirus producen Fiebre Hemorrágica con Síndrome Renal (FHRS) en Europa y Asia con una tasa de mortalidad de 0.1 a 15% (Muranyi *et al.*, 2005) (Kariwa *et al.*, 2007). Los virus que causan esta enfermedad incluyen al virus Hantaan (HTNV), Dobrava virus (DOBV), Puumala virus (PUUV) y Seoul virus (SEOV). En América producen el Síndrome Pulmonar por Hantavirus con una tasa de mortalidad de hasta el 40%, los virus que generan esta enfermedad en América incluyen a Sin Nombre virus (SNV), Andes virus (ANDV) y Laguna Negra virus (LANV) principalmente (Jonsson *et al.*, 2010). La infección ocurre por la inhalación de aerosoles provenientes de excretas de roedores infectados. Ambas enfermedades están principalmente asociadas a zonas rurales donde existen factores de riesgo por actividades humanas que propician el contacto con los roedores reservorios infectados (Simpson *et al.*, 2010).

Los reservorios naturales de los hantavirus son roedores pertenecientes a las familias Muridae (subfamilia Murinae) en Europa y Asia y Cricetidae (subfamilias Arvicolinae, Neotominae y Sigmodontinae) en América. Para los hantavirus de Europa y Asia son roedores de los géneros *Myodes*, *Rattus* y *Apodemus* (Hussein *et al.*, 2011), mientras que para los hantavirus de América se reconocen a los roedores del género *Peromyscus*, *Reithrodontomys*, *Sigmodon*, *Oryzomys*, *Oligoryzomys* y *Microtus* (Cuadro 1) como principales reservorios (Mills *et al.*, 2009) Se reporta que el virus en sus reservorios naturales la transmisión es horizontal por mordeduras y acicalamiento (Lee *et al.*, 1981a). En los roedores causa infección persistente y asintomática, lo que permite que el virus sea liberado por tiempo prolongado (Lee *et al.*, 1981b). Los hantavirus y sus reservorios roedores representan sistemas altamente coevolucionados, evolutivamente la relación virus-hospedero ha dado como resultado una relación de adaptación, se sugiere que la persistencia de los hantavirus está mediada tanto por el virus como por el reservorio (Easterbrook y Klein, 2008). Existen reportes de hantavirus en otras especies de roedores, murciélagos y marsupiales pero ninguno se ha asociado a enfermedad en humanos (Arai *et al.*, 2007, Kang *et al.*, 2009, Song *et al.*, 2007, de Araujo *et al.*, 2012), también se han reportado roedores de otros géneros como *Heteromys sp* y *Proecchimys sp* seropositivos para hantavirus (Alemán *et al.*, 2006).

Hantavirus en Norteamérica

En el año 1993 se registró un brote de una enfermedad respiratoria en la región de Four Corners en el suroeste de EUA dando como resultado la mortalidad del 70% de los pacientes afectados, el agente etiológico responsable de este brote fue un hantavirus nombrado Sin Nombre Virus y se denominó a la enfermedad como Síndrome Pulmonar por Hantavirus (Mills *et al.*, 1997) y se identificó como principal reservorio de este virus al roedor de la especie *Peromyscus maniculatus*. Desde el brote en la región de Four Corners, se han registrado nuevos hantavirus y sus reservorios en América (Schmaljohn y Hjelle., 1997, Peters y Khan, 2002,

Mills et al., 2009), tan sólo para Norteamérica se han reportado 16 hantavirus y sus reservorios (Cuadro 1).

En México existen reportes de roedores seropositivos a hantavirus (SNV) en los estados de Morelos, México, Tamaulipas, Distrito Federal, Colima, Oaxaca, Zacatecas, Hidalgo, Yucatán, Chiapas, Veracruz y Jalisco (Castro-Arellano *et al.*, 2009, Suzán *et al.*, 2001, Chu *et al.*, 2008). Se han realizado estudios mediante análisis moleculares a partir de tejidos de roedores en los que se identificaron un genotipo de hantavirus denominado Playa de Oro Virus (ORO) en Colima (Chu *et al.*, 2008) y variantes de otros genotipos, Montano (MTN), Carrizal (CAR) y Huitzilac (HUI) en Guerrero y Morelos (Kariwa *et al.*, 2012). No existen reportes del SPH en humanos, pero existen reportes de humanos seropositivos a hantavirus en Yucatán, Colima, Hidalgo, Guanajuato, Distrito Federal y Chihuahua entre el 0.6 y 1.6% de prevalencia de anticuerpos (Flores y Morales, 2001, Vado-Solís *et al.*, 2003). Es escasa la información sobre la ecología del hantavirus y sus reservorios, así como de los factores que pueden propiciar brotes epidémicos.

Cuadro 1. Genotipos de hantavirus y sus reservorios en Norteamérica

Virus	Reservorio	Distribución del virus	Enfermedad
Prospect Hill (PHV)	<i>Microtus pennsylvanicus</i>	Norteamérica	No reconocida
Bloodland Lake (BLLV)	<i>Microtus ochrogaster</i>	Norteamérica	No reconocida
Isla Vista (ISLAV)	<i>Microtus californicus</i>	Norteamérica	No reconocida
Sin Nombre Virus	<i>Peromyscus maniculatus</i>	Norteamérica	SPH
New York (NYV)	<i>Peromyscus leucopus</i>	Este y Centro de EUA	SPH
Monongahela (MGLV)	<i>P.maniculatus</i>	Este de EUA y Canadá	SPH
Limestone Canyon (LSCV)	<i>Peromyscus boylii</i>	Suroeste de EUA	No reconocida
Blue River (BRV)	<i>P.leucopus</i>	Centro de EUA	No reconocida
El Moro Canyon (ELMCV)	<i>Reithrodontomys megalotis</i>	Oeste de EUA y México	No reconocida
Black Creek Canal (BCCV)	<i>Sigmodon hispidus</i>	Sur de Florida	SPH
Bayou (BAYV)	<i>Oryzomys palustris</i>	Sureste de EUA	SPH
Mulshoe (MULEV)	<i>S. hispidus</i>	Texas y sureste de Nebraska	SPH
Playa de Oro (OROV)	<i>Oryzomys couesi</i>	Colima, México	No reconocida
Camp Ripley (RPLV)	<i>Blarina brevicauda</i>	Norteamérica	No reconocida
Ash River (ARRV)	<i>Sorex cinereus</i>	Minnesota, EUA	No reconocida
Jemez Spring (JMSV)	<i>Sorex monticolus</i>	Nuevo México, EUA	No reconocida

HIPÓTESIS

La estructura de las comunidades (diversidad y composición de especies) de roedores estará relacionada con la infección por hantavirus independientemente de la escala espacial.

OBJETIVOS.

Objetivo general

Evaluar la relación entre la diversidad de especies y la infección por hantavirus en comunidades de roedores de la región de Janos-Casas Grandes, Chihuahua en escala regional y local.

Objetivos específicos.

- Describir la estructura de comunidades de roedores de acuerdo a los parámetros comunitarios de riqueza y diversidad de especies, así como la abundancia de especies, familias y reservorios conocidos de hantavirus en escala regional y local.
- Comparar las comunidades de acuerdo a la disimilitud en la composición de especies.
- Estimar la prevalencia de anticuerpos contra hantavirus en las comunidades de roedores en escala regional y local.
- Realizar el diagnóstico molecular a partir de muestras de tejidos para confirmar la presencia del virus y determinar el genotipo de hantavirus que está circulando.
- Relacionar los parámetros de las comunidades de roedores con la prevalencia de anticuerpos contra hantavirus en escala local y regional.

METODOLOGÍA

Área de Estudio.

El muestreo se realizó en la región de Janos-Casas Grandes ubicada al noroeste del estado de Chihuahua. Esta región forma parte de la ecoregión del desierto chihuahuense, limita al sur y al este con la sierra madre occidental, al norte y oeste con praderas y serranías de Sonora y Estados Unidos de América. La vegetación está dominada por pastizales y matorrales en las planicies y bosques de encinos y coníferas en las laderas y partes altas de las montañas.

Diseño de muestreo en escalas espaciales.

Se definieron dos escalas espaciales para el muestreo. La primer escala “regional” (Figura 1) abarca el área ocupada por el complejo de colonias de perritos de la pradera de cola negra (*Cynomys ludovicianus*), denominado Janos-Nuevo Casas Grandes (Ceballos et al., 1993). Dentro de esta región se ubicaron cinco áreas de muestreo en diferentes porciones del complejo histórico de perritos de la pradera y separadas al menos 15 km, que corresponden a la escala “local”, tres de las subregiones de muestreo se encuentran dentro de la Reserva de la Biosfera de Janos y dos fuera de ella (Figura 2).

Figura 1. Diseño del muestreo.

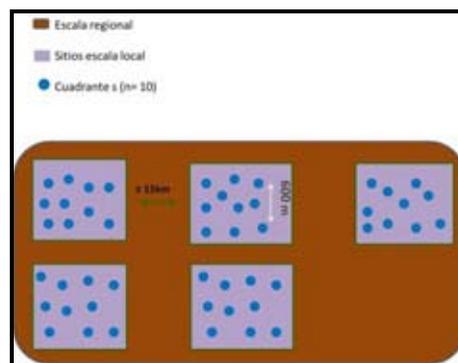
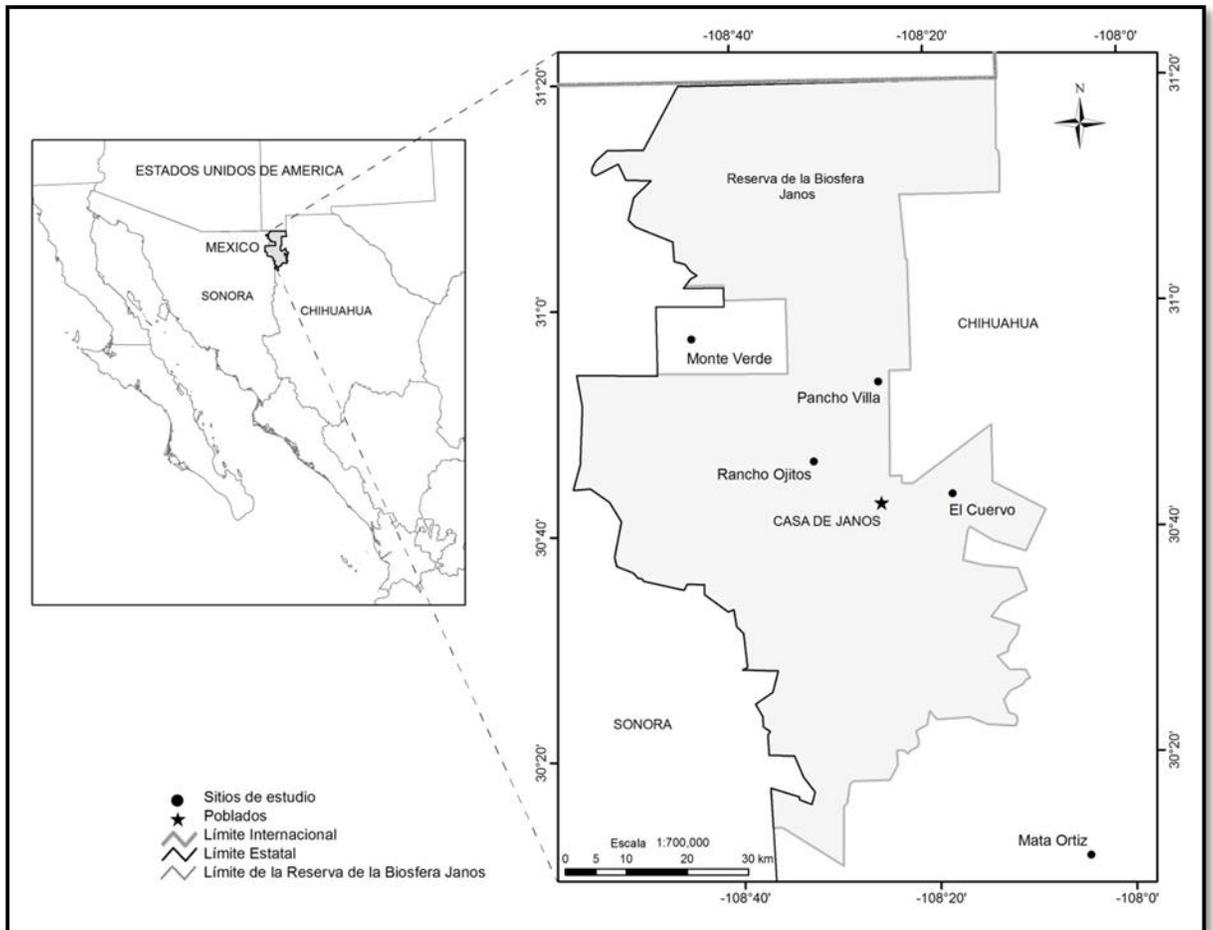


Figura 2. Mapa de localización de los sitios de muestreo



Cada subregión elegida representa la escala “local” del estudio. En cada una de ellas se colocaron 10 cuadrantes de captura de 2,500 m². de diferentes tipos de vegetación (pastizal, matorral xerófilo, matorral espinoso, izotal y coníferas) para maximizar la diversidad de especies por tipos de vegetación. En cada uno de los cuadrantes se colocaron 25 trampas tipo Sherman (5x5) separadas 10 m entre sí, fueron cebadas con avena y esencia de vainilla, y permanecieron abiertas durante tres noches consecutivas. El muestreo se realizó durante la primavera (abril-mayo de 2012) y el otoño (octubre) del 2012. El número de cuadrantes de acuerdo al tipo de hábitat se muestra en el cuadro 2.

