

Tesis de Posgrado

Epidemiología molecular y caracterización genética del hantvirus Andes causante de síndrome pulmonar en Argentina

Edelstein, Alexis

2003

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias
Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Edelstein, Alexis. (2003). Epidemiología molecular y caracterización genética del hantvirus Andes causante de síndrome pulmonar en Argentina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3690_Edelstein.pdf

Cita tipo Chicago:

Edelstein, Alexis. "Epidemiología molecular y caracterización genética del hantvirus Andes causante de síndrome pulmonar en Argentina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2003.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3690_Edelstein.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Tesis para optar por el título de doctor de la Universidad de
Buenos Aires

**“Epidemiología molecular y caracterización
genética del hantavirus Andes causante de
Síndrome Pulmonar en Argentina”**

Autor:
Alexis Edelstein

Directora:
Dra. Paula Julieta Padula

Servicio de Biología Molecular
Departamento de Virología
Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas
A.N.L.I.S. “Dr. Carlos G. Malbrán”

2003

110 3 00

| | |
|---|-----------|
| ABREVIATURAS..... | 3 |
| RESUMEN..... | 5 |
| ABSTRACT..... | 8 |
| 1 INTRODUCCION..... | 11 |
| 1.1..Clasificación General..... | 11 |
| 1.2 Clasificación de los Hantavirus..... | 12 |
| 1.2.1 SPH y HFRS..... | 16 |
| 1.4 Transmisión de la enfermedad..... | 21 |
| 1.5 Propiedades Fisicoquímicas..... | 25 |
| 1.6 Estructura Genética..... | 26 |
| 1.7 Persistencia viral..... | 30 |
| 1.8 Analisis genético de los hantavirus..... | 32 |
| 1.9 Manifestaciones clínicas del SPH..... | 33 |
| 1.9.1 Período de incubación..... | 33 |
| 1.9.2 Manifestaciones clínicas..... | 34 |
| 1.9.3 Patogenia de los hantavirus en América..... | 36 |
| 1.9.4 Laboratorio..... | 37 |
| 1.9.5 Tratamiento..... | 38 |
| 1.9.6 Diagnóstico de SPH y diagnóstico diferencial..... | 39 |
| 1.9.7 Vacunas..... | 42 |
| 1.10 Hantavirus en Argentina..... | 44 |
| 2 OBJETIVOS..... | 46 |
| 2.1 Objetivo General..... | 46 |
| 2.1.1 Objetivos Particulares..... | 46 |
| 2.1.1.1 Caracterización genómica del virus Andes..... | 46 |
| 2.1.1.2 Estudio de los extremos de los segmentos del hantavirus Andes..... | 47 |
| 2.1.1.3 Estudio de Contagio interhumano del virus Andes...47 | 47 |
| 2.1.1.4 Comparación cepa transmisora vs no transmisora...48 | 48 |
| 3 MATERIALES Y METODOS..... | 49 |
| 3.1 Productos Químicos..... | 49 |
| 3.2 Material Radioactivo..... | 49 |
| 3.3 Cultivos Celulares..... | 49 |
| 3.4 Extracción de ARN Viral..... | 50 |
| 3.5 Síntesis de cADN viral y amplificación..... | 52 |
| 3.6 Aislamiento viral..... | 56 |
| 3.7 Electroforesis en Gel..... | 56 |
| 3.8 Purificación de Fragmentos de PCR..... | 58 |
| 3.9 Secuenciación..... | 58 |
| 3.10 Ligación del ARN viral..... | 60 |

| | |
|--|------------|
| 3.11 Clonado de los extremos..... | 63 |
| 3.12 Análisis filogenéticos..... | 63 |
| 3.12.1 Alineamiento..... | 63 |
| 3.12.2 Métodos filogenéticos..... | 64 |
| 3.12.3 Métodos para el estudio de recombinantes..... | 64 |
| 4 RESULTADOS..... | 65 |
| 4.1 Caracterización geonómica del virus Andes..... | 65 |
| 4.1.1 Caracterización inicial del virus Andes..... | 65 |
| 4.1.2 Identificación y caracterización en otras regiones geográficas..... | 66 |
| 4.1.2.1 Región Norte..... | 72 |
| 4.1.2.2 Región Sur..... | 74 |
| 4.1.2.3 Región Central..... | 76 |
| 4.2 Caracterización del segmento S..... | 78 |
| 4.2.1 Región 5' no codificante del segmento S..... | 81 |
| 4.2.2 Análisis de los marcos de lectura abierto..... | 82 |
| 4.3 Caracterización del segmento M..... | 83 |
| 4.4 Caracterización parcial del segmento L..... | 94 |
| 4.5 Análisis filogenético..... | 96 |
| 4.6 Análisis de los extremos genómicos..... | 99 |
| 4.6.1 Extremos genómicos de los segmentos S y M..... | 99 |
| 4.6.2 Extremos genómicos de los segmentos L..... | 100 |
| 4.7 Propiedades biológicas del virus Andes Sout. | 106 |
| 4.7.1 Transmisión interhumana..... | 106 |
| 4.7.1.1 Análisis comparativo de las secuencias..... | 106 |
| 4.7.1.2 Análisis filogenético de las secuencias de los casos de contagio interhumano..... | 112 |
| 4.8 Análisis de reasociantes virales..... | 114 |
| 4.9 Comparación cepa transmisora vs no transmisora..... | 120 |
| 4.10 Comparación genética del virus asociado a un caso de SPH y al de su roedor infectante..... | 127 |
| 5 DISCUSION..... | 130 |
| 6 BIBLIOGRAFIA..... | 140 |
| 7 ANEXO alineamiento glicoproteinas putativas G1 y G2..... | 154 |
| AGRADECIMIENTOS | 159 |

Abreviaturas

ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|---------------------------------------|
| °C | grados centígrados. |
| µg | microgramos. |
| µl | microlitros. |
| aa. | aminoácido. |
| AC | Anticuerpo |
| ADN | ácido desoxirribonucleico. |
| ARN | ácido ribonucleico. |
| cm ³ | centímetros cúbicos |
| cél. | célula. |
| DTT | ditiotritol. |
| EDTA | etilendiaminotetra acetato de sodio. |
| FHSR | Fiebre hemorrágica con síndrome renal |
| fig. | figura. |
| G1 | Glicoproteína G1 |
| G2 | Glicoproteína G2 |
| GPC | Precursor glicoprotéico |
| gr. | gramos |
| hr. | hora. |
| IFI | Inmunofluorescencia indirecta |
| Kb. | Kilobases. |
| kDa | kiloDalton (1000 Da). |
| Kpb | Kilo pares de bases. |
| mARN | ARN mensajero. |
| MEM | medio esencial mínimo. |
| mg | miligramo. |
| min | minutos. |
| ml | mililitro. |
| mM | milimolar. |
| mm ³ | milímetro cúbico |
| N | Nucleoproteína |
| pb | pares de bases |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| PBS | buffer salino de fosfatos. |
| PM | peso molecular. |
| pmoles | picomoles. |
| RNC | Región no codificante |
| r.p.m | revoluciones por minuto |
| SDS | dodecil sulfato de sodio. |
| SFB | Suero fetal bovino |
| SPH | Síndrome pulmonar por hantavirus |
| Tris | Tris [hidroximetil] aminometano. |

Abreviaturas de aminoácidos

| | | |
|--------------|-----|---|
| Alanina | Ala | A |
| Arginina | Arg | R |
| Asparagina | Asn | N |
| Aspartato | Asp | D |
| Cisteína | Cys | C |
| Fenilalanina | Phe | F |
| Glicina | Gly | G |
| Glutamato | Glu | E |
| Glutamina | Gln | Q |
| Histidina | His | H |
| Isoleucina | Ile | I |
| Leucina | Leu | L |
| Lisina | Lys | K |
| Metionina | Met | M |
| Prolina | Pro | P |
| Serina | Ser | S |
| Tirosina | Tyr | Y |
| Treonina | Thr | T |
| Triptofano | Trp | W |
| Valina | Val | V |

Nota: en este trabajo se utilizaron términos en inglés, de uso corriente en la literatura científica, cuando estos son de difícil traducción o carecen de un equivalente castellano ampliamente difundido.

Resumen

RESUMEN

A partir de una zoonosis emergente en el año 1995, se determinó la presencia de un hantavirus asociado al síndrome pulmonar en la Argentina, desconociéndose la magnitud del problema.

Este trabajo tiene como objetivo aportar al conocimiento de la infección por hantavirus, su replicación, transmisibilidad ecoepidemiología y caracterización de virus circulantes.

El estudio de la caracterización viral de las muestras humanas provenientes de distintas regiones geográficas determinó la existencia de 3 regiones endémicas asociadas a hantaviriosis responsables del SPH en nuestro país: La región Norte (Salta y Jujuy) donde se estableció la existencia del linaje viral AND Nort., la región Sur (Rio Negro, Chubut y Neuquén) donde circula el linaje AND Sout., y la región Central (Provincia de Buenos Aires) donde se detectaron los linajes AND Cent. Lec, AND Cent Plata y AND Cent Bs.As

Los distintos análisis filogenéticos realizados sobre las secuencias nucleotídicas de los segmentos genómicos S y M mostraron claramente la evolución monofilética de los hantavirus. En esta evolución, el antecesor del virus Andes sería el virus Laguna Negra. Este análisis filogenético es apoyado por el aparente desplazamiento migratorio realizado por los Sigmodontinos desde América del Norte hasta el extremo sur del continente.

Dentro del grupo Andes, la divergencia evolutiva no resultó tan clara, probablemente debido a que este grupo monofilético es de reciente radiación.

Se obtuvo por primera vez la secuencia completa del virus Andes amplificándose y secuenciándose los segmentos S y M correspondientes al genoma viral y una porción del segmento L. Del análisis de dicho genoma se identificó al virus Andes como una nueva especie viral.

Se determinó además para los 3 segmentos virales, la composición nucleotídica no putativa de sus extremos, responsables de la estabilidad del ARN viral y asociados además a su replicación / transcripción. A diferencia del segmento S, los segmentos M y L presentaron deleciones en ambos extremos posiblemente asociadas a la regulación de la persistencia viral.

El análisis del brote ocurrido en El Bolsón en el año 1996, demostró por primera vez en el mundo, la existencia de un hantavirus capaz de transmitirse a través de contacto interhumano. Esta vía de contagio representó un evento único entre los hantavirus del grupo renal y pulmonar, solamente asociada hasta el momento al linaje Andes Sout.

Con el objeto de determinar las posibles alteraciones genéticas asociadas a la vía de contagio interhumano hallada en Andes Sout, se amplificaron y secuenciaron en forma completa los segmentos S y M de un hantavirus perteneciente al linaje Andes Cent Plata, hasta el momento no asociado a contagio interhumano. La comparación de los segmentos S y M de las cepa transmisora y no transmisora no presentó diferencias estructurales significativas. La transmisión interhumana no parecería ser dependiente de la cepa viral requiriéndose la evaluación de factores alternativos como la carga viral o la respuesta inmune dependiente del huésped.

Los hallazgos del presente trabajo de tesis aportaron las bases para el estudio de los mecanismos que influyen en la interrelación genética-viral y los aspectos biológicos tales como factores ambientales y ecológicos, cuyos efectos provocan alteraciones demográficas en huéspedes infectados y susceptibles, que conducen a la emergencia de enfermedades zoonóticas humanas.

ABSTRACT

From an emergent zoonosis in 1995, it was determined the presence of hantavirus associated to the pulmonary syndrome in Argentina, not knowing the magnitude of the problem.

This work takes as target to reach to the knowledge of the infection with hantavirus, its replication, contagiousness, ecoepidemiology and characterization of circulating viruses.

Viral characterization of human samples from different geographic regions determined the existence of 3 endemic regions associated to hantavirus illness responsible for the hantavirus pulmonary syndrome in our country: north region (Salta and Jujuy) where settled down the existence of viral lineage AND Nort., south region (Río Negro, Chubut and Neuquén) where circulates lineage AND Sout. and central region (Province of Buenos Aires) where cocirculate lineages AND Cent. Lec, AND Cent Plata and AND Cent Bs.As.

The different phylogenetic analyses realized on the sequences of the genomic segments S and M clearly showed a monophyletic evolution of the hantavirus. In this evolution, the predecessor of the virus Andes would be the virus Laguna Negra. This phylogenetic analysis is supported by the apparent migratory displacement realized by the sigmodontines from North America up to the south end of the continent.

Inside the group Andes, the evolutionary difference did not turn out to be so clear, probably due to the fact that this monophyletic group is of recent radiation.

The complete sequence of Andes virus was obtained for the first time through complete S and M segments amplification corresponding to the viral genome and a portion of segment L. The analysis of this genome identified Andes virus as a new viral species.

It was determined in addition for the 3 viral segments, the non putative nucleotidic extremes sequences, which are responsible of RNA viral stability and associated in addition to its replication/transcription. Unlike S segment, segments M and L displayed deletions in both extremes possibly associated to the regulation of viral persistence.

Analysis of the outbreak happened in El Bolsón in the year 1996, demonstrated for the first time in the world, the existence of a hantavirus capable of being transmitted across interhuman contact. This route of contagion represented a unique event between hantaviruses of renal and pulmonary group, only associated up to the moment with the lineage Andes Sout.

In order to determine the possible genetic alterations associated with the route of interhuman infection found in Andes Sout, the complete S and M segments of a hantavirus belonging to the lineage Andes Cent Plata, not associated to interhuman infection until the moment, were amplified and sequenced. The comparison of segments S and M of the transmitting and nontransmitting lineages did not display significant structural differences. The interhuman transmission would not seem to be dependent of the viral lineage requiring the evaluation of alternative factors like viral load or immune response dependent of the guest.

The findings of the present thesis work contributed the bases for the study of the mechanisms that influence in the genetic-viral interrelation and the

biological aspects such as environmental and ecological factors, whose effects cause demographic alterations in infected and susceptible guests, who lead to the emergency of human zoonotic diseases.

Introducción

1 INTRODUCCION

1.1 Clasificación General

La familia *Bunyaviridae* se encuentra dividida en 5 géneros: *Bunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus* y *Tospovirus*, la mayoría de éstos son arbovirus, mantenidos en la naturaleza por un ciclo biológico de transmisión entre un vertebrado susceptible y un artrópodo hematófago. Por el contrario, los virus del género *Hantavirus*, a diferencia de los demás *Bunyavirus*, no son transmitidos por un artrópodo, sino que en su lugar son los roedores persistentemente infectados los transmisores del virus. Los *Bunyavirus* se mantienen en la naturaleza a través de ciclos de transmisión selváticos, sin embargo, más de 60 miembros de la familia *Bunyaviridae* han sido reportados como agentes causantes de enfermedades humanas (Elliott, RM., 1996).

El primer *Bunyavirus*, el virus *Bunyamwera*, fue descubierto en 1943 en Uganda a partir del estudio de mosquitos *Aedes* durante estudios de fiebre amarilla e inicialmente incluido dentro de la familia de los arbovirus. Más tarde se ubicaría a este virus como el prototipo del supergrupo *Bunyamwera*. Para 1960 se habían aislado más de una docena de virus que se agrupaban entre sí a partir de ensayos de fijación de complemento, pero diferían claramente en cuanto a ensayos de neutralización. A partir de estos estudios se comienza la agrupación de los mismos en serogrupos. En 1980 el Comité Internacional para la Taxonomía de Virus (Bishop DH. et al., 1980) clasificó, a partir de estudios bioquímicos y moleculares del supergrupo

Bunyamwera, a los virus pertenecientes a la familia *Bunyaviridae* en los 5 géneros actualmente reconocidos (Tabla 1).

Tabla 1

| Géneros de la familia Bunyaviridae | Virus prototipo |
|---|---------------------------------|
| Bunyavirus | Bunyamwera |
| Hantavirus | Hantaan |
| Nairovirus | Crimean-Congo hemorrhagic fever |
| Phlebovirus | Rift Valley fever |
| Tospovirus | Tomato spotted wilt |

Géneros de la familia Bunyaviridae indicando el virus representativo de cada género.

1.2 Clasificación de los Hantavirus

Existen en la naturaleza diversos hantavirus distinguibles por propiedades genéticas y antigénicas (Tabla 2). Dentro de los hantavirus descritos hasta el momento se encuentran los virus Hantaan (HTN), Seoul (SEO), Puumala (PUU) y Dobrava (DOB) los cuales pertenecen al subgrupo de virus causantes de Fiebre Hemorrágica con Síndrome Renal (FHRS) en humanos, con una patología que se presenta como una infección generalizada con hemorragias y una insuficiencia renal aguda (Plyusnin A. et al., 1996), causando 200.000 casos anuales en China, Corea, Rusia y Europa con una severidad variable. La mortalidad de HFRS varía de: 3-8 %

para HTN hasta 0,1- 0,2 % en PUU (Lee HW. et al., 1990; Mustonen J. et al., 1994).

El Síndrome Pulmonar por hantavirus (SPH), fue descubierto en 1993 en Four Corners, Estados Unidos; a partir de un grupo de muertes debido a una enfermedad respiratoria en jóvenes adultos sanos (Nichol ST. et al., 1993). Se caracteriza por un prodromo febril seguido de una brusca aparición de edema pulmonar no cardiogénico, infiltrado pulmonar y muerte en alrededor del 50% de los casos (Elliott, RM. 1994). A este subgrupo pertenecen los virus: Sin Nombre (SN), New York (NY), Black Creek Canal (BCC), Bayou (BAY), Blue River (BR) Choclo, Río Mamore (RIOM), Río Mearim (RM), Anajatuba (ANAJ), Laguna Negra (LN), Araraquara (ARA), Castelo dos sonhos (CAS), Andes (AND) y Orán (ORN).

Desde la aparición del virus SN, se han descubierto nuevos hantavirus asociados a SPH en todo el continente americano. Para todos estos hantavirus del "nuevo mundo" se propone la diferenciación a partir de un ancestro común y la diseminación en los distintos huéspedes pertenecientes a la subfamilia *Sigmodontinae*.

Tabla 2

| Hantavirus | Roedor del cual se caracterizó | Referencia |
|--|-----------------------------------|------------------------------------|
| Virus asociados a la subfamilia Murinae | | |
| Hantaan (HTN) | <i>Apodemus agrarius</i> | Lee & Lee (1976) |
| Seoul (SEO) | <i>Rattus norvegicus</i> | Lee et al. (1980) |
| Dobrava (DOB) | <i>Apodemus flavicollis</i> | Avsic-Zupanc et al. (1995) |
| Thailand (THAI) | <i>Bandicota indica</i> | Xiao et al. (1994) |
| Virus asociados a la subfamilia Arvicolinae | | |
| Puumala (PUU) | <i>Clethrionomys glareolus</i> | Brummer-Korvenkonlio et al. (1980) |
| Prospect Hill (PH) | <i>Microtus pennsylvanicus</i> | Parrington MA. & Kang C. (1990) |
| Tula (TUL) | <i>Microtis arvalis</i> | Plyusnin A. et al., (1994) |
| Khabarovsk (KBR) | <i>Microtus fortis</i> | Horling et al., (1996) |
| Topografov (TOP) | <i>Lemmus sibiricus</i> | Clement J. et al., (1997) |
| Isla Vista (ISLA) | <i>Microtus californicus</i> | Song et al., (1995) |
| Virus asociados a la subfamilia Sigmodontinae | | |
| Sin Nombre (SN) | <i>Peromyscus maniculatus</i> | Nichol ST. et al., (1993) |
| Black Creek Canal (BCC) | <i>Sigmodon hispidus</i> | Ravkov E. et al., (1995) |
| New York (NY) | <i>Peromyscus leucopus</i> | Hjelle B. et al., (1995b) |
| Bayou (BAY) | <i>Oryzomys palustris</i> | Morzunov S. et al., (1995) |
| Blue River (BR) | <i>Peromyscus leucopus</i> | Morzunov S. et al., (1998) |
| Caño Delgadito (CDG) | <i>Sigmodon alstoni</i> | Fulhorst C. et al., (1997) |
| Río Mamore (RIOM) | <i>Oligoryzomys microtis</i> | Hjelle B. et al., (1996) |
| Laguna Negra (LN) | <i>Calomys laucha</i> | Johnson A. et al., (1997) |
| MulesHoe (MULE) | <i>Sigmodon hispidus</i> | Rawlings J. et al., (1996) |
| El Moro Canyon (ELMC) | <i>Reithrodontomys megalotis</i> | Hjelle B. et al. (1994) |
| Río Segundo (RIOS) | <i>Reithrodontomys mexicanus</i> | Hjelle B. et al. (1995a) |
| Choclo | <i>Oligoryzomys fulvescens</i> | Vincent M. et al., (2000) |
| Calabazo | <i>Zygodontomys brevicauda</i> | Vincent M. et al., (2000) |
| HTN-007 | <i>Oligoryzomys microtis</i> | Powers A. et al., (1999) |
| Araraquara (ARA) | <i>Bolomys lasiurus</i> | Johnson A. et al., (1999) |
| Castelo dos sonhos (CAS) | Desconocido | Johnson A. et al., (1999) |
| Franca (FRA) | Desconocido | Johnson A. et al., (1999) |
| Río Mearim (RM) | <i>Holochilus sciureus</i> | Mendes W. et al., (2001) |
| Anajatuba (ANAJ) | <i>Oligoryzomys fornesi</i> | Mendes W. et al., (2001) |
| Andes (AND) | <i>Oligoryzomys longicaudatus</i> | Lopez N. et al. (1996) |
| Maciel (MAC) | <i>Bolomys obscurus</i> | Levis S. et al., (1998) |
| Pergamino (PGM) | <i>Akodon azarae</i> | Levis S. et al., (1998) |
| Oran (ORN) | <i>Oligoryzomys longicaudatus</i> | Levis S. et al., (1998) |
| Bermejo (BMJ) | <i>Oligoryzomys chacoensis</i> | Levis S. et al., (1998) |
| Virus asociado a la Insectos | | |
| Thottapalayam (TPM) | <i>suncus murinus.</i> | Xiao et al. (1994) |

hantavirus identificados hasta el momento.

1.2.1 SPH y HFRS

La diferenciación entre los grupos SPH y HFRS no es tan absoluta como se presumía inicialmente. Esto se debe principalmente a que tanto BCC como BAY, virus asociados al grupo SPH, exhiben un compromiso renal (Morzunov SP. et al., 1995; Ravkov EV. et al., 1995), así como también se hallaron casos de HFRS con manifestaciones pulmonares (Kanerva M. et al., 1996).

Uno de los principales factores que influyen en la patogenicidad del virus es la familia taxonómica a la que pertenece el roedor huésped. La familia de roedores *Sigmodontinae*, portadores de los virus causantes del SPH (cuyo prototipo es el virus SN) producen, en general, una enfermedad más severa en humanos frente a los virus HTN y PUU acarreados por las familias Murinae y Arvicolae respectivamente.

Varios cofactores pueden influir en la patogenicidad del virus, incluyendo el estadio de la enfermedad, la carga viral, coinfección con otros patógenos y el tipo de virus. Se ha propuesto para hantavirus pertenecientes a la misma cepa, un aumento de la virulencia debido a la alteración en el patrón de glicosilación (Pilaski J. et al., 1994; Bowen MD. et al., 1995), el cambio del patrón de palmitoilación (Isegawa J. et al., 1994), así como también en cepas híbridas portadoras de segmentos genómicos provenientes de distintas variantes virales (Schmaljohn A. et al., 1995 y Plyusnin A. et al., 1997).

Por otro lado, la susceptibilidad genética de los pacientes también puede contribuir substancialmente a la interacción hantavirus-humano. Esto

ha sido estudiado particularmente para la infección con Puumala (Mustonen J. et al., 1996) y se ha observado que la correlación entre la infección viral y los niveles de expresión en los pacientes están asociados a los haplotipos HLA B8 y DRB 1* 0301 (Plyusnin A. et al., 1997).

Hasta el momento no se conoce patología en humanos de los hantavirus: PH, THAI, TPM, ILV, RIOS, TULA, ELMC, Calabazos, MAC, PRM y BMJ en los cuales el virus fue amplificado a partir del roedor reservorio.

1.3 Ecología de los hantavirus

La distribución geográfica de los hantavirus y los patrones epidemiológicos observados para el HFRS y para el SPH son un reflejo de la distribución de los roedores huéspedes del virus. Esto se debe a que el hantavirus genera en su huésped primario, el roedor, una infección persistente a través de la cual se secretan y excretan partículas virales durante un intervalo prolongado de tiempo y sirve por lo tanto para mantener el virus en la naturaleza. En el humano, el virus genera una infección aguda, observándose en los pacientes sobrevivientes, una rápida eliminación del virus.

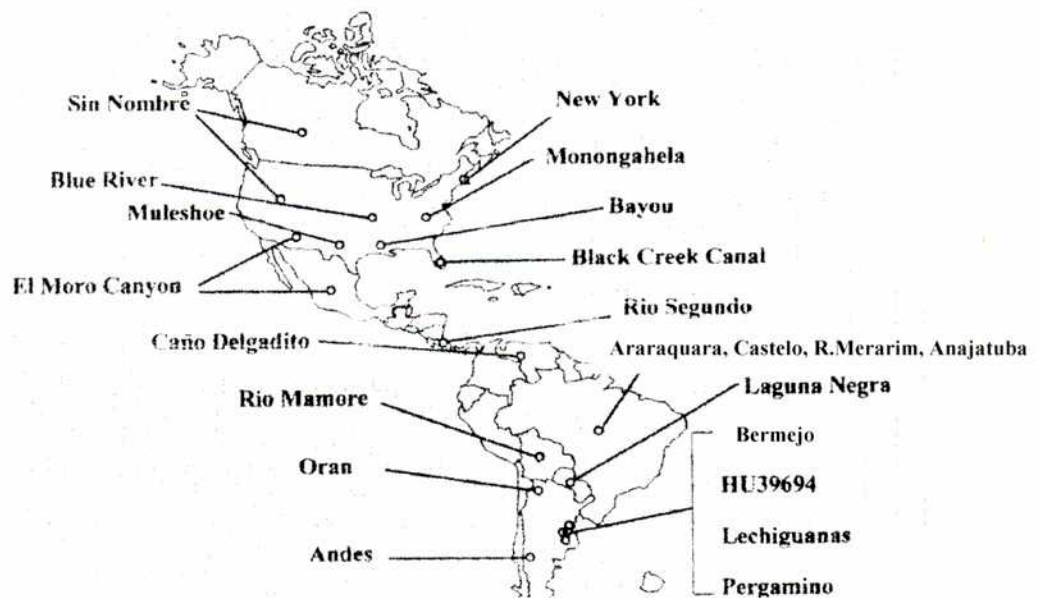
El virus Hantaan produce el Fiebre Hemorrágica con Síndrome Renal (FHRS) y se encuentra distribuido en varias regiones de China y Corea, así como también en la región oriental de Rusia (Figura 1 a).

Figura 1

A)



B)



Distribución geográfica de los hantavirus causantes de HFRS (A) y SPH (B)

El roedor reservorio del virus es *Apodemus agrarius*, y se encuentra predominantemente en el campo (Chernukha YG. et al, 1986). El pico de casos se produce en otoño debido principalmente a un aumento en la población de roedores y un contacto mayor roedor-humano debido a la cosecha de los campos. Hombres de 20 a 50 años de edad conforman el mayor grupo de riesgo debido a las tareas desarrolladas (Chen HX. & Qiu FX. 1993 y Lee HW. 1982), con una incidencia anual de aproximadamente 85.000 casos, de los cuales el 97% ocurren en China. La mortalidad se encuentra entre 6-9%.

El virus Seoul se encuentra asociado a las ratas domésticas *Rattus norvegicus* y *Rattus rattus* (Lee HW. et al., 1982). Su distribución es mundial y es además el único hantavirus asociado a áreas urbanas, ambas características se deben a la colonización de los puertos por parte de las ratas. La mortalidad por FHRs producido por el virus Seoul es de 1% a 5%. A diferencia del virus Hantaan, no se observa un patrón estacional marcado aunque la mayoría de los casos se producen en primavera (Chen HX. Et al., 1986). El virus Seoul se encuentra emparentado evolutivamente con el virus Thailand, cuyo roedor reservorio es *Bandicota indica*. Hasta el momento no se han encontrado casos humanos asociados a este hantavirus.

El roedor *Apodemus flavicollis* es el reservorio principal del virus Dobrava, el cual se encuentra en la región de los Balcanes (Antoniadis A. et al., 1996, Avsic-Zupanc T. et al., 1995 y Papa A. et al., 1998). Este virus causa FHRs con una severidad y una mortalidad similar al virus Hantaan.

El virus Puumala es el responsable de la forma menos patógena de HFRS denominada Nefropatía Epidémica. El huésped de este virus es

Clethionomys glareolus (bank vole), el cual se encuentra distribuido en la región occidental de Europa, principalmente en los países escandinavos.

Desde el descubrimiento del virus Sin Nombre, asociado al Síndrome Pulmonar por Hantavirus (SPH), en Estados Unidos en 1993 (Nichol ST. et al., 1993)(Figura 1 b), se han detectado al menos una docena de hantavirus asociados a roedores de la subfamilia Sigmodontinae presentes en América. El roedor huésped del virus Sin Nombre es el deer mice *Peromiscus maniculatus*. La prevalencia de anticuerpos contra este virus es muy baja 0,2%-0,5%, indicando que la infección es poco probable (Vitek CR. et al., 1996 y Zeitz PS. et al., 1997).

En Estados Unidos se han detectado otros hantavirus muy relacionados al virus Sin Nombre, cuyos roedores asociados pertenecen a la especie *Peromiscus*. El virus New York se encuentra asociado al roedor *Peromiscus leucopus* (Horling J. et al., 1992 y Hjelle B. et al., 1995c), mientras que el roedor *Peromiscus maniculatus nubiterrae*, subespecie del roedor asociado al virus Sin Nombre, es el reservorio del virus Monongahela (Song JW. et al., 1996 y Monroe MC. et al., 1999).

