



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ARENAVIRUS (*Arenaviridae*) EN
ROEDORES SILVESTRES DEL NOROESTE DE CHIHUAHUA, MÉXICO.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA

P R E S E N T A

VÍCTOR HUGO MENDOZA GUTIÉRREZ

ASESORES:

M. EN C. ANDRÉ VICTOR RUBIO CARRASCO

DRA. ROSA ELENA SARMIENTO SILVA

DR. GERARDO SUZÁN AZPIRI



MÉXICO D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Biblioteca Central

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM



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.

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ARENAVIRUS (*Arenaviridae*) EN ROEDORES
SILVESTRES DEL NOROESTE DE CHIHUAHUA, MÉXICO.**

DEDICATORIA

**A mi familia: Flor, Felipe, Violeta, Azucena, Regina, Nelly, Alma, Irma,
Enrique y Sabina.**

A la música, por mantenerme vivo.

**A los roedores y a todos aquellos seres vivos que han dado la vida por la
investigación, aunque no sea por voluntad propia.**

A este hermoso lugar donde coexistimos, caminamos y vivimos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se llevó a cabo gracias al apoyo del proyecto CONACyT “Efecto de la diversidad sobre la prevalencia de agentes zoonóticos en roedores del noroeste de Chihuahua”, del cual obtuve el financiamiento para campo, laboratorio y el apoyo a partir de una beca.

El aporte del control positivo universal (Universal Control 1) y el diseño de los iniciadores para la RT-PCR estuvieron a cargo por parte de PREDICT-USAID (Laboratory Protocols for PREDICT Surveillance, 2011).

A mis asesores, M. en C. André Rubio, por ser un excelente asesor, por la extrema paciencia que demostró, por la amistad y por todo el apoyo brindado, vital para el desarrollo de este estudio. A la Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva por todos los buenos consejos tanto en el aspecto académico como en el personal, por la fuerte amistad y por el apoyo brindado en el laboratorio. Al Dr. Gerardo Suzán, por darme esta gran oportunidad y por ser un ejemplo a seguir.

Al Laboratorio de Virología de la FMVZ-UNAM del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, UNAM, por brindarme el apoyo para el procesamiento de mis muestras.

A los integrantes del Proyecto Janos, por la extensa ayuda en el campo y captura de roedores y por ayudarme a montar la técnica de laboratorio.

A los integrantes del grupo de Ecología de Enfermedades de la FMVZ por el apoyo brindado y por aceptarme como un miembro más del equipo.

A mis compañeros de generación Guadalupe Bárcenas, Santiago Martín, Manuel Moguel, Alberto Rocha, Ma. José González, Jonathan López, Fernanda Balderas, Cristina Lavín, María Fernanda Ramírez y Astrid Spinolo, por todo el apoyo brindado en todos estos años.

Por último, quisiera agradecer a los miembros del jurado por apoyarme a lo largo del desarrollo de este trabajo y por ayudarme a resolver mis dudas, iniciándome en el largo camino de la investigación.

Contenido

1.	RESUMEN	1
2.	INTRODUCCIÓN	2
2.1.	ARENAVIRUS.....	3
2.2.	ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN GENÓMICA.....	6
2.3.	CICLO VIRAL.....	8
2.4.	EPIDEMIOLOGÍA.....	10
2.5.	MANIFESTACIÓN CLÍNICA EN HUMANOS	11
2.6.	DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO	12
2.7.	TRATAMIENTO EN HUMANOS	13
2.8.	PREVENCIÓN	13
2.9.	RESERVORIOS E HISTORIA EVOLUTIVA	14
2.10.	RESERVORIOS EN NORTE AMÉRICA.....	15
2.10.1.	<i>Neotoma spp.</i>	15
2.10.2.	<i>Peromyscus spp.</i>	16
2.11.	REGIÓN JANOS-CASAS GRANDES.....	17
3.	JUSTIFICACIÓN	19
4.	HIPÓTESIS	20
5.	OBJETIVO GENERAL	20
6.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
7.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
7.1.	ÁREA DE ESTUDIO Y DISEÑO DE MUESTREO	21
7.2.	CAPTURA DE ROEDORES	22
7.3.	OBTENCIÓN Y MANEJO DE MUESTRAS	23
7.4.	MONTAJE DE LA TÉCNICA DE LABORATORIO	24
7.4.1.	Extracción del material genético	24
7.4.2.	Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa	26
7.4.3.	Electroforesis	28
7.5.	ANÁLISIS DE ABUNDANCIA SOBRE POTENCIALES RESERVORIOS	28
8.	RESULTADOS.....	29
8.1.	MONTAJE DE LA TÉCNICA DE RT-PCR Y ANÁLISIS MOLECULAR	29
8.2.	CAPTURA DE ROEDORES	30
8.3.	RESERVORIOS.....	31
9.	DISCUSIÓN	32
10.	REFERENCIAS.....	36

1. RESUMEN

MENDOZA GUTIÉRREZ VÍCTOR HUGO. DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE ARENAVIRUS (*Arenaviridae*) EN ROEDORES SILVESTRES DEL NOROESTE DE CHIHUAHUA, MÉXICO. (BAJO LA DIRECCIÓN DE: M. EN C. ANDRÉ VÍCTOR RUBIO CARRASCO, DRA. ROSA ELENA SARMIENTO SILVA Y DR. GERARDO SUZÁN AZPIRI). Los arenavirus (*Mammarenavirus*; *Arenaviridae*) son un grupo de virus causantes de enfermedad zoonótica transmitida por roedores de gran interés, ya que hasta la fecha se tiene registro de ocho arenavirus patógenos, algunos potencialmente letales. En México se tiene evidencia serológica en roedores de diversos estados y también evidencia molecular en dos zonas del país. El noroeste de Chihuahua es una región de potencial importancia para el estudio de arenavirus, ya que existe un reporte de roedores seropositivos a arenavirus. Además, dicha zona presenta cercanía geográfica y similitud de condiciones ecológicas con zonas del suroeste de Estados Unidos donde existen roedores reservorios de arenavirus y casos de fiebre hemorrágica en humanos. Los objetivos de este trabajo fueron i) montar la técnica de RT-PCR anidada para el diagnóstico molecular de arenavirus, ii) analizar muestras de órganos de roedores silvestres del noroeste de Chihuahua mediante dicha técnica y iii) determinar las diferencias entre la abundancias de roedores reservorios potenciales de arenavirus en tres distintos hábitats (matorral de mezquite; pastizal con presencia de perritos de la pradera, *Cynomys ludovicianus*; pastizal sin perritos de la pradera) en el noroeste de Chihuahua. En este estudio, pudimos estandarizar la técnica de diagnóstico molecular para arenavirus mediante la RT-PCR anidada. En marzo y octubre de 2013, se capturaron 504 roedores pertenecientes a 10 especies, 6 Géneros y 2 Familias, de los cuales se colectaron muestras de 85 diferentes individuos para el análisis de laboratorio. No se logró determinar la presencia de arenavirus en las muestras analizadas. Por otro lado, los resultados del análisis de abundancias de reservorios mostraron que existen diferencias significativas entre las abundancias de reservorios potenciales en los distintos tipos de hábitats ($H=10.26$; $p=0.006$). Se encontró una mayor abundancia de roedores reservorios potenciales en mezquite en comparación a los pastizales sin perritos de la pradera. No se encontraron diferencias entre las abundancias de reservorios entre mezquite y pastizal con perritos de la pradera y entre ambos pastizales. La estandarización de una técnica para el diagnóstico de arenavirus en México servirá como base para futuras investigaciones sobre la ecología del virus y sus reservorios, así como su relación con la salud humana. Los resultados negativos en este trabajo no indican necesariamente que el virus no se encuentra circulando en los roedores de la zona. Se sugiere que estudios posteriores en la zona de estudio se enfoquen principalmente en muestrear roedores en zonas de matorrales con mezquites.

2. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas emergentes (EIE) son enfermedades nuevas que han aparecido en una población o que ya han existido previamente, aumentando de manera rápida su incidencia y modificando su rango geográfico (Woolhouse et al., 2005). En décadas recientes se ha incrementado el número de EIE que afectan al ser humano, llegando a registrarse entre 1940 y 2004 más de 300 patógenos causales (Jones et al., 2008). Este fenómeno se ha visto relacionado principalmente con actividades antropogénicas, tales como, el cambio de uso de suelo, el aumento en la movilización de las personas y la invasión humana hacia ambientes naturales (Daszak et al., 2000).

Alrededor del 60% de las EIE son causadas por patógenos zoonóticos (transmisión animal-humano). De estas zoonosis, el 70% proviene de la fauna silvestre (Jones et al., 2008), hecho que ha acrecentado el interés en investigación sobre temas que involucren la relación entre fauna silvestre y sus patógenos (Jones et al., 2013), entre los cuales destacan los murciélagos (*Chiroptera*) y roedores (*Rodentia*) como principales reservorios silvestres de enfermedades zoonóticas (Luis et al., 2013; Young et al., 2014).

Dentro de las enfermedades virales zoonóticas transmitidas por roedores se encuentran las fiebres hemorrágicas causadas por dos grupos distintos de virus, los arenavirus (*Arenaviridae*) y los hantavirus (*Bunyaviridae*) (Cleri et al., 2006). En general, cada virus de ambos grupos está relacionado primariamente con una sola especie de roedor de las Familias *Muridae* o *Cricetidae* (Charrel y De Lamballerie,

2003; Kunz, 2009). La distribución geográfica del hospedero marca directamente la distribución del virus (Charrel y De Lamballerie, 2010) y por lo tanto, el área máxima en la cual la enfermedad pueda ser endémica (Mills y Childs, 1998).

Algunas de las especies del Género *Mammarenavirus* (Radoshitzky et al., 2015), miembros de la Familia *Arenaviridae*, son consideradas agentes causales de fiebres hemorrágicas y meningitis aséptica en humanos, quienes se infectan a partir del contacto con roedores infectados o por inhalación de excreciones y secreciones de los mismos (Charrel et al., 2011). En los hospederos silvestres provocan infección crónica y asintomática (Milazzo et al., 2013).

Por otro lado, se ha determinado que los distintos hábitats dentro de un paisaje pueden presentar diferentes composiciones de hospederos, esto puede llevar a que algunos hábitats presenten mayores prevalencias de ciertos patógenos como los arenavirus (Bennett et al., 2000; Laakkonen et al., 2006; Charbonnel et al., 2008; Coulibaly-N'Golo et al., 2011), y por ende, un mayor riesgo de exposición para los humanos.

A continuación se presenta información general sobre los arenavirus y posteriormente se presenta información sobre las características del área de estudio como zona potencial para la presencia de arenavirus.

2.1. ARENAVIRUS

De acuerdo con la lista más reciente del 9° Comité Internacional de Taxonomía de Virus (Salvato et. al, 2012) y en base a las modificaciones realizadas por Radoshitzky y colaboradores (2015), la Familia *Arenaviridae* se comprende en dos

géneros, *Mammarenavirus* y *Reptarenavirus*, formados a su vez por 27 y 3 especies, respectivamente. Además, se tiene evidencia de algunas otras especies propuestas que no han sido incluidas en la lista (Charrel y De Lamballerie, 2008; Inizan et al., 2010; Cajimat et al., 2012).

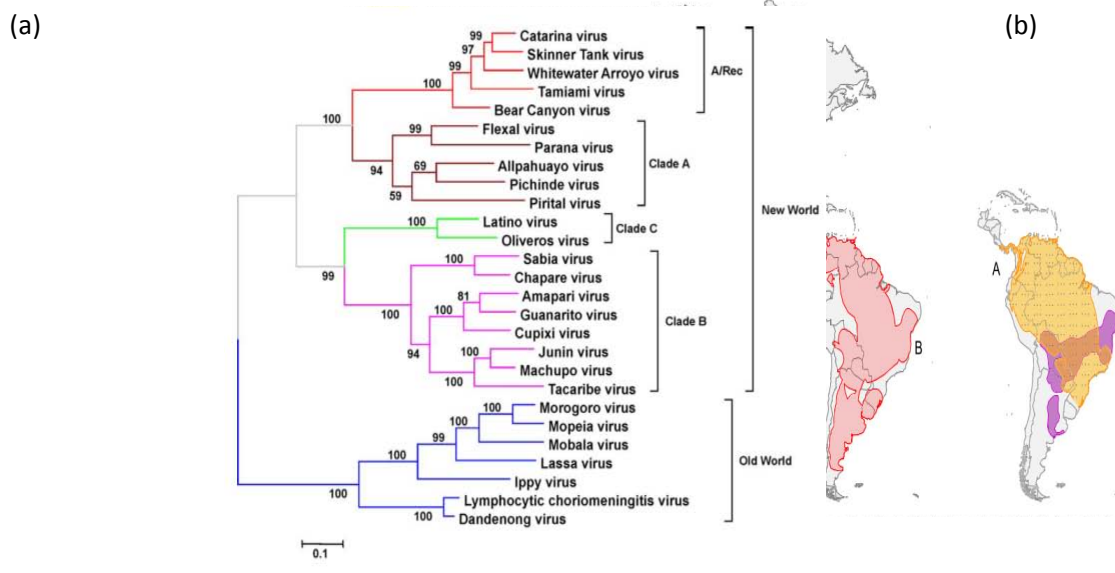


Figura 1. (a) Árbol filogenético de distintos arenavirus. Arenavirus del Viejo Mundo en color azul, clado A-Rec en rojo, clado A en café, clado B en morado y clado C en verde (imagen tomada de Emonet et al., 2009). (b) Distribución de los roedores hospederos según el clado de arenavirus que lo infecta (imagen tomada de Irwin et al., 2012).