Cuadro 2. Número de cuadrantes por tipo de hábitat

Subregión	MX	ME	PZ	C	IZ
Monte Verde	5	0	5	0	0
Pancho Villa	1	0	9	0	0
Rancho Ojitos	5	2	0	0	0
El Cuervo	1	0	7	0	2
Mata Ortiz	4	0	5	1	0

MX: Matorral xerófilo. ME: Matorral espinoso. PZ: Pastizal. C: Coníferas. IZ: Izotal

Manejo de individuos y obtención de muestras.

Los individuos capturados fueron identificados por especie con ayuda de la guía de campo de mamíferos de Norteamérica (Reid, 2006), se registraron medidas somáticas, estado reproductivo y fueron marcados con arete metálico numerado para la identificación de recapturas.

La obtención de las muestras de sangre fue por punción del plexo retroorbital, mediante tubo capilar heparinizado, las muestras se conservaron en tiras de papel filtro (nobuto strips®) a temperatura ambiente para su posterior análisis en laboratorio. Después de ser procesados los individuos fueron liberados en el sitio de captura (Figura 3). Se realizó eutanasia y necropsia para la colecta de órganos de algunos individuos identificados como reservorios del virus, para el análisis molecular, estas muestras fueron conservadas a -70°C sin ningún medio de conservación.

Las técnicas de captura, colecta de muestras y eutanasia fueron realizadas de acuerdo con los lineamientos de la Sociedad Norteamericana de Mastozoología (American Society of Mammalogists, Sikes *et al.*, 2011), y fueron aprobadas por el Subcomité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales Experimentales del Posgrado en Ciencias de la Salud y la Producción Animal-UNAM.

Figura 3. Manejo de individuos



Análisis de laboratorio.

Análisis serológico.

El diagnóstico se realizó en el laboratorio de Enfermedades Infecciosas Transmitidas por Artrópodos del departamento de Microbiología, Inmunología y Patología de la escuela de Veterinaria de la Universidad del Estado de Colorado, en Fort Collins, Colorado, con la colaboración del Dr. Tony Schountz.

El análisis serológico consistió en un Inmuno-Ensayo Enzimático (EIA) para la detección de anticuerpos IgG contra Sin Nombre Virus, modificado de lo descrito por Schountz, *et al.*, 2007. Esta técnica consiste en la utilización de un conjugado de proteína A/G de *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pneumoniae*, marcada con peroxidasa de rábano picante, las cuales reconocen la porción Fc de las Igs. El conjugado de proteínas tiene mayor afinidad por las IgGs (Anexo I), esta técnica ha sido probada y tiene una especificidad del 82.9% y sensibilidad del 97.1% (Schountz *et al.*, 2007).

Análisis molecular.

El análisis molecular se realizó a partir de muestras de tejidos de órganos de roedores, mediante un pool de órganos incluyendo riñón, pulmón y corazón, ya que son los órganos en los que se ha reportado una mayor replicación del virus (Botte *et al.*, 2000)

Se realizó mediante una PCR hemi-anidada utilizando cebadores altamente degenerados para la detección del segmento S del virus, de acuerdo al protocolo P-010 descrito en la versión 1 del Laboratory Protocols for PREDICT Surveillance.

La extracción de ácidos nucleicos se realizó mediante una combinación de purificación por Trizol® (Invitrogen) y paso por columna con el kit QIAamp Viral RNA Mini Kit® (Qiagen). La primera vuelta del protocolo se utilizó el kit OneStep® (Qiagen) que incluye la retrotranscripción y en segunda vuelta se utilizó TaqPolimerase platinum®. Para observar los amplicones se utilizó gel de agarosa al 1.5 % y como colorante GelRed® para la visualización de los amplicones. Los pasos detallados de este análisis se describen en el anexo II.

Análisis de datos

Análisis de diversidad.

Para el análisis de diversidad en ambas escalas se estimaron:

- Riqueza específica (S) la cual corresponde al número de especies presentes en la comunidad.
- Abundancia relativa (Ar) por especie, por familia de roedores (cricétidos y heterómidos) y por reservorios. La abundancia relativa es expresada como el porcentaje de individuos pertenecientes a cada grupo o taxón en relación con el total de individuos capturados.

- Índice de diversidad de Simpson (1-D), que mide la probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar sean de la misma especie. La fórmula para calcular este índice es

$$\lambda = \sum p_i^2$$

Donde:

p_i = abundancia proporcional de la especie i , es decir, el número de individuos de la especie i dividido entre el número total de individuos de la muestra.

Este índice varía inversamente con la heterogeneidad, aunque es deseable que valores altos del índice correspondan a valores altos de diversidad. Para ello se sustrae de 1 el resultado obtenido de D, en este caso el valor máximo es cercano a 1, los valores obtenidos cercanos a 1 son comunidades con mayor diversidad.

- Coeficiente de similitud de Jaccard, que expresa el grado en el que dos muestras (comunidades) son semejantes de acuerdo con las especies presentes. Mide la similitud en la composición de especies entre las comunidades. La fórmula para calcular este coeficiente es:

$$I_J = \frac{c}{a + b - c}$$

Donde

a = número de especies presentes en el sitio A

b = número de especies presentes en el sitio B

c = número de especies presentes en ambos sitios A y B

Con este coeficiente se construyeron dendrogramas de similitud.

Análisis estadístico.

Los datos obtenidos se analizaron con un enfoque correlativo utilizando modelos lineales generalizados (MLG) para evaluar la relación entre los parámetros comunitarios y la identidad de las especies con la prevalencia de anticuerpos en escala regional y local. Para realizar estos modelos previamente se construyó una matriz de correlación entre todas las variables explicativas para eliminar aquellas variables altamente correlacionadas y fueron excluidas de los MLG.

Los modelos de la escala regional se construyeron empleando como unidad de análisis los cuadrantes de toda la región (escala regional; n=43) y como variable dependiente la prevalencia de anticuerpos. El primer modelo incluyó como variables explicativas el inverso del índice de Simpson (1-D), la abundancia relativa de cricétidos y abundancia relativa de reservorios. En el segundo modelo la variable dependiente fue la prevalencia de anticuerpos y como variables explicativas las especies independientemente de la familia a la que pertenecen, así como también por familia y por especies de reservorios.

Los modelos de la escala local se construyeron empleando como unidad de análisis los cuadrantes por cada localidad (escala local; n= 7 a 10). La variable dependiente fue la prevalencia de anticuerpos y las variables explicativas el inverso del índice de Simpson (1-D) y las abundancias relativas de cricétidos. Adicionalmente se construyó un modelo que incluyó como variable explicativa la región como una variable categórica.

En todos los modelos se utilizó la función de distribución de errores "*binomial*" y función de enlace "*logit*".

RESULTADOS

Análisis de Diversidad.

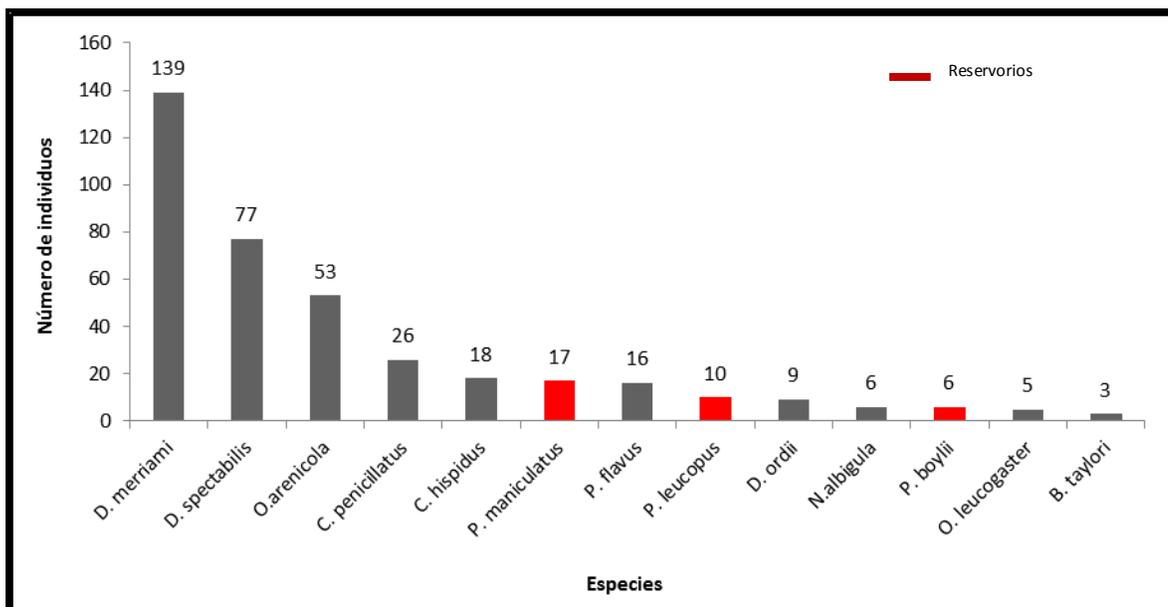
Escala Regional

El esfuerzo de captura fue de 7500 noches trampa para la región JCNG, se capturaron un total de 385 roedores de 2 familias, 7 géneros y 13 especies. El esfuerzo de captura fue de 150 noches trampa por cada cuadrante. Se obtuvieron capturas en 43 cuadrantes.

Riqueza específica: Para el complejo JCNG se registró una riqueza de 13 especies. El 29% de los cuadrantes presentaron una riqueza de 6 especies, que fue el valor máximo, mientras que el 5% de los cuadrantes tuvieron una riqueza de una especie. A nivel regional se observó una riqueza de 7 especies de cricétidos y 6 de heterómidos; sólo se registraron 3 especies de reservorios, *P. boylii*, *P. maniculatus* y *P. leucopus* en todo el complejo JCNG.

Abundancia Relativa (Ar): La familia más abundante fue la Heteromyidae con el 74% de los individuos capturados, mientras que la Cricetidae fue menos abundante con el 26% de los individuos capturados. La especie más abundante fue *Dypodomys merriami* y la menos abundante *Bayomys taylori*, las abundancias relativas de los reservorios fueron bajas (Figura 4).