Otro roedor perteneciente al género sigmodontino, el *Sigmodon hispidus*, es el portador en la naturaleza del virus Black Creek Canal, responsable de un sólo caso de hantavirus en La Florida (USA) (Ravkov EV, et al., 1995). Un *Sigmodon hispidus* genéticamente distinto respecto del anterior, es el portador del virus Muleshoe (Rawlings JA, et al., 1996).

El virus Bayou asociado a un caso fatal en Louisiana (USA) en 1994, es mantenido en la naturaleza por el ratón arrocero *Oligoryzomys palustris* (Morzunov SP. et al., 1995).

En Sudamérica, en el año 1996 se describió la existencia del virus Río Mamoré (Hjelle B. et al., 1996) en la región oriental de Bolivia, su reservorio es el roedor *Oligoryzomys microtis*, dicho hantavirus infectó humanos, mientras que el virus HTN-007 (Powers A. et al., 1999), amplificado a partir de la misma especie de roedor en el Perú, no produjo hasta el momento casos humanos.

El virus Laguna Negra se encuentra asociado al roedor *Calomys laucha* en el Paraguay, éste fue el primer hantavirus sudamericano patógeno para el hombre en ser aislado (Johnson A., et al., 1997).

En Panamá se caracterizaron 2 hantavirus a partir de un brote ocurrido entre los años 1999-2000 en Los Santos. El virus Choclo fue amplificado a partir de los 12 casos correspondientes al brote. De la captura de roedores realizada en el área se identificó al *Oligoryzomys fulvescens* como el roedor reservorio del virus. El roedor *Zygodontomys brevicauda* también capturado en el área, sería el reservorio del virus Calabazos, hasta el momento no asociado a casos humanos.

En Brasil entre los años 1986-1990 se detectaron 32 personas con anticuerpos antihantavirus a través de estudios de seroprevalencia en los estados de San Pablo y Paraná (Iverson L. et al., 1994). En 1999 a partir del estudio de 3 casos fatales de hantavirus se describió la existencia de al menos 3 linajes genéticamente distintos de hantavirus presentes en los estados de Mato Grosso (CAS), Araraquara (ARA) y Franca (FRA)(Johnson A. et al., 1999). Estudios serológicos en roedores capturados en 5 localidades del estado de San Pablo determinaron que *Bolomys lasiurus* y probablemente *Akodon sp.* serían potenciales reservorios de hantavirus en

este estado en Brasil (Katz G. et al., 2001). Más recientemente se ha descrito la existencia de los linajes virales Río Mearim y Anajatuba asociados a los roedores *Holochilus sciureus* y *Oligoryzomys fornesi* respectivamente, capturados en la región amazónica (T. Rosa E., comunicación personal).

En Argentina, Levis y colaboradores describieron la existencia del genotipo Orán asociado al roedor *Oligoryzomys longicaudatus* a partir del análisis de 2 individuos, el bajo número de ejemplares analizados no excluiría completamente la posibilidad de la circulación de dicho genotipo en otra especie. Se identificaron además 3 genotipos de hantavirus cuyo roedor reservorio no es *Oligoryzomys* y no fueron hasta el momento asociados a infecciones en humanos, los virus Maciel (*Bolomys obscurus*), Pergamino (*Akodon azarae*) y Bermejo (*Oligoryzomys chacoensis*) (Levis S. et al., 1998).

Recientemente se han identificado *Oligoryzomys flavescens* y *Akodon azarae* como los roedores reservorios de virus tipo Andes en la provincia de Buenos Aires (Suárez OV. Et al., 2003).

1.4 Transmisión de la enfermedad.

El principal modo de transmisión del virus Sin Nombre al ser humano es la inhalación de partículas de virus transportada por el aire, liberadas de las heces y orina de los roedores infectados a medida que se secan (Langlois M. et al., 2001).

La transmisión del hantavirus en una población de reservorio es horizontal y el mecanismo de transferencia involucrado serían los encuentros agresivos y mordeduras frecuentes entre los machos (Mills J. et al., 1999a), esto ocurriría en forma más frecuente durante los periodo de apareamiento, primavera-verano, que coincide con las más elevadas seroprevalencia observadas en las poblaciones de reservorios (Douglass R.J. et al. 2001). En densidades elevadas aumenta el contacto roedor-roedor con el incremento de las posibilidades de transmisión del virus a roedores susceptibles, con elevada incidencia total y prevalencia acumulativa (Mills J. et al. 1999b). Esta propuesta se ve respaldada por el modo de transmisión teórico, densidad-dependiente, también conocido como acción masiva (Dobson AP. & Hudson PJ. 1995) o más recientemente como pseudo acción masiva (Begon M. et al. 1999). Sin embargo no se han encontrado evidencias claras entre el aumento de la seroprevalencia y la densidad poblacional tanto en virus SN en Norte América (Mills J. et al. 1999b) como en virus Andes en Sudamérica (Cantoni G. et al., 2001 y Murúa RM. et al., 2003) e incluso datos recopilados muestran una relación inversa entre la densidad poblacional y la prevalencia de anticuerpos (Abbott KD. et al. 1999; Douglass R.J. et al., 2001). Existe, sin embargo, una relación positiva entre el número promedio de huésped positivos y el promedio de abundancia (Douglass R.J. et al., 2001; Murúa RM. et al., 2003).

Otro modo alternativo de transmisión es la frecuencia dependiente o también llamada mezcla proporcionada, donde se asume los huéspedes hacen un número fijo de contactos con otros huéspedes (Begon M. et al., 1999). Así enfermedades socialmente transmitidas pueden tener la misma

dinámica de transmisión, en donde la frecuencia de los contactos entre los huéspedes son independientes de la densidad (Begon M. et al., 1999). En el *Oligoryzomys longicaudatus*, roedor reservorio del virus Andes en Argentina y Chile, existen conductas sociales tales como identificación, monta, oler, persecución, (González L. et al. 1990) que favorecen el contacto físico no necesariamente agresivo entre individuos de estas especies, así como con roedores de especies que coexisten en el mismo hábitat.

El ensamble de roedores en el Sur de Chile y patagonia Argentina se caracteriza por tres especies dominantes: *Abrothrix olivaceus*, *Oligoryzomys longicaudatus* y *Abrothrix longipilis* que superponen sus hábitats y se han detectado animales seropositivos de las especies *A. olivaceus* (Toro J. et al., 1998) y *A. longipilis* (Murua RM. et al., 2003) y *Loxodontomys micropus* en la patagonia Argentina (Cantoni G. et al., 2001) en un fenómeno conocido como derrame (spill-over) del virus en otros roedores que entran en contacto.

La ruta del aerosol aparece como la más importante vía de transmisión (Lundkvist A. et al., 1994). El mecanismo de transmisión entre ratones y de éstos al hombre sería por inhalación de aerosoles con partículas de virus que se liberarían de la saliva al secarse del pelaje del roedor positivo después de su acicalamiento y limpieza o de otros elementos contaminados (alimento, muebles, cortinas) con ella. Esta hipótesis estaría avalada por el hallazgo tanto en animales positivos a virus Andes colectados del terreno como infectados en condiciones experimentales, de la presencia de ARN viral en glándulas salivales y pulmón detectados por RT-PCR e

inmunohistoquímica y por RT-PCR en la saliva de animales (Padula PJ. et al., en prensa).

La seroprevalencia en roedores presenta variaciones estacionales siendo en el caso del virus SN más elevada en primavera y más baja en otoño (Mills J. et al., 1999b), situación que también se ha observado para el virus Andes en la región sur de Argentina (Cantoni G. et al., 2001) y en el sur de Chile (Murúa RM. et al., 2003). La disminución en otoño se debe a la mayor captura de juveniles que afectarían la seroprevalencia a través de un efecto de dilución que conduce a una baja prevalencia de anticuerpos (Mills J. et al., 1999b). La población de primavera esta compuesta principalmente por roedores adultos que pasan el invierno lo que refleja la alta prevalencia de anticuerpos que se espera de poblaciones adultas (Mills J. et al. 1999b).

La mayor prevalencia de anticuerpos se ha encontrado en poblaciones con predominio de individuos adultos siendo mucho menos común en poblaciones con dominancia de animales juveniles (Calisher CH. et al., 1999). De esta manera, el mantenimiento del virus en las poblaciones reservorios ocurriría a través de los animales adultos residentes, que mantendrían la infección de la estación previa reintroduciendo el virus en animales susceptibles cada primavera (transestacional) (Abbott KD. et al. 1999; Calisher CH. et al. 1999; Mills J. et al., 1999a).

Para mantener la infección de hantavirus en un sitio serían necesarias poblaciones reservorios compuestas por residentes estables. Por el contrario poblaciones de reservorio con estructuras de edades juveniles y de alto recambio poblacional mostrarían baja tasas de infección de hantavirus lo que ocurre en poblaciones marginales en la periferia del rango de la especie

reservorio (Calisher CH. et al., 2001). Este mecanismo podría ser una explicación alternativa a la focalidad observada en infecciones de hantavirus y a la prevalencia que puede fluctuar entre 0 y 60% en una escala regional (Calisher CH. et al., 2001).

1.5 Propiedades Fisicoquímicas

Las propiedades fisicoquímicas de los hantavirus son similares a aquellos virus de la familia *Bunyaviridae* (Murphy FA. et al., 1995), el virus Hantaan, prototipo del género, sedimenta a una densidad de 1.16-1.17 en sacarosa o 1.20-1.21 en cloruro de cesio. El tratamiento de los viriones con un detergente no iónico libera tres ribonucleocápsides, las cuales pueden ser separadas por centrifugación zonal, sedimentando a una densidad de 1.18 en sacarosa o 1.25 en cloruro de cesio (Schmaljohn CS. et al., 1983).

Para la transmisión, los hantavirus deben permanecer estables en la orina de los roedores, así como también en las heces y saliva. Estudios sobre el virus Hantaan revelan que el virus puede permanecer estable 30 min. a pH 6.6-8.8, mientras que en presencia de suero fetal bovino el rango de pH varía de 5.8-9.0 (Hugging J. comunicación personal). Estudios de infectividad variando la temperatura mostraron que el virus HTN permanece estable 30 min. en un rango de temperatura de 40 C-42° C.

1.6 Estructura Genética

Todos los miembros de la familia *Bunyaviridae* estudiados hasta el momento poseen tres segmentos de ARN simple cadena, L: Largo, M: Mediano y S: (small) pequeño. Los viriones envueltos poseen forma esférica u ovalada con un diámetro de 80-120 nm, sin embargo se han reportado formas pleomórficas de entre 78-200 nm. (McCormick JB. et al., 1982; White JD. et al., 1982; Hung T. et al., 1985; Martin ML. et al., 1985). Los lípidos comprenden un 20-30 % del peso del virión, formando parte de la envoltura lipoproteica. Los hidratos de carbono comprenden un 2-7 % del peso formando tanto glicolípidos como glicoproteínas (Schmaljohn CS. et al., 1990).

La partícula viral posee una envoltura lipídica de cuya superficie se proyectan espículas con un largo aproximado de 6 nm, compuestas de dos glicoproteínas designadas G1 y G2, originadas de una proteína precursora (GPC), la cual es codificada a partir del segmento M. Esta envoltura rodea el interior no estructurado granulo-filamentoso que contiene la nucleocápside con un tamaño de 2,5 nm, la cual está compuesta por RNA negativo simple cadena y la nucleoproteína (N), esta última codificada por el segmento S (Elliott RM. et al., 1991; Antic D. et al., 1992; Elliott RM., 1996). Un marco de lectura abierto (ORF) para una proteína putativa no estructural (Nss) con un peso de 7-10 kD. fue hallado en los hantavirus BAY, BCC, ELMC, ILV, KBR, NY, PH, PUU, RIOS, SN TUL, Riom, LN, BMJ, PRM, ORN y Andes hantavirus pero sorprendentemente no en los virus HTN, SEO y DOB (no se

dispone de información para THAI y TPM). Si bien hasta el momento no se ha logrado encontrar la proteína NSs en células infectadas con hantavirus, la disminución en la frecuencia de sustituciones nucleotídicas en la región con ambos ORF , sugeriría la funcionalidad en por lo menos SN, PUU y TUL (Plyusnin A. et al., 1994; Spiropoulou CF. et al., 1994; Bowen MD. et al., 1995). Finalmente el segmento L codifica para una polimerasa viral (L) encargada de la replicación, transcripción que presenta además función endonucleasa. (FIG. 2).

Los extremos 3' y 5' de los tres segmentos que forman el genoma de los hantavirus son complementarios y altamente conservados lo que da lugar a la formación de estructuras secundarias en forma de horquillas o "asa de sarten" ("Panhandle")(FIG. 3), El apareamiento de los extremos por complementariedad de secuencias no se encuentra únicamente en los hantavirus, sino que es un rasgo característico de la familia *Bunyaviridae* (Elliott RM. et al., 1991). En los hantavirus, esta estructura posee un largo de 17 pb, siendo 14 de las 17 pb., específicas de género.

En todos los hantavirus conocidos hasta el momento, el apareamiento de los extremos es incompleto, produciéndose un no apareamiento en la posición 9 (Parrington MA. & Kang CY., 1990; Bowen MD. et al., 1995; Chizhikov VE. et al., 1995). Se cree que la estructura de horquilla (ARN circular) de los hantavirus posee un rol en la regulación viral de la transcripción/replicación. Este rol ha sido demostrado para otros virus (Tiley LS. et al., 1994).

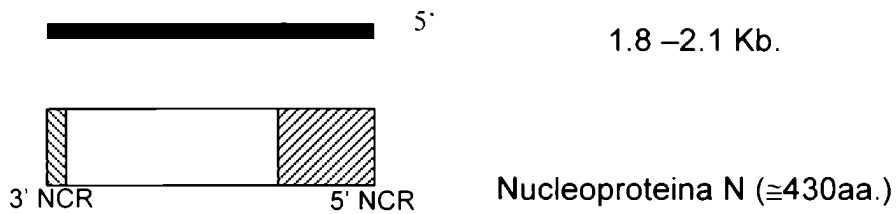
Los genomas RNA negativos sirven como templado para que la polimerasa (L) produzca tanto genomas positivos como ARN mensajeros.

Los extremos del genoma contienen 3 repeticiones trinucleotídicas (5' pUAGUAGUAG 3') las cuales estarían involucradas en el mecanismo de replicación propuesto de "cebado y realineamiento".

Figura 2

Segmento S

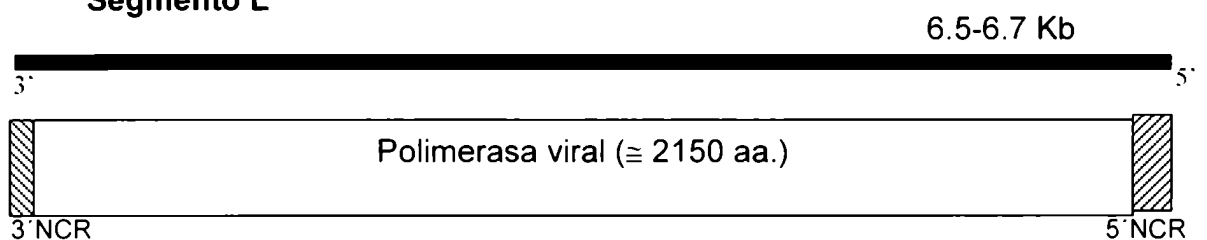
ARN genómico negativo (-)



Segmento M



Segmento L



Genoma trisegmentado de los hantavirus donde se observa el tamaño relativo de cada segmento, la polaridad y la/las proteínas codificadas.

El genoma negativo le sirve como templado a la proteína L para producir genomas positivos y ARN mensajeros (mARN). Para la producción de genoma positivo, un nucleótido GTP se alinea con el tercer residuo (C) del extremo 3', el cebado de 3 o menos nucleótidos es llevado a cabo, después de lo cual el cebador se desliza una repetición trinucleotídica, quedando un GTP protruyente no alineado en el extremo 3'. Éste es posteriormente clivado por la polimerasa dejando un residuo pU, restaurando el genoma original.

Figura 3

S

```

3' AUCAUCAUCUGAGGGAUUUCUGAUGAUGC---
   |||||      |||||      ||  |  |
5' UAGUAGUAUGCUCUCCUAAAAGACAAUCA---

```

M

```

3' AUCAUCAUCUGAGGCGUUUCUUCGUCAG---
   |||||      |||||      |
5' UAGUAGUAUGCUCCGCAAGAUGUUAAGACA---

```

L

```

3' AUCAUCAUCUGAGGCCUUCACUGUUUGAGA---
   |||||      |||||      |||
5' UAGUAGUAUGCUCCGGAAAUGAAAAGAA---

```

Estructura secundaria propuesta para los extremos de los segmentos S, M y L del genoma del virus Hantaan, prototipo de los hantavirus.

1.7 Persistencia viral

Al igual que los virus ARN de cadena negativa, los hantavirus replican su genoma a partir de un intermediario ARN antígenómico complementario (cARN) y sintetizan su ARN mensajero a partir del extremo 3' terminal del genoma viral. A su vez el ARN viral (vARN) complementario dará origen, a partir del extremo 3' terminal, al vARN. El mecanismo de replicación y transcripción se encuentra regulado por los extremos de los 3 segmentos genómicos. Estos extremos poseen una secuencia aproximada de 20 nucleótidos y presentan una complementariedad invertida imperfecta. Dicha complementariedad mantiene apareados los extremos formando la estructura ya mencionada "asa de sartén". Estudios de infecciones de roedores a largo plazo permitieron comprender el ciclo viral en el huésped. La infección por hantavirus en el huésped comprende una corta fase aguda de 3 a 4 semanas con una viremia transiente con un pico entre los días 7-14 postinfección. La segunda fase o fase persistente se caracteriza por extenderse en el tiempo varios meses y presenta una marcada disminución en los niveles virales, llegando en algunos tejidos a desaparecer y reaparecer en forma cíclica Meyer, BJ. & Schmaljohn, CS. (2000).

Estos datos permitieron postular un modelo de represión de la multiplicación viral, donde, luego de la fase aguda, ocurre una regulación negativa de la replicación genómica que lleva a un estado persistente cíclico (Meyer, BJ. & Schmaljohn CS., 2000)

Se determinó el mecanismo de regulación de la persistencia viral en el hantavirus SEO durante una infección a largo plazo en cultivos celulares.

Se estableció que cambios en la replicación serían la causa de la persistencia viral en hantavirus observándose la cantidad máxima de partículas virales infectivas en la primera semana postinfección para ir declinando hasta la tercera semana, este periodo representaría la duración de la fase aguda y el comienzo de la persistencia. A partir de este punto la abundancia de virus infectivo varió en forma cíclica pero nunca alcanzó los valores observados en la fase aguda.

Se determinó el cambio involucrado en la persistencia a partir de estudios de Northern blot y densitometría en los 3 segmentos del genoma viral, descartándose la presencia de grandes deleciones en los segmentos que pudieran actuar interfiriendo como ARNs defectuosos.

El estudio de los extremos de los segmentos genómicos en el vARN permitió detectar la presencia de deleciones de entre 9-15 nucleótidos en el extremo 5' terminal del segmento L (responsable de la ARN polimerasa-ARN dependiente viral). En las distintas fracciones se determinó la existencia de una variación cíclica en el tamaño de las deleciones y la proporción de ARNs completos versus ARNs delecionados.

Los 3 segmentos de vARN presentaron deleciones en sus extremos 3' terminal, con un aumento en la frecuencia de las deleciones que se correspondería con el pico de título viral y su declinación posterior, seguido de una disminución en la cantidad de vARN.

En el cARN sólo se encontraron deleciones significativas para el segmento L, no obstante, éstas no variaron a lo largo de la infección de manera cíclica, tal cual lo observado para los vARNs.

1.8 Análisis genético de los hantavirus

La identificación de las distintas especies de hantavirus no es posible utilizando los métodos clásicos de aislamiento viral o neutralización debido a la dificultad que presentan los hantavirus para su aislamiento. Por esta razón la caracterización de estos virus se realiza a través de árboles evolutivos.

Los árboles evolutivos contienen información sobre los procesos biológicos que los generaron.

La filogenia representa las relaciones ancestrales entre diferentes especies y contiene información sobre los procesos asociados al nivel de la especie.

Para el estudio genético de los hantavirus se utiliza la filogenia asociada a una secuencia de datos, en este caso secuencias nucleotídicas o aminoacídicas, analizándose cada posición de una secuencia respecto del alineamiento total.

Debido a que no se conoce la historia previa de los hantavirus y no es posible predeterminar un reloj molecular asociado a los cambios genéticos en estos virus, se emplea el método de Máxima Parsimonia.

Los árboles filogenéticos que utilizan el método de Máxima Parsimonia (MP) tienen como objeto determinar la topología del árbol para un set de secuencias alineadas que pueda ser explicado con el menor

número de cambios o mutaciones. El algoritmo asociado al método de MP genera topologías de árboles y evalúa la mínima cantidad de cambios necesarios para explicar la posición de todos los nodos para cada árbol generado. El árbol que requiere el menor número de cambios es considerado el mejor árbol (Vandamme, AM., comunicación personal).

Además de generar variaciones genéticas a través de las mutaciones, los virus han desarrollado otros métodos para incrementar su potencial evolutivo. Los métodos mas importantes son la recombinación y la reasociación. Mientras que la recombinación es el intercambio de fragmentos pertenecientes a la misma región genómica de diferentes cepas, la reasociación involucra el intercambio de segmentos genómicos completos.

En los hantavirus, la reasociación ha sido descripta ampliamente entre variantes genéticas pero no entre virus distintos (Henderson WW. et al., 1995 y Rodríguez LL. et al., 1998).

1.9 Manifestaciones clínicas del SPH

1.9.1 Período de incubación

El período de incubación estimado para los virus causantes de HFRS es de 4 a 42 días (Lee, JS., 1999), mientras que el tiempo de incubación estimado para la infección viral por el virus SN es de 14 a 21 días (Koster F. & Levy H., 1999).

Para el virus Andes, el período de incubación se determinó a partir del estudio de casos de contagio interhumano que reunieron las siguientes

restricciones: i) Cada caso secundario estuvo en contacto con un caso previo de HPS de 4 a 50 días previo al inicio de síntomas, ii) Confirmación genética de la identidad absoluta entre ambos casos, iii) Confirmación de no exposición a roedores en los 50 días previos al inicio de síntomas.

Asumiendo que la infectividad siguió una distribución normal con un valor máximo al día de inicio de síntomas del caso primario +/- 2 días y considerando un evento único de infección se determinó una media para la incubación de 19 días con un desvío de +/- 5 días aproximadamente, determinándose un período de incubación de 12 a 27 días (Padula P.J. et al., 2000b).

En estudios de contactos, donde se reciben normalmente muestras antes del comienzo de los síntomas, se logró amplificar para el virus Andes ARN viral en muestras de 7 días previos al inicio de la enfermedad es decir durante el período de incubación viral (Padula P.J. et al., 2000a), mientras que para los casos dicho ARN se detectó circulando en sangre hasta 30 días post inicio de síntomas.

1.9.2 Manifestaciones clínicas del SPH

La enfermedad se divide en 3 fases: fiebre, shock o edema pulmonar y convalecencia. La fase febril o prodrómica tiene una duración de 3 a 6 días y es indistinguible de otros prodrómos virales (Moolenaar R.L. et al., 1995 y Enria D. et al., 2001), caracterizado por fiebre, temblores, debilidad, dolor de cabeza, anorexia, mialgias, náusea con o sin vómito, dolor abdominal y diarrea. Los dolores abdominales son suficientemente fuertes

como para mimetizar apendicitis. Durante este período, tanto el examen físico, como los estudios del laboratorio clínico y la radiografía de tórax, pueden ser completamente normales. No se reporta durante esta fase tos no productiva ni disnea, pero si marcan el comienzo de la segunda fase.

El comienzo del shock y el edema proceden rápidamente en el curso de 4 a 24 hs. El shock se manifiesta como hipotensión y oliguria mientras que el edema pulmonar se manifiesta por taquipnea, disnea y tos no productiva. Éste puede ser visualizado en el pecho por radiografía de tórax (Boroja M. et al., 2001) que presenta infiltrados pulmonares bilaterales, cuffing peribronqueal y fluido intersticial-alveolar en el segmento basal (Ketai LH. et al., 1994). En este punto la hipoxemia se hace evidente con una saturación de oxígeno inferior al 90 %. Se presume que el shock se debe a una falla miocárdica. Se puede observar frecuentemente leucocitosis marcada (mayor de 25.000 por mm^3) con un porcentaje incrementado de granulocitos inmaduros y algunos linfocitos atípicos. En pacientes con enfermedad severa se observan acumulaciones de suero en las vías respiratorias, así como acidosis metabólica con disminución de los niveles de bicarbonato y acidosis láctica.

La fase de convalecencia se caracteriza por una mejoría notable en las funciones hemodinámicas y en la oxigenación. Si bien no se dispone todavía de suficiente información en relación a las secuelas a largo plazo, entre los pacientes que han superado la fase cardiopulmonar, la recuperación, si bien lenta, ha sido aparentemente completa (Enria D. et al., 2001; Seijo AC., 1998 y Jenison S. et al., 1995)).

1.9.3 Patogenia de los hantavirus en América

El roedor huésped una vez infectado, secreta y elimina el virus por prolongados periodos probablemente durante toda su vida. (Hart CA. & Bennett M., 1999).

La presencia del virus en el huésped no provoca ninguna desventaja en su supervivencia ni efecto perjudicial o de adecuación reproductiva. Se ha demostrado, a través de infecciones experimentales con virus SN en *Peromyscus maniculatus*, la no afección de la función respiratoria aun bajo condiciones de baja presión atmosférica (O'Connor CS. et al., 1997). Sin embargo, existirían cambios histopatológicos asociados a la infección en *Peromyscus leucopus* con virus NY (presencia de mononucleares y edema del septo alveolar) como parte de un posible modelo animal (Lyubsky S. et al., 1996) y en *Peromyscus maniculatus* (Netski D. et al., 1999).

El hombre y otros animales diferentes al reservorio natural son huéspedes incidentales y sin ninguna importancia en la transmisión o evolución de los hantavirus (Hart CA. & Bennett M. 1999).

La disfunción vascular parece ser el principal daño que desencadena tanto la FHSR como el SPH derivado de la interacción con las beta-3-integrinas que regulan la permeabilidad vascular y la función de las plaquetas (Hart CA. & Bennett M. 1999). Los principales cambios histopatológicos encontrados en el SPH son pseudo neumonitis intersticial con congestión, edema con características de trasudado e infiltración celular de mononucleares con áreas de formación de membrana hialina en un epitelio respiratorio intacto (Zaki SR. et al., 1995). El rol de la respuesta

inmune celular en la infección de hantavirus es complejo. Los hantavirus infectan las células sin causar ningún efecto citopático directo, gran número de linfocitos infiltrados se encontraron en biopsias de pacientes de FHSR y de SPH, además de una gran respuesta inflamatoria con células efectoras activadas y niveles altos de citoquinas, por lo que se ha sugerido que la respuesta inmune celular esta involucrada en la patogénesis de la enfermedad (Kanerva M. et al., 1998). Por otro lado la respuesta inmune celular también parece ser importante para la protección y eliminación de la infección viral, como fue observado en animales. La clarificación de esta paradoja, importante para el tratamiento como para las medidas preventivas, requiere aún entender los mecanismos que operan en la respuesta protectora y en la respuesta patológica .

Los estudios de seroprevalencia en Sudamérica mostraron porcentajes mayores que los encontrados en Norteamérica y la presencia de poblaciones nativas con alta seroprevalencia alcanzó en algunos casos al 40% (Ferrer JF. et al., 2003). Otros aspectos importantes de la infección por hantavirus en América del sur son la presencia de un mayor compromiso renal y manifestaciones hemorrágicas, las que se observan mas frecuentemente (Schmaljohn CS. & Hjelle B., 1997).

1.9.4 Laboratorio

El grado de shock e hipovolemia es reflejado por la elevada creatinina y el nitrógeno urea sangre. La proteinuria no es altamente significativa pero hematuria microscópica y trombocitopenia se encuentran en la mayoría de

los casos, esta última es la primera anomalía en aparecer en la sangre periférica, usualmente 2 a 3 días antes del comienzo del edema pulmonar. La trombocitopenia se observa con un conteo de plaquetas menor a $130.000/\text{mm}^3$, raramente menor a $20.000/\text{mm}^3$. Niveles elevados en enzimas hepáticas se observan en todos los casos pero raramente supera 5 veces el límite superior normal.

1.9.5 Tratamiento

No existe hasta el momento terapia específica o antiviral, sólo terapia de sostén. Dada la condición clínica, es aconsejable una unidad de terapia intensiva para el tratamiento de los enfermos. En todos los casos es fundamental respetar las normas universales de bioseguridad.

Considerando que en la patogénesis de estos síndromes, el débito hídrico capilar tendría un rol fundamental, la hidratación parenteral debe realizarse en forma muy cautelosa, siendo preferible una ligera deshidratación a la sobrehidratación; sin olvidar que una hidratación excesiva contribuirá en el aumento del edema pulmonar.

Se preconiza el uso temprano de agentes inotrópicos y vasopresores como dobutamina, dopamina o norepinefrina, para mantener la perfusión tisular. Se utiliza oxigenoterapia para la hipoxemia y ventilación mecánica si se considera indicada, usualmente durante 5-7 días.

La Rivavirina es una droga antiviral que en forma de aerosol se utiliza para el tratamiento de las infecciones pulmonares por el virus sincicial

respiratorio. Se ha postulado la posibilidad de la utilización de dicha droga para el tratamiento del SPH, sin embargo, su efectividad aun se desconoce (Severson WE. et al., 2003).

1.9.6 Diagnóstico de SPH y diagnóstico diferencial

El diagnóstico de SPH, debe ser considerado en todo paciente previamente sano que se presente con un cuadro febril seguido de signos de insuficiencia respiratoria. Durante la fase prodrómica este diagnóstico es muy difícil, debido a la inespecificidad del cuadro clínico. Cuando se inicia la fase cardiopulmonar, los hallazgos del examen físico, unidos a los del laboratorio y a la radiografía de tórax, permiten sospechar el diagnóstico de SPH.