Desde el punto de vista serológico, filogenético y geográfico, los arenavirus correspondientes al Género *Mammarenavirus* se dividen en dos grandes grupos o serocomplejos (figura 1), (1) el complejo Lassa-Coriomeningitis Linfocítica, que incluye a los arenavirus del viejo mundo y al ubicuo Virus de la Coriomeningitis Linfocítica (LCMV), y (2) el complejo Tacaribe que incluye a los arenavirus del Nuevo Mundo (cuadro 1) (Clegg, 2002; Charrel y De Lamballerie, 2008; Yun y

Walker, 2012). A su vez, los virus pertenecientes al complejo Tacaribe se agrupan, según características filogenéticas, en tres clados A, B y C (Bowen et al., 1996).

Cuadro 1. Arenavirus del Nuevo Mundo. Distribución de arenavirus y roedores hospederos a los que infectan, tomando en cuenta si son causantes de enfermedad zoonótica (modificado de Charrel y De Lamballerie, 2010). * Virus no reconocido como especie por el ICTV; **NR** No reportado; **FH** Fiebre hemorrágica; **EF** Enfermedad febril adquirida en laboratorio; **PEF-L** Posible enfermedad febril adquirida en laboratorio; **PEF** Posible enfermedad febril; † Aislado de un caso fatal en humanos

Virus.	Abreviación	Clado	Distribución	Huésped	Zoonosis
Allpahuayo mamarenavirus	ALLV	A	Perú	<i>Oecomys sp</i>	NR
Amapari mamarenavirus	AMAV	B	Brasil	<i>Oryzomys gaeldi</i> <i>Neacomys guianae</i>	NR
Bear Canyon mamarenavirus	BCNV	A-REC	E.U.A	<i>Peromyscus californicus</i>	NR
Big Brushy Tank*	BBTV	A-REC	E.U.A.	<i>Neotoma albigula</i>	NR
Catarina*	CTNV	A-REC	E.U.A.	<i>Neotoma micropus</i>	NR
Chapare mamarenavirus	CHPV	B	Bolivia	<i>Desconocido†</i>	FH
Cupixi mamarenavirus	CPXV	B	Brasil	<i>Oryzomys spp</i>	NR
Flexal mamarenavirus	FLEV	A	Brasil	<i>Oryzomys spp</i>	EF-L
Guanarito mamarenavirus	GTOV	B	Venezuela	<i>Zygodontomys brevicauda</i>	FH
Junín mamarenavirus	JUNV	B	Argentina	<i>Calomys musculus</i>	FH
Latino mamarenavirus	LATV	C	Bolivia	<i>Calomys callosus</i>	NR
Machupo mamarenavirus	MACV	B	Bolivia	<i>Calomys callosus</i>	FH
Ocozocoautla de Espinoza*	OCEV	NR	México	<i>Peromyscus mexicanus</i>	NR
Oliveros mamarenavirus	OLVV	C	Argentina	<i>Bolomys spp</i>	NR
Paraná mamarenavirus	PARV	A	Paraguay	<i>Oryzomys buccinatus</i>	NR
Patawa mamarenavirus	PTWV	A	Guyana Francesa	<i>Oecomys spp</i>	NR
Pichinde mamarenavirus	PICV	A	Colombia	<i>Oryzomys albigularis</i>	NR
Pinhal*	PINV	NR	Brasil	<i>Calomys tener</i>	NR
Piritai mamarenavirus	PIRV	A	Venezuela	<i>Sigmodon alstoni</i>	NR
Real de Catorce*	RCTV	NR	México	<i>Neotoma leucodon</i>	NR
Sabiá mamarenavirus	SABV	B	Brasil	<i>Desconocido†</i>	FH
Skinner Tank*	SKTV	A-REC	E.U.A.	<i>Neotoma mexicana</i>	NR
Tacaribe mamarenavirus	TCRV	B	Trinidad	<i>Artibeus spp. (quiróptero)</i>	PEF-L
Tamiami mamarenavirus	TAMV	A-REC	E.U.A.	<i>Sigmodon hispidus</i>	NR
Tonto Creek*	TTCV	A-REC	E.U.A.	<i>Neotoma mexicana</i>	NR
White Water Arroyo mamarenavirus	WWAV	A-REC	E.U.A.	<i>Neotoma mexicana</i>	PEF

2.2. ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN GENÓMICA

Los miembros del Género *Mammarenaviridae* son virus envueltos con ARN de cadena sencilla y doble sentido, poseen un genoma bisegmentado compuesto por el segmento L (Large) de 7200 nucleótidos, que codifica para dos proteínas, la L-polimerasa y la proteína Z, y el segmento S (Small) de 3400 nucleótidos, que codifica para un precursor de la Glicoproteína (GP) y la Nucleoproteína (NP) (Archer et al, 2002; Urata et al., 2012), divididos a la vez por una región intergénica no codificante (IGR) (Buchmeier et al., 2007). La Figura 2 esquematiza la estructura y organización genómica de los arenavirus.

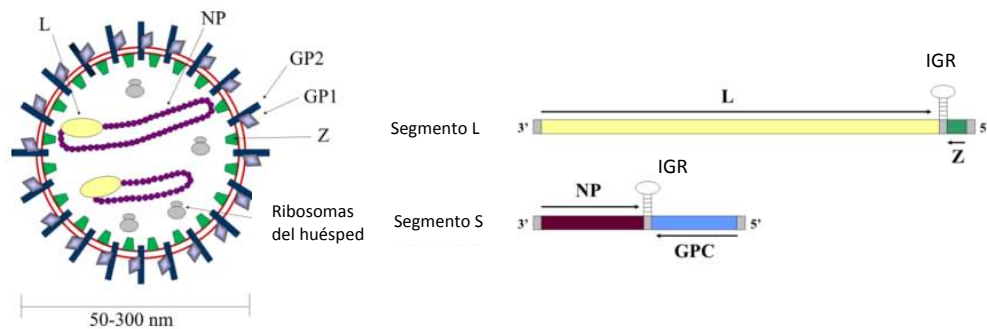


Figura 2. Esquema del virión y genoma del arenavirus (tomado de Wolff et al., 2013). En la figura izquierda se observan las proteínas L, NP y GP (GP-1 y GP-2) y Z, componentes del virión de los arenavirus, además de los ribosomas del huésped que dan el aspecto “arenoso” visto en microscopía electrónica. La figura derecha representa el genoma de los arenavirus, tanto del segmento L como del S, así como las regiones que codifican para las proteínas divididas a su vez por la IGR.

En los extremos 3' y 5' de cada segmento de ARN se encuentran 19 nucleótidos que son complementarios y altamente conservados en todos los arenavirus, mismos que son esenciales para los procesos de replicación y transcripción, y que incluso se cree que son los sitios de unión para la polimerasa viral (Salvato, 2005). Esta complementariedad de secuencia permite que los ARNs genómicos

conformen una estructura circular "*pan-handle*" necesaria para la síntesis de ARN eficiente (Lee et al., 2002).

Los viriones son esféricos a pleomórficos con un diámetro de 50-300 nm (el diámetro medio de partículas esféricas es de 120 nm), mientras que los ribosomas de las células del huésped, presentes en las partículas virales, son responsables de la apariencia arenosa del virus visto con microscopia electrónica, característica que da el nombre a los arenavirus (Latin: *arena*) (Gonzalez, 2007).

La NP (63 kDa) es el polipéptido más abundante en las células infectadas y en los viriones (alrededor de 1530 NP por virión). Es el principal elemento estructural de la nucleocápside viral y se asocia con el genoma para formar una estructura esférica. La NP es un componente clave del complejo de ribonucleoproteína viral (RNP) que dirige la síntesis de ARN viral y constituye la unidad mínima de infectividad (Buchmeier et al., 2007).

La GP consta de una estructura espicular compuesta por GP1 (40 kDa), GP2 (35 kDa) (Schlie et al., 2010) y un pequeño péptido de 58 aminoácidos que funciona como señalizador al dirigir a la GP hacia el retículo endoplásmico (Nunberg y York, 2012). Es substancial que la GP lleve a cabo un proceso de proteólisis para obtener dicha estructura espicular (Beyer et al., 2003).

Se ha determinado que GP1 es la proteína de unión al receptor α -dístroglicano (α -DG) para los virus miembros del clado C, mas no de A y B, del Nuevo Mundo, así como para los virus LCMV y *Lassa marmarenavirus* (LASV) (Spiropoulou et al.,

2002). El segmento L codifica para la proteína L (200 kDa), una polimerasa dependiente de ARN (RdRP) (Zapata y Salvato, 2013). La proteína Z (11 kDa) es un componente estructural de los arenavirus (Salvato et al., 1992), desempeñando diversas funciones en el ciclo de multiplicación viral (Wang et al., 2012). Se sabe, por ejemplo, que la proteína Z está directamente relacionada con la síntesis de ARN (Cornu y De la Torre, 2001), además de ser necesaria para un correcto ensamblaje y liberación del virión (Fehling et al., 2012).

2.3. CICLO VIRAL

Numerosos estudios han revelado que los arenavirus presentan tropismo hacia diversos tejidos en los roedores y otros mamíferos incluyendo al hombre, tanto en pulmón, bazo, piel, riñón, hígado, corteza adrenal, miocardio, lengua y linfonodos (Fulhorst et al., 2001a; Abbott et al., 2004; Mattar et al., 2011). Los roedores adquieren el virus a partir de heridas ocasionadas por encuentros agresivos entre machos (transmisión horizontal) (Fichet-Calvet et al., 2014) o por vía transplacentaria (transmisión vertical) (Tagliapietra et al., 2009).

El receptor de unión principal para muchos de los arenavirus es el α -DG, incluyendo a los miembros del Viejo Mundo y a los integrantes del clado C del Nuevo Mundo (Spiropoulo et al., 2002), mientras que para el caso de *Junin mammarynavirus* (JUNV) y *Machupo mammarynavirus* (MACV) se ha propuesto al receptor de unión Transferrina 1 como vía de infección a la célula (Radoshitzky et al., 2007). Sin embargo, aún hay varios miembros de la Familia *Arenaviridae* cuyo receptor de unión se desconoce en la actualidad. Tras la unión a los receptores

celulares, los virus son internalizados por vesículas, y luego se liberan en el citoplasma a través de una etapa de fusión de membrana dependiente del pH que se lleva a cabo por la porción transmembranal de la glicoproteína viral, GP2 (Eschli et al., 2006).

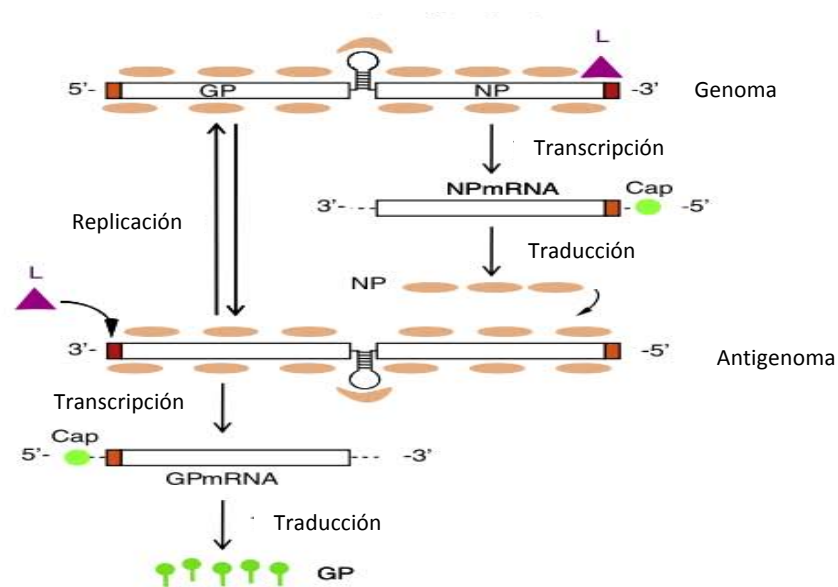


Figura 3. Replicación y transcripción del segmento S genómico del arnavirus (tomado de Emonet et al., 2011). Una vez que la RNP viral se libera en el citoplasma de la célula infectada, la L-polimerasa o RdRP inicia la transcripción a partir de un promotor situado en el extremo 3' del genoma. La transcripción primaria resulta en la síntesis de NP-mRNA y L-mRNA de los segmentos S y L respectivamente. Posteriormente la RdRP adopta una función de replicasa y se mueve a través de la IGR para generar una copia completa del genoma (antigenoma). Este antigenoma servirá como plantilla para la síntesis de GP-mRNA y Z-mRNA. Los antigenomas resultantes también sirven como plantillas para la amplificación del ARN del genoma viral.

La síntesis de ARN se lleva a cabo en el citoplasma celular. Debido a la estrategia de codificación “doble sentido” (del inglés *ambisense*) de estos virus, los genes NP y L se transcriben directamente de los segmentos genómicos virales, mientras que los mRNAs de GP y Z deben ser transcritos de la cadena antigenómica (Günther y Lenz, 2004), tal y como se muestra en la figura 3. Junto con NP y L, los dos segmentos de genoma “doble sentido” se ensamblan en complejos de RNPs, que

sirven como las plantillas para la transcripción y la replicación por la RdRP (Wolff et al., 2013). Tras la liberación de la ribonucleoproteína viral (vRNP) en el citoplasma de las células infectadas, la ARN polimerasa viral asociada a vRNP inicia la replicación del ARN viral y la transcripción de genes (Urata y Yasuda, 2012).

2.4. EPIDEMIOLOGÍA

Hasta la fecha, se tiene registro de distintos arenavirus que pueden causar enfermedad en humanos, entre ellos se encuentran el virus *Lujo mammarenavirus* (LUJV) y el LASV en África; el LCMV, de distribución mundial y los virus JUNV, MACV, *Guaranito mammarenavirus* (GTOV), *Sabiá mammarenavirus* (SABV) y *Chapare mammarenavirus* (CHPV), en Sudamérica (Buchmeier et al., 2007; Brieze et al., 2009). Además, aunque se conoce muy poco sobre las consecuencias en la salud humana, otros arenavirus como TCRV y *Flexal mammarenavirus* (FLEV) han causado enfermedad febril a trabajadores en laboratorios de investigación (Buchmeier et al., 2007). Por otro lado, hay datos sobre tres casos fatales en personas de California, EUA, ocasionados por WWAV (CDC, 2000). Los virus antes descritos han sido incluidos en la categoría A de la lista de patógenos y considerados como agentes bioseguridad nivel 4 en los Estados Unidos y Europa (Charrel et al., 2011).

La perturbación del medio ambiente, ya sea debido a ciertas actividades humanas (prácticas agrícolas, urbanización, etc.) o a cambios ecológicos naturales (inundaciones, tormentas, etc.) puede dar lugar a cambios poblacionales de los

hospederos reservorios, aumentando el riesgo de contacto con humanos y por ende, de infección (Charrel et al., 2011). Por ejemplo, Fulhorst y colaboradores (2007) ponderan que el riesgo de infección por arenavirus en personas cuya ocupación implica un contacto físico cercano con roedores reservorios en Norte América es bajo, mientras que para el caso de infecciones con arenavirus de Sudamérica (muchos de ellos causantes de fiebres hemorrágicas), implica un riesgo potencial en personas con actividades ligadas a la agricultura (Cleri et al. 2006).

2.5. MANIFESTACIÓN CLÍNICA EN HUMANOS

Los humanos y los hospederos no reservorios inhalan aerosoles que contienen el virus, el cual se ha demostrado que ingresa por las células epiteliales gastrointestinales y respiratorias a través de la membrana plasmática apical (Buchmeier et al., 2007).

Existen básicamente dos manifestaciones clínicas en humanos ocasionadas por la infección de arenavirus. En la mayoría de los casos, son dependientes del virus causante de la infección, así pues, la fiebre hemorrágica viral puede ser causada por el LASV y el LUJV África o por el JUNV, MACV, SABV, GTOV y CHPV en Argentina, Bolivia, Venezuela y Brasil, respectivamente (Buchmeier et al., 2007; Delgado et al., 2008; Briese et al., 2009). La infección por el virus LCM puede resultar en enfermedad del sistema nervioso central aguda y malformaciones congénitas (Barton y Hyndman, 2000). Además, recientemente se ha descrito como una causa importante de infección fatal en los receptores de trasplante de

órganos y los pacientes inmunocomprometidos (Palacios et al., 2008; Singh, 2013).

2.6. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Los procedimientos de diagnóstico serológico, como por ejemplo, ensayo inmunoenzimático (ELISA), fijación del complemento, inmunofluorescencia indirecta o ensayo de neutralización (Martínez et al., 2007; Charbonnel et al., 2008; Cajimat et al., 2011), pueden indicar la circulación de arenavirus en una población dada de una región específica y esto puede servir como base para estudios que integren métodos moleculares que demuestren la presencia del virus (Charrel y De Lamballerie, 2011).

En los brotes de fiebres hemorrágicas virales donde se sospecha de arenavirus, las infecciones se confirman mediante diversos métodos de diagnóstico de laboratorio. La detección de arenavirus se lleva a cabo mediante aislamiento viral, reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) y serología por ELISA (Fukushi et al., 2012). Se ha demostrado que los paneles de anticuerpos monoclonales contra arenavirus patógenos son útiles para detectar antígenos virales en las células infectadas, así como para la investigación de las relaciones antigénicas de los arenavirus (Buchmeier et al., 1981).

Hoy en día, la prueba de (RT-PCR) representa uno de los métodos más rápidos, válidos y más utilizados para el diagnóstico de arenavirus (Lozano et al., 1995, Charrel y De Lamballerie, 2010).

2.7. TRATAMIENTO EN HUMANOS

Existen diversos compuestos que han sido probados experimentalmente y en campo para bloquear diferentes pasos del ciclo de replicación del arenavirus, incluyendo la entrada, la replicación y la salida (Mclay et al., 2013). Sin embargo, el antiviral más utilizado para combatir la infección en humanos por JUNV es la Ribavirina, cuya eficacia está dada solamente cuando el tratamiento es administrado en la fase temprana de la infección, teniendo efectos secundarios significativos de toxicidad (Günter y Lenz, 2004).

También para la infección por JUNV y en una etapa temprana, la inmunoterapia con interferón gamma mostró una eficaz reducción de la tasa de mortalidad del 30% al 1% (Maiztegui et al., 1979).

2.8. PREVENCIÓN

Las modificaciones del medio ambiente debido a las actividades humanas han sido implicadas en la aparición de enfermedades humanas causadas por arenavirus, resultantes de los cambios en el comportamiento del huésped reservorio (Charrel y Lamballerie, 2010), por lo que un manejo adecuado de zonas naturales con reservorios potenciales sugiere un primer estado de prevención zoonótica para el arenavirus (Jay et al., 2005). En regiones de América del Sur, donde algunos arenavirus son endémicos y en donde han existido brotes de fiebre hemorrágica, se ha recomendado como medida de prevención, la sustitución de cultivos o la quema periódica de áreas verdes de altura que se encuentran en las proximidades de los campos (Childs y Peters, 1993).

En Argentina, existe una vacuna con virus atenuado utilizada como preventivo para la fiebre hemorrágica argentina en humanos, causada por la infección con JUNV, llamada Candid # 1 (Maiztegui et al., 1998), que además proporciona una protección cruzada contra MACV (Jahrling et al., 1988). Recientemente y de manera experimental, se está probando una vacuna atenuada recombinante de LCMV/Vesiculovirus evita la exposición letal con LCMV en ratones, provocando una rápida y larga vida de inmunidad mediada por células contra el desafío letal con el tipo salvaje LCMV (Bergthaler et al., 2006).

2.9. RESERVORIOS Y COEVOLUCIÓN

Existen diversos estudios que han determinado una estrecha historia coevolutiva entre virus y sus hospederos reservorios (e. g. Jackson y Charleston, 2004; Lobo et al., 2009; Little et al., 2010). Para el caso de los arenavirus y en base a la evidencia filogenética, se ha establecido que evolutivamente cada virus está restringido a una sola especie de roedor (Hugot et al., 2001; Irwin et al., 2012). Los arenavirus del Viejo Mundo están asociados con roedores de la Familia *Muridae*, Subfamilia *Murinae* (ratas y ratones del Viejo Mundo) y los virus del Nuevo Mundo con la Familia *Cricetidae*, Subfamilia *Sigmodontinae* (ratas y ratones del Nuevo Mundo) (González y Duplantier, 1999). Por otro lado, Downs y colaboradores, aislaron en 1963 a un arenavirus (*Tacaribe mammarenavirus*, TCRV) de un murciélago *Artibeus* spp., sin embargo se ha postulado que estos murciélagos no son reservorios de arenavirus y que el hallazgo incidental del TCRV se debió producto del contacto roedor-murciélago (Cogswell-Hawkinson et al., 2012). En 2014, Sayler y colaboradores, también aislaron TCRV en garrapatas del Género

Amblyoma. Por otro lado, en China se han encontrado anticuerpos contra arenavirus en musarañas de la Familia *Soricidae* (Li et al., 2015), además de los arenavirus pertenecientes al recientemente incorporado Género *Reptarenavirus*, aislados de serpientes en cautiverio (Hetzl et al., 2013; Bodewes et al., 2014). Esto sugiere que la relación hospedero-virus y la ecología de los arenavirus es por de más compleja.

Los arenavirus causan una infección crónica y asintomática en sus roedores reservorios principales (Hugot et al., 2001), mientras que los reservorios secundarios son aquéllos potencialmente y esporádicamente infectados con arenavirus y sólo producen viremia durante la infección aguda (Bowen et al., 1997). La infección persistente en los roedores es causada tanto por los mecanismos moleculares del virus como por una respuesta inmune deficiente por parte del hospedero (Cleri et al., 2006).

2.10. RESERVORIOS EN NORTE AMÉRICA

2.10.1. *Neotoma* spp.

Probablemente es en el Género *Neotoma* donde más estudios se han hecho en América para la identificación de arenavirus del complejo Tacaribe. Tal es el caso de la rata de garganta blanca (*Neotoma albigula*), especie descrita como reservorio principal para *White Water Arroyo mammarenavirus* (WWAV) (Fulhorst et al., 1996). Diversos estudios de laboratorio, sugieren que el estado de portador crónico de WWAV en la rata de garganta blanca suele ser resultado de la

exposición al virus en vida temprana (Fulhorst et al., 2001a) y que la transmisión vertical es una vía importante de transmisión en este roedor (Abbott et al., 2004).

Otros miembros del Género *Neotoma* han sido relacionados con los arenavirus, por ejemplo Catarina virus (CTNV) ha sido identificado en *N. micropus* en Texas (Cajimat et al., 2007a); Real de Catorce virus (RCTV) en *N. leucodon* (Inizan et al., 2010); Skinner Tank virus (SKTV) en *N. mexicana* (Cajimat et al., 2008); recientemente, se ha determinado que *N. macrotis* es el reservorio principal para *Bear Canyon mammarenavirus* (BCNV) (Cajimat et al., 2007b). También se han encontrado anticuerpos contra el complejo Tacaribe en *N. mexicana* y *N. stephensi* en Arizona (Abbott et al., 2004), *N. fuscipes* y *N. lepida* en California (Bennet et al., 2000) y *N. cinerea* en Utah (Fulhorst et al., 2001b).

2.10.2. *Peromyscus* spp.

Se han realizado varios estudios de arenavirus y la relación de estos con los roedores del Género *Peromyscus*. Por ejemplo, existe evidencia serológica y molecular que propone a *P. californicus* como uno de los reservorios principales de BCNV (Bennett et al., 2000; Fulhorst et al., 2002a) en California, mientras que en México, específicamente en el estado de Chiapas, se detectó arenavirus (Ocozocoautla de Espinoza virus) en muestras de órganos pertenecientes a un ratón venado mexicano (*P. mexicanus*) (Cajimat et al., 2012).

Además, en distintos estados de México y EUA, se han encontrado anticuerpos (IgG) contra WWAV y *Amapari mammarenavirus* (AMAV) en *P. leucopus*, *P.*

maniculatus, *P. megalops*, *P. melanophrys*, *P. melanotis* (Milazzo et al., 2010) y *P. gossypinus* en Oklahoma (Nisbett et al., 2001).