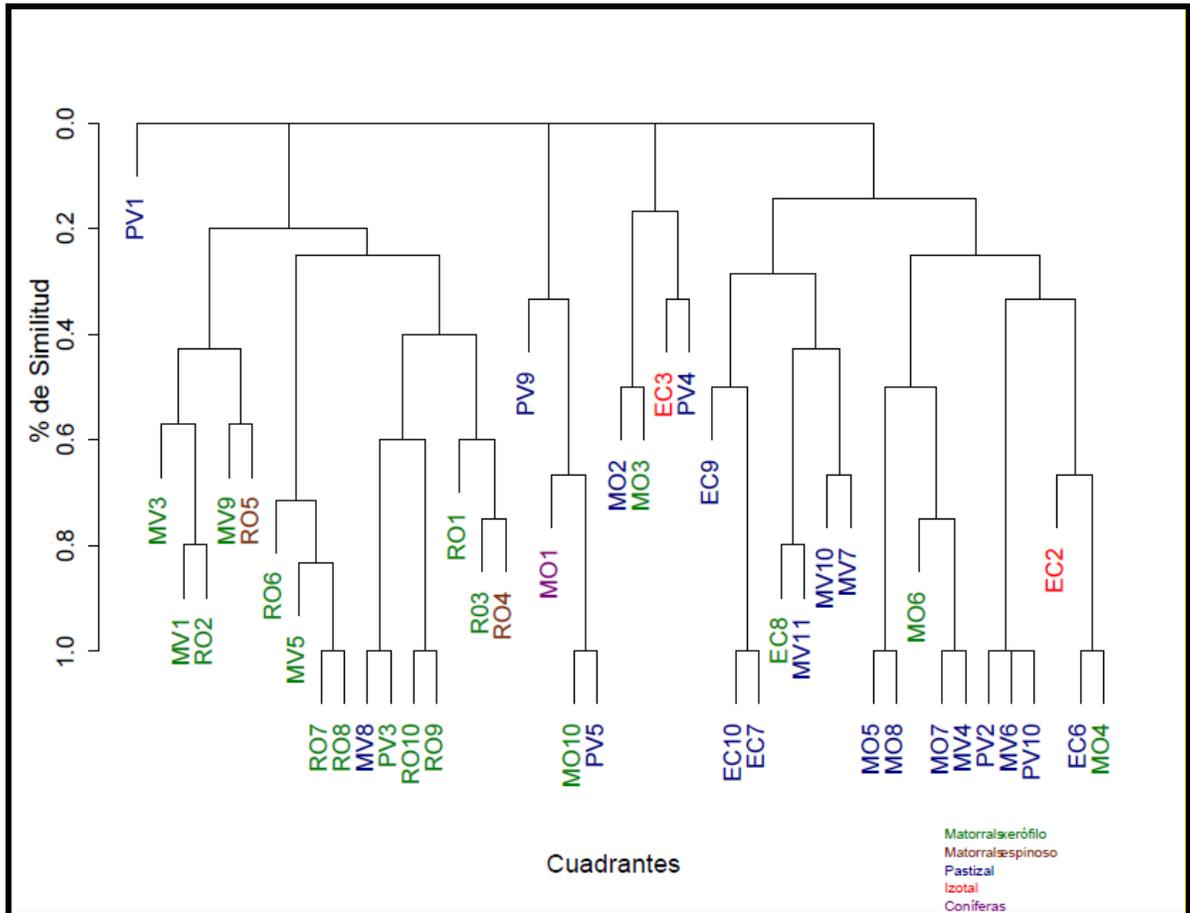
Figura 4. Composición de especies del complejo JCNG.



Diversidad de especies: La diversidad de la comunidad de roedores del complejo de JCNG fue de 0.8 de acuerdo al índice de Simpson. 17 cuadrantes presentaron una diversidad cercana a 1, mientras que 6 cuadrantes registraron una diversidad cercana a cero.

Coefficiente de similitud: De acuerdo al coeficiente de similitud de Jaccard se observaron cuatro agrupamientos principales. Se conformó un grupo por cuadrantes de vegetación de matorral xerófilo en su mayoría. Se observó otro agrupamiento conformado en su mayoría de los cuadrantes con vegetación de pastizal aunque también incluye cuadrantes de matorral xerófilo y de izotal, mientras que los agrupamientos más pequeños se conformaron por cuadrantes de pastizal, matorral xerófilo, izotal o coníferas. Un solo cuadrante fue diferente de todos los demás (Figura 5).

Figura 5. Dendrograma de similitud regional complejo JCNG

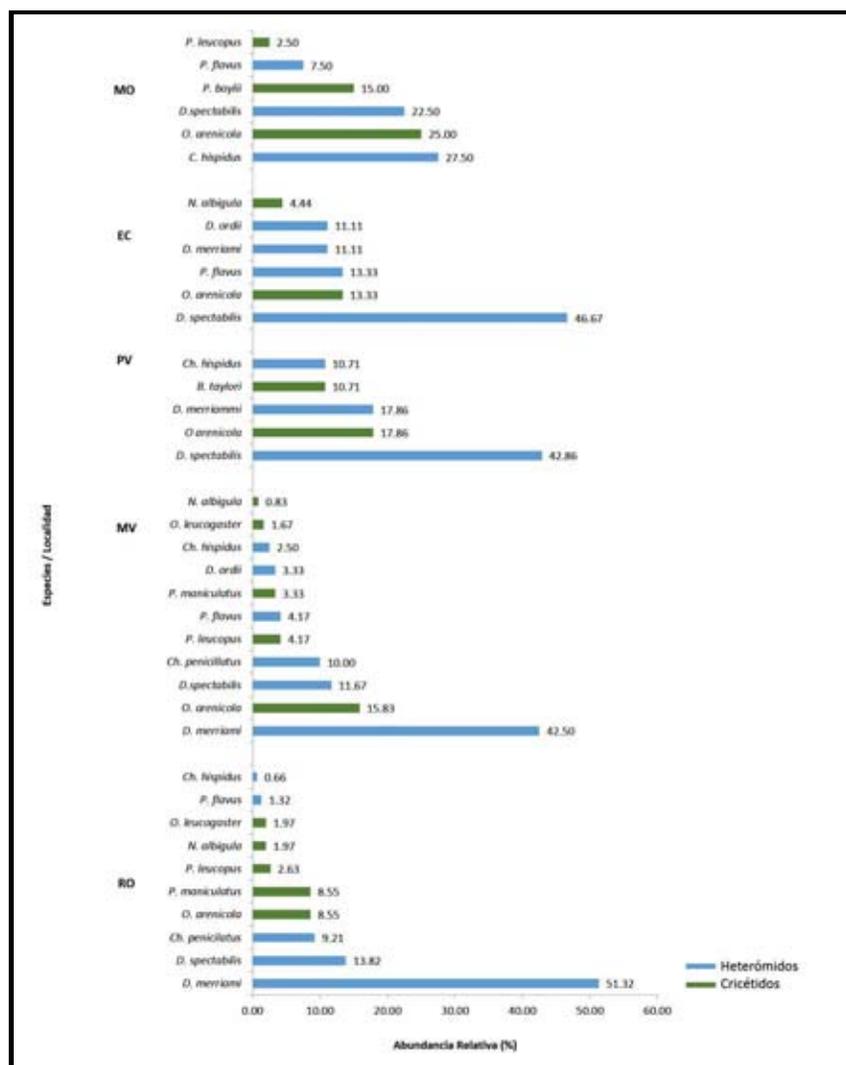


Escala local.

El esfuerzo de captura fue de 1500 noches trampa por cada localidad. La comunidad que registró la mayor riqueza fue MV con 11 especies (120 individuos), mientras que PV presentó la menor riqueza con 5 especies (28 individuos).

Abundancia Relativa (Ar): La especie más abundante fue *Dipodomys merriami* en las localidades de RO y MV, *Dipodomys spectabilis* en EC y PV y *Chaetodypus hispidus* en MO. Las especies menos abundantes fueron *Chaetodypus hispidus* en RO y PV, *Neotoma albigula* en MV y EC, y *Peromyscus leucopus* en MO (Figura 6).

Figura 6. Composición de especies por localidad.



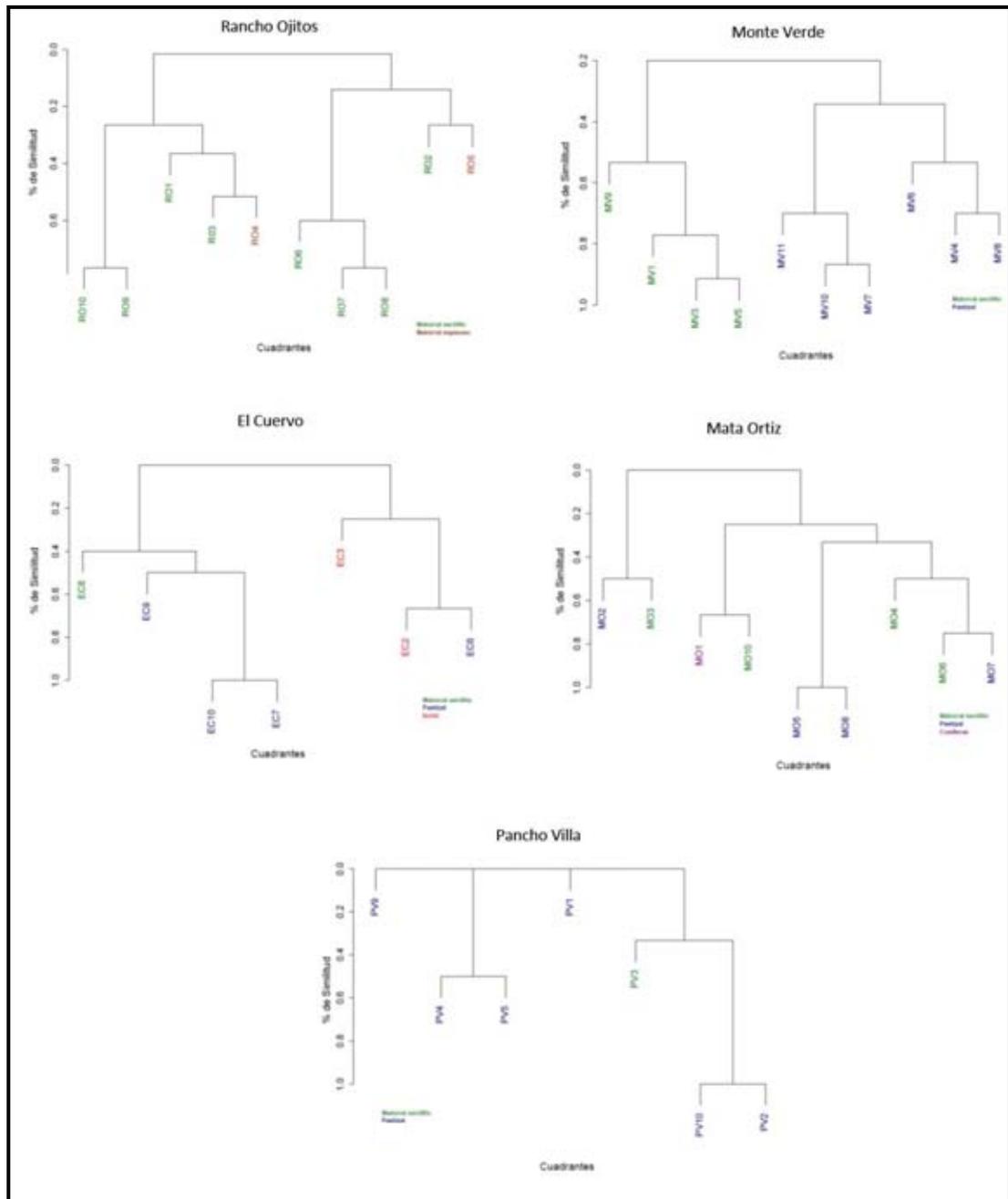
Diversidad de especies: De acuerdo al índice de diversidad de Simpson la comunidad más diversa fue MO, mientras que la menos diversa fue RO (Cuadro 4).

Cuadro 4. Riqueza y diversidad de especies por localidad.

	MV	RO	EC	MO	PV
Riqueza	11	10	6	6	5
No. Individuos	120	152	45	40	28
Simpson_1-D	0.76	0.69	0.72	0.78	0.73

Coefficiente de Similitud: De acuerdo al coeficiente de Jaccard se observó que para la región de MV se formaron dos grupos por tipo de vegetación, mientras que para los cuadrantes de RO, EC, MO y PV no se agruparon por tipo de vegetación (Figura 7).

Figura 7. Dendrogramas de similitud a escala local.