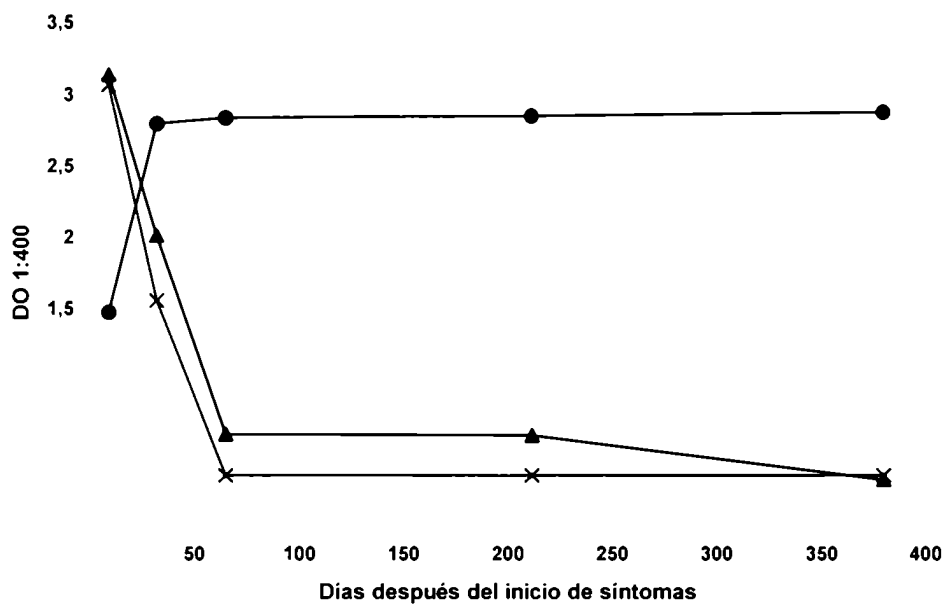
El diagnóstico para hantavirus se realiza a través de un ensayo de ELISA para la detección de anticuerpos IgM y/o IgG en suero, utilizando como antígeno virus inactivado o la nucleoproteína recombinante purificada (Padula PJ. Et al., 2000a).

Debido a la diferenciación y proliferación de los linfocitos reactivos, se pueden detectar anticuerpos IgM específicos a los 1-2 días después del inicio de los síntomas y permanece a niveles detectables alrededor de dos meses (Figura 4). La IgG comienza a detectarse con 2-3 días de demora con respecto a la IgM principalmente una semana, alcanzando su pico máximo el día 17 post inicio de síntomas, no observándose una disminución en el título de anticuerpos IgG al menos en 370 días. La aparición de anticuerpos IgA sigue un patrón temporal similar al observado para la IgM, alcanzando su

pico máximo a día 15 después del inicio de síntomas, sin embargo en varios pacientes se observó una disminución en el título de anticuerpos IgA mas abrupta que para los anticuerpos IgM. (Martinez VP. et al., 2001)

En un estudio comparativo llevado a cabo en 91 pacientes se determinó la presencia de un título menor de anticuerpos IgG reactivos contra la proteína N del virus Andes en los pacientes que fallecieron respecto de aquellos que sobrevivieron Padula PJ. et al., 2000b). Para dicho estudio se encontraron diferencias significativas para los valores de IgG para los intervalos 3-4, 5-6 y 10-13 días post infección.

Figura 4



IgM (♦), IgG (●) e IgA (x)

Seguimiento serológico de SPH a partir de la toma de cinco muestras.

Alternativamente el diagnóstico se puede realizar amplificando fragmentos del genoma viral a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Este método diagnóstico es más sensible que el método serológico y se utiliza principalmente cuando se carece de muestra sanguínea y sólo se cuenta con tejido de órganos, cuando es necesario un diagnóstico precoz debido a la sospecha prematura en personas relacionadas o convivientes de un caso reciente, o bien cuando es necesario establecer el sitio probable de contagio para estudios epidemiológicos. La implementación continua de este método es difícil dado el tiempo involucrado en el procesamiento de la muestra, el elevado costo y la probabilidad de contaminaciones asociadas a su sensibilidad extrema.

Dada la inespecificidad de los síntomas iniciales, el profesional a cargo del paciente deberá evaluar la posibilidad de requerir los siguientes diagnósticos diferenciales, que comparten con el SPH signos y síntomas en determinados estadios de la enfermedad:

- ◆ **Leptospirosis.** (Sion ML. et al., 2002 y Markotic A. et al., 2002)
- ◆ **Rickettsiosis.**
- ◆ **Influenza.**
- ◆ **Histoplasmosis.**
- ◆ **Bacteremia neumococcica.**
- ◆ **Neumonía severa por micoplasma.**
- ◆ **Meningococemia.**
- ◆ **Legionelosis.**
- ◆ **Tularemia pulmonar.**
- ◆ **Dengue**
- ◆ **Fiebre Hemorrágica**

En la mayoría de los casos debe sospecharse primeramente de patologías diferenciales, tales como la neumonía o el distrés respiratorio agudo, siendo éstas más comunes que el hantavirus. Sin embargo si el caso se encontrase en una región con antecedentes de hantavirus, o en una región que se encuentre atravesando un brote, el análisis diagnóstico para hantavirus deberá ser requerido inicialmente.

1.9.7 Vacunas

Las proteínas de la envoltura viral G1 y G2 son las proteínas involucradas en el desarrollo de una respuesta inmune debido principalmente a dos factores: Se demostró que anticuerpos monoclonales anti G1 y G2 pero no contra la nucleoproteína N neutralizan la infección viral *in vitro* y la transferencia pasiva de anticuerpos monoclonales neutralizantes específicos para G1 o G2 son capaces de proteger hamsters o ratones del virus Hantaan, no así los anticuerpos no neutralizantes (Schmaljohn CS. et al., 1990 y Arikawa J. et al., 1992); lo que sugiere que el despliegue de una respuesta inmune humoral es suficiente para la protección de una infección por hantavirus.

La eficiencia de la respuesta humoral ha sido demostrada además a través de la transferencia pasiva de inmunosuero y la subsiguiente inoculación de virus SEO así como también se ha logrado proteger a ratas recién nacidas de la infección con el mismo virus realizando una transferencia pasiva de anticuerpos maternos de ratas infectadas (Zhang et al., 1989).

La utilización de los virus recombinantes baculovirus y vaccinia, expresando el segmento M (codificante de las glicoproteínas G1 y G2) indujeron la neutralización y la protección de los virus HTN y SEO a través de anticuerpos en animales (Schmaljohn CS. et al., 1990 y Xu X. et al., 1992), más recientemente se han generado anticuerpos neutralizantes recombinantes humanos contra G2 para SEO y DOV (Koch J. et al., 2003). La inmunización de animales con baculovirus expresando el segmento S (nucleoproteína N) también despertó una respuesta inmune no mediada por anticuerpos neutralizantes cuando se infectó a dichos animales con virus HTN, lo que reafirma que la respuesta inmune mediada por células también puede ser protectora. (Schmaljohn CS. et al., 1990). En este sentido se ha verificado la existencia de reactividad cruzada en los linfocitos T citotóxicos (LTC) al obtener dichos linfocitos HTN-específicos reestimulando hepatocitos de ratones infectados con distintos hantavirus (Asada H. et al., 1989).

Se ha demostrado la existencia de reactividad cruzada a través de ensayos de proliferación linfocitaria realizados con células de pacientes inmunes con el virus HTN donde se observó la respuesta inmune en uno de cada tres individuos contra el virus Sin Nombre (Schmaljohn AL. et al., 1995).

Hooper y colaboradores, expresaron las glicoproteínas G1 Y G2 de los virus SEO y HTN e inyectaron macacos Rhesus observando el desarrollo de anticuerpos neutralizantes en 3 de los 4 hantavirus asociados a la FHSR (Hooper JW. et al., 2001b).

Más recientemente se ha expresado el segmento M del virus Andes y se ha inyectado en el macaco Rhesus observándose el desarrollo de

anticuerpos neutralizantes para Andes y para otros hantavirus asociados a SPH (Custer DM. et al., 2003).

1.10 Hantavirus en Argentina

En Argentina, las investigaciones indican la presencia de casos de SPH y HFRS desde principios de la década de los 80' en trabajos realizados sobre seres humanos sanos residentes en las provincias del Norte argentino: Jujuy, Salta, Tucumán, Chaco, Santiago del Estero, Misiones y Buenos Aires donde fueron encontrados anticuerpos (AC) antihantavirus en estudios de inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando como antígenos los serotipos: HTN, SEO y PUU todos estos asociados al HFRS (Weissenbacher et al., 1986). Estudios posteriores permitieron determinar la presencia de AC antihantavirus tanto en laboratoristas sanos como en roedores experimentales de los bioterios (Weissenbacher M. et al., 1988), capturas de roedores silvestres de las provincias de Buenos Aires y Mendoza arrojaron resultados similares (Weissenbacher M. et al., 1990).

Estudios de IFI realizados en roedores capturados en el puerto de Buenos Aires y Mar del Plata determinaron la presencia de hantavirus, sin embargo, en ningún caso logró aislarse el virus responsable (Maiztegui JI. et al., 1983).

En 1995, (dos años después del primer hallazgo de un hantavirus responsable del SPH en Estados Unidos de Norteamérica) se detectaron, a

través de métodos serológicos, focos de infección por hantavirus asociado a un síndrome pulmonar por primera vez en Argentina.

El primer foco ocurrió en la región Sur en un área rural cercana a “El Bolsón” entre los meses de marzo y abril. Como resultado de este brote familiar, dos de tres individuos murieron afectados por un distrés respiratorio no explicable. Las muestras de suero de los tres individuos fueron positivas tanto para IgM como para IgG utilizando la nucleoproteína del virus SN como antígeno para el ensayo de ELISA (Lázaro ME. et al., 1995).

A partir de tejidos extraídos en la autopsia de uno de los individuos (caso AH1), se realizó la caracterización genómica del virus. De ésta caracterización se identificó un nuevo virus causante de SPH, el virus Andes (López NM, et al.1996).

Posteriormente, estudios realizados en diversas localidades de nuestro país permitieron definir la existencia de diversos genotipos similares al hantavirus Andes (Oran, HU 39694, Lechiguanas, Bermejo, Maciel) (Levis S. et al., 1998).

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo General

En el presente proyecto nos abocaremos al estudio de un miembro de los hantavirus, el virus Andes, primer hantavirus caracterizado en Argentina, analizaremos además sus propiedades genéticas y sus propiedades biológicas distintivas, finalmente estudiaremos su relación con las demás variantes virales del virus Andes.

2.1.1 Objetivos Particulares

2.1.1.1 Caracterización genómica del virus Andes

Con la detección de un nuevo hantavirus denominado Andes, fue necesario determinar su composición genómica. Esta caracterización aporta nuevas herramientas para poder diagnosticar el virus, dado que el diagnóstico serológico no logra diferenciar entre los distintos hantavirus que potencialmente pueden cocircular en una región geográfica.

Nos proponemos determinar la estructura genómica de los segmentos del virus Andes

2.1.1.2 Estudio de los extremos de los segmentos del hantavirus Andes

Al igual que los virus RNA de cadena negativa, los hantavirus replican su genoma a partir de un intermediario antígenómico ARN (ARN viral complementario) y sintetizan su ARN mensajero a partir del extremo 3' terminal del genoma viral. A su vez el ARN viral complementario dará origen, a partir del extremo 3' terminal al ARN viral. EL mecanismo de replicación y transcripción se encuentra regulado por los extremos de los 3 segmentos genómicos. Estos extremos poseen una secuencia aproximada de 20 nucleótidos y presentan una complementariedad invertida imperfecta. Dicha complementariedad mantiene apareados los extremos formando una estructura denominada "asa de sarten".

Secuenciaremos los extremos de los 3 segmentos genómicos para determinar la funcionalidad de éstos en el plegamiento secundario y la formación del asa responsable de la replicación y transcripción viral.

2.1.1.3 Estudio de contagio interhumano del virus Andes

Dos años después del descubrimiento de la existencia del hantavirus presente en América, cuya característica distintiva era la producción de un distrés pulmonar con una elevada mortalidad, se diagnosticaba por primera vez su presencia en Argentina, mas precisamente en la zona sur en la

provincia de Río Negro, sin embargo la característica más extraordinaria de este virus emergería recién en el año 1997 en un brote en la ciudad de El Bolsón que involucró a 16 personas.

2.1.1.4. Comparación cepa transmisora versus no transmisora.

Con el objeto de determinar la presencia de diferencias a nivel del genoma de la cepa transmisora, responsable del contagio persona-persona, decidimos secuenciar en forma completa los segmentos S y M de una cepa de hantavirus no transmisora. La cepa no transmisora elegida es una de las variantes presentes en provincia de Buenos Aires y La República Oriental del Uruguay.

Nos proponemos así realizar estudios comparativos entre ambas cepas virales para determinar la presencia de alteraciones genéticas distintivas entre ambas cepas y su posible importancia en la infección viral.

Materiales y métodos

3 MATERIALES Y METODOS

3.1 Productos químicos

En todos los casos se usaron reactivos de grado analítico de Merck (Darmstadt, Alemania), Sigma (ST. Louis, EE.UU.), Fluka (Buchs, Suiza), BDH (Poole, Inglaterra), Carlo Erba (Milan, Italia) o Mallinckrodt (Nueva York, EE.UU.).

Los medios de cultivo de células fueron de Gibco (Grand Island, EE.UU.) o Flow (McLean EE.UU.). El suero fetal bovino provino de Gibco (Grand Island, EE.UU.) o Bioser (Buenos Aires, Argentina).

3.2 Material Radioactivo

El material usado fue de New England Nuclear (NEN) (Boston, EE.UU.) que proveyó γ [^{32}P] ATP.

Para las autoradiografías se usó película X-Omat de Kodak (Rochester EE.UU.) revelándose con revelador manual para placas radiográficas.

3.3 Cultivos Celulares

Células Vero: Se utilizó una línea de células Vero E6 (fibroblastos de riñón de mono verde africano- *Cercopithecus aethiops*) ATCC 1008, crecidas en monocapa (Yasumura & Kawatika, 1963).

Se la mantuvo por repiques semanales en medio MEM (medio mínimo esencial con sales de Earle y glutamina) suplementado con 10% de suero de ternera inactivado y 50 mg/ml de gentamicina. El mismo medio se utilizó para medio de mantenimiento pero suplementado con 2% de suero fetal bovino inactivado. Esta línea celular se usó entre los pasajes 11 y 20. Ambas líneas celulares fueron cultivadas a 37° C en botellas Falcon de 12.5, 25 ó 75 cm³.

3.4 Extracción de ARN Viral

La extracción de ARN se efectuó a partir de tejido de autopsia (hígado, pulmón, corazón y bazo), fluidos corporales, sangre total, coágulo sanguíneo o suero. La extracción del ácido nucleico se realizó utilizando el método descrito por Chomczynski y Sacchi (Chomczynski P. & Sacchi N., 1987).

Para cada muestra, 200-250 µl de coágulo o suero fue agregado a 500 µl de isotiocianato de guanidina y 65µl de acetato de sodio 2M dentro de un flujo laminar de bioseguridad, se agitó vigorosamente y se dejó reposar. Luego de 5 min. se le agregó 500 µl de fenol (saturado en agua), se agitó y se le agregó 150 µl de cloroformo-isoamílico 24:1, se sometió la mezcla a la acción del vortex durante 10 seg. y luego se depositó el tubo en hielo durante 15 min. Luego se centrifuga la muestra a 13.500 r.p.m. durante 15 min. Se separó la fase acuosa, normalmente la fase superior, y se le agregó 500µl de isopropanol, agitándose por inversión varias veces; para dejarlo a -20°C durante 2 hs. o alternativamente -70°C durante 30 min. Se centrifugó

45 min. a 13.500 r.p.m. y se descartó el sobrenadante conservándose el pelet traslúcido. Dicho pelet se resuspendió para su lavado en 1 ml de etanol 70%, se centrifugó 20 min a 13.500 r.p.m. Se descartó el sobrenadante, dejándose secar el pelet bajo flujo de aire 15 min., luego de lo cual se lo resuspendió en 25 μ l de agua ultra pura.

En caso de partir de una muestra de tejido (hígado, pulmón, corazón o bazo) se tomó una porción de aproximadamente 1 gr. de peso (cuyas dimensiones aproximadas son de 4 mm. de lado) en un flujo laminar de seguridad biológica. La muestra fue sometida a un desgranamiento mecánico en un mortero (con un cuello de seguridad que evita el derrame de la muestra) en presencia de 1ml. de isotiocianato de guanidina y 65 μ l de acetato de sodio 2M. Una vez homogeneizado, se volcó la muestra en un tubo que contenía 500 μ l de fenol (saturado en agua). El protocolo de extracción continuó tal cual lo descrito para la extracción de suero/coágulo.

Para la extracción de fluidos corporales (semen, saliva y orina) se realizó tal cual lo descrito para suero/coágulo excepto el volumen inicial de muestra, partiéndose de 300 μ l de fluido.

Para aumentar la cantidad de muestra de orina a analizar, dada la dilución que presenta esta muestra, se utilizó un protocolo modificado respecto al original, en el cual se concentraron las dichas orinas como paso previo a la extracción. Previamente a la concentración de la muestra se desalinizó la misma mediante una diálisis contra agua ultra pura durante una noche con el objeto de evitar una interferencia del exceso de sales. Para la concentración se partió de un volumen inicial de 10 ml los cuales fueron colocados en un tubo de diálisis utilizando una resina de polietilenglicol en

escamas (Carbowax), esta resina posee la propiedad de absorber el agua, deshidratando la muestra. La orina concentrada fue llevada a un volumen final de 250 μ l para la extracción del ARN, realizada tal cual el protocolo de extracción de suero/coágulo.

Los isopados fueron dejados en TCG durante 60 min. para lograr la desintegración del soporte fibroso y la consiguiente liberación del ARN. Luego de este paso se procedió a la extracción del ARN tal cual lo descrito anteriormente.

3.5 Síntesis de cADN viral y amplificación

El ARN genómico extraído fue transcrito a cADN utilizando 5 unidades de la enzima transcriptasa reversa AMV durante 60 min. a 42° C. La reacción se realizó en presencia de una concentración 100nM de cebadores (primers) virus-específicos, 250uM de cada uno de los deoxioligonucleotidos (dNTP) y el buffer específico de la enzima (250mM Tris-HCl (pH 8.3 at 25°C), 250mM KCl, 50mM MgCl₂, 2.5mM spermidine, 50mM DTT)

El cADN obtenido se amplificó a través de la reacción en cadena de la polimerasa anidada (nested PCR). El objetivo de esta técnica es, utilizando nuevamente cebadores específicos, generar amplímeros que corresponden a fragmentos del genoma viral, los cuales serán utilizados como templados para una segunda amplificación. El resultado es un doble evento de amplificación exponencial que genera un número mayor de fragmentos (fundamental cuando se parte de concentraciones muy bajas del templado original) y además asegura una mayor especificidad como resultado de la

unión de más primers en la reacción. Ambos eventos de amplificación se realizaron agregando 5 unidades de enzima TAQ polimerasa con su correspondiente buffer 500mM KCl, 100mM Tris-HCl (pH 9.0 at 25° C), 1% Triton X-100, 15mM MgCl₂, 100nM de dNTPs y 100nM de los primers. Para la primer amplificación (primer round), se utilizó 1ul del cDNA generado con la transcriptasa mientras que para la amplificación anidada (segundo round), se utilizó 1 µl del ciclo anterior.

Para la amplificación del segmento S completo se generaron dos fragmentos: S1 y S2. Para el primer fragmento se utilizaron los primers pS+1 y pS-2 como primer ciclo y pS+3 y pS-4 para la amplificación anidada. Para el segundo fragmento se utilizaron los cebadores pS+5 y pS-6 como primer ciclo y pS+7 y pS-8 para el segundo ciclo.

El fragmento S1-2 se diseñó con el objeto de unir los fragmentos S1 y S2, para esto se utilizaron los cebadores pS+9, pS-10 y pS+11 (tabla 3).

Para la amplificación del segmento M se utilizó la misma estrategia descrita para el segmento S, sin embargo, debido a su tamaño se generaron cuatro fragmentos iniciales M1 (pM+1_pM-2 y pM+3_pM-2 como ciclo hemianidado), M2 (pM+4_pM-5 y pM+6_pM-7 como segundo ciclo), M3 (pM+8_pM-9) y M4 (pM+10_pM-11 y pM+12_pM-11), a partir de la secuenciación de los mismos se diseñaron los cebadores que los conectaron M1-M2 (pM+13_pM-14 y pM+15_pM-14), M2-M3 pM+4_pM-9 y pM+6_pM-9) y M3-M4 (pM+18_pM-19 y pM+20_pM-21) para la obtención de la secuencia completa.

El fragmento M5 que comprende la región 5' del segmento fue amplificada utilizando pM+22_pM-23 y pM+24_pM-23 como segundo ciclo hemianidado (tabla 4).

Tabla 3

| Secuencia del cebador/primer | Posición relativa al genoma de Andes |
|-------------------------------------|---|
| pS+1 AGTAGACTCCTTGAGAAGCTAC | 5-26 |
| pS-2 TCAGGATCCATGTCATCTCC | 1234-1253 |
| pS+3 GCTACTACGACTAAAGCTGGAA | 22-47 |
| pS-4 GGTGCACATGCAAAGACCCA | 955-974 |
| pS+5 TGGGGATTCAACTGGACC | 1154-1171 |
| pS-6 CTCCTTGAAAGCAATCAAG | 1847-1866 |
| pS+7 CGGGCTTGTGCCACATAT | 1365-1382 |
| pS-8 GTACGTTGAGCCAATGCCG | 1803-1822 |
| pS+9 GAACCAGGATAAGGTTTAAGG | 503-523 |
| pS-10 TATAGACTAACCCACCTCCC | 1535-1554 |
| pS+11GCTGAAACTGAGTCTGCTACC | 901-921 |
| pSL-1 GCATTCACATCAAGGACATTTTC | 337-358 |
| pSL-2 GTTAGCTTACGGTCTTGGAC | 224-244 |
| pSL+3 AGTATGTTAAGGCCTATAGGT | 1674-1694 |

Secuencia y posición de los cebadores utilizados para amplificar el segmento S completo del hantavirus Andes.

Tabla 4

| Secuencia del cebador/primer | Posición relativa al virus Andes |
|------------------------------|----------------------------------|
| pM+1 GACTCCGCAAGAAGAAGC | 9-26 |
| pM-2 TCATATGTATGCCCTGGTTGTG | 662-683 |
| pM+3 GGTTGCTCTTGGAGTCTGC | 69-87 |
| pM+4 ACAATGGGCTCTATGGTGTGT | 1678-1698 |
| pM-5 TTGAATGTCGCATCCATCCA | 2227-2246 |
| pM+6 GACTGGGACACAGCAAAAGA | 1714-1733 |
| pM-7 TCGGCACTCGCAGCCCA | 1993-2009 |
| pM+8 TGGGCTGCAAGTGC | 1993-2006 |
| pM-9 CAACCCCAGCTAGTTTC | 2341-2357 |
| pM+10 TTTAAGCAATGGTGC ACTAC | 2638-2657 |
| pM-11 CCTGAACCCCATGCCCCATC | 2998-3017 |
| pM+12 CCTAGTGGTATGAGGTGTCC | 2698-2717 |
| pM+13 GCATGTCAATTAGAAGTTG | 534-552 |
| pM-14 CCTCAGTTATTGTCATGC | 1777-1794 |
| pM+15 CAAGTAGGATTCAGGTG | 568-584 |
| pM+16 CTGTGAGGCCTACTCTGAGA | 1224-1243 |
| pM-17 TCTCAGAGTAGGCCTCACAG | 1224-1243 |
| pM+18 GGTGCATGTCAGAAGTAC | 2287-2302 |
| pM-19 GAATCTTTTGTGGCCATC | 2807-2824 |
| pM+20 GGCAAACATCTAAGTGC | 2314-2330 |
| pM-21 GTATCCAGAAACAGTATTC | 2780-2798 |
| pM+22 AAGAGACCATGTAAACCTTG | 2901-2920 |
| pM-23 TCTTATAAAGTCAATAACTA | 3551-3570 |
| pM+24 CAGGATTTAAGTGATAACCC | 2947-2966 |

Secuencia y posición de los cebadores utilizados para amplificar el segmento M completo del hantavirus Andes.

3.6 Aislamiento viral

Trozos de tejido de hígado y pulmón de pacientes guardados congelados a -140°C , fueron desgranados tanto en PBS como en MEM conteniendo 2% SFB para utilizarse como inóculo infectivo de monocapas de células Vero E6 de pasaje 11 con una confluencia de 80-90%, crecidas en medio MEM suplementado con 7% de suero fetal bovino y antibiótico. Una vez infectadas las células con la suspensión durante 90 min. se removió el inóculo y se lavó las células 2 veces con PBS para luego dejarlas con medio MEM conteniendo 2% de SFB y antibiótico durante 14 días en estufa a 37°C con 5% de CO_2 .

Las infecciones se realizaron por triplicado, tomándose alícuotas de fluido semanalmente. A los 14 días la monocapa celular fue desprendida mecánicamente utilizando un removedor celular o bien utilizando tripsina versene (EDTA). Las células se resuspendieron en 1,5 ml MEM 2% SFB; de éstos, 500 μl se utilizaron para infectar el siguiente pasaje celular siguiendo los pasos descritos, 300 μl se utilizaron para verificar la presencia de virus por PCR y los 700 μl remanentes fueron congelados a -140°C .

3.7 Electroforesis en gel

El análisis de amplificación de los fragmentos por PCR se realizó a través de corridas electroforéticas en geles de agarosa, utilizando como buffer de corrida el buffer Tris Bórico EDTA (TBE). Para visualizar las bandas en transiluminador de luz ultravioleta, se adicionó al gel Bromuro de

Etidio. Se utilizaron 2 μ l de buffer de siembra conteniendo azul de bromofenol y naranja de acridina (colorantes indicadores del avance del frente de corrida) y 5 μ l de la muestra de ADN. Los fragmentos de PCR, cuyo tamaño esperado se encontraba entre 200 a 500 pb fueron analizados en geles de agarosa al 2%. Los fragmentos de PCR cuya longitud estimada oscilaba entre 500-800 pb se corrieron en geles de agarosa 1.2%. Aquellos fragmentos de más de 800 pb. se corrieron en geles de agarosa al 0.8%. Para determinar el tamaño exacto del fragmento se sembró en cada gel un control de peso molecular que consiste en un conjunto de bandas de ADN cuyo peso es conocido. En los geles que contenían fragmentos de 100 a 1000 pb se utilizó el control de escalera de 100 pb. (100 bp. ladder, Promega) que posee bandas de ADN de 100 a 1000 pb en incrementos de 100 pb., mientras que para bandas cuyo tamaño superaba las 1000 pb. se utilizó el control de peso escalera de 1 Kbp. (Promega).

Como paso previo a la purificación de las bandas de PCR, que habían presentado el peso esperado en el gel de agarosa-TBE, se realizaron geles de agarosa de bajo punto de fusión (agarosa LMP) y buffer Tris Acético EDTA (TAE). En estos geles se sembró el volumen total de la PCR (excepto los 5 μ l utilizados para la verificación del tamaño de la banda) combinado con 3 μ l. de buffer de siembra. Las bandas corridas se cortaron con hojas de bisturí generando tacos de agarosa conteniendo únicamente el fragmento de PCR para su posterior purificación (ver purificación de fragmentos de PCR 3.8).

3.8 Purificación de fragmentos de PCR

Los tacos de LMP agarosa conteniendo las bandas de ADN se purificaron utilizando kits de purificación comerciales dependiendo del tamaño de la banda. Para las bandas de 200 a 300 pb. se utilizó el kit "Mermaid" de Promega, mientras que para las bandas de mayor peso molecular se utilizó el kit "Wizard PCR purification kit" (Promega).

3.9 Secuenciación

Inicialmente el laboratorio contaba con un secuenciador manual, por lo tanto parte del diseño para la amplificación completa de los segmentos contemplaba la obtención de fragmentos no superiores a 350 pb, límite superior del secuenciador manual. Previo a la reacción de secuenciación se marcó el cebador con fósforo radiactivo. Para esto se incubó el cebador en presencia de γP^{32} ATP y la enzima T4 Polinucleotido Kinasa durante 30 min. a 37° C. Para la secuenciación de cada fragmento se requerían cuatro tubos de reacción de secuenciación independientes como parte del método de secuenciación de Sanger. En cada tubo se combinaban 2 μ l. del producto de PCR amplificado y purificado con 0.7 μ l. del primer marcado con radioactivo, 2 μ l. de la mezcla de los cuatro deoxiligonucleotidos trifosfatados (dntps) más un dideoxiligonucleotido (ddntp) para cada tubo que funciona como terminador, es decir, interrumpe la polimerización al no permitir la unión del siguiente oligonucleotido. La reacción se completa con 1 μ l. de Taq grado secuencia y 1 μ l. de su correspondiente buffer 10x. Los ciclos de secuenciación comprenden 2 min. a 95° C, y 30 ciclos de 95° C durante 1

min., 37-45° C (dependiendo del primer) durante 1 min. y 72° C por 2 min. La reacción de secuenciación se detiene adicionando a cada tubo de secuencia 2 µl de buffer de inhibición (stopping buffer) que además contiene dos colorantes que indicarán el avance de la muestra en la electroforesis.

Los productos de la secuenciación se sembraron en geles de poliacrilamida 30:0.8 (porcentaje de acrilamida y bisacrilamida respectivamente) y se corrieron a 60 amperes (1700 voltios) utilizando solución TBE 1X como buffer de corrida. Con el objeto de aumentar la resolución de la secuenciación se realizaron dos cargas de cada reacción. La técnica de la doble carga sucesiva permite aumentar la separación de las últimas bases del fragmento ya que aumenta el tiempo de corrida. Se produce una primer carga de 2.5 µl., cuando el colorante indicador del frente de corrida cae al receptáculo del buffer de corrida inferior, se realiza una segunda carga y se corre hasta que el frente de la segunda carga alcanza el borde inferior del gel.