2.11. REGIÓN JANOS-CASAS GRANDES

La región Janos-Casas Grandes, Chihuahua, es una zona del país cercana a zonas del suroeste de Estados Unidos donde existen reportes de casos humanos de enfermedades zoonóticas transmitidas por roedores, como el síndrome pulmonar por hantavirus, la peste, la bartonelosis, y la fiebre hemorrágica por arenavirus (CDC, 2000; Kosoy et al., 2003; Abbott y Rocke, 2012; Knust y Rollin, 2013).

Los tipos de vegetación principales son los pastizales y los matorrales áridos, pero también existen manchones de vegetación riparia y pequeños humedales. El pastizal natural comprende cerca del 65% de la superficie regional, seguida del mezquite con 25%, vegetación riparia 5% y ecotono pastizal-bosque de encino con 5% (Ceballos et al., 2005). Este mosaico de hábitats hace que existan composiciones contrastantes de roedores silvestres (Ceballos et al., 2010) y por ende, estos hábitats pueden presentar distintas especies de hospederos o distintas abundancias de éstos.

Esta región es de un interés ecológico particular, ya que ahí se encuentra la Reserva de la Biósfera Janos, que cuenta con la presencia de perritos de las praderas de cola negra (PPCN, *Cynomys ludovicianus*), cuyas colonias representan el complejo más grande de Norteamérica. Las colonias de esta especie clave permite a su vez, la presencia de especies en riesgo como el águila

real (*Aquila chrysaetos*), tecolote llanero (*Athene cunicularia*) y la zorra gris del desierto (*Urocyon cinereoargenteus*) (CONANP, 2013).

Las especies claves son aquéllas que desempeñan un papel único en un ecosistema, produciendo efectos directos e indirectos sobre la abundancia y distribución de otras especies (Kotliar, 2000). Los PPCN se han descrito como una especie clave en base a que tienen un efecto pronunciado sobre la diversidad biológica en los sistemas de la pradera (Power et al., 1996; Wuerthner, 1997; Kotliar, 2000). Esta especie puede influir en la heterogeneidad ambiental, la sucesión vegetal, la hidrología, el ciclo de nutrientes, la biodiversidad y la arquitectura del paisaje (Ceballos et al., 1999). Por ejemplo, se ha demostrado que los PPCN evitan el establecimiento de comunidades de matorral de mezquite (*Prosopis* sp.), evitando así la desaparición de las praderas y el avance del matorral (Weltzin et al., 1997).

Así pues, los PPCN, al ser especies que pueden modificar la estructura de vertebrados en sus colonias, pueden ser utilizados como un modelo para estudiar la dinámica de enfermedades en fauna silvestre (Rubio et al., en prensa). En un estudio previo en la zona, Moreno-Torres (2009), encontró que la seroprevalencia de arenavirus en roedores fue menor en los hábitats de PPCN, por lo que sugiere que las colonias de PPCN podrían disminuir un potencial riesgo de exposición de arenavirus al humano.

3. JUSTIFICACIÓN

Los arenavirus representan a uno de los grupos virales de mayor interés causantes de enfermedad zoonótica transmitida por roedores, ya que hasta la fecha, se tiene evidencia de ocho arenavirus patógenos del total de las especies registradas, algunos de los cuales pueden llegar a ser letales. En México existe una amplia distribución de roedores potencialmente reservorios y se ha determinado que éstos responden a cambios en sus abundancias debido a efectos naturales y antropogénicos.

Los estudios de este virus realizados en México son escasos, teniendo evidencia serológica en roedores de varios estados del país (Milazzo et al., 2010) y registros de roedores infectados por dos arenavirus, propuestos como Ocozocoautla de Espinoza virus y Real de Catorce virus, en Chiapas y San Luis Potosí, respectivamente (Inizan et al., 2010; Cajimat et al., 2012).

En el sitio de estudio, en el noroeste de Chihuahua, se han reportado roedores silvestres positivos a anticuerpos contra arenavirus (Milazzo et al., 2010). Además, esta zona presenta una cercanía geográfica y similitud de condiciones ecológicas con zonas del suroeste de Estados Unidos, donde existen roedores reservorios de arenavirus y casos de fiebre hemorrágica por arenavirus en humanos (CDC, 2000; Calisher et al., 2001; Cajimat et al., 2008). Esto resalta la importancia de realizar estudios sobre arenavirus en dicha zona del país.

Para un mejor conocimiento de la ecología de los arenavirus en el noroeste mexicano, es necesario identificar primero las especies de virus que infectan a los hospederos silvestres del área. Esta información base podrá servir de ayuda a ulteriores estudios sobre arenavirus, sus reservorios y su impacto en la salud pública. Además, conocer ciertos hábitats que presenten mayores abundancias de reservorios o potenciales reservorios de arenavirus también puede ser de información útil para posteriores estudios o planes de manejos en la zona, donde se incluyan análisis de riesgos epidemiológicos.

4. HIPÓTESIS

1. Debido a que existe evidencia serológica de anticuerpos contra arenavirus en roedores del noroeste mexicano, una o varias especies del Género *Mammarenavirus*, filogenéticamente cercanas con arenavirus reportados en Estados Unidos, se encuentran infectando a roedores silvestres del municipio Janos, Chihuahua, México.
2. Debido a que los perritos de las praderas de cola negra pueden influir en el ensamblaje de comunidades de roedores, esto puede tener un efecto sobre las abundancias de reservorios potenciales de arenavirus. Se espera que en los hábitats con colonias de perritos de las praderas las abundancias de reservorios sean menores en comparación con otros hábitats.

5. OBJETIVOS GENERALES

1. Estandarizar la técnica de diagnóstico molecular para arenavirus.

2. Determinar la presencia de arenavirus en roedores silvestres de Janos, Chihuahua.
3. Comparar las abundancias de roedores reservorios potenciales de arenavirus en distintos hábitats de Janos, Chihuahua.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estandarizar en laboratorio la técnica de diagnóstico molecular para arenavirus, a partir de la RT-PCR en su variante anidada.
2. Determinar la presencia de arenavirus en distintos tejidos de roedores silvestres de la Familia *Cricetidae* del noroeste mexicano, mediante RT-PCR.
3. Estimar la prevalencia de infección por arenavirus en los roedores muestreados.
4. En caso de determinar la presencia de arenavirus, se identificará la o las especies encontradas mediante secuenciación genética y análisis filogenético.
5. Comparar abundancias de roedores reservorios potenciales de arenavirus en los tres hábitats dominantes de la región Janos-Casas Grandes.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. ÁREA DE ESTUDIO Y DISEÑO DE MUESTREO

El área de estudio corresponde a la región Janos-Casas Grandes, en el municipio Janos, al noroeste del estado de Chihuahua, aproximadamente a 75 km al sur de

la frontera con Estados Unidos ($30^{\circ} 50' N$, $108^{\circ} 25' W$, a una altitud de 1,380 msnm). Colinda al norte con Nuevo México, EUA., al este con Ascensión, Chihuahua, al sur con Galeana, Chihuahua y al oeste con Sonora (Ceballos et al., 2010). En el área de estudio se designaron 4 sitios de muestreo (subregiones), los cuales contaron con una distancia mínima de 16 km entre ellos, con el fin de cubrir una zona amplia de muestreo.

Para la colecta de pequeños mamíferos, se utilizaron trampas tipo Sherman (H.B. Sherman Traps, Inc., Tallahassee, FL). En cada subregión de estudio se dispusieron al azar 6 cuadrantes distanciados linealmente al menos por 600 m, totalizando 24 cuadrantes. Estos se instalaron en 3 hábitats dominantes de la zona: pastizal con presencia de PPCN, pastizal sin PPCN y matorral de mezquite. En cada cuadrante se instalaron 49 trampas Sherman espaciadas a intervalos de 10 m en una cuadrícula de 7 X 7, abarcando un área de 0.49 ha por cuadrante. Las trampas estuvieron activadas 3 noches seguidas.

7.2. CAPTURA DE ROEDORES

Los individuos capturados se identificaron por especie y se obtuvieron datos de sexo, medidas morfométricas (largo del cuerpo, largo de la cola, largo total, largo de la oreja derecha), estado reproductivo (escrotado, inactivo, gestante, en lactación) y edad (adulto, juvenil). Se realizaron 2 muestreos, el primero en marzo del 2013 y el segundo en octubre del 2013.

Para obtener un mayor número de muestras de las especies de interés (reservorios potenciales), además se realizó un muestreo específico, el cual consistió en la instalación de trampas Sherman en 10 sitios al azar cercanos a madrigueras de *N. albigula*, especie descrita como reservorio de arenavirus (Cajimat et al., 2008). Este muestreo se realizó en octubre del 2013.

7.3. OBTENCIÓN Y MANEJO DE MUESTRAS

Debido a las características zoonóticas del arenavirus, el procedimiento de toma de muestras se llevó a cabo bajo estrictas reglas de bioseguridad basadas en la Guía de Seguridad – Uso de Equipamiento de Protección Personal Bioseguridad de USAID-PREDICT (2011).

Las especies capturadas de la Familia *Cricetidae* fueron sometidas a eutanasia mediante sobredosis con Isoflurano según las recomendaciones de la Guía para la Eutanasia de Animales edición 2013 del American Veterinary Medical Association y el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (CICUAE, FMVZ). Se tomaron muestras de distintos órganos (corazón, pulmón, hígado, bazo y riñón), las cuales fueron almacenadas en criotubos con RNALater[®] y conservadas en nitrógeno líquido (figura 4). Posteriormente, en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia Universidad Nacional Autónoma de México (FMVZ, UNAM) las muestras fueron transferidas a un ultracongelador (-70° C).

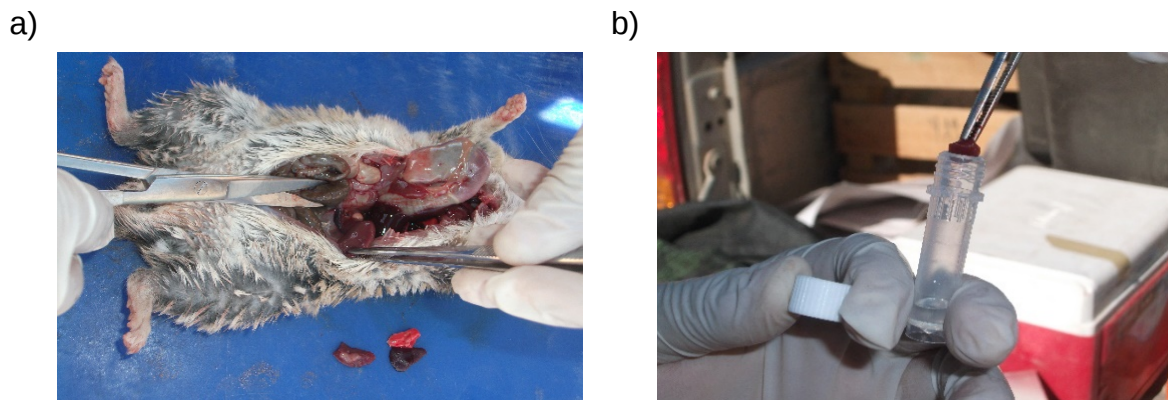


Figura 4. Toma y conservación de muestras. (a) Disección de la cavidad abdominal de una *N. albigula* para toma de muestra de órganos y (b) conservación de las muestras en criotubos con 50 µL de RNALater®.

7.4. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE LABORATORIO

El trabajo de laboratorio se llevó a cabo en el Laboratorio de Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología (FMVZ, UNAM).

7.4.1. Extracción del material genético

La extracción de ácidos nucleicos se realizó a partir de la técnica por columnas utilizando el producto comercial RNeasy Mini Kit de QIAGEN®, compuesta por los siguientes pasos:

- Se obtuvieron muestras no mayores a 30 grs
- Se maceraron las muestras utilizando 300 µL de Búfer RLT y 300 µL de PBS al 10%
- Se centrifugaron las muestras a 12,000 rpm durante 3 min a 4° C
- Se obtuvo el sobrenadante, mismo que se utilizó a partir de los siguientes pasos:

- Se agregó un volumen de etanol al 70% a cada muestra, mezclando mediante pipeteo
- Se obtuvieron 700 μ L de la mezcla anterior, colocándolos en las columnas de extracción
- Se centrifugó la muestra (columnas de extracción) a 10,000 rpm durante 15 s a 4° C
- Se descartó el fluido que atravesó la membrana de la columna; se reutilizó el tubo colector
- Se agregaron 700 μ L de búfer RW1 a la columna de extracción
- Se centrifugó la muestra a 10,000 rpm durante 15 s a 4° C
- Se descartó el fluido que atravesó la membrana de la columna; se reutilizó el tubo colector
- Se agregaron 500 μ L de búfer RPE a la columna de extracción
- Se centrifugó muestra a 10,000 rpm durante 15 s a 4° C
- Se descartó el fluido que atravesó la membrana de la columna; se reutilizó el tubo colector
- Se agregaron 500 μ L de búfer RPE a la columna de extracción
- Se centrifugó la muestra a 10,000 rpm durante 2 min a 4° C
- Se descartó el fluido que atravesó la membrana de la columna junto con los tubos colectores, mismos que se reemplazaron por tubos para microcentrífuga de 1.5 ml
- Se agregaron 40 μ L de agua libre de ribonucleasas a la columna de extracción

- Se centrifugó la muestra a 10,000 rpm durante 1 min a 4° C
- Se desecharon las columnas de extracción y se conservó el fluido obtenido (ARN), almacenándolo a -20° C

7.4.2. Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa

La identificación de arenavirus en las muestras se realizó mediante la RT-PCR, con la variante de PCR anidada según Lozano y colaboradores (1997) en un solo paso a partir del producto comercial QIAGEN® OneStep RT-PCR, siguiendo las instrucciones del fabricante.

El fragmento que se amplificó corresponde al segmento S, el cual ha sido determinado como el segmento más conservado de la secuencia de ARN entre los miembros de la familia *Arenaviridae* (Auperin et al., 1982). La secuencia de los iniciadores se muestra en el cuadro 2, los cuales, debido a la circulación frecuente de dos o más arenavirus en la misma región geográfica, se recomienda amplifique a todos los arenavirus reconocidos por combinación de iniciadores degenerados ubicados en las regiones conservadas del genoma (Lozano et al., 1997; Charrel y Lamballerie, 2010).

Cuadro 2. Iniciadores de primer y segundo ciclo de la PCR.

PCR anidada	Iniciadores	Secuencia	Tamaño del Producto
Primera ciclo PCR	forward 1 - ARS6V	GGCATWGANCCAACTGATT	640 pb
	reverse 1 - ARS1	CGCACCGGGGATCCTAGGC	
Segunda ciclo PCR	forward 2 - ARS3V	CATGACKMTGAATTYTGTGACA	460 pb
	reverse 2 - ARS7C-Mod	ATRTGYCKRTGWGTTGG	

Se utilizó el Universal Control 1 de PREDICT-USAID (Laboratory Protocols for PREDICT Surveillance, 2011) como control positivo para la PCR. La descripción de los ciclos (temperatura, duración) de la RT-PCR se muestra en el cuadro 3.

Cuadro 3. Protocolo para la RT-PCR, con las temperaturas y tiempos correspondientes.

Ciclo	Temperatura	Tiempo	Número de Ciclos
Retrotranscripción	95° C	5 min	1 ciclo
Desnaturalización	92° C	2 min	1 ciclo
Disociación	92° C	20 s	40 ciclos
Asociación	55° C	30 s	
Extensión	72 ° C	1 min	
Extensión final	72 ° C	5 min	1 ciclo

7.4.3. Electroforesis

Se utilizaron geles de agarosa al 2% para verificar al amplicón obtenido en ambos ciclos de la PCR. Se agregaron 5 µL del resultado de la PCR a cada pozo del gel junto con 2 µL de búfer de carga y 1.5 µL de RedGel™ Nucleic Acid Gel Stain (BIOTUM, 3159 Corporate Place, Hayward, CA 95545) para teñir el gel. Así mismo, los controles positivo y negativo y el marcador de peso molecular eran agregados en pozos independientes tratando de alejarlos lo mayor posible de las muestras para evitar contaminación.

7.5. ANÁLISIS DE ABUNDANCIA SOBRE POTENCIALES RESERVORIOS

Los potenciales reservorios fueron las especies capturadas de los Géneros *Neotoma* y *Peromyscus*, debido a que son Géneros descritos como reservorios en Norte América. Además se incluyó el Género *Onychomys*, ya que aunque no hay estudios que determinen su capacidad como reservorio de arenavirus, un estudio encontró anticuerpos contra arenavirus en la misma zona donde se llevó a cabo este estudio (Milazzo et al., 2010).

Para estimar la abundancia de los reservorios potenciales, se utilizó el mínimo número de individuos vivos (Greenwood y Robinson, 2006; Carver et al., 2011) en cada cuadrante. Para la comparación de la abundancias entre los 3 distintos hábitats, se utilizó el análisis no paramétrico de Kruskal Wallis, mediante el programa STATISTICA - StatSoft®.

8. RESULTADOS

8.1. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE RT-PCR Y ANÁLISIS MOLECULAR

Se logró estandarizar la prueba de diagnóstico molecular para arenavirus a partir de la técnica de RT-PCR anidada en México. La figura 6 muestra la fotografía de un gel de agarosa corrido durante la prueba, donde se observan el control positivo y negativo, demostrando que el protocolo fue correctamente establecido. Ochenta y cinco individuos fueron sacrificados para la obtención de muestras de órganos para el diagnóstico molecular (cuadro 4). No se logró evidenciar la presencia de arenavirus en estas muestras (figura 6).

Cuadro 4. Especies de roedores a las cuales se les aplicó eutanasia y de las cuales se tomaron muestras de órganos para el análisis molecular.

Especies de roedores	Número de individuos muestreados
<i>Onychomys arenicola</i>	36
<i>Onychomys leucogaster</i>	8
<i>Neotoma albigula</i>	5
<i>Peromyscus leucopus</i>	14
<i>Peromyscus maniculatus</i>	21
Total	85

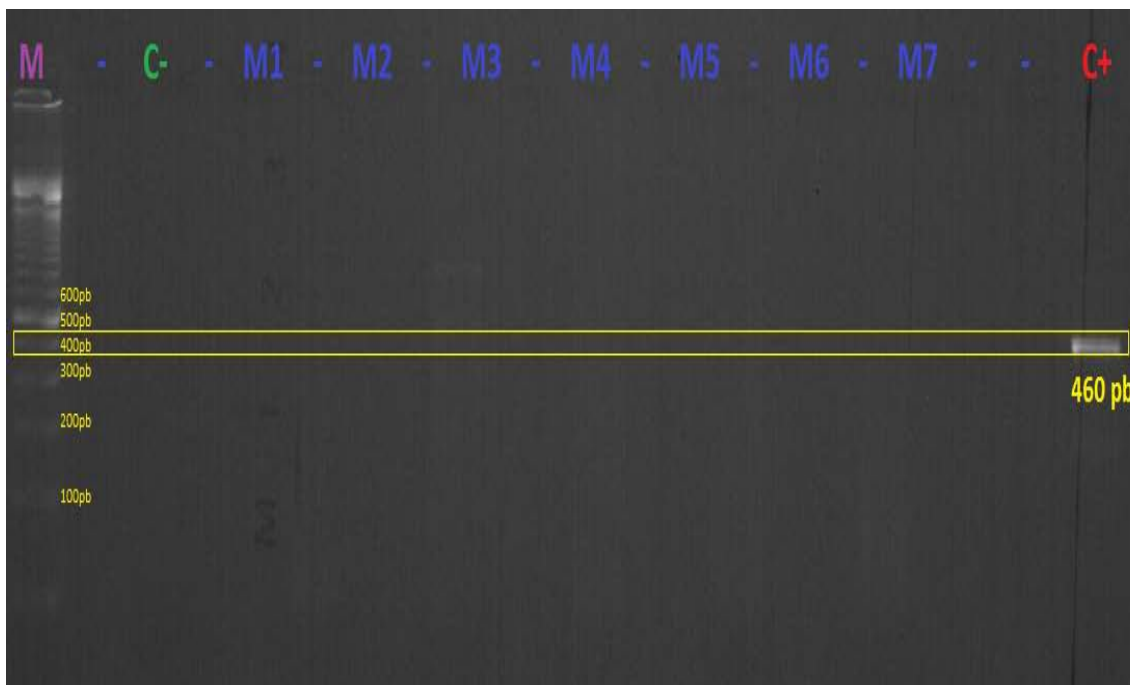


Figura 6. Fotografía de un gel de agarosa al 2%. En la figura se muestra el resultado de la electroforesis en gel de las primeras 7 muestras analizadas en el segundo ciclo de la PCR. *M* indica el marcador de peso molecular, donde cada banda equivale a 100 pb. *C-* es el control negativo. *M1*, *M2*, *M3*, *M4*, *M5*, *M6* y *M7* son las muestras analizadas, todas ellas negativas. *C+* es el control positivo, con 460 pb.

8.2. CAPTURA DE ROEDORES

En total se capturaron 504 roedores, pertenecientes a 10 especies, 6 Géneros y 2 Familias (*Cricetidae*, *Heteromyidae*) (Figura 5). De estos, 111 fueron individuos de especies reservorios potenciales (cuadro 5).

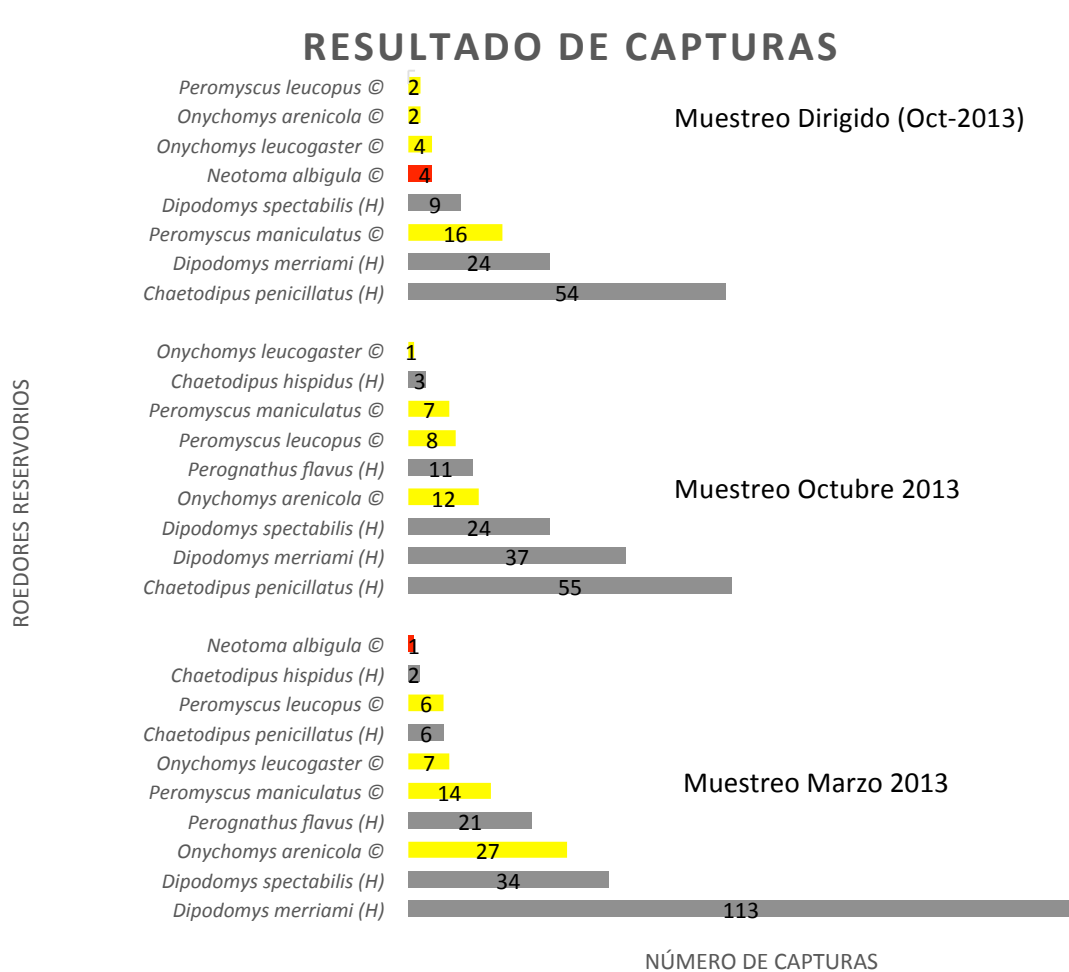


Figura 5. Captura de roedores. En la gráfica se observan los tres periodos de captura, las barras grises corresponden a los roedores heterómidos no reservorios, las barras amarillas a los reservorios potenciales y las barras rojas a los reservorios principales para arenavirus. © Familia *Cricetidae*, (H) Familia *Heteromyidae*

8.3. RESERVORIOS

Hubo diferencias significativas entre las abundancias de reservorios potenciales en los distintos tipos de hábitats ($H=10.26$; $p=0.006$). Las abundancias fueron mayores en mezquite en comparación a los pastizales sin perritos de la pradera ($p= 0.008$), mientras que no hubo diferencias significativas entre mezquite y

pastizal con perritos de la pradera ($p= 0.22$) y entre ambos pastizales ($p= 1.0$) (cuadro 5).

Cuadro 5. Número de roedores capturados por tipo de hábitat. Entre paréntesis se muestra el número de individuos por cada 100 noches trampa. (1) Reservorios potenciales de arnavirus en este estudio, (2) Reservorio de arnavirus reportado previamente, (Mar) cuadrantes muestreados en el mes de marzo de 2013, (Oct) cuadrantes muestreados en el mes de octubre de 2013

Especies	Matorral de Mezquite	Pastizal con PPCN	Pastizal sin PPCN	Total
<i>Chaetodipus hispidus</i>	1 (0.03)	0 (0.00)	4 (0.19)	5 (0.07)
<i>Chaetodipus penicillatus</i>	54 (2.04)	6 (0.29)	0 (0.00)	60 (0.89)
<i>Dipodomys merriami</i>	126 (4.76)	20 (0.97)	2 (0.10)	148 (2.19)
<i>Dipodomys spectabilis</i>	15 (0.57)	22 (1.07)	16 (0.78)	53 (0.78)
<i>Onychomys arenicola</i> (1)	14 (0.53)	19 (0.92)	3 (0.15)	36 (0.53)
<i>Onychomys leucogaster</i> (1)	8 (0.30)	0 (0.00)	0 (0.00)	8 (0.19)
<i>Neotoma albigula</i> (2)	1 (0.04)	0 (0.00)	0 (0.00)	1 (0.01)
<i>Perognathus flavus</i>	5 (0.19)	9 (0.44)	14 (0.68)	28 (0.41)
<i>Peromyscus leucopus</i> (2)	11 (0.42)	0 (0.00)	3 (0.15)	14 (.21)
<i>Peromyscus maniculatus</i> (2)	20 (0.76)	0 (0.00)	1 (0.05)	21 (0.31)
Total	255 (9.54)	76 (3.69)	43 (2.1)	374 (5.53)
Número de cuadrantes muestreados	9 (Mar), 9 (Oct)	6 (Mar), 8 (Oct)	8 (Mar), 6 (Oct)	

9. DISCUSIÓN

En este estudio, se logró estandarizar la técnica de diagnóstico molecular de arnavirus, la cual no se tenía establecida en México y con ello se logró cumplir con el objetivo principal del trabajo. En el análisis molecular de los órganos de roedores obtenidos, no se obtuvieron muestras positivas y dado este resultado, la primera hipótesis no pudo ser comprobada y algunos objetivos específicos no pudieron ser realizados.

En este estudio no utilizamos un control interno para la extracción del material genético, por lo que se recomienda utilizarlo en futuros estudios, con el fin de evitar el sesgo que puede provocar una deficiente extracción de ácidos nucleicos.

Previamente existía evidencia de anticuerpos contra arenavirus en roedores de la misma zona de estudio, con una seroprevalencia de 8.7 % (Moreno-Torres, 2009). Diversos estudios han encontrado que para arenavirus puede existir una mayor prevalencia de anticuerpos comparado con la prevalencia de arenavirus mediante análisis moleculares. Por ejemplo, Laakkonen y colaboradores (2006), encontraron que de los 330 roedores muestreados en Turquía, 8 de estos (2.42 %) fueron seropositivos, mientras que ninguno fue positivo en PCR.

Los resultados negativos en el análisis molecular de este estudio pueden deberse por un lado, a que la viremia de arenavirus en los reservorios se detecta fácilmente durante la fase aguda de la enfermedad y desaparece durante la convalecencia (Grant et al., 2012), en parte porque la transmisión horizontal puede causar solamente una viremia breve, mientras que la transmisión vertical puede causar una infección crónica (Skinner y Knight, 1974; Childs and Peters, 1993).

Además, los reservorios potenciales para arenavirus en la zona, entre los que destaca *N. albigula*, presentaron bajas abundancias, lo que podría influir en una baja prevalencia de arenavirus en la zona de estudio, por lo que sería necesario un mayor número de animales analizados para su detección.

Los hantavirus y arenavirus son patógenos que pueden presentar variaciones temporales de prevalencias en los reservorios (Enria y Pinheiro, 2000; Disney y Ruedas, 2009) y esto se debe, por ejemplo, a variaciones en las abundancias de reservorios debido a factores naturales (e.g. lluvias, sequías) y antropogénicos (e.g. aumento en las prácticas de agricultura) (Meerburg et al., 2009; Charrel y De Lamballerie, 2010). Generalmente las abundancias de roedores reservorios aumentan en épocas lluviosas (Dearing y Disney, 2010). Nuestro muestreo fue realizado en marzo de 2013, un año después de que se registrara el periodo de mayor sequía en Chihuahua, estado que comprende a la zona de estudio (SAGARPA-CONAZA, 2012). Por otro lado, se ha postulado la posibilidad de que en zonas con presencia de arenavirus, la disminución de las poblaciones de roedores reservorios puede estar dada por la baja en la fecundidad provocada por una infección crónica en generaciones anteriores de roedores (Jay et al., 2005).

En el área de estudio se detectó que existen diferencias entre los distintos hábitats en las abundancias de roedores potencialmente reservorios, pero no se encontró una menor abundancia de reservorios en los pastizales con perritos de la pradera, como era nuestra predicción. Esto se debió a que *O. arenicola* fue una de las especies más abundantes en el pastizal con perritos de la pradera. Por lo tanto, los perritos de las praderas no tendrían un efecto importante sobre las abundancias de los potenciales reservorios de arenavirus. Sin embargo, ya que los perritos de la pradera evitan el establecimiento de comunidades de matorral de mezquite, este podría ser un efecto indirecto sobre las abundancias de reservorios

ya que de acuerdo nuestros resultados, el mezquite es el hábitat principal de *N. albigula* y *Peromyscus* spp.

Este es el primer estudio en México donde se realizó un análisis molecular para buscar la presencia de arenavirus en roedores. En los estudios previos donde se ha detectado arenavirus en roedores mexicanos y mediante técnicas moleculares, las muestras han sido analizadas en el extranjero. El hecho de que en este trabajo se pudo montar la técnica de PCR para arenavirus puede facilitar los estudios sobre arenavirus en México. Es necesario continuar investigando sobre arenavirus y sus reservorios, ya que en México existe una amplia distribución de los mismos, aunado a las conductas relacionadas con usos y costumbres que aumentan el contacto de personas con roedores en el país.

10. REFERENCIAS

- Abbott, K.D.; Milazzo, M.L.; Keith, J.; Bradley, R.D. y Fulhorst, C.F. (2004). Epizootiology of arenaviral infections in the white-throated woodrat (*Muridae: Sigmodontinae*) and other woodrats in Arizona. *Journal of Vector Ecology*, 29:355-364.
- Archer, A.M. y Rico-Hesse, R. (2002). High Genetic Divergence and Recombination in Arenaviruses from the Americas. *Virology*, 304:274-281.
- Auperin, D.D., Compans, R.W. and Bishop, D.H.L. (1982). Nucleotide sequence conservation at the 3' termini of the virion RNA species of New World and Old World arenaviruses. *Virology*, 121:200–203.
- Barton, L.L. y Hyndman, N.J. (2000). Lymphocytic choriomeningitis virus: reemerging central nervous system pathogen. *Pediatrics*, 105:1-2.
- Bennett, S.G.; Milazzo, M.L.; Webb, J.P. y Fulhorst, C.F. (2000). Arenavirus antibody in rodents indigenous to coastal southern California. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 52:626-630.
- Bergthaler, A.; Gerber, N.U.; Merkler, D.; Horvath, E.; De la Torre, J.C. y Pinschewer, D.D. (2006). Envelope exchange for the generation of live-attenuated arenavirus vaccines. *PLoS Pathogen*, 2:501-512.
- Beyer, W.R.; Popplau, D.; Garten, W.; Von Laer, D. y Lenz, O. (2003). Endoproteolytic Processing of the Lymphocytic Choriomeningitis Virus Glycoprotein by the Subtilase SKI-1 / S1P. *Journal of Virology*, 77:2866-2872.
- Bodewes, R.; Raj, V.S.; Kik, M.J.L.; Schapendonk, C.M.; Haagmans, B.L.; Smits, S.L. y Osterhaus, A.D.M.E. (2014). Updated Phylogenetic Analysis of Arenaviruses Detected in Boid Snakes. *Journal of Virology*, 88:1399-1400.
- Bowen, M. D., C. J. Peters, and S. T. Nichol. 1996. The phylogeny of New World (Tacaribe complex) arenaviruses. *Virology*, 219:285–290.
- Bowen, M. D.; Peters, C. J. y Nichol, S. T. (1997). Phylogenetic Analysis of the *Arenaviridae*: Patterns of Virus Evolution and Evidence for Cospeciation between Arenaviruses and Their Rodent Hosts. *Molecular Phylogenetics And Evolution*, 8:301–316.
- Briese, T.; Paweska, J.T.; McMullan, L.K.; Hutchison, S.K.; Street, C.; Palacios, G.; Khristova, M.L.; Weyer, J.; Swanepoel, R.; Egholm, M.; Nichol, S.T. y Lipkin, W.I. (2009). Genetic detection and characterization of Lujo virus, a new

haemorrhagic fever-associated arenavirus from southern Africa. *PLoS Pathogens*, 5:1-8.

Buchmeier, M.J.; De la Torre, J.C.; Peters, C.J. (2007). *Arenaviridae*: the viruses and their replication. En Knipe, D.L., Howley, P.M. (Editores), 4a ed. *Fields Virology*. Lippincott- Raven, Philadelphia, pp. 1791–1828.

Buchmeier, M.J.; Lewicki, H.A.; Tomori, O. y Oldstone, M.B. (1981). Monoclonal antibodies to lymphocytic choriomeningitis and pichinde viruses: Generation, characterization, and cross-reactivity with other arenaviruses. *Virology*, 113:73–85.

Cajimat, M.; Louise, M.; Borchert, J.; Abbott, K.; Bradley, R. y Fulhorst, C. (2008). Diversity among Tacaribe serocomplex viruses (Family *Arenaviridae*) naturally associated with the Mexican woodrat (*Neotoma mexicana*). *Virus Research*, 133:211–217.

Cajimat, M.; Louise, M.; Hess, B.; Rood, M. y Fulhorst, C. (2007a). Catarina Virus, an Arenaviral Species Principally Associated with *Neotoma micropus* (Southern Plains Woodrat) in Texas. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77:732–736.

Cajimat, M.; Milazzo, M.; Bradley, R. y Fulhorst, C. (2012). Ocozocoautla de Espinosa Virus and Hemorrhagic Fever, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 18:401–405.

Cajimat, M.; Milazzo, M.L.; Hess, B.D.; Rood, M.P. y Fulhorst, C.F. (2007b). Principal host relationships and evolutionary history of the North American arenaviruses. *Virus Research*. 367:235-243.

Cajimat, M.N.B.; Milazzo, M.L.; Haynie, M.; Hanson, J.D.; Bradley, R.D. y Fulhorst, C.F. (2011). Diversity and phylogenetic relationships among the North American Tacaribe serocomplex viruses (Family *Arenaviridae*). *Virology*, 421:87-95.

Calisher, C.; Nabity, S.; Root, J.; Fulhorst, C. y Beaty, B. (2001). Transmission of an Arenavirus in White-Throated Woodrats (*Neotoma albigula*), Southeastern Colorado, 1995–1999. *Emerging Infectious Diseases*, 7:1995–1999.

Carver, S.; Kuenzi, A.; Bagamian, K.H.; Mills, J.N.; Rollin, P.E.; Zanto, S.N. y Douglass, R. (2011). A temporal dilution effect: hantavirus infection in deer mice and the intermittent presence of voles in Montana. *Oecologia*, 166:713-721.

Ceballos, G.; Davidson, A.; List, R.; Pacheco, J.; Manzano-Fischer, P.; Santos-Barrera, G. y Cruzado, J. (2010). Rapid Decline of a Grassland System and Its Ecological and Conservation Implications. *PlosOne*, 5:1–12.

Ceballos, G.; Pacheco, J. y List R. (1999). Influence of prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*) on habitat heterogeneity and mammalian diversity in Mexico. *Journal of Arid Environments*, 41:161-172.

Ceballos, G.; Pacheco, J.; List., R; Manzano, P.; Santos, G. y Royo, M. (2005). Prairie dogs, cattle, and crops: diversity and conservation of the Grassland-Shrubland habitat mosaic in Northwestern Chihuahua, Mexico. En Cartron, J.L., Ceballos, G. y Felger, R. S. (Editores), Biodiversity, Ecosystems, and Conservation in Northern Mexico, *Oxford University Press*, pp. 425-438.

Centers for Disease Control and Prevention (2000). Fatal illnesses associated with a New World arenavirus—California, 1999–2000. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 49:709–711.

Charbonnel, N.; Deter, J.; Chaval, Y.; Laakkonen, J.; Henttonen, H.; Voutilainen, L.; Vapalahti, O.; Vaheri, A.; Morand, S. y Cosson, J.F. (2008). Serological evidence of viruses naturally associated with the montane water vole (*Arvicola scherman*) in eastern France. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 8:763-767.

Charrel, R.N. y De Lamballerie, X. (2003). Arenaviruses other than Lassa virus. *Antiviral Research*, 57:89-100.

Charrel, R.N. y De Lamballerie, X. (2008). Phylogeny of the genus *Arenavirus*. *Current Opinion in Microbiology*, 11:362–368.

Charrel, R.N. y De Lamballerie, X. (2010). Zoonotic aspects of arenavirus infections. *Veterinary Microbiology*, 140:213–220.

Charrel, R.N.; Coutard, B.; Baronti, C.; Canard, B.; Nougairede, A.; Frangeul, A.; Morin, B.; Jamal, S.; Schmidt, C.L.; Hilgenfeld, R.; Klempa, B. y De Lamballerie, X. (2011). Arenaviruses and hantaviruses: From epidemiology and genomics to antivirals. *Antiviral Research*, 90:102-114.

Charrel, R.N.; De Lamballerie, X. y Fulhorst, C.F. (2001). The Whitewater Arroyo Virus: Natural Evidence for Genetic Recombination among Tacaribe Serocomplex Viruses (Family *Arenaviridae*). *Virology*, 283:161-166.

Childs, J.E. y Peters, C.J. (1993). Ecology and epidemiology of arenaviruses and their hosts. En Salvato, M.S. (Editor), *The Arenaviridae*. New York, Plenum Press, pp. 331–384.

Clegg, J.C. (2002). Molecular phylogeny of the arenaviruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 262:1–24.

Cleri, D.J.; Ricketti, A.J.; Porwancher, R.B.; Ramos-Bonner, L.S. y Vernaleo, J.R. (2006). Viral Hemorrhagic Fevers: Current Status of Endemic Disease and Strategies for Control. *Infectious Disease Clinics of North America*, 20:359-393.

Cogswell-Hawkinson, A.; Bowen, R.; James, S.; Gardiner, D.; Calisher, C.H. y Adams, R.; Schountz, T. (2012). Tacaribe Virus Causes Fatal Infection of An Ostensible Host, the Jamaican Fruit Bat. *Journal of Virology*, 86:5791-5799.

Comisión Nacional de las Zonas Áridas. 2012. Análisis de la problemática de la sequía 2011 – 2012 y sus efectos en la ganadería y la agricultura de temporal. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación.

Consorcio PREDICT Una Salud 2010. Guía de Seguriad: Uso del Equipo de Protección Personal y Bioseguriad. <http://www.vetmed.ucdavis.edu/ohi/predict/publications.cfm>.

Cornu, T.I. y De la Torre, J.C. (2001) RING Finger Z Protein of Lymphocytic Choriomeningitis Virus (LCMV) Inhibits Transcription and RNA Replication of an LCMV. *Journal of Virology*, 75:9415-9426.

Coulibaly-N'Golo, D.; Allali, B.; Kouassi, S.K.; Fichet-Calvet, E.; Becker-Ziaja, B.; Rieger, T.; Ölschläger, S.; Dosso, H.; Denys, C.; Meulen, J.T.; Akoua-Koffi, C. y Günther, S. (2011). Novel arenavirus sequences in *Hylomyscus* sp. and *Mus (Nannomys) setulosus* from Côte d'Ivoire: Implications for evolution of arenaviruses in Africa. *PLoS One*. 6:1-9.

Daszak, P.; Cunningham, A. y Hyatt, A. (2000). Emerging Infectious Diseases of Wildlife - Threats to Biodiversity and Human Health. *Science*, 287:443-449.

Delgado, S.; Erickson, B.R.; Agudo, R.; Blair, P.J.; Vallejo, E.; Albariño, C.G.; Vargas, J.; Comer, J.; Rollin, P.E.; Ksiazek, T.G.; Olson, J.G. y Nichol, S.T. (2008). Chapare virus, a newly discovered arenavirus isolated from a fatal hemorrhagic fever case in Bolivia. *PLoS Pathogens*, 4:1-6.

Dearing, M. D., & Disney, L. (2010). Ecology of hantavirus in a changing world. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1195:99-112.

Disney, L.J. y Ruedas, L. (2009). Increased Host Species Diversity And Decreased Prevalence Of Sin Nombre Virus. *Emerging Infectious Diseases*, 15:1012-1018.

Downs, D.G.; Anderson, C.R.; Spence, L.; Aitken, T.H. y Greenhall, A.H. (1963). Tacaribe virus, a new agent isolated from *Artibeus* bats and mosquitoes

in Trinidad, West Indies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 12:640-646.

Emonet, S.; De la Torre, J.; Domingo, E. y Sevilla, N. (2009). Arenavirus genetic diversity and its biological implications. *Infection, Genetics and Evolution*, 9:417–429.

Emonet, S.E.; Urata, S. y De la Torre, J.C. (2011). Arenavirus reverse genetics: New approaches for the investigation of arenavirus biology and development of antiviral strategies. *Virology*, 411:416-425.

Enria, D.A. y Pinheiro, F. (2000). Rodent-Borne Emerging Viral Zoonosis. Hemorrhagic Fevers and Hantavirus Infections in South America. *Infectious Disease Clinics of North America*, 14:167-184.

Eschli, B.; Quirin, K.; Wepf, A.; Weber, J.; Zinkernagel, R. y Hengartner, H. (2006). Identification of an N-terminal trimeric coiled-coil core within arenavirus glycoprotein 2 permits assignment to class I viral fusion proteins. *Journal of Virology*, 80:5897–5907.

Fehling, S.K.; Lennartz, F. y Strecker, T. (2012). Multifunctional nature of the arenavirus RING finger protein Z. *Viruses*, 4:2973-3011.

Fichet-Calvet, E.; Becker-Ziaja, B.; Koivogui, L. y Günther, S. (2014). Lassa Serology in Natural Populations of Rodents and Horizontal Transmission. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 14:665-674.

Fukushi, S.; Tani, H.; Yoshikawa, T.; Saijo, M. y Morikawa, S. (2012). Serological assays based on recombinant viral proteins for the diagnosis of arenavirus hemorrhagic fevers, *Viruses*, 4:2097–2114.

Fulhorst, C. F.; Milazzo, M.L.; Armstrong, L.R.; Childs, J.E.; Rollin, P.E.; Khabbaz, R.; Peters, C.J. y Ksiazek, T.G. (2007). Hantavirus and Arenavirus Antibodies in Persons with Occupational Rodent Exposure, North America. *Emerging Infectious Diseases*, 13:532-538.

Fulhorst, C. F.; Milazzo, M.L.; Carrol, D.S.; Charrel, R.N. y Bradley, R.D. (2002b). Natural host relationships and genetic diversity of Whitewater Arroyo virus in southern Texas. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 67:114-118.

Fulhorst, C.F.; Bennett, S.G.; Milazzo, M.L.; Murray, H.L.; Webb, J.P.; Cajimat, M. y Bradley, R.D. (2002). Bear Canyon Virus: An Arenavirus Naturally Associated with the California Mouse (*Peromyscus californicus*). *Emerging Infectious Diseases*, 8:717-721.

Fulhorst, C.F.; Bowen, M.; Ksiazek, T.; Rollin, P.; Nichol, S.; Kosoy, M. y Peters, C. (1996). Isolation and Characterization of Whitewater Arroyo Virus, a Novel North American Arenavirus. *Virology*, 120:114–120.

Fulhorst, C.F.; Charrel, R.N.; Weaver, S.C.; Ksiazek, T.G.; Bradley, R.D.; Milazzo, M.L.; Tesh, R.B. y Bowen, M.D. (2001b). Geographic Distribution and Genetic Diversity of Whitewater Arroyo Virus in the Southwestern United States. *Emerging Infectious Diseases*, 7:403-407.

Fulhorst, C.F.; Milazzo, M.L.; Bradley, R.D. y Peppers, L.L. (2001a). Experimental infection of *Neotoma albigula* (Muridae) with Whitewater Arroyo virus (Arenaviridae). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 65:147-151.

Gonzalez, J.D. y Duplantier, J.M. (1999). The Arenaviruses and Rodent Co-Evolution Process: A Global View of a Theory. En Saluzzo, J.F. y Dodet, B. (Editores), Factors in the Emergence and Control of Rodent-Borne Viral Diseases (Hantaviral and Arenaviral Diseases), Elsevier, Paris, pp. 39–42.

Gonzalez, J.P. (2007). Arenaviruses. En Childs, J.E, Mackenzie, J.S, Richt, J.A (Editores), Wildlife and Emerging Zoonotic Diseases: The Biology, Circumstances and Consequences of Cross-Species Transmission. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 253-288.

Grant, A.; Seregin, A.; Huang, C.; Kolokoltsova, O.; Brasier, A.; Peters, C. y Paessler, S. (2012). Junín Virus Pathogenesis and Virus Replication. *Viruses*, 4:2317-2339.

Greenwood, J. y Robinson, R. (2006). General census methods: population indices. En Sutherland, W. J. (Editor), Ecological Census Techniques. Cambridge University Press, pp. 91, 157.

Günther, S. y Lenz, O. (2004). Lassa virus. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 41:339–390.

Hetzel, U.; Sironen, T.; Laurinmäki, P.; Liljeroos, L.; Patjas, A.; Henttonen, H.; Vaheri, A.; Artelt, A.; Kipar, A.; Butcher, S.J.; Vapalahti, O. y Hepojoki, J. (2013). Isolation, identification, and characterization of novel arenaviruses, the etiological agents of boid inclusion body disease. *Journal of Virology*, 87:10918-10935.

Hugot, J.P.; Gonzalez, J.P. y Denys, C. (2001). Evolution of the Old World Arenaviridae and their rodent hosts: generalized host-transfer or association by descent?, *Infection, Genetics and Evolution*. 2:1-8.

- Inizan, C.; Cajimat, M.; Milazzo, M.; Barragán-Gómez, B.; Bradley, R. y Fulhorst, C. (2010). Genetic Evidence for a Tacaribe Serocomplex Virus, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 16:1007–1010.
- Irwin, N.R.; Bayerlová, M.; Missa, O. y Martínková, N. (2012). Complex patterns of host switching in New World arenaviruses. *Molecular Ecology*, 21:4137-4150.
- Jackson, A.P. y Charleston, M. (2004). A Cophylogenetic Perspective of RNA-Virus Evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 21:45-57.
- Jahrling, P. B.; Trotter, R. W.; Barrera-Oro, J. G.; Lupton, H. W.; Cosgriff, T. M.; Lewis, R. W.; Parrish, D. B.; Smith, S. B. y Peters, C. J. (1988). Cross-protection against Machupo virus with Candid #1 Junin virus vaccine: III, post-challenge clinical findings. En Second International Conference on the Impact of Viral Diseases on the Development of Latin American Countries and the Caribbean Region. Mar de la Plata, Argentina.
- Jay, M.T.; Glaser, C. y Charles, F.C. (2005). The arenaviruses. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 227:904-915.
- Jones, B.; Grace, D.; Kock, R.; Alonso, S.; Rushton, J. y Said, M. (2013). Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and environmental change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110:8399-8404.
- Jones, K.; Patel, N.; Levy, M.; Storeygard, A.; Balk, D.; Gittleman, J. y Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451:990–993.
- Knust, B. y Rollin, P.E. (2013). Twenty-year summary of surveillance for human hantavirus infections, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 19:1934-1937.
- Kosoy, M.; Murray, M.; Gilmore, R.D.; Bai, Y. y Gage, K. (2003). *Bartonella* strains from ground squirrels are identical to *Bartonella washoensis* isolated from a human patient. *Journal Of Clinical Microbiology*, 41:645–650.
- Kotliar, N. B. (2000). Application of the new keystone-species concept to prairie dogs: how well does it work? *Conservation Biology*, 14:1715–1721.
- Kunz, S. (2009). Receptor binding and cell entry of Old World arenaviruses reveal novel aspects of virus – host interaction. *Virology*, 387:245-249.
- Laakkonen, J; Kallio-Kokko, H.; Oktem, M.; Blasdel, K.; Plyusnina, A.; Niemimaa, J.; Karataş, A.; Plyusnin, A.; Vaheri, A. y Henttonen, H. (2006). Serological survey for viral pathogens in Turkish rodents. *Journal Of Wildlife Diseases*, 42:672-676.

Laakkonen, J.; Kallio-Kokko, H.; Oktem, M.; Blasdel, K.; Plyusnina, A.; Niemimaa, J.; Karataş, A.; Plyusnin, A.; Vaheri, A. y Henttonen, H. (2006). Serological survey for viral pathogens in Turkish rodents. *Journal of Wildlife Diseases*, 42:672-676.

Lee, K.J.; Perez, M.; Pinschewer, D.D. y De La Torre, J.C. (2002). Identification of the lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV) proteins required to rescue LCMV RNA analogs into LCMV-like particles. *Journal of Virology*, 76:6393–6397.

Li, K.; Lin, X.D.; Wang, W.; Shi, M.; Guo, W.P.; Zhang, X.H.; Xing, J.G.; He, J.R.; Wang, K.; Li, M.H.; Cao, J.H.; Jiang, M.L.; Holmes, E.C. y Zhang, Y.Z. (2015). Isolation and characterization of a novel arenavirus harbored by Rodents and Shrews in Zhejiang province, China. *Virology*, 476:37-42.

lian diversity in Mexico. *The Journal of Arid Environments*, 41:161-172.

Little, T.J.; Shuker, D.M.; Colegrave, N.; Day, T. y Graham, A.L. (2010). The coevolution of virulence: Tolerance in perspective. *PloS Pathogens*, 6:1-5.

Lobo, F.P.; Mota, B.; Pena, S.; Azevedo, V.; Macedo, A.M.; Tauch, A.; Machado, C.R. y Franco, GR. (2009). Virus-host coevolution: Common patterns of nucleotide motif usage in Flaviviridae and their hosts. *PLoS One*, 4:1-14.

Lozano, M.; Posik, D.; Albariño, C.; Schujman, G.; Ghiringhelli, P.; Calderón, G.; Sabattini, M. y Romanowski, V. (1997). Characterization of arenaviruses using a family-specific primer set for RT-PCR amplification and RFLP analysis. Its potential use for detection of uncharacterized arenaviruses. *Virus Research*, 49:79–89.

Lozano, M.E.; Enria, D.; Maiztegui, J.I.; Grau, O. y Romanowski, V. (1995). Rapid diagnosis of Argentine hemorrhagic fever by reverse transcriptase PCR-based assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 33:1327–1332.

Luis, A.D.; Hayman, T.S.; O'Shea, T.J.; Cryan, P.M.; Gilbert, A.T.; Pulliam, J.R.; Mills, J.N.; Timonin, M.E.; Willis, C.; Cunningham, A.; Fooks, A.; Rupprecht, C.; Wood, J. y Webb, C. (2013). A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: are bats special? *Proceedings of The Royal Society B*, 280:2012-2020.

Maiztegui, J.; Fernandez, N.J. y De Damilano, A.J. (1979). Efficacy of immune plasma in treatment of Argentine haemorrhagic fever and association between treatment and a late neurological syndrome. *Lancet*, 2:1216–1217.

Maiztegui, J.; McKee, K.T.; Barrera-Oro, J.G.; Harrison, L.H.; Gibbs, P.H.; Feuillade, M.R.; Enria, D.A.; Briggiler, A.M.; Levis, S.C.; Ambrosio,

A.M.; Halsey, N.A. y Peters, C.J. (1998). Protective efficacy of a live attenuated vaccine against Argentine hemorrhagic fever. AHF Study Group. *Journal of Infectious Disease*, 177:277–283.

Martinez, M.G.; Cordo, S.M. y Candurra, N. (2007). Characterization of Junin arenavirus cell entry. *The Journal of General Virology*, 88:1776-1784.

Mattar, S.; Guzmán, C.; Arrazola, J.; Soto, E.; Barrios, J.; Pini, N.; Levis, S.; Salazar-Bravo, J. y Mills, J.N. (2011). Antibody to Arenaviruses in Rodents, Caribbean Colombia. *Emerging Infectious Diseases*, 17:9-11.

Mclay, L.; Ansari, A.; Liang, Y. y Ly, H. (2013). Targeting virulence mechanisms for the prevention and therapy of arenaviral hemorrhagic fever. *Antiviral Research*, 97:81-92.

Meerburg, B. G.; Singleton, G. R. y Kijlstra, A. (2009). Rodent-borne diseases and their risks for public health. *Critical Reviews in Microbiology*, 35:221-270.

Milazzo, M.; Barragán-Gomez, A.; Hanson, J.; Estrada-Franco, J.; Arellano, E.; González-Cózatl, F.; Fernández-Salas, I.; Ramirez-Aguilar, F.; Rogers, D.; Bradley, R. y Fulhorst, C. (2010). Antibodies to Tacaribe Serocomplex Viruses (Family *Arenaviridae*, Genus *Arenavirus*) in Cricetid Rodents from New Mexico, Texas, and Mexico. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10:629-637.

Milazzo, M.L.; Amman, B.R.; Cajimat, M.; Méndez-Harclerode, F.; Suchecki, J.; Hanson, J.; Haynie, M.; Baxter, B.; Milazzo, C.; Carroll, S.; Carroll, D.S.; Ruthven, D.C.; Bradley, R.D. y Fulhorst, C.F. (2013). Ecology of Catarina virus (family *Arenaviridae*) in southern Texas, 2001-2004. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 13:50-59.

Mills, J.N. y Childs, J.E. (1998). Ecologic studies of rodent reservoirs: Their relevance for human health. *Emerging Infectious Diseases*, 4:529–537.

Moreno-Torres, K.I. The rol of keystone species in the dynamic of infectious diseases: The case of Prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*) and rodent-borne hemorrhagic fevers in Janos, Chihuahua, Mexico. Tesis de Maestría en Medicina Veterinaria y Zootecnia. México D.F.: Universidad Nacional Autónoma de México, 2009.

Nisbett, R.; Caire, W.; Stuart, M.D.; Caddell, G.M.; Crutcher, J.M. y Calisher, C.H. (2001). Serologic survey of Oklahoma rodents: Evidence for the presence of a hantavirus and an arenavirus. *Proceedings of the Oklahoma Academy of Science*, 81:53-66.

Nunberg, J.H. y York, J. (2012). The Curious Case of Arenavirus Entry, and Its Inhibition. *Viruses*, 4:83-101.

Palacios, G.; Druce, J.; Du, L.; Tran, T.; Birch, C.; Briese, T.; Conlan, S.; Quan, P.L.; Hui, J.; Marshall, J.; Simons, J.F.; Egholm, M.; Paddock, C.D.; Shieh, W.J.; Goldsmith, C.S.; Zaki, S.R.; Catton, M. y Lipkin, W.I. (2008). A new arenavirus in a cluster of fatal transplant-associated diseases. *The New England Journal of Medicine*, 358:991–998.

Power, M. E.; Tilman, D.; Estes, J. A; Menge, B. A.; Bond, W. J.; Mills, L. S.; Daily, G.; Castilla, J. C.; Lubchenco, J. y Paine, R. T. (1996). Challenges in the quest for keystones. *BioScience*, 46:609–620.

Radoshitzky, S.R.; Abraham, J.; Spiropoulou, C.F.; Kuhn, J.H.; Nguyen, D.; Li, W.; Nagel, J.; Schmidt, P.J.; Nunberg, J.H.; Andrews, N.C.; Farzan, M. y Choe, H. (2007). Transferrin receptor 1 is a cellular receptor for New World haemorrhagic fever arenaviruses. *Nature*, 446:92–96.

Rubio, A.V.; Viguera-Galván, A.L.; Schountz, T.; Moreno-Torres, K.; List, R.; Sarmiento-Silva, R.E.; Ávila-Flores, R.; Suzán, G. (En prensa). Abundance of hantavirus hosts in a landscape with black-tailed prairie dog colonies in northwestern Mexico. *Mammalian Biology*.

Safety Guide: Biosafety and Personal Protective Equipment Use. Preparado por David Bunn, U.C. Davis y USAID-PREDICT. Pp. 1-30.

Salvato, M.S.; Clegg, J.C.S.; Buchmeier, M.J.; Charrel, R.N.; Gonzalez, J.P.; Lukashevich, I.S.; Peters, C.J.; Romanowski, V. (2012) *Arenaviridae*. Virus Taxonomy. En King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B. y Lefkowitz, E.J., (Editores), Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Elsevier, San Diego, CA, E.U.A., pp. 715–723.

Salvato, M.S.; Clegg, J.C.S.; Buchmeier, M.J.; Charrel, R.N.; Gonzales, J.P.; Lukashevich, I.S.; Peters, C.J.; Rico-Hesse, R. y Romanowski, V. (2005). Family *Arenaviridae*. En Van Regenmortel, M.H.V., Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball (Editores), Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, L.A. Academic Press.

Salvato, M.S.; Schweighofer, K.J.; Burns, J. y Shimomaye, E.M. (1992). Biochemical and immunological evidence that the 11 kDa zinc-binding protein of lymphocytic choriomeningitis virus is a structural component of the virus. *Virus Research*, 22:185-198.

Sayler, K.; Barbet, A.F.; Chamberlain, C.; Clapp, W.L.; Alleman, R.; Loeb, J.C. y Lednicky, J. (2014). Isolation of Tacaribe Virus, a Caribbean Arenavirus, from Host-Seeking *Amblyomma americanum* Ticks in Florida. *PloS One*, 9:1-16.

Schlie, K.; Maisa, A.; Lennartz, F.; Ströher, U.; Garten, W. y Strecker, T. (2010). Characterization of Lassa virus glycoprotein oligomerization and influence of cholesterol on virus replication. *Journal of Virology*, 84:983-992.

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas. Programa de Manejo Reserva de la Biosfera Janos. México, D. F., 2013.

Singh, N. y Levi, M.E. (2013). Arenavirus and West Nile virus in solid organ transplantation. *American Journal of Transplantation*, 13:361-371.

Skinner, H.H. y Knight, E.H. (1974). Factors influencing prenatal infection of mice with lymphocytic choriomeningitis virus. *Arch. ges. Virus*, 46:1.

Spiropoulou, C.F.; Kunz, S.; Rollin, P.E.; Campbell, K.P. y Oldstone, M.B. (2002). New World Arenavirus Clade C, but Not Clade A and B Viruses, Utilizes α -Dystroglycan as Its Major Receptor. *Journal of Virology*, 76:5140-5146.

Tagliapietra, V.; Rosà, R.; Hauße, H.C.; Laakkonen, J. y Voutilainen, L. (2009). Spatial and Temporal Dynamics of Lymphocytic Choriomeningitis Virus in Wild Rodents, Northern Italy. *Emerging Infectious Diseases*, 15:1019-1025.

Urata, S. y Yasuda, S. (2012). Molecular Mechanism of Arenavirus Assembly and Budding. *Viruses*, 4:2049-2079.

Wang, J.; Danzy, S.; Kumar, N.; Ly, H. y Liang, Y. (2012). Biological roles and functional mechanisms of arenavirus Z protein in viral replication. *Journal of Virology*, 86:9794-9801.

Weltzin, J.F.; Archer, S. y Heitschmidt, R.K. (1997). Small-mammal regulation of vegetation structure in temperate savanna. *Ecology*, 78:751-763.

Wolff, S.; Ebihara, H. y Groseth, A. (2013). Arenavirus Budding: A Common Pathway with Mechanistic Differences. *Viruses*, 5:528-549.

Woolhouse, M.; Haydon, D.T. y Antia, R. (2005). Emerging pathogens: the epidemiology and evolution of species jumps. *Trends in Ecology and Evolution*, 20:238-244.

Wuerthner, G. (1997). Viewpoint: The black-tailed prairie dog-headed for extinction? *Journal of Range Management*, 50:459-466.

Young, H.S.; Dirzo, R.; Helgen, K.; McCauley, D.; Billeter, S. y Kosoy, M. (2014). Declines in large wildlife increase landscape-level prevalence of rodent-borne disease in Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111:7036-7041.

Yun, N.E. y Walker, D.H. (2012). Pathogenesis of Lassa Fever. *Viruses*, 4:2031-2048.

Zapata, J.C. y Salvato, M.S. (2013). Arenavirus Variations Due to Host-Specific Adaptation. *Viruses*, 5:241-278.