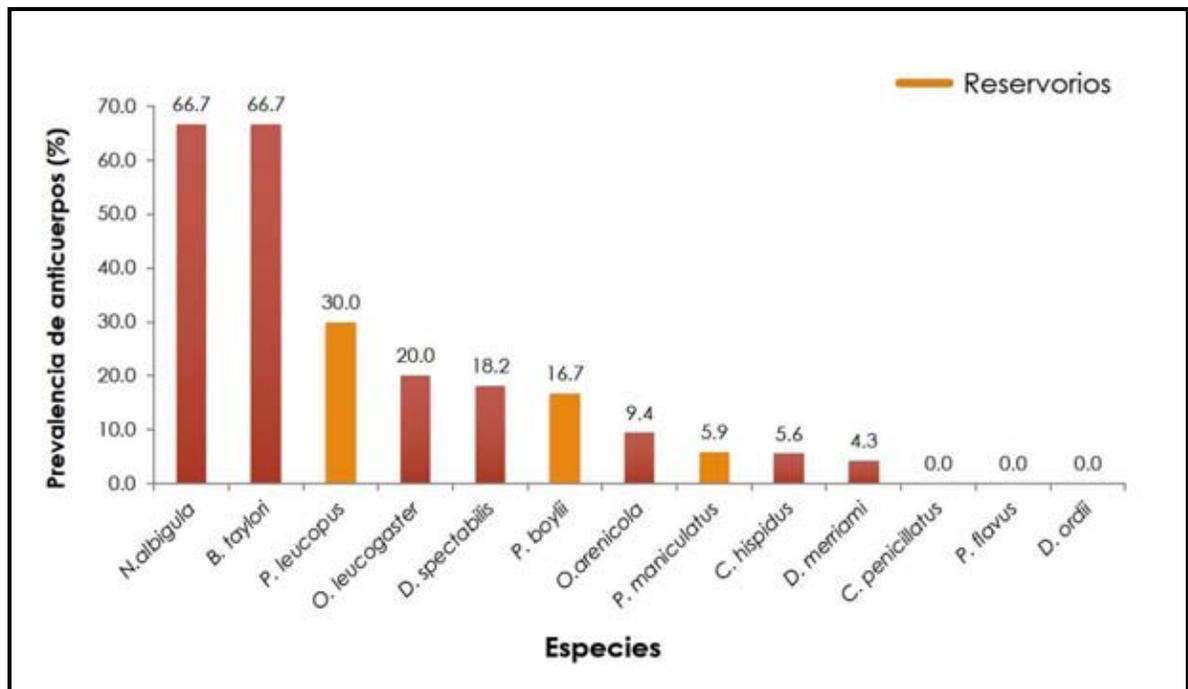


Análisis de laboratorio

Análisis serológico

Se analizaron un total de 385 muestras de suero, de las cuales se obtuvo una prevalencia de anticuerpos del 9.9% para toda la región de JNCG. La prevalencia de anticuerpos encontrada por familia de roedores fue mayor en los cricétidos con 17% y en los heterómidos con 7.4%. La prevalencia de anticuerpos en los reservorios fue del 15.2%. La especie en la que se registró la prevalencia de anticuerpos más alta fue en *N. albigula* y *Baiomys taylori* con un 66.7%, mientras que la especie *D. merriami* registró una prevalencia de anticuerpos del 4.3% (Figura 8), mientras que las especies *C. penicillatus*, *P. flavus* y *D. ordii* no presentaron individuos seropositivos.

Figura 8. Prevalencia de anticuerpos por especies del complejo JCNG.



La región en la que se registró la mayor prevalencia de anticuerpos fue PV con 39.3% mientras que para MV fue del 3.3% (Cuadro 5).

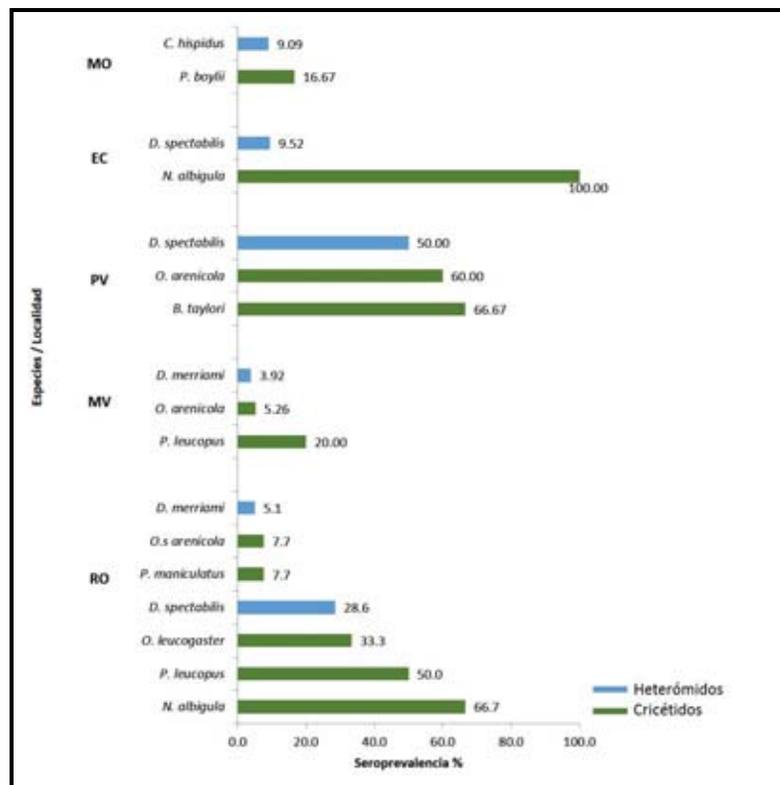
Cuadro 5. Prevalencia de anticuerpos por región.

Región	No. Individuos	No. Positivos	P (%)
RO	152	17	11.18
MV	120	4	3.33
EC	45	4	8.89
MO	40	2	5.00
PV	28	11	39.29

P= Prevalencia de anticuerpos

La región que registró un mayor número de especies seropositivas fue RO, mientras que EC y MO sólo tuvieron dos especies con individuos seropositivos (Figura 9).

Figura 9. Prevalencia de anticuerpos por especie por región.



Análisis molecular

Se colectaron muestras de 34 individuos pertenecientes a 11 especies; 12 individuos fueron seropositivos, pero ninguna de las muestras fue positiva en el análisis molecular (Cuadro 6).

Cuadro 6. Muestras utilizadas para el análisis molecular

Especie	NI	PS	RM
<i>Baiomys taylori</i>	3	2	**
<i>Neotoma albigula</i>	3	3	**
<i>Onychomys arenicola</i>	4	2	**
<i>Peromyscus boylii</i>	1	0	**
<i>Peromyscus leucopus</i>	9	3	**
<i>Peromyscus maniculatus</i>	9	1	**
<i>Chaetodipus hispidus</i>	1	0	**
<i>Chaetodipus penicillatus</i>	1	0	**
<i>Dypodomys spectabilis</i>	2	1	**
<i>Perognatus flavus</i>	1	0	**
Total	34	12	**

NI: Número de individuos analizados; PS: Número de individuos seropositivos;
RM: Resultado molecular; ** Negativo

Análisis estadístico

Escala regional

En los MLG realizados para la escala regional con los parámetros comunitarios de diversidad, se observó que la diversidad tiene una relación negativa estadísticamente significativa con la prevalencia de anticuerpos en todos los modelos. No se observó relación estadísticamente significativa entre las familias de roedores y la prevalencia de anticuerpos, ni entre la abundancia de reservorios y la prevalencia. El mejor modelo fue el que incluyó la variable diversidad, con un AIC de 101.31 y una $R^2=0.138$ (Cuadro 7).

Cuadro 7. Modelos a escala regional.

Variables explicativas	Coefficiente de la variable	p	PR ²	AIC
Diversidad	-2.222	0.012	0.174	103.31
Ar_C	0.011	0.153		
Ar_R	-0.009	0.591	0.169	101.62
Diversidad	-2.391	0.004		
Ar_C	0.009	0.185	0.138	101.31
Diversidad	-2.453	0.003		
Ar_C	0.011	0.131	0.036	107.27
Ar_R	-0.011	0.499	0.009	108.89

p: nivel de significancia; PR²: Pseudo-R²; AIC: Criterio de información de Akaike.

En el modelo para evaluar la relación con la identidad de las especies se observó una Pseudo-R²= 0.5295 con un AIC de 102.67 (Cuadro 8). Las especies que en el modelo presentaron relación con la prevalencia de anticuerpos estadísticamente significativa fueron, *N. albigula* con una relación positiva ($p < 0.05$) y *Perognathus flavus* con relación negativa ($p < 0.05$).

Cuadro 8. Modelo de especies del complejo JCNG

Variables explicativas	Coefficiente de la variable	p	PR ²	AIC
<i>B. taylori</i>	0.606	0.1780	0.5295	102.67
<i>N. albigula</i>	0.635	0.0331		
<i>O. arenicola</i>	-0.279	0.2408		
<i>O. leucogaster</i>	0.753	0.3870		
<i>P. boylii</i>	-0.397	0.5991		
<i>P. maniculatus</i>	-0.248	0.3544		
<i>P. leucopus</i>	0.708	0.2141		
<i>C. hispidus</i>	-0.321	0.3482		
<i>C. penicillatus</i>	-0.429	0.1504		
<i>D. merriami</i>	-0.074	0.3401		
<i>D. ordii</i>	-1.191	0.1166		
<i>D. spectabilis</i>	0.106	0.2200		
<i>P. flavus.</i>	-1.114	0.0139		

p: nivel de significancia; PR²: Pseudo-R²; AIC: Criterio de información de Akaike.

En el modelo de cricétidos se observó una R²= 0.1726 con un AIC de 111.37, la especie que mostró una relación estadísticamente significativa en el modelo fue *Baiomys taylori* con una relación positiva y $p < 0.05$ (Cuadro 9)

Cuadro 9. Modelo de cricétidos

Variables explicativa	Coefficiente de la variable	p	PR ²	AIC
<i>B. taylori</i>	0.949	0.0247	0.1726	111.37
<i>N. albigula</i>	0.249	0.3116		
<i>O. arenicola</i>	-0.116	0.3820		
<i>O. leucogaster</i>	-0.094	0.8561		
<i>P. boylii</i>	-0.369	0.5423		
<i>P. maniculatus</i>	0.173	0.4236		
<i>P. leucopus</i>	-0.180	0.5162		

p: nivel de significancia; PR²: Pseudo-R²; AIC: Criterio de información de Akaike.

En el modelo de reservorios no se observó significancia en ninguna de las especies incluidas (Cuadro 10).

Cuadro 10. Modelo de reservorios

Variables explicativa	Coefficiente de la variable	P	R ²	AIC
<i>P. boylii</i>	-0.402	0.517	0.036	111.32
<i>P. maniculatus</i>	0.097	0.596		
<i>P. leucopus</i>	-0.227	0.369		

p: nivel de significancia; PR²: Pseudo-R²; AIC: Criterio de información de Akaike.

En el modelo de heterómidos se observó una R²= 0.3831 con un AIC de 97.165, se observó una relación negativa estadísticamente significativa con la especie *Perognathus flavus* (p<0.01), la especie *D. merriami* mostró una relación negativa marginalmente significativa con una p=0.054 (Cuadro 11)

Cuadro 11. Modelo de heterómidos.

Variables explicativa	Coefficiente de la variable	p	PR ²	AIC
<i>C. hispidus</i>	-0.348	0.2672	0.3831	97.165
<i>C. penicillatus</i>	-0.050	0.7490		
<i>D. merriami</i>	-0.102	0.0542		
<i>D. ordii</i>	-1.205	0.0790		
<i>D. spectabilis</i>	0.067	0.3597		
<i>P. flavus.</i>	-1.069	-0.0076		

p: nivel de significancia; PR²: Pseudo-R²; AIC: Criterio de información de Akaike.

Escala local.

En los MLGs contruidos para la escala local las variables no fueron estadísticamente significativas, aunque los indicadores del desempeño de los modelos fueron diferentes. En cuatro de los cinco modelos de la escala local, la diversidad mostró una relación negativa con la prevalencia de anticuerpos, excepto en el modelo para RO (Cuadros del 12 al 16)

Cuadro 12. Modelos de la localidad Rancho Ojitos

Variables explicativas	Coefficiente de la variable	p	PR ²	AIC
Diversidad	0.523	0.601	0.335	32.839
Ar_C	0.920	0.358		
Ar_R	-0.347	0.728	0.314	30.96
Diversidad	0.44	0.659		
Ar_C	0.878	0.380	0.278	29.166
Ar_C	1.271	0.204		
Ar_R	0.284	0.777	0.014	30.681
Diversidad	0.929	0.353	0.177	29.752

p: nivel de significancia; PR²: Pseudo-R²; AIC: Criterio de información de Akaike.