Una vez finalizada la corrida electroforética, se procedió a cortar el gel para su posterior fijación a un papel de filtro Watmann nro. 3 en una bandeja con solución fijadora durante 30 min. El gel luego fue secado en un secador de geles por vacío durante 2 hs. y colocado en un casete con una placa radiográfica Kodac X-Omat de alta sensibilidad toda la noche a -70° C. Finalmente se reveló la placa en cuarto oscuro pasando la misma por una bandeja con solución reveladora y otra con solución fijadora.

La secuenciación automática se basa en la utilización de un equipo con un lector láser capaz de captar la emisión de ondas a partir de una excitación previa. 4 µl. de cada fragmento de ADN purificado se combinaron

con 2 μ l del reactivo de secuenciación (ABI Prism, Perkin Elmer, Cetus) 0.7 μ l. del primer y 0.3 μ l. de DMSO, alcanzando un volumen de reacción de 7 μ l. Los ciclos de secuenciación comprendieron 2 min. a 95° C, y 35 ciclos de 95° C durante 1 min., 37-50° C (dependiendo del primer) durante 40 segundos y 68° C durante 4 min.

Previo a la electroforesis del producto de secuenciación se requirió la purificación del mismo. Los 7 μ l de la reacción se llevaron a un volumen final de 30 μ l. con agua bidestilada grado biología molecular (ADD), los cuales fueron sembrados en micro columnas de purificación preparadas con Sefarosa G25 (20 mg. de Sefarosa hidratada con 500 μ l. de ADD durante 1 hr) y centrifugadas durante 1 minuto a 900 G en centrifuga clínica. El producto recuperado se concentró utilizando un liofilizador "Savant" durante 50 min.

Para la corrida electroforética se resuspendió la reacción en 3 μ l de buffer de corrida y se sembró sólo la mitad en un gel de poliacrilamida-bisacrilamida 19:1. El programa que controla al secuenciador determina la longitud de la corrida y guarda el resultado en forma de electroferograma.

3.10. Ligación del ARN viral

Para la secuenciación de los extremos de los tres segmentos virales fue necesaria su ligación. Para los segmentos S y M se partió de un ARN extraído en el momento sin congelar, mientras que para el segmento L fue necesario partir del sobrenadante de células infectadas con el virus provenientes del aislamiento viral (materiales y métodos 3.6) debido a la baja

cantidad de dicho segmento en la partícula viral. EL ARN purificado se combinó con 20u T4 ARN ligasa con su correspondiente buffer (New England Biolabs, Beverly, MA), 20u Rnasin inhibidor de Rnasas (Promega, Madison, WI) y se lo llevó a un volumen final de 15 µl. con agua Dietilfosfocarmamidada (DEPC). Luego de 1 hr de incubación a 37° C, se extrajo el ARN tal cual lo descrito en 3.4 excepto que luego del ultimo lavado se resuspendió el ARN en 5 µl de agua grado biología molecular.

Para la amplificación de la región correspondiente a la ligación en cada segmento se diseñaron cebadores orientados de manera de atravesar la unión de los extremos 3' y 5' correspondientes (Tabla 5).

La amplificación de los extremos del segmento S se logró a través de una PCR semi-anidada utilizando los cebadores pSL-1y pSL+2 para la primer amplificación y pSL-3 y pSL+2 para el segundo evento de amplificación.

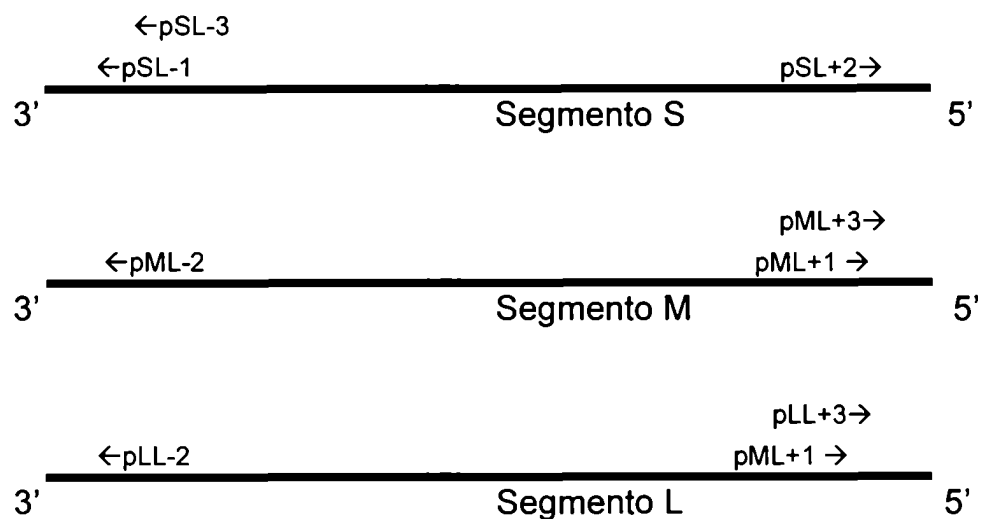
Para la amplificación de los extremos correspondientes al segmento M se utilizaron los cebadores pML+1 y pML-2 para la primer amplificación y pML-3 y pML-2 para el segundo evento de amplificación.

Para la amplificación de los extremos del segmento L no se contó con la secuencia de ningún hantavirus Andes ni otro hantavirus sudamericano, por lo tanto, para este segmento se realizó un alineamiento de los últimos 250 nucleótidos del extremo 5' terminal y los primeros 200 nucleótidos del extremo 3' terminal de las secuencias de los segmentos L pertenecientes a los virus HTN, SEO, PUU y SN utilizando el programa CLUSTAL del paquete informático PCGENE (Intelligenetics) versión 6.82. A partir del alineamiento

se diseñaron los cebadores pLL+1 y pLL-2 para la primer amplificación y pLL+3 y pLL-2 para el segundo evento de amplificación.

Tabla 5

| Secuencia del cebador/primer | Posicion relativa al genoma de Andes |
|-------------------------------------|---|
| pSL-1 GCATTCACATCAAGGACATTC | 337-358 |
| pSL-3 GTTAGCTTACGGTCTTGGAC | 224-244 |
| pSL+2 AGTATGTTAAGGCCTATAGGT | 1674-1694 |
| pML+1 GGIAATTGGATTGTTGTTGT | 3367-3386 |
| pML-2 GTTTGATTACAGGCCAGATCATAAC | 446-470 |
| pML-3 CTTGGGTGAAACTCTTCTGG | 273-292 |
| pLL+1 AGGTTGACAATGATGCAC | 6352-6369 |
| pLL-2 GCAAATCTAACATTCT | 101-117 |
| pLL+3 GCCCGAAGACATATTACC | 6398-6415 |



Secuencia y posición de los cebadores utilizados para amplificar los extremos ligados de los tres segmentos del hantavirus Andes.

3.11 Clonado de los extremos

Los fragmentos amplificados, producto de la ligación de las regiones adyacentes a ambos extremos de los tres segmentos, fueron clonados en el vector P-Gem T que posee resistencia a ampicilina y que posee la capacidad de degradar X-Gal. en presencia del inductor IPTG. Las bacterias que incorporan el vector desarrollan color azul solamente cuando el gen B-Gal no ha sido interrumpido por el fragmento de PCR a clonar. 7 μ l. de cada fragmento purificado (materiales y métodos 3.8) de PCR se combinaron con 1 μ l. del vector, 1 μ l. de ADN ligasa y 1 μ l. de su correspondiente buffer y se lo incubó toda la noche a 14° C. Con el producto de ligación se transformaron bacterias E. Coli DH5 α previamente competenciadas con cloruro de calcio a través del método descrito por Kushner, S. (1978). Las bacterias transformadas fueron reparadas en medio SOC y plaqueadas en placas con ampicilina, Xgal e IPTG. De las placas se seleccionaron las colonias blancas, de las cuales se extrajo el vector utilizando el kit de purificación "Wizard Miniprep Purification Kit"(Promega) para su secuenciación.

3.12. Análisis filogenéticos

3.12.1. Alineamiento

Las secuencias de ADN fueron alineadas manualmente y traducidas a aminoácidos mediante un editor de secuencias utilizando el programa de computación TRANSLATE del paquete de programas de computación PCGENE versión 7.82.

3.12.2. Métodos filogenéticos

Para la inferencia filogenética se utilizaron los programas contenidos en el paquete de programas de computación PHYLIP versión 3.52. Para generar los árboles filogenéticos se utilizaron los programas DNAPARS (Máxima Parsimonia) y DNADIST junto con NEIGHBOR (Jukes Cantor y Neighbor Joining). El programa SEQBOOT fue utilizado para realizar el "remuestreo" ("bootstrap"). Estos remuestreos dieron lugar al árbol consenso mediante el uso del programa CONSENSE. Las secuencias de los hantavirus no argentinos pertenecientes a las distintas variantes virales circulantes en los países de América, Asia y Europa utilizadas en los árboles se obtuvieron de la base de datos del GenBank.

3.12.3. Métodos para el estudio de recombinantes

El programa VESPA (Korber y Myers, 1992) fue utilizado para la detección de secuencias recombinantes. Este programa se basa en la determinación de un patrón de aminoácidos señal de cada subtipo. Para ello se definen 2 parámetros: p y q . El primero (p) especifica el grado de conservación del aminoácido mayoritario en valor de frecuencia en el subtipo problema. El segundo parámetro (q) especifica el valor máximo de frecuencia en que se halla este aminoácido en cada uno de los subtipos de referencia, descartando del patrón del subtipo problema a aquellos aminoácidos representados en mayor cuantía que dicho valor (ya sea por homoplasia o por falta de divergencia).

Resultados

4 RESULTADOS

4.1 Caracterización genómica del hantavirus Andes

La caracterización genética de los hantavirus está motivada tanto para contribuir al estudio filogenético y epidemiológico como para intentar asociar la patología con particularidades encontradas en secuencias virales. Para el virus Andes tiene un interés particular, dado que ha demostrado propiedades biológicas diferenciales respecto de los otros hantavirus.

4.1.1 Caracterización inicial del virus Andes

En 1995, debido a un caso fatal (AH-1) de la provincia de Río Negro, se determinó la existencia de una nueva especie viral de hantavirus asociado a SPH denominado virus Andes (López N. et al., 1995).

En esta etapa, el objetivo inicial de este trabajo fue diseñar cebadores específicos que permitieran al menos caracterizar la nueva especie viral. Para esto se generaron 8 cebadores (figuras 9 y 11, y tablas 3 y 4 de materiales métodos) capaces de generar 2 fragmentos genómicos mediante la técnica de RT-PCR, un fragmento correspondiente al segmento S (posición nucleotídica 49-336), dentro de la región que codifica para la nucleoproteína (N) y un fragmento (G2) correspondiente al segmento M (posición nucleotídica 2721-2946), en la región codificante de la glicoproteína G2.

La elevada conservación nucleotídica encontrada en las nucleoproteínas de todos los hantavirus hasta el momento secuenciados, le otorga al fragmento correspondiente a la N, la capacidad potencial de ser amplificado a partir de distintas especies virales. El fragmento correspondiente a G2 presenta una variabilidad mucho mayor, dada la función y ubicación de las glicoproteínas en la envoltura viral. Si bien los cebadores fueron diseñados en regiones codificantes de baja variabilidad, esta variabilidad nos permitiría detectar diferencias entre distintos virus pertenecientes a la misma especie viral.

En el mes de enero y febrero del año 1996 se confirmaron por serología dos casos (muestras 1/96 y 2/96) en la misma localidad que el primer caso detectado en Argentina (AH-1), en El Bolsón, Provincia de Río Negro. De las muestras de sangre se extrajo el ARN genómico, se amplificaron los fragmentos N y G2 utilizando los cebadores diseñados y se llevó a cabo la secuenciación de los amplímeros en forma manual.

El análisis comparativo de éstas respecto de la muestra AH-1 (AH-1=Sur 1/95) analizada mostró una alta identidad tanto a nivel nucleotídico como a nivel aminoacídico para ambos fragmentos (Tabla 6).

4.1.2 Identificación y caracterización en otras regiones geográficas

En el año 1997, se diagnosticaron, por serología, dos muestras positivas de hantavirus provenientes del norte de nuestro país, lo que

determinó la detección de hantavirus en una región geográfica distinta respecto de la única región endémica estudiada en 1996. La caracterización genómica de estas muestras provenientes de la provincia de Salta (1/97 y 2/97), amplificando nuevamente N y G2, mostró para el fragmento G2 un porcentaje de similitud del 99.6 % cuando se las comparó entre ellas mientras que la similitud fue del 84.5 % al compararlas con las muestras provenientes del Sur.

Para el fragmento amplificado de la N, los porcentajes de similitud determinados para muestras pertenecientes a cada región (100 % y 98.7 % para las muestras del Norte y Sur respectivamente) fueron muy similares a los observados cuando se compararon muestras entre las dos regiones geográficas (97.3 %).

En el mismo año se realizó el análisis genético de muestras serológicamente positivas de pacientes con SPH provenientes de una región geográfica distinta, la Provincia de Buenos Aires (Cent 3/97 y Cent 1/98).

Las secuencias obtenidas de las muestras presentaron el mismo patrón de identidad observado para las muestras del norte, baja cuando se las comparó con las muestras provenientes de distintas regiones geográficas y alta al compararlas entre sí para el fragmento G2 y escasa diferencia entre todas las muestras para el fragmento N (tabla 6).

Tabla 6

A)

| | Sur 1/96 | Sur 2/96 | Sur 1/95 | Cent 3/97 | Cent 1/98 | Sal 1/97 | Sal 2/97 | LN | SN |
|-----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|----------|----------|-------|-------|
| Sur 1/96 | ----- | 95,1 | 96,0 | 78,8 | 80,1 | 84,1 | 84,5 | 76,1 | 68,9 |
| Sur 2/96 | 99,3 | ----- | 93,8 | 79,2 | 77,4 | 84,1 | 84,5 | 76,3 | 69,0 |
| Sur 1/95 | 100 | 99,3 | ----- | 79,8 | 79,2 | 83,6 | 84,1 | 77,1 | 70,4 |
| Cent 3/97 | 96,2 | 96,8 | 96,2 | ----- | 94,2 | 82,3 | 81,9 | 77,9 | 69,9 |
| Cent 1/98 | 96,8 | 97,5 | 96,8 | 98,7 | ----- | 83,2 | 82,7 | 78,5 | 68,6 |
| Sal 1/97 | 95,2 | 95 | 94,3 | 97,5 | 96,8 | ----- | 99,6 | 79,9 | 70,8 |
| Sal 2/97 | 94,9 | 94,6 | 94,4 | 96,9 | 96,1 | 99,3 | ----- | 79,4 | 70,4 |
| LN | 83,7 | 84,8 | 84,2 | 83,5 | 83,6 | 82,8 | 84,9 | ----- | 67,3 |
| SN | 81,3 | 81,7 | 81,3 | 80,1 | 80,8 | 80,1 | 79,8 | 79,3 | ----- |

B)

| | Sur 1/96 | Sur 2/96 | Sur 1/95 | Cent 3/97 | Cent 1/98 | Sal 1/97 | Sal 2/97 | LN | SN |
|-----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|----------|----------|-------|-------|
| Sur 1/96 | ----- | 98,7 | 97,3 | 97,3 | 94,7 | 97,3 | 97,3 | 92,0 | 81,3 |
| Sur 2/96 | 100,0 | ----- | 98,7 | 98,7 | 96,0 | 98,7 | 98,7 | 92,0 | 81,3 |
| Sur 1/95 | 100,0 | 100,0 | ----- | 97,3 | 94,7 | 97,3 | 97,3 | 90,7 | 82,7 |
| Cent 3/97 | 96,2 | 96,2 | 96,2 | ----- | 97,3 | 100,0 | 100,0 | 93,3 | 80,0 |
| Cent 1/98 | 96,2 | 96,2 | 96,2 | 100,0 | ----- | 97,3 | 97,3 | 90,7 | 77,3 |
| Sal 1/97 | 96,2 | 96,2 | 96,2 | 100,0 | 100,0 | ----- | 100,0 | 93,3 | 80,0 |
| Sal 2/97 | 96,2 | 96,2 | 96,2 | 100,0 | 100,0 | 100,0 | ----- | 93,3 | 80,0 |
| LN | 92,7 | 92,5 | 92,5 | 88,7 | 88,7 | 88,7 | 88,7 | ----- | 78,7 |
| SN | 88,5 | 88,7 | 88,7 | 84,9 | 84,9 | 84,9 | 84,9 | 88,7 | ----- |

Tabla de similitud nucleotídica (A) y aminoacídica (B) de las secuencias correspondientes a las 3 regiones geográficas de Argentina (Norte, Centro y Sur) y los virus LN (de Paraguay) y SN (de USA). Los valores por arriba de la diagonal corresponden al fragmento G2 y los valores por debajo corresponden al fragmento N

De esta manera se clasificaron 3 regiones endémicas para el hantavirus: la región norte, la región central y la región sur.

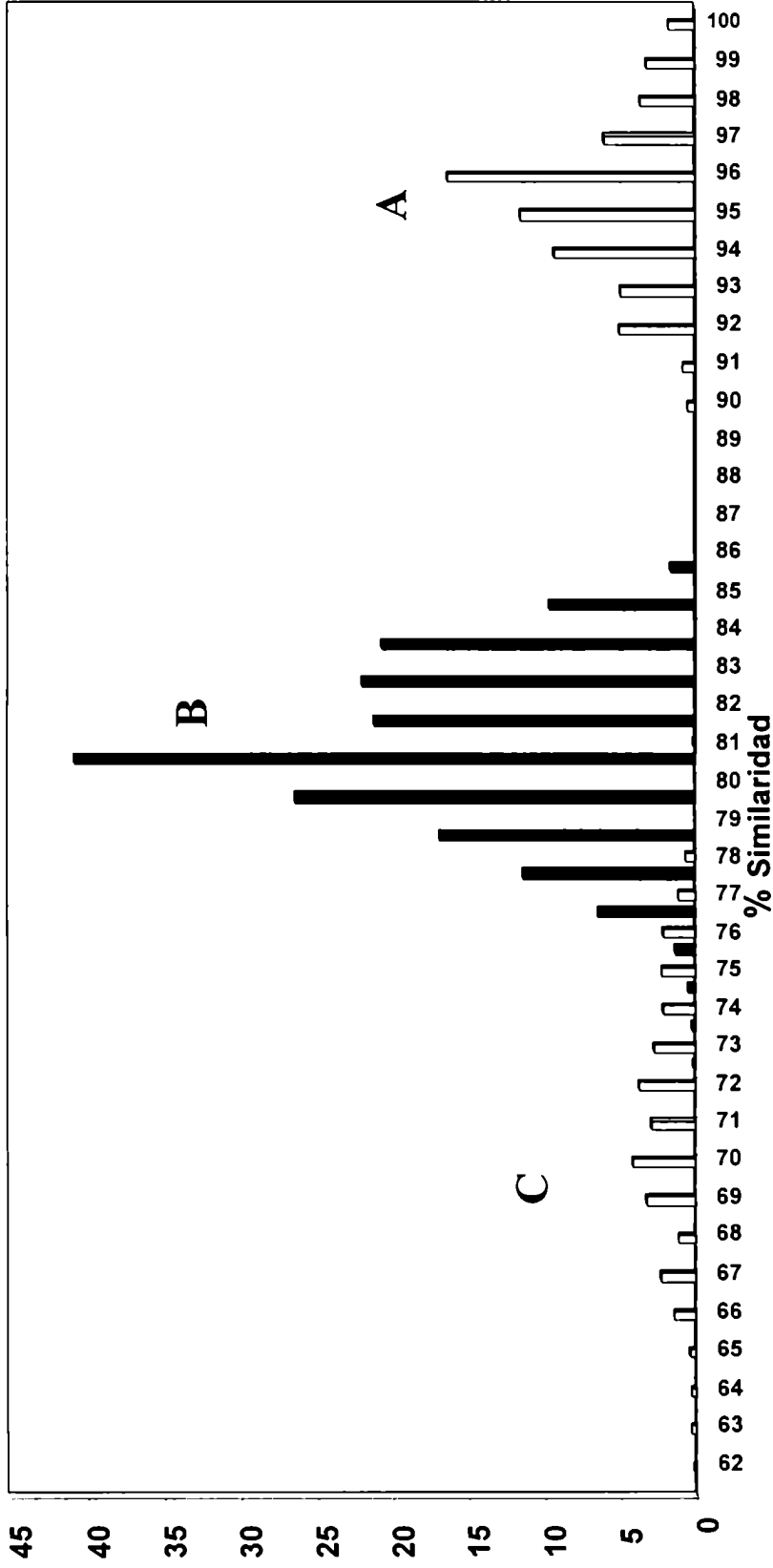
La imposibilidad de realizar aislamientos a partir de casos descartó la posibilidad de clasificar a los virus de acuerdo a los ensayos clásicos de neutralización, sin embargo, los resultados permitieron determinar la ausencia de homogeneidad en el genoma de los hantavirus analizados utilizando el fragmento correspondiente a G2. De esta manera, los análisis comparativos de las muestras dentro de una dada región geográfica presentaron una similitud nucleotídica del 90-100%, mientras que los análisis de cualesquiera dos secuencias de muestras provenientes de distintas regiones geográficas presentó una similitud nucleotídica del 74 al 86%. Finalmente la similitud fue baja, entre el 63 al 79%, cuando se compararon 2 secuencias de virus provenientes de diferentes hemisferios o entre virus diferentes de Sudamérica (figura 5).

Cuando se realizó un gráfico de frecuencias de valores de las muestras correspondientes a las distintas regiones geográficas de nuestro país basadas en el fragmento de G2, determinó la formación de una curva trimodal, donde cada pico representa una región geográfica distinta lo que demuestra que los hantavirus circulantes en las distintas regiones son genéticamente distinguibles. De acuerdo a los porcentajes de similitud nucleotídica se creyó, inicialmente, que las diferencias serían suficientes para clasificarlos como especies virales distintas, sin embargo cuando se realizó el análisis comparativo a partir de las mismas secuencias pero a nivel aminoacídico, se observó un aumento significativo en los valores de

similitud entre los linajes (tabla 6), lo que favorecería la clasificación de los distintos genotipos circulantes en las distintas regiones como linajes virales.

A partir de los análisis comparativos realizados se decidió clasificar a los virus caracterizados en tres cepas virales todas pertenecientes al linaje Andes, estas cepas se nombraron incluyendo el nombre de la especie viral y la región geográfica donde circulaban: **AND Nort**, **AND Sout** y **AND Cent**.

Figura 5



Frecuencia de porcentajes de similitud para los hantavirus pertenecientes al mismo linaje A, a diferentes linajes B y pertenecientes a diferentes hemisferios C.

4.1.2.1 Región Norte

En la región geográfica norte, formada por las provincias de Salta y Jujuy, se determinó la presencia de la variante viral correspondiente al virus AND Nort, dentro de este linaje se encontraba el genotipo del virus Orán previamente caracterizado (Levis S. et al., 1998).

Con el objeto de determinar la homología presente dentro del linaje se analizaron las muestras disponibles de la región.

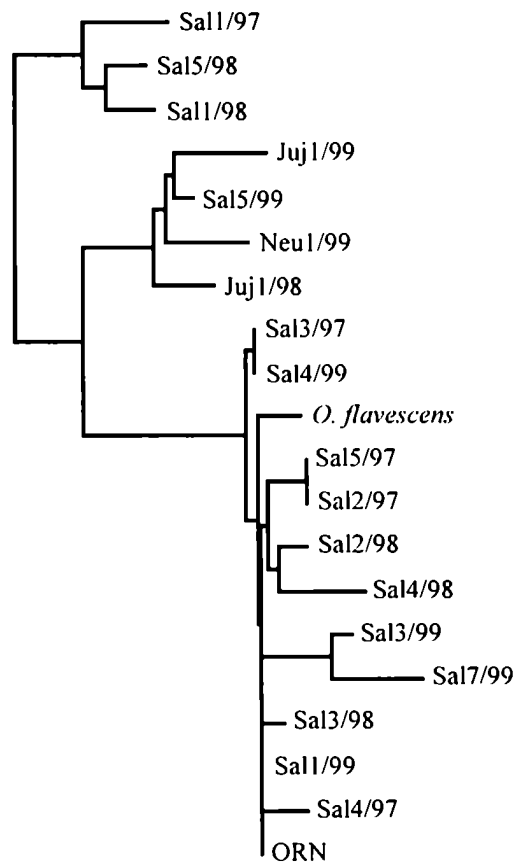
De 26 muestras confirmadas por serología, se amplificaron y secuenciaron 17 muestras, el análisis filogenético (figura 6) a partir de las secuencias demostró la existencia de 3 sublinajes en la región Norte. El primer sublinaje incluyó dos muestras de Jujuy (Juj 1/98 y Juj 1/99) y una de Salta (Sal 5/99) pero muy cercana del límite con Jujuy, mientras que las 14 muestras restantes, todas provenientes de Salta, se distribuyeron en dos sublinajes: uno que incluyó los casos Sal 1/97, Sal 1/98 y Sal 5/98 y el restante formado por 11 muestras (Sal 2/97-5/97, Sal 2/98-4/98, Sal 1/99, Sal 7/99, Sal 3/99 y Sal 4/99).

De esta manera, a través del análisis de un número mayor de muestras de ambas provincias se logró determinar la coexistencia de tres sublinajes dentro de esta variante viral.

La divergencia nucleotídica observada entre los 2 sublinajes de Salta y el de Jujuy osciló entre 5.8-8.4% y 5.3-9.3% respectivamente, mientras que la divergencia entre los linajes Salta fue de 7.1-11.1%. La variación nucleotídica máxima presente dentro de los tres sublinajes fue de 3.5-5.3%. La amplificación de fragmentos del genoma del virus AND Nort a partir de

tejidos de roedores serológicamente positivos pertenecientes al género *Oligoryzomys chacoensis* y *flavencens* (Della Valle MO. et al., 2000) los convertiría en reservorios potenciales, junto con el anteriormente descrito *O. longicaudatus* (Levis S. et al., 1998)

Figura 6



Árbol filogenético a partir de muestras correspondientes al linaje AND Nort utilizando el fragmento G2 del segmento M realizado utilizando el método de Máxima Parsimonia (MP).

4.1.2.2 Región Sur

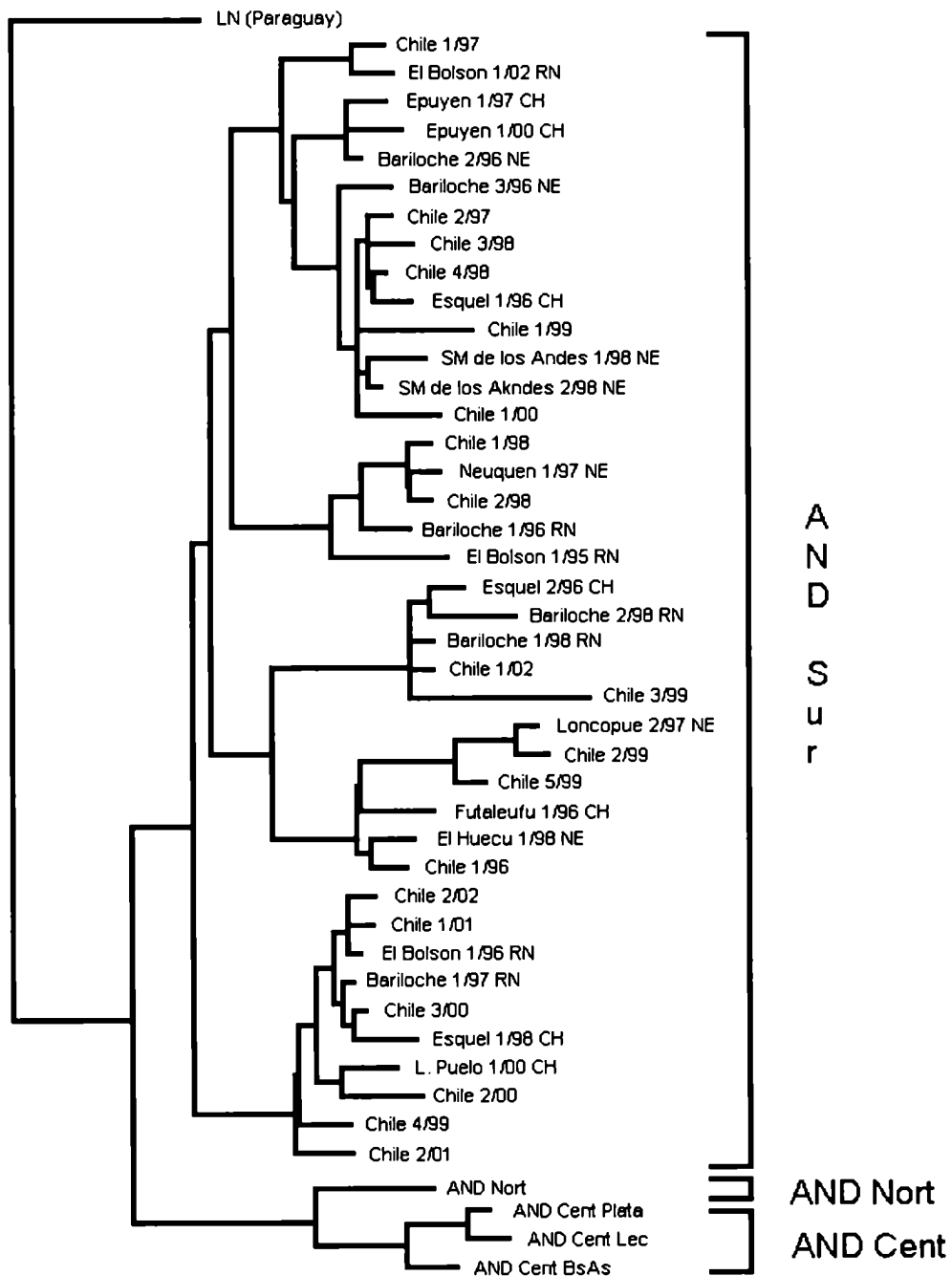
En la región endémica Sur, que comprende las provincias de Río Negro, Neuquén y Chubut de Argentina y las regiones V a XI de Chile, geográficamente ubicadas a la misma altura respecto de las provincias argentinas, se determinó la presencia del linaje AND Sout, cuyo reservorio es el *O. longicaudatus*.

El análisis genético a partir de la secuenciación de 40 muestras pertenecientes a ambos países determinó la presencia en la región de un único agrupamiento para el cual no se logró establecer la existencia de sublinajes cocirculantes. Para el análisis filogenético de estas muestras se utilizó el fragmento G2 (figura 7)

En el árbol filogenético se puede observar que no existe un agrupamiento significativo de secuencias entre las distintas localidades de ambos países. La característica distintiva de este linaje, es la documentación, por primera vez, de cadenas de contagio interhumano para un hantavirus (Padula PJ. et al., 1997). Tema desarrollado en el punto 4.4.1.

El virus AND Sout es además, el único hantavirus capaz de producir enfermedad en un hámster desencadenando una enfermedad similar al SPH, incluyendo período de incubación, síntomas, y progreso de la enfermedad de forma similar al SPH en humanos, convirtiéndose en el primer hantavirus patógeno para el hombre con un modelo animal para el estudio de la infección (Hooper JW. et al., 2001).

Figura 7



Árbol filogenético a partir de muestras correspondientes al linaje AND Sout utilizando el fragmento de la glicoproteína G2 del segmento M utilizando el método de Máxima Parsimonia (MP).

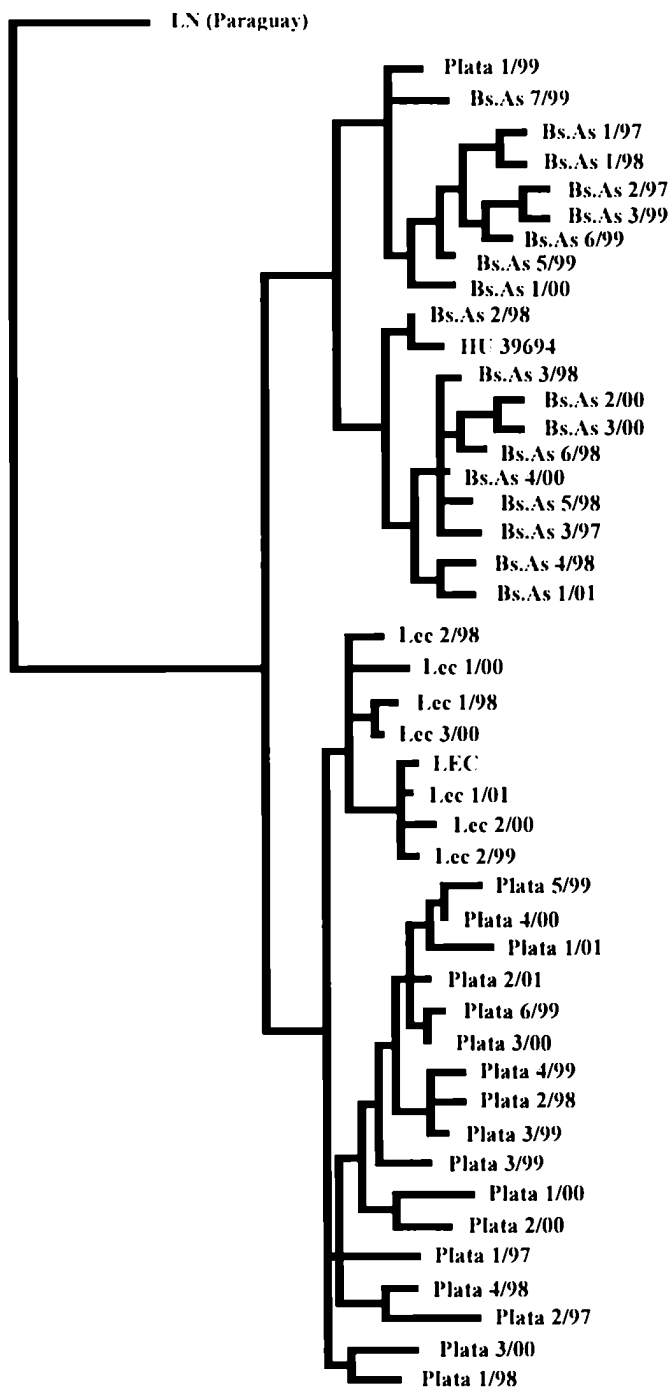
4.1.2.3 Región Central

A partir de estudios filogenéticos y del análisis comparativo de secuencias provenientes de muestras de la región geográfica central, que comprende la provincia de Buenos Aires y la República Oriental del Uruguay, se determinó la existencia de 3 linajes del hantavirus Andes en dicha región: AND Cent Bs. As., AND Cent Plata y AND Cent Lec (figura 8). Los linajes AND Cent Lec y AND Cent Bs.As fueron previamente reportados como genotipos Lechiguana (LEC) y Hu 39694 (Levis S. et al., 1998). En total se analizaron 8 casos humanos infectados con cepas virales correspondientes al linaje AND Cent Plata, 3 casos pertenecientes a la provincia de Buenos Aires y 5 a partir de muestras provenientes del Uruguay.

Más recientemente se analizaron 39 muestras provenientes de 21 partidos de la provincia de Buenos Aires (Martinez VP. et al., 2001).

Los 3 linajes se encuentran altamente relacionados y forman un único agrupamiento respecto del linaje Andes mas cercano, el virus Andes Nort.

Figura 8



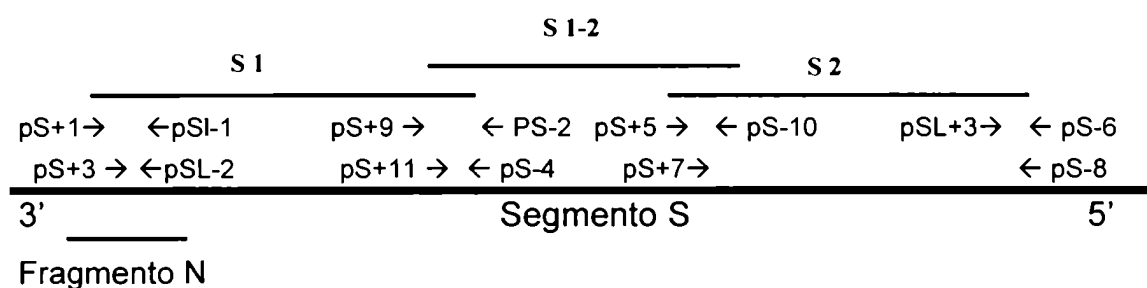
Árbol filogenético a partir de muestras correspondientes al linaje AND Cent utilizando el fragmento de la glicoproteína G2 del segmento M utilizando el método de Máxima Parsimonia (MP).

4.2 Caracterización del segmento S

Hasta el momento solamente se obtuvieron secuencias parciales de los distintos linajes. En esta parte del trabajo nos propusimos realizar la secuencia completa del genoma de una cepa prototipo del virus Andes.

Con el fin de amplificar el segmento S se generaron dos fragmentos: S1 y S2. El primer fragmento se logró utilizando los cebadores pS+1 y pS-2 como primer ciclo y pS+3 y pS-4 para la amplificación anidada. Para el segundo fragmento se utilizaron los cebadores pS+5 y pS-6 como primer ciclo y pS+7 y pS-8 para el segundo ciclo (figura 9). El signo +/- indica el sentido de pegado del primer.

Figura 9



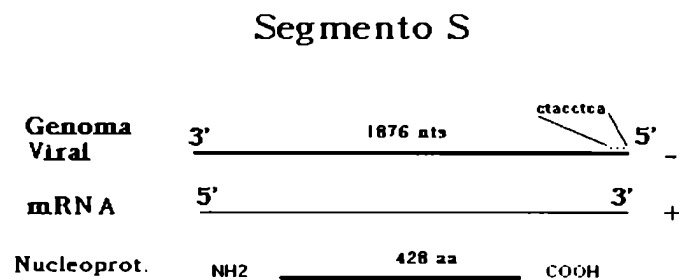
Posición de los cebadores utilizados para amplificar el segmento S completo del hantavirus Andes.

Los cebadores utilizados debieron ser diseñados específicamente para el virus Andes (tabla 3 materiales y métodos). La estrategia de amplificación se basó en realizar alineamientos de los hantavirus conocidos más cercanos. Del alineamiento se eligieron las regiones más conservadas, donde la probabilidad de mutaciones o cambios es menor. En nuestro caso se utilizaron las secuencias de los hantavirus causantes de SPH: SN, NY,

BAY, BCC y LN. A partir de estas secuencias se diseñaron cebadores concensuados (no Andes específicos). De la amplificación y secuenciación de estos fragmentos se diseñaron nuevos primers específicos pS+9, pS S-10 y pS+11 generando el fragmento S1-2 el cual logró unir los fragmentos S1 y S2.

La secuenciación del segmento S completo permitió obtener los siguientes datos. El segmento S del virus Andes posee 1876 nucleótidos de longitud. El marco de lectura abierto comienza con la metionina (met) en la posición nucleotídica 43 y finaliza en el nucleótido 1327 codificando para la nucleoproteína de 428 aminoácidos (figura 10). Esta proteína resultó ser altamente conservada comparado con los hantavirus que producen HPS.

Figura 10



Esquema del segmento S del hantavirus Andes donde se indica el tamaño en nucleótidos y polaridad del genoma viral, las secuencias repetitivas en la región 5' no codificantes (RNC). El resultado de la transcripción es un ARN mensajero viral de polaridad + y la traducción de éste genera la nucleoproteína N

El análisis de los porcentajes de identidad nucleotídica y aminoacídica para el segmento S, situaron al virus Andes como el más relacionado al virus LN de Paraguay con 70.4 % y 90.8 % respectivamente (tabla 7).

Tabla 7

A)

| | Andes Argentina | LN Paraguay | Riom Bolivia | Rios C.Rica | Bay USA | BCC USA | SN USA | NY USA | PH USA |
|-----------------|-----------------|-------------|--------------|-------------|---------|---------|--------|--------|--------|
| Andes Argentina | ----- | 70.4 | 70.2 | 67.1 | 69.3 | 69.5 | 67.1 | 68.1 | 66.1 |
| LN Paraguay | 90.8 | ----- | 75.9 | 69.1 | 68.9 | 68.6 | 66.9 | 66.7 | 66.3 |
| Riom Bolivia | 90.3 | 93.2 | ----- | 67.9 | 68.6 | 68.0 | 65.5 | 65.1 | 66.4 |
| Rios C. Rica | 81.7 | 80.6 | 81.5 | ----- | 69.4 | 67.6 | 69.3 | 67.6 | 64.2 |
| Bay USA | 88.3 | 81.2 | 88.1 | 83.6 | ----- | 73.6 | 66.2 | 67.5 | 65.9 |
| BCC USA | 86.4 | 85.5 | 86.7 | 82.0 | 92.3 | ----- | 64.2 | 64.4 | 65.5 |
| SN USA | 85.9 | 85.3 | 84.6 | 83.2 | 86.9 | 83.9 | ----- | 76.5 | 64.8 |
| NY USA | 87.6 | 87.1 | 86.7 | 82.9 | 87.6 | 85.5 | 93.7 | ----- | 65.3 |
| PH USA | 74.9 | 74.7 | 74.8 | 72.9 | 77.1 | 76.6 | 73.8 | 75.7 | ----- |

B)

| | AND Argentina | LN Paraguay | Riom Bolivia | Rios C.Rica | Bay USA | BCC USA | SN USA | NY USA | PH USA |
|---------------|---------------|-------------|--------------|-------------|---------|---------|--------|--------|--------|
| AND Argentina | ----- | 79.5 | 79.3 | 74.2 | 77.1 | 76.9 | 76.5 | 77.2 | 70.6 |
| LN Paraguay | | ----- | 82.6 | 75.3 | 77.9 | 77.5 | 76.5 | 76.4 | 69.9 |
| Riom Bolivia | | | ----- | 74.2 | 77.9 | 77.3 | 76.5 | 76.9 | 69.9 |
| Rios C. Rica | | | | ----- | 75.0 | 73.6 | 75.4 | 73.9 | 68.7 |
| Bay USA | | | | | ----- | 81.4 | 77.1 | 77.5 | 70.5 |
| BCC USA | | | | | | ----- | 75.8 | 75.9 | 70.4 |
| SN USA | | | | | | | ----- | 83.7 | 69.6 |
| NY USA | | | | | | | | ----- | 70.4 |
| PH USA | | | | | | | | | ----- |

Tablas de similitud de los hantavirus americanos. A) Porcentajes de similitud nucleotídica correspondiente al segmento S completo, diagonal superior. Similitud aminoacídica correspondiente a la nucleoproteína N, diagonal inferior. B) Porcentajes de similitud de la región codificante del segmento S.

De la misma manera, el estudio de la región más variable de la nucleoproteína en los hantavirus, comprendida entre los aa. 230 y 300, mostró nuevamente la máxima identidad del virus Andes con el virus LN (70.0 %). Para el resto de la proteína la identidad fue del 93.8 %.

4.2.1 Región 5' no codificante del segmento S

El análisis del segmento de la porción 3' terminal del segmento S referido al antígenoma, reveló la existencia de una región no codificante de 547 nts., dicha región es la que presenta la mayor variabilidad comparada con la región correspondiente a otros hantavirus. La presión evolutiva sobre una región no codificante es menor, ya que su información no se transcribe a proteínas. Sin embargo en la región no codificante se encontraron dos tipos de secuencias conservadas presentes en todos los hantavirus. La primera presenta el motivo "5' CTACCTCA 3' ". Dicha secuencia se encontró repetida tres veces a 50, 65 y 93 nucleótidos del extremo 3' terminal. El número de repeticiones difiere aparentemente en los hantavirus que son portados por roedores Sigmodontinos, los cuales presentan tres motivos versus los Arvicolinos que sólo portan dos repeticiones de esta secuencia en las posiciones 50 y 104-106.

El segundo motivo de secuencias conservadas dentro de la región no codificante 5' GGGTGGTTAAGGGGTCA 3' y 5' GGGTAAGGGTTCA 3' estarían asociadas a señales de fin de la transcripción tal como fueran también descritas por Hutchinson para el virus SN (Hutchinson, KL. et al.,

1996). En el virus Andes dichas secuencias se encuentran en las posiciones 1433 y 1462 respectivamente.

4.2.2 Análisis de los marcos de lectura abierto

Además del marco de lectura abierto responsable de la síntesis de la nucleoproteína en la posición nucleotídica 43, es posible detectar la presencia de un segundo marco de lectura solapado que comienza en el nucleótido 122 respecto del extremo 5' terminal del virus Andes y se extiende hasta el nucleótido 310. En total abarca 189 nucleótidos, que tendrían la capacidad potencial de codificar para una proteína de 63 aminoácidos. Este marco de lectura ha sido encontrado en otros hantavirus pulmonares de América así como en PUU y Tula, ambos virus asociados a FHSR. La ubicación se encuentra altamente conservada en todos los casos, sin embargo su longitud es variable, presentando 90 aminoácidos en PH, 67 aa. en Tula, 76 aa. en LN, 69 aa. en NY y 63 aa. en SN, BCC, Bay y el virus Andes.

Si este segundo marco de lectura fuera funcional, la presión evolutiva para mantener la secuencia aminoacídica en ambos marcos debería disminuir la frecuencia de sustituciones en tercera posición para esta región. Para determinar la variación en la frecuencia de mutaciones se realizó un análisis estadístico utilizando el programa SPSS 10 (Statistical Package for the Social Sciences) que permite comparar la frecuencia de mutaciones en tercera posición en la región donde se solapan los marcos de lectura y en el resto del genoma codificante para todos los hantavirus americanos. Para ello

se analizaron todos los cambios nucleotídicos en tercera posición generando una matriz de datos binaria (sólo tomando la tercer posición del codón) donde 1 indica presencia de mutación y 0 indica conservación de la tercera posición. Se realizó un test estadístico de Chi cuadrado para comparaciones bivariadas con una significación $p < 0.05$ y se encontró una disminución significativa en las sustituciones de tercera posición para la región solapada ($39/55 = 70.9\%$ sustituciones sobre tercera posición) respecto del genoma restante ($279/339 = 82.3\%$ sustituciones sobre tercera posición). Esto implicaría que de alguna manera esta región poseería alguna función accesoria, aún no determinada, que impide o disminuye su variación.

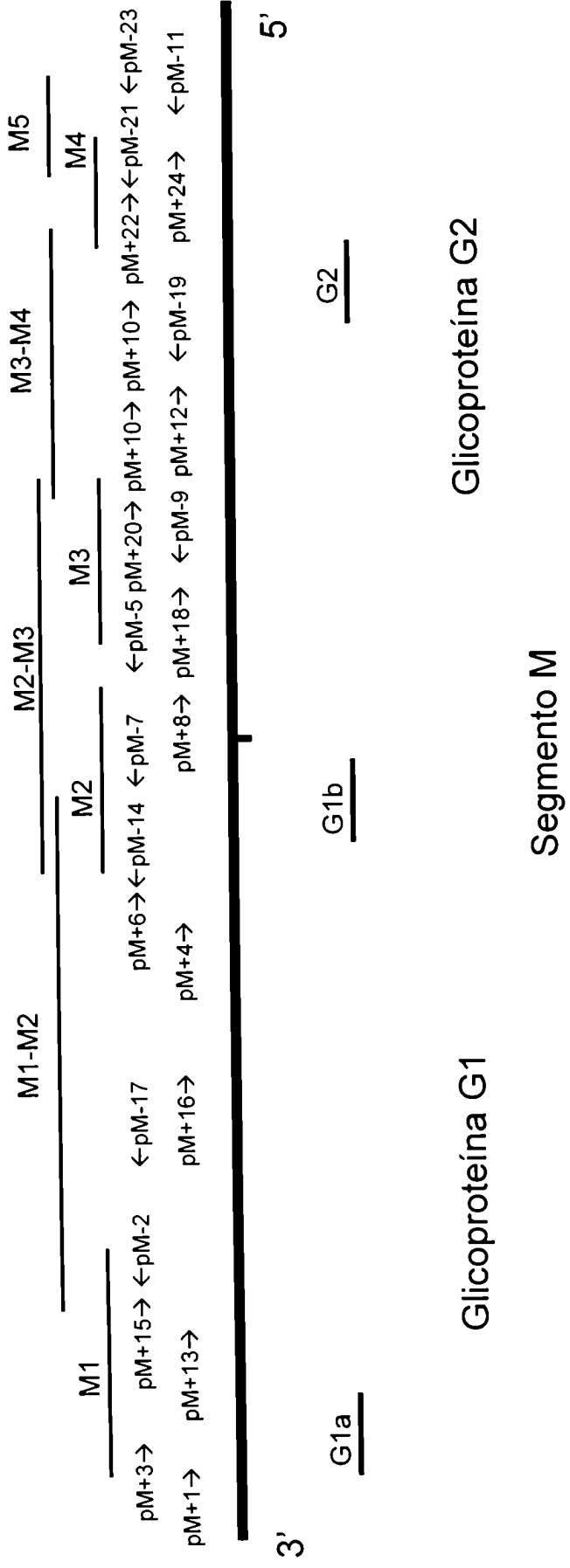
4.3 Caracterización del segmento M

Con el objeto de amplificar el segmento M se utilizó la misma estrategia descrita para el segmento S, sin embargo, debido al mayor tamaño de este segmento se debieron generar cuatro fragmentos iniciales. M1 (pM+1_pM-2 como primer ciclo de amplificación y pM+3_pM-2 como segundo ciclo hemianidado), M2 (pM+4_pM-5 y pM+6_pM-7 como segundo ciclo), M3 (pM+8_pM-9 como único ciclo de amplificación) y M4 (pM+10_pM-11 y pM+12_pM-11 como segundo ciclo hemianidado) (figura 11), luego a partir de la secuenciación de éstos fragmentos se diseñaron los primers capaces de unir M1-M2, M2-M3, M3-M4 y M5 generándose los fragmentos M1M2 (pM+13_pM-14 como primer ciclo de amplificación y pM+15_pM-14 como segundo ciclo hemianidado). Para secuenciar este fragmento de 1200 pb se utilizaron dos cebadores internos al fragmento de idéntica secuencia

pero de distinta orientación (pM+16 y pM-17). M2M3 no se logró a través de primers nuevos sino cambiando las condiciones de reacción (utilizando Dimetilsulfoxido (DMSO) al 5% final en el primer ciclo) y combinando los cebadores pM+4_pM-9 como primer ciclo y pM+6_pM-9 como segundo ciclo hemianidado. M3M4 se generó utilizando los primers pM+18_pM-19 como primer ciclo y pM+20_pM-21 como segundo ciclo.

El fragmento M5 que comprende la región 5' del segmento fue amplificada utilizando el primer pM+22_pM-23 y pM+24_pM-23 como segundo ciclo anidado. (figura 11 y tabla 3 materiales y metodos).

Figura 11



Glicoproteína G1

Glicoproteína G2

Segmento M

Esquema de la posición de los cebadores utilizados y los fragmentos generados para la amplificación del segmento

M del virus Andes

Luego de la amplificación y posterior secuenciación de los fragmentos M1, M1-M2, M2, M2-M3, M3, M3-M4, M4 y M5 se reportaron las siguientes características. El segmento M del virus Andes posee una secuencia de 3671 nucleótidos. Durante el transcurso de esta tesis, un grupo de investigadores en USA secuenció el segmento genómico M completo de los linajes virales AND Cent Lec y AND Cent Bs.As (Levis S. et al., 1998) lo que permitió su comparación. El largo total es 18, 19 y 25 nucleótidos mayor que los virus Andes Lec, Andes Cent Bs.As y Andes Cent Nort (Della Valle, M. et al., 2000) respectivamente pero 27 y 25 nucleótidos menor que los virus LN y SN respectivamente. Para todos los virus responsables de SPH la diferencia en el largo de este segmento se encuentra en la región 5' no codificante y por lo tanto no representa diferencia en las proteínas codificadas a partir de este segmento.

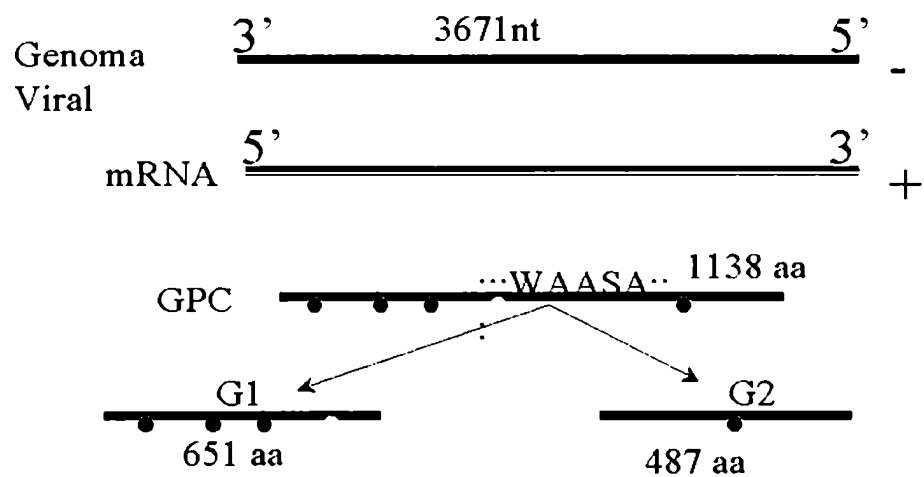
El mayor marco de lectura abierto (ORF) se encuentra entre los nucleótidos 52 a 3465, codificando para una proteína de 1138 aa. (figura 12).

Al igual que todos los hantavirus descritos hasta el momento, el virus Andes posee el motivo aminoacídico "WAASA" en la posición 647-651, este motivo sería una señal para el procesamiento del precursor glicoprotéico (GPC) el cual sería clivado postraduccionalmente en el retículo endoplasmático por una proteasa celular (Ruusala et al., 1992; Shi X. et al., 2002 y Spiropoulou CF. et al. 2003).

El clivaje del GPC libera las dos glicoproteínas G1 y G2. La primera se extiende desde el aa. 1 hasta el 651 (posición nucleotídica 52-2004) incluyendo el sitio putativo de clivaje mientras que la segunda abarca los aa 652-1138 (posición nucleotídica 2005-3465).

Figura 12

Esquema del segmento M del hantavirus Andes donde se indica el



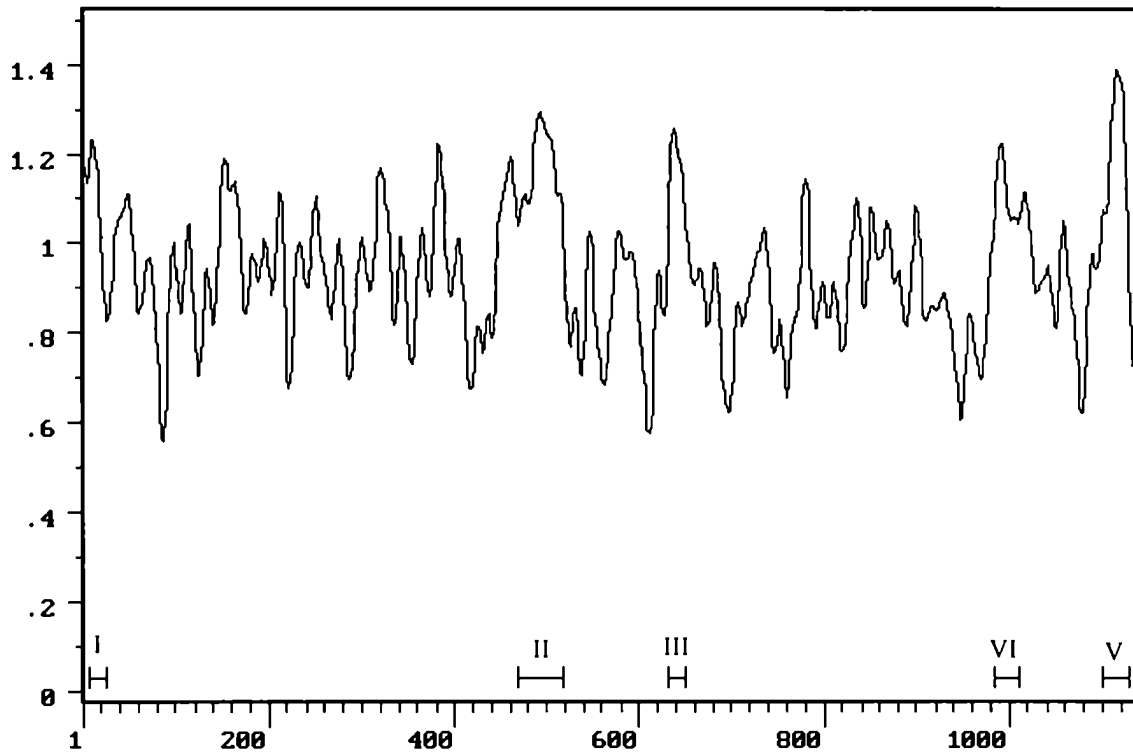
tamaño en nucleótidos y polaridad del genoma viral, las regiones no codificantes (RNC), su mensajero, y el tamaño de las proteínas resultantes donde se pueden observar los sitios potenciales de glicosilación

Para el análisis de las regiones hidrofóbicas del GPC se utilizó el programa RAOARGOS del paquete informático PCGENE. La función de este programa es determinar la presencia de regiones transmembrana (Rao M.J.K.& Argos P, 1986), a partir del cálculo de un parámetro conformacional preferencial basado en la relación entre la composición de cada aminoácido presente en la región transmembrana potencial versus la presencia de ese mismo aminoácido en las demás regiones de la proteína.

El análisis del perfil de hidrofobicidad del GPC del virus Andes (figura 13), mostró 5 dominios hidrofóbicos. De éstos, todos menos el dominio IV se encontraron presentes en todos los hantavirus.

El dominio I, se extiende de la posición aminoacídica 1 al 18 y correspondería al péptido señal (Parrington P. et al., 1991). El dominio II, posición 469 a 519 y el dominio V (posición 1099 a 1129) corresponden a los dominios transmembrana de G1 y G2 respectivamente (Spiropoulou et al., 1994). La existencia del dominio IV no está determinada ya que se encuentra en el punto de corte respecto de los parámetros del algoritmo.

Figura 13



Smoothed curve of ANDM from amino acid 1 to amino acid 1138.
The y axis value represents the buried helix parameter.

Perfil de hidrofobicidad del precursor glicoprotéico GPC calculado con el programa RAOARGOS del paquete de análisis genético PCGENE (versión 6.82).

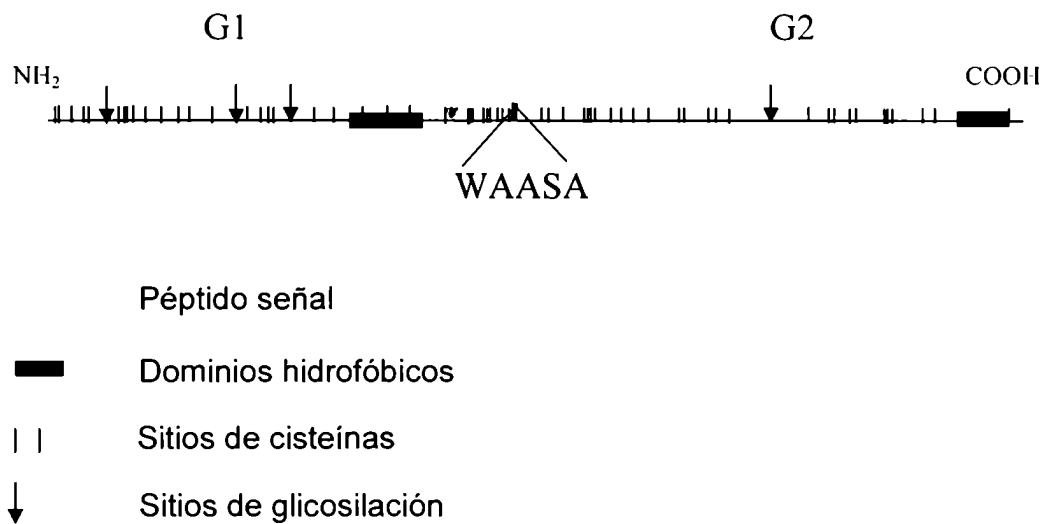
Todos los hantavirus americanos presentan el dominio IV y la mayoría del viejo mundo, sin embargo utilizando el programa SOAP del mismo paquete informático (Kyte J. & Doolittle RF., 1982) este dominio desaparece para la mayoría de los virus. El dominio III se extiende entre los aminoácidos 632 y 651 terminando con el pentapéptido WAASA. En el virus Andes este pentapéptido se encuentra altamente conservado en la posición aminoacídica 647-651.

El GPC posee dos regiones altamente hidrofóbicas que se encuentran río arriba de la secuencia putativa de clivaje del precursor en G1 y cerca del extremo carboxi-terminal de G2.

Ambas regiones serian los puntos de anclaje de las glicoproteínas a la membrana viral.

La glicoproteína G1 contiene cuatro sitios potenciales de glicosilación ligados a asparragina, representados por el motivo aminoacídico Asn-X-Ser o Asn-X-Thr, estos se encuentran en la posición aminoacídica 138, 350, 402 y 524 (figura 14). De los cuatro sitios presentes, tres se encuentran conservados en todos los hantavirus responsables de SPH, mientras que el cuarto sitio (aa. 524) sólo se encuentra en el virus Andes y PH (Parrington MA. et al., 1991). La glicosilación de este sitio parece no ser posible dado que se encuentra en el dominio citoplasmático de la región transmembrana y por lo tanto no se encontraría expuesta.(Figura 14 y Apéndice I).

Figura 14

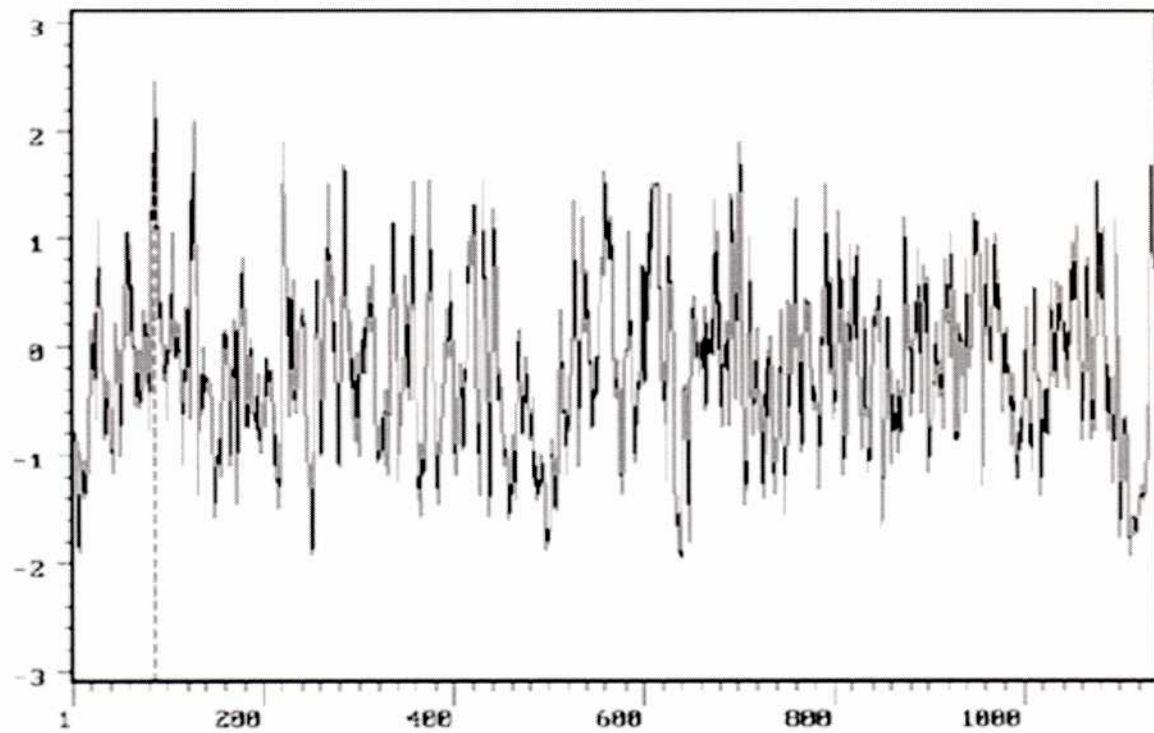


Esquema del segmento M indicando los sitios putativos de glicosilación en la glicoproteína G1 y G2. Se muestran además los dominios hidrofóbicos correspondientes a las regiones transmembrana y péptido señal

La glicoproteína G2 presenta un único sitio de glicosilación en la posición 930, esta posición se encuentra conservada en todos los hantavirus.

El perfil de hidrofiliidad del GPC calculado utilizando el programa ANTIGEN (Hopp TP. & Woods KR., 1981) cuyo algoritmo asigna valores hidrofílicos a los distintos aminoácidos y computa hexapéptidos, muestra un pico en la región carboxi-terminal correspondiente a la G1. (figura 15).

Figura 15



Hydrophilicity profile of protein sequence ANDM.
Computed using an average group length of 5 amino acids.

Aminoacidos 84 a 89: Arg-Lys-Lys-Ser-Asp-Thr

*Perfil de hidrofiliidad del precursor glicoprotéico GPC del virus Andes
calculado a través del programa ANTIGEN del paquete de análisis
genético PCGENE (versión 6.82).*

La alta homología en la presencia de cisteínas (cys) y prolinas en los distintos hantavirus indica una alta conservación en la estructura tridimensional de ambas glicoproteínas. Las cys son los únicos aminoácidos capaces de establecer enlaces o puentes disulfuros a través del átomo de azufre presente en su radical. Este enlace es covalente y por lo tanto es una fuente de estabilización de la conformación proteica. Las 64 cys presentes en el virus Andes representan un 5,6% de la composición aminoacídica total, del total 37 cys se encuentran en G1 mientras que las 27 restantes en G2.

A su vez, de las 64 cys totales presentes en el virus Andes, 52 cys se encuentran en la misma posición en los demás virus, mientras que de las 12 restantes, 6 cys conservan la posición en más del 95% de los hantavirus.

El virus Andes posee 1 cys en la posición aminoacídica 643, la cual no esta presente en los demás virus, mientras que no presenta cys ausentes las cuales están presentes en los demás virus.

La prolina (pro) es el único iminoácido, en él se forma una estructura cíclica entre su radical y el grupo amino y por esta razón su presencia genera giros beta en las proteínas además de romper hélices alfa. El virus Andes presenta 51 pro. La conservación de las pro entre los hantavirus presentes en Sudamérica es del 96%. El virus Andes presenta una pro única respecto de los demás hantavirus en la posición aminoacídica 721 correspondiente a la glicoproteína G2.

A diferencia de lo que observado en el segmento S, en el análisis de la secuencia del segmento M no se detectó la presencia de ningún marco de lectura abierto adicional en ninguno de los dos sentidos, consecuentemente

no sería posible la existencia de una proteína no estructural para este segmento.

Para el virus Hantaan se ha demostrado la existencia de una región intergénica de 17 aa. (Schmaljohn et al. 1987). La comparación de ambas proteínas putativas determinó la presencia de la misma región para el virus Andes en la posición 652-669.

4.4 Caracterización parcial del segmento L

Para los hantavirus el segmento L codifica para la RNA polimerasa ARN dependiente. Dada la función fundamental de esta enzima en la replicación viral, no se esperan mutaciones significativas en dicho segmento para los hantavirus, incluso la homología es elevada si se la compara con virus de la familia *Bunyaviridae*. Debido a esta alta homología, el análisis del segmento no aporta información para la caracterización viral y por consiguiente en banco de datos sólo se dispone de algunas secuencias completas del segmento L.

Para estudiar el segmento L del virus Andes se amplificó un fragmento de 608 nts. ubicado en la posición 2831 a 3438, lo que correspondería a un fragmento de la polimerasa de 202 aa. posición 943-1144 (numerado relativo al virus Sin Nombre). Dentro de los hantavirus asociados a la subfamilia *Sigmodontinae* sólo se encuentran accesibles en el banco de secuencias GenBank las pertenecientes al virus LN y al virus SN.

La comparación nucleotídica y aminoacídica reveló una identidad del 79.5% y 90.7%, respectivamente, con el virus LN (sobre 521 nts) el virus más emparentado con secuencia disponible, mientras que para el virus SN la identidad fue del 72.7% para la comparación genómica y 87.1% (tabla 8) para la comparación aminoacídica.

Tabla 8

| | Andes | LN* | SN | PUU | SEO | HTN |
|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Andes | _____ | 79.5 | 72.7 | 71.7 | 62.6 | 61.1 |
| LN* | 90.7 | _____ | 75.4 | 70.4 | 66.6 | 64.9 |
| SN | 87.1 | 86.7 | _____ | 64.1 | 61.0 | 69.6 |
| PUU | 82.7 | 80.4 | 80.2 | _____ | 70.4 | 63.5 |
| SEO | 72.8 | 72.3 | 73.3 | 71.3 | _____ | 62.0 |
| HTN | 71.8 | 69.4 | 30.3 | 70.8 | 86.1 | _____ |

*nts 2862-3382 disponibles de LN

*aa 943-1115 disponible de LN

Tablas de similitud del fragmento amplificado de la ARN polimerasa correspondiente al segmento L. Diagonal superior: Porcentajes de similitud nucleotídica y diagonal inferior: similitud aminoacídica.

4.5 Análisis filogenético

Para el análisis filogenético de los hantavirus se utilizó el método de Maxima Parsimonia (MP) debido que para la familia *Bunyaviridae* en general y el genero hantavirus en particular no hay un reloj molecular capaz de asociar la evolución de los virus. De esta manera el algoritmo matemático desarrollado en éste método es el que mejor interpreta los datos de secuencias debido a que minimiza los cambios.

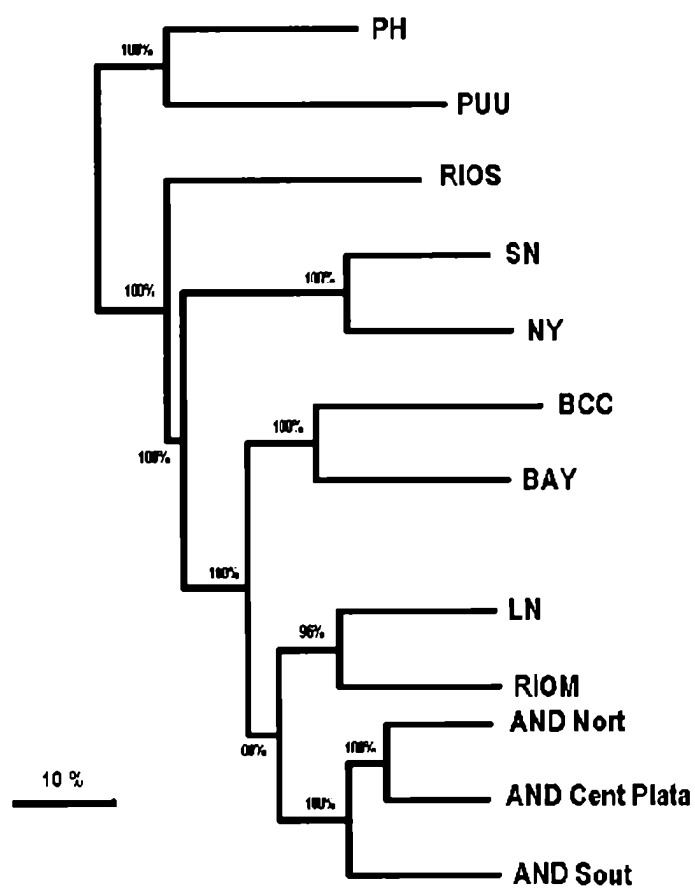
Existen 3 grupos principales de hantavirus, los cuales se corresponden con las subfamilias *Muridae*, *Arvicolinae* y *Sigmodontinae* dentro de la familia *Muridae*.

Dentro de los hantavirus asociados a la subfamilia *Sigmodontinae*, el análisis de las secuencias de los segmentos completos S (figura 16A) y M (figura 16B) por el método de máxima parsimonia indicó que los virus relacionados a los sigmodontinos sudamericanos formaron un clado separado de los hantavirus asociados a los peromyscines de América del Norte.

El análisis filogenético mostró que los virus del grupo Andes (Andes, Orán y Lechiguanas) y Laguna Negra (LN), representaron un linaje distinto dentro de los hantavirus sudamericanos asociados a SPH.

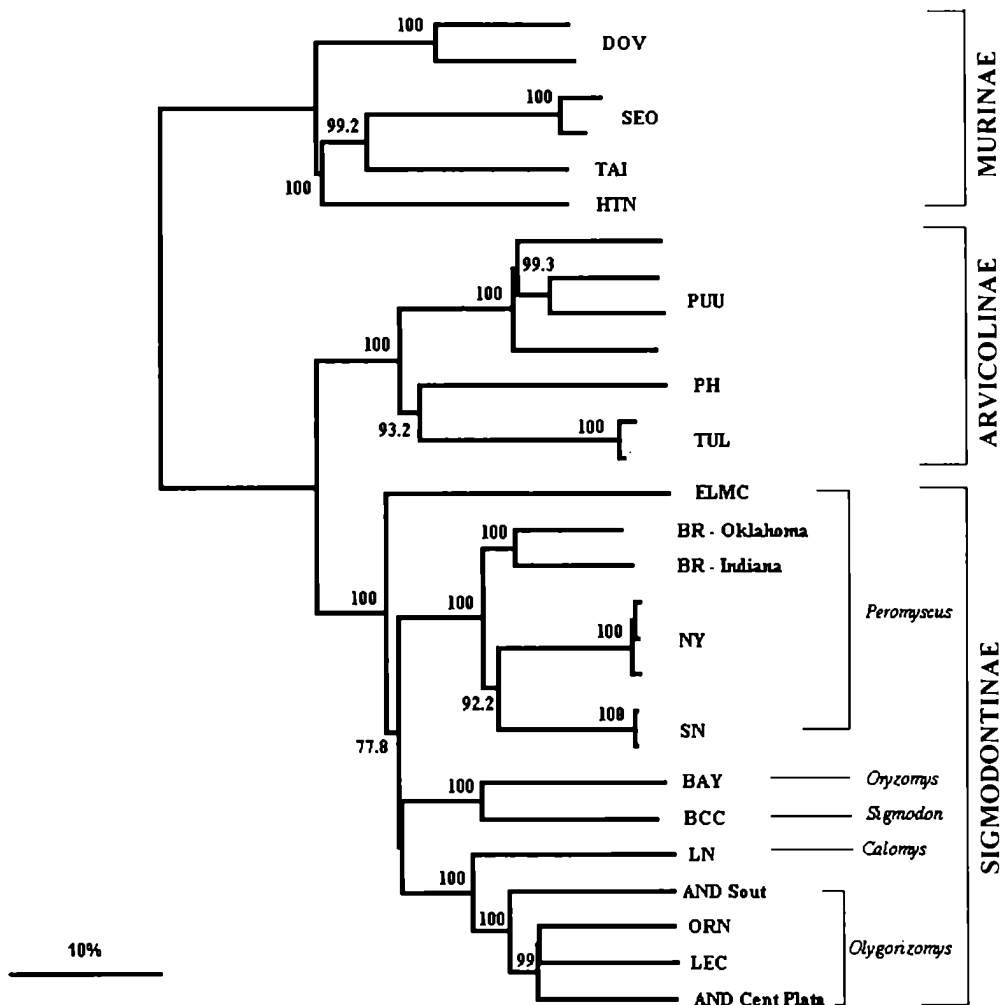
El clado sudamericano presentó un origen monofilético, siendo LN un taxón más ancestral.

Figura 16 A



Árbol filogenético correspondiente al segmento S completo de los hantavirus utilizando el método de MP.

Figura 16 B



Árbol filogenético correspondiente al segmento M completo de los hantavirus utilizando el método de MP.

4.6 Análisis de los extremos genómicos

Aún cuando las secuencias de los segmentos virales completos de los hantavirus han sido publicados con los extremos genómicos putativos, dado que incluían las secuencias de los cebadores, los hantavirus presentan deleciones terminales que podrían estar relacionadas con la infección persistente y otorgarle propiedades biológicas diferenciales según el grado de deleción que presenten, razón por lo cual la determinación fehaciente de dichos extremos se hace imperativa.

4.6.1 Extremos genómicos de los segmentos S y M

La secuencia putativa completa de los segmentos S y M descrita en 4.2 y 4.3 se obtuvo a través de la amplificación y posterior secuenciación a partir de cebadores de ubicación terminal en ambos segmentos, estas secuencias contienen las regiones correspondientes a los cebadores por lo tanto dichos extremos no pertenecen al virus sino a los cebadores.

Con el fin de conocer la secuencia terminal de los segmentos del virus Andes, se circularizaron los extremos de los segmentos S y M del virus Andes mediante la ligación de las terminaciones de dichos segmentos de ARN.

La ligación del segmento S y posterior secuenciación confirmó la secuencia putativa tanto para el extremo 3' como para el 5' terminal del ARN viral (figura 17A). Este segmento no presentó deleciones en el extremo 3' ni en el extremo 5' terminal.

La ligación y posterior secuenciación del segmento M presentó deleciones respecto de sus correspondientes secuencias putativas. El segmento M presentó 3 deleciones en el extremo 3' y ninguna en el 5' con respecto a la secuencia putativa del segmento descrita para otros hantavirus (figura 17B). Para determinar la frecuencia de estas deleciones se decidió clonar el fragmento de PCR amplificado a partir del ARN viral y de esta manera determinar la composición y abundancia relativa de las poblaciones de extremos.

Se secuenciaron un total de 24 clones conteniendo los extremos ligados del segmento M (figura 17 B). La secuencia 5' terminal del ARN viral se encontró altamente conservada, detectándose la presencia de nucleótidos faltantes en sólo 5 de los 24 clones analizados. En cambio, ningún clon analizado presentó el extremo 3' del ARN viral intacto. Del total, 17 clones presentaron extremos 3' truncados donde faltaban los nucleótidos AUC. Con el objeto de eliminar un factor de variabilidad asociado al error de la polimerasa se repitió el experimento a partir de una preparación independiente obteniéndose el mismo resultado.

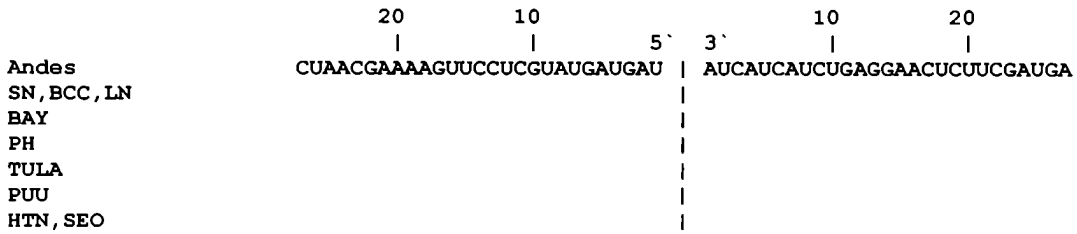
El análisis de los clones demuestra la presencia de poblaciones virales cuyos extremos presentan un número variable de deleciones tanto en el extremo 3' como en el 5' terminal.

4.6.2 Extremo genómico del segmento L

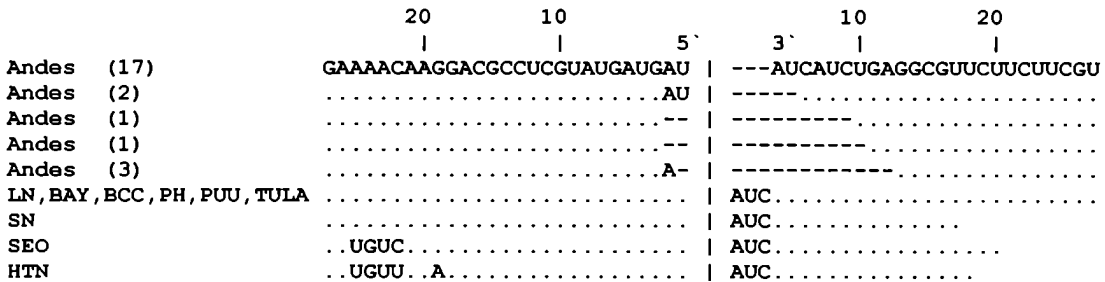
La misma estrategia de ligación, clonado y secuenciación utilizada para los segmentos S y M se intentó para determinar la secuencia de los extremos

Figura 17

**A)
Segmento S**



**B)
Segmento M**



**C)
Segmento L**

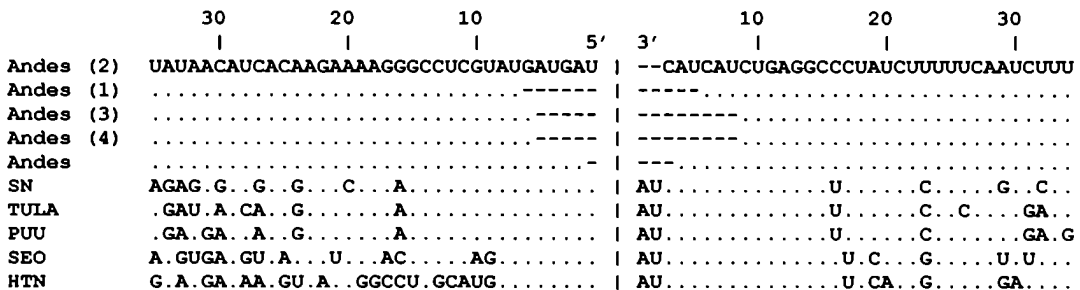


Gráfico de los extremos secuenciados del segmento S y secuencias de los extremos clonados de los segmentos M y L, todos alineados con hantavirus del nuevo y viejo mundo. El numero entre paréntesis indica la cantidad de clones analizados.

del segmento L, sin embargo no fue posible su ligación, probablemente debido al bajo número de copias del segmento L presentes.

Con el objeto de contar con un mayor número de moléculas, se realizó el asilamiento viral a partir de tejidos de roedores positivos de la misma zona geográfica que la muestra utilizada para las ligaciones de los dos segmentos anteriores.

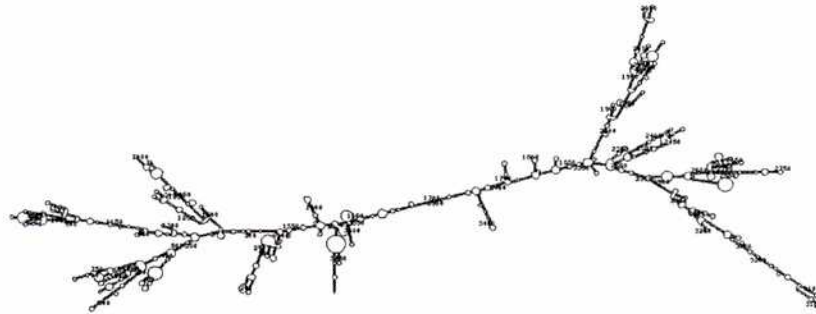
La ligación de los extremos y secuenciación determinó la presencia de pequeños cambios en las bases involucradas en la formación de la estructura de asa de sartén (Panhandle) comparado con el virus SN. Estas diferencias incluyen el cambio de los nucleótidos en la posición 16 respecto de ambos extremos generándose la unión U-A para el virus SN mientras que para el virus Andes la estabilización de la estructura secundaria sería a través de C-G. Además los nucleótidos en las posiciones 20 y 24 del extremo 5' terminal del virus SN están cambiados $A \rightarrow C$ y $A \rightarrow G$ respectivamente para el virus Andes (figura 17C). En los extremos del segmento se detectó la ausencia de 2 nucleótidos (AU), los cuales podían faltar en cualquiera de los dos extremos del ARN viral.

Con el objeto de determinar las alteraciones presentes en los extremos se clonaron los productos de ligación obteniéndose 12 colonias. Ninguna de las colonias presentó ambos extremos intactos. Un clon presentó la delección de un nucleótido en el extremo 5' y 3 en el extremo 3', 2 clones presentaron la delección de 2 nucleótidos los cuales por estudios de variabilidad corresponderían al extremo 3' (Meyer BJ. & Schmaljohn CS., 2000). El resto de los clones presentaron al menos 11 delecciones entre ambos extremos.

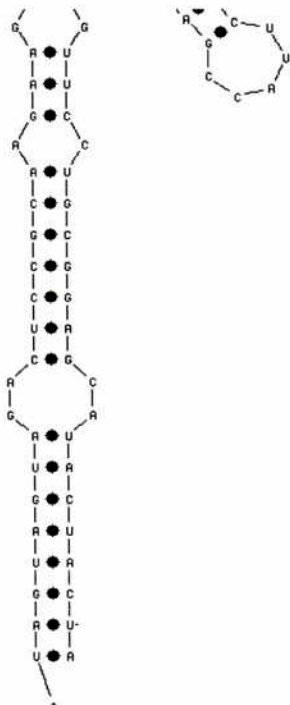
Para determinar la importancia de las deleciones presentes en los distintos clones se realizó un estudio de estructura secundaria del ARN viral, y de esta forma evaluar el impacto de las bases faltantes en la unión de ambos extremos y la formación de la estructura de "mango de sartén". El algoritmo de Zuker (Zuker M., 1989) permite analizar la probabilidad de la formación (estabilización) de una estructura secundaria de acuerdo a la atracción (interacción versus repulsión) entre las cadenas de nucleótidos de los extremos de los genomas virales. Se calculó el valor de energía libre ΔG (grado de estabilidad) de los extremos completos y los extremos de los clones con 3 deleciones en el extremo 3' y completo el 5', extremos con 9 deleciones del extremo 3' y 2 del 5' y finalmente extremos con 12 nucleótidos delecionados del extremo 3' y 2 nucleótidos del 5'.

De acuerdo a las secuencias de ARN, se determinó que la estructura secundaria de asa de sartén se formaría aún con la deleción de hasta 9 nucleótidos respecto de la secuencia original para el extremo 3' (figura 17).

Figura 17

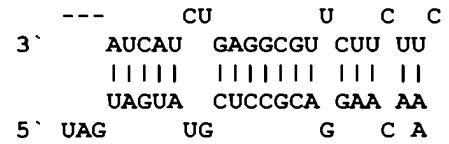
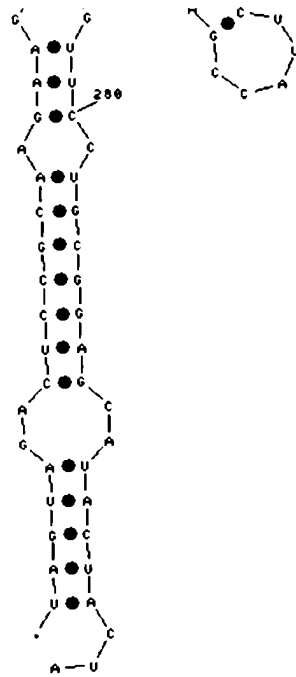


Estructura secundaria del segmento M del virus Andes.

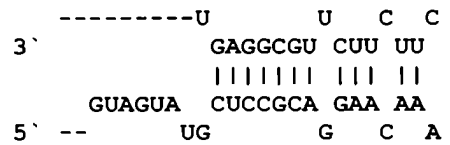
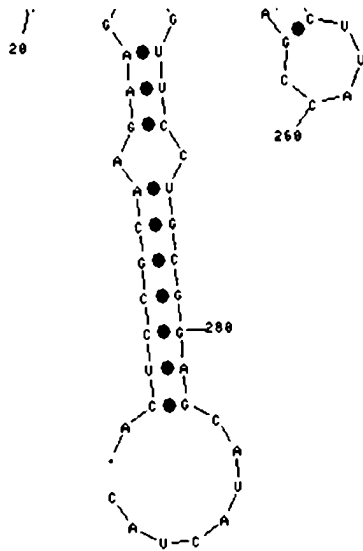


| | | | | |
|----|----------|---------|-----|-----|
| | CU | U | C | C |
| 3` | AUCAUCAU | GAGGCGU | CUU | UU |
| | | | | |
| | UAGUAGUA | CUCCGCA | GAA | AA |
| 5` | | UG | G | C A |

Plegamiento secundario de los extremos completos del segmento M del virus Andes.



Plegamiento secundario de los extremos del segmento M de los clones del virus Andes con 3 nucleótidos delecionados en el extremo 3' terminal



Plegamiento secundario de los extremos del segmento M de los clones del virus Andes con 9 nucleótidos delecionados en el extremo 3' y 2 nucleótidos del extremo 5' terminal

4.7 Propiedades biológicas del virus Andes Sout

4.7.1 Transmisión interhumana

Dos años después del descubrimiento de la existencia del hantavirus presente en América, cuya característica distintiva era una nueva enfermedad debida a un distrés pulmonar con una elevada mortalidad, se diagnosticaba por primera vez su presencia en Argentina, en la zona sur en la provincia de Río Negro. Sin embargo la característica más significativa de este virus emergería recién en el año 1996 en un brote en la ciudad de El Bolsón que involucró a 16 personas, con una mortalidad del 56%.

Para el análisis del brote se estudiaron 16 casos con infección confirmada por serología de hantavirus, todos relacionados epidemiológicamente, otros 6 casos de SPH no relacionados y 3 descritos anteriormente. Con propósitos comparativos se incluyó un caso que pertenecía a otra región, Orán, Salta, en el norte de Argentina. Las relaciones de contacto epidemiológicas de estos casos se describen en la figura 18.

4.7.1.1 Análisis comparativo de las secuencias

Luego de diagnosticar los casos se realizó un estudio molecular del virus involucrado en la infección de cada paciente. Se logró amplificar un fragmento de 285 nts ubicado en la región 3' terminal del segmento S (nts. 49-336) en 9 casos. Las primeras secuencias analizadas mostraron una identidad nucleotídica del 100% al compararlas entre sí.

Figura 18

| CASO | Lugar de residencia | Contacto con casos anteriores (hasta 45 días antes del comienzo de síntomas) | Inicio de Síntomas | Fecha de muerte |
|------------|---------------------|--|--------------------|-----------------|
| AH1 • | El Bolsón | Padre de AH1 | 22-4-95 | 29-4-95 |
| ESQ-1/96 | Esquel * | SCC | 9-2-96 | 14-2-96 |
| CH-1/96 | Chile | SCC | 23-2-96 | 28-2-96 |
| I • | El Bolsón | SCC | 22-9-96 | 26-9-96 |
| G | El Bolsón | SCC | 23-9-96 | |
| T | El Bolsón | SCC | 4-10-96 | |
| A • | El Bolsón | Médico de I | 12-10-96 | 20-10-96 |
| B • | El Bolsón | Madre de I | 13-10-96 | 19-10-96 |
| P • | Bariloche | Visitó el Hospital Privado de Bariloche mientras fueron hospitalizados casos de El Bolsón | 13-10-96 | 22-10-96 |
| L • | El Bolsón | Ama de llaves de I y B | 21-10-96 | 25-10-96 |
| Q • | Bariloche | Esposa de P. Dio a luz en el Hospital Privado de Bariloche mientras los casos de El Bolsón era transferidos. | 22-10-96 | 2-11-96 |
| K | El Bolsón | Amigo de I, contacto diario en el Hospital | 23-10-96 | |
| J • | Bs. As. * | Cuñado de I. Estuvo en el funeral de B. Viaje en auto con L. | 31-10-96 | |
| H • | Bs. As. * | Hermana de I, esposa de J. Estuvo en el funeral de B. Viajó en auto con L y J | 4-11-96 | |
| F | El Bolsón | Médico de I, B y G, contacto diario con A | 7-11-96 | |
| O | Bariloche | Visitó un paciente no HPS en el Hospital Privado de Bariloche | 7-11-96 | 13-11-96 |
| N | Bariloche | Recepcionista del Hos. Privado de Bariloche cuando casos de El Bolsón fueron hospitalizados. Amigo de P y Q | 8-11-96 | 17-11-96 |
| C • | El Bolsón | Esposa de A, transferida a un Hospital de Bs. As. | 8-11-96 | |
| ESQ-2/96 | Esquel | SCC | 20-11-96 | 22-11-96 |
| M • | Bs. As. | Hija de J y H. Viajó en auto con L, M, J y H. No visitó el área | 28-11-96 | |
| E | Bs. As.* | Amigo y médico de C. Visitas diarias en el Hospital de Bs. As. | 28-11-96 | 16-12-96 |
| D | Bs. As. | Médico de C en el Hospital de Bs. As. | 5-12-96 | |
| Salta-1/96 | Orán | SCC | 6-12-97 | |
| ESQ-3/96 | Esquel | SCC | 19-12-96 | 24-12-96 |
| CH-2/96 | Chile | SCC | 17-12-97 | 24-12-96 |
| CH-3/96 | Chile | SCC | 29-1-97 | |

SCC, Sin contacto conocido

• Cohabitó con uno o más casos de SPH. Gupos familiares: (AH-1 y su padre) (I su madre B y su ama de llaves L) (P y su esposa Q) y (M y sus padres J y H)

*Visitantes de El Bolsón

Tabla de datos epidemiológicos asociados a los casos involucrados en el brote conjuntamente con datos de los casos control utilizados para los análisis comparativos.

Aún cuando estos resultados eran indicativos de transmisión interhumana, hay que considerar que el fragmento estudiado no es muy variable.

Los resultados fueron los mismos al realizar múltiples extracciones cambiando los reactivos descartándose así un evento de contaminación.

Con el objeto de amplificar regiones con mayor variabilidad se seleccionaron cebadores para amplificar fragmentos pertenecientes a regiones del segmento M, éste codifica para dos glicoproteínas de superficie, las cuales presentan mayor variabilidad que la nucleoproteína: Se amplificó el fragmento G1a (nts. 88-259) ubicado en el extremo 3' del genoma viral conjuntamente con otro fragmento dentro de la misma glicoproteína, el fragmento G1b (nts. 1736-1992), ubicada en el extremo 5' terminal de la glicoproteína G1, incluyendo el sitio de clivaje del GPC. Dentro de la región correspondiente a la G2 se amplificó un fragmento de 167 nts (posición nucleotídica 2780-2946). Con el objeto de detectar variaciones entre las muestras se amplificó además la región no codificante en el extremo 5' (5' RNC) del segmento S (nts. 1694-1847). Este fragmento debería presentar una elevada variabilidad dado que al no codificar para proteínas, tiene menor selección negativa.

Los porcentajes de identidad entre las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas de G1a, G1b y G2 codificados por el segmento M (tabla 9) y de secuencias nucleotídicas del fragmento 5' RNC del segmento S (tabla 10) se compararon con los obtenidos con hantavirus ya caracterizados.

Tabla 9

| fragmento M (% de identidad) | BCC | | BAY | | CH-1/96 | | CH-2/96 | | CH-3/96 | | ESQ-1/96 | | U (ESQ-2/96) | | ESQ-3/96 | | AH-1 | | EpiInk/96 | | T | | G | | | | | | | | | | | |
|---------------------------------|-------|------|------|-------|---------|------|---------|------|---------|------|----------|------|--------------|------|----------|------|------|------|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| | G1a | G1b | G1a | G1b | G1a | G1b | G1a | G1b | G1a | G1b | G1a | G1b | G1a | G1b | G1a | G1b | G1a | G1b | G1a | G1b | G1a* | G2 | G1a* | G2 | | | | | | | | | | |
| BCC | --- | --- | 73.7 | 80.9 | 79.0 | 64.6 | 70.4 | 74.3 | 62.4 | 73.9 | 73.7 | 63.2 | 71.2 | 73.1 | 64.0 | 72.0 | 74.3 | 63.2 | 74.3 | 73.7 | 63.2 | 74.3 | 74.9 | 64.0 | 73.5 | 75.5 | 64.2 | 72.0 | 74.3 | 61.6 | 73.7 | 62.2 | 75.5 | |
| BAY | 80.2 | 91.8 | 87.3 | --- | --- | 61.4 | 72.4 | 70.7 | 61.8 | 73.2 | 71.3 | 61.2 | 75.5 | 70.1 | 61.6 | 75.5 | 72.5 | 62.4 | 75.5 | 72.5 | 62.4 | 75.5 | 72.5 | 61.2 | 75.5 | 72.5 | 61.2 | 75.5 | 70.7 | 61.6 | 70.1 | 61.1 | 72.5 | |
| CH-1/96 | 56.8 | 82.4 | 76.4 | 52.7 | 82.4 | 76.4 | --- | --- | 92.9 | 93.0 | 94.6 | 93.1 | 93.8 | 92.8 | 93.5 | 93.4 | 94.6 | 92.1 | 94.2 | 94.6 | 92.7 | 94.2 | 94.6 | 92.5 | 94.6 | 93.4 | 93.3 | 93.4 | 94.6 | 92.4 | 85.6 | 91.3 | 93.4 | |
| CH-2/96 | 56.2 | 82.4 | 76.4 | 52.1 | 82.4 | 76.4 | 99.4 | 100 | --- | --- | 96.1 | 94.2 | 95.8 | 95.9 | 93.8 | 97.6 | 96.7 | 95.3 | 100 | 97.2 | 95.3 | 97.6 | 95.3 | 95.7 | 95.2 | 95.7 | 93.8 | 97.6 | 95.9 | 94.0 | 97.1 | 95.2 | | |
| CH-3/96 | 56.2 | 82.4 | 76.4 | 52.1 | 82.4 | 76.4 | 99.4 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 96.3 | 94.9 | 95.8 | 95.7 | 94.9 | 95.8 | 95.5 | 94.9 | 94.6 | 97.6 | 96.9 | 97.0 | 96.1 | 94.9 | 95.8 | 97.7 | 97.0 | 98.8 | 97.0 | |
| ESQ-1/96 | 56.2 | 81.2 | 74.6 | 52.1 | 81.2 | 74.6 | 99.4 | 98.8 | 98.2 | 100 | 98.8 | 98.2 | 100 | 98.8 | 98.2 | --- | --- | 95.9 | 94.6 | 97.6 | 96.1 | 94.6 | 96.4 | 96.3 | 95.7 | 95.2 | 99.8 | 100 | 100 | 95.2 | 97.7 | 95.2 | | |
| U (ESQ-2/96) | 56.2 | 82.4 | 76.4 | 52.1 | 82.4 | 76.4 | 99.4 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 98.8 | 98.2 | --- | --- | 99.2 | 100 | 97.6 | 95.3 | 96.5 | 95.2 | 95.7 | 94.6 | 97.6 | 94.8 | 99.4 | 95.9 | 95.2 | | |
| ESQ-3/96 | 56.2 | 82.4 | 76.4 | 52.1 | 82.4 | 76.4 | 99.4 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 98.8 | 98.2 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 | 95.1 | 96.5 | 94.0 | 95.9 | 94.6 | 96.4 | 95.9 | 97.0 | 95.9 | 94.0 |
| AH-1 | 56.2 | 82.4 | 78.2 | 52.1 | 82.4 | 78.2 | 99.4 | 100 | 98.2 | 100 | 98.2 | 100 | 98.2 | 100 | 98.8 | 96.4 | 100 | 100 | 98.2 | 100 | 98.2 | 100 | 98.2 | 100 | 100 | 96.1 | 95.7 | 95.2 | 98.3 | 95.8 | 99.4 | 100 | | |
| EpiInk/96 | 56.2 | 81.2 | 74.6 | 52.1 | 81.2 | 74.6 | 99.4 | 98.8 | 98.2 | 100 | 98.8 | 98.2 | 100 | 98.8 | 98.2 | 100 | 100 | 100 | 98.8 | 98.2 | 100 | 98.8 | 98.2 | 100 | 98.8 | 100 | 98.8 | 96.4 | --- | --- | 100 | 94.6 | 97.7 | 95.2 |
| T | 56.1* | NA | 74.6 | 50.9* | NA | 74.6 | 100* | NA | 98.2 | 100* | NA | 98.2 | 100* | NA | 98.2 | 100* | NA | 98.2 | 100* | NA | 98.2 | 100* | NA | 98.2 | 100* | NA | 96.4 | 100* | NA | 100 | --- | --- | 97.7 | 94.6 |
| G | 56.1* | NA | 78.2 | 50.9* | NA | 78.2 | 100* | NA | 98.2 | 100* | NA | 98.2 | 100* | NA | 98.2 | 100* | NA | 98.2 | 100* | NA | 98.2 | 100* | NA | 98.2 | 100* | NA | 100 | 100* | NA | 96.4 | 100 | 99.4 | --- | --- |

Los valores por arriba de la diagonal corresponden a la homología entre secuencias nucleotídicas, los valores bajo la diagonal a las homologías entre secuencias aminoacídicas

Se analizaron solo los nucleótidos 88-259

ND, no determinado

Homología aminoacídica y nucleotídica entre secuencias del segmento M de hantavirus del sur de Argentina y Chile y dos característicos de América del Norte

Tabla 10

| Fragmento S (% identidad) | BCC | BAY | CH-1/96 | CH-2/96 | CH-3/96 | ESQ-1/96 | U (ESQ-2/96) | ESQ-3/96 | AH-1 | Epilink/96 | T |
|------------------------------|------|------|---------|---------|---------|----------|--------------|----------|------|------------|------|
| BCC | ---- | 74.8 | 76.2 | 73.4 | 75.5 | 75.5 | 76.2 | 75.5 | 76.2 | 76.2 | 75.5 |
| BAY | | ---- | 79 | 81.1 | 77.6 | 79.7 | 82.5 | 81.8 | 79 | 83.2 | 79.7 |
| CH-1/96 | | | ---- | 93 | 97.9 | 99.3 | 97.9 | 97.2 | 100 | 97.9 | 99.3 |
| CH-2/96 | | | | ---- | 90.9 | 93.7 | 92.3 | 91.6 | 93 | 93.7 | 93.7 |
| CH-3/96 | | | | | ---- | 97.2 | 95.8 | 95.1 | 97.9 | 95.8 | 97.2 |
| ESQ-1/96 | | | | | | ---- | 98.6 | 97.9 | 99.3 | 98.6 | 100 |
| U (ESQ-2/96) | | | | | | | ---- | 99.3 | 97.9 | 98.6 | 98.6 |
| ESQ-3/96 | | | | | | | | ---- | 97.2 | 97.9 | 97.9 |
| AH-1 | | | | | | | | | ---- | 97.9 | 99.3 |
| Epilink/96 | | | | | | | | | | ---- | 98.6 |

Homología nucleotídica entre secuencias del segmento S de hantavirus del sur de Argentina y Chile y dos características de América del Norte

Dieciséis casos (I, A, B, P, L, Q, K, J, H, F, O, N, C, M, E, D) que mostraron la misma secuencia viral, a la que denominamos Epilink/96, en los fragmentos G1a, G1b, G2, del segmento M y en el fragmento 5' RNC del segmento S, provinieron de El Bolsón. Sin embargo las secuencias de los dos casos humanos T y G, también provenientes de El Bolsón ocurridos en forma s contemporánea pero no epidemiológicamente relacionados a los 16 casos, resultaron diferentes de Epilink/96 y también entre sí. T difirió de Epilink/96 en 1 de 167 nucleótidos en el fragmento G2, en 2 de 143 en el fragmento S y fue idéntico en G1a. Mientras G difirió en 8 de 167 nts en G2 y 4 de 172 en la porción amino-terminal de G1a.

Ninguno de los virus correspondientes a la región donde se analizó el brote (sur de Argentina y Chile) difirieron entre sí más del 9.1%.

A pesar de la relativa diversidad entre las secuencias nucleotídicas en los fragmentos secuenciados de G1 y G2, la secuencia aminoacídica deducida está conservada indicando una fuerte presión evolutiva para

mantener la integridad de la expresión proteica, este hecho puede indicar que el reservorio de ambos virus es el mismo y que el virus está muy adaptado a este huésped. Esta presión evolutiva también se verificó al comprobar que el 88% de las diferencias nucleotídicas se encuentran en la tercera posición del codón y la mayoría corresponde a transiciones G-A o C-T cuyos resultados son mutaciones silentes (no modifican la secuencia aminoacídica). Las secuencias aminoacídicas correspondientes a G1a de todos los casos fueron idénticas. En G1b Epilink/96 y la secuencia más emparentada, ESQ-1/96, se diferenciaron en un aminoácido del resto de las secuencias del sur (isoleucina en lugar de treonina en el residuo 642).

En el fragmento G2, tanto Epilink/96 como ESQ-1 y el caso T presentaron una alanina en lugar de treonina en el residuo 939.

Los casos AH-1/96 y G se diferenciaron de las otras secuencias en un aa. mientras que SAL-1/96 mostró 2 cambios respecto de las secuencias del sur.

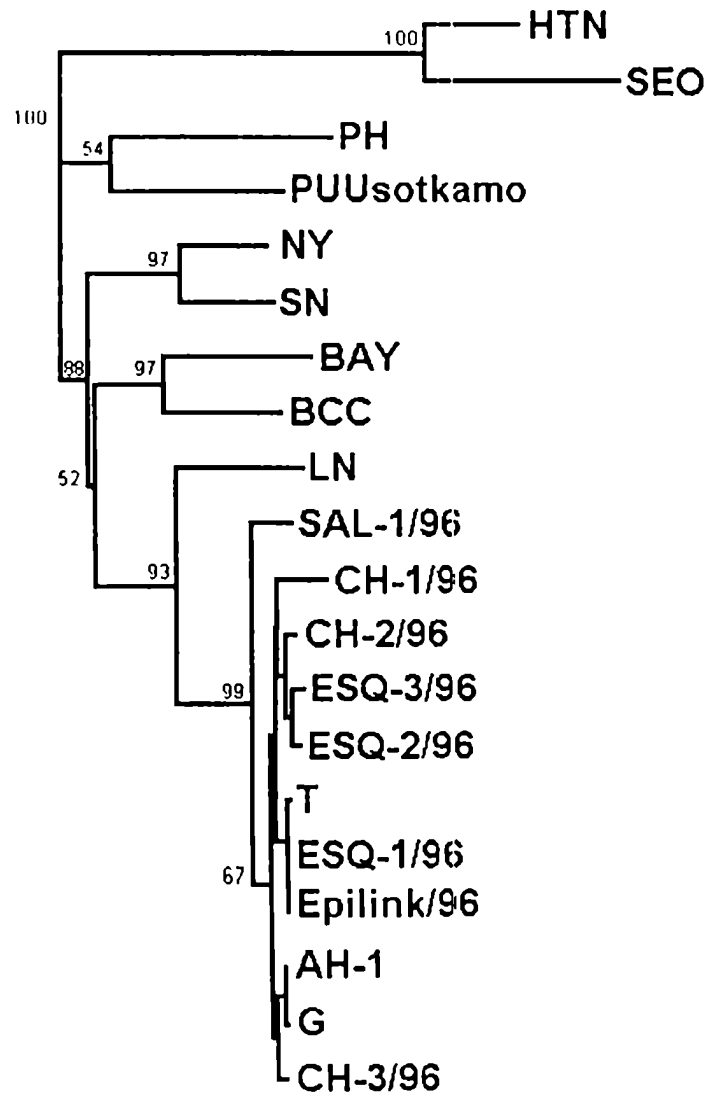
En las cadenas de contagio, establecidas a través de estudios epidemiológicos (Yadon Z., 1998), el porcentaje de mortalidad disminuyó lo cual es consistente con un evento de contagio interhumano donde se produce una adaptación/atenuación en los sucesivos pasajes, más que con infecciones independientes con una tasa de mortalidad altamente variable. Esta propiedad se verifica comparando los datos epidemiológicos donde se observan 6 muertes sobre 7 casos en octubre versus 3 muertes sobre 9 casos registrados en noviembre y diciembre.

4.7.1.2 Análisis filogenético de las secuencias de los casos de contagio interhumano

Para estudiar las relaciones filogenéticas se utilizó la región amino terminal del fragmento G1a (nts 88-259), y el fragmento G2 (nts 2780-2946) del segmento M.

Los árboles construidos con el método de máxima parsimonia (figura 17) mostraron que el virus Epilink/96 está relacionado más estrechamente con ESQ-1/96 y T que con las demás secuencias. Se puede observar que las secuencias chilenas no forman un grupo definido, pero el registro de los viajes de esas personas es incompleto por lo que no está claro el sitio probable de infección. Además el estrecho parentesco entre las secuencias del sur de Argentina y Chile puede dificultar la distinción entre secuencias de uno u otro país.

Figura 17



Árbol filogenético correspondiente a los fragmentos G1a y G2 del segmento M de los hantavirus utilizando el método de MP.

4.8 Análisis de reasociantes virales

Los virus de genoma ARN, cuyo genoma se encuentra repartido en varios segmentos, tienen la capacidad de reasociar sus segmentos a través de una infección doble (co-infección) en las células blanco. La reasociación de segmentos es el intercambio de los mismos entre partículas virales pertenecientes a distintas variantes del virus, este evento jugaría un papel importante en la evolución, patogénesis y epidemiología de los virus. Este mecanismo ha sido detectado para los Rotavirus (Gouvea V. & Brantly M., 1995), virus de la Influenza (Peng G. et al., 1996) entre otros. Para los hantavirus se ha determinado la reasociación de segmentos a través de co-infecciones *in vitro* en células Vero E6 entre los virus SN y BCC (Rodriguez L. et al., 1998) y Convict Creek 74 (Schmaljohn A. et al., 1995).

Dentro de los virus Andes, este estudio es particularmente interesante en las muestras provenientes de la provincia de Buenos Aires, donde se detectó la co-circulación de al menos tres linajes virales AND Cent Plata, AND Cent Lec y AND Cent Bs As.

Para analizar los eventos de reasociación se utilizó la estrategia de diseño de PCR múltiple con el objeto de detectar polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados, sin embargo dicha estrategia no aportó información dado que los distintos virus Andes no presentaron inserciones ni deleciones en las regiones codificantes de sus genomas para los segmentos S y M. Por consiguiente, no fue posible determinar la ocurrencia de un evento de reasociación a través de la observación de fragmentos de distinto peso molecular. Otra estrategia fue analizar las NCR 3' y NCR 5', sin embargo tampoco resultaron de utilidad dado que

presentaron diferencias sólo entre algunas variantes de los virus Andes. Se sabe que la baja presión de selección determina un aumento en la variabilidad lo que dificulta la amplificación de dicha región.

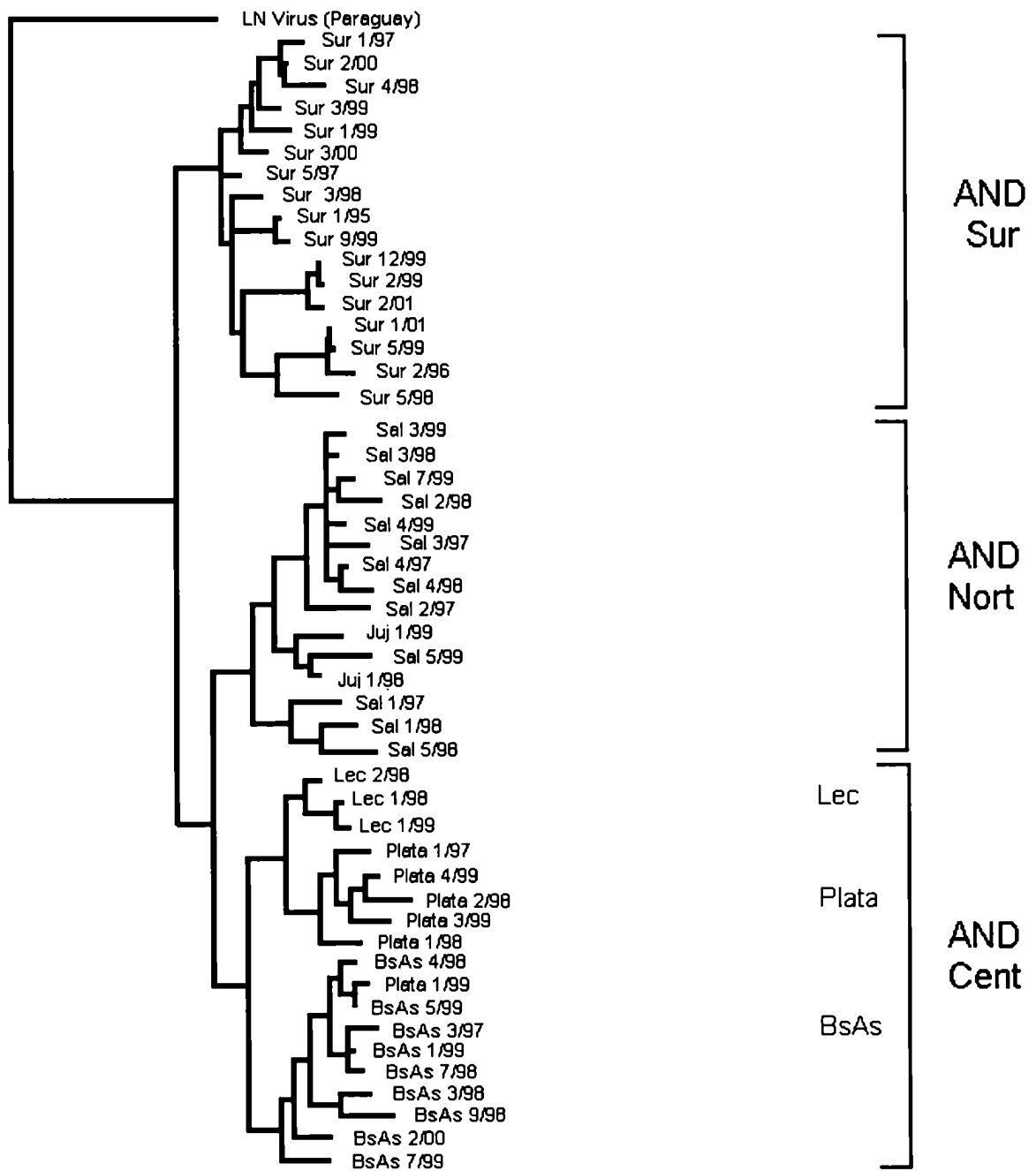
Una tercera estrategia para detectar la reasociación entre las variantes virales descritas del virus Andes, se amplificaron dos fragmentos codificantes de cada muestra determinada positiva por el test de Elisa. Un fragmento correspondiente a la región 3' terminal del segmento S correspondiente a 288 nts que codifica para la nucleoproteína N, ésta se extiende de la posición nucleotídica 49 a la 336 relativo al virus Andes y otro fragmento del segmento M, perteneciente a la glicoproteína G2, de 226 nts ubicado entre los nucleótidos 2721 y 2946.

Los fragmentos fueron secuenciados y a partir de cada fragmento se realizó un árbol filogenético para determinar la posición relativa de cada muestra dentro de las distintas variantes virales para cada segmento (figuras 18 y 19).

De las 17 muestras analizadas correspondientes a la región Sur, ninguna variante viral se ubicó fuera del agrupamiento correspondiente a dicha región, tanto para el fragmento correspondiente al segmento S como para el correspondiente al segmento M, aún cuando la posición relativa de cada muestra respecto de las demás muestras de esa región no fue idéntica entre ambos árboles filogenéticos.

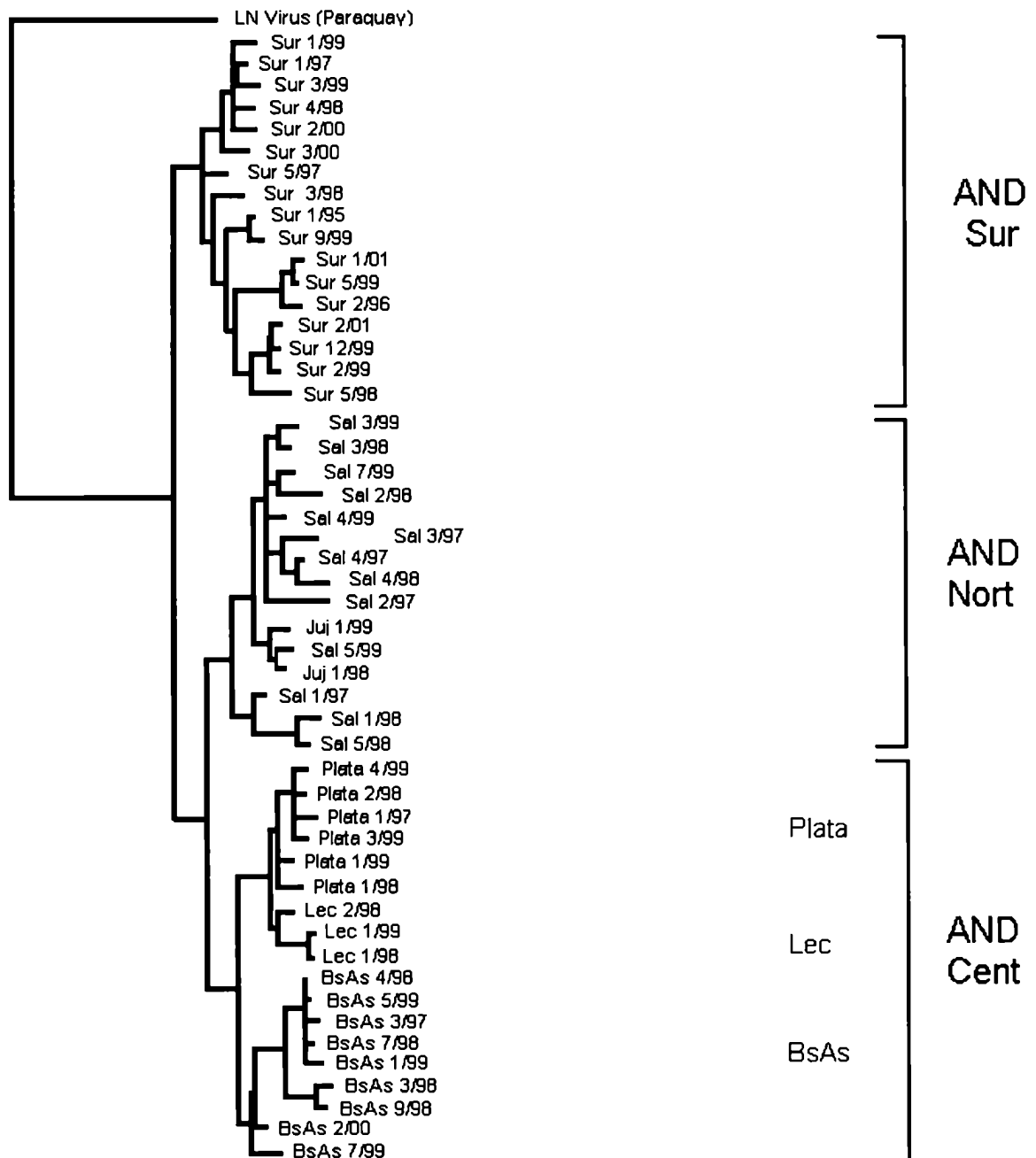
El mismo resultado se obtuvo cuando se compararon las secuencias correspondientes a la región Norte, donde tampoco se observaron diferencias relativas a posición entre los árboles filogenéticos.

Figura 18



Árbol filogenético por MP realizado a partir de muestras de los distintos linajes utilizando un fragmento de la glicoproteína G2 del segmento M .

Figura 19



Árbol filogenético por MP realizado a partir de muestras de los distintos linajes del virus Andes utilizando un fragmento de la nucleoproteína N del segmento S.

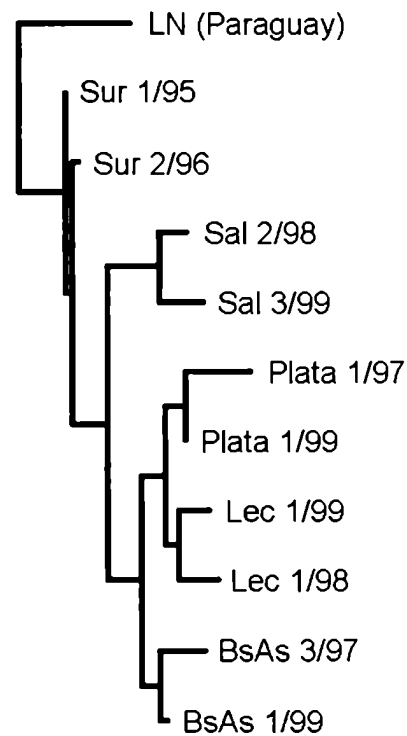
Una de las cepas pertenecientes a la región Central, Plata 1/99, muestra correspondiente al linaje AND Cent Plata, se ubicó con las muestras pertenecientes a su región para el fragmento representativo del segmento S, sin embargo para el fragmento correspondiente al segmento M dicha muestra se ubicó dentro del conjunto de muestras correspondientes a la variante viral AND Cent Bs.As. Para corroborar la posible existencia de un evento de reasociación se realizó un árbol filogenético a partir de otro fragmento perteneciente al segmento M pero dentro de la glicoproteína G1 (posición 1735–1987) de 252 nucleótidos de longitud (figura 20). Para este fragmento, la muestra Plata 1/99 se ubicó dentro del agrupamiento de secuencias correspondientes al linaje AND Cent Plata.

Rigurosamente la secuenciación de los segmentos S y M completos darían la confirmación directa. La presencia de sólo un fragmento de una dada muestra fuera de su agrupamiento no es indicativo de un evento de reasociación, sin embargo podría indicar la presencia de un evento de recombinación lo que implica un intercambio parcial de una o más porciones del genoma y no el intercambio íntegro del segmento. Para determinar la posibilidad de la ocurrencia de dicho evento se analizó otro fragmento dentro de la glicoproteína G1 (posición 88–281) dentro del segmento M, que permitiera hallar la región de transición entre ambos genomas. Para este fragmento la muestra Plata 1/99 se ubicó dentro del agrupamiento de las muestras correspondientes a AND Cent Plata.

En resumen, para las muestras estudiadas de acuerdo a la estrategia desarrollada no se detectaron reasociaciones entre los distintos linajes de Andes.

Para determinar la posibilidad de recombinación en la región 5' terminal sería necesario el análisis de un fragmento río abajo del fragmento de la G2.

Figura 20



Árbol filogenético realizado a partir de muestras de los distintos linajes utilizando un fragmento de la glicoproteína G1 del segmento M.

4.9 Comparación cepa transmisora versus no transmisora

Con el objeto de determinar la presencia de diferencias en la cepa Epilink, correspondiente al linaje AND Sout que fuera responsable de la transmisión interhumana, se decidió realizar el estudio genético de otra cepa viral que no presentara registros de contagio persona a persona para de esta manera poder realizar un análisis comparativo entre ambas cepas.

Se seleccionó para el estudio la muestra Plata 2/98 correspondiente a una cepa de hantavirus del linaje viral AND Cent Plata proveniente de la República Oriental del Uruguay. El estudio epidemiológico en este caso y en otros determinó la ausencia de casos secundarios relacionados al contagio primario.

A partir de coágulo sanguíneo del paciente se amplificó y secuenció en forma completa el segmento S y M del genoma viral utilizando la misma estrategia descrita para los segmentos del virus Andes Sout (descrito en materiales y métodos 3.5).

Las secuencias completas del segmento S de ambas cepas virales fueron alineadas utilizando el programa NALIGN del paquete informático PCGENE. La comparación nucleotídica de ambas variantes virales para el segmento S mostró una identidad del 78,7% cuando se comparó el segmento completo, mientras que el porcentaje ascendió a 83,6% al considerar únicamente la región codificante. Si bien las RNCs carecen de presión de selección que impida su variación, no se encontraron variaciones significativas entre ambos virus en la RNC 3'. En la RNC 5' terminal las

diferencias fueron mayores incluyendo la delección de 54 nucleótidos en la variante trasmisora respecto de AND Cent Plata.

Si bien la RNC 5' presentó una variabilidad del 66,7 %, las tres secuencias repetitivas presentes en dicha región se mantuvieron inalteradas lo que ratificó su potencial rol en la replicación como ya fuera descrito en 4.2.1.

El análisis comparativo de las nucleoproteínas putativas de ambas cepas virales mostró una identidad de 96,5 %, lo que representó la variación de 15 aa., 9 del total resultaron ser conservativos. Los perfiles de hidrofobicidad y de hidrofiliidad (figuras 21 A y B) mostraron una muy alta similitud en la distribución de cargas, epitopes y regiones de transmembrana entre ambas proteínas.

Con el objeto de determinar la presencia de alguna proteína no estructural con función reguladora presente en otros miembros de la familia *Bunyaviridae* (Giorgi C. et al., 1991) se analizaron los seis marcos de lectura del segmento S. Tanto la cepa trasmisora como la no trasmisora presentaron únicamente un segundo marco de lectura abierto para la síntesis potencial de una proteína de 63 aminoácidos, presente en todos los hantavirus responsables de SPH (descrito en 4.2.2).

Se analizó la identidad nucleotídica y aminoacídica del segmento M mediante un alineamiento (figura 22). La comparación reportó una identidad de 80,7 % para la comparación nucleotídica y 93,9 % para la comparación de las glicoproteínas G1 y G2 de ambas cepas virales. En la RNC 3' terminal el virus Plata 2/98 presentó 1 nucleótido más que el virus Epilink, mientras que en la RNC 5' presentó 18 nucleótidos menos.

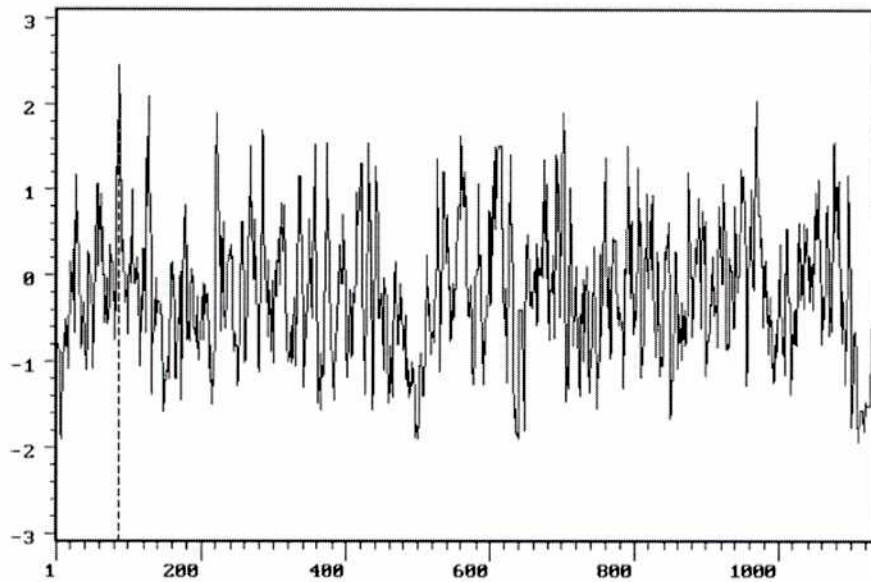
El análisis de los perfiles hidrofílicos (figura 21A) de las dos variantes virales permitió observar las mismas regiones expuestas en ambas glicoproteínas. El análisis comparativo de los perfiles hidrofóbicos (figura 21B) mostró la conservación de la región hidrofóbica amino-terminal en ambas proteínas la cual cumpliría la función de péptido señal involucrado en la señalización para el pasaje del precursor proteico GPC al Aparato de Golgi. Se observó la presencia de la secuencia hidrofóbica ubicada inmediatamente río arriba de la secuencia aminoacídica "WAASA", esta región contribuiría al reconocimiento y clivaje del GPC en la G1 y G2 a través de una endoproteasa.

El estudio de los sitios potenciales de glicosilación no resultó ser distintivo entre ambas cepas, encontrándose el mismo sitio en la proteína G2 ubicado en la posición aminoacídica 930 y los mismos 4 sitios en la proteína G1 posiciones: 138, 350, 402 y 524.

En el análisis comparativo de las cys presentes en G1 y G2 para ambas cepas virales se observó la presencia de 64 cys en la cepa trasmisora y 63 en la cepa no trasmisora. Del total, se encontraron 63 cys conservadas en ambas cepas lo que representó una identidad de 98,5 % entre ambos virus. En la comparación se determinó la existencia de la cys 511, presente únicamente en la cepa trasmisora (figura 22). La importancia de la cys 511, única comparando con el resto de los hantavirus responsables de SPH, por encontrarse en la región transmembrana putativa de la glicoproteína G1 a priori no es posible identificar si cumple una función biológica. En resumen, no se encontraron diferencias significativas, a nivel genético entre la cepa trasmisora y la no trasmisora.

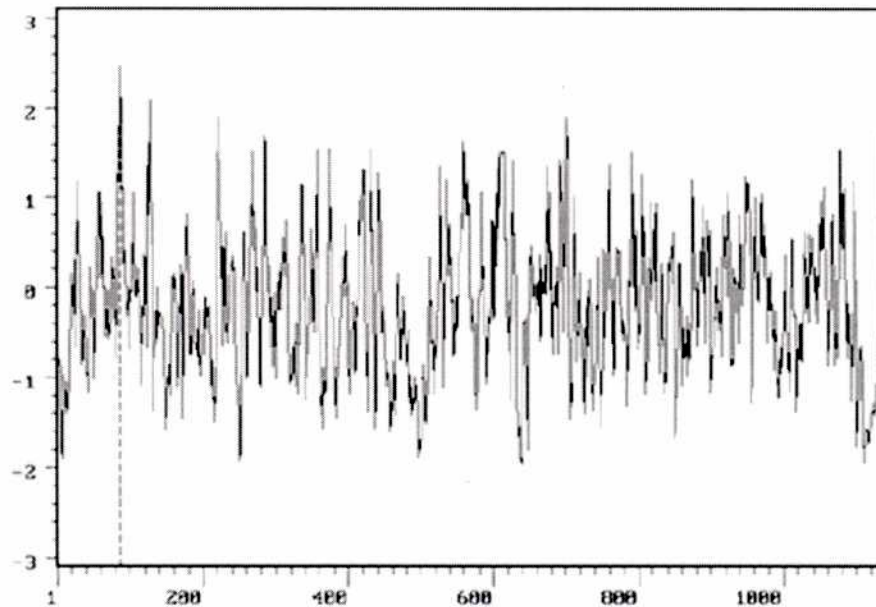
Figura 21 A

A)



Hydrophilicity profile of protein sequence URUM.
Computed using an average group length of 5 amino acids.

B)

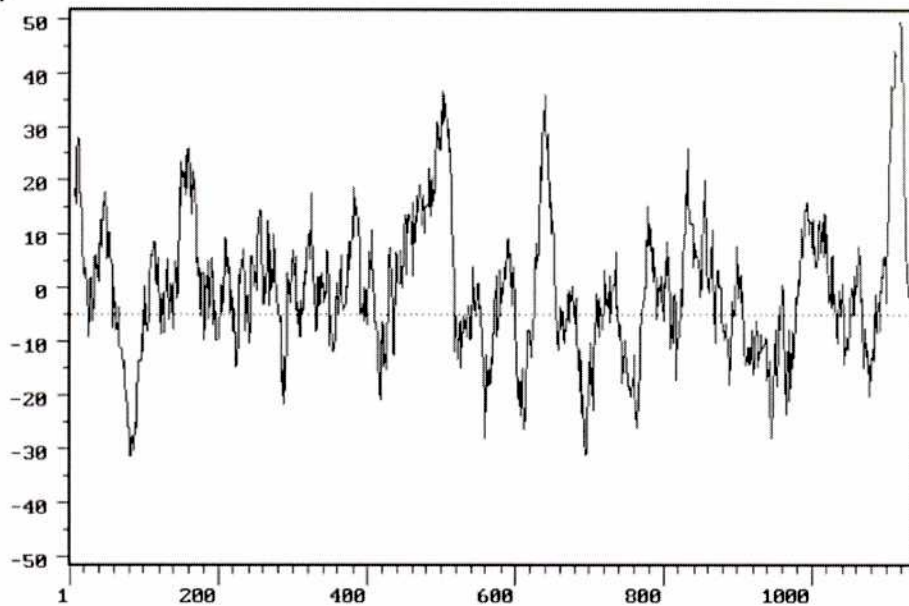


Hydrophilicity profile of protein sequence ANDN.
Computed using an average group length of 5 amino acids.

Perfiles de hidrofiliidad determinados con el programa ANTIGEN del paquete PCGENE donde se puede observar el determinante antigénico en la glicoproteína G1 en los GPC de la cepa no trasmisora Plata 2/98(A) y la cepa trasmisora Epilink (B)

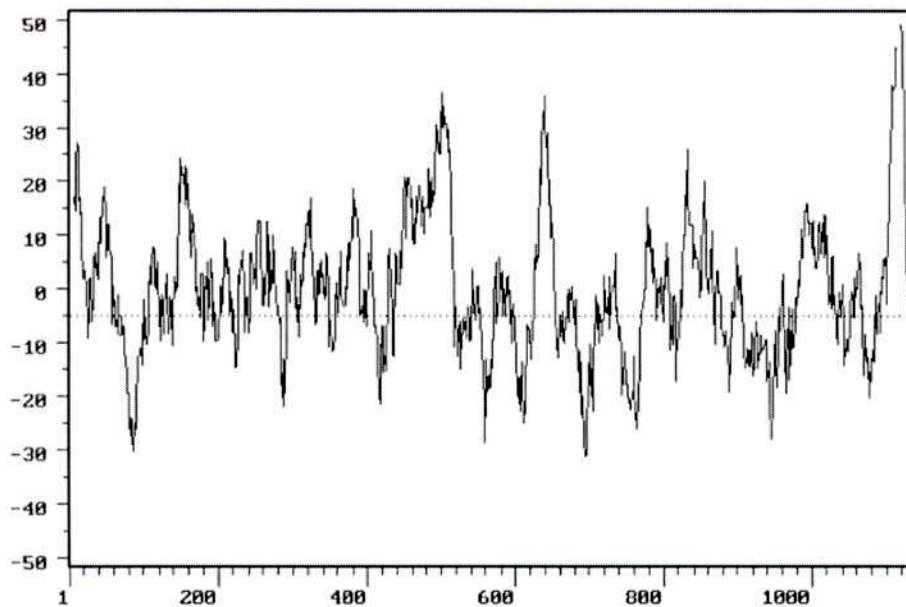
Figura 21 B

A)



Hydrophobic index of URUM from amino acid 1 to amino acid 1138.
Computed using an interval of 15 amino acids. (GRAVY = -.01).

B)



Hydrophobic index of ANDM from amino acid 1 to amino acid 1138.
Computed using an interval of 15 amino acids. (GRAVY = .01).

Perfiles de hidrofobicidad determinados con el programa RAOARGOS del paquete PCGENE donde se puede observar la alta homología en la distribución de cargas entre los GPC de la cepa no trasmisora Plata 2/98(A) y la cepa trasmisora Epilink (B)

4.10. Comparación genética del virus asociado a un caso de SPH y al de su roedor infectante.

En el año 1997 se confirmaron 72 casos de infección por hantavirus, 37 casos fueron confirmados en la región norte, 15 casos se reportaron en la región central y 20 casos ocurrieron en la región sur, de estos últimos, 5 ocurrieron en nuestro país y 15 casos en Chile.

En la localidad de Bariloche en la provincia de Río Negro, uno de los pacientes (Bariloche 1/97), diagnosticado positivo para hantavirus a través de una prueba serológica, murió debido a una falla respiratoria aguda. A partir de tejidos pulmonares de la autopsia se realizaron estudios genéticos por RT-PCR para caracterizar el virus responsable de la infección. Se amplificó un fragmento correspondiente a la nucleoproteína del segmento S y dos fragmentos del segmento M pertenecientes a las glicoproteínas G1 y G2. El análisis de homología realizado a través del alineamiento de las secuencias así como el estudio filogenético de la secuencia humana comparada con las demás variantes del virus Andes, ubicó al caso dentro del linaje AND Sout correspondiente a dicha región.

Con el objeto de determinar el preciso sitio de contagio del paciente y confirmar inequívocamente la especie de roedor asociada a SPH en la región Sur, se realizaron trampeos de roedores en el domicilio y peridomicilio. Las trampas fueron numeradas y la ubicación de cada una fue registrada en un mapa para determinar la ubicación de cada roedor capturado (figura 24).

Luego de dos noches de trapeo se capturaron seis roedores. De los 6 roedores capturados, 2 *Oligoryzomys* presentaron anticuerpos para hantavirus (r235 y r237) determinado a partir de un ensayo serológico por ELISA realizado con antígeno Andes específico. El roedor r235 fue capturado en el interior del domicilio del paciente, con una trampa ubicada debajo de la cama mientras que el roedor r237 fue capturado en el peridomicilio en un arbusto de rosa mosqueta ubicado en el sendero de acceso a la vivienda (figura 24). Los roedores positivos fueron procesados para obtener los órganos necesarios para la amplificación viral de los dos fragmentos correspondientes a las glicoproteínas. El análisis de las secuencias de los roedores comparadas con la secuencia obtenida a partir de tejido humano determinó la existencia de un roedor portador de la misma información genética respecto del humano, tanto para el fragmento secuenciado perteneciente a la G1 (nts. 88-259) como para el fragmento representativo de la G2 (nts 2780-2946), lo que señalaría al roedor (r237) como el ratón infectante del caso. (figura 23).

Sorpresivamente el roedor potencialmente responsable de la infección fue el capturado fuera del domicilio mientras que el roedor seropositivo encontrado dentro de la casa no compartía el mismo genoma que el hantavirus amplificado del paciente.

Aún cuando se habían caracterizado roedores *Oligoryzomys longicaudatus* y casos humanos con las secuencias correspondientes al virus Andes Sout, se mostró, por primera vez, la identidad en el reservorio y el caso humano relacionado.

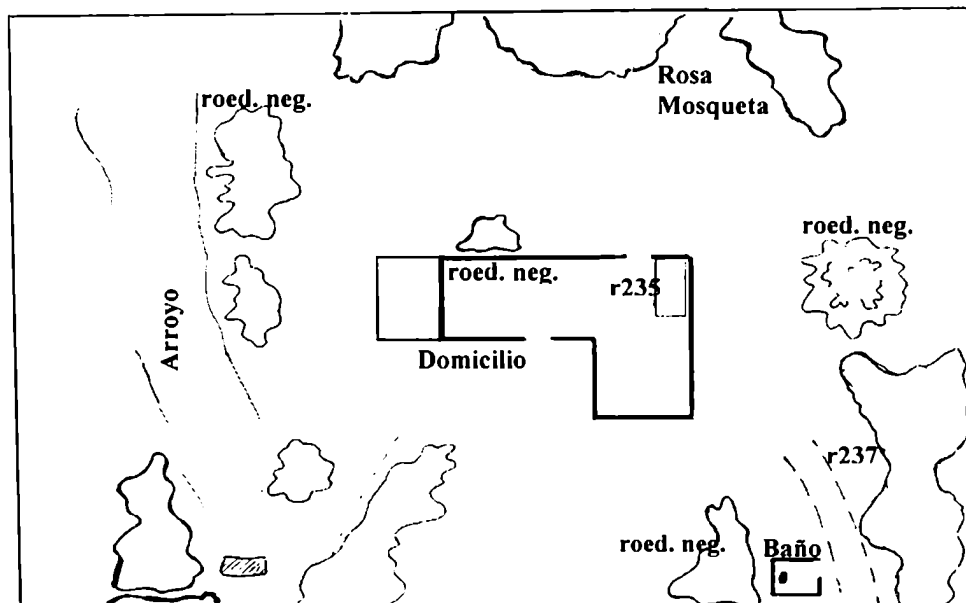
Figura 23

| | Bariloche 1/97 | r235 | r237 | El Bolsón 1/96 | Futaleufú 1/96 CH | Bariloche 1/96 | Epuyen 1/97 CH | Loncopué 2/97 | Esquel 2/96 |
|-------------------|----------------|-------|-------|----------------|-------------------|----------------|----------------|---------------|-------------|
| Bariloche 1/97 | ----- | 100 | 98.2 | 96.4 | 97.4 | 98.2 | 95.6 | 97.4 | 97.4 |
| r235 | 100 | ----- | 98.2 | 96.4 | 97.4 | 98.2 | 95.6 | 97.4 | 97.4 |
| r237 | 97.7 | 97.7 | ----- | 96.0 | 96.9 | 97.8 | 95.6 | 96.9 | 96.4 |
| El Bolsón 1/96 | 95.3 | 95.3 | 95.9 | ----- | 97.8 | 98.2 | 97.8 | 95.6 | 97.4 |
| Futaleufú 1/96 CH | 95.9 | 95.9 | 95.3 | 96.5 | ----- | 98.2 | 96.4 | 95.6 | 97.4 |
| Bariloche 1/96 | 97.1 | 97.1 | 96.5 | 97.1 | 97.7 | ----- | 97.8 | 97.4 | 96.4 |
| Epuyen 1/97 CH | 97.1 | 97.1 | 97.1 | 96.5 | 97.1 | 95.9 | ----- | 96.0 | 97.4 |
| Loncopué 2/97 | 95.3 | 95.3 | 94.8 | 95.9 | 95.1 | 97.1 | 95.9 | ----- | 98.2 |
| Esquel 2/96 | 96.5 | 96.5 | 95.9 | 97.1 | 95.9 | 97.7 | 96.5 | 97.1 | ----- |

Los casos corresponden a localidades del Sur argentino excepto donde se indica CH (Chile)

Tabla de similitud nucleotídica correspondiente al fragmento G1 (diagonal inferior) y G2 (diagonal superior) donde se compara el caso Bariloche 1/97, los roedores capturados en su domicilio / peridomicilio y casos de hantavirus de la región Sur

Figura 24



Esquema de la captura de los roedores asociados al caso fatal de hantavirus.

Discusión

5. DISCUSIÓN

Los hantavirus descritos hasta el momento en América del Sur se han concentrado en el área del corredor de dispersión que los roedores mamíferos utilizaron en su migración hacia el sur del continente durante el cuaternario (Marshall LG. et al., 1979) atravesando parte de Bolivia y expandiéndose desde el norte de nuestro país hacia el sur este y centro para alcanzar la patagonia, lo que sugiere un centro de radiación del virus en esa área. Así estudios realizados en el genoma S de las secuencias nucleotídicas de distintos genotipos de hantavirus indican que las cepas Río Mamore y Lechiguanas forman un clado separado que ocupa una posición ancestral del resto de los hantavirus sudamericanos que conforman dicho grupo (esta tesis y Morzunov S. et al., 2001). Por otro lado los huéspedes del virus Andes Nort y los descritos en Brasil (Juquitiba, Castello do Sonhos y Araraquara) aparecen aislados por la costa norte oriental de Venezuela y Brasil. Esta pudo ser una vía de colonización alternativa hacia el sur de los huéspedes roedores, sin embargo será necesario un análisis genómico más complejo a partir de la secuenciación para determinar las variantes ancestrales y deducir de esta manera el camino recorrido en la migración.

El elevado porcentaje de similitud presente al comparar las muestras provenientes de las provincias de Río Negro y Chubut versus las regiones V y XI de Chile reforzarían la propuesta que la colonización de los sigmodontinos se realizó a través de los pasos cordilleranos desde Argentina a Chile. En Argentina la cepa Andes Sout tiene un extenso rango geográfico

por la vertiente oriental de la Cordillera de los Andes hacia la patagonia. El hecho ya aceptado que cada hantavirus posee un roedor reservorio que es especie específico explicaría la existencia de un sólo reservorio de hantavirus hasta el momento descrito, aun cuando podrían eventualmente existir otras especies de roedores sigmodontinos que podrían servir de huéspedes vectores del virus.

Los distintos análisis filogenéticos realizados tanto sobre las secuencias nucleotídicas como sobre las secuencias aminoacídicas de los segmentos genómicos S y M mostraron claramente la evolución monofilética de los hantavirus. En esta evolución, el antecesor del virus Andes sería el virus Laguna Negra. Este análisis filogenético es apoyado por el aparente desplazamiento migratorio realizado por los sigmodontinos desde América del Norte hasta el extremo sur del continente.

El estudio de las secuencias de las muestras provenientes de distintas regiones geográficas permitió determinar la existencia de regiones endémicas asociadas a hantaviriosis responsables del SPH en nuestro país.

A partir del análisis comparativo de los linajes del virus Andes descritos se obtienen valores de divergencia aminoacídica bajos, entre un 3% a 6%. En general, si bien una relación directa entre datos genéticos y serológicos es difícil de mostrar, el criterio tradicional serológico correlaciona muy bien con los datos moleculares. Normalmente, la baja divergencia en aminoácidos indica neutralización cruzada entre cepas virales. Hasta el

momento no existen suficientes evidencias para considerar a los linajes asociados a SPH circulantes en Argentina como diferentes virus. La investigación de datos geográficos y ecológicos basados en mantenimiento y coevolución de diferentes reservorios primarios contribuirá a la asignación del estado taxonómico del virus Andes. Más aún, a medida que se obtengan nuevos virus caracterizados de la región, tal es el caso de los virus de Brasil (Johnson A. et al., 1999) y de Panamá (Vincent MJ. et al., 2000), se podrá observar que cada vez es mayor del número de hantavirus que circulan con diferencias pequeñas entre sí, insuficientes como para considerarlos especies virales diferentes sino genotipos, los que a su vez se agrupan en linajes.

Sin embargo, a pesar de las diferencias, los hantavirus del Cono Sur de América no son lo suficientemente similares entre linajes o genotipos de distintas regiones geográficas, lo que permite en la mayoría de los casos poder identificar el lugar de infección. A medida que otros virus caracterizados se incorporen a las bases de datos y se realicen pruebas de neutralización cruzada entre cepas, se podrá definir o agrupar en distintas especies virales.

Como parte del objetivo fundamental de esta tesis se caracterizó el genoma del hantavirus Andes. Se amplificaron en forma completa los segmentos S y M correspondientes al genoma viral y una porción del segmento L.

El análisis del segmento S permitió confirmar la existencia del marco de lectura correspondiente a la nucleoproteína además de un segundo

marco abierto hasta el momento no asociado a proteína viral alguna. De la misma manera que lo anteriormente reportado por este grupo de trabajo, se identificaron 3 repeticiones nucleotídicas presentes en la región 5' no codificante, aparentemente relacionadas a la transcripción del ARN viral.

El segmento M presentó al igual que el S, su máxima similitud con el correspondiente al virus Laguna Negra, este segmento es el responsable de la síntesis de las glicoproteínas de la superficie de la partícula viral G1 y G2. La glicoproteína G1 formada por 651 aa. presentó 4 sitios potenciales de glicosilación, uno más respecto del resto de los virus americanos asociados a SPH. El cuarto sitio sin embargo, no se encontraría accesible para su glicosilación debido a su posición.

El análisis de los sitios de exposición asociados al perfil de hidrofiliidad sitúa al principal determinante antigénico en la porción amino-terminal de esta proteína, este sitio coincide con el sitio descrito para LN. El perfil de hidrofobicidad trazado sobre el GPC determinó la presencia de una región hidrofóbica cerca al extremo carboxi-terminal anteriormente descrita como responsable del anclaje de la G1 a la membrana de la partícula viral así como la presencia del péptido señal en el extremo amino-terminal responsable del tráfico del GPC al aparato de Golgi.

Dentro de esta glicoproteína se encontró, además, el pentapeptido putativo WAASA, presente en la posición aminoacídica 647-651, que serviría como sitio de clivaje y procesamiento del GPC para la liberación de ambas glicoproteínas (reportado para todos los hantavirus conocidos).

La G2 mostró una longitud total de 487 aa. Esta proteína sólo presentó un sitio potencial de glicosilación en la posición 930 y la región hidrofóbica correspondiente al dominio transmembrana de anclaje en la región carboxi-terminal.

Al igual que el análisis de los segmentos anteriores, el fragmento amplificado del segmento L presentó mayor similitud con el hantavirus sudamericano LN. La escasa información existente del segmento L de los demás hantavirus sumado a la baja variabilidad aparentemente asociada a este segmento, responsable de codificar para la ARN polimerasa viral, le restaría importancia para su análisis comparativo.

Otro aporte a la caracterización del virus Andes se determinó la composición nucleotídica real de los extremos de los 3 segmentos virales (hasta el momento sólo putativas) responsables de la circularización de dichos segmentos y . Para ello se ligaron los extremos de los ARN virales para su secuenciación. El segmento S presentó ambos extremos inalterados respecto de los extremos de los hantavirus previamente caracterizados. Sin embargo tanto el segmento M como el L presentaron extremos incompletos con un rango variable de deleciones. En el segmento M el mayor número de deleciones se encontraron en el extremo 3' terminal referido al ARN viral, donde se obtuvieron clones con hasta 12 nucleótidos faltantes. Estas partículas virales probablemente fueran defectivas y formando parte de un mecanismo de regulación de la replicación del virus que daría lugar a la

persistencia viral (Schmaljohn, C. et al., 2000). El extremo 5' terminal solamente presentó 2 nucleótidos delecionados como máximo.

El segmento L presentó un patrón de deleciones muy similar en ambos extremos, alcanzando hasta 5 nucleótidos en el 5' y 8 nucleótidos en el extremo 3' terminal.

Si bien existen antecedentes de eventos de reasociación en virus cuyo genoma se encuentra segmentado, incluyendo a los hantavirus, en nuestro estudio, sobre un total de 51 muestras correspondientes a los 5 linajes pertenecientes al agrupamiento Andes no se detectó ningún evento de reasociación. Dicha reasociación debería ser particularmente favorable en la provincia de Buenos Aires donde cocirculan los linajes AND Cent Lec, AND Cent Plata y AND Cent Bs.As. todos patógenos para el hombre.

Sólo una muestra, Plata 1/99 se ubicó en el agrupamiento correspondiente a Cent Bs.As. en el árbol filogenético realizado a partir de un fragmento de la G2. Sin embargo el análisis de otro fragmento perteneciente al mismo segmento ubicó a dicha muestra dentro de su grupo. El uso de fragmentos muy pequeños en análisis filogenéticos puede conducir a relaciones inconsistentes.

El análisis del brote ocurrido en El Bolsón en el año 1996, permitió detectar por primera vez la existencia de un hantavirus capaz de contagiarse a través de contacto interhumano. Sin embargo, