



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

BÚSQUEDA DE VIRUS ZONÓTICOS EN ROEDORES Y MURCIÉLAGOS DE ALGUNAS ZONAS DEL CARIBE COLOMBIANO

KETTY ESTHER GALEANO ANAYA

Maestría en Ciencias-Microbiología

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Bogotá, Colombia

2020

BÚSQUEDA DE VIRUS ZONÓTICOS EN ROEDORES Y MURCIÉLAGOS DE ALGUNAS ZONAS DEL CARIBE COLOMBIANO

KETTY ESTHER GALEANO ANAYA

Proyecto de tesis para optar el título de:
Magíster en Ciencias - Microbiología

Director:

Salim Mattar Velilla PhD

Codirector:

Manuel Vargas Córdoba PhD

Línea de Investigación:

Enfermedades emergentes y reemergentes

Grupo de Investigación:

Instituto de Investigación Biológicas del Trópico (IIBT)-Universidad de Córdoba

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Bogotá, Colombia

2020

Dedicatoria

A Dios, el creador de toda ciencia.

A mi hermano Cristian, tu pérdida siempre será mi mayor ausencia.

Agradecimientos

En primera instancia, agradezco a Dios por permitirme llevar a cabo este proceso. Agradezco a mis padres, que con amor y templanza han hecho de mí, lo que soy hoy. A mi hermana y mis hermanos por enseñarme a amar la academia y por supuesto a mi amor Luis, por la incondicionalidad, por siempre creer en mí y por motivarme a asumir nuevos retos en mi vida.

Agradezco al Instituto de Investigación Biológicas del Trópico encabezado por mi director Salim Mattar que me dijo sí en el momento que me acerqué a buscar trabajo de tesis, siempre estaré agradecida por su ayuda, guía, inteligencia, consejos e innumerables regaños para poder llevar a cabo este trabajo. Al profesor Camilo Guzmán quien estuvo apoyando desde el inicio, gracias por enseñarme a tener paciencia, a buscar otras alternativas en la medida que se iban presentando desafíos metodológicos, y por siempre estar allí a pesar de sus ocupaciones. Al profesor Alfonso Calderón muchas gracias por facilitarme y confiarme el cuaderno de campo, se cuánto es valioso para usted, y por estar pendiente en todo el proceso de tesis.

Agradecimiento especial a mis compañeros del Instituto de investigación biológica del trópico quienes hicieron parte en la ayuda de este gran desafío, en especial a Ricardo Rivero, por acompañarme en muchas jornadas intensas de electroforesis.

A mis compañeros de estudio de la Universidad Nacional, por todo el compañerismo brindado. A la profesora María Teresa Reguero, por apoyarnos en la academia, su ayuda como coordinadora de la Maestría en Microbiología fue insuperable. Al profesor Manuel Antonio Vargas mi codirector, quien me impulsó y enseñó amar los caminos de la virología, gracias por el regalo del libro, siempre será bueno leerlo.

Resumen

Las zoonosis son enfermedades infecciosas transmisibles desde animales vertebrados al ser humano bajo condiciones naturales y representan un problema de salud pública. La etiología de las zoonosis incluye bacterias, virus, hongos, parásitos y priones. Dentro de las zoonosis virales se encuentran alrededor de 23 familias de virus RNA de cadena sencilla que, algunas de ellas causan las fiebres hemorrágicas. Estas zoonosis suelen ser mortales y han sido motivo de estudios eco-epidemiológicos en busca de animales reservorios y el nicho ecológico de estas entidades. El objetivo de este estudio fue el de buscar *Orthohantavirus*, *Mammarenavirus*, *Phlebovirus* y *Orthobunyavirus* en tejidos de roedores y murciélagos procedentes de algunas áreas del Caribe colombiano. A través de PCR convencionales se llevó a cabo un análisis para detectar esos virus en tejidos de 283 murciélagos y 120 roedores capturados de algunas áreas del Caribe colombiano. A partir, de murciélagos no se logró detectar genoma viral, sin embargo, en tejidos de roedores, uno de pulmón y otro de riñón capturados en Urumita y Villanueva (Guajira) respectivamente, se detectó un amplicón de 264 pb que correspondió al gen S de *Orthohantavirus*. Las dos muestras fueron secuenciadas por secuenciación de nueva generación (NGS), con el fin de identificar a que secuencias del género *Orthohantavirus* estaban relacionadas. No obstante, las secuencias no correspondieron a *Orthohantavirus*. La vigilancia epidemiológica de virus zoonóticos en murciélagos y roedores es importante por su posible capacidad de cruzar a otras especies de animales silvestres y de ahí a los humanos.

Palabras clave: zoonosis, reservorios, agentes infecciosas, vigilancia epidemiológica.

Abstract

Zoonoses are infectious diseases that can be transmitted from vertebrate animals to humans under natural conditions and represent a public health problem. The etiology of zoonoses includes bacteria, viruses, fungi, parasites, and prions. Within the viral zoonoses there are about 23 families of single-stranded RNA viruses, some of which cause hemorrhagic fevers. These zoonoses are usually fatal and have been the subject of eco-epidemiological studies in search of reservoir animals and the ecological niche of these entities. The objective of this study was to search for *Orthohantavirus*, *Mammarenavirus*, *Phlebovirus* and *Orthobunyavirus* in tissues of rodents and bats from some areas of the Colombian Caribbean. Through conventional PCR, an analysis was carried out to detect these viruses in tissues of 283 bats and 120 rodents captured from some areas of the Colombian Caribbean. From bats, it was not possible to detect the viral genome, however, in rodent tissues, one from the lung and the other from the kidney captured in Urumita and Villanueva (Guajira) respectively, a 264 bp amplicon was detected that corresponded to the S gene of *Orthohantavirus*. The two samples were sequenced by next generation sequencing (NGS), in order to identify which sequences of the genus *Orthohantavirus* were related. However, the sequences did not correspond to *Orthohantavirus*. Epidemiological surveillance of zoonotic viruses in bats and rodents is important because of their potential ability to cross over to other species of wild animals and from there to humans.

Keywords: Zoonoses, reservoirs, infectious agents, epidemiological surveillance.

Contenido

Resumen.....	VII
Lista de figuras.....	XI
Lista de tablas	XII
Lista de abreviaturas.....	XIV
Introducción	1
1. Capítulo 1. Generalidades.....	5
1.1 Enfermedades Virales Emergentes	5
1.2 Zoonosis	7
1.3 Infección por <i>Mammarenavirus (Arenaviridae)</i>	8
1.3.1 Agente infeccioso	9
1.3.2 Mecanismo de replicación	11
1.3.3 Epidemiología.....	12
1.3.4 Periodos de incubación y transmisión.....	14
1.3.5 Diagnóstico de laboratorio	15
1.3.6 Prevención y vacunación.....	16
1.3.7 Tratamiento	16
1.4 Infección por <i>Orthohantavirus (Hantavirus)</i>	16
1.4.1 Agente infeccioso	18
1.4.2 Mecanismo de replicación	19
1.4.3 Epidemiología, periodo de incubación y transmisión.	20
1.4.4 Diagnóstico de laboratorio	21
1.4.5 Prevención	21
1.5 Infección por <i>Phlebovirus</i>	22
1.5.1 Agente infeccioso	24
1.5.2 Mecanismo de replicación.	25
1.5.3 Epidemiología y transmisión.....	25
1.5.4 Diagnóstico de laboratorio.....	26
1.5.5 Prevención	26
1.6 Infección por <i>Orthobunyavirus</i>	27
1.6.1 Mecanismo de replicación, patógena y respuesta inmune.....	29
1.6.2 Epidemiología y transmisión.....	31
1.6.3 Diagnóstico de laboratorio	31
1.6.4 Prevención	32
1.7 Mamíferos y su importancia como reservorios zoonóticos.....	33
1.7.1 Murciélagos.....	33
1.7.2 Roedores.....	35
1.8 Antecedentes en Colombia de <i>Orthohantavirus</i> , <i>Mammarenavirus</i> , <i>Orthobunyavirus</i> y <i>Phlebovirus</i> en murciélagos y roedores.....	37
Capítulo 2. Objetivos.....	42

3. Capítulo 3. Metodología.....	45
3.1 Tipo de estudio, tamaño de la muestra y áreas geográficas.	45
3.2 Aspectos éticos.	45
3.3. Área geográfica de los roedores.....	47
3.4. Área geográfica de los murciélagos.....	47
3.5 Captura de roedores.....	48
3.6 Captura de murciélagos.....	49
3.7 Toma de las muestras de roedores y murciélagos.....	50
3.8 Medidas de bioseguridad.....	50
3.9 Métodos moleculares para la detección de virus zoonoticos.....	51
3.10 Relación filogenéticas.....	61
4. Capítulo 4. Resultados.....	63
4.1 Distribución y ubicación espacial de los murciélagos capturados.	63
4.2 Distribución y ubicación espacial de los roedores capturados.	63
4.3 Demostración del gen beta-actina con los iniciadores b-actina3 y b-actina4 en murciélagos y roedores.	67
4.4 Resultados Objetivo 1. Detectar <i>Orthobunyavirus</i> , <i>Phlebovirus</i> , <i>Orthohantavirus</i> y <i>Arenavirus</i> en tejidos de roedores y murciélagos.	68
4.4.1 Detección por PCR convencional de <i>Orthohantavirus</i> en roedores y murciélagos.	69
4.4.2 Detección por PCR anidada de <i>Phlebovirus</i> en roedores y murciélagos.	71
4.4.3 Detección por PCR convencional de arenavirus- <i>Mammarenavirus</i> en roedores y murciélagos.....	74
4.4.4 Detección por PCR convencional de <i>Orthobunyavirus</i> en roedores y murciélagos.	74
5. Capítulo 5. Discusión.....	75
6. Conclusiones y recomendaciones	84
6.1 Conclusiones.....	84
6.2 Recomendaciones.....	85
Anexos.....	87
Anexo A. Condiciones de la PCR del gen de la beta-actina como control interno.....	87
Anexo B. Gel de agarosa con controles positivos para <i>Orthohantavirus</i> . A (Necocli virus), B (Rio mamore virus), C (Sin nombre virus), D (Rio mamore virus 2).	88
Anexo C. Gel de agarosa con control positivo para <i>Phlebovirus</i>	88
Anexo D. Gel de agarosa con control positivo para <i>Mammarenavirus</i>	89
Bibliografía	90

Lista de figuras

Figura 1- 1 Factores que afectan la evolución de las enfermedades virales.	7
Figura 1- 2 Esquema general de la familia <i>Arenaviridae</i>	11
Figura 1- 3 Distribución geográfica de las principales infecciones causadas por <i>Mammarenavirus</i>	12
Figura 1- 4 Forma de transmisión de <i>Mammarenavirus</i>	14
Figura 1- 5 Estructura y genoma de los <i>Orthohantavirus</i>	20
Figura 1- 6 Estructura y genoma del género <i>Phlebovirus</i>	24
Figura 1- 7 Estructura y genoma de los <i>Orthobunyavirus</i>	28
Figura 3- 1 Esquema general metodológico del estudio.	46
Figura 4- 1 Distribución espacial de roedores y murciélagos en los departamentos de Córdoba; Sucre y La Guajira.	66
Figura 4- 2 Gel de agarosa para el gen beta-actina en murciélagos. B (cerebro), L (pulmón), H (corazón), K (riñón), LI (hígado), S (bazo) y C- (control negativo).	68
Figura 4- 3 Gel de agarosa para el gen beta-actina en roedores. B (cerebro), L (pulmón), H (corazón), K (riñón), LI (hígado), S (bazo) y C- (control negativo).	68
Figura 4- 4 Gel de agarosa con amplicones obtenidos por PCR convencional en roedores. 2 (riñón), 12 (pulmón) y C- (control negativo).	69
Figura 4- 5 Electroferogramas de la muestra de riñón de Villanueva-Guajira.	70
Figura 4- 6 Gel de agarosa con amplicón obtenido del segmento L por PCR anidada; murciélago 162 (hígado), control negativo (C-).	72
Figura 4- 7 Electroferogramas de la muestra 162 del murciélago capturado en Ayapel-Córdoba.	73

Lista de tablas

Tabla 1- 1 Factores ligados a la emergencia de enfermedades virales.....	6
Tabla 1- 2 Fiebres hemorrágicas virales importantes en salud pública.....	8
Tabla 1- 3 Especies del género <i>Mammarenavirus</i>	10
Tabla 1- 4 Descripción de <i>Mammarenavirus</i> en América.....	13
Tabla 1- 5 Taxonomía del orden <i>Bunyvirales</i> 2018.....	17
Tabla 1- 6 Clasificación de la familia <i>Hantaviridae</i> 2019.....	17
Tabla 1- 7 Clasificación de la familia <i>Phenuiviridae</i> 2019.....	22
Tabla 1- 8 Especies del género <i>Phlebovirus</i> 2019.....	23
Tabla 1- 9 Clasificación de la familia <i>Peribunyaviridae</i> 2019.....	27
Tabla 3- 1 Mezcla 1 RT.....	52
Tabla 3- 2 Mezcla 2 RT.....	53
Tabla 3- 3 Gen de la beta-actina como control interno.....	53
Tabla 3- 4 Iniciadores para la detección genérica de orthohantavirus por PCR convencional.....	54
Tabla 3- 5 Condiciones de la mezcla de reacción de la PCR convencional para la detección de orthohantavirus.....	54
Tabla 3- 6 Iniciadores para la detección genérica de phlebovirus por PCR anidada.....	56
Tabla 3- 7 Condiciones de la mezcla de reacción de la PCR anidada para la detección de phlebovirus.....	56
Tabla 3- 8 Iniciadores para la detección genérica de mammarenavirus por PCR convencional.....	57
Tabla 3- 9 Condiciones de la mezcla de reacción de la PCR convencional para la detección de mammarenavirus.....	57
Tabla 3- 10 Iniciadores para la detección genérica de orthobunyavirus por PCR convencional.....	58
Tabla 3- 11 Condiciones de la mezcla de reacción de la PCR convencional para la detección de orthobunyavirus.....	59

Tabla 4- 1 Distribución geográfica de los murciélagos capturados en los departamentos de Córdoba y Sucre.	64
Tabla 4- 2 Distribución geográfica de roedores capturados en los departamentos de Córdoba y La Guajira.	67
Tabla 4- 3 Estadística de calidad de tejidos de roedores de La Guajira secuenciadas...	71

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
ANDV	Virus Andes
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BUNV	Virus Bunyamwera
CDC	Centro para el control y la prevención de enfermedades
CML	Coriomeningitis Linfocitaria
DAF	Factor aceleración de la degradación
DC	Células dendríticas
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
EM	Microscopia electrónica
ESCRT	Complejo requerido para el transporte endosomal
FHA	Fiebre hemorrágica Argentina
FHV	Fiebre hemorrágica Venezolana
GP	Glicoproteína
HCPS	Síndrome cardiopulmonar por Hantavirus
HFRS	Fiebre hemorrágica con síndrome renal
HRTV	Virus Heartland
IFI	Inmunofluorescencia indirecta
Ig	Inmunoglobulinas
IFN	Interferón
JUNV	Virus Junín
Kb	Kilobases

LACV	Virus La Crosse
MDA5	Proteína 5 asociada a la diferenciación de melanona
MERS	Síndrome respiratorio del medio oriente
NGS	Secuenciación de próxima generación
NP	Nucleoproteína
NSs	Proteína no estructural pequeña
ORF	Marco abierto de lectura
OROV	Virus Oropouche
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pb	pares de bases
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RdRp	ARN polimerasa dependiente de ARN
RIG-I	Receptores similares al gen I inducible por ácido retinoico
RNP	Ribonucleoproteína
RT	Transcriptasa Inversa
RVF	Virus de la fiebre del valle del Rift
SARS	Síndrome respiratorio agudo severo
SFTSV	Virus del síndrome de fiebre severa con trombocitopenia
SNC	Sistema nervioso central
SNV	Virus sin Nombre
TOSV	Virus Toscana
TBPV	<i>Phlebovirus</i> transmitidos por garrapatas
UUKV	Virus Uukuniemi

Introducción

Las enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes representan una amenaza a nivel global así como un reto para la salud pública y la economía de los países afectados por ellas. La mayor parte de estas enfermedades son de origen zoonótico. Las zoonosis son enfermedades infecciosas transmitidas de forma natural por exposición o a través del contacto directo de animales con humanos, ya sea por ingestión, inhalación o inoculación de material infeccioso (Calderon, Guzman, Salazar, Figueiredo, & Mattar, 2016).

Actualmente el mundo se encuentra paralizado por la aparición de una nueva zoonosis. En el mes de diciembre de 2019, un nuevo virus perteneciente a la familia *Coronaviridae* irrumpió como agente patógeno en la región china de Wuhan provocando un síndrome respiratorio agudo severo SARS-CoV-2 de alta letalidad (Li et al., 2020; Zhu et al., 2020). Para el día 10 del mes de noviembre del 2020 ha ocasionado más de 46,6 millones de contagios y más de 1,7 muertes en todo el mundo (Barrios et al., 2020). La entrada de esta pandemia ha generado grandes problemas en la salud pública, no solo por la extensión de la infección y su letalidad, sino por los grandes interrogantes que despierta sobre el origen y su posible evolución a medio o largo plazo.

La etiología de las zoonosis incluye bacterias, virus, protozoarios, hongos y priones (McArthur, 2019) donde la coexistencia de éstos microorganismos con los vectores, los reservorios y el hombre aumenta el riesgo de adquisición de la infección (Calderon et al., 2016). En cuanto a las enfermedades virales la emergencia o reemergencia puede deberse, entre otros muchos factores, a mutaciones de los virus, recombinaciones genéticas, o alteraciones ambientales que afectan la relación virus-huésped. Por ello las zoonosis son el origen más frecuente de la emergencia de las infecciones virales, ya que los virus que naturalmente infectan a animales pueden pasar a otras especies como la humana (İnci, Doğanay, Özdemir, Düzlü, & Yıldırım, 2018; Monsalve, Mattar, & González, 2009). La vía de transmisión de animal a hombre mediada por vectores es un

mecanismo de transmisión de patógenos zoonóticos en el cual la fauna silvestre es el principal reservorio de estos agentes causales (Elelu et al., 2019; Higgins, 2004).

En años recientes las zoonosis han sido objeto de mayor atención en todo el mundo, permitiendo una mejor comprensión de la epidemiología, el diagnóstico, la prevención y el control de éstas. Muchas infecciones zoonóticas son consecuencia de la entrada abrupta del hombre a los hábitats de diferentes animales, comúnmente aislados de centros y cabeceras urbanas (Calderón et al., 2016). La mayoría de las enfermedades parecen originarse con patógenos ya presentes en el medio y que emergen por presiones selectivas o por factores favorecedores, entre los cuales, las condiciones socio geográficas y sociales predisponen a la aparición de patologías (Ínci et al., 2018; McArthur, 2019). La búsqueda de virus zoonóticos y el papel de los animales silvestres permiten esclarecer la posible aparición de las enfermedades emergentes o reemergentes posiblemente relacionadas con la pérdida de la biodiversidad por factores antropogénicos como la destrucción de hábitats naturales, el tráfico de fauna y a la pérdida de diversidad genética, factores que representan una amenaza en la salud pública (Cunningham, Daszak, & Wood, 2017).

Por lo que es de interés saber, que los murciélagos son los únicos mamíferos voladores, los cuales con más de 1200 especies, representan no menos del 20% de todas las especies de mamíferos, además son el segundo orden de mamíferos numéricamente más diversos (Flores, Carter, Halczok, Kerth, & Page, 2020; Subudhi, Rapin, & Misra, 2019). En los roedores, el subgrupo más importante es el de los *Sigmodontinae*, con 14 tribus, 79 géneros y 423 especies. En comparación con los roedores, los virus zoonóticos son más abundantes y diversos en los murciélagos (Luis et al., 2013). Los roedores (Orden Rodentia) son un grupo de comparación adecuado, ya que son huéspedes reservorios importantes de una serie de patógenos virales zoonóticos con un impacto poco favorable en la salud pública (Bandouchova et al., 2018; Eitan, Kosa, & Yovel, 2019; Hanadhita et al., 2019). Estos patógenos incluyen *Hantavirus* (que causan síndrome pulmonar por hantavirus y fiebre hemorrágica con síndrome renal) y *Arenavirus* (que causan, por ejemplo, Coriomeningitis linfocítica, fiebre de Lassa y fiebres hemorrágicas por virus Junin, Machupo, Guanarito etc.) (Luis et al., 2013). En murciélagos se ha reportado más de 60 especies de virus agrupados en familia y género: *Rhabdoviridae*, *Lyssavirus*; *Paramyxoviridae*, *Henipavirus* y *Rubulavirus*; *Flaviviridae*, *Flavivirus*; *Togoviridae*,

Alphavirus; Bunyaviridae, orthobunyavirus, phlebovirus y hantavirus; Reoviridae, Orbivirus y orthoreovirus) (Calisher, Childs, Field, Holmes, & Schountz, 2006; Subudhi et al., 2019).

En Colombia los cambios sociales y demográficos también han motivado el estudio sobre las zoonosis (Guzmán et al., 2013). Una vez que las personas irrumpen en ecosistemas con los cuales han tenido poco contacto y cuya fauna quizá no ha sido conocida en su totalidad, aumentan su exposición a los animales y a las infecciones que ellos transmiten. Así mismo, existen conocimientos nuevos en el área de la ecología urbana (McArthur, 2019). La facilidad y la velocidad de los viajes modernos también contribuyen a la propagación de enfermedades antes limitadas a zonas geográficas específicas. Colombia es uno de los países con la mayor diversidad, albergando diferentes especies de vida silvestre con una amplia distribución y donde desafortunadamente el tráfico de fauna silvestre sigue teniendo un amplio impacto (Calderon et al., 2016). El presente trabajo permite contribuir a la búsqueda de patógenos zoonóticos en roedores y murciélagos de algunas zonas del Caribe colombiano destacando la necesidad de profundizar el conocimiento y mejorar la vigilancia y el control oportuno de las zoonosis emergentes y reemergentes que causan una extensa morbilidad, discapacidad y mortalidad en poblaciones humanas vulnerables con el fin de mejorar las condiciones de salud humana.

En este contexto, el estudio buscó determinar: ¿Cuáles *orthohantavirus, mamarenavirus, phlebovirus* y *orthobunyavirus* se encuentran presentes en las especies de roedores y murciélagos en algunas zonas del caribe colombiano? Para ello se tomaron muestras de tejidos de roedores y murciélagos en algunas áreas del caribe colombiano.

1. Capítulo 1. Generalidades

1.1 Enfermedades Virales Emergentes

Las enfermedades virales emergentes son aquellas entidades que ocurren en forma novedosa en la población; esto hace referencia también a las virosis existentes que ha aumentado su incidencia recientemente y han seguido incrementándose en una determinada región geográfica (Inci et al., 2018). En este grupo se incluyen aquellas infecciones nuevas en un determinado grupo poblacional o infecciones por nuevos agentes virales. Es posible que las enfermedades virales emergentes también se deban al desarrollo de métodos diagnósticos que permiten identificar agentes infecciosos no reconocidos previamente (Cunningham et al., 2017; McArthur, 2019). La emergencia viral podría definirse como “la aparición espontánea, súbita y progresiva de numerosos casos de infección ocasionados por virus aparentemente nuevos (desde el punto de vista antigénico, genómico y genético) y acompañados de una alta invasividad y mortalidad” (Vargas, 2016). En la (Tabla 1-1) se manifiestan los factores ligados a la emergencia de enfermedades virales.

Las enfermedades virales no son entidades estáticas, son dinámicas y evolucionan en el tiempo con algunos mecanismos que favorecen su evolución. Hay variables asociadas al agente infeccioso, al hospedero, a los grupos poblacionales, a los nichos ecológicos y a los patrones sociales de comportamiento (Eitan et al., 2019; Holmes, 2007; Subudhi et al., 2019). En la Figura 1-1 se pueden observar los diferentes factores que afectan las enfermedades virales.

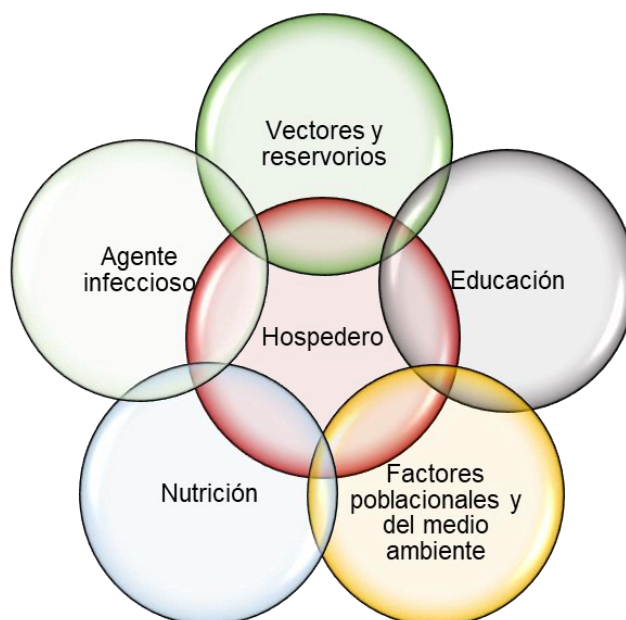
Tabla 1- 1 Factores ligados a la emergencia de enfermedades virales.

Factores	Concepto
Cambios en las poblaciones humanas	Las creencias religiosas, pueden originar que ciertos grupos poblacionales dejen de aplicarse los esquemas vacúnales, dejando grupos poblacionales expuestos a riesgo.
Cambios en los hábitats de vectores o reservorios animales	La creación de diques y represas hidroeléctricas han creado grandes reservas de agua que facilitan la infestación por insectos que pueden ser vectores de enfermedades, creando nuevos nichos ecológicos.
Cambios en el ambiente	Las últimas décadas se han caracterizado por cambios asociados a mayores desplazamientos por viajes, cambios políticos, hambre, guerras civiles, invasiones militares, desplazamientos forzados de civiles y nuevos núcleos de formación. Estas condiciones de salud e higiene generan poblaciones vulnerables.
Agricultura intensiva	Esta ha permitido la proliferación de reservorios de enfermedades virales.
Movimientos poblacionales	Con desplazamiento de humanos y animales domésticos a zonas hasta entonces vedadas o de difícil acceso. En este sentido, tiene un gran impacto la colonización de zonas selváticas, la explotación de regiones auríferas y el turismo denominado ecológico.
Los nichos ecológicos aislados	Potenciales reservorios y vectores, como los que se presentan en regiones remotas o islas, pueden ser vulnerables a la introducción de virus foráneos
La globalización de la economía	El intercambio de productos desde zonas remotas facilita la diseminación de vectores a través del mundo.
La migración de aves	Así como el intercambio comercial de productos agrícolas y ganaderos, permite la propagación de virus y artrópodos (especialmente garrapatas) alrededor del mundo.
El contacto de humanos con mascotas exóticas	Roedores y perros de las praderas, transportadas en condiciones poco higiénicas y sin normas de cuarentena.
El uso masivo de insecticidas	Para evitar la proliferación de insectos en cultivos extensivos, posibilita el surgimiento de vectores resistentes, como se puede ver en nuestro medio en cultivos de arroz, y algodón.
Fenómenos climáticos cambiantes	En los últimos años los diferentes fenómenos han dado condiciones necesarias para el resurgimiento de enfermedades como la neumonía, causada por Hantavirus (virus Sin Nombre).
La urbanización descontrolada	Esto permite que se almacene agua en forma no adecuada y la proliferación de vectores de virus

Modificado de (Vargas, 2016)

Figura 1- 1 Factores que afectan la evolución de las enfermedades virales.

(Vargas, 2016)



1.2 Zoonosis

Zoonosis (del griego zoon: animal) son enfermedades infecciosas transmisibles desde animales vertebrados al ser humano bajo condiciones naturales. Los agentes infecciosos involucrados incluyen bacterias, virus, parásitos, hongos y priones. Estas infecciones, según su ciclo, pueden ser clasificadas como sinantrópicas cuando tienen un ciclo urbano o exoantrópicas, cuando el ciclo es selvático. Algunas zoonosis pueden presentar ambos tipos de ciclos (Dabanch, 2013; McArthur, 2019).

Algunas familias virales de ARN de cadena sencilla causan las fiebres hemorrágicas virales, estas se caracterizan por causar diversos cuadros febriles con manifestaciones hemorrágicas; la mayoría de estas fiebres hemorrágicas son transmitidas por: mordedura de animales, inhalación de secreciones o las picaduras de insectos hematófagos (Cunningham et al., 2017; Piacenza, Calderón, Enría, Provencal, & Polop, 2018). Las fiebres hemorrágicas causadas por agentes virales pueden ser mortales y han sido motivo de múltiples encuestas epidemiológicas y estudios de campo en busca de animales

reservorios y la determinación del nicho ecológico de estas entidades (Paessler & Walker, 2013). A continuación en la (Tabla 1-2) se muestran las fiebres hemorrágicas virales de interés.

Tabla 1- 2 Fiebres hemorrágicas virales importantes en salud pública.

Familia viral	Género	Especie	Enfermedad	Localización	Reservorio/vector
Arenaviridae	<i>Mammarenavirus</i>	Virus Lassa	Fiebre por virus Lassa	África Occ.	<i>Mastomys</i>
		Virus Junín	Fiebre hemorrágica argentina	Argentina	<i>Calomys</i>
		Virus Machupo	Fiebre hemorrágica boliviana	Bolivia	<i>musculus</i>
		Virus Guanarito	Fiebre hemorrágica venezolana	Venezuela	<i>Calomys</i>
		Virus Sabia	Fiebre hemorrágica brasilera	Brasil	<i>Zygodontomys</i>
		Virus Lujo	Innominada	Zambia	Desconocido
		Virus Chapare	Fibre hemorrágica boliviana	Bolivia	Desconocido
Hantaviridae	<i>Orthohantavirus</i>	Virus Hantaan Virus Puumala Virus Seoúl Virus Dobrova	Fiebre hemorrágica con síndrome renal	Europa Lejano Oriente	Roedores silvestres
		Virus Andes, Virus Maporal, Virus Araraquara, Virus sin Nombre	Síndrome cardiopulmonar por <i>Orthohantavirus</i>	América	Roedores silvestres
Phenuiviridae	<i>Phlebovirus</i>	Virus RFV	Fiebre del Valle de Rift	África Oriente Medio	Ganado/ <i>Aedes</i> y otros
Peribunyaviridae	<i>Orthobunyavirus</i>	Virus California encefalitis Virus Jamestown Canyon Virus La Crosse Virus de la fiebre de patas blancas	Fiebres hemorrágicas	Norte América	<i>Aedes dorsalis</i> <i>Aedes albopictus</i> <i>Ochlerotatus triseriatus</i> <i>Aedes</i> entre otros

Modificado de (Kuno, Mitchell, Chang, & Smith, 1996; Maes et al., 2018).

1.3 Infección por *Mammarenavirus* (*Arenaviridae*)

El género *Mammarenavirus* pertenece a la familia *Arenaviridae* la cual se estableció en 1976 para agrupar virus predominantemente murinos con genomas de ARN bisegmentados, ambisentidos de cadena sencilla que forman partículas envueltas con una apariencia "arenosa" (Maes et al., 2018; Radoshitzky et al., 2015). Hasta hace poco, la familia era monogénica, incluyendo solo al género *Arenavirus*, con un número cada vez mayor de especies (Bodewes et al., 2013; Hetzel et al., 2013). En particular, el género *Arenavirus* que afecta a los mamíferos pasó a denominarse *Mammarenavirus* (Hepojoki

et al., 2015). En este trabajo solo se enfoca en la búsqueda de *Arenavirus* pertenecientes al género *Mammarenavirus*; debido a las infecciones crónicas que causan en roedores (Mattar, Guzmán, Calderón, & González, 2017).

El género *Mammarenavirus* se divide en dos grupos, los *Arenavirus* del Viejo Mundo y los *Arenavirus* del Nuevo Mundo (Liu, Li, Wang, & Duan, 2017). Los *Arenavirus* causan infecciones crónicas en roedores de América, Europa, y África. En estos animales el virus se ha adaptado para persistir durante muchos siglos; cuando el humano invade su hábitat natural entra en contacto con las excretas de estos animales, sufriendo enfermedades que pueden tener un curso mortal (Vargas, 2016). En la (Tabla 1-3) es posible observar las 36 especies del genero *Mammarenavirus*.

1.3.1 Agente infeccioso

Arenaviridae está compuesta por virus que tienen características estructurales muy particulares. Tienen una morfología pleomorfa con un diámetro de 60-200nm. Todos los virus de esta familia están cubiertos con un ARN circular, bisegmentado y ambisentido. El tamaño de las moléculas de ARN es de 7,2 kb para la cadena larga y 3,5 kb para la cadena corta. El genoma codifica para cuatro proteínas como lo muestra la Figura 1-2 (Liu, Li, Wang, & Duan, 2017). El genoma consiste de dos cadenas de ARN designadas como S (small) L (large). El ARN S posee alrededor de 3.500 nucleótidos y el ARN L 7.100, con diferencias en los pesos moleculares entre los agentes infecciosos de la familia (Olayemi et al., 2018). La región 3' de las dos cadenas de ARN tiene homología en 17 de sus nucleótidos. Las extremidades 3' y 5' tienen secuencias de bases que son complementarias, lo que permite que el genoma forme estructuras en asa, otorgándole una estructura circular en la microscopía electrónica (McLay, Liang, & Ly, 2014). El esquema general de la familia *Arenaviridae* se presenta en la (Figura 1-2).

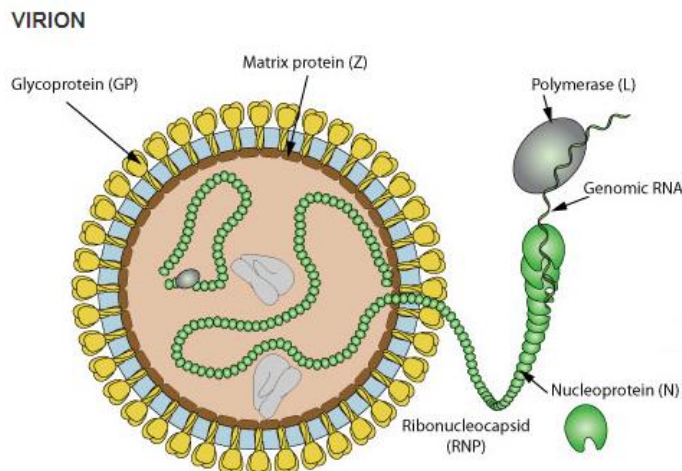
Tabla 1- 3 Especies del género *Mammarenavirus*.

Género	Especies
Mammarenavirus	<i>Allpahuayo mammarenavirus</i>
	<i>Argentinian mammarenavirus</i>
	<i>Bear Canyon mammarenavirus</i>
	<i>Brazilian mammarenavirus</i>
	<i>Chapare mammarenavirus</i>
	<i>Cupixi mammarenavirus</i>
	<i>Flexal mammarenavirus</i>
	<i>Gairo mammarenavirus</i>
	<i>Guanarito mammarenavirus</i>
	<i>Ippy mammarenavirus</i>
	<i>Lassa mammarenavirus</i>
	<i>Latino mammarenavirus</i>
	<i>Loei River mammarenavirus</i>
	<i>Lujo mammarenavirus</i>
	<i>Luna mammarenavirus</i>
	<i>Lunk mammarenavirus</i>
	<i>Lymphocytic choriomeningitis mammarenavirus</i>
	<i>Machupo mammarenavirus</i>
	<i>Mariental mammarenavirus</i>
	<i>Merino Walk mammarenavirus</i>
	<i>Mobala mammarenavirus</i>
	<i>Mopeia mammarenavirus</i>
	<i>Okahandja mammarenavirus</i>
	<i>Oliveros mammarenavirus</i>
	<i>Paraguayan mammarenavirus</i>
	<i>Cali mammarenavirus</i>
	<i>Piritai mammarenavirus</i>
	<i>Ryukyu mammarenavirus</i>
	<i>Serra do Navio mammarenavirus</i>
	<i>Solwezi mammarenavirus</i>
<i>Souris mammarenavirus</i>	
<i>Tacaribe mammarenavirus</i>	
<i>Tamiami mammarenavirus</i>	
<i>Wenzhou mammarenavirus</i>	
<i>Whitewater Arroyo mammarenavirus</i>	

Modificado de (Maes et al., 2018)

Figura 1- 2 Esquema general de la familia *Arenaviridae*.

<https://viralzone.expasy.org/501>.



1.3.2 Mecanismo de replicación

El ciclo viral comienza con la interacción del virus con la superficie celular y la entrada del virión a la célula blanco por endocitosis mediada por GP. Luego de la fusión de la membrana endosomal con la envoltura viral y la subsecuente liberación de las nucleocápsides al citoplasma tienen lugar los procesos de transcripción y replicación del ARN viral (Rojek & Kunz, 2008). Si bien la región 5' de los segmentos S y L de los arenavirus contiene un ORF en sentido positivo, los ARNs genómicos no funcionan como mensajero ya que el ARN es antisentido. Asociados a la proteína NP, los ARN genómicos forman las nucleocápsides que funcionan como cadena molde o "template" para la replicación viral (Reguera et al., 2016). Ésta es una propiedad fundamental que los arenavirus comparten con los virus de cadena negativa (Gryseels et al., 2017; Martínez-Sobrido et al., 2009). El ciclo replicativo se hace por completo en el citoplasma de las células infectadas, la replicación genómica ocurre cuando hay suficiente NP para encapsidar las copias genómicas y antígenómicas; el virus se ensambla en la membrana plasmática y egresa por gemación (Garcin, Rochat, & Kolakofsky, 1993; López, Jácamo, & Franze, 2001).

1.3.3 Epidemiología

Los *Mammarenavirus* son virus que infectan a los roedores; los diferentes *Mamarenavirus* son específicos de un roedor determinado; así por ejemplo, *Mus musculus* (ratón domestico) es el principal reservorio del virus de la Coriomeningitis linfocitaria (CMLV). La coevolución de las especies de roedores con los agentes infecciosos hace que estas entidades tengan una distribución geográfica específica y que los reservorios sean específicos de los diferentes agentes virales (Lozano, Mattar, Guzmán & Calderón, 2017; Laurence & Kunz, 2011). Fuente de infección es la contaminación de bebidas o alimentos de consumo humano con orina de animales infectados o por contacto con elementos contaminados mediante lesiones o abrazones. Los grandes depósitos de granos pueden ser el lugar mas buscado por roedores que contaminan los alimentos, por lo cual, el contacto con estos alimentos puede exponer al hombre a la adquisición de *Mammarenavirus* como el virus de la fiebre hemorrágica Argentina (Vargas, 2016). En la Figura 1-3, se observa la distribución geográfica de las principales infecciones causadas por *Mammarenavirus* (Vargas, 2016). En la (Tabla 1-4) se observan arenavirus suramericanos (Lozano, Mattar, Guzmán, & Calderón, 2017).

Figura 1- 3 Distribución geográfica de las principales infecciones causadas por *Mammarenavirus*.



En círculos rojos los sitios donde se han aislados los virus del complejo del nuevo mundo. En círculos morados virus Lassa, en líneas horizontales azules los virus Ippy y Mobola, en óvalo verde virus Mopeia.

Tabla 1- 4 Descripción de *Mammarenavirus* en América.

Virus (Reservorio)	Distribución	Detección	Enfermedad
Junin(<i>Calomys musculus</i>)	Argentina	1958	Fiebre hemorrágica Argentina
Machupo(<i>Calomys callosus</i> ; <i>Calomys laucha</i>)	Bolivia	1963-2008	Fiebre hemorrágica Boliviana
Chapare-desconocido	Bolivia	2004	Fiebre hemorrágica Boliviana
Guanarito (<i>Zygodontomys brevicauda</i>)	Venezuela	1990	Fiebre hemorrágica Venezolana
Sabia-desconocido	Brasil	1990	Fiebre hemorrágica Brasileña
Virus de la Coriomeningitis linfocítica (<i>Mus musculus</i>)	Mundial	1934	Coriomeningitis linfocitaria (CML)
Flexal (<i>Oryzomys sp</i>)	Brasil	1975	Indeterminado
Guanarito y Pichindé (<i>Z. brevicauda</i>)	Colombia	2009	Virus Pichindé no patógeno
Cali (<i>Oryzomys albigularis</i>)	Colombia	1967	Virus de Pichindé no patógeno
Paraguay (<i>Oryzomys buccinatus</i>)	Paraguay	1965	Indeterminado
Allpahuayo (<i>Oecomys bicolor</i>)	Perú	2001	Indeterminado
Pirital (<i>Sigmodon alstoni</i>)	Venezuela	1997	Indeterminado
Tacaribe (<i>Artibeus sp</i>)	Trinidad	1956	Indeterminado
Cupuxi (<i>Oryzomys capito</i>)	Brasil	1998	Indeterminado
Serra de Navio (<i>Oryzomys capito</i> ; <i>Neacomys guianae</i>)	Brasil	1964	Indeterminado
Oliveros (<i>Bolomys obscures</i>)	Argentina	1989	Indeterminado
Latino (<i>Calomys callosus</i>)	Bolivia	1965	No patógeno
Whitewater creek (<i>Neotoma sp</i>)	USA	1996	Indeterminado
Tamiame (<i>Sigmodon hispidus</i>)	USA	1965	Indeterminado
Bear Canyon (<i>Peromyscus sp</i>)	USA	2002	Indeterminado
Pinhal (<i>Calomys tener</i>)	Brasil	?	Indeterminado

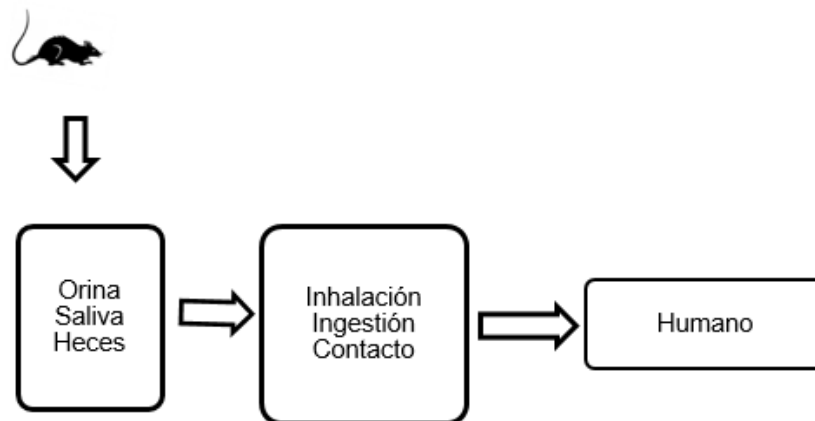
Modificado de (Lozano et al., 2017)

1.3.4 Periodos de incubación y transmisión

El periodo de incubación de las infecciones por *Mammarenavirus* es de 6 a 21 días. Los periodos cambian con los diferentes agentes infecciosos y con la dosis del inóculo. Los roedores se infectan muy temprano en la vida y cursan con una infección persistente, eliminando el virus por saliva, orina y otros líquidos corporales (Soto & Mattar, 2010). Contrario a lo que se pensaba, los roedores presentan una respuesta inmune celular y humoral con formación de complejos inmunes, pero no logran eliminar el virus. El humano adquiere la enfermedad por inhalación, ingestión o contacto directo con las secreciones animales y también mediante contacto con otros pacientes infectados (Figura 1-4) (Vargas, 2016).

Figura 1- 4 Forma de transmisión de *Mammarenavirus*.

(Vargas, 2016)



Se plantea que la mayoría de las infecciones son asintomáticas; en el caso de la fiebre de Lassa se calcula que al año se infectan entre 300 mil a 500 mil personas en África, de las cuales sólo presentan sintomatología 12 mil personas y fallecen unas cinco mil, lo que confiere una tasa de mortalidad de 1-2%. Si se contabilizaran sólo los pacientes hospitalizados e infecciones nosocomiales, la tasa de mortalidad sería del 30-40% (Vargas, 2016). La CML puede acompañarse de una variedad de manifestaciones que incluyen: infección asintomática o subclínica, síndrome similar a la influenza, meningitis

aséptica o meningoencefalitis. La mayoría de las infecciones son de origen benigno. El periodo de incubación es de 6 a 13 días.

En la fiebre hemorrágica Argentina (FHA), el contagio se da por inhalación de excretas de los roedores, un ejemplo de esto ocurre durante la recolección de cosecha, en el cual los trabajadores se infectaban por los aereosoles producidos por la maquina llamada combinada, en esta se encontraban los restos de animales macerados por el proceso de recolección. La infección puede ser subclínica, el periodo de incubación es de una semana o dos semanas (Fernandes et al., 2018).

1.3.5 Diagnóstico de laboratorio

La prueba de oro es el aislamiento viral durante el periodo febril, el cual puede ser realizado de hisopado laríngeo, orina, líquido cefalorraquídeo o muestras de tejido. Esta técnica implica el contacto directo con el virus que es altamente infeccioso, por lo que debe realizarse solamente en laboratorios con nivel de bioseguridad categoría cuatro. Desde hace algunos años han sido diseñadas PCR específicas para *Arenavirus* que pueden ser utilizadas en laboratorios de categoría dos y tres (Fukushi, Tani, Yoshikawa, Saijo, & Morikawa, 2012; Stefan et al., 2016). En la práctica, la serología es el método más común utilizado para el diagnóstico de la enfermedad. En un paciente con cuadro clínico compatible, la presencia de un título de ELISA o IFA IgM positivo, permite hacer un diagnóstico presuntivo, el cual debe confirmarse, con seroconversión a las 3 semanas y aumento de los títulos de IgG a las 4 semanas. No existen pruebas comerciales para *Arenavirus*, solo los grupos de investigación especializados y grandes laboratorios de salud pública poseen pruebas de ELISA o IFI. Existe una importante reactividad cruzada entre los diferentes tipos de virus, por lo que el diagnóstico específico solo puede realizarse por medio de anticuerpos neutralizantes, los cuales aparecen entre 12 a 30 días del inicio de los síntomas y durante la convalecencia (Fukushi et al., 2012)

1.3.6 Prevención y vacunación

Ante la presencia de un caso sospechoso de fiebre hemorrágica por *Mammarenavirus*, hay que tener un control estricto de las personas que entran en contacto directo con el paciente y los procedimientos de manejo de fluidos corporales y excretas deben seguir protocolos estrictos para evitar la diseminación de la enfermedad a partir de un caso índice (Weaver et al., 2000). El manejo de la enfermedad en humanos está basado con el control de roedores tal como sucedió con virus Machupo en Bolivia, donde el control de roedores fue exitoso y se detuvo la infección (Lozano et al., 2017).

1.3.7 Tratamiento

El tratamiento es sintomático y consiste en la hidratación, electrolitos y corregir el desbalance osmótico de los pacientes. Las manifestaciones hemorrágicas se mejoran mediante el uso de factores de coagulación y plasma fresco, pero se debe tener en cuenta que los casos más graves se deben a fragilidad capilar (Ippolito et al., 2012). Aunque la infección por Arenavirus es una enfermedad potencialmente mortal, la mayor parte de los pacientes presentan un cuadro de gravedad moderada, que necesita solamente adecuada hidratación, antipiréticos y antiinflamatorios (Crispin, Zeltina, Zitzmann, & Bowden, 2016; Mahmutovic et al., 2015; Schlie, Strecker, & Garten, 2010).

1.4 Infección por *Orthohantavirus* (Hantavirus).

El orden *Bunyvirales* se estableció en 2017 para agrupar virus relacionados con genomas de ARN segmentados, lineales, monocatenarios, de sentido negativo o ambisentidos distribuidos entre nueve familias (Maes et al., 2018). En la Table 1-5 se puede observar la clasificación del orden *Bunyvirales* hasta género.

Todas estas familias con excepción de los Hantavirus, son arbovirus que tienen ciclos de transmisión silvestre entre hospederos vertebrados silvestres o plantas (tospovirus) y artrópodos hematófagos (Ballinger, Bruenn, Hay, Czechowski, & Taylor, 2014). Los

miembros de cada género difieren por el modo de replicación, otras características moleculares y la carencia de las relaciones antigénicas entre miembros de diferentes géneros (Guzmán, Calderon, Lozano & Mattar, 2017).

Tabla 1- 5 Taxonomía del orden *Bunyvirales* 2018.

Orden	Familia	Género
<i>Bunyvirales</i>	<i>Feraviridae</i>	<i>Orthoferavirus</i>
	<i>Fimoviridae</i>	<i>Emaravirus</i>
	<i>Hantaviridae</i>	<i>Orthohantavirus</i>
	<i>Jonviridae</i>	<i>Orthojonvirus</i>
	<i>Nairoviridae</i>	<i>Orthonairovirus</i>
	<i>Peribunyaviridae</i>	<i>Herbevirus</i>
		<i>Orthobunyavirus</i>
	<i>Phasmaviridae</i>	<i>Orthophasmavirus</i>
	<i>Phenuiviridae</i>	<i>Goukovirus</i>
		<i>Phasivirus</i>
		<i>Phlebovirus</i>
<i>Tenuivirus</i>		
<i>Tospoviridae</i>	<i>Orthotospovirus</i>	

Modificado de (Maes et al., 2018)

Los descubrimientos recientes de *Orthohantavirus* en un amplio espectro de especies hospedadoras han aumentado significativamente la diversidad conocida de *Orthohantavirus* (Laenen et al., 2019). La inferencia filogenética divide a la familia *Hantaviridae* en subclados bien soportados. Estos subgrupos taxonómicos ahora están mejor definidos por la introducción de géneros y subfamilias (Laenen et al., 2019). En la (Tabla 1-6) se encuentra un resumen de la clasificación de la familia *Hantaviridae* en 2019.

Tabla 1- 6 Clasificación de la familia *Hantaviridae* 2019.

Subfamilia	Género	Especies	Huésped
<i>Actantavirinae</i>	<i>Actinivirus</i>	3	Pez con aletas radiadas
<i>Agantavirinae</i>	<i>Agnathovirus</i>	1	pez sin mandíbula
<i>Mammantavirinae</i>	<i>Loanvirus</i>	1	Murciélagos
	<i>Mobatvirus</i>	3	Murciélagos o topos

	<i>Orthohantavirus</i>	36	Roedores o musarañas
	<i>Thottimvirus</i>	2	Musarañas
<i>Repantavirinae</i>	<i>Reptillovirus</i>	1	Reptiles

Modificado de (Abudurexiti et al., 2019a).

Los *Orthohantavirus* son patógenos humanos que se encuentran distribuidos en gran parte del mundo y están clasificados por el CDC (Centers for Disease Control and Prevention, E.E.U.U.) como patógenos de categoría C (Centers for Disease Control and Prevention, 2019). El género *Orthohantavirus* (familia *Hantaviridae*) incluye patógenos zoonóticos emergentes que son de gran importancia para la medicina humana y son una carga para la salud pública en todo el mundo (Amaral et al., 2018a). Los *Orthohantavirus* se mantienen en ciclos naturales en roedores que comúnmente son miembros de las subfamilias *Sigmodontinae*, *Arvicolinae*, *Neotominae* y *Murinae* (familia *Cricetidae* y *Muridae*, orden Rodentia) (Parvate et al., 2019).

En Asia y Europa, los *Orthohantavirus* del Viejo Mundo están habitualmente implicados con fiebre hemorrágica con síndrome renal (HFRS) caracterizada por el desarrollo de una enfermedad febril aguda similar a la influenza que puede conducir a manifestaciones hemorrágicas e insuficiencia renal (Parvate et al., 2019). En las Américas, los *Orthohantavirus* del Nuevo Mundo generalmente causan el síndrome cardiopulmonar por Hantavirus (HCPS), una enfermedad respiratoria que inicialmente se presenta con fiebre, dolor de cabeza y mialgia, que puede evolucionar rápidamente a disfunción cardiopulmonar (Amaral et al., 2018a).

1.4.1 Agente infeccioso

Orthohantavirus han sido descritos como partículas esféricas de tamaño heterogéneo, que varían entre 120 nm y 160 nm de diámetro (Battisti et al., 2011). Se ha observado que contienen espículas en su superficie, las cuales presentan una simetría local tetramérica; estas espículas están insertas en una envoltura de bicapa lipídica de entre 5 nm y 7 nm de espesor (Albornoz, Hoffmann, Lozach, & Tischler, 2016; Huisken et al., 2010). Contienen un genoma de ARN de hebra simple y sentido negativo el cual se replica en el citosol y que

comprende tres segmentos: pequeño (S), mediano (M) y grande (L). El segmento S codifica la nucleoproteína viral (N); su tamaño varía entre 1,6 Kb y 2 Kb. En el caso de algunos *Orthohantavirus* puede haber un segundo marco abierto de lectura (ORF) en este segmento que se encuentra en parte superpuesto con el primero el cual codifica una proteína no estructural pequeña (NSs). El segmento M tiene un tamaño aproximado de 3,6 Kb y codifica las glicoproteínas Gn y Gc dentro de un solo ORF, dando origen a un precursor de glicoproteína (GPC). El segmento L posee una longitud aproximada de 6,5 Kb y codifica una ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) (Albornoz et al., 2016). Las glicoproteínas Gn y Gc están ancladas en la membrana viral y son clave para mediar tanto la entrada, como la salida del virus desde la célula huésped, Figura 1-5 (Guzmán et al., 2017).

1.4.2 Mecanismo de replicación

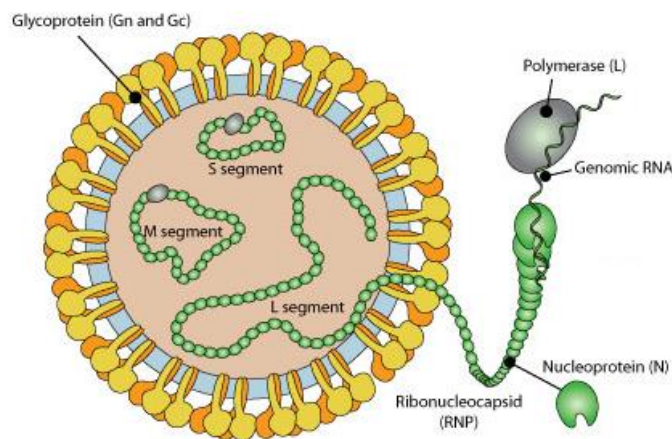
El ciclo de vida de los Hantavirus comienza con la unión del virus a sus receptores celulares. Los Hantavirus utilizan integrinas para ingresar a las células y los Hantavirus patogénicos como el virus Andes (ANDV) dependen, entre otros, de integrina $\beta 3$ como receptor (Matthys, Gorbunova, Gavrillovskaya, & Mackow, 2010). Luego de unirse a la membrana celular, los virus deben ser endocitados por las células. Se ha confirmado que otros virus del orden *Bunyavirales* agrupan receptores en el sitio de contacto, generando un microdominio rico en receptores en la membrana plasmática (Albornoz et al., 2016).

Para la replicación y transcripción de los Hantavirus se produce ARNm y ARN viral de polaridad negativa por acción de RdRp (polimerasa de ARN dependiente de ARN). La hebra de ARN viral de polaridad negativa es transformada en una hebra complementaria de ARN de polaridad positiva, la cual se utiliza como templado para generar hebras de ARN viral de polaridad negativa. Para producir nuevas proteínas virales, se transcribe el ARN viral de polaridad negativa a ARNm lo cual conlleva a la posterior traducción de proteínas virales (Kukkonen, Vaheeri, & Plyusnin, 2005). Posteriormente, debe ocurrir el ensamblaje de las partículas virales, para lo que se requiere el ARN viral más las proteínas N y RdRp, que son envueltos por las glicoproteínas Gn y Gc ancladas a la membrana bicapa (Cifuentes, Salazar, & Tischler, 2014). Una vez que todos los componentes estructurales interactúan entre sí, se produce la gemación del virus, que requiere de una evaginación de la membrana plasmática

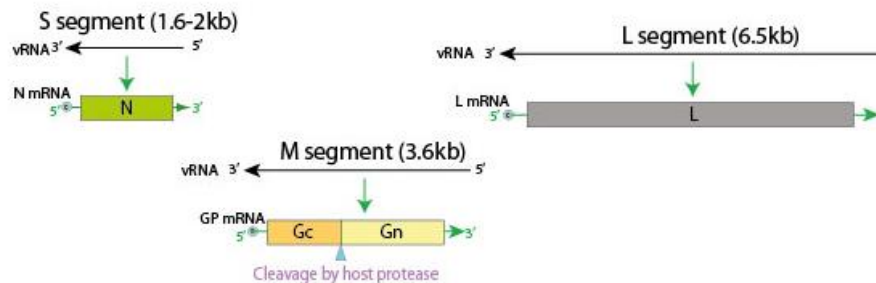
y de una escisión para permitir la separación del virus de esta membrana, lo cual conduce a la liberación de nuevas partículas virales (Cifuentes et al., 2014).

Figura 1- 5 Estructura y genoma de los *Orthohantavirus*.

<https://viralzone.expasy.org/7079>.



Enveloped, spherical. Diameter from 80 to 120nm.



1.4.3 Epidemiología, periodo de incubación y transmisión.

Los Hantavirus se mantienen en la naturaleza por replicación en un huésped vertebrado de tipo roedor y se transmiten por aerosoles. Los hantavirus se eliminan en las excretas de los ratones infectados de forma crónica y asintomática. De las heces del roedor pasa al

hospedero humano por aerosoles producidos durante procesos de limpieza o aspiración de excrementos. El virus puede permanecer en excretas desecadas hasta por dos semanas (Vargas, 2016). Los hantavirus de las Américas tienen como reservorio a roedores silvestres cricétidos (subfamilias *Sigmodontinae*, *Arvicolinae* y *Neotominae*). La infección que establecen en los roedores es persistente y con poca o ninguna sintomatología. La transmisión a los humanos se realiza a través de la inhalación o del contacto de las mucosas con material contaminado con excretas de roedores infectados, ocasionando síndromes febriles que van desde episodios leves hasta cuadros pulmonares severos con manifestaciones hemorrágicas. Los virus actúan en una íntima asociación con la especie de roedor que le sirve de reservorio. Así mismo dado que la distribución del roedor silvestre está restringida a un hábitat específico, cada Hantavirus se limita a una región geográfica específica (Guzmán et al., 2017), con respecto al virus Seoul se presume que su distribución sea mundial considerando la distribución de su reservorio (roedores sinantrópicos del género *Rattus*).

1.4.4 Diagnóstico de laboratorio

El genoma viral de *Orthohantavirus* puede ser detectado mediante métodos de RT-PCR. Los fragmentos S son fácilmente detectados en comparación a los fragmentos L o M. Los *Orthohantavirus* son cultivables en células Vero E6 pero no causan ningún efecto citopático evidenciable, factor que dificulta su identificación sólo mediante el aislamiento viral. Por las dificultades técnicas y riesgo biológico, el aislamiento viral se reserva a laboratorios de referencia con nivel de seguridad BSL-4 (Mattar, Garzón, Tadeu, Faccini, & Mills, 2014).

1.4.5 Prevención

Las especies de roedores que son reservorios de las infecciones por *Hantavirus* están sometidas a la dinámica de población dada por la accesibilidad al alimento, la presencia de depredadores. La epidemia de HCPS que se presentó en EE.UU. ocurrió luego de un periodo de lluvia abundante que permitió la proliferación de pinos, especie vegetal de alimento para los roedores. Las especies de roedores silvestres que hospedan *Orthohantavirus* son de difícil control, exceptuando el virus Seoul cuyo reservorio principal son roedores del género *Rattus*. La presencia de vivienda o actividad humana cerca al hábitat natural de los roedores permite

el contacto humano con el virus y la aparición de brotes epidémicos. Para prevenir la infección por *Orthohantavirus* se debe tener control de roedores, basados en el diseño de despensas y sitios de habitación humana que sean inaccesibles a los roedores (Kruger, Figueiredo, Song, & Klempa, 2015).

1.5 Infección por *Phlebovirus*.

Los Phlebovirus pertenecen a la familia Phenuiviridae, orden Bunyvirales (Maes et al., 2018). La familia se expandió mediante la adición de tres nuevos géneros. El género Kabutovirus, Laulavirus y Wenrivirus como se puede observar en la (Tabla 1-7) (Abudurexiti et al., 2019a).

Tabla 1- 7 Clasificación de la familia *Phenuiviridae* 2019.

Subfamilia	Géneros	
<i>Phenuiviridae</i>	<i>Banyangvirus</i>	<i>Mobuvirus</i>
	<i>Beidivirus</i>	<i>Phasivirus</i>
	<i>Goukovirus</i>	<i>Pidchovirus</i>
	<i>Horwuvirus</i>	<i>Tenuivirus</i>
	<i>Hudivirus</i>	<i>Wenrivirus</i>
	<i>Hudovirus</i>	<i>Wubeivirus</i>
	<i>Kabutovirus</i>	<i>Phlebovirus</i>
	<i>Laulavirus</i>	

Modificado de (Abudurexiti et al., 2019a)

El género *Phlebovirus* comprende 57 virus que se agrupan en complejos de 10 especies como se muestra en la (Tabla 1-8). Miembros del género *Phlebovirus*, incluyen varios patógenos de importancia médica y veterinaria. Se transmiten a través de artrópodos que se alimentan de sangre, como mosquitos, moscas de arena o garrapatas (Ejiri et al., 2018). Los *Phlebovirus* transmitidos por la mosca de la arena se encuentran en Europa, África y las Américas y son responsables de enfermedades febriles e infecciones del sistema nervioso en humanos (Marklewitz et al., 2019a).

Tabla 1- 8 Especies del género *Phlebovirus*.

Género	Especies	
<i>Phlebovirus</i>	<i>Bujaru phlebovirus</i>	<i>Punta Toro phlebovirus</i>
	<i>Candiru phlebovirus</i>	<i>Rift Valley fever phlebovirus</i>
	<i>Chilibre phlebovirus</i>	<i>Salehabad phlebovirus</i>
	<i>Frijoles phlebovirus</i>	<i>Sandfly fever Naples phlebovirus</i>
	<i>Mukawa phlebovirus</i>	<i>Uukuniemi phlebovirus</i>

Modificado de (Abudurexiti et al., 2019)

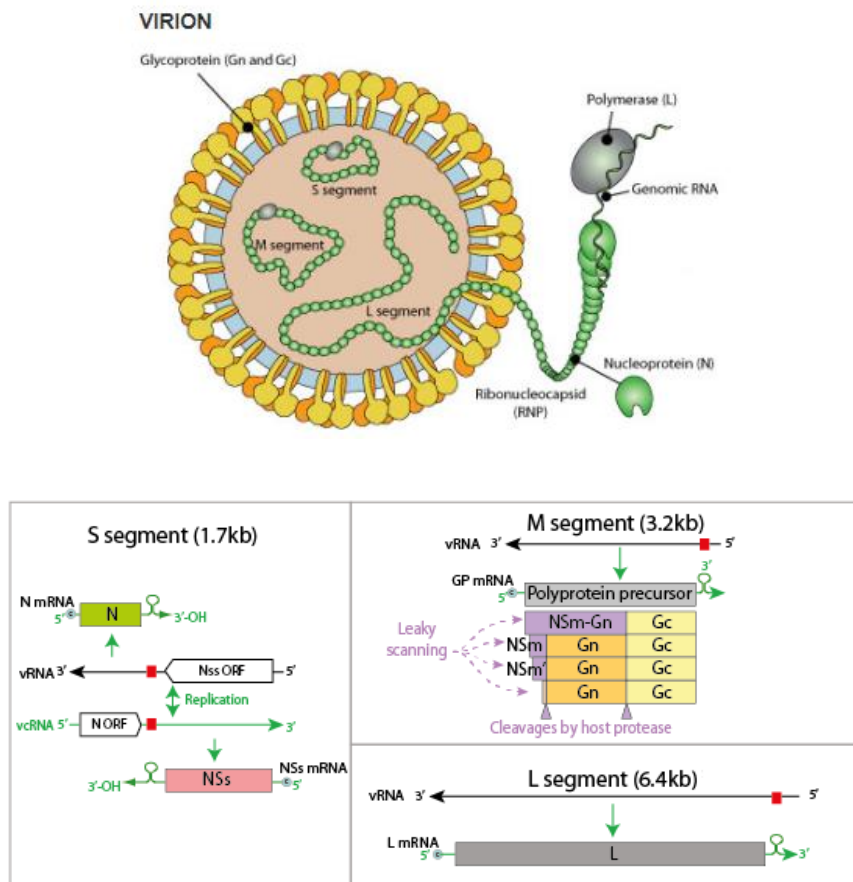
El virus de la fiebre del Valle del Rift (RVF) es uno de los *Phlebovirus* más conocidos, que causa una enfermedad grave transmitida por mosquitos en humanos y rumiantes, los serocomplejos de Nápoles y Toscana son *Phlebovirus* transmitidos por flebotomos que causan enfermedades febriles y enfermedades neuroinvasivas más graves (Alkan et al., 2013). El grupo Uukuniemi está representado por el virus Uukuniemi (UUKV), que se considera el prototipo de los *Phlebovirus* transmitidos por garrapatas (TBPV). Los virus del síndrome de la fiebre severa con Trombocitopenia (SFTS) y virus Heartland se descubrieron en China continental y EE.UU., respectivamente, y se caracterizaron como TBPV novedosos altamente patógenos para los humanos (Briese, Calisher, & Higgs, 2013; Shi, Hu, Deng, & Shen, 2018). Un estudio exhaustivo reciente de la filogenia de los TBPV mostró que se pueden dividir en al menos cuatro grupos distintos: SFTS /*Heartland*, *Bhanja*, *Uukuniemi* y *Kaisodi* (Ejiri et al., 2018; Matsuno et al., 2018) la información de estos nuevos virus que se han identificado solo en las garrapatas es limitada, sus riesgos potenciales de propagación en la población humana no se han entendido completamente (Torii et al., 2019).

1.5.1 Agente infeccioso

Los *Phlebovirus* son virus envueltos, esféricos. El genoma es un ARN monocatenario de sentido negativo. Los 3 segmentos de ARN designados como grande (L), medio (M) y pequeño (S) codifican el ARN polimerasa dependiente de ARN, las glicoproteínas de la envoltura y la nucleoproteína, respectivamente como se muestra en la Figura 1-6. Los segmentos de ARN monocatenario tienen altas tasas de mutación debido a la ausencia del sistema proofreading (que puede corregir una base incorrecta) de la RNA polimerasa, que puede resultar en una deriva genética después de la mutación puntual, mientras que los 3 segmentos del genoma están involucrados en la reordenación/recombinación, lo que lleva a la generación de nuevos virus (Yadav et al., 2019).

Figura 1- 6 Estructura y genoma del género *Phlebovirus*.

<https://viralzone.expasy.org/252>.



1.5.2 Mecanismo de replicación.

La replicación se da a nivel citoplasmático, donde el virus se une a los receptores del huésped a través del dímero de glucoproteína Gn-Gc, y se endocita en vesículas en la célula huésped, luego la fusión de la membrana del virus con la membrana de la vesícula; los segmentos de la ribonucleocapside se liberan en el citoplasma puesto que los ARNm virales están limitados en el citoplasma. En la mayoría de los *Phlebovirus*, la replicación comienza cuando hay suficiente nucleoproteína presente para encapsidar los genomas no sintetizados. Los *Phlebovirus* utilizan sus proteínas de envoltura, Gn y Gc, para la entrada en células diana y para el ensamblaje de partículas de progenie en células infectadas. Por lo tanto, la unión de Gn y Gc a los factores de la superficie celular promueve la unión viral, la captación en las células, y la exposición a pH endosomal bajo induce la fusión de las membranas viral y vesicular impulsada por Gc (Spiegel, Plegge, & Pöhlmann, 2016).

1.5.3 Epidemiología y transmisión.

El panorama epidemiológico actual de los *Phlebovirus* transmitidos por vectores como las garrapatas es complicado, ya que los estudios de patógenos conocidos y nuevos en las garrapatas, así como sus correlaciones entre sí en la naturaleza son limitadas (Torii et al., 2019). La distribución global de los *Phlebovirus* transmitidos por vectores ha sido poco descrita, a excepción de las distribuciones locales de SFTSV y HRTV en sus respectivas áreas geográficas donde son endémicas; a pesar de la distribución mundial de garrapatas en diversas zonas ecológicas, el mecanismo evolutivo subyacente a la aparición de *Phlebovirus* transmitidos por garrapatas (TBPV) patógenos, tales como SFTSV y HRTV, se desconoce (Matsuno et al., 2018).

Los *Phlebovirus* se transmiten por artrópodos hematófagos, como mosquitos, lutzomias y garrapatas (Kukkonen et al., 2005). En consecuencia, debe considerarse la existencia de reservorios adicionales en el mantenimiento del ciclo de los *Phlebovirus*. Solo se han realizado algunos estudios en animales para verificar su papel como reservorios de *Phlebovirus*. En 1984, se aisló el virus Toscana (TOSV) de un murciélago en Italia, mientras que la alta frecuencia de ARN viral y los anticuerpos específicos para TOSV en la población canina en Túnez y Turquía sugieren que los perros pueden actuar como

reservorios TOSV, sin embargo, esto merece una mayor exploración en otras áreas geográficas y mediante estudios experimentales. Los anticuerpos TOSV también fueron revelados en Caballos, gatos, perros, ovejas, cerdos, vacas y cabras en España y en perros que viven en Córcega y Argelia (Moriconi et al., 2017).

1.5.4 Diagnóstico de laboratorio.

El aislamiento de los *Phlebovirus* transmitidos se realiza a través de la inoculación de ratones lactantes o células susceptibles (por ejemplo, Células Vero) con sueros o sobrenadantes de homogeneizados derivados de tejidos de individuos infectados o de pools de mosquitos.

El advenimiento de las tecnologías moleculares, como la transcripción inversa (RT-PCR), ofrece una alternativa eficiente en tiempo, con respecto a los métodos serológicos tradicionales para la identificación de virus aislados. Adicionalmente, la aplicación de RT-PCR para detectar un grupo de virus de interés, seguido por la secuenciación de nucleótidos para la confirmación de resultados y la especiación de virus ha demostrado ser una poderosa herramienta para identificación de virus emergentes (Lambert & Lanciotti, 2009).

1.5.5 Prevención

Los repelentes e insecticidas son las principales opciones para reducir la propagación de enfermedades transmitidas por moscas de la arena (Alkan et al., 2013). La prevención se basa en la utilización de medidas que minimicen el riesgo de exposición a posibles vectores como mosquitos y garrapatas en zonas de riesgo, entre ellas, las más adecuadas son el uso de repelentes, ropa adecuada que cubran la mayor superficie corporal posible, medias, botas de campo, evitar salidas al exterior en las horas de la tarde, utilizar mosquiteros para dormir y telas metálicas en puertas y ventanas (Acevedo & Arrivillaga, 2008).

1.6 Infección por *Orthobunyavirus*.

El género *Orthobunyavirus* pertenece a la familia *Peribunyaviridae* que incluye virus transmitidos por artrópodos compuestos por 95 especies virales y clasificados en cuatro géneros como lo muestra la Tabla 1-9 (Abudurexiti et al., 2019a; Tauro et al., 2019). Esta familia es la más grande y diversa de los virus RNA. Comprende más de 400 aislamientos nombrados, agrupados en múltiples géneros (Golender et al., 2018).

Tabla 1- 9 Clasificación de la familia *Peribunyaviridae* 2019.

Subfamilia	Género
<i>Peribunyaviridae</i>	<i>Herbivirus</i>
	<i>Orthobunyavirus</i>
	<i>Pacuvirus</i>
	<i>Shangavirus</i>

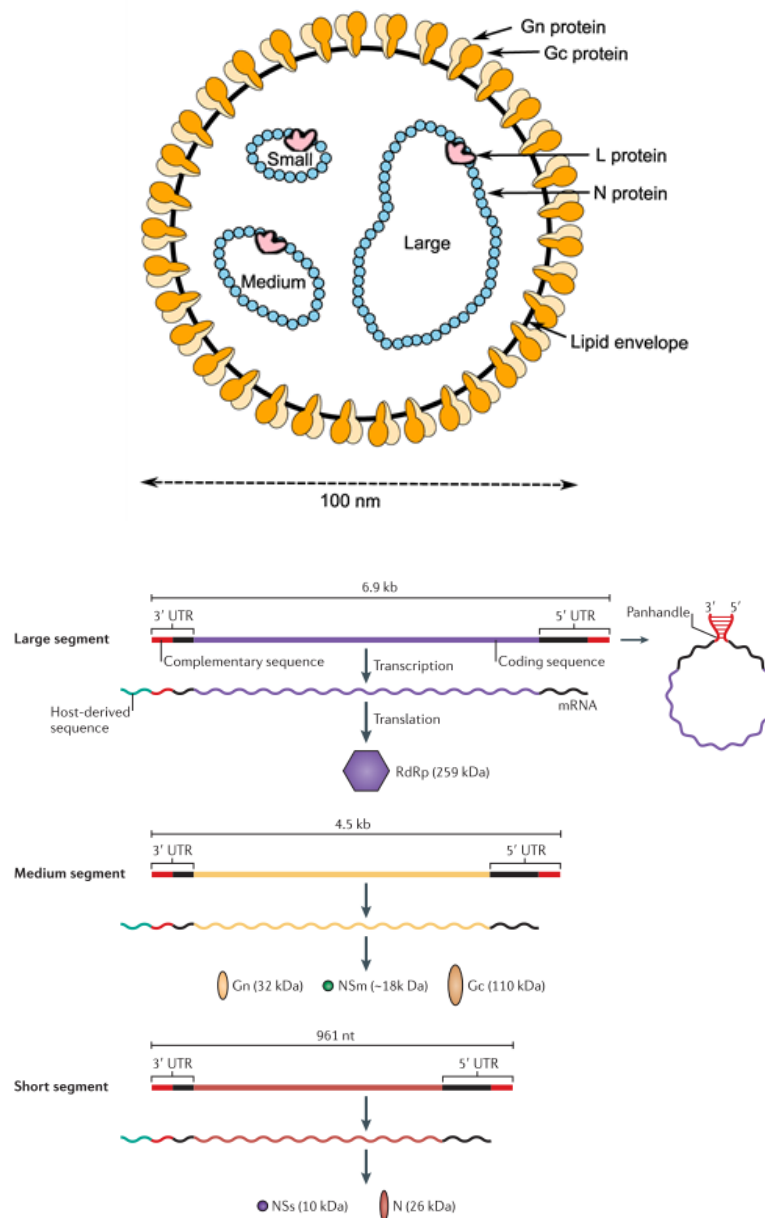
Modificado de (Abudurexiti et al., 2019b)

El género *Orthobunyavirus* está compuesto por una amplia gama de virus, incluidos algunos que causan enfermedades humanas y veterinarias (Elliott, 2014). Hay más de 170 virus nombrados en el género *Orthobunyavirus*, que se agrupan en 18 serogrupos sobre la base de la relación serológica, según lo determinado por la fijación del complemento, la neutralización y los ensayos de inhibición de la hemaglutinación (Elliott, 2014; Tauro et al., 2019). Pocos de estos virus se han estudiado a nivel molecular, y gran parte de lo que se sabe sobre la biología molecular del virus del *Orthobunya* se basa en el estudio de solo unos pocos virus, predominantemente *Bunyamwera* virus BUNV (que es el prototipo tanto del género como de la familia) y *La Crosse* virus LACV. Sin embargo, está claro que existe una gran diversidad entre los virus *Orthobunya* (Hughes, Lanciotti, Blair, & Lambert, 2017).

Los viriones de *Orthobunyavirus* son relativamente simples en su composición general y comprenden solo cuatro proteínas estructurales: dos glicoproteínas de superficie, denominadas Gn y Gc, y dos proteínas internas, la proteína N (nucleocápside) y la proteína L (la ARN polimerasa dependiente de ARN viral (RdRp)). Los tres segmentos de ARN genómico están encapsidados por la proteína N para formar complejos de ribonucleoproteína (RNP) que se asocian con el RdRp y están contenidos dentro de la envoltura lipídica de la

partícula, Figura 1-7 (Elliott, 2014; Hughes et al., 2020). Los viriones tienen un diámetro promedio de 108 ± 8 nm y aunque son pleomórficos, tienen una red ordenada localmente de espigas de glicoproteína que sobresalen 18 nm de la membrana. Se predice que los picos comprenden trímeros de heterodímeros Gn-Gc y forman una disposición única similar a un trípode en la superficie del virus (Elliott, 2014).

Figura 1- 7 Estructura y genoma de los *Orthobunyavirus*.



1.6.1 Mecanismo de replicación, patógenia y respuesta inmune.

La entrada celular implica interacciones entre las glicoproteínas Gn y/o Gc y los receptores de la superficie celular; estos receptores son desconocidos, aunque se ha informado que DC-SIGN promueve la entrada de los *Orthobunya* (Elliott, 2014; Lozach et al., 2011). Aunque DC-SIGN se expresa mucho en las células dendríticas dérmicas y es un buen candidato para la entrada después de la transmisión por una mordida de artrópodo, es probable que otros receptores estén involucrados, ya que estos virus infectan una amplia gama de tejidos. Los estudios con virus Oropouche (OROV) y virus LaCrosse (LACV) han demostrado que es probable que se produzca la entrada por endocitosis mediada por clatrina (Santos et al., 2008). Además, la entrada de LACV depende de Rab5 pero no de Rab7 (Rab5 y Rab7 son GTPasas que son reguladores clave para el transporte de vesículas endocíticas a endosomas tempranos y tardíos, respectivamente), lo que indica que se requiere el tráfico a endosomas tempranos para la eliminación del recubrimiento (Elliott, 2014). Después de la liberación de las ribonucleoproteína (RNPs) en el citoplasma, el primer evento es la transcripción primaria, que implica la síntesis dependiente de cebadores de ARNm virales y da como resultado ARNm que contienen 12-18 nucleótidos derivados del huésped en sus extremos 5'. Aunque esta secuencia es generalmente heterogénea, se ha observado una preferencia por cierto motivo en la unión del cebador y el ARNm viral, por lo que los nucleótidos en el extremo 3' del cebador eliminado son similares a los del extremo 5' del ARN viral. Se ha sugerido que, después de la transcripción inicial de dos o tres nucleótidos, el ARNm naciente podría realinearse hacia atrás en la plantilla como consecuencia de la repetición de la secuencia terminal, antes de que se reanude el alargamiento, lo que resulta en una reiteración parcial de la secuencia 5' (Elliott, 2014). Los ARNm de *Orthobunyavirus* no tienen tractos de poli (A) detectables en sus extremos 3', y no hay un tracto rico en U (que se usa para señalar la poliadenilación por otros virus de sentido negativo) en el genoma. Los extremos 3' de los ARNm virales tienen el potencial de formar estructuras en tallo-bucle que pueden estar involucradas en la promoción de una traducción eficiente de manera independiente de la proteína de unión a poli (A) (Elliott, 2014). El mapeo detallado de la terminación de la transcripción del segmento S de BUNV muestra que la secuencia de pentanucleótidos 5'-UGUCG-3' señala la terminación. Aunque esta secuencia está presente en el segmento BUNV L y en los segmentos S de algunos otros virus *Orthobunya*, no ocurre en el segmento BUNV M, lo que indica que las señales de terminación de la transcripción no están universalmente conservadas (Elliott, 2014).

Las glicoproteínas virales Gn y Gc están dirigidas y se acumulan en el complejo de Golgi, donde se produce el ensamblaje viral. Las RNPs virales se transportan a regiones de la membrana de Golgi que han sido modificadas por la inserción de las glicoproteínas, lo que promueve la gemación en vesículas derivadas de Golgi. Las vesículas de Golgi que contienen partículas virales son transportadas a la superficie celular y la fusión de las membranas vesiculares con la membrana plasmática conduce a la liberación de viriones infecciosos, que pueden ser facilitados por los filamentos de actina. Las partículas virales nacientes se liberan posteriormente de la célula (Elliott, 2014).

La infección se inicia por la picadura de un artrópodo infectado y el virus se propaga al músculo estriado, donde se produce una replicación extensa, lo que resulta en una alta viremia. Luego, el virus se propaga a la mayoría de los órganos del cuerpo y puede cruzar la barrera hematoencefálica, donde se dirige a las neuronas; la infección del sistema nervioso central (SNC) está relacionada con la edad y los animales juveniles parecen ser más susceptibles que los adultos. Sin embargo, los estudios de ratones infectados con LACV han demostrado que el virus sigue siendo neurovirulento (es decir, causa una infección letal después de la inoculación intracraneal directa) (Bennett, Ton, Hanson, Murphy, & Whitehead, 2007). El período de incubación de los *Orthobunyavirus* en humanos suele ser de 3 a 8 días, seguido de la aparición repentina de fiebre, dolor de cabeza, dolores musculares y articulares, que en ocasiones se acompañan de náuseas y erupción cutánea. Los síntomas generalmente duran alrededor de 1 semana, y puede aparecer un segundo episodio de fiebre 1 o 2 semanas después (particularmente con la infección por OROV). Aunque la mayoría de los pacientes se recuperan sin secuelas duraderas, las infecciones graves por LACV pueden provocar convulsiones que pueden durar hasta 1 año. Además, se han informado algunas muertes debido a la infección por LACV (Romero-Alvarez & Escobar, 2018).

La respuesta de IFN es extremadamente poderosa para controlar la replicación del virus y, en las células que han sido tratadas previamente con IFN (para inducir el estado antiviral), la replicación del virus *Orthobunya* está restringida, pero la adición de IFN después de que se establece la infección tiene poco efecto sobre la replicación del virus. En las células de mamíferos, las proteínas NS de BUNV, LACV inhiben la inducción de IFN, y esto ocurre corriente abajo de la activación del factor de transcripción (Elliott, 2014).

1.6.2 Epidemiología y transmisión.

La mayoría de los Orthobunya se replican en vertebrados y artrópodos y generalmente son citopáticos en vertebrados, pero no en invertebrados. Otros se describen como virus específicos de artrópodos que no pueden replicarse en vertebrados. Los Orthobunya son ecológicamente diversos y se han encontrado en todos los continentes, excepto en la Antártida; aunque estos se distribuyen en todo el mundo parecen tener mayor diversidad y prevalencia en regiones tropicales y subtropicales (Marklewitz et al., 2013). La mayoría de los *Orthobunyavirus* se transmiten a través de mosquitos (*Aedes spp*) o moscas culicoides, aunque algunos otros vectores como garrapatas. En general, solo una o muy pocas especies de artrópodos son competentes para transmitir un virus Orthobunya particular, y se observa una preferencia estricta de vectores incluso en regiones donde coexisten diferentes virus y vectores. Los mosquitos hembras adquieren el virus cuando se alimentan de un huésped infectado, y los mosquitos infectados muestran poca sintomatología (Ciota, 2019). Los mosquitos se infectan de forma persistente y sistémica y, en algunos casos, se ha informado de una transmisión vertical (es decir, transovarial) a la descendencia. La transmisión transovárica es un mecanismo importante para el mantenimiento de algunos virus (como el LACV) durante los meses de invierno y puede provocar mosquitos machos infectados que transfieren el virus a las hembras durante el apareamiento. La naturaleza suave de la infección es claramente ventajosa para la transmisión de mosquitos, y tanto la transmisión horizontal y vertical entre mosquitos elimina la necesidad de un huésped vertebrado, lo que sugiere que los virus ortobunya podrían haber evolucionado inicialmente como virus de solo insectos (Elliott, 2014).

1.6.3 Diagnóstico de laboratorio

La confirmación del diagnóstico se basa principalmente en ensayos serológicos comerciales no disponibles. El diagnóstico clínico de la fiebre OROV es difícil porque la enfermedad se manifiesta con síntomas similares a otras infecciones que circulan en las áreas endémicas, como el dengue, el chikungunya, el Zika, la fiebre amarilla y la malaria. Los análisis de sangre de laboratorio de rutina no son particularmente útiles, mientras que la leucopenia informada ocasionalmente y los niveles ligeramente elevados de transaminasas hepáticas no son específicos para la infección por OROV (Romero-Alvarez & Escobar, 2018). La combinación

de síntomas compatibles más una muestra de suero positiva de IgM detectado con un ensayo inmunoenzimático (ELISA) debe considerarse positivo para una fiebre aguda de Oropouche hasta que se pueda establecer la detección del virus. El diagnóstico inmunológico, sin embargo, depende de un suero recogido oportunamente, muestreado dentro de una ventana de tiempo de cinco días después del inicio de síntomas, para detectar anticuerpos durante los niveles virémicos más altos. Otras pruebas inmunológicas incluyen ELISA IgG, inmunofluorescencia, inhibición de la hemaglutinación, neutralización, y pruebas de fijación del complemento (Romero-Alvarez & Escobar, 2018). Las técnicas moleculares, como la RT-PCR anidada, se han aplicado con éxito como herramientas para el diagnóstico rápido y específico de la infección por OROV. Recientemente, la tecnología de secuenciación de nueva generación (NGS) se ha sugerido como una herramienta de diagnóstico útil en aislados clínicos (muestras de suero de fase aguda) con secuencias genómicas novedosas suficientemente diferentes de los datos publicados cuando se demuestra que los métodos de amplificación convencionales basados en secuencias conocidas puede ser ineficaces. Últimamente, se evaluó una RT-qPCR multiplex precisa y altamente sensible en un solo paso para la detección de OROV en sobrenadantes celulares y tejidos de ratón (Naveca et al., 2017; Romero-Alvarez & Escobar, 2018).

1.6.4 Prevención

Las estrategias de prevención se basan en medidas de control o erradicación de los vectores de artrópodos y medidas de protección personal. Las medidas de control de vectores dependen de la reducción las poblaciones de mosquitos a través de la erradicación de los sitios de reproducción, mediante la aplicación de buenas prácticas agrícolas. Las medidas de protección personal se basan en la prevención de la picadura de mosquitos utilizando barreras mecánicas (mosquiteros), dispositivos repelentes de insectos (trampas de luz de insectos), ropa tratada con repelente y lociones antimosquitos, aunque estos últimos han sido incriminados por alergias y / o reacciones dermatológicas (Romero-Alvarez & Escobar, 2018).

Los insecticidas químicos como la deltametrina y la N, N-dietil-meta-toluamida (DEET) han demostrado efectos insecticidas muy suficientes contra las especies de Culicoides. Sin embargo, las consecuencias ecológicas del uso de insecticidas a gran escala son motivo de

especial preocupación. Alternativamente, se han propuesto varios compuestos naturales (piretrinas, picaridina, azadiractina) y aceites esenciales derivados de plantas (eucalipto, levanter, geraniol) como repelentes. La erradicación completa y permanente de los vectores de artrópodos es complicada, considerando la abundancia de las poblaciones de culicoides. La educación de las poblaciones humanas en regiones endémicas (Ej., Granjeros, criadores de ganado, trabajadores forestales, amas de casa, alumnos / estudiantes, turistas) sobre las estaciones de alto riesgo de exposición, las posibles implicaciones en la salud humana debido a la mordedura de mosquitos y protección personal, contribuye significativamente a la prevención de la fiebre OROV, ya que no existe una vacuna en humanos (Sakkas, Bozidis, Franks, & Papadopoulou, 2018).

1.7 Mamíferos y su importancia como reservorios zoonóticos.

1.7.1 Murciélagos

Los murciélagos, están incluidos dentro del orden quiróptera que significa "mano alada" (del griego: cheiros= mano y pteron= ala). Los antepasados remotos datan del eoceno, cuando se adaptaron a un hábitat ecológico similar al diurno para aprovechar otras oportunidades. Es probable que se originaran de pequeños mamíferos nocturnos no voladores cuya alimentación eran insectos y vivían entre el follaje de los árboles (Subudhi et al., 2019). El costo energético que implicaba trasladarse por vía terrestre motivó la evolución hacia un vuelo activo y originó un mecanismo de caza muy efectivo (Ballesteros & Racero, 2012).

Con más de 1200 especies descritas, constituyen el segundo orden más abundante de los mamíferos placentarios, el cuerpo está cubierto de pelos y regulan la temperatura interna (Karesh et al., 2012). Colombia con 197 especies de murciélagos, ocupa el primer lugar en América y segundo en el mundo en cuanto a la diversidad de quirópteros (Jesús Ballesteros & Racero-Casarrubia, 2012). Es el único grupo de mamíferos voladores, con adaptaciones morfológicas, fisiológicas y ecológicas, lo que le permite ocupar una amplia variedad de hábitats (Rengifo, Calderón, & Aquino, 2013), y así mismo una gran diversidad de hábitos alimentarios (insectívoras, frugívoras, nectarívoras, carnívoros, hematófagos, piscívoros y omnívoros (Jones, Jacobs, Kunz, Wilig, & Racey, 2009; Karesh et al., 2012). Concentran sus

actividades en horas de la noche o crepusculares, hábitos que le han facilitado el desarrollo de la ecolocalización que les permite orientarse incluso en la más completa oscuridad (Eitan et al., 2019). El desconocimiento de la ecología, ha resultado perjudicial para la conservación de la diversidad de los murciélagos, injuriándolos como animales dañinos (Brook & Dobson, 2015).

Los murciélagos son un grupo ecológico importante dentro de cualquier ecosistema, dado que prestan servicios ambientales como controladores de insectos y favoreciendo la regeneración de los bosques, además de participar en la dispersión de semillas (Jones et al., 2009) y en procesos de polinización, como, por ejemplo, *Leptonycteris curasoae* con el agave (*Agave palmeri*, *Agave chrysantha*), del cual se obtiene la tequilla (Jesús Ballesteros & Racero-Casarrubia, 2012). Adicionalmente los murciélagos responden rápidamente a los cambios en el ecosistema por acción antrópica (Flores et al., 2020). Actualmente el 70% de las especies de murciélagos se alimentan de insectos, siendo además los miembros de este gremio trófico los que tienen la más amplia distribución global (Gorbunova, Seluanov, & Kennedy, 2020). La evolución y adaptaciones ecológicas no sólo se demuestran por el número de especies vivientes sino, por los diferentes niveles tróficos que dominan con distintos grados de especialización por su fuente alimenticia (Brook & Dobson, 2015; Jesús Ballesteros & Racero-Casarrubia, 2012).

Los quirópteros se dividen en dos subórdenes: *megachiroptera* y *microchiroptera*. Los *megaquirópteros* son murciélagos frugívoros, nectarívoros y polinívoros. Carecen de ecolocalización a excepción del *Rousettus aegyptiacus* cuyos sonidos son producidos por la lengua (Hanadhita et al., 2019); se ubican en áreas subtropicales y tropicales de Australia, Oceanía, Asia y África. Los *microquirópteros*, constituyen el 17% de la fauna global de los mamíferos, son murciélagos con ecolocalización, cuyos sonidos son originados en la laringe (Flores & Chumacero, 2010), con mayor número de especies insectívoras, aunque especies como *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* y *Diaemus youngi*, se han adaptado como hematófagos (Flores & Chumacero, 2010).

Los murciélagos a pesar de sus enormes servicios ecosistémicos, están recibiendo una atención creciente como posibles reservorios de enfermedades zoonóticas (Luis et al., 2013). Tras su implicación en la rabia transmitida por el murciélago hematófago *Desmodus rotundus* y las encefalitis por *Alfavirus*. Además, en algunas infecciones participan como reservorios o

huéspedes de coronavirus que causan el síndrome agudo respiratorio severo (SARS), síndrome respiratorio del medio Oriente (MERS), los *Paramixovirus Nipah*, *Hendra* y el *Filovirus* del *Ébola*. En los quirópteros frugívoros e insectívoros también se ha encontrado una variedad de patógenos como Dengue, virus de las encefalitis, *Arenavirus*, *Hantavirus*, *Hepacivirus*, *Leptospira*, *Bartonella*, *Leishmania* y *Trypanosoma* entre otros (Mattar & González, 2017)

En términos evolutivos, los murciélagos son mamíferos antiguos y se ha formulado la hipótesis de que los virus que se desarrollaron en murciélagos pueden usar receptores celulares altamente conservados, mejorando así su capacidad de transmitir virus a otros mamíferos (Subudhi et al., 2019). Muchas especies de murciélagos tienen hábitos peridomésticos, como la de habitar en casas y edificios, así como árboles en áreas urbanas densas, lo que lleva al contacto humano frecuente con excrementos de murciélagos (Luis et al., 2013). El contacto entre humanos y murciélagos también está aumentando en las últimas décadas debido a la invasión del hábitat (campo) y al mayor uso de murciélagos como alimentación para los humanos (Luis et al., 2013).

1.7.2 Roedores

Los roedores, son un orden de mamíferos placentarios con aproximadamente 2280 especies actuales; es el orden más numeroso de mamíferos. Pueden hallarse en gran número en todos los continentes salvo la Antártida (Sahley et al., 2015). Los roedores (Order *Rodentia*) son un grupo de comparación adecuado con respecto a los murciélagos, ya que son huéspedes reservorios importantes de una serie de patógenos virales zoonóticos con un impacto significativo en la salud pública (Luis et al., 2013).

La distribución geográfica de los roedores está basada en dos subfamilias; la subfamilia *Murinae* del viejo mundo, y la subfamilia *Sigmodontinae* del nuevo mundo. Existe una gran diversidad entre los *Sigmodontinae*, con aproximadamente 540 especies y 84 géneros distribuidos en todo el continente americano (Jonsson, Figueiredo, & Vapalahti, 2010). Esto hace que esta subfamilia sea el mamífero más diverso en el Nuevo Mundo y el segundo a escala mundial, solo superado por los roedores en el Viejo Mundo, de la subfamilia *Murinae* (D'Elia, Pardiñas, Jayat, & Salazar, 2008). Es un desafío estudiar la dinámica de estos roedores, cuando constantemente se describen nuevas especies. Tres géneros de esta

subfamilia *Sigmodontinae* habitan en América: *Oligoryzomys*, *Sigmodon* y *Oryzomys* (D'Elía, Pardiñas, Jayat, & Salazar-Bravo, 2008).

Sigmodontinae difieren ampliamente en características físicas. En general, son de pequeño tamaño, en comparación con las de otras subfamilias de roedores, que varían de 12 a 400 gramos (Bonvicino, Oliveira, & D'Andrea, 2008). *Sigmodontinae* habitan prácticamente en todos los ecosistemas del continente americano, incluidos desiertos, bosques ecuatoriales y tropicales, pantanos, sabanas y altiplanicies (Bonvicino et al., 2008). Si bien algunos *Sigmodontinae* son muy sensibles a la destrucción del hábitat, otras se adaptan a esta situación. Como se esperaba de tan diversos roedores, también tienen dietas variadas. Algunos son omnívoros y pueden, dependiendo de la disponibilidad, alimentarse tanto de tejidos vegetales como animales. La mayoría de las especies de hábito terrestre son granívoras. Los arbóreos y semifossoriales son generalmente frugívoros y carnívoros, respectivamente (Hancke & Suárez, 2018).

Dentro de la importancia ecológica de la subfamilia *Sigmodontinae* se encuentran muchos roedores que rascan el suelo para la construcción de sus madrigueras, permiten la aireación del suelo e infiltración de agua, lo cual promueve el crecimiento de las plantas, así como introducen materia orgánica al subsuelo haciéndolos más fértiles; también son grandes dispersores de semillas las cuales transportan y almacenan para su posterior consumo. En muchas ocasiones éstas semillas son olvidadas, favoreciendo que muchas de ellas germinen y se desarrollen árboles nuevos (Almendra, González-Cózatl, Engstrom, & Rogers, 2018). También consumen grandes cantidades de insectos que pueden ser considerados nocivos para la agricultura (Bonvicino et al., 2008; D'Elía et al., 2008). La importancia de los roedores también radica en que son consumidos por una gran cantidad de carnívoros, aves de presa y serpientes, siendo en ocasiones fundamentales para la permanencia de varias especies que los consumen; por estas razones es que muchas especies de roedores son consideradas especies clave, ya que promueven una serie de respuestas benéficas para los ecosistemas en los que habitan (Luis et al., 2013).

A pesar que *Sigmondontinae* son roedores de gran importancia para el hombre, se sabe que muchas especies de esta subfamilia son reservorios naturales de agentes etiológicos de varias enfermedades, como Hantavirus. Estos virus causan un síndrome pulmonar y fiebre hemorrágica con síndrome renal (Luis et al., 2013). Los arenavirus (causan, por ejemplo,

Coriomeningitis linfocítica, fiebre de Lassa y fiebres hemorrágicas en América Latina como la fiebre hemorrágica Argentina, Boliviana, Venezolana y Brasilera (Charrel et al., 2003).

Cuando los ambientes naturales de los roedores son intervenidos por el hombre, estos buscan alimento y refugio en depósitos, casas u otros lugares creados por el hombre. De esta manera el hombre prepara las condiciones para estas zoonosis (Figueiredo et al., 2010).

Los roedores también comparten una serie de características con los murciélagos; ambos órdenes taxonómicos son evolutivamente antiguos, diversos e incluyen muchas especies con hábitos peridomésticos y especies que comúnmente expresan letargo (Luis et al., 2013).

Por lo tanto, para conocer la epidemiología y lograr el control de las enfermedades por diferentes virus, es importante comprender la ecología de los reservorios como son los de roedores y los murciélagos.

1.8 Antecedentes en Colombia de *Orthohantavirus*, *Mammarenavirus*, *Orthobunyavirus* y *Phlebovirus* en murciélagos y roedores.

En Colombia el primer estudio de *Orthohantavirus* fue en el año 2004 (Mattar & Parra, 2004), donde informaron la primera evidencia serológica en humanos de circulación de *Orthohantavirus*; los investigadores reportaron una prevalencia de anticuerpos contra *Orthohantavirus* de 13,5 % en trabajadores sanos de áreas rurales de los departamentos de Sucre y Córdoba. Posteriormente, la primera evidencia serológica de *Orthohantavirus* en roedores fue en 2006, (Alemán et al., 2006) reportaron una prevalencia de 2,1 % en 336 roedores capturados en once municipios del departamento de Córdoba. Los porcentajes de resultados seropositivos, específicos por género de roedores, fueron 5,9 % (1 de 17) en *Heteromys sp.*, 8,5 % (4 de 47) en *Oryzomys sp.*, 9,1 % (1 de 11) en *Oligorysomys sp.*, y 50 % (1 de 2) en *Proechimys sp.* (Londoño, Levis, & Rodas, 2011) corroboraron los datos de circulación serológica en humanos y en roedores realizada en tres municipios del Urabá antioqueño. Además, se encontró la primera evidencia genética de estos virus en roedores capturados en el municipio de Necoclí, donde se capturaron 354 roedores en y se encontró una prevalencia de anticuerpos de tipo IgG anti-hantavirus de 4% (15/354). Todos los roedores seropositivos fueron de la especie *Zygodontomys*

cherriei (rata de la caña), lo que corresponde a 14% de resultados seropositivos para la especie (15 de 109 capturados). Once de los 15 *Z. cherriei* seropositivos resultaron positivos por RT-PCR para *Orthohantavirus*.

(Blanco, Arroyo, & Corrales, 2012) evidenciaron por primera vez seropositividad en *Orthohantavirus* encontrados en roedores de la subfamilia *Murinae* en el departamento de Sucre. Encontrando que la seroprevalencia de anticuerpos contra *Orthohantavirus* fue del 8,3 % (12/144 capturas). Los porcentajes de seropositividad específicos por especie variaron entre 6,8 % (3/44, *Zygodontomys brevicauda*) y 50 % (1/2, *Neacomys spinosus*). No encontraron diferencias estadísticas en la seroprevalencia con respecto al área de muestreo, sexo y etapa reproductiva ($p > 0,05$); sin embargo, hubo un mayor número de machos adultos seropositivos. En el 2013 estos mismos investigadores (Blanco, Corrales, & Castellar, 2013) encontraron anticuerpos IgG específicos contra el Virus Sin Nombre (VSN) que fueron detectados en muestras de plasma de roedores mediante ensayo de inmuno absorción ligado a enzimas (ELISA indirecto). Se capturaron 61 roedores distribuidos en tres especies, de las cuales *Mus musculus* fue la más abundante (91.8%). Del total de animales analizados, un único ejemplar, clasificado dentro de la especie *Rattus rattus* (seroprevalencia de 1.64%), resultó positivo a *Orthohantavirus*. Los hallazgos evidenciaron seropositividad a *Orthohantavirus* en roedores de la subfamilia *Murinae* en Colombia. La detección de anticuerpos contra el virus refuerza la hipótesis que sugiere la circulación de al menos un *Orthohantavirus* en roedores del norte colombiano.

En 2013 (Guzmán et al., 2013) probaron sueros de 286 trabajadores agrícolas y 322 roedores en el departamento de Córdoba, noreste de Colombia, para detectar anticuerpos contra dos *Orthohantavirus*. Los sueros se analizaron por ELISA indirecto utilizando el lisado de las células Vero E6 infectadas con el virus Maciel (MACV) o la proteína N del virus Araraquara (ARAV) como antígenos para la detección de anticuerpos contra *Orthohantavirus*. 24 sueros humanos fueron IgG positivos usando uno o ambos antígenos. Se detectaron anticuerpos IgG anti-MACV en 10 sueros (3.5%) y anticuerpos anti-ARAV en 21 sueros (7.34%). De las 10 muestras que dieron positivo para MACV, siete (70%) presentaron reacción cruzada con ARAV; siete de las 21 muestras positivas para ARAV tuvieron reacción cruzada con MACV. Usando un ELISA ARAV IgM, dos de los 24 sueros humanos (8.4%) fueron positivos. Capturaron 322 roedores, todos los sueros de roedores

fueron negativos para ambos antígenos. La tasa de detección del 8,4% de los anticuerpos contra el *Orthohantavirus* en humanos es mucho mayor que la encontrada previamente en encuestas serológicas en América del Norte, lo que sugiere que los trabajadores agrícolas rurales en el noreste de Colombia están frecuentemente expuestos a los *Orthohantavirus*.

Posteriormente, (Mattar, Garzon, Tadeu, Faccini-Martínez, & Mills, 2014) informaron la seroconversión a un *Orthohantavirus* en muestras pareadas de un paciente hospitalizado que presentó síndrome febril inespecífico en Montería, departamento de Córdoba, noroeste de Colombia. Pruebas de agentes endémicos regionales que incluyen *Plasmodium*, *Leptospira*, *Salmonella*, virus del dengue, *Brucella*, *Rickettsia*, virus de inmunodeficiencia humana y los virus de la hepatitis fueron negativos. Debido a que el paciente estaba inscrito en un ensayo clínico para fiebres hemorrágicas realizado por la Universidad de Córdoba, se recolectaron muestras de suero al ingreso y a la salida del paciente. Las pruebas con ELISA del virus Sin Nombre mostraron seroconversión de IgG e IgM entre muestras. El hallazgo eventual de este primer caso clínico de infección por *Orthohantavirus* en Colombia es consistente con la alta prevalencia de anticuerpos contra *Orthohantavirus* en humanos en la región y la probable exposición del paciente a roedores. Al igual en el 2017 (Mattar, Tique, Miranda, Montes, & Garzon, 2017), condujeron un estudio sobre enfermedades febriles indiferenciadas en el departamento de Córdoba, cuyo principal problema es la similitud entre los cuadros clínicos que presentan. En este estudio se llevaron a cabo diagnósticos para Leptospirosis, dengue, Hantavirus, Malaria, Rickettsiosis, Hepatitis A y Brucelosis. Obteniendo como resultado 27 casos positivos de los cuales 4 fueron positivos para *Orthohantavirus*.

Los *Mammarenavirus* son los agentes etiológicos de algunas de las enfermedades emergentes más temidas y de mayor letalidad, tales como la fiebre de Lassa y las fiebres hemorrágicas suramericanas, caracterizadas por daño vascular, renal, hepático y neurológico (Castellar et al., 2017). (Mattar et al., 2011) determinaron la presencia de anticuerpos reactivos contra los virus Guanarito y Pichindé en roedores capturados en el departamento de Córdoba, donde recolectaron 210 roedores *Sigmodontinos* de 3 especies: 181 *Zygodontomys brevicauda*, 28 *Oligoryzomys fulvescens* y 1 *Oecomys concolor*. Once muestras de suero, 10 de *Zygodontomys brevicauda* y 1 de *Oligoryzomys fulvescens*, tenía anticuerpos de Arenavirus detectables. Tres muestras de roedores *Z. brevicauda* tenían anticuerpos reactivos para ambos virus, Pichindé como al virus Guanarito, y 7 más fueron positivos para Pichindé o Guanarito. Estos resultados

demonstraron la presencia de Arenavirus que circulan entre hospedadores de roedores comunes en el Caribe colombiano. (Restrepo et al., 2016) desarrollaron un estudio a la comunidad indígena Embera-Katios y descubrieron que la seropositividad para los anticuerpos IgG contra *Leptospira spp.* Fue 18.1%; el dengue fue 61.1%; para Arenavirus fue de 3.1% y para Hantavirus fue de 1.5%. Concluyendo que esta comunidad indígena vive en condiciones que promueven las infecciones reemergentes y emergentes.

Finalmente, (Castellar et al., 2017) reportaron la primera evidencia de infección por el virus de LCMV (Arenavirus) en roedores *Mus musculus* capturados en áreas urbanas del municipio de Sincelejo, Sucre. Ellos evaluaron 80 muestras de plasma mediante la prueba ELISA usando antígeno del virus de la coriomeningitis linfocítica. Además, emplearon la reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RT-PCR) anidada en muestras de animales seropositivos y seronegativos para la detección del segmento S. encontraron una seroprevalencia de 10% (8/80) y detectaron el genoma viral en 16 muestras de cerebro; el alineamiento con BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y el análisis filogenético confirmaron que correspondía al virus de la coriomeningitis linfocítica.

Por otra parte los arbovirus como *Orthobunyavirus* y *Phlebovirus* están implicados en enfermedades virales emergentes y re-emergentes debido a cambios en los patrones eco-epidemiológicos o fallas en los programas de control (Acevedo & Arrivillaga, 2008).

El género *Orthobunyavirus* responsable de varios síndromes de enfermedades en los humanos, incluida la enfermedad febril aguda pero autolimitada (virus Oropouche (OROV)), la encefalitis (el virus La Crosse (LACV)) y la fiebre hemorrágica (Virus Ngari) (Elliott, 2014).

El virus Oropouche deriva su nombre de la localidad de Vegas de Oropouche, la cual se encuentra en la isla de Trinidad y Tobago, en donde fue detectado en 1955 en un paciente febril y en mosquitos *Coquilletidia venezuelensis*. El virus de Oropouche es prevalente en muchas regiones de América del Sur y del Caribe. En el ciclo silvestre, el virus tiene varios mosquitos vectores: *Culicoides paraensis*, *Coquilletidia venezuelensis* y *Aedes serratus*. Los mamíferos silvestres son picados por estos mosquitos y aumentan las viremias, como en el oso perezoso (*Bradypus tridactylus*), primates (*Aloutta sanguinus*) y roedores entre otros. En el ciclo urbano los vectores *Culicoides paraensis* y *Culex quinquefasciatus*, ambos muy comunes en los ambientes tropicales de Colombia (Mira et al., 2013).

Un estudio por Groot, 1964, llevó a cabo tal vez el mayor estudio de serovigilancia de arbovirus en Colombia entre 1956 y 1962. Él utilizó pruebas de neutralización y estableció en monos y humanos anticuerpos contra Mayaro, Oropuche, Dengue, Ilhleus, Sant Louis, Fiebre Amarilla, Encefalitis Venezolana, Encefalitis del Este, Bussuquara, Guaroa y Mayaro. La mayor actividad para Oropuche fue detectada en monos del corregimiento de La Lizama (Santander) (Groot, 2017). El estudio de Groot marcó un hito en la historia de los virus hemorrágicos en Colombia y demostró que la vigilancia hay que llevarla a cabo de forma activa buscando los virus en los vectores, lo que garantizaría el desarrollo y actualización de la ecoepidemiología en Colombia (Salim Mattar & Marco González, 2015).

Con respecto al estudio del género *Phlebovirus* reside en el incremento de arbovirosis que se creían controladas durante las últimas décadas, así como la aparición de distintas cepas virales en áreas geográficas antes no reportadas. Factores como la incursión humana, perturbaciones en ecosistemas terrestres, la movilidad de la población sin control sanitario y los cambios climáticos han favorecido la aparición de enfermedades arbovirales originadas por *Phlebovirus*, considerando la modificación del hábitat natural, la ecología de los vectores y la ecoepidemiología de la enfermedad que, en el caso de América, consiste básicamente en la deforestación y cambio de uso de la tierra de ambientes terrestresboscosos (Nunes, Weaver, Tesh, & Vasconcelos, 2005).

En Colombia no existen estudios de la búsqueda de *Othobunyavirus* y *Phlebovirus* en roedores y murciélagos, por lo tanto se desconoce el indicio del papel que juegan estos animales en la ecología del agente infeccioso.

Capítulo 2. Objetivos

General

Buscar virus zoonóticos en tejidos de roedores y murciélagos procedentes de algunas áreas del Caribe colombiano.

Específicos

1. Detectar *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus*, *Orthohantavirus* y *Arenavirus* en tejidos de roedores y murciélagos.
2. Establecer las relaciones filogenéticas de virus zoonóticos detectados en roedores y murciélagos de áreas del Caribe colombiano.

3. Capítulo 3. Metodología

3.1 Tipo de estudio, tamaño de la muestra y áreas geográficas.

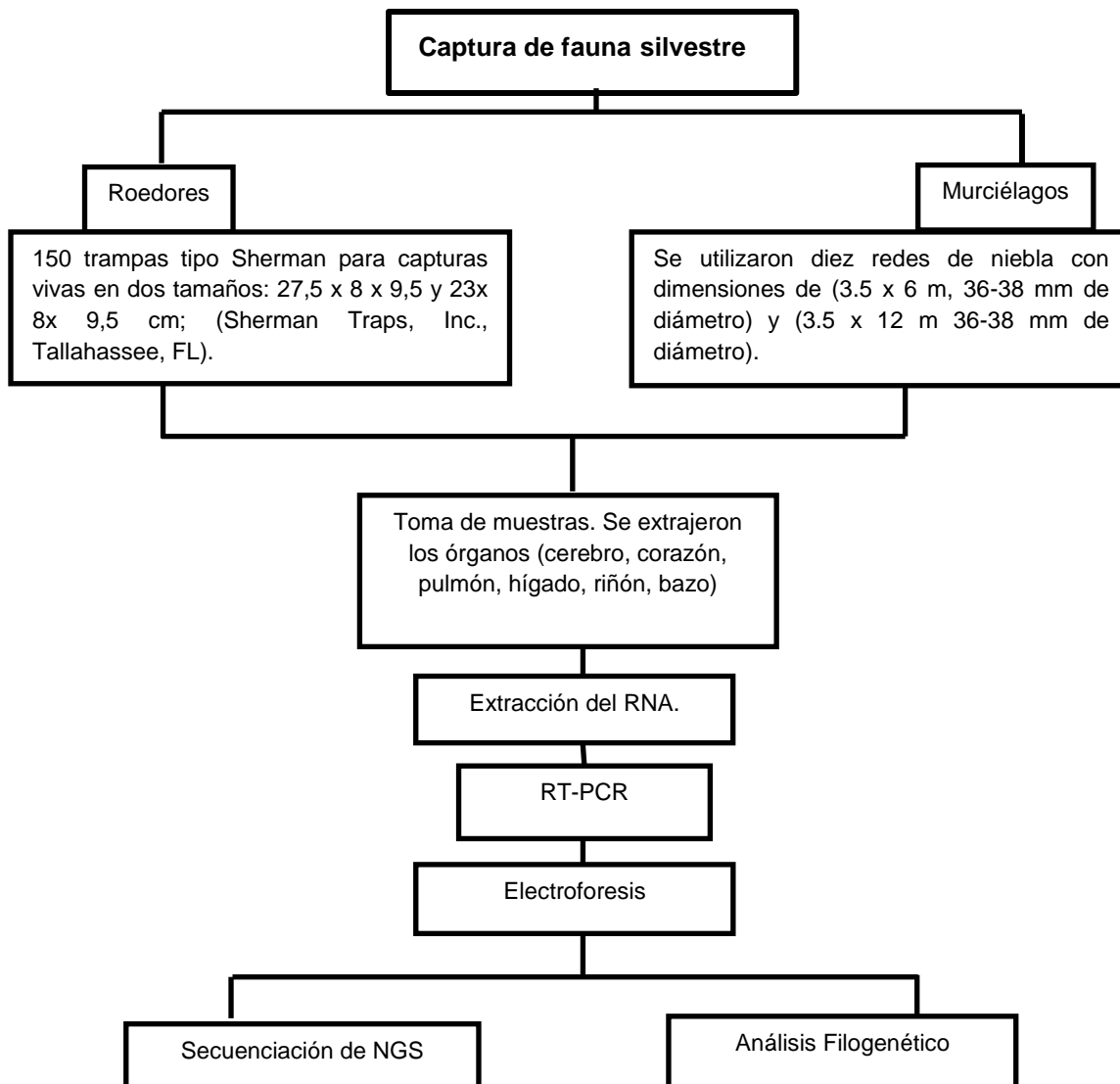
Se realizó un estudio descriptivo retrospectivo de corte transversal en algunas áreas del Caribe Colombiano. En 2016 se capturaron 120 roedores a través de un muestreo no probabilístico en el departamento de Córdoba en los meses de marzo y junio en el municipio de los Córdoba, específicamente a las veredas Contrapunto y Corea, y en el departamento de la Guajira en los meses de agosto y octubre en los municipios de Villanueva y Urumita. Los murciélagos (n=283), se capturaron en 2018 y 2019 en 8 puntos geográficos del departamento de Córdoba en los meses de febrero a octubre en 2018 y 4 puntos en el departamento de Sucre en los meses de enero y abril año 2019. En la Figura 3-1, se observa el esquema general de las estrategias metodológicas que se emplearon para el cumplimiento de los objetivos del presente estudio.

3.2 Aspectos éticos.

Los procedimientos de captura, manipulación, eutanasia e identificación del material biológico fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, de la Universidad de Córdoba. Este proyecto contó con el permiso de la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales, en el marco de recolección de muestras biológicas resolución 0914 fecha 4 de agosto de 2016 para la recolección de especímenes de especies silvestres de la diversidad biológica con fines de investigación científica no comercial, de acuerdo con lo establecido en el Decreto 1376 de 2013 ahora compilado en el Decreto 1076 de 2015. Además para el desarrollo de este trabajo se conoce la declaración universal de los derechos de los animales proclamada por la liga internacional de los derechos del animal, Ginebra, Suiza (UNESCO, 1989), la guía para el cuidado y uso

de animales de laboratorio (NRC, 1996) y los principios éticos de la experimentación animal enunciados por ICLAS, Internacional Council for Laboratory Animal Science.

Figura 3- 1 Esquema general metodológico del estudio.



3.3. Área geográfica de los roedores.

En 2016 se capturaron roedores en las localidades de Corea (08° 51.166'N 76° 20.296'W) y Contrapunto (08° 44.264'N 75° 58.710'W) pertenecientes al municipio de Los Córdoba en el departamento de Córdoba. Las localidades de Corea y contrapunto se caracterizan por estar cubiertas de vegetación densa de bosque seco tropical. Estas zonas boscosas han sido modificadas y fragmentadas por la actividad humana, siendo el cultivo de maíz, arroz, frutos tropicales y cítricos la actividad económica principal en estas localidades.

Los municipios de Urumita y Villanueva en el departamento de La Guajira (coordenadas 10° 35.563'N 73° 02.261'W y 10°39.876'N 58° .689'W respectivamente), presentan zona de remanentes boscosas, siendo la agricultura principalmente el café y ganadería las actividades principales. La media anual de temperatura es de 29°C y puede variar desde 39°C en el mes de enero hasta 27°C durante el mes de octubre, el cual está comprendido dentro de la época de lluvias. Se escogieron estos municipios de La Guajira por su cercanía con la frontera venezolana, las migraciones y porque existen registros históricos en esa área de hace más de 60 años sobre la captura de Sigmondontinos principales reservorios de *Orthohantavirus* y *Mammarenavirus*.

3.4. Área geográfica de los murciélagos.

En 2018 y 2019 se escogieron 12 sitios de muestreos, 8 en Córdoba, en la subregión del Alto Sinú en cuatro municipios (Buenavista, Momil; ayapel y Tierralta); (coordenadas 8°16'32"N -75°24'55"W; 9°03'44,6"N 9°03'44,6"W; 8°17'53,8"N -75°9'20,6"W y 8°03'43,9" -76°9'35,9"W respectivamente) Medio Sinú 2 municipios (Montería y San Carlos) (coordenadas 8°34'9"N -75°43'6"W y 8°44'40,7"N -75°39'00,9"W respectivamente) en la subregión Costanera dos municipios (Puerto escondido y Canalete) (coordenadas 9°03'46,9"N -76°11'35,8"W y 8°47'26,1"N -76°14'16"W respectivamente); y en Sucre cuatro sitios de captura, en la subregión Montes de María (Colosó y Sincelajo) (coordenadas 9°29'59,2"N-75°20'54,3"W y 9°19'21,9"N -75°26'22,9"W respectivamente) , en la subregión del río de La Mojana (Majagual 8°32'35,7"N-74°34'31,7"W), y en la subregión del río San Jorge (San Marcos 8°42'57,5"N-75°16'10,0"W).

3.5 Captura de roedores.

La captura de roedores se realizó con 150 trampas tipo Sherman para capturas vivas en dos tamaños: 27,5 x 8 x 9,5 y 23x 8x 9,5 cm; (Sherman Traps, Inc., Tallahassee, FL).

Las capturas se realizaron durante tres o cuatro días por cada mes. Las trampas fueron colocadas por transecto en la tarde, a una distancia entre ellas, de no menos de 100 metros y revisadas al día siguiente antes de las 7:00 AM para evitar sobrecalentamiento de los individuos capturados. Cada animal fue retirado de la trampa y transferido a una bolsa tipo Ziploc® que contenía el anestésico acetilpromacina-ketamina (0.02mg/kg-0.05mg/kg); esto con el fin de evitar la inhalación del anestésico por parte de los manipuladores y la fuga de los roedores durante el procedimiento. Para la realización de este procedimiento se tuvieron en cuenta todas las normas de bioseguridad establecidas para estos casos (Mills, Childs, Ksiazek, & Peters, 1998). Para la captura de roedores silvestres fueron colocadas alrededor de 100 trampas separadas por una distancia no mayor a 5 metros en forma radial, utilizando como cebo avena humedecida con vainilla y banano. En áreas peridomésticas fueron colocadas trampas en zonas residenciales previamente definidas como: interior de residencias (urbanas y rurales), áreas circunvecinas y zonas separadas a una distancia no menor de 150 mts de dichas edificaciones. Una vez el roedor se encuentra completamente anestesiado, estos fueron identificados taxonómicamente usando claves taxonómicas (Linares, 1998), los roedores fueron sacrificados con una sobredosis de anestesia, con pentobarbital sódico. Cada uno de los órganos extraídos (riñón, pulmón, bazo, corazón, hígado, cerebro). Los datos poblacionales y morfométricos (sexo, estado reproductivo y presencia de heridas o cicatrices, peso, largo total, largo cola, largo oreja, largo pata derecha fueron registrados como caracteres morfológicos. El estado

reproductivo se determinó con base a características morfológicas. La proporción de heridas se determinó en una escala de 0 a 4, donde 0= no heridas, 1= pequeña herida en la cola; 2= grandes heridas en la cola y pequeñas heridas en región posterior del cuerpo; 3= heridas de 0.25 a 0.5cm de diámetro en el cuerpo y 4= muchas heridas extendidas por todo el cuerpo (Hinson, Shone, Zink, Glass, & Klien, 2004; Mills et al., 1998).

3.6 Captura de murciélagos.

Diez redes de niebla (6mX2m) por cada sitio de muestreo durante seis noches, instaladas durante cuatro horas de muestreo que correspondió a 240 horas/red y un área de captura de 360 metros cuadrados y se colocaron en fuentes de agua, bosques, corrales de ganado, las cuales se revisaron cada quince minutos (min) con el fin de verificar la captura de los murciélagos y la integridad de las mallas de acuerdo a los protocolos de investigación del CDC (Mills et al., 1998). Estos inicialmente fueron premedicados con asociación de acetilpromacina-ketamina (0.02mg/kg-0.05mg/kg) vía intramuscular para obtener sedación y facilitar la identificación mediante claves taxonómicas dicotómicas (Linares, 1998) y datos morfométricos estándares como: longitud total (LT), longitud de la cola (LC), longitud de la pata (LP), longitud de la oreja (LO), longitud del antebrazo (LAnt), coloración de los individuos y peso necesarios para una mejor identificación. Igualmente, datos biológicos como sexo, estado reproductivo, edad relativa, peso y presencia de ectoparásitos, que fueron consignados en una hoja de campo. Se aplicó la eutanasia con una sobredosis de pentobarbital sódico a una dosis total de 0.2 ml, con el fin de evitar el sufrimiento animal (eutanasia farmacológica). Se implementó la disección en campo, asegurando condiciones de asepsia según protocolos (Mills et al., 1998).

3.7 Toma de las muestras de roedores y murciélagos.

La disección se realizó en sitio de procesamiento en el campo donde se extrajeron cerebro, corazón, pulmón, hígado, riñón y bazo; una vez extraídos se fraccionaron en porciones pequeñas (50 - 100 mg) que se depositaron por triplicado en tubos estériles (crioviales) previamente identificados; el primer tubo se conservó con 600µl de Trizol™, el segundo criovial con 600µl de RNA later (RNA_later™ Stabilization Solution- Invitrogen- Waltham, MA), y el tercer tubo sin ningún preservante; que se usó como copia de seguridad. Todos los crioviales se sumergieron en tanques con nitrógeno líquido (-196oC) para criopreservación, almacenaje y transporte de las muestras (Chart INC, Canton, GA); una vez en el laboratorio del Instituto de Investigaciones Biológicas del Trópico (IIBT) se preservaron en ultra-congeladores a -80°C (Thermo Scientific, Waltham, MA).

3.8 Medidas de bioseguridad.

Todo el personal involucrado en la captura de los murciélagos fue vacunado contra el virus de la rabia antes de iniciar el muestreo (esquema pre-exposición). Igualmente se utilizaron vestidos desechables, guantes, gafas de bioseguridad, mascarillas desechables N95 y se trató de asegurar condiciones de esterilidad. No se permitió la presencia de persona extrañas o animales, el personal que no usó elementos de bioseguridad permaneció en dirección contraria al viento y al menos a 10 metros del área de disección. Siempre se usó material estéril. Al final de la jornada de trabajo, los residuos biológicos fueron descartados en bolsas rojas para manejo de material biológico contaminante e incinerados.

3.9 Métodos moleculares para la detección de virus zoonóticos.

Extracción del ARN.

Para la extracción del ARN, se tomaron las 1.698 alícuotas de tejidos de murciélagos y 720 alícuotas de tejidos de roedores preservadas en 600µl de Trizol™ a -80°C; las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y se adicionaron 400µl de Trizol™ a 100 mg de tejido. Luego se homogenizaron con la ayuda de un disruptor (Pellet pestles cordless motor, referencia Z359971 SIGMA), durante 3 min. Posterior a la homogenización las muestras se conservaron en hielo, para continuar con la separación de fases, y se adicionaron 200 µl de cloroformo por 1000 µl de Trizol™ se tapó y se agitó el tubo vigorosamente durante 15 segundos. Se incubó durante 2 a 3 minutos a temperatura ambiente. Las muestras fueron centrifugadas a 12.000 g durante 15 min a 4°C. La fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo. Para la precipitación del ARN, se agregaron 500 µl de 100% isopropanol, por cada 1000 µl de Trizol™ como coadyuvante del agente caotropico. Se incubó en hielo 10 min y se centrifugó a 12.000 g 10 min a 4°C, el sobrenadante se eliminó y se conservó el precipitado. Este último se lavó con 1mL de etanol al 75% por cada ml de Trizol™ usado en la homogeneización y se aplicó un vortex, luego se centrifugó a 7500 g durante 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se secó el precipitado durante 5 a 10 min dejando los tubos en la cabina de seguridad; no se permitió que el ARN se secase por completo, dado que el precipitado puede perder solubilidad.

El ARN fue disuelto en un volumen de 100 µl de agua DEPC, precalentada a 65°C, mezclándose suavemente con micropipeta y luego se almacenó a -85°C. Las concentraciones de ARN fueron cuantificadas en términos de rendimiento por órgano, y se

determinó la absorbancia utilizando el NanoDrop2000™ (Thermo Scientific™), donde se determinó concentración y pureza del ARN.

Síntesis del ADNc

A partir de las muestras de ARN extraídas de los 1,698 tejidos de murciélagos y 720 tejidos roedores, se llevó a cabo una Reacción en cadena de la Polimerasa con Transcriptasa Reversa, esto con el fin de obtener ADNc. Se usó la enzima M-MLV Reverse Transcriptase (Promega M1701), y los iniciadores aleatorios (Random primers Promega C118A). Se realizaron dos mezclas. En un primer tubo de microcentrifuga libre de nucleasas, se adicionó 1 µl random primers, 6 µl de agua libre de nucleasas y 2 µg de RNA (Tabla 3-1).

Tabla 3- 1 Mezcla 1 RT.

RT1	X1
Primer Random	1 µl
Agua	6µl
RNA	2µg
Volumen inicial	15µl

Los diferentes microtubos se calentaron a 65°C durante 5 min. Básicamente se centrifugaron y se añadieron 10 µl de la mezcla (Tabla 3-2). Se mezcló suavemente con la pipeta, se incubó a 25°C por 10 min y 37°C por 50 min. Los ADNc se almacenaron a -20°C. Las concentraciones de ADNc fueron evaluadas en términos de rendimiento por órgano; la cuantificación se realizó usando el NanoDrop2000™, (Thermo Scientific); donde se determinó concentración y pureza del ADNc.

Tabla 3- 2 Mezcla 2 RT.

RT2	X1
5 X Buffer de Reacción M-MLV (Promega)	5µl
dNTPs 10 mM	1,25µl
Recombinant RNasin® Ribonuclease inhibitor (40 units/µl) (Promega)	2µl
Agua libre de nucleasas	0,75µl
M-MLV Reverse Transcriptase (200 unidades/µl) (Promega)	1µl
Volumen final	25µl

Control interno de PCR.

Como control interno, se empleó un par de iniciadores complementarios (Tabla 3-3), se amplificó el gen de la beta-actina como control interno en las 1.698 muestras de murciélagos y 720 muestras en roedores. Las actinas son proteínas altamente conservadas en los vertebrados (Johnston, Zhang, Messina, Lawton, & Dean, 2005). Las condiciones de la PCR se presentan en el anexo A.

Tabla 3- 3 Gen de la beta-actina como control interno.

Gen	Iniciador	Secuencias ((5' → 3')	Tamaño del amplicón
Beta-actina	B-actina3	GGTGCATCTCTGCCTTACAGATC	96
	B-actina4	ACAGCCTGGATAGCAACGTACAT	

Los productos de la amplificación fueron visualizados en gel de agarosa al 1,5% preparado en tampón TBE y 5µl de SYBR-safe, utilizando marcador de peso molecular de 50 pb, se visualizó productos de 96 pb del gen Beta-actina.

Detección por PCR convencional de *Orthohantavirus*.

Para la detección de *Orthohantavirus* en las 720 muestras de roedores y las 1.698 muestras en murciélagos por PCR convencional se utilizaron iniciadores propuestos por (Moreli, Moro De Sousa, & Figueiredo, 2004) con la finalidad de amplificar una región altamente conservada del segmento N del genoma de *Orthohantavirus* de Suramérica que amplifican un producto de 264 pares de bases como lo muestra la (Tabla 3-4).

Tabla 3- 4 Iniciadores para la detección genérica de *Orthohantavirus* por PCR convencional.

Gen	Iniciador	Secuencias (5' → 3')	Tamaño del amplicón
N	SAHN-S(Forward)	GAT GAA TCA TCC TTG AAC CTT AT	264
	SAHN-C(Reverse)	CAA AAC CAG TTG ATC CAA CAG GG	

En la (Tabla 3-5) se muestran las condiciones de los reactivos. Las condiciones del termociclador fueron: 95°C por 2 minutos, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 55°C por 1 minuto, 72°C por 30 segundos, extensión final de 72°C por 5 minutos. El termociclador utilizado para la realización de la PCR, fue un equipo de marca Himedia Prima-96.

Tabla 3- 5 Condiciones de la mezcla de reacción de la PCR convencional para la detección de *Orthohantavirus*.

Reactivos	[] inicial	Volumen de reacción
Buffer	10 x	10µl
MgCl ₂	25 mM	4µl
dNTPs	10 mM	2µl
Taq ADN polimerasa	5 U/mL	0,3µl
SAHN-S(Forward)	100 mM	1µl
SAHN-C(Reverse)	100 mM	1µl
Agua ultra pura	—	28,7µl
DNAc	—	3µl
Volumen final	—	50µl

Los productos de la amplificación fueron visualizados en gel de agarosa al 1,5% preparado en tampón TBE y 5µl de SYBR-safe, utilizando marcador de peso molecular de 25 pb, se visualizó productos de 264 pb, para determinar la presencia de especies del género *Orthohantavirus*, el aparato utilizado para observar los geles fue el Gel-Doc Software Quantity One (Bio Rad). Como control positivo para *Orthohantavirus* se usó ARN proveniente de 4 controles positivos de las cepas Necoclí donados por la universidad de Antioquia y Rio Maporé, Sin Nombre virus fueron donados por el profesor LuisTadeu Moraes Figueiredo del centro de pesquisa en virología de la universidad de São Paulo. La electroforesis de los controles positivos para *Orthohantavirus* se presenta en el anexo B. Como control negativo se utilizó agua ultrapura.

Detección por PCR anidada de *Phlebovirus*.

La detección de *Phlebovirus* en las 1.698 muestras de murciélagos y 720 muestras de roedores se llevó a cabo por una PCR anidada el cual amplificó un fragmento del segmento L que codifica la ARN polimerasa de los *Phlebovirus*, utilizando los iniciadores propuestos por (Charrel et al., 2005; Sánchez-Seco et al., 2003); en la (Tabla 3-6), se muestran los iniciadores usados. Las condiciones del termociclador de la primera ronda de PCR fueron: 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 45°C por 1 minuto, 72°C por 30 segundos, extensión final de 72°C por 5 minutos; y para la segunda segunda ronda de PCR las condiciones fueron: 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 45°C por 1 minuto, 72°C por 30 segundos, extensión final de 72°C por 5 minutos. El termociclador utilizado para la realización de la PCR, fue un equipo de marca Himedia Prima-96.

Tabla 3- 6 Iniciadores para la detección genérica de *Phlebovirus* por PCR anidada.

Gen	Iniciador	Secuencias (5' → 3')	Tamaño del amplicón
L	NPhlebo1f (Forward)	ATGGARGGITTGTIWSICIICC	553
	NPhlebo1r (Reverse)	AARTTRCTIGWIGCYTTIARIGTIGC	
L	NPhlebo2f (Forward)	WTICCIAAICCIYMSAARATG	244
	NPhlebo2r (Reverse)	TCYTCYTTRTTYTTRARRTARCC	

Las condiciones de los reactivos de la ronda 1 ronda 2 se muestran en la (Tabla 3-7).

Tabla 3- 7 Condiciones de la mezcla de reacción de la PCR anidada para la detección de *Phlebovirus*.

Reactivos	[] inicial	Volumen de reacción-ronda 1	Reactivos	Volumen de reacción-ronda 2
Buffer	10 x	10µl	Buffer	10µl
MgCl ₂	25 mM	6µl	MgCl ₂	6µl
dNTPs	10 mM	2µl	dNTPs	2µl
Taq ADN polimerasa	5 U/mL	0.3µl	Taq ADN polimerasa	0.3µl
NPhlebo1f (Forward)	100 mM	1,6µl	NPhlebo2f (Forward)	1,6µl
NPhlebo1r (Reverse)	100 mM	1,6µl	NPhlebo2r (Reverse)	1,6µl
Agua ultra pura	—	23,5µl	Agua ultra pura	27,5µl
DNAc	—	5µl	DNAc	1µl
Volumen final	—	50µl	Volumen final	50µl

Los productos de la amplificación fueron visualizados en gel de agarosa al 1,5% preparado en tampón TBE y 5µl de SYBR safe, utilizando marcador de peso molecular de 100 pb, visualizando productos de 244 pb, para determinar la presencia de especies del género *Phlebovirus* empleando el aparato Gel-Doc Software Quantity One (Bio Rad). Como control positivo se utilizó una muestra de Virus *Heartland* donado por Nicholas Komar, Ph.D

arboviral diseases, Forth Collins, CO, CDC. La electroforesis del control positivo para *Phlebovirus* se presenta en el anexo C. Como control negativo se utilizó agua ultrapura.

Detección por PCR convencional de arnavirus- *Mammarenavirus*.

A través de una PCR convencional en las 1.698 muestras de murciélagos y 720 muestras de roedores se amplificó el gen de la glucoproteína el segmento S, con un tamaño de amplicón de 295 pares de bases, utilizando los iniciadores propuestos por (Delgado et al., 2008). En la (Tabla 3-8), se presentan los iniciadores usados. Las condiciones del termociclador fueron: 95°C por 2 minutos, 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos, 72°C por 15 segundos, extensión final de 72°C por 1 minuto. En la (Tabla 3-9), se presentan las condiciones de los reactivos. El termociclador utilizado para la realización de la PCR, fue un equipo de marca Himedia Prima-96.

Tabla 3- 8 Iniciadores para la detección genérica de *Mammarenavirus* por PCR convencional.

Gen	Iniciador	Secuencias (5' → 3')	Tamaño del amplicón
S	GP878+(Forward)	GAYATGCCWGGIGGITAYTGT	295
	GP1126-(Reverse)	TACCAAAAYTTTGTGTARTTRCAATA	

Tabla 3- 9 Condiciones de la mezcla de reacción de la PCR convencional para la detección de *Mammarenavirus*.

Reactivos	[] inicial	Volumen de reacción
Buffer	10 x	10µl
MgCl ₂	25 mM	5µl
dNTPs	10 mM	2µl
Taq ADN polimerasa	5 U/mL	0,3µl
GP878+(Forward)	100 mM	1,6µl
GP1126-(Reverse)	100 mM	1,6µl
Agua ultra pura	—	26µl

DNAc	—	3,5µl
Volumen final	—	50µl

Los productos de la amplificación fueron visualizados en gel de agarosa al 1,5% preparado en tampón TBE y 5µl de SYBR safe, marcador de peso molecular de 50 pb, productos de 295 pb, para determinar la presencia de especies del género *Mammarenavirus* el sistema Gel-Doc Software Quantity One (Bio Rad). Como control positivo se utilizó una muestra de virus Amapari donado por el Dr Luis Tadeu, del centro de pesquisa en virología de la universidad de São Paulo. La electroforesis del control positivo para *Mammarenavirus* se presenta en el anexo D. Como control negativo se utilizó agua ultrapura.

Detección por PCR convencional de *Orthobunyavirus*.

Para *Orthobunyavirus* (Bunyamwera y el serogrupo California), la detección fue desarrollada, amplificando un fragmento de 251pb del segmento S en las 1.698 muestras de murciélago y 720 muestras de roedores usando los iniciadores descritos por (Kuno et al., 1996). En la (Tabla 3-10), se presentan los iniciadores usados. Las condiciones del termociclador fueron: 94°C por 5 minutos, 39 ciclos de 94°C por 1 minuto, 56°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, extensión final de 72°C por 5 minutos. El termociclador utilizado para la realización de la PCR, fue un equipo de marca Himedia Prima-96. En la (Tabla 3-11), se presentan las condiciones de los reactivos.

Tabla 3- 10 Iniciadores para la detección genérica de *Orthobunyavirus* por PCR convencional.

Gen	Iniciador	Secuencias ((5' → 3')	Tamaño del amplicón
S	BCS82C (Forward)	ATGACTGAGTTGGAGTTTCATGATGTCGC	251
	BCS332V (Reverse)	TGTCCTGTTGCCAGGAAAAT	

Los productos de la amplificación fueron visualizados en gel de agarosa al 1,5% preparado en tampón TBE y 5µl de SYBR safe, el marcador de peso molecular utilizado fue de 100 pb, para productos de 251 pb, para determinar la presencia de especies del género *Orthobunyavirus* se utilizó el sistema Gel Doc Software Quantity One (Bio Rad). No se pudo obtener control positivo en el género *Orthobunyavirus*. Como control negativo se utilizó agua ultrapura.

Tabla 3- 11 Condiciones de la mezcla de reacción de la PCR convencional para la detección de *Orthobunyavirus*.

Reactivos	[] inicial	Volumen de reacción
Buffer	10 x	4µl
MgCl ₂	25 mM	2µl
dNTPs	10 mM	1µl
Taq ADN polimerasa	5 U/mL	0,3µl
BCS82C (Forward)	100 mM	1µl
BCS332V (Reverse)	100 mM	1µl
Agua ultra pura	—	35,7µl
DNAc	—	5µl
Volumen final	—	50µl

Secuenciación de los productos por el método Sanger.

Los productos de las PCR que presentaron las bandas esperadas fueron purificados usando el sistema de QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). La secuenciación se implementó mediante Sanger por electroforesis capilar (método automatizado 3500XL Genetic Analyzer Applied Biosystems) en Macrogen INC, Korea. Los amplificados fueron secuenciados en ambos sentidos.

Secuenciación NGS.

Las bandas que no fueron resueltas con el método de Sanger, fueron secuenciadas utilizando la plataforma illumina™. A las muestras positivas se les realizó la síntesis de la primera cadena utilizando la transcriptasa inversa SuperScript™ III, y se enviaron a MacroGen según sus recomendaciones de envío. La verificación de la calidad del DNA se realizó por espectrofotometría (NanoDrop) para evaluar la relación 260/280, que indican pureza y debe tener un valor entre 1.8 y 2.0; la integridad del DNA se evaluó por electroforesis en gel de agarosa al 1,5%, y la cuantificación se hizo por fluorometría con el equipo picogreen (Invitrogen), empleando el estuche comercial Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific Inc).

A partir del ADN enviado, se elaboraron las librerías genómicas en este caso la librería que se usó fue TruSeq mRNA; empleando el kit comercial TruSeq RNA Sample Prep kit v2, según las instrucciones del fabricante. En resumen, se realizó el marcaje con adaptadores Illumina de secuencias de DNA específicas fragmentadas (tagmentación), que posteriormente fueron amplificadas mediante PCR, y a los productos obtenidos se les hizo el proceso de limpieza con perlas magnéticas Ampure XP (Angencourt Bioscience corporation, MA, USA) (Illumina, 2015). La cuantificación de las librerías se hizo de acuerdo al protocolo de qPCR del fabricante (Illumina, 2011), utilizando el estuche comercial Qubit HS-DNA (Thermo Fisher Scientific Inc), y se utilizó el bioanalizador de ácidos nucleicos Agilent 2100 Bioanalyzer con el High sensitivity DNA chip para determinar la distribución y tamaño de los fragmentos de DNA.

Después, cada librería fue ajustada a una concentración de 10nM y se elaboraron grupos (pools) de librerías a una concentración de 12pM para realizar la secuenciación. Para este

proceso se empleó el kit TruSeq SBS v4, compatible con el secuenciador NovaSeq 6000 (Illumina Inc.), en donde se realizó la secuenciación para la obtención de lecturas pareadas de 100 pb.

A las secuencias pareadas obtenidas, se les hizo verificación de calidad y un proceso de limpieza (trimming) para eliminar secuencias contaminantes (adaptadores) o de baja calidad, empleando un valor Phred de 30 utilizando el programa Trimmomatic. A partir de estas secuencias (reads), se realizó ensamblaje empleando como genoma de referencia el *Orthohantavirus Maporal* (NC_034566.1) descartando los contigs cortos, empleando el programa HISAT2 v21.0 (Kim, Langmead, & Salzberg1, 2015). A partir del genoma ensamblado, se realizó la anotación genómica empleando la herramienta RAST versión 2.0 (Rapid Annotation using Subsystem Technology) (Overbeek et al., 2014).

3.10 Relación filogenéticas.

Usando el programa Clustal W contenido en Mega X, para aplicar el mejor modelo de evolución y explicar la diversidad nucleótica entre posibles secuencias alineadas.

4. Capítulo 4. Resultados.

4.1 Distribución y ubicación espacial de los murciélagos capturados.

En los doce puntos de muestreo, se capturaron 283 murciélagos distribuidos en seis familias y 17 géneros. En la (Tabla 4-1), se muestra la distribución, cantidad de especímenes y posicionamiento de los doce puntos de muestreo. En la Figura 4-1, se muestra la distribución espacial de murciélagos en los departamentos de Córdoba y Sucre.

4.2 Distribución y ubicación espacial de los roedores capturados.

En los cuatro puntos de muestreo, se capturaron 120 roedores distribuidos en cinco familias, ocho géneros. En la (Tabla 4-2), se muestra la distribución, cantidad de especímenes y posicionamiento de los tres municipios de muestreo. En la Figura 4-1 se muestra la distribución espacial de roedores capturados en los departamentos de Córdoba y Guajira.

Tabla 4- 1 Distribución geográfica de los murciélagos capturados en los departamentos de Córdoba y Sucre.

Latitud	Longitud	Departamento	Municipio	Total especímenes capturados	Género	Especímenes capturados
-75°43'6''	8°34'9''	Córdoba	Montería	25	<i>Carollia</i>	6
					<i>Sturnira</i>	1
					<i>Artibeus</i>	15
					<i>Noctilio</i>	1
					<i>Uroderma</i>	2
-76°14'16''	8°47'26,1''	Córdoba	Canalete	24	<i>Rhogeessa</i>	1
					<i>Phyllostomus</i>	12
					<i>Artibeus</i>	7
					<i>Glssophaga</i>	1
-76°9'35,9''	8°03'43,9''	Córdoba	Tierralta	25	<i>Sturnira</i>	3
					<i>Carollia</i>	18
					<i>Carollia</i>	5
-75°24'55''	8°16'32''	Córdoba	Buenavista	22	<i>Sacopterix</i>	2
					<i>Myotis</i>	1
					<i>Carollia</i>	3
					<i>Phyllostomus</i>	2
					<i>Artibeus</i>	14
					<i>Noctilio</i>	1
-75°9'20,6''	8°17'53,8''	Córdoba	Ayapel	25	<i>Uroderma</i>	1
					<i>Artibeus</i>	8
					<i>Eumops</i>	1
					<i>Phyllostomus</i>	3
					<i>Phyllostomus</i>	5
					<i>Molossus</i>	5
					<i>Noctilio</i>	1
					<i>Sturnira</i>	1
76°11'35,8''	9°03'46,9''	Córdoba	Puerto Escondido	25	<i>Uroderma</i>	1
					<i>Artibeus</i>	18
					<i>Glssophaga</i>	1
					<i>Phyllostomus</i>	1
					<i>Sturnira</i>	3
					<i>Carollia</i>	1
76°11'27,6''	9°03'44,6''	Córdoba	Momil	25	<i>Glssophaga</i>	1
					<i>Artibeus</i>	21

					<i>Uroderma</i>	2
					<i>Lasiurus</i>	1
-75°39'00,9"	8°44'40,7"	Córdoba	San Carlos	25	<i>Phyllostomus</i>	5
					<i>Rhogeessa</i>	1
					<i>Artibeus</i>	11
					<i>Sturnira</i>	3
					<i>Desmodus</i>	2
					<i>Carollia</i>	2
					<i>Micronycteris</i>	1
					-74°34'31,7"	8°32'35,7"
<i>Phyllostomus</i>	5					
<i>Artibeus</i>	8					
<i>Sturnira</i>	2					
<i>Sacopterix</i>	1					
<i>Carollia</i>	2					
<i>Eptesicus</i>	1					
<i>Molossus</i>	1					
-75°26'22,9"	9°19'21,9"	Sucre	Sincelejo	15	<i>Artibeus</i>	9
					<i>Carollia</i>	2
					<i>Phyllostomus</i>	1
					<i>Glssophaga</i>	1
					<i>Trachops</i>	1
					<i>Sturnira</i>	1
-75°20'54,3"	9°29'59,2"	Sucre	Colosó	25	<i>Artibeus</i>	10
					<i>Phyllostomus</i>	10
					<i>Desmodus</i>	2
					<i>Sacopterix</i>	1
					<i>Carollia</i>	1
					<i>Glssophaga</i>	1
-75°16'10,0"	8°42'57,5"	Sucre	San Marcos	22	<i>Artibeus</i>	7
					<i>Phyllostomus</i>	2
					<i>Uroderma</i>	3
					<i>Molossus</i>	4
					<i>Sturnira</i>	1
					<i>Glssophaga</i>	1
					<i>Noctilio</i>	3
					<i>Sacopterix</i>	1

Figura 4- 1 Distribución espacial de roedores y murciélagos en los departamentos de Córdoba; Sucre y La Guajira.

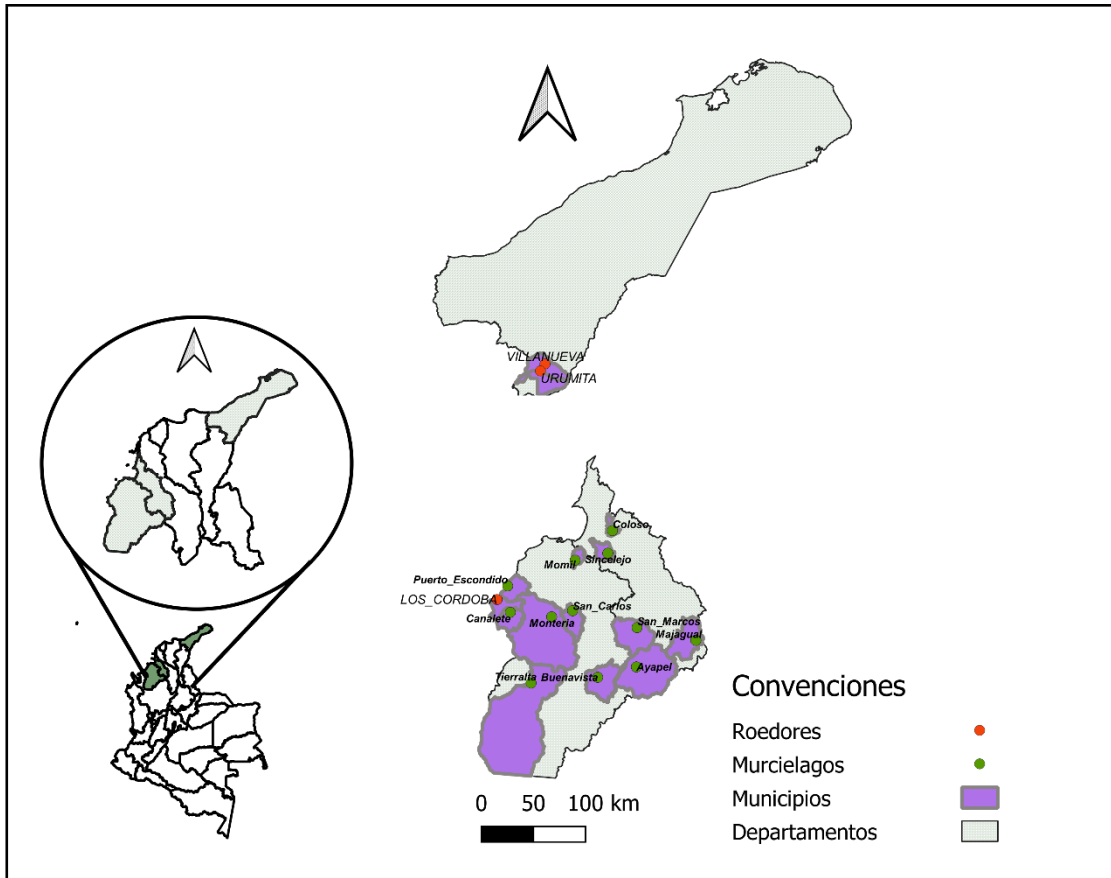


Tabla 4- 2 Distribución geográfica de roedores capturados en los departamentos de Córdoba y La Guajira.

Latitud	Longitud	Departamento	Municipio	Total Especímenes capturados	Generos	Especímenes capturados
-76.354939	8.896.553	Córdoba	Los Cordobas	97	<i>Olygoryzomys</i>	7
					<i>Zygodontomys</i>	27
					<i>Rattus</i>	49
					<i>Heteromys</i>	3
					<i>Proechymis</i>	2
					<i>Mus</i>	4
					<i>Marmosa</i>	5
-75.267221	10.446262	La Guajira	Villanueva	18	<i>Zygodontomys</i>	13
					<i>Sigmodont</i>	3
-73.009928	10.561866	La Guajira	Urumita	7	<i>Zygodontomys</i>	5
					<i>Olygoryzomys</i>	2

4.3 Demostración del gen beta-actina con los iniciadores b-actina3 y b-actina4 en murciélagos y roedores.

Las diferentes muestras de tejido (cerebro, corazón, pulmón, bazo, hígado y riñones); de los 283 murciélagos y los 120 roedores capturados amplificaron un producto de 96 pb, lo cual permitió demostrar que todas las muestras de murciélagos y roedores fueron extraídas correctamente y que no hubo inhibidores en la PCR, en la Figura 4-2, muestra los tejidos de un espécimen de los 283 murciélagos capturados, resaltando el control interno en los diferentes tejidos. En la Figura 4-3, se muestra un representante de los 120 roedores capturados, destacando el control interno en los diferentes tejidos del roedor capturado. Empleando un marcador de peso de 50pb.

Figura 4- 2 Gel de agarosa para el gen beta-actina en murciélagos. B (cerebro), L (pulmón), H (corazón), K (riñón), LI (hígado), S (bazo) y C- (control negativo).

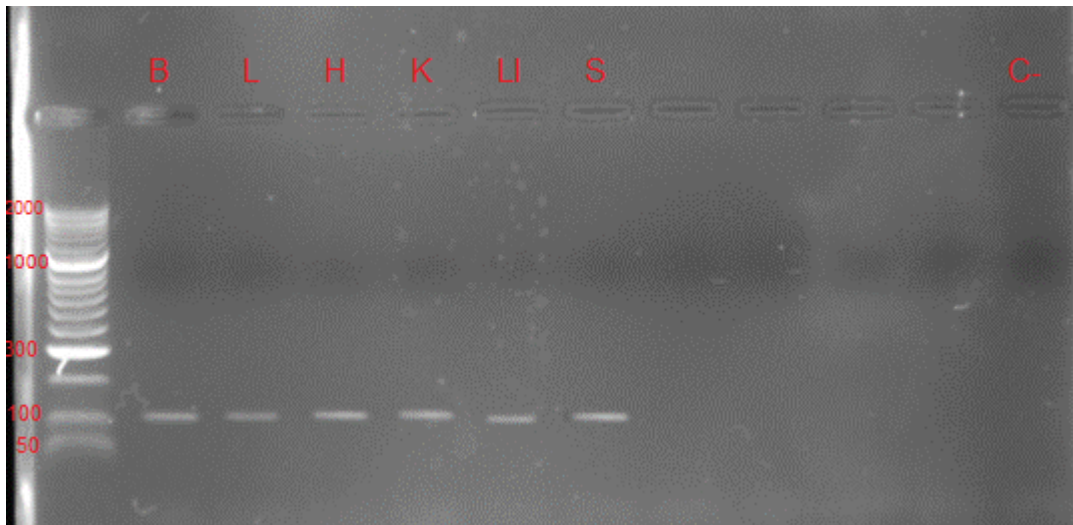
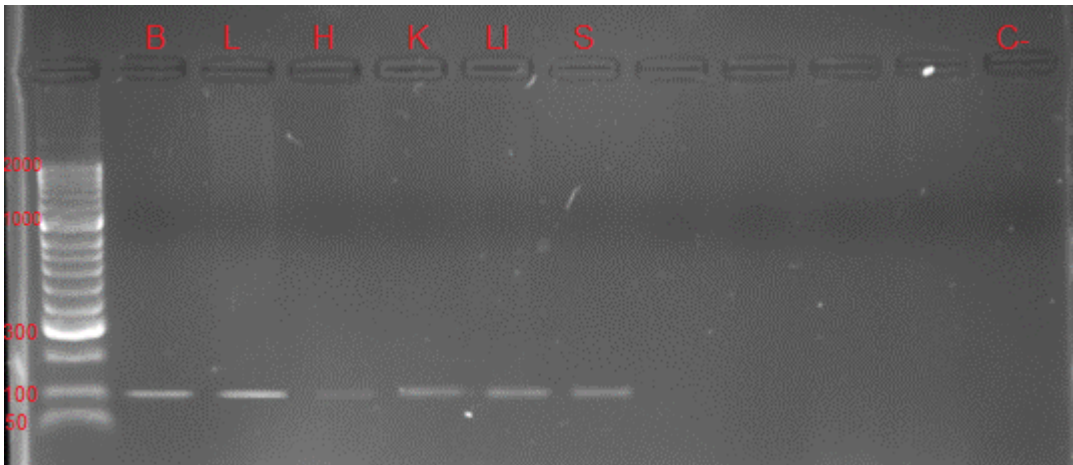


Figura 4- 3 Gel de agarosa para el gen beta-actina en roedores. B (cerebro), L (pulmón), H (corazón), K (riñón), LI (hígado), S (bazo) y C- (control negativo).



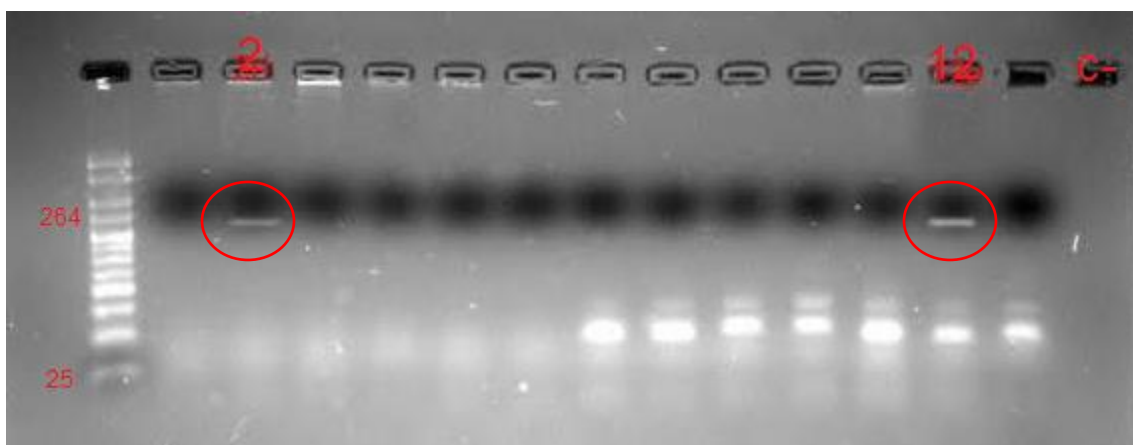
4.4 Resultados Objetivo 1. Detectar *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus*, *Orthohantavirus* y *Arenavirus* en tejidos de roedores y murciélagos.

4.4.1 Detección por PCR convencional de *Orthohantavirus* en roedores y murciélagos.

De las 720 muestras de tejidos evaluadas en roedores, se encontraron dos muestras positivas, se detectaron amplicones de un tamaño de 264pb del segmento N en riñón y pulmón del género *Zygodontomys* en el departamento de la Guajira. La primera correspondió al tejido de riñón del roedor número dos de Villanueva_Guajira. La segunda muestra positiva fue del tejido de un pulmón del roedor número 12 de Urumita-Guajira. En la Figura 4-4 se muestran las bandas de las muestras positivas respectivamente.

De los 283 murciélagos capturados; *Carollia*, *Sturnira*, *Artibeus*, *Uroderma*, *Phyllostomus*, *Noctilio*, *Glssophaga*, *Molossus*, *Desmodus*, *Lasiurus*, *Sacopterix*, *Rhogeessa*, *Myotis*, *Eumops*, *Micronycteris*, *Sptesicus*, y *Trachops* no se logró detectar genoma viral de *Orthohantavirus* en los diferentes tejidos.

Figura 4- 4 Gel de agarosa con amplicones obtenidos por PCR convencional en roedores. 2 (riñón), 12 (pulmón) y C- (control negativo).



Los resultados de secuenciación obtenidos de los dos productos por Sanger en Macrogen mostraron una señal baja en los electroferogramas, mostrando picos encimados. Cuando se realizó el BLAST, la secuencias de SAHN-S (Forward) y SAHN-C (Reverse), no mostraron ninguna coincidencia con secuencias del género *Orthohantavirus*, la Figura 4-5 muestran los diferentes electroferogramas de la muestra 2 de riñón enviados por Macrogen.

Luego de tener estos resultados, las muestras fueron enviadas nuevamente a Macrogen para realizar secuenciación de genoma completo utilizando la plataforma Illumina.

La estadística de calidad de las muestras de tejidos de roedores secuenciadas obtuvieron un promedio 222, 570,732 reads pareados (222, 005,630 y 223, 135,834) y 22, 536, 719,234 bases leídas. El porcentaje de GC fue de 56.88 %. Los puntajes de calidad asignados a las bases en Q20 y Q30 fueron de 96% y 91% respectivamente. Los resultados detallados de número de reads y puntajes de calidad de cada muestra se describen en la (Tabla 4-3).

Tabla 4- 3 Estadística de calidad de tejidos de roedores de La Guajira secuenciadas.

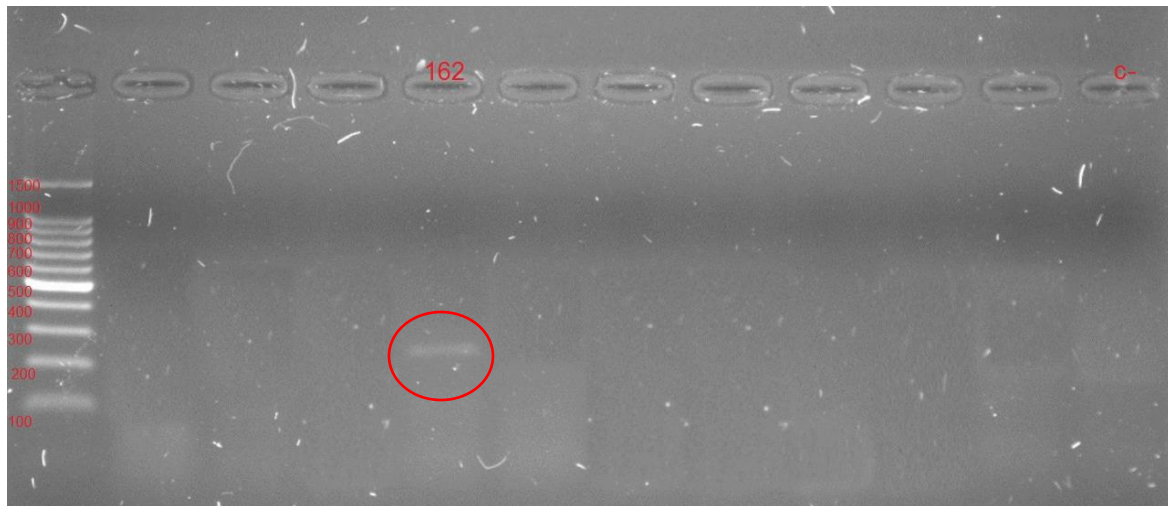
MUESTRA	TOTAL BASES LEIDAS (bp)	TOTAL READS	GC (%)	AT (%)	Q20 (%)	Q30 (%)
2	22,422,568,630	222,005,630	56.88	43.12	96.18	90.81
12	22,536,719,234	223,135,834	56.4	43.6	96.69	91.94

El ensamblaje por referencia, utilizando *Orthohantavirus* Maporal RefSeq, demostró que no eran secuencias de *Orthohantavirus*, sino de gusanos, no hubo lecturas alineadas con el genoma de referencia del virus *Maporal*.

4.4.2 Detección por PCR anidada de *Phlebovirus* en roedores y murciélagos.

A partir de los tejidos de los 283 murciélagos, se detectaron amplicones de un tamaño de 244 pb del segmento L de *Phlebovirus* en hígado en un *Eumops glaucinus* (insectívoro) en Ayapel (Córdoba); en la Figura 4-6 se muestra el amplicón detectado en hígado. En los tejidos de los 120 roedores capturados no se logró detectar bandas de *Phlebovirus* a través de la PCR anidada.

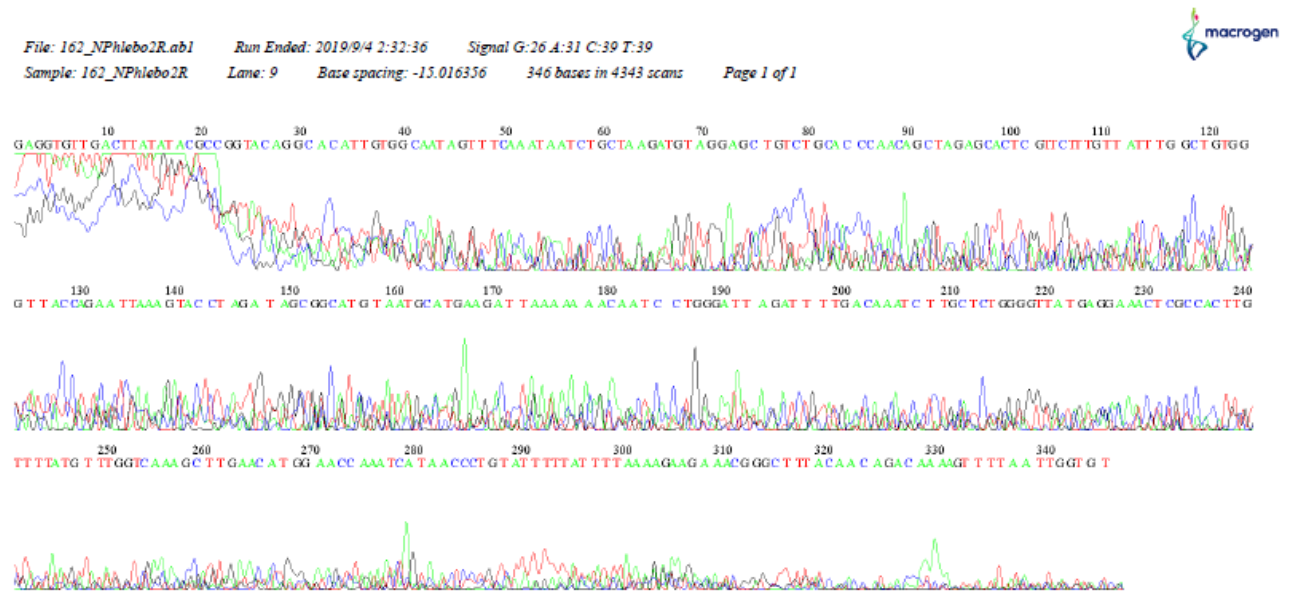
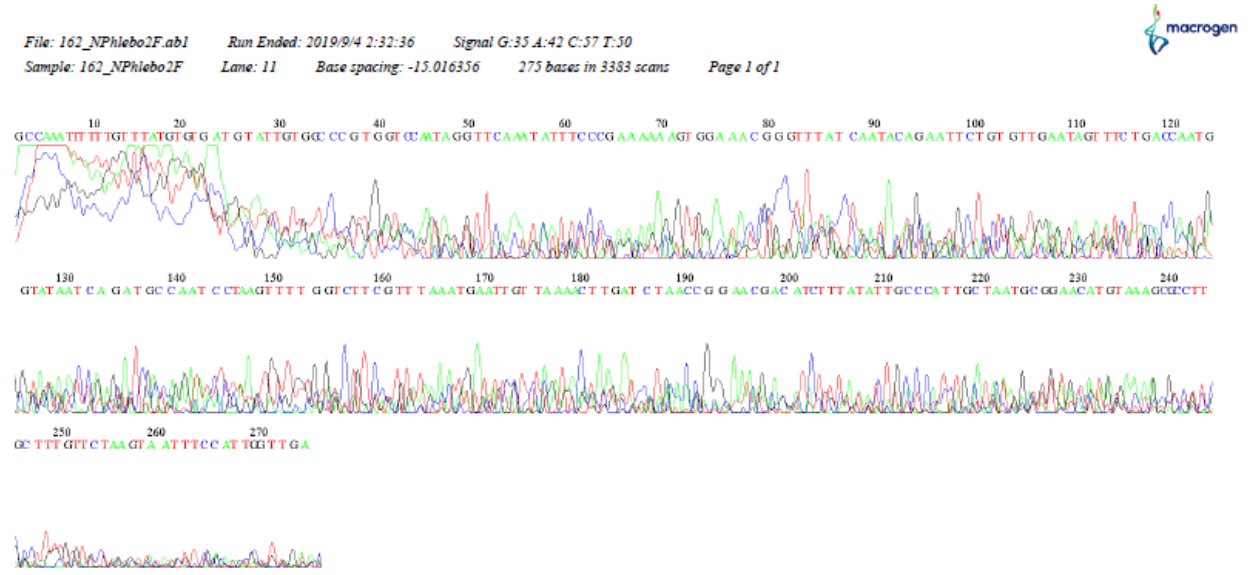
Figura 4- 6 Gel de agarosa con amplicón obtenido para el gen L por PCR anidada; murciélago 162 (hígado), control negativo (C-).



A pesar de la verificación de la integridad y concentración al momento de enviar la muestra a Macrogen en Seul Corea, los resultados de secuenciación obtenidos del producto por Sanger mostraron una interferencia en los electroferogramas, no se evidenció fragmentación ni degradación del RNA en la muestra. Aunque los resultados de los electroferogramas no fueron exactos respecto a los tamaños esperados en los productos de PCR, no se observó un patrón similar mostrando picos encimados y no definidos. Cuando se realizó el BLAST, la secuencias de Nphlebo2 (Forward) y Nphlebo2 (Reverse), no mostraron ninguna coincidencia con alguna secuencia de *Phlebovirus*. En la Figura 4-7, observamos los electroferogramas de la muestra 162 para *Phlebovirus*.

Se hizo nuevamente la extracción de la muestra positiva del tejido correspondiente a hígado del murciélago, luego la RT, la PCR anidada y la electroforesis. Los resultados no mostraron la banda en el tejido de hígado que inicialmente se logró ver, por lo que no se pudo enviar otra vez a secuenciar. Esto pudo ser debido a que la carga viral en muestras de tejidos en campo es mucho menor.

Figura 4- 7 Electroferogramas de la muestra 162 del murciélago capturado en Ayapel-Córdoba.



4.4.3 Detección por PCR convencional de arenavirus-*Mammarenavirus* en roedores y murciélagos.

A través de una de PCR convencional no se logró amplificar el gen de la glicoproteína de arenavirus (*Mammarenavirus*) en el segmento S, con un tamaño de amplicón de 295 pares de bases, en los 120 roedores y 283 murciélagos en los departamentos de Córdoba, Sucre y La Guajira.

4.4.4 Detección por PCR convencional de *Orthobunyavirus* en roedores y murciélagos.

En esta investigación no se logró evidenciar por PCR convencional *Orthobunyavirus* en los 120 roedores y 283 murciélagos de algunas áreas de los departamentos de Córdoba, Sucre y La Guajira.

5. Capítulo 5. Discusión

Debido a que muchas enfermedades infecciosas virales emergentes tienen su origen en reservorios como mamíferos, una mejor comprensión de la distribución geográfica de los virus zoonóticos y sus reservorios es vital para evaluar el riesgo y predecir futuros brotes de enfermedades virales, así como para descubrir asociaciones de enfermedades no reconocidas previamente en el caso de los virus en pequeños mamíferos (Arai & Yanagihara, 2020).

En la actualidad, uno de los mayores desafíos a nivel mundial es la evolución viral y las enfermedades virales emergentes, como la reciente aparición del nuevo coronavirus SARS-CoV-2 que sorprendió a todos. Hasta la fecha de hoy 10 de noviembre de 2020 hay más de 46,6 millones de infectados y más de 1,6 millones de fallecidos en todo el mundo, los casos diariamente se incrementan rápidamente y no parece que se termine su propagación hasta tanto no se aplique una vacunación masiva (Barrios et al., 2020).

En el presente trabajo a pesar de que no se pudieron detectar *Mammarenavirus*, *Orthohantavirus*, *Phlebovirus* y *Orthobunyavirus* los resultados son importantes para el sistema de vigilancia epidemiológica de salud pública de algunas regiones del Caribe, aunque estas enfermedades causada por estos virus no son enfermedades prioritarias al contrario son enfermedades desatendidas y muy poco conocidas, estos resultados nos invitan a seguir buscando estos virus en murciélagos y roedores, porque la ausencia de resultados positivos no indican en lo absoluto que estos virus no estén circulando en diferentes zonas del caribe colombiano.

En Colombia no existe una vigilancia activa sobre las enfermedades causadas por *Mammarenavirus*, *Orthohantavirus*, y menos de *Phlebovirus* y *Orthobunyavirus*. La sintomatología de muchas de las enfermedades causadas por estos virus es similar y se confunde con otros síndromes agudos infecciosos tropicales (Mattar, Tique, et al., 2017).

Además, no se cuenta con personal sanitario preparado que permita un adecuado diagnóstico.

Los departamentos de Córdoba y Sucre al igual que el resto de los departamentos del Caribe, se caracterizan por tener un clima cálido, suelos inundables, con temperatura promedio anual entre 25.8°C y 27.5°C, una altitud baja entre 5 y 125 metros, una precipitación anual entre los 1.000 mm. En Sucre la lluvia puede alcanzar hasta los 3.600mm, en Córdoba la humedad relativa es alta entre el 72% y 88% (Acero-Aguilar, 2016). De otro lado, el Caribe colombiano, es la región que ha sufrido mayor transformación de sus ecosistemas naturales debido a la pérdida de bosque seco por actividades antrópicas, como la deforestación y contaminación (Monroy, De La Ossa, & De La Ossa, 2015).

El primer paso para controlar las enfermedades transmitidas por vectores y reconocer la aparición de nuevas enfermedades corresponde a la detección e identificación inmediata, lo que es la vigilancia epidemiológica (Suárez Larreinaga & Berdasquera Corcho, 2000). Esta vigilancia permite reconocer las especies de murciélagos y roedores que son hospederos de estos virus importantes para la salud pública. Por eso es esencial contar con un sistema organizado de vigilancia de las enfermedades tropicales emergentes y reemergentes causadas por virus, bacterias, que actualmente nuestro sistema de vigilancia epidemiológica en Colombia no estudia a profundidad. Tales como hantavirus, arenavirus, *Rickettsia*, *Coxiella*, *Ehrlichia*, *Anaplasma* y virus aún desconocidos en Colombia transmitidos por garrapatas.

Por lo anterior, el Instituto de investigaciones biológicas del trópico de la Universidad de Córdoba, ha considerado orientar su atención en la vigilancia ecoepidemiológica de algunos agentes causales de enfermedades emergentes como la búsqueda de *Orthohantavirus*, *Phlebovirus*, *Arenavirus*, y *Orthobunyavirus* y virus transmitidos por garrapatas en diferentes áreas geográficas del Caribe, donde se encuentren animales silvestres del bosque seco tropical como roedores y murciélagos.

En el presente estudio no se detectó *Orthohantavirus* en los roedores del departamento Córdoba en el municipio de los Córdoba y en el departamento de La Guajira en los municipios de Villanueva y Urumita, esto no significa que *Orthohantavirus* no está circulando en estos roedores. Es posible que el número (n=120) de especímenes

analizados no haya sido el adecuado o la tasa de circulación viral es baja en la naturaleza y se incrementa cuando el hombre altera ese ciclo (Guzmán, Calderón, González, & Mattar, 2017). No obstante, los resultados son importantes para el sistema de vigilancia epidemiológica, en la medida en que aportan información referente a la distribución de los diferentes géneros de roedores encontrados como *Olygoryzomys*, *Zygodontomys*, *Rattus*, *Heteromys*, *Proechymis*, *Mus*. Estos géneros hospedan otros patógenos muy poco estudiados en Colombia como *Leishmania*, *Tripanosoma*, *Yersinia*, *Rickettsia* y virus de las encefalitis (*Togaviridae*) que permiten tener una visión más amplia de la importancia que tienen como reservorios de estos agentes causales.

Desde el hallazgo en Korea en 1978 del primer *Orthohantavirus* aislado de pulmón, del roedor *Apodemus agrarius* llamado virus Hantaan (Lee, Baek, & Johnson, 1982; Lee, Lee, & Johnson, 2004). Se han encontrado múltiples evidencias de una amplia distribución mundial de este género viral.

Nuestros resultados no coinciden con la mayoría de investigaciones de *Orthohantavirus* en roedores realizadas en Colombia debido a la mayoría de estudios publicados en el país, la técnica usada es serología y no técnicas moleculares. El primer estudio en 2006 hecho en el IIBT, demostró las evidencias serológicas de *Orthohantavirus* en roedores (Alemán et al., 2006) con una prevalencia de 2,1 % en 336 roedores capturados en once municipios del departamento de Córdoba. Los porcentajes de resultados seropositivos, específicos por género de roedores, fueron 5,9 % en *Heteromys sp.* (1 de 17), 8,5 % en *Oryzomys sp.* (4 de 47), 9,1 % en *Oligorysomys sp.* (1 de 11) y 50 % en *Proechimys sp.* (1 de 2). Esto demuestra que las técnicas serológicas son más importantes en principio que las técnicas moleculares debido a que permiten tener una visión más general de la circulación viral. No obstante, el grupo del IIBT escogió la aproximación molecular ya que se acerca mucho más al estudio genético de los tipos de virus permitiendo una vez secuenciadas las muestras, determinar la especie detectada.

En nuestro trabajo con 120 roedores y dos marsupiales capturados en el departamento de Córdoba y la Guajira, en los cuales 49 (39%) especímenes pertenecían al género *Zygodontomys*, se detectaron dos amplicones en los tejidos de riñón y pulmón en el departamento de la Guajira. Desafortunadamente por problemas técnicos ajenos al estudio, no se lograron secuenciar estos amplicones a través de la secuenciación del genoma completo. En contraste, (Londoño et al., 2011) lograron hacerlo y lo comprobaron

con serología en roedores en tres municipios del Urabá antioqueño donde capturaron 354 roedores. Este grupo, encontró la primera evidencia genética de estos virus en roedores capturados en el municipio de Necoclí y halló una prevalencia de anticuerpos de tipo IgG anti-hantavirus de 4% (15/354). Todos los roedores seropositivos fueron de la especie *Zygodontomys cherriei* (rata de la caña), lo que corresponde a 14% de resultados seropositivos para la especie (15 de 109 capturados). Once de los 15 *Z. cherriei* seropositivos resultaron positivos por RT-PCR para *Orthohantavirus*.

En nuestro estudio a pesar de obtener 45 especímenes de roedores del género *Rattus*, de la subfamilia *Murinae* capturados en el departamento de Córdoba no fue posible detectar *Orthohantavirus*, el papel del género *Rattus* contribuye en ser reservorio de muchos patógenos, siendo este roedor el mayor colonizador de los ecosistemas urbanos y peridomesticos a nivel mundial (Kosoy, Khlyap, Cosson, & Morand, 2015). Los resultados de (Blanco et al., 2012) muestran una seroprevalencia de anticuerpos en *Orthohantavirus* del 8,3% (12/144 capturas) en roedores de la subfamilia *Murinae* en el departamento de Sucre. Estos resultados son importantes, ya que se piensa que debido a la distribución mundial del género *Rattus* perteneciente a la subfamilia *Murinae*, podría estar circulando el virus Seoul en diferentes áreas del caribe colombiano.

En el 2013 estos mismos autores, capturaron 61 roedores distribuidos en tres especies, siendo *Mus musculus* la más abundante (91.8%). Del total de animales analizados, un ejemplar de *Rattus rattus* (seroprevalencia de 1.64%), resultó positivo a *Orthohantavirus*. Los hallazgos evidenciaron seropositividad a *Orthohantavirus* en roedores de la subfamilia *Murinae* en Colombia (Blanco et al., 2013). Encontraron anticuerpos IgG específicos contra el Virus Sin Nombre (SNV) que fueron detectados en muestras de plasma por el método de ELISA. La detección de anticuerpos contra el virus refuerza la hipótesis que sugiere la circulación de al menos un *Orthohantavirus* en roedores de la subfamilia *Murinae* del Caribe Colombiano.

En nuestros resultados, el género *Zygodontomys* fue el segundo género más abundante de los roedores capturados y el género donde se encontró el menor número de especies fue el género *Proechymis*; este último género es un importante reservorio de

Orthohantavirus entre otros microorganismos de importancia clínica (Cabello C & Cabello C, 2008).

El trabajo de (Guzmán et al., 2013) concuerda con nuestros resultados negativos por RT-PCR en los 126 roedores capturados utilizando metodologías distintas. Ellos probaron por ELISA indirecta sueros de 322 roedores en el departamento de Córdoba, para detectar anticuerpos contra dos *Orthohantavirus*. Los sueros se analizaron utilizando el lisado de las células Vero E6 infectadas con el virus Maciel (MACV) o la proteína N del virus *Araraquara* (ARAV), como antígenos para la detección de anticuerpos contra *Orthohantavirus*. Todos los sueros de roedores fueron negativos para ambos antígenos.

A pesar que en nuestros resultados por RT-PCR no coinciden con la mayoría de búsquedas de este patógeno, esto no significa que este virus no esté circulando en este hospedero, es importante aumentar el número de capturas y seguir investigando la prevalencia.

En países limítrofes, como Brasil, en la región de Riberão Preto, donde el número de capturados fue de 595 roedores silvestres, dentro de las especies encontraron *Necromys lasiurus*, *Calomys tener*, *Oligorizomys sp.* Las secuencias nucleotídicas obtenidas por RT-PCR del roedor *Calomys tener*, mostraron homología con el virus *Araraquara* (ARAV) (Figueiredo et al., 2010). Contradictorio al número de capturas en roedores en el trabajo anterior, en el estado de Minas Gerais, lograron solo capturar 20 roedores pertenecientes a especies diferentes y solo un roedor resultó positivo por IgG y PCR del género *Oligoryzomys nigripes* capturado en áreas peridomésticas. Estos resultados sugieren la circulación silenciosa de *Orthohantavirus* en una región de uso intensivo de producción agrícola (Amaral et al., 2018b).

En Venezuela, aislaron un *Orthohantavirus* de dos ratas de arroz. Los análisis de las secuencias precursoras completas de la proteína de la nucleocapside y de la glucoproteína indicaron que los aislados son cepas de un nuevo *Orthohantavirus* llamado virus Maporal, que filogenéticamente está relacionado con los virus que causan el síndrome cardiopulmonar por *Orthohantavirus* (Fulhorst, Cajimat, Utrera, Milazzo, & Duno, 2004).

En este trabajo se capturaron diferentes géneros, dentro de los cuales; 9 *Olygoryzomys*, 45 *Zygodontomys*, 49 *Rattus*, 3 *Heteromys*, 2 *Proechymis*, 4 *Mus*, 5 *Marmosa* y 3 *Sigmodont*, fueron negativos para *Orthohantavirus* usando un amplicón de 264pb del segmento S de *Orthohantavirus*. En Argentina, investigaron la infección por *Orthohantavirus* en roedores *Sigmodontinae* salvajes, donde todos los seropositivos de *Oligorymys nigripes* fueron positivos por PCR para los segmentos S Y M del genotipo del *Orthohantavirus* Lechiguanas con un 98 % de identidad de nucleótidos para ambos segmentos. Estos resultados sorprenden dado que *O. nigripes* se ha asociado previamente con el genotipo Jujuitiba, no con el genotipo Lechiguanas (Colombo et al., 2019). Lo que contribuye a la discusión de la hipótesis de que un genotipo solo puede estar en un mismo reservorio, y estos resultados demuestran lo contrario, asociación entre reservorios de roedores y *Orthohantavirus* (Colombo et al., 2019; Liphardt et al., 2019).

Aunque nuestras muestras de tejidos de roedores no mostraron secuencias de *Orthohantavirus* por secuenciación de genoma completo (NGS); el uso de la secuenciación del genoma completo del virus ayuda en la identificación y caracterización de virus emergentes o reemergentes, siendo el mejor método actualmente para secuenciar el genoma viral. En un estudio comparativo en Inglaterra, utilizaron un amplicon para la secuenciación del genoma completo del virus Hantaan (HTNV) de muestras de roedores. Se analizó la cobertura del genoma del virus Hantaan en función del número de copias de ARN viral, se demostró una alta tasa de cobertura de HTNV en tejidos pulmonares de *Apodemus agrarius*. Este estudio proporciona información útil sobre la técnica de secuenciación de genoma completo en *Orthohantavirus* con respecto a la desventaja de hacer cultivo celular en un laboratorio BSL4 que no se encuentra en todas partes y que solo así se podría cultivar estos *Orthohantavirus* (No et al., 2019), aunque recordemos que hacer cultivo celular es el prueba estándar pero que en el caso de *Orthohantavirus* es de mucho cuidado por su alto nivel de riesgo (Radford et al., 2012).

De otra parte las diferentes evidencias moleculares y serológicas de la presencia de *Orthohantavirus* han sido en distintas especies de roedores, pero muy pocas de este género en murciélagos, históricamente, se pensaba que estos virus estaban alojados principalmente en pequeños mamíferos roedores e insectívoros; hasta cuando se reportó, la presencia de *Orthohantavirus* en murciélagos (De Araujo et al., 2012).

Aunque no se detectó *Orthohantavirus* en los 283 murciélagos en este estudio. Recientemente, se han identificado nuevas especies de *Orthohantavirus* en murciélagos de los continentes de África y Asia, expandiendo los reservorios potenciales y el rango de estos virus. En el caso de Brasil, en 53 murciélagos neotropicales evaluaron el potencial como anfitriones de *Orthohantavirus* y su dinámica de transmisión en la naturaleza. El segmento S amplificó en sangre y orina en el frugívora *Carollia perspicillata* y el murciélago vampiro común *Desmodus rotundus*. La secuenciación del ADN mostró una gran similitud con el genoma del *Orthohantavirus* Araraquara (ARQV), que pertenece a uno de los clados de *Hantavirus* más letales (*Orthohantavirus* de los Andes) (Sabino-Santos et al., 2018).

Ahora bien, según la clasificación de (Abudurexiti et al., 2019b) todos los *Hantavirus* transmitidos por roedores pertenecen al género *Orthohantavirus* (Arai & Yanagihara, 2020). Desde esa perspectiva nuestros resultados concuerdan con los de (Amaral et al., 2018a), en los cuales no se encontró evidencia molecular de *Orthohantavirus* en murciélagos, llegando a la conclusión que en América del Sur, los roedores de la subfamilia *Sigmodontinae* son los principales reservorios de *Orthohantavirus*; al igual que (Lee et al., 2020) quienes consideran que la evolución de los virus ARN en los vertebrados es muy compleja, debido a la divergencia y al cambio de huésped con sus huéspedes vertebrados.

Por otra parte, en esta investigación la detección por PCR convencional de *Arenavirus* no fue exitosa, estos resultados no indican que los *Arenavirus* (*Mammarenavirus*) no están circulando en los diferentes hospederos (roedores y murciélagos) en los departamentos de Córdoba, Sucre y La Guajira en la actualidad; desconocemos la prevalencia de la enfermedad, puesto que aún en Colombia estos virus no son de notificación obligatoria. A diferencia con los resultados de serología de (Mattar et al., 2011), ellos demuestran la circulación en tres roedores de la especie *Z. brevicauda* que tuvieron anticuerpos reactivos contra los virus Guanarito y Pichindé con un total de 210 roedores capturados en el departamento de Córdoba, demostrando la circulación silenciosa de estos *arenavirus* en roedores en el departamento de Córdoba.

Nuestros resultados RT-PCR demostraron la ausencia de *arenavirus* en roedores de los diferentes géneros; *Olygoryzomys*, *Zygodontomys*, *Rattus*, *Heteromys*, *Proechymis* y *Mus*, como lo reporta en 2014 (Arroyave, Rodas, & Salazar, 2014) en un estudio de vigilancia del virus de la Coriomeningitis linfocítica (LCMV), en roedores del departamento de

Córdoba. Se encontró que la seroprevalencia de anticuerpos IgG contra LCMV en *Mus musculus*, roedores de la subfamilia *Sigmodontinae* fue del 0%. La ausencia de animales seropositivos no indica que el virus no se encuentre en circulación, al contrario el modelo de estudio propuesto puede implementarse en otras zonas de Colombia. Es importante resaltar que en Colombia se detectó por primera vez la evidencia molecular del virus de la Coriomeningitis linfocítica en roedores *Mus musculus* en el municipio de Sincelejo departamento de Sucre; ellos lograron detectar genoma viral por RT-PCR amplificando una región del segmento S de *Mammarenavirus* en 16 muestras de cerebro; estos resultados demostraron la circulación e infección del virus de la coriomeningitis linfocítica en humanos podría ocurrir en el área urbana de Sincelejo (Castellar et al., 2017).

En este estudio no se pudo detectar genoma viral de *Phlebovirus* ni *Orthobunyavirus* en los 283 murciélagos y 120 roedores capturados, indicando que no se encontró infección natural de *Phlebovirus* y *Orthobunyavirus* en los tejidos de roedores y murciélagos muestreados. De otro lado, no se conoce que tan transitoria o permanente es la viremia en los murciélagos y roedores. Un estudio sobre este aspecto sería importante pero costoso, pues se tendrían que capturar, marcar y posteriormente liberar los murciélagos y roedores para establecer la infección natural. (Strandin et al., 2020).

En la región Caribe la circulación de estos dos arbovirus es baja, asociado a murciélagos y roedores (Groot, 2017). Sin embargo Colombia alberga especies importantes de moscas phlebotominas, dentro de las cuales *Psychodopygus panamensis*, *Nyssomyia trapidoi*, *Lutzomyia gomezi*, *Nyssomyia ylephiletor*, *Lutzomyia sanguinaria* y *Psychodopygus thula*, han sido implicadas como vectores para la transmisión de *Phlebovirus* a una amplia gama de animales y humanos (De Carvalho et al., 2018; Marklewitz et al., 2019b; Nunes-Neto et al., 2017).

Para el caso del virus del valle de Rift el reservorio vertebrado natural no se conoce, sin embargo, fue aislado de murciélagos (Fagre & Kading, 2019; Mourya et al., 2014).

En el presente estudio se observó por electroforesis una banda de un amplicón de 244pb de *Phlebovirus* en una muestra de tejido de hígado de murciélagos, sin embargo posteriormente no se pudo observar nuevamente esa banda en nuevas extracciones del mismo tejido, Al respecto, es importante considerar que dentro de las desventajas de trabajar en campo es la reducción de la carga viral en muestras de tejidos, además que

estos virus su genoma es RNA segmentados, y el RNA es una molécula altamente inestabilidad y que requiere de un buen proceso de almacenamiento, y su uso en la extracción y RT-PCR requiere cadena de frío. Asegurarse de tener estas condiciones son importantes para que las muestras no se vean comprometidas y así obtener resultados confiables (Demchyshyna et al., 2020).

Con relación al género *Orthobunyavirus*, el género del virus *Orthobunya* es el más grande dentro de la familia *Bunyaviridae* con más de 160 miembros descritos. La mayoría de los *Orthobunyavirus* son transmitidos por mosquitos con pequeños mamíferos que sirven generalmente como anfitriones amplificadores (Lanciotti et al., 2013). En este trabajo no se detectó genoma viral, por lo tanto se sigue desconociendo el papel que juegan los animales silvestres en el mantenimiento del ciclo de estos virus.

En conclusión, en muestras de roedores y murciélagos de algunas zonas del Caribe Colombiano no se pudo detectar, confirmar por RT-PCR y técnicas de NGS la presencia y caracterización de *Orthohantavirus*, *Phlebovirus*, *Orthobunyavirus* y *Arenavirus*. Sin embargo, la metodología de detección molecular usada en pequeños mamíferos silvestres es muy importante para la vigilancia activa de virus emergentes en estas especies silvestres que podrían ser hospederos para estos patógenos de importancia en la salud pública.

6. Conclusiones y recomendaciones

6.1 Conclusiones

En este trabajo, no se detectaron *Orthohantavirus*, *Phlebovirus*, *Mammarenavirus* y *Orthobunyavirus* en 120 roedores y 283 murciélagos en los departamentos de Córdoba, Sucre y la Guajira.

La metodología de detección molecular usada en este estudio es importante en las vigilancias ecoepidemiológicas para el control de patógenos emergentes y reemergentes en roedores y murciélagos del Caribe Colombiano.

Este es el primer estudio en Colombia que incluye la búsqueda de *Phlebovirus*, y *Orthobunyavirus* en roedores y murciélagos en algunas áreas del caribe colombiano.

6.2 Recomendaciones

Realizar muestreos sistemáticos en la misma área, que impliquen mayor número de especímenes y en diferentes épocas del año.

A pesar de los resultados prometedores de las pruebas de PCR, se requiere de un mayor número de estudios, uno de ellos es probar con otros segmentos del genoma de *Orthohantavirus* como el segmento L. Estudios de la caracterización del segmento L del genoma de ARN, revelan que este segmento tiene 6.533 nucleótidos de longitud y contiene un único marco de lectura abierto (ORF) de 6.456 nucleótidos en el sentido antigénico que codifica la ARN polimerasa dependiente de ARN viral, que tiene 2.153 aminoácidos de largo con una masa molecular prevista de 246 kDa.

Realizar análisis entre las variables climáticas y la presentación de infecciones en fauna silvestre y animales de interés que permitan establecer modelos predictivos.

Realizar muestreos en diferentes áreas de Colombia para hacer análisis de comparación y detección en roedores y murciélagos con el fin de abarcar un mayor número de hábitats.

Los resultados obtenidos justifican la necesidad de seguir haciendo estudios ecoepidemiológicos en animales silvestres, vectores que permitan demostrar un ciclo enzoótico de patógenos emergentes y re-emergentes de impacto en salud pública.

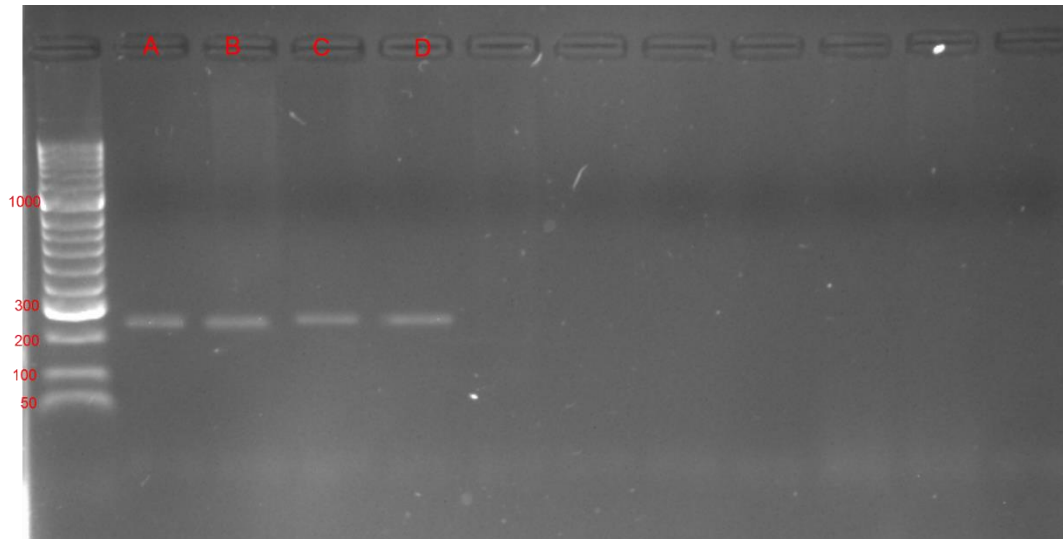
Implementar el uso de la PCR en tiempo real y la secuenciación de nueva generación en estudio de vectores y hospederos.

Anexos

Anexo A. Condiciones de la PCR del gen de la beta-actina como control interno.

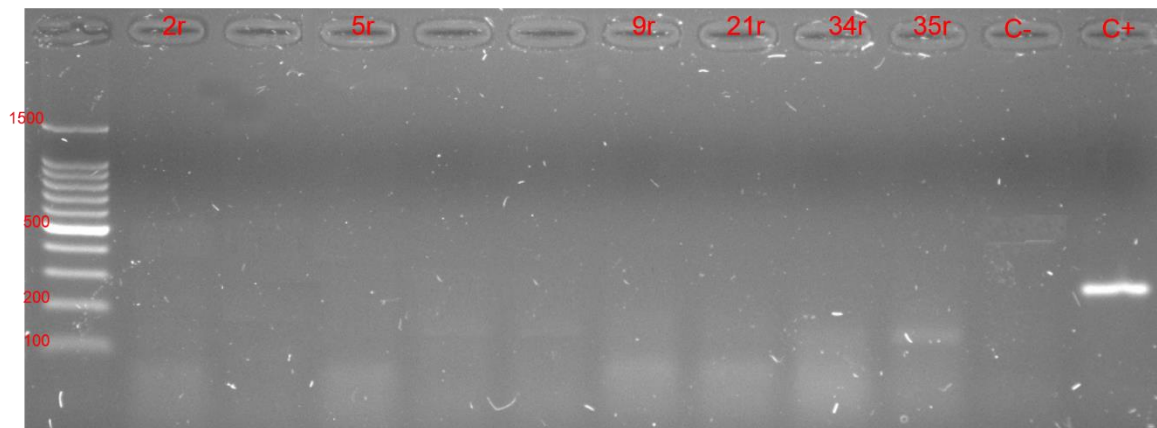
Reactivos	[] inicial	Volumen de reacción
Buffer	10 x	10 μ l
MgCl ₂	25 mM	5 μ l
dNTPs	10 mM	2 μ l
Taq ADN polimerasa	5 U/mL	0,3 μ l
B-actina3	100 mM	1 μ l
B-actina4	100 mM	1 μ l
Agua ultra pura	—	27,2 μ l
DNAc	—	3,5 μ l
Volumen final	—	50 μ l

Anexo B. Gel de agarosa con controles positivos para *Orthohantavirus*. A (Necocli virus), B (Rio mamore virus), C (Sin nombre virus), D (Rio mamore virus 2).



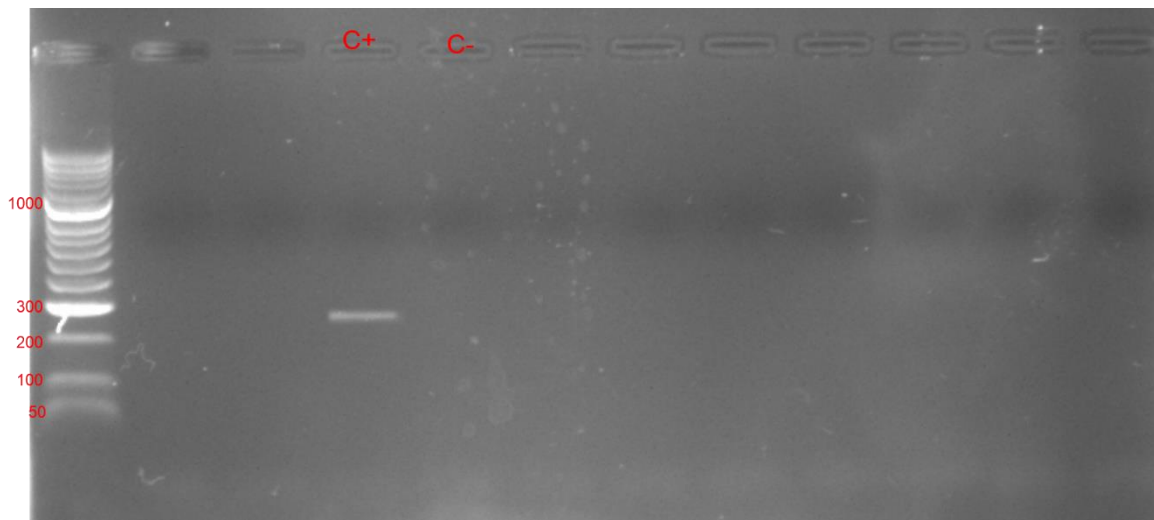
Marcador de peso usado en la electroforesis fue de 50 pb para los controles positivos de *Orthohantavirus*.

Anexo C. Gel de agarosa con control positivo para *Phlebovirus*.



Marcador de peso usado en la electroforesis fue de 100 pb para el control positivo de *Phebovirus*.

Anexo D. Gel de agarosa con control positivo para Mammarenavirus.



Marcador de peso usado en la electroforesis fue de 100 pb para el control positivo de *Mammarenavirus*.

Bibliografía

- Abudurexiti, A., Adkins, S., Alioto, D., Alkhovsky, S. V., Avšič-Županc, T., Ballinger, M. J., ... Kuhn, J. H. (2019a). Taxonomy of the order Bunyavirales: update 2019. *Archives of Virology*, 164(7), 1949–1965.
<https://doi.org/10.1007/s00705-019-04253-6>
- Abudurexiti, A., Adkins, S., Alioto, D., Alkhovsky, S. V., Avšič-Županc, T., Ballinger, M. J., ... Kuhn, J. H. (2019b). Taxonomy of the order Bunyavirales: update 2019. *Archives of Virology*, 164(7), 1949–1965.
<https://doi.org/10.1007/s00705-019-04253-6>
- Acero-Aguilar, M. (2016). Zoonosis y otros problemas de salud pública relacionados con los animales: Reflexiones a propósito de sus aproximaciones teóricas y metodológicas. *Revista Gerencia y Políticas de Salud*, 15(31), 232–245. <https://doi.org/10.11144/Javeriana.rgyps15-31.zpsp>
- Acevedo, M. de los Á., & Arrivillaga, J. (2008). Eco-epidemiología de flebovirus (Bunyaviridae, Phlebovirus) transmitidos por flebótomos (Psychodidae, Phlebotominae). *Boletín de Malariología y Salud Ambiental*, 48(1), 3–16.
- Albornoz, A., Hoffmann, A. B., Lozach, P. Y., & Tischler, N. D. (2016). Early bunyavirus-host cell interactions. *Viruses*, 8(5).
<https://doi.org/10.3390/v8050143>
- Alemán, A., Iguarán, H., Puerta, H., Cantillo, C., Mills, J., Ariz, W., & Mattar, S.

- (2006). [First serological evidence of Hantavirus infection in rodents in Colombia]. *Revista de Salud Publica (Bogota, Colombia)*, 8 Suppl 1(1), 1–12. <https://doi.org/10.1590/S0124-00642006000400001>
- Alkan, C., Bichaud, L., De Lamballerie, X., Alten, B., Gould, E. A., & Charrel, R. N. (2013). Sandfly-borne phleboviruses of Eurasia and Africa: Epidemiology, genetic diversity, geographic range, control measures. *Antiviral Research*, 100(1), 54–74. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.07.005>
- Almendra, A. L., González-Cózatl, F. X., Engstrom, M. D., & Rogers, D. S. (2018). Evolutionary relationships and climatic niche evolution in the genus *Handleyomys* (Sigmodontinae: Oryzomyini). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 128(June 2017), 12–25. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.06.018>
- Amaral, C. D., Costa, G. B., de Souza, W. M., Alves, P. A., Borges, I. A., Tolardo, A. L., ... de Souza Trindade, G. (2018a). Silent Orthohantavirus Circulation Among Humans and Small Mammals from Central Minas Gerais, Brazil. *EcoHealth*, 15(3), 577–589. <https://doi.org/10.1007/s10393-018-1353-2>
- Amaral, C. D., Costa, G. B., de Souza, W. M., Alves, P. A., Borges, I. A., Tolardo, A. L., ... de Souza Trindade, G. (2018b). Silent Orthohantavirus Circulation Among Humans and Small Mammals from Central Minas Gerais, Brazil. *EcoHealth*, 15(3), 577–589. <https://doi.org/10.1007/s10393-018-1353-2>
- Arai, S., & Yanagihara, R. (2020). Genetic diversity and geographic distribution of

bat-borne hantaviruses. *Current Issues in Molecular Biology*, 39(February), 1–28. <https://doi.org/10.21775/cimb.039.001>

Arroyave, Rodas, J. D., & Salazar, J. (2014). _____ 1. 3(Lcmv), 5–14.

Ballinger, M. J., Bruenn, J. A., Hay, J., Czechowski, D., & Taylor, D. J. (2014). Discovery and Evolution of Bunyavirids in Arctic Phantom Midges and Ancient Bunyavirid-Like Sequences in Insect Genomes. *Journal of Virology*, 88(16), 8783–8794. <https://doi.org/10.1128/jvi.00531-14>

Bandouchova, H., Bartonička, T., Berkova, H., Brichta, J., Kokurewicz, T., Kovacova, V., ... Zukal, J. (2018). Alterations in the health of hibernating bats under pathogen pressure. *Scientific Reports*, 8(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24461-5>

Barrios, J. M., Rego-García, I., Muñoz Martínez, C., Romero-Fábrega, J. C., Rivero Rodríguez, M., Ruiz Giménez, J. A., ... Fernández Pérez, M. D. (2020). Ischaemic stroke and SARS-CoV-2 infection: A causal or incidental association? *Neurologia*, 35(5), 295–302. <https://doi.org/10.1016/j.nrl.2020.05.002>

Battisti, A. J., Chu, Y.-K., Chipman, P. R., Kaufmann, B., Jonsson, C. B., & Rossmann, M. G. (2011). Structural Studies of Hantaan Virus. *Journal of Virology*, 85(2), 835–841. <https://doi.org/10.1128/jvi.01847-10>

Bennett, R. S., Ton, D. R., Hanson, C. T., Murphy, B. R., & Whitehead, S. S.

- (2007). Genome sequence analysis of La Crosse virus and in vitro and in vivo phenotypes. *Virology Journal*, 4, 1–10. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-4-41>
- Blanco, P., Arroyo, S., & Corrales, H. (2012). *Evidencia serológica de infección por hantavirus in rodents from the Sucre Department in Colombia*. 14(5), 755–764.
- Blanco, P., Corrales, A., & Castellar, A. (2013). Hantavirus (Bunyaviridae: Hantavirus) en roedores murinos de Sincelejo, departamento de Sucre. *Revista Colombiana de Ciencia Animal - RECIA*, 5(2), 408. <https://doi.org/10.24188/recia.v5.n2.2013.452>
- Bodewes, R., Kik, M. J. L., Stalin Raj, V., Schapendonk, C. M. E., Haagmans, B. L., Smits, S. L., & Osterhaus, A. D. M. E. (2013). Detection of novel divergent arenaviruses in boid snakes with inclusion body disease in The Netherlands. *Journal of General Virology*, 94(PART 6), 1206–1210. <https://doi.org/10.1099/vir.0.051995-0>
- Bonvicino, C., Oliveira, J., & D'Andrea, O. (2008). Guia dos Roedores do Brasil. *Rio de Janeiro: Or*, 120. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Guia+dos+roedores+do+Brasil#1>
- Briese, T., Calisher, C. H., & Higgs, S. (2013). Viruses of the family Bunyaviridae: Are all available isolates reassortants? *Virology*, 446(1–2), 207–216.

<https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.07.030>

Brook, C. E., & Dobson, A. P. (2015). Bats as “special” reservoirs for emerging zoonotic pathogens. *Trends in Microbiology*, 23(3), 172–180.

<https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.12.004>

Cabello C, C., & Cabello C, F. (2008). Zoonosis con reservorios silvestres: Amenazas a la salud pública y a la economía. *Revista Medica de Chile*, 136(3), 385–393. <https://doi.org/10.4067/s0034-98872008000300016>

Calderon, A., Guzman, C., Salazar, J., Figueiredo, L. T., & Mattar, S. (2016). Viral Zoonoses That Fly with Bats: A Review. *MANTER: Journal of Parasite Biodiversity*. <https://doi.org/10.13014/k2bg2kwf>

Calisher, C. H., Childs, J. E., Field, H. E., Holmes, K. V., & Schountz, T. (2006). Bats: Important reservoir hosts of emerging viruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 19(3), 531–545. <https://doi.org/10.1128/CMR.00017-06>

Castellar, A., Guevara, M., Rodas, J. D., Londoño, A. F., Arroyave, E., Díaz, F. J., ... Blanco, P. J. (2017). Primera evidencia de infección por el virus de la coriomeningitis linfocítica (arenavirus) en roedores *Mus musculus* capturados en la zona urbana del municipio de Sincelejo, Sucre, Colombia. *Biomedica*, 37, 75–85. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v37i2.3226>

Charrel, R. N., Gallian, P., Navarro-Marí, J. M., Nicoletti, L., Papa, A., Sánchez-Seco, M. P., ... De Lamballerie, X. (2005). Emergence of Toscana virus in

-
- Europe. *Emerging Infectious Diseases*, 11(11), 1657–1663.
<https://doi.org/10.3201/eid1111.050869>
- Charrel, R. N., Lemasson, J. J., Garbutt, M., Khelifa, R., De Micco, P., Feldmann, H., & De Lamballerie, X. (2003). New insights into the evolutionary relationships between arenaviruses provided by comparative analysis of small and large segment sequences. *Virology*, 317(2), 191–196.
<https://doi.org/10.1016/j.virol.2003.08.016>
- Ciota, A. T. (2019). The role of co-infection and swarm dynamics in arbovirus transmission. *Virus Research*, 265(March), 88–93.
<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2019.03.010>
- Colombo, V. C., Brignone, J., Sen, C., Previtali, M. A., Martin, M. L., Levis, S., ... Beldomenico, P. M. (2019). Orthohantavirus genotype Lechiguanas in *Oligoryzomys nigripes* (Rodentia: Cricetidae): New evidence of host-switching. *Acta Tropica*, 191(December 2018), 133–138.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.12.040>
- Crispin, M., Zeltina, A., Zitzmann, N., & Bowden, T. A. (2016). Native functionality and therapeutic targeting of arenaviral glycoproteins. *Current Opinion in Virology*, 18(Figure 2), 70–75. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.04.001>
- Cunningham, A. A., Daszak, P., & Wood, J. L. N. (2017). One health, emerging infectious diseases and wildlife: Two decades of progress? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 372(1725).

<https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0167>

D'Elfa, G., Pardiñas, U. F. J., Jayat, J. P., & Salazar-Bravo, J. (2008). Systematics of *Necromys* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae): species limits and groups, with comments on historical biogeography. *Journal of Mammalogy*, 89(3), 778–790. <https://doi.org/10.1644/07-mamm-a-246r1.1>

Dabanch, J. (2013). Zoonosis. *Rev Chil Infect*, 20(Supl 1), 5. Retrieved from <https://scielo.conicyt.cl/pdf/rci/v20s1/art08.pdf>

De Araujo, J., Thomazelli, L. M., Henriques, D. A., Lautenschlager, D., Ometto, T., Dutra, L. M., ... Durigon, E. L. (2012). Detection of hantavirus in bats from remaining rain forest in São Paulo, Brazil. *BMC Research Notes*, 5. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-690>

De Carvalho, M. S., De Lara Pinto, A. Z., Pinheiro, A., Rodrigues, J. S. V., Melo, F. L., Da Silva, L. A., ... Dezengrini-Slhessarenko, R. (2018). *Viola* phlebovirus is a novel *Phlebotomus* fever serogroup member identified in *Lutzomyia* (*Lutzomyia*) *longipalpis* from Brazilian Pantanal. *Parasites and Vectors*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2985-3>

Delgado, S., Erickson, B. R., Agudo, R., Blair, P. J., Vallejo, E., Albariño, C. G., ... Nichol, S. T. (2008). Chapare virus, a newly discovered arenavirus isolated from a fatal hemorrhagic fever case in Bolivia. *PLoS Pathogens*, 4(4), 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000047>

-
- Demchyshyna, I. V., Glass, G. E., Hluzd, O. A., Kutseva, V. V., Taylor, M. K., Williams, E. P., ... Jonsson, C. B. (2020). Cocirculation of two orthohantavirus species in small mammals of the Northwestern Ukraine. *Journal of Wildlife Diseases*, *56*(3), 640–645. <https://doi.org/10.7589/2019-09-238>
- Eitan, O., Kosa, G., & Yovel, Y. (2019). Sensory gaze stabilization in echolocating bats. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *286*(1913). <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.1496>
- Ejiri, H., Lim, C. K., Isawa, H., Yamaguchi, Y., Fujita, R., Takayama-Ito, M., ... Sawabe, K. (2018). Isolation and characterization of Kabuto Mountain virus, a new tick-borne phlebovirus from *Haemaphysalis flava* ticks in Japan. *Virus Research*, *244*(November 2017), 252–261. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017.11.030>
- Elelu, N., Aiyedun, J. O., Mohammed, I. G., Oludairo, O. O., Odetokun, I. A., Mohammed, K. M., ... Nuru, S. (2019). Neglected zoonotic diseases in nigeria: Role of the public health veterinarian. *Pan African Medical Journal*, *32*, 1–12. <https://doi.org/10.11604/pamj.2019.32.36.15659>
- Elliott, R. M. (2014). Orthobunyaviruses: recent genetic and structural insights. *Nature Reviews. Microbiology*, *12*(10), 673–685. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3332>
- Fagre, A. C., & Kading, R. C. (2019). Can bats serve as reservoirs for Arboviruses? *Viruses*, *11*(3). <https://doi.org/10.3390/v11030215>

- Fernandes, J., de Oliveira, R. C., Guterres, A., Barreto-Vieira, D. F., Terças, A. C. P., Teixeira, B. R., ... de Lemos, E. R. S. (2018). Detection of Latino virus (Arenaviridae: Mammarenavirus) naturally infecting *Calomys callidus*. *Acta Tropica*, 179(October 2017), 17–24.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.12.003>
- Figueiredo, G. G., Borges, A. A., Campos, G. M., Machado, A. M., Saggiaro, F. P., Sabino, S., ... Figueiredo, L. T. M. (2010). Diagnosis of hantavirus infection in humans and rodents in Ribeirão. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 43(4), 348–354.
- Flores, Carter, G. G., Halczok, T. K., Kerth, G., & Page, R. A. (2020). Social structure and relatedness in the fringe-lipped bat (*Trachops cirrhosus*). *Royal Society Open Science*, 7(4). <https://doi.org/10.1098/rsos.192256>
- Flores, J. W., & Chumacero, L. M. (2010). Perspectivas sobre el origen y la filogenia de los murciélagos. *ContactoS*, 77, 5–9.
- Fukushi, S., Tani, H., Yoshikawa, T., Saijo, M., & Morikawa, S. (2012). Serological assays based on recombinant viral proteins for the diagnosis of arenavirus hemorrhagic fevers. *Viruses*, 4(10), 2097–2114.
<https://doi.org/10.3390/v4102097>
- Fulhorst, C. F., Cajimat, M. N. B., Utrera, A., Milazzo, M. L., & Duno, G. M. (2004). Maporal virus, a hantavirus associated with the fulvous pygmy rice rat

-
- (*Oligoryzomys fulvescens*) in western Venezuela. *Virus Research*, 104(2), 139–144. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2004.03.009>
- Garcin, D., Rochat, S., & Kolakofsky, D. (1993). The Tacaribe arenavirus small zinc finger protein is required for both mRNA synthesis and genome replication. *Journal of Virology*, 67(2), 807–812.
- Golender, N., Bumbarov, V. Y., Erster, O., Beer, M., Khinich, Y., & Wernike, K. (2018). Development and validation of a universal S-segment-based real-time RT-PCR assay for the detection of Simbu serogroup viruses. *Journal of Virological Methods*, 261(May), 80–85. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2018.08.008>
- Gorbunova, V., Seluanov, A., & Kennedy, B. K. (2020). The World Goes Bats: Living Longer and Tolerating Viruses. *Cell Metabolism*, 32(1), 31–43. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2020.06.013>
- Groot, H. (2017). Estudios sobre virus transmitidos por artrópodos en Colombia. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 41(Suplemento), 12. <https://doi.org/10.18257/raccefyn.565>
- Gryseels, S., Baird, S. J. E., Borremans, B., Makundi, R., Leirs, H., & Goüy de Bellocq, J. (2017). When Viruses Don't Go Viral: The Importance of Host Phylogeographic Structure in the Spatial Spread of Arenaviruses. *PLoS Pathogens*, 13(1), 1–22. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006073>

- Guzmán, C., Calderón, A., González, M., & Mattar, S. (2017). Infecciones por hantavirus. *Revista MVZ Córdoba*, 22, 6101–6117.
<https://doi.org/10.21897/rmvz.1079>
- Guzmán, C., Mattar, S., Levis, S., Pini, N., Figueiredo, T., Mills, J., & Salazar-Bravo, J. (2013). Prevalence of antibody to hantaviruses in humans and rodents in the Caribbean region of Colombia determined using Araraquara and Maciel virus antigens. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 108(2), 167–171. <https://doi.org/10.1590/0074-0276108022013007>
- Hanadhita, D., Rahma, A., Prawira, A. Y., Mayasari, N. L. P. I., Satyaningtijas, A. S., Hondo, E., & Agungpriyono, S. (2019). The spleen morphophysiology of fruit bats. *Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia*, 48(4), 315–324. <https://doi.org/10.1111/ahe.12442>
- Hancke, D., & Suárez, O. V. (2018). Structure of parasite communities in urban environments: The case of helminths in synanthropic rodents. *Folia Parasitologica*, 65. <https://doi.org/10.14411/fp.2018.009>
- Hepojoki, J., Salmenperä, P., Sironen, T., Hetzel, U., Korzyukov, Y., Kipar, A., & Vapalahti, O. (2015). Arenavirus Coinfections Are Common in Snakes with Boid Inclusion Body Disease. *Journal of Virology*, 89(16), 8657–8660.
<https://doi.org/10.1128/jvi.01112-15>
- Hetzel, U., Sironen, T., Laurinmaki, P., Liljeroos, L., Patjas, A., Henttonen, H., ...

-
- Hepojoki, J. (2013). Isolation, Identification, and Characterization of Novel Arenaviruses, the Etiological Agents of Boid Inclusion Body Disease. *Journal of Virology*, 87(20), 10918–10935. <https://doi.org/10.1128/jvi.01123-13>
- Higgins, R. (2004). Emerging or re-emerging bacterial zoonotic diseases: bartonellosis, leptospirosis, Lyme borreliosis, plague. In *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz* (Vol. 23).
- Hinson, E. R., Shone, S. M., Zink, M. C., Glass, G. E., & Klien, S. L. (2004). Wounding: The primary mode of Seoul virus transmission among male Norway rats. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 70(3), 310–317. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2004.70.310>
- Holmes, E. C. (2007). Viral evolution in the genomic age. *PLoS Biology*, 5(10), 2104–2105. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050278>
- Hughes, H. R., Adkins, S., Alkhovskiy, S., Beer, M., Blair, C., Calisher, C. H., ... Ictv Report Consortium. (2020). ICTV Virus Taxonomy Profile: Peribunyaviridae. *The Journal of General Virology*, 101(1), 1–2. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001365>
- Hughes, H. R., Lanciotti, R. S., Blair, C. D., & Lambert, A. J. (2017). Full genomic characterization of California serogroup viruses, genus Orthobunyavirus, family Peribunyaviridae including phylogenetic relationships. *Virology*, 512(October), 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.09.022>

- Huiskonen, J. T., Hepojoki, J., Laurinmaki, P., Vaheri, A., Lankinen, H., Butcher, S. J., & Grunewald, K. (2010). Electron Cryotomography of Tula Hantavirus Suggests a Unique Assembly Paradigm for Enveloped Viruses. *Journal of Virology*, *84*(10), 4889–4897. <https://doi.org/10.1128/jvi.00057-10>
- Illumina. (2011). Sequencing Library qPCR Quantification Guide. *Illumina Technical Manuals*, (February), 1–27.
- Illumina. (2015). TruSeq RNA Sample Preparation v2 Guide. *Illumina*, *3*(2), 141–148. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2015.06.003>
- İnci, A., Doğanay, M., Özdarendeli, A., Düzlü, Ö., & Yıldırım, A. (2018). Overview of Zoonotic Diseases in Turkey: The One Health Concept and Future Threats. *Turkiye Parazitoloji Dergisi*, *42*(1), 39–80. <https://doi.org/10.5152/tpd.2018.5701>
- Ippolito, G., Feldmann, H., Lanini, S., Vairo, F., Di Caro, A., Capobianchi, M. R., & Nicastri, E. (2012). Viral hemorrhagic fevers: Advancing the level of treatment. *BMC Medicine*, *10*. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-10-31>
- Jesús Ballesteros, C., & Racero-Casarrubia, J. (2012). Murciélagos del área urbana en la ciudad de Montería, Córdoba - Colombia. *Revista MVZ Cordoba*, *17*(3), 3193–3199.
- Johnston, S. C., Zhang, H., Messina, L. M., Lawton, M. T., & Dean, D. (2005). *Chlamydia pneumoniae* burden in carotid arteries is associated with

- upregulation of plaque interleukin-6 and elevated C-reactive protein in serum. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 25(12), 2648–2653. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000189157.88630.d1>
- Jones, G., Jacobs, D. S., Kunz, T. H., Wilig, M. R., & Racey, P. A. (2009). Carpe noctem: The importance of bats as bioindicators. *Endangered Species Research*, 8(1–2), 93–115. <https://doi.org/10.3354/esr00182>
- Jonsson, C. B., Figueiredo, L. T. M., & Vapalahti, O. (2010). A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 23(2), 412–441. <https://doi.org/10.1128/CMR.00062-09>
- Karesh, W. B., Dobson, A., Lloyd-Smith, J. O., Lubroth, J., Dixon, M. A., Bennett, M., ... Heymann, D. L. (2012). Ecology of zoonoses: Natural and unnatural histories. *The Lancet*, 380(9857), 1936–1945. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61678-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61678-X)
- Kim, D., Langmead, B., & Salzberg, S. L. (2015). HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements Daehwan HHS Public Access. *Nature Methods*, 12(4), 357–360. <https://doi.org/10.1016/j.bbim.2017.04.008>
- Kosoy, M., Khlyap, L., Cosson, J. F., & Morand, S. (2015). Aboriginal and invasive rats of genus *Rattus* as hosts of infectious agents. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 15(1), 3–12. <https://doi.org/10.1089/vbz.2014.1629>
- Kruger, D. H., Figueiredo, L. T. M., Song, J. W., & Klempa, B. (2015).

Hantaviruses-Globally emerging pathogens. *Journal of Clinical Virology*, *64*, 128–136. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.033>

Kukkonen, S. K. J., Vaheri, A., & Plyusnin, A. (2005). L protein, the RNA-dependent RNA polymerase of hantaviruses. *Archives of Virology*, *150*(3), 533–556. <https://doi.org/10.1007/s00705-004-0414-8>

Kuno, G., Mitchell, C. J., Chang, G. J., & Smith, G. C. (1996). Detecting bunyaviruses of the Bunyamwera and California serogroups by a PCR technique . Updated information and services can be found at : These include : Detecting Bunyaviruses of the Bunyamwera and California Serogroups by a PCR Technique. *Journal of Clinical Microbiology*, *34*(5), 1184–1188. <https://doi.org/10.1145/800027.808431>

Laenen, L., Vergote, V., Calisher, C. H., Klempa, B., Klingström, J., Kuhn, J. H., & Maes, P. (n.d.). *Hantaviridae : Current Classification and Future Perspectives*. 1–17.

Lambert, A. J., & Lanciotti, R. S. (2009). Consensus amplification and novel multiplex sequencing method for S segment species identification of 47 viruses of the Orthobunyavirus, Phlebovirus, and Nairovirus genera of the family Bunyaviridae. *Journal of Clinical Microbiology*, *47*(8), 2398–2404. <https://doi.org/10.1128/JCM.00182-09>

Lanciotti, R. S., Kosoy, O. I., Bosco-Lauth, A. M., Pohl, J., Stuchlik, O., Reed, M.,

- & Lambert, A. J. (2013). Isolation of a novel orthobunyavirus (Brazoran virus) with a 1.7kb S segment that encodes a unique nucleocapsid protein possessing two putative functional domains. *Virology*, *444*(1–2), 55–63. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.05.031>
- Lee, Baek, L. J., & Johnson, K. M. (1982). Isolation of Hantaan Virus, the Etiologic Agent of Korean Hemorrhagic Fever, from Wild Urban Rats. *Journal of Infectious Diseases*, *146*(5), 638–644. <https://doi.org/10.1093/infdis/146.5.638>
- Lee, Lee, P. W., & Johnson, K. M. (2004). Isolation of the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever. 1978. *The Journal of Infectious Diseases*, *190*(9), 1711–1721. <https://doi.org/10.1093/infdis/190.9.1711>
- Lee, S. H., Kim, W. K., Park, K., No, J. S., Lee, G. Y., Kim, H. C., ... Song, J. W. (2020). Genetic diversity and phylogeography of Jeju Orthohantavirus (Hantaviridae) in the Republic of Korea. *Virology*, *543*(September 2019), 13–19. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2020.01.012>
- Linares, J. 1998. Roedores, Sociedad Conservacionista Audubon de Venezuela. Mamiferos de Venuezula, Caracas, 205-348.
- Li, Q., Guan, X., Wu, P., Wang, X., Zhou, L., Tong, Y., ... Feng, Z. (2020). Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *New England Journal of Medicine*, *382*(13), 1199–1207. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001316>

- Liphardt, S. W., Kang, H. J., Dizney, L. J., Ruedas, L. A., Cook, J. A., & Yanagihara, R. (2019). Complex history of codiversification and host switching of a newfound soricid-borne orthohantavirus in north america. *Viruses*, 11(7). <https://doi.org/10.3390/v11070637>
- Liu, M. M., Li, L. L., Wang, X. F., & Duan, Z. J. (2017). Complete genome sequence of a novel variant of Wenzhou mammarenavirus. *Genome Announcements*, 5(47), 5–6. <https://doi.org/10.1128/genomeA.01303-17>
- Londoño, A. F., Levis, S., & Rodas, J. D. (2011). Hantavirus como agentes emergentes de importancia en Suramérica. *Biomedica*, 31(3), 451–464. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v31i3.370>
- López, N., Jácamo, R., & Franze, M. T. (2001). Transcription and RNA Replication of Tacaribe Virus Genome and Antigenome Analogs Require N and L Proteins: Z Protein Is an Inhibitor of These Processes. *Journal of Virology*, 75(24), 12241–12251. <https://doi.org/10.1128/jvi.75.24.12241-12251.2001>
- Lozach, P. Y., Kühbacher, A., Meier, R., Mancini, R., Bitto, D., Bouloy, M., & Helenius, A. (2011). DC-SIGN as a receptor for phleboviruses. *Cell Host and Microbe*, 10(1), 75–88. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.06.007>
- Lozano, J. C., Mattar, S., Guzmán, C., & Calderón, A. (2017). Infecciones por arenavirus. *Revista MVZ Córdoba*, 22(supl), 6089. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1078>

-
- Luis, A. D., Hayman, D. T. S., O’Shea, T. J., Cryan, P. M., Gilbert, A. T., Pulliam, J. R. C., ... Webb, C. T. (2013). A comparison of bats and rodents as reservoirs of zoonotic viruses: Are bats special? *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280(1756).
<https://doi.org/10.1098/rspb.2012.2753>
- Maes, P., Alkhovsky, S. V., Bào, Y., Beer, M., Birkhead, M., Briese, T., ... Kuhn, J. H. (2018). Taxonomy of the family Arenaviridae and the order Bunyavirales: update 2018. *Archives of Virology*, 163(8), 2295–2310.
<https://doi.org/10.1007/s00705-018-3843-5>
- Mahmutovic, S., Clark, L., Levis, S. C., Briggiler, A. M., Enria, D. A., Harrison, S. C., & Abraham, J. (2015). Molecular Basis for Antibody-Mediated Neutralization of New World Hemorrhagic Fever Mammarenaviruses. *Cell Host and Microbe*, 18(6), 705–713.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.11.005>
- Marklewitz, M., Dutari, L. C., Paraskevopoulou, S., Page, R. A., Loaiza, J. R., & Junglen, S. (2019a). Diverse novel phleboviruses in sandflies from the Panama Canal area, Central Panama. *Journal of General Virology*, 100(6), 938–949. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001260>
- Marklewitz, M., Dutari, L. C., Paraskevopoulou, S., Page, R. A., Loaiza, J. R., & Junglen, S. (2019b). Diverse novel phleboviruses in sandflies from the Panama Canal area, Central Panama. *Journal of General Virology*, 100(6),

938–949. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001260>

Marklewitz, M., Zirkel, F., Rwego, I. B., Heidemann, H., Trippner, P., Kurth, A., ... Junglen, S. (2013). Discovery of a Unique Novel Clade of Mosquito-Associated Bunyaviruses. *Journal of Virology*, *87*(23), 12850–12865. <https://doi.org/10.1128/jvi.01862-13>

Martinez-Sobrido, L., Emonet, S., Giannakas, P., Cubitt, B., Garcia-Sastre, A., & de la Torre, J. C. (2009). Identification of Amino Acid Residues Critical for the Anti-Interferon Activity of the Nucleoprotein of the Prototypic Arenavirus Lymphocytic Choriomeningitis Virus. *Journal of Virology*, *83*(21), 11330–11340. <https://doi.org/10.1128/jvi.00763-09>

Matsuno, K., Kajihara, M., Nakao, R., Nao, N., Mori-Kajihara, A., Muramatsu, M., ... Ebihara, H. (2018). The Unique Phylogenetic Position of a Novel Tick-Borne Phlebovirus Ensures an Ixodid Origin of the Genus Phlebovirus . *MSphere*, *3*(3). <https://doi.org/10.1128/msphere.00239-18>

Mattar, S., Garzon, D., Tadeu, L., Faccini-Martínez, A. A., & Mills, J. N. (2014). Serological diagnosis of hantavirus pulmonary syndrome in a febrile patient in Colombia. *International Journal of Infectious Diseases*, *25*, 201–203. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.03.1396>

Mattar, S., & González, M. (2017). Los sorprendentes murciélagos: ¿Amigos, enemigos o aliados? *Revista MVZ Córdoba*, *22*(3), 6177.

- <https://doi.org/10.21897/rmvz.1125>
- Mattar, S., Guzmán, C., Arrazola, J., Soto, E., Barrios, J., Pini, N., ... Mills, J. N. (2011, July). Antibody to arenaviruses in rodents, Caribbean Colombia. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 17, pp. 1315–1317. <https://doi.org/10.3201/eid1707.101961>
- Mattar, S., Guzmán, C., Calderón, A., & González, M. (2017). Infecciones por arenavirus. *Revista MVZ Córdoba*, 22, 6089–6100. <https://doi.org/10.21897/rmvz.1078>
- Mattar, S., Tique, V., Miranda, J., Montes, E., & Garzon, D. (2017). Undifferentiated tropical febrile illness in Cordoba, Colombia: Not everything is dengue. *Journal of Infection and Public Health*, 10(5), 507–512. <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.09.014>
- Matthys, V. S., Gorbunova, E. E., Gavrillovskaya, I. N., & Mackow, E. R. (2010). Andes Virus Recognition of Human and Syrian Hamster 3 Integrins Is Determined by an L33P Substitution in the PSI Domain. *Journal of Virology*, 84(1), 352–360. <https://doi.org/10.1128/jvi.01013-09>
- McArthur, D. B. (2019). Emerging Infectious Diseases. *Nursing Clinics of North America*, 54(2), 297–311. <https://doi.org/10.1016/j.cnur.2019.02.006>
- McLay, L., Liang, Y., & Ly, H. (2014). Comparative analysis of disease pathogenesis and molecular mechanisms of New World and Old World

arenavirus infections. *Journal of General Virology*, 95(PART 1), 1–15.

<https://doi.org/10.1099/vir.0.057000-0>

Mills, J., Childs, J., Ksiazek, T., & Peters, C. J. (1998). Métodos para trampeo y muestreo de pequeños mamíferos para estudios virológicos. *Centros Para El Control y Prevención de Enfermedades de Los Estados Unidos de América*, 64.

Monroy, M. C., De La Ossa, A., & De La Ossa, J. (2015). Tasa De Atropellamiento De Fauna Silvestre En La Vía San Onofre – María La Baja , Caribe Colombiano Runover Rate. *Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas*, 1(27), 88–95. Retrieved from <http://www.ojs.asociacioncolombianadecienciasbiologicas.org/index.php/accb/article/view/106>

Monsalve, Mattar, & González. (2009). Zoonosis transmitidas por animales silvestres y su impacto en las enfermedades emergentes y reemergentes. *Revista MVZ Cordoba*, 14(2), 1762–1773.

Moreli, M. L., Moro De Sousa, R. L., & Figueiredo, L. T. M. (2004). Detection of Brazilian hantavirus by reverse transcription polymerase chain reaction amplification of N gene in patients with hantavirus cardiopulmonary syndrome. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 99(6), 633–638. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000600018>

-
- Moriconi, M., Rugna, G., Calzolari, M., Bellini, R., Albieri, A., Angelini, P., ...
Varani, S. (2017). Phlebotomine sand fly–borne pathogens in the
Mediterranean Basin: Human leishmaniasis and phlebovirus infections. *PLoS
Neglected Tropical Diseases*, *11*(8), 1–19.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005660>
- Mourya, D. T., Yadav, P. D., Basu, A., Shete, A., Patil, D. Y., Zawar, D., ...
Jadhav, S. M. (2014). Malsoor Virus, a Novel Bat Phlebovirus, Is Closely
Related to Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus and
Heartland Virus. *Journal of Virology*, *88*(6), 3605–3609.
<https://doi.org/10.1128/jvi.02617-13>
- Naveca, F. G., do Nascimento, V. A., de Souza, V. C., Nunes, B. T. D., Rodrigues,
D. S. G., & da Costa Vasconcelos, P. F. (2017). Multiplexed reverse
transcription real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection
of Mayaro, Oropouche, and oropouche-like viruses. *Memorias Do Instituto
Oswaldo Cruz*, *112*(7), 510–513. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160062>
- No, J. S., Kim, W. K., Cho, S., Lee, S. H., Kim, J. A., Lee, D., ... Song, J. W.
(2019). Comparison of targeted next-generation sequencing for whole-
genome sequencing of Hantaan orthohantavirus in *Apodemus agrarius* lung
tissues. *Scientific Reports*, *9*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-53043-2>
- Nunes-Neto, J. P., De Souza, W. M., Acrani, G. O., Romeiro, M. F., Fumagalli, M.,

- Vieira, L. C., ... Da Costa Vasconcelos, P. F. (2017). Characterization of the bujaru, frijoles and tapara antigenic complexes into the sandfly fever group and two unclassified phleboviruses from Brazil. *Journal of General Virology*, 98(4), 585–594. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000724>
- Nunes, M. R. T., Weaver, S. C., Tesh, R. B., & Vasconcelos, P. F. C. (2005). Molecular Epidemiology of Group C Viruses (Bunyaviridae). *Society*, 79(16), 10561–10570. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.16.10561>
- Overbeek, R., Olson, R., Pusch, G. D., Olsen, G. J., Davis, J. J., Disz, T., ... Stevens, R. (2014). The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Research*, 42(D1), 206–214. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1226>
- Paessler, S., & Walker, D. H. (2013). Pathogenesis of the Viral Hemorrhagic Fevers. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 8(1), 411–440. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020712-164041>
- Parvate, A., Williams, E. P., Taylor, M. K., Chu, Y. K., Lanman, J., Saphire, E. O., & Jonsson, C. B. (2019). Diverse morphology and structural features of old and New World hantaviruses. *Viruses*, 11(9). <https://doi.org/10.3390/v11090862>
- Piacenza, M. F., Calderón, G. E., Enría, D., Provencal, M. C., & Polop, J. J. (2018). Diferencia espacial de la incidencia de fiebre hemorrágica argentina y

-
- la composición y abundancia de roedores en el ensamble. *Revista Chilena de Infectología*, 35(4), 386–394. <https://doi.org/10.4067/s0716-10182018000400386>
- Radford, A. D., Chapman, D., Dixon, L., Chantrey, J., Darby, A. C., & Hall, N. (2012). Application of next-generation sequencing technologies in virology. *Journal of General Virology*, 93(PART 9), 1853–1868. <https://doi.org/10.1099/vir.0.043182-0>
- Reguera, J., Gerlach, P., Rosenthal, M., Gaudon, S., Coscia, F., Günther, S., & Cusack, S. (2016). Comparative Structural and Functional Analysis of Bunyavirus and Arenavirus Cap-Snatching Endonucleases. *PLoS Pathogens*, 12(6), 1–24. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005636>
- Rengifo, E. M., Calderón, W., & Aquino, R. (2013). Características de refugios de algunas especies de murciélagos en la cuenca alta del río Itaya, Loreto, Perú. *UNED Research Journal*, 5(1), 143–150. <https://doi.org/10.22458/urj.v5i1.20>
- Restrepo, B., Rodas, J. D., Montoya-Ruiz, C., Zuluaga, A. M., Parra-Henao, G., & Agudelo-Flórez, P. (2016). Evidencia serológica retrospectiva de infecciones por *Leptospira* spp., dengue, hantavirus y arenavirus en indígenas Emberá-Katío, Colombia. *Revista Chilena de Infectología*, 33(4), 472–473. <https://doi.org/10.4067/S0716-10182016000400015>
- Rojek, J. M., & Kunz, S. (2008). Cell entry by human pathogenic arenaviruses. *Cellular Microbiology*, 10(4), 828–835. <https://doi.org/10.1111/j.1462->

5822.2007.01113.x

- Romero-Alvarez, D., & Escobar, L. E. (2018). Oropouche fever, an emergent disease from the Americas. *Microbes and Infection*, *20*(3), 135–146.
<https://doi.org/10.1016/j.micinf.2017.11.013>
- Sabino-Santos, G., Maia, F. G. M., Martins, R. B., Gagliardi, T. B., De Souza, W. M., Muylaert, R. L., ... Figueiredo, L. T. M. (2018). Natural infection of Neotropical bats with hantavirus in Brazil. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–8.
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-27442-w>
- Sahley, C. T., Cervantes, K., Pacheco, V., Salas, E., Paredes, D., & Alonso, A. (2015). Diet of a Sigmodontine Rodent Assemblage in a Peruvian Montane Forest. *Journal of Mammalogy*, *96*(5), 1071–1080.
<https://doi.org/10.1093/jmammal/gyv112>
- Sakkas, H., Bozidis, P., Franks, A., & Papadopoulou, C. (2018). Oropouche fever: A review. *Viruses*, *10*(4), 1–16. <https://doi.org/10.3390/v10040175>
- Salim Mattar, V., & Marco González, T. (2015). Oropouche virus: A virus present but ignored. *Revista MVZ Cordoba*, *20*(3), 4675–4676.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0702.2>
- Sánchez-Seco, M. P., Echevarría, J. M., Hernández, L., Estévez, D., Navarro-Marí, J. M., & Tenorio, A. (2003). Detection and identification of Toscana and other phleboviruses by RT-nested-PCR assays with degenerated primers.

-
- Journal of Medical Virology*, 71(1), 140–149.
<https://doi.org/10.1002/jmv.10465>
- Santos, R. I. M., Rodrigues, A. H., Silva, M. L., Mortara, R. A., Rossi, M. A., Jamur, M. C., ... Arruda, E. (2008). Oropouche virus entry into HeLa cells involves clathrin and requires endosomal acidification. *Virus Research*, 138(1–2), 139–143. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.08.016>
- Schlie, K., Strecker, T., & Garten, W. (2010). Maturation cleavage within the ectodomain of Lassa virus glycoprotein relies on stabilization by the cytoplasmic tail. *FEBS Letters*, 584(21), 4379–4382.
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.09.032>
- Shi, J., Hu, Z., Deng, F., & Shen, S. (2018). Tick-Borne Viruses. *Virologica Sinica*, 33(1), 21–43. <https://doi.org/10.1007/s12250-018-0019-0>
- Soto, E., & Mattar, S. (2010). Fiebres hemorrágicas por Arenavirus en Latinoamérica. *Salud Uninorte*, 26(2), 298–310.
- Spiegel, M., Plegge, T., & Pöhlmann, S. (2016). The role of phlebovirus glycoproteins in viral entry, assembly and release. *Viruses*, 8(7).
<https://doi.org/10.3390/v8070202>
- Stefan, C. P., Chase, K., Coyne, S., Kulesh, D. A., Minogue, T. D., & Koehler, J. W. (2016). Development of real-time reverse transcriptase qPCR assays for the detection of Punta Toro virus and Pichinde virus. *Virology Journal*, 13(1),

1–6. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0509-3>

Strandin, T., Smura, T., Ahola, P., Aaltonen, K., Sironen, T., Hepojoki, J., ...

Forbes, K. M. (2020). Orthohantavirus isolated in reservoir host cells displays minimal genetic changes and retains wild-type infection properties. *Viruses*, 12(4), 1–14. <https://doi.org/10.3390/v12040457>

Suárez Larreinaga, C. L., & Berdasquera Corcho, D. (2000). Enfermedades

emergentes y reemergentes: Factores causales y vigilancia. *Revista Cubana de Medicina General Integral*, 16(6), 593–597.

Subudhi, S., Rapin, N., & Misra, V. (2019). Immune system modulation and viral

persistence in bats: Understanding viral spillover. *Viruses*, 11(2).

<https://doi.org/10.3390/v11020192>

Tauro, L. B., de Souza, W. M., Rivarola, M. E., de Oliveira, R., Konigheim, B.,

Silva, S. P., ... Contigiani, M. S. (2019). Genomic characterization of orthobunyavirus of veterinary importance in America. *Infection, Genetics and Evolution*, 73(February), 205–209.

<https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.04.030>

Torii, S., Matsuno, K., Qiu, Y., Mori-Kajihara, A., Kajihara, M., Nakao, R., ... Sawa,

H. (2019). Infection of newly identified phleboviruses in ticks and wild animals in Hokkaido, Japan indicating tick-borne life cycles. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 10(2), 328–335. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.11.012>

Weaver, S. C., Salas, R. A., De Manzione, N., Fulhorst, C. F., Duno, G., Utrera, A., ... Tesh, R. B. (2000). Guanarito virus (Arenaviridae) isolates from endemic and outlying localities in Venezuela: Sequence comparisons among and within strains isolated from Venezuelan hemorrhagic fever patients and rodents. *Virology*, 266(1), 189–195. <https://doi.org/10.1006/viro.1999.0067>

Yadav, P. D., Nyayanit, D. A., Shete, A. M., Jain, S., Majumdar, T. P., Chaubal, G. Y., ... Mourya, D. T. (2019). Complete genome sequencing of Kaisodi virus isolated from ticks in India belonging to Phlebovirus genus, family Phenuiviridae. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 10(1), 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.08.012>

Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., ... Tan, W. (2020). A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, 382(8), 727–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>