Cuadro 13. Modelos de la localidad Monte Verde

Variables explicativa	Coefficiente de la variable	p	PR ²	AIC
Diversidad	-1.118	0.264	0.352	18.547
Ar_C	0.843	0.399		
Ar_R	0.707	0.479	0.270	17.075
Diversidad	-0.934	0.351		
Ar_C	1.235	0.217	0.164	15.758
Ar_C	1.019	0.308		
Ar_R	1.051	0.293	0.16	15.777
Diversidad	-0.352	0.724	0.017	16.706

p: nivel de significancia; PR²: Pseudo-R²; AIC: Criterio de información de Akaike.

Cuadro 14. Modelos de la localidad El Cuervo

Variable explicativa	Coefficiente de la variable	p	PR ²	AIC
Diversidad	-1.162	0.245	0.307	19.327
Ar_C	1.715	0.086		
Ar_C	0.0315	0.216	0.147	18.852
Diversidad	-0.391	0.696	0.016	20.094

p: nivel de significancia; PR²: Pseudo-R²; AIC: Criterio de información de Akaike.

Cuadro 15. Modelos de la localidad Mata Ortiz.

Variable explicativa	Coefficiente de la variable	p	PR ²	AIC
Diversidad	1.775	0.136	0.419	73.184
Ar_C	1.020	0.354		
Ar_R	-0.796	0.462		
Diversidad	1.733	0.134	0.345	72.259
Ar_C	0.661	0.533		
Ar_C	0.351	0.736	0.346	73.912
Ar_R	0.617	0.557	0.051	73.592
Diversidad	1.721	0.129	0.297	70.893

p: nivel de significancia; PR²: Pseudo-R²; AIC: Criterio de información de Akaike.

Cuadro 16. Modelos de la localidad Pancho Villa

Variable explicativa	Coefficiente de la variable	P	R ²	AIC
Diversidad	-0.789	0.435	0.255	19.022
Ar_C	0.415	-0.678		
Ar_C	0.719	0.472	0.117	17.631
Diversidad	-0.970	0.332	0.216	17.195

p: nivel de significancia; PR²: Pseudo-R²; AIC: Criterio de información de Akaike.

El modelo con la variable categórica de localidad se observó una R²= 0.450 con un AIC de 89.259. La localidad de PV mostró una relación positiva estadísticamente significativa con una p=0.003 (Cuadro 17)

Modelo por localidad.

Variable explicativa	Coefficiente de la variable	P	R ²	AIC
Mata Ortiz	-0.690	0.490	0.450	89.259
Monte Verde	-1.425	0.154		
Pancho Villa	2.905	0.003		
Rancho Ojitos	0.437	0.662		

p: nivel de significancia; PR²: Pseudo-R²; AIC: Criterio de información de Akaike.

DISCUSIÓN

La región de JCNG presenta una alta diversidad de pequeños mamíferos en cuanto a riqueza y composición de especies (Cruzado, 2008). La mayor riqueza y abundancia de especies se registró en las zonas de matorral xerófilo, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Cruzado (2008), quien registró en las zonas de matorral por lo menos 10 especies.

En el estudio de Pacheco entre 1992 y 1994 (datos no publicados, citado por Cruzado, 2008) realizado en la misma zona pero sólo en pastizal, la composición y abundancia de especies es distinta, él reportó 10 especies, entre ellas 4 que se consideraron exclusivas de matorral, *Peromyscus eremicus*, *Sigmodon fulviventer*, *Neotoma albigula* y *Onychomys arenicola*, de las cuales en este estudio no fueron exclusivas del matorral y *Sigmodon fulviventer* no fue registrado. Las especies más abundantes en el estudio de Pacheco fueron *Chaetodipus hispidus* y *O. arenicola*, estas mismas especies en el estudio de Cruzado (2008) tuvieron abundancias bajas y en este estudio ambas presentaron una abundancia media-baja con respecto a las demás especies registradas.

En el estudio de Cruzado (2008) realizado en la misma zona, las especies registradas en las zonas de mezquite están adaptadas al forrajeo bajo los matorrales, mientras que las registradas en zonas de pastizal prefieren el forrajeo en áreas abiertas como los hetéromidos. En el presente estudio de acuerdo al coeficiente de similitud se observó un patrón de asociación entre los cuadrantes por tipo de vegetación, lo cual concuerda con los hallazgos de Cruzado (2008), sin embargo también se observó similitud entre cuadrantes con diferente tipo de vegetación en menor número de cuadrantes.

Sólo tres especies reconocidas como reservorios naturales de hantavirus en Norteamérica fueron registradas en este estudio, *P. maniculatus*, *P. leucopus* y *P. boylii* con una abundancia relativa baja en ambas escalas espaciales. Para el reservorio principal del SNV se registró una abundancia de 4.42% mientras que en comunidades de Texas es de 9.46% (Fulhorst *et al.*, 2001) y en la región de Four Corners es del 34.86% (Mills *et al.*, 1997).

La prevalencia de anticuerpos registrada en este estudio para el complejo de JCNG fue del 9.9%, lo cual es superior a lo registrado para la región del suroeste de EUA en la que se registró una prevalencia de anticuerpos de 6.9% (datos de revisión de artículos). La prevalencia de anticuerpos por localidad fue variada entre 3.3% hasta 39.3%, se ha reportado que la prevalencia de anticuerpos varía ampliamente entre las diferentes regiones y hábitats e incluso en diferentes estaciones del año y entre años (Mills *et al.*, 1997). En el sureste de Arizona la prevalencia global de anticuerpos contra SNV varió considerablemente entre los roedores silvestres capturados, del 0% para las especies de la familia *Heteromyidae*, 5.4% para especies de la familia *Muridae* (Mills *et al.*, 1997).

En el presente estudio la prevalencia de anticuerpos para los heterómidos fue de 7.4%, lo que representa una prevalencia de anticuerpos alta para esta familia de roedores comparada con la prevalencia de anticuerpos de 0.54% registrada en la región del suroeste de EUA (datos de revisión de artículos) para esta misma familia. La prevalencia en roedores heterómidos está documentada y las especies de esta familia no son reconocidas como reservorios de hantavirus (Childs *et al.*, 1994., Jay *et al.*, 1997). Es posible que estos virus de una especie reservorio en particular sean capaces de infectar a otras especies con las que comparten el mismo hábitat, sin embargo la infección en esta especie puede ser autolimitada.

Para el caso de los cricétidos en este estudio de acuerdo a los reportes que se han realizado se esperaba una prevalencia de anticuerpos de al menos el 3% para

las especies de esta familia, para los que se registró una prevalencia de anticuerpos del 17%. En los roedores del género *Peromyscus* se registró una prevalencia de anticuerpos del 15.15%, para este género se ha reportado una prevalencia de anticuerpos media del 7% de acuerdo con estudios realizados en Kansas (Kaufman *et al.*, 1994) y Montana (Douglass *et al.*, 1996), pero esta prevalencia de anticuerpos es menor a la prevalencia de anticuerpos reportada en otras zonas de Arizona y Nuevo México (Childs *et al.*, 1994, Mills *et al.*, 1997).

La prevalencia de anticuerpos para los roedores de la especie *P. maniculatus* fue del 5.9%, los roedores de esta especie que se encuentran en hábitats desérticos son menos abundantes, la tasa de contacto entre ellos es menor y por lo tanto la prevalencia de anticuerpos es baja (Mills *et al.*, 1997). En un estudio realizado en la misma región de Janos-Casas Grandes durante el 2007 y 2008 se encontró una prevalencia de anticuerpos del 33.3% en roedores de la especie *P. maniculatus* (Moreno, 2009), esto concuerda con la variabilidad mencionada anteriormente entre individuos de la misma especie y entre años.

La presencia de anticuerpos contra hantavirus y la ausencia de evidencia molecular en los individuos seropositivos, puede ser debido a diferentes causas, como el método de conservación de las muestras de tejido y el tiempo de conservación hasta su procesamiento dando como resultado la degradación del ARN viral presente en las muestras. Estudios experimentales realizados en roedores de la especie *P. maniculatus* han demostrado que semanas después de la infección con Andes virus éste ya no se encuentra en replicación (Schountz *et al.*, 2012). Los niveles de ARN viral varían considerablemente en los *P. maniculatus* infectados, la mayoría presentan niveles moderados de ARN en el pico de la infección, sin embargo, algunos presentan mayores cantidades de ARN viral, lo que sugiere que estos roedores pueden producir sustancialmente más virus que otros roedores incluso de su misma especie y transmiten el virus de forma más eficiente en la comunidad de roedores (Spengler *et al.*, 2013).

En Norteamérica los estudios realizados en los que se relaciona la diversidad con la prevalencia de anticuerpos de hantavirus, se enfocan a los roedores reservorios (Clay *et al.*, 2009a, Clay *et al.*, 2009b, Carver *et al.*, 2011a, Madhav *et al.*, 2007), en el presente estudio se consideró la prevalencia de anticuerpos registrada en toda la comunidad de roedores independientemente de su clasificación como reservorio o no reservorio, esto debido a que resulta de interés saber que otras especies pueden estar participando en la dinámica de hantavirus en comunidades de roedores.

En este estudio se observó una relación negativa entre la diversidad y la prevalencia de anticuerpos en todos los modelos de escala regional que incluyó la diversidad. Esto es consistente con otro estudio realizado en Oregón en el que se encontró una relación negativa significativa entre la prevalencia de la infección por hantavirus y la diversidad de especies, la prevalencia de la infección aumentó a medida que disminuyó la diversidad (Disney y Ruedas, 2009). En Panamá, se observó que aquellos sitios donde la diversidad de especies se redujo la prevalencia de anticuerpos del virus en los roedores aumentó (Suzán *et al.*, 2009). Allan *et al.* (2009) encontraron que la diversidad de aves tiene una correlación negativa con la infección con el Virus del Oeste del Nilo en sus vectores a escala regional en St. Louis, Missouri y con la incidencia de la enfermedad en humanos a nivel nacional en EUA. De acuerdo a los resultados podemos considerar que cambios en la estructura de las comunidades de roedores afectarán la prevalencia del virus, sí disminuye la diversidad la prevalencia del virus aumentará en las comunidades de roedores.

En el modelo de especies que componen la comunidad de roedores del complejo JCNG se observó una relación positiva estadísticamente significativa entre prevalencia de anticuerpos y la especie *Neotoma albigula*, en estudios realizados esta especie no se ha reportado seropositiva (Mills *et al.*, 1997, Abbott *et al.*, 1999,

Biggs *et al.*, 2000), pero especies del mismo género si se han reportado seropositivas (Dearing *et al.*, 1998, Saasa *et al.*, 2012).

En el modelo de cricétidos observamos que existe una relación positiva estadísticamente significativa entre la abundancia de la especie *Baiomys taylori* y la prevalencia de anticuerpos. Estos hallazgos podrían sugerir que estas especies (*N. albigula* y *B. taylori*) puedan funcionar como amplificadoras y que evidentemente las interacciones interespecificas es clave para la transmisión de hantavirus entre las diferentes especies que componen una comunidad. Sin embargo se desconoce su potencial como reservorio ya que no se han reportado individuos seropositivos de esta especie para hantavirus.

En el modelo de reservorios no se observó una relación estadísticamente significativa con la prevalencia de anticuerpos, esto es consistente con otros estudios en los que no se observó asociación entre la prevalencia y la abundancia de reservorios (Disney y Ruedas, 2009, Clay *et al.*, 2009a). En Argentina no se encontró correlación entre la diversidad de hospederos y la equitatividad con la prevalencia de anticuerpos del Andes Virus en sus reservorios, *Oligoryzomys longicaudatus*, pero si entre la diversidad y la abundancia de roedores seropositivos de *O. logicaudatus* (Piudo *et al.*, 2011). En otro estudio se observó que la diversidad de especies se correlaciona negativamente con la abundancia del *P. maniculatus* (Clay *et al.*, 2009b), se ha demostrado que los cambios en la composición de las comunidades de roedores tiene efecto sobre la abundancia del *P. maniculatus* (Heske *et al.*, 1994), tales cambios en la abundancia pueden ser consecuencia de la competencia interespecifica por los sitios de refugio y recursos alimenticios.

En el modelo de heterómidos encontramos una relación negativa con la prevalencia de anticuerpos en las especies *D. merriami* y *P. flavus* las cuales podrían estar disminuyendo la prevalencia del virus debido a su alta abundancia

en las comunidades del complejo de JCNG. En otro estudio los roedores de la especie *D. ordii* mostraron una relación positiva con la prevalencia de anticuerpos (Clay *et al.*, 2009a) en el presente estudio la especie *D. ordii* mostró una relación negativa marginalmente significativa, por lo que al menos en el complejo de JCNG esta especie podría tener el mismo efecto que las otras especies de heterómidos, aunque es la especie de heterómidos menos abundante en complejo.

Las comunidades del complejo JCNG están dominadas principalmente por roedores de las especies *D. merriami* y *D. spectabilis*, las cuales pueden estar modificando la dinámica de los reservorios al reducir sus hábitats. Se observó que la mayor abundancia de sigmodontidos se ubicó en zonas de matorral, esto se ha observado en otro estudio en que los roedores *P. maniculatus* cambiaron significativamente el uso de hábitats de abiertos a cerrados en presencia de roedores del género *Dipodomys* (Falkenberg y Clarke, 1998), por lo que la abundancia de roedores de la *P. maniculatus* en las zonas de matorral podría estar incrementando la prevalencia del virus de manera intraespecífica (Clay *et al.*, 2009a) como interespecífica posibilitando a que el virus sea capaz de adaptarse a otras especies que funcionen como reservorio con las que el *P. maniculatus* coexiste en los microhábitats.

La relación entre la prevalencia de anticuerpos con la estructura de las comunidades a escala regional fue significativa mientras que a nivel local esta relación no fue estadísticamente significativa. Posiblemente debido a que la infección por hantavirus está determinada por la abundancia de las especies que componen la comunidad, principalmente de los reservorios. A nivel local la densidad de los reservorios es variable y se observa una clara dominancia de los roedores del género *Dipodomys*. En un estudio realizado en el estado de Montana observaron una relación significativa entre la abundancia del *P. maniculatus* a escala regional mientras que esta relación no se observó a escala local (Carver *et al.*, 2011b). Ezenwa *et al.*, (2006) documentaron que a escala local existe una

relación negativa entre el número de especies de aves no paseriformes y la prevalencia de infección por VON en sus vectores. Aunque existe esta evidencia a escala local debemos considerar que la transmisión de hantavirus es directa y no implica a un vector como es el caso del VON.

A escala local podemos considerar que, para la transmisión del hantavirus es más importante la presencia de los reservorios y sus interacciones con otras especies que en sí la diversidad de la comunidad local como es el caso de este estudio. En un estudio realizado en el estado de Utah los roedores de la especie *Peromyscus truei* parecen reducir la prevalencia de hantavirus, mientras que los de la especie *D. ordii* parecen aumentarla (Clay *et al.*, 2009b). En el estado de Montana se estimó que la prevalencia del SNV en los roedores de la especie *P. maniculatus* se reduce en presencia de roedores del género *Microtus* sin importar la abundancia de éste (Carver *et al.*, 2011a).

En el estado de Utah se realizó un estudio en el que se registró una baja prevalencia del virus en sitios con alta diversidad (Clay *et al.*, 2009b) en el presente estudio el hallazgo es similar en la escala local en 3 de 5 localidades (MV, EC y MO), donde observamos una diversidad alta. La localidad de RO presentó la diversidad más baja y es la segunda localidad con prevalencia de anticuerpos más alta de todo el complejo. Mientras que la localidad de PV registró diversidad alta y al mismo tiempo una alta prevalencia de anticuerpos, sin embargo no se observó relación estadísticamente significativa entre la prevalencia de anticuerpos y la diversidad en esta localidad.

En el modelo donde se incluyó la variable localidad, PV mostró una relación estadísticamente significativa con la prevalencia de anticuerpos, sin embargo esta localidad no tiene la diversidad más alta o baja, por lo que el modelo podría estar influenciado sólo por la prevalencia de anticuerpos ya que es la comunidad que tiene la prevalencia más alta de todas.

Existen estudios que destacan la importancia de la diversidad en la transmisión de patógenos, la diversidad de la comunidad altera significativamente la transmisión del parásito y que el grado de reducción en la transmisión dependerá de los mecanismos por los cuales la diversidad y composición de las comunidades sea modificada considerando las escalas espaciales (Johnson y Thieltges, 2010).

En caso particular de este estudio con la información colectada aún se pueden realizar otros análisis considerando la presencia de los perritos de las praderas (*Cynomys ludovicianus*) en las comunidades, comparar las prevalencias de hantavirus por tipo de vegetación.

Para reforzar los hallazgos de evidencia serológica en roedores heterómidos se pueden modificar las técnicas de diagnóstico serológico utilizando anticuerpos específicos contra estas especies de roedores.

CONCLUSIONES

La transmisión y mantenimiento del virus en comunidades locales depende de la composición, la presencia de hospederos y sus interacciones con otras especies, a diferencia de la escala regional, en la que la diversidad tiene una fuerte relación con la prevalencia de anticuerpos de hantavirus, por lo que la transmisión y mantenimiento del virus está influenciada por el componente espacial en comunidades de roedores.

Las comunidades dominadas por roedores heterómidos pueden estar modificando la dinámica de los reservorios a nivel local al reducir sus hábitats, así también los roedores heterómidos podrían estar representando un papel fundamental en la dinámica del virus en las comunidades de roedores, funcionando como amortiguadores de la prevalencia del virus, para ello se requieren realizar otros estudios para determinar si estos roedores son capaces de transmitir el virus o sólo son capaces de infectarse por competencia de recursos.

Es necesario ampliar el estudio de análisis molecular para la detección del genoma viral y determinar que virus del género hantavirus se encuentra circulando en la región de Janos- Casas Grandes.

El realizar este tipo de estudios de la dinámica de agentes patógenos de tipo zoonótico en ambientes naturales aportan información para determinar el posible y potencial riesgo y magnitud de brotes epidémicos, incluyendo los factores antropogénicos dado el patrón de uso de los recursos naturales que se realiza en la actualidad

ABREVIATURAS Y SIGLAS

1-D. Índice de diversidad de Simpson.
AIC. Criterio de información de Akaike.
ANDV. Andes virus.
Ar. Abundancia relativa.
ARN. Ácido ribonucleico.
CAR. Carrizal virus.
DOBV. Dobrava virus.
EC. El Cuervo.
EIA. Inmuno-Ensayo Enzimático.
EUA. Estados Unidos de América.
FHSR. Fiebre hemorrágica con síndrome renal.
HTNV. Hantaan virus.
HUI. Huitzilac virus
IgG. Inmunoglobulina G
JCNG. Janos-Casas Grandes
LANV. Laguna Negra virus.
MLG. Modelos Lineales Generalizados.
MO. Mata Ortiz.
MTN. Montano virus.
MV. Monte Verde
NP. Nucleocapside.
ORO. Playa de Oro virus.
PCR. Reacción en cadena de la polimerasa.
PUUV. Puumala virus.
PV. Pancho Villa
RdRp. ARN polimerasa dependiente de ARN
RO. Rancho Ojitos.
S. Riqueza específica.

SEOV. Seoul virus.

SNV. Sin Nombre virus.

SPH. Síndrome Pulmonar por Hantavirus.

UNAM. Universidad Nacional Autónoma de México.

VON. Virus del Oeste del Nilo

REFERENCIAS

- Abbott, K. D., Ksiazek, T. G. & Mills, J. N. 1999. Long-term hantavirus persistence in rodent populations in central arizona. *Emerging Infectious Diseases*, 5, 102-112.
- Alemán, A., Iguarán, H., Puerta, H., Cantillo, C., Mills, J. N., Ariz, W. & Mattar, Y. S. 2006. Primera evidencia serológica de infección por hantavirus en roedores, en Colombia. *Rev. Salud Pública. Sup.*, 8, 1-12.
- Allan, B. F., Langerhans, R. B., Ryberg, W. A., Landesman, W. L., Griffin, N. W., Katz, R. S., Oberle, B. J., Schutzenhofer, M. R., Smyth, K. N., De St. Maurice, A., Clark, L., Crooks, K. R., Hernandez, D. E., Mclean, R. G., Ostfeld, R. S. & M. Chase, J. M. 2009. Ecological correlates of risk and incidence of West Nile Virus in the United States. *Oecologia*, 158, 699–708.
- Arai, S., Song, J. W., Sumibcay, L., Bennett, S. N., Nerurkar, V. R., Parmenter, C., Cook, J. A., Yates, T. L. & Yanagihara, R. 2007. Hantavirus in northern short-tailed shrew, United States. . *Emerg. Infect. Dis.*, 13, 1420–1423.
- Balvanera, P., Pfisterer, A. B., Buchmann, N., He, J. S., Nakashizuka, T., Raffaelli, D. & Schmid, B. 2006. Quantifying the evidence for biodiversity effects on ecosystem functioning and services. *Ecol Lett*, 9, 1146-56.
- Biggs, J. R., Bennett, K. D., Torrez-Martinez, N. & Hjelle, B. L. 2000. Sin Nombre Virus antibody prevalence in rodents of north-central New Mexico. *Southwestern Association Of Naturalists*, 45, 61-66.
- Brisson, D. & Dykhuizen, D. E. 2006. A modest model explains the distribution and abundance of *Borrelia burgdorferi* strains. *The American Society of Tropical Medicine And Hygiene*, 74, 615–622.
- Carver, S., Kuenzi, A., Bagamian, K. H., Mills, J. N., Rollin, P. E., Zanto, S. N. & Douglass, R. 2011a. A temporal dilution effect: hantavirus infection in deer mice and the intermittent presence of voles in Montana. *Oecologia*, 166, 713-21.

- Carver, S., Trueax, J. T., Douglass, R. & Kuenzi, A. 2011b. Delayed density-dependent prevalence of sin nombre virus infection in deer mice (*Peromyscus maniculatus*) in central and western Montana. *Journal Of Wildlife Diseases*. 47, 56-63.
- Castro-Arellano, I., Suzán, G., Flores, R., Morales, R. & Thomas, E. 2009. Survey for antibody to hantaviruses in Tamaulipas, México. *Journal Of Wildlife Diseases*, 45, 207-212.
- Ceballos, G., Mellink, E. & Hanebury, L. 1993. Distribution and conservation status of prairie dogs (*Cynomys mexicanus* and *Cynomys ludovicianus*) in Mexico. *Biological Conservation*, 63, 105-112.
- Clay, C. A., Lehmer, E. M., Jeor, S. S. & Dearing, M. D. 2009a. Sin Nombre Virus and rodent species diversity: a test of the dilution and amplification hypotheses. *Plos One*, 4, E6467.
- Clay, C. A., Lehmer, E. M., St Jeor, S. & Dearing, M. D. 2009b. Testing Mechanisms Of The Dilution Effect: Deer Mice Encounter Rates, Sin Nombre Virus prevalence and species diversity. *Ecohealth*, 6, 250-9.
- Cruzado, C. J. 2008. *Dinámica poblacional y estructura de la comunidad de pequeños mamíferos de la región Janos-Casas Grandes, Chihuahua*. Maestro en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma De México.
- Childs, J. E., Ksiazek, T. G., Piropoulou, C. F. S., Krebs, J. W., Morzunov, S., Maupin, G. O., Rollin, P. E., Sarisky, J. & Enscore, R. E. 1994. Serologic and genetic identification of *Peromyscus maniculatus* as the primary rodent reservoir for a new hantavirus in southwestern United States. *Journal Of Infectious Diseases* 169, 1271–1280.
- Chu, Y. K., Owen, R. D., Sanchez-Hernandez, C., Romero-Almaraz Mde, L. & Jonsson, C. B. 2008. Genetic characterization and phylogeny of a hantavirus from western Mexico. *Virus Res*, 131, 180-8.
- De Araujo, J., Matsumiya, L., Alves, D., Lautenschlager, D., Ometto, T., Mara, L., Cotrin, C., Favorito, S. & Luiz, E. 2012. Detection of hantavirus in

bats from remaining rain forest in São Paulo, Brazil. *Bmc Research Notes*, 5.

- Dearing, M. D., Mangione, A. M., Karasov, W. H., Morzunov, S., Otteson, E. & S., S. J. 1998. Prevalence of hantavirus in four species of *Neotoma* from Arizona and Utah. *American Society Of Mammalogists*, 79, 254-1259.
- Díaz, S., J. Fargione,, Chapin, F. S. & Tilman., D. 2006. Biodiversity loss threatens human well-being. *Plos Biology* 4, 1300-1305.
- Dirzo, R. & Raven., P. 2003. Global state of biodiversity and loss. *Annual Review Of The Environment And Resources* 28 137-167.
- Disney, L. J. & Ruedas, L. A. 2009. Increased host species diversity and decreased prevalence of Sin Nombre Virus. *Emerging Infectious Diseases*, 15, 1012-1018.
- Douglass, R. J., Van Horn, R., Coffin, K. W. & Zanto, S. N. 1996. Hantavirus in Montana deer mouse Populations: Preliminary Results. *Journal Of Wildlife Diseases*, 32, 527-530.
- Easterbrook, J. D. & Klein, S. L. 2008. Immunological Mechanisms Mediating Hantavirus Persistence In Rodent Reservoirs. *Plos Pathogens*, 4, 1-8.
- Elliott, L. H., G., K. T., E., R. P., Spiropoulou, C. F., Morzunov, S., Monroe, M., Goldsmith, C. S., Humphrey, C. D., Zazi, S. R., Krebs, J. W., Maupin, G., Gage, K., Childs, J. E., T, N. S. & J., P. C. 1994. Isolation of the causative agent of Hantavirus Pulmonary Syndrome. *Am J Trop Med Hyg*, 51, 102-108.
- Ezenwa, V. O., Godsey, M. S., King, R. J. & Guphill, S. C. 2006. Avian diversity and West Nile Virus: testing associations between biodiversity and infectious disease Risk. *Proc Biol Sci*, 273, 109-17.
- Falkenberg, J. C. & Clarke, J. A. 1998. Microhabitat use of deer mice: effects of interspecific interaction risks. *Journal Of Mammalogy*, 79, 558-565.

- Flores, L. & Morales, J. 2001. Situación de los hantavirus en México. *Enf Infect Microbiol*, 21.
- Fulhorst, C. F., Mantooh, S. J., Milazzo, M. L., Bradley, R. D., Hice, C. L., Ceballos, G. & Tesh, R. B. 2001. Geographical distribution of rodent-associated hantaviruses in Texas. *Journal Of Vector Ecology*, 26, 7-14.
- Gubler, D., Reiter, P., Ebi, K., Yap, W., Nasci, R. & Patz, J. 2001. Climate variability and change in the united states: potential impacts on vector- and rodent-borne diseases. *Environ Health Perspect* 109, 223–233.
- Heske, E. J., Brown, J. H. & Mistry, S. 1994. Long-term experimental study of a Chihuahuan desert rodent community: 13 Years Of Competition. *Ecology* 75, 438–445.
- Hess, G. R., Randolph, S.E., Arneberg, P., Chemini, C., Furlanello, C., Harwood, J., Roberts, M.G., Swinton, J. 2002. Spatial aspects of disease dynamics. In: Press, O. U. (Ed.) *The Ecology Of Wildlife Diseases*
- Hooper, D. U., Chapin, F. S., Ewel, J. J., Hector, A., Inchausti, P., Lavorel, S., Lawton, J. H., Lodge, D. M., Loreau, M., Naeem, S., Schmid, B., Setälä, H., Symstad, A. J., Vandermeer, J. & Wardle, D. A. 2005. Effects of biodiversity on ecosystem functioning: a consensus of current knowledge. *Ecological Monographs*, 75, 3-35.
- Hussein, I. T., Haseeb, A., Haque, A. & Mir, M. A. 2011. Recent advances in hantavirus molecular biology and disease. *Adv Appl Microbiol*, 74, 35-75.
- Johnson, P. T., Hartson, R. B., Larson, D. J. & Sutherland, D. R. 2008. Diversity and disease: community structure drives parasite transmission and host fitness. *Ecol Lett*, 11, 1017-26.
- Johnson, P. T. & Thielges, D. W. 2010. Diversity, decoys and the dilution effect: how ecological communities affect disease risk. *J Exp Biol*, 213, 961-70.

- Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L. & Daszak, P. 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451, 990-3.
- Jonsson, C. B., Figueiredo, L. T. & Vapalahti, O. 2010. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clin Microbiol Rev*, 23, 412-41.
- Kang, H. J., Bennett, S. N., Dizney, L., Sumibcay, L., Arai, S., Ruedas, L. A., Song, J. W., And & Yanagihara, R. 2009. Host switch during evolution of a genetically distinct hantavirus in the american shrew mole (*Neurotrichus gibbsii*). *Virology* 388, 8–14.
- Kariwa, H., Lokugamage, K., Lokugamage, N., Miyamoto, H., Yoshii, K., Nakauchi, M., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Ivanov, L. I., Iwasaki, T. & Takashima, I. 2007. A comparative epidemiological study of hantavirus infection in Japan and far east Russia. *Jpn J Vet Res.* , 54, 145-61.
- Kariwa, H., Yoshida, H., Sanchez-Hernandez, C., Romero-Almaraz Mde, L., Almazan-Catalan, J. A., Ramos, C., Miyashita, D., Seto, T., Takano, A., Totani, M., Murata, R., Saasa, N., Ishizuka, M., Sanada, T., Yoshii, K., Yoshimatsu, K., Arikawa, J. & Takashima, I. 2012. Genetic diversity of hantaviruses in México: identification of three novel hantaviruses from neotominae rodents. *Virus Res*, 163, 486-94.
- Kaufman, G. A., Kaufman, D. W., Mcmillan, B. R. & Brillhart, D. E. 1994. Prevalence of hantavirus antibodies in natural populations of deer mice un north central Kansas. *Prairie Naturalist*, 26, 209-216.
- Keesing F., Belden L.K., Daszak, P., Dobson, A., Harvell, C. D., Holt, R. D., Hudson, P., Jolles, A., Jones, K. E., Mitchell, C. E., Myers, S. S., Bogich, T. & Ostfeld, R. S. 2010. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature* 468, 647–652.
- Keesing, F., Holt, R. D. & Ostfeld, R. S. 2006. Effects of species diversity on disease risk. *Ecol Lett*, 9, 485-98.

- Lee, H. W., French, G. R., Lee, P. W., Baek, L. J., Tsuchiya, K. & Foulke, R. S. 1981a. Observations on natural and laboratory infection of rodents with the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. . *Am. J. Trop. Med. Hyg.* , 30, 477–482.
- Lee, H. W., Lee, P. W., Baek, L. J., Song, C. K. & Seong, I. W. 1981b. Intraspecific transmission of Hantaan Virus, etiologic agent of Korean hemorrhagic fever, in the rodent *Apodemus agrarius*. . *Am. J. Trop. Med. Hyg.* , 30, 1106–1112.
- Logiudice, K., Ostfeld, R. S., Schmidt, K. A. & Keesing, F. 2003. The ecology of infectious disease: effects of host diversity and community composition on Lyme disease risk. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 567-71.
- Madhav, N. K., Wagoner, K. D., Douglass, R. J. & Mills, J. N. 2007. Delayed Density-Dependent prevalence of Sin Nombre Virus antibody in Montana deer mice (*Peromyscus maniculatus*) and implications for human disease risk. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 7, 353-64.
- Mills, J. N. 2006. Biodiversity loss and emerging infectious disease: an example from the rodent-borne hemorrhagic fevers. *Biodiversity*, 7, 9-17.
- Mills, J. N., Amman, B. R. & Glass, G. E. 2009. Ecology of hantaviruses and their hosts in North America. *Vector-Borne And Zoonotic Diseases*, 9.
- Mills, J. N., Ksiazek, T. G., Ellis, B. A., Rollin, P. E., Nichol, S. T., Yates, T. L., Gannon, W. L., Levy, C. E., Engelthaler, D. M., Davis, T., Tanda, D. T., Frampton, J. W., Nichols, C. R., Peters, C. J. & Childs, J. E. 1997. Patterns of association with host and habitat: antibody reactive with Sin Nombre Virus in small mammals in the major biotic communities of the southwester United States. *The American Society Of Tropical Medicine And Hygiene*, 56, 273-284.
- Moreno, T. K. I. 2009. The role of keystone species in the dynamic of infectious diseases: the case of prairie dog (*Cynomys ludovicianus*) and rodent-borne hemorrhagic fevers in Janos, Chihuahua, Mexico. *Maestría En*

Medicina Veterinaria Y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma De México.

- Muranyi, W., Bahr, U., Z., M., & Van Der Woude, F. J. 2005. Hantavirus infection. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 16, 3669–3679.
- Ostfeld, R. S., Glass, G. E. & Keesing, F. 2005. Spatial epidemiology: an emerging (or re-emerging) discipline. *Trends Ecol Evol*, 20, 328-36.
- Ostfeld, R. S. & Keesing, F. 2000. The function of biodiversity in the ecology of vector-borne zoonotic diseases. *Can. J. Zool*, 78, 2061-2078.
- Ostfeld, R. S. & Logiudice, K. 2003. Community disassembly, biodiversity loss, and the erosion of an ecosystem service. *Ecology* 84, 1421–1427.
- Peixoto, I. D. & Abramson, G. 2006. The effect of biodiversity on the hantavirus Epizootic. *Ecology*, 87, 873-879.
- Peters, C. J. & Khan, A. S. 2002. Hantavirus Pulmonary Syndrome: the new american hemorrhagic fever. *Clin Infect Dis.*, 1, 1224-31.
- Peterson, A., Robbins, A., Restifo, R., Howell, J. & Nasci, R. 2008. Predictable ecology and geography of west nile virus transmission in the central United States. *Journal Of Vector Ecology* 33, 342-352.
- Piudo, L., Monteverde, M. J., Walker, R. S. & Douglass, R. J. 2011. Rodent community structure and andes virus infection in sylvan and peridomestic habitats in northwestern Patagonia, Argentina. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 11, 315-24.
- Ramos, C. 2008. Los hantavirus causantes de la Fiebre Hemorrágica Con Síndrome Renal y del Síndrome Pulmonar. *Salud Pública De México* 50, 334-340.
- Reid, F. A. 2006. *Peterson Field Guide To Mammals Of North America*, Houghton Mifflin Company.
- Saasa, N., Sánchez-Hernandez, C., De Lourdes Romero-Almaraz, M., Guerrero-Ibarra, E., Almazán-Catalán, A., Yoshida, H., Miyashita, D., Ishizuka, M., Sanada, T., Seto, T., Yoshii, K., Ramos, C., Yoshimatsu, K.,

Arikawa, J., Takashima, I. & Kariwa, H. 2012. Ecology of hantaviruses in Mexico: genetic identification of rodent host species and spillover infection. *Virus Res*, 168, 88-96.

- Schmaljohn, C. S. & Hjelle, B. 1997. Hantaviruses: a global disease problem. *Emerging Infectious Diseases*, 3, 95-104.
- Schountz, T., Calisher, C. H., Richens, T. R., Rich, A. A., Doty, J. B., Hughes, M. T. & Beaty, B. J. 2007. Rapid field immunoassay for detecting antibody to Sin Nombre Virus in deer mice. *Emerging Infectious Diseases*, 13, 1604-1607.
- Schountz, T.; Acuna-Retamar, M.; Feinstein, S.; Prescott, J.; Torres-Perez, F.; Podell, B.; Peters, S.; Ye, C.; Black, W.C.; Hjelle, B. Kinetics of immune responses in deer mice experimentally infected with Sin Nombre Virus. *J. Virol.* 2012, 86, 10015–10027.
- Searlea, C. L., Bigaa, L. M., Spataforac, J. W. & Blaustein, A. R. 2011. A Dilution Effect In The Emerging Amphibian Pathogen *Batrachochytrium Dendrobatidis*. *Pnas*, 108, 16322-16326.
- Simpson, S. Q., Spikes, L., Patel, S. & Faruqi, I. 2010. Hantavirus Pulmonary Syndrome. *Infect. Dis. Clin. North Am.*, 24, 159–173.
- Song, K. J., Baek, L. J., Moon, S., Ha, S. J., Kim, S. H., Park, K. S., Klein, T. A., Sames, W., Kim, H. C., Lee, J. S., Yanagihara, R. & Song, J. W. 2007. Muju Virus, a novel hantavirus harboured by the arvicolid rodent *Myodes regulus* in Korea. *J. Gen. Virol.*, 88, 3121–3129.
- Spengler, J.R.; Haddock, E.; Gardner, D.; Hjelle, B.; Feldmann, H.; prescott, j. Experimental andes virus infection in deer mice: characteristics of infection and clearance in a heterologous rodent host. *Plos One* 2013, 8, E55310.
- Suzán, G., Ceballos, G., Mills, J. N., Ksiazek, T. G. & Yates, T. L. 2001. Serologic evidence of hantavirus infection in sigmodontine rodents in Mexico. *Journal Of Wildlife Diseases*, 37, 391-393.
- Suzán, G., Marce, E., Giermakowski, J. T., Mills, J. N., Ceballos, G., Ostfeld, R. S., Armien, B., Pascale, J. M. & Yates, T. L. 2009. Experimental evidence

for reduced rodent diversity causing increased hantavirus prevalence. *Plos One*, 4, E5461.

- Suzuki, A., Bisordi, I., Levis, S., Garcia, J., Pereira, L. E., Souza, R. P., Sugahara, T. K. N., Pini, N., Enria, D. & Souza, L. 2004. Identifying rodent hantavirus reservoirs, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 10, 2127-2134.
- Vado-Solís, I., Pérez-Osorio, C., Lara-Lara, J., Ruiz-Piña, H., Cárdenas-Marrufo, M., Milazzo, M. L., F. Fulhorst, C. F. & Zavala-Velázquez, J. 2003. Evidencia serológica de infección por hantavirus en población humana del estado de Yucatán, México. *Rev Biomed*, 14, 221-225.
- Yates, T. L., Mills, J. N., Parmenter, C. A., Ksiazek, T. G., Parmenter, R. R., Castle, J. R. V., Calisher, C. H., Nichol, S. T., Abbott, K. D., Young, J. C., Morrison, M. L., Beaty, B. J., Dunnum, J. L., Baker, R. J., Salazar-Bravo, J. & Peters, C. J. 2002. The ecology and evolutionary history of an emergent disease: Hantavirus Pulmonary Syndrome. *Bioscience*, 52, 989-998.

ANEXO I. Ensayo Inmuno-Enzimático proteína A/G para muestras conservadas en tiras nobuto.

Este ensayo detecta las IgG de mamíferos de varias especies, independientemente del antígeno que se utilice, siendo este antígeno específico para el anticuerpo que se esté buscando. Se utiliza una combinación de proteína A de *Staphylococcus* y la proteína G de *Streptococcus*, cada una de las cuales se une con alta afinidad a la porción Fc de las IgG de mamíferos (pero no otros isotipos). Ambas proteínas están enlazadas covalentemente a la peroxidasa de rábano picante. Esta técnica serológica tiene una especificidad del 82.9% y sensibilidad del 97.1% (Schountz et al., 2007).

Materiales

- Antígeno fragmento de la proteína N de la nucleocápside de SNV clonado en Pet21b de 15 kDa (Jonsson et al., 2001).
- PBS 1x
- Gelatina de piel de cerdo (Sigma G-6144).
- Sueros controles positivo y negativo diluidos (1:100) en PBS 1x.
- Albúmina Sérica Bovina (ASB)
- Mix de antibiótico penicilina / estreptomina.
- Proteína A / G peroxidasa (Pierce 32490, disponible de VWR)
- Sustrato revelador ABTS.
- Placas Falcón de PVC de 96 pozos fondo plano para inmunoensayo con tapas (BD 353912 y 353913).
- Tween-20 (Sigma P-1379).
- Micropipetas y puntas para micropipetas de 20ul, 200ul y 1000ul

Métodos

Preparación de soluciones.

- Se preparó la solución de sensibilización de placa con PBS con 0.5% de ASB, mezcla de 1% penicilina / estreptomina, se esterilizó con filtro, posteriormente se agregó el antígeno SNV a una concentración de 1ug/ml.
- Se preparó el buffer de bloqueo con PBS 1x más 0.25% de gelatina de piel de cerdo, posteriormente se calentó a 56°C durante 15 a 30 minutos para disolver.
- El buffer de lavado se preparó al 0.1% de Tween-20

Sensibilización de placas.

Se agregaron 100ul de la solución de sensibilización en cada pozo de la placa y se cubrieron con tapa plástica, posteriormente se conservaron en refrigeración durante 16 horas a 4°C.

Preparación de los sueros.

Este procedimiento se realizó dentro de gabinete de bioseguridad

- En tubos de microcentrifugación de 1.5ml se agregaron 500ul de PBS 1x, se cortaron las tiras nobutos hasta donde se encuentre absorbida la muestra posteriormente esta tira nobuto se colocó dentro del tubo, se dejaron eluir durante toda la noche a 4°C. En esta preparación la muestra se encontraba en una dilución 1:5.
- Al día siguiente se retiraron las tiras Nobuto y posteriormente se calentaron a baño María durante 30 minutos a 60°C para inactivar las muestras.
- Se realizaron diluciones de 1:20 de las muestras de sangre eluidas (obteniendo una dilución final de 1:100) en tubos de microcentrifugación añadiendo 25ul de la muestra eluida más 475ul de PBS 1x (total 500ul), esta fue la dilución de trabajo.

Inmunoensayo.

- Se lavaron las placas 3 veces con el buffer de lavado.
- Se añadieron 150ul del buffer de bloqueo y se incubaron durante 1 hora o más.

NOTA: Las placas pueden guardarse con el buffer de bloqueo durante dos semanas, siempre y cuando se mantengan a 4 ° C con tapas y envueltas en plástico.

- Posteriormente se lavaron las placas 3 veces con buffer de lavado, se añadieron 100ul de muestra (dilución 1:100) en cada pozo y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente.
- Se lavaron las placas 4 veces con buffer de lavado, a continuación, se preparó una dilución 1:5000 de la proteína A/G-HRP en PBS 1x y se añadieron 100ul de esta mezcla en cada pozo. Se incubaron durante 45 minutos protegidas de la luz directa.
- Posteriormente se lavaron las placas 4 veces con buffer de lavado, se añadió 100ul de ABTS activado a cada pozo y se dejaron incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente y protegidas de la luz.
- Se leyeron las placas a 405 nm.
- La densidad óptica ajustada se calculó restando la DO del control negativo a cada muestra y cualquier valor superior a 0.200 de DO se consideró positivo.

ANEXO II. Diagnóstico molecular mediante RT-PCR.

Extracción de RNA

La extracción de RNA a partir de las muestras de tejidos de órganos de roedores se realizó utilizando el método de Trizol® (Invitrogen) y paso por columna con el Kit QIAamp Viral RNA Mini Kit®. Las muestras se encontraban congeladas a -70°C.

Procedimiento

- El tejido fue macerado en mortero con una mezcla de RNAlater® y PBS 1x.
- Se agregaron 700 µl de trizol por cada 300 µl de muestra y se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente,
- Se adicionaron 200 µl de cloroformo, se agitaron durante 15 segundos en vórtex y se dejaron 3 minutos a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm durante 15 minutos a 4°C,
- Se recuperaron 500µl del sobrenadante en 500µl de isopropanol/etanol frío para precipitar, se mantuvieron a -80°C toda la noche.
- Una vez precipitado, se mezclaron suavemente y se centrifugaron a 12,000 rpm 10 min. a 4°C, se descartó el líquido y se lavó, agregando 1ml de etanol al 75%, se volvió a centrifugar 10 min. a 12,000 rpm, se descartó el etanol y se dejó secar a temperatura ambiente durante 15-30 min.
- A partir de este punto la extracción se continuó con el método por columna con la utilización de QIAamp Viral RNA Mini Kit®.
- Se agregaron 0.56 ml de buffer AVL y 5.6 µl de buffer acarreador por muestra, obteniendo un total de 565.6 µl,
- Se adicionaron 565 µl de etanol al 100%, mezclo en el vórtex durante 15 segundos

- Se colocaron 700 µl de cada mezcla a la columna y se centrifugó a 8000 rpm durante 2 minutos. Este procedimiento se repitió cambiando de tubo colector o descartando el contenido del tubo colector.
- Se añadieron 500 µl de buffer AW1 a la columna con tubo colector nuevo y se centrifugó a 8000 rpm durante 2 minutos.
- Se añadieron 500 µl de buffer AW2 cambiando el tubo colector y se centrifugó a 8000 rpm durante 2 minutos.
- Se eluyó en un tubo tipo eppendorf de 1.5 ml agregando 15 µl de buffer AVE, centrifugando a 8000 rpm por 2 minutos y repitiendo este procedimiento una segunda ocasión para obtener un volumen de 30ul de muestra.

Reacción en Cadena de la Polimerasa- Transcripción Reversa.

Tanto el protocolo como el control positivo (universal control) para el desarrollo de este diagnóstico fueron provistos por el grupo de investigación que diseñó los protocolos de diagnóstico PREDICT. Este protocolo fue diseñado por Dr S.J Anthony, Dr T. Goldstein, M.D Sanchez, Dr T. Seimon, Dr J.Fair, Dr B. Schneider, Dr J. Epstein, Eva Mertens y Dr I. Lipkin, de la Universidad de Columbia, U.C Davis, Global Viral Forecasting, EcoHealth Alliance y Wildlife Conservation Society.

Control Universal 1: El control positivo es un plásmido de ADN sintético que contiene regiones cortas de secuencia de solapamiento viral que actúan como sitios de unión de los primers para diferentes ensayos de PCR. Fueron sintetizados bajo el control de una secuencia promotor de T7, y por lo tanto puede ser transcrito en ARN para ensayos basados en la retrotranscripción para el diagnóstico de virus de ARN. Este control ha sido probado y funciona para el diagnóstico de diferentes virus, incluyendo: filovirus, coronavirus, arenavirus,

hantavirus, flavivirus, seadornavirus, bocavirus, paramixovirus, alfavirus y Nipah virus.

Protocolo PREDICT Protocol-P010

Referencia: Modificado de Raboni, SM et al. 2005. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 72: 800-804.

Nota: La publicación original describe una PCR aninada diseñada para la identificación de hantavirus de Sudamérica. En este protocolo se realizaron modificaciones para aumentar la reactividad a un amplio número de hantavirus, aunque requiere de validación completa. Esta versión es una PCR hemi-anidada en la que se utilizan primers altamente degenerados.

Blanco: Segmento- S

Cebadores.

Primera vuelta

UHantaF3: AGCACAYTVCAIIIBAGRCGG

UHantaR3: GAYNATVTTYCTIGCYTTDAYYTGDGC

Segunda vuelta

UHantaF4: CCWVHKGAYCCAACWGG

UHantaR3: el mismo de la primera vuelta.

Control: Control Universal 1.

Mezcla de reacción con One-Step Qiagen ®: este kit de reactivos se utilizó para la primera vuelta del protocolo. El volumen final ajustado fue de 25ul por cada reacción para cada muestra. La mezcla de reacción para el control positivo fue

igual que para muestras, pero el volumen del control utilizado fue de 1ul en dilución de 1:1000 para la primera vuelta.

Mezcla de reacción con TaqPolimerase platinum ®: este kit de reactivos se utilizó para la segunda vuelta del protocolo. El volumen final ajustado fue de 25ul por cada reacción para cada muestra. La mezcla de reacción para el control positivo fue igual que para muestras, en esta reacción debe hacerse dilución de 1:100 a partir del producto de PCR de la primera vuelta. En el volumen para el control negativo se hizo una mezcla de control de reactivos por lo que sólo se agregó agua para ajustar hasta los 25ul de volumen final.

Protocolo PCR

Protocolo largo:

Primera vuelta: 94°C 2 min, después 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 38°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos. Finaliza con una extensión 72°C por 10 minutos.

Segunda vuelta: 94°C 2 min, después 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 42°C por 30 segundos, 72°C for 2 minutes. Finaliza con 72°C for 10 minutes.

Tamaño del amplicón:

Después de la primera vuelta el amplicón esperado es de 532 bp

Después de la segunda vuelta el amplicón esperado es de 417 bp

Visualización de amplicones

Se preparó gel de agarosa al 1.5%

Una vez gelificado, se procedió a mezclar 5ul del producto de PCR, 8ul de buffer de carga y 1ul de GelRed®.

Se observó el gel en transiluminador de UV.

Financiamiento

Esta investigación forma parte de los objetivos de los proyectos:

- Ecología de enfermedades infecciosas en el noroeste de México. Con clave AC_0118316
- Efecto de la diversidad sobre la prevalencia de agentes Zoonóticos en roedores del noroeste de Chihuahua. Con clave CB-179482

Estos proyectos fueron financiados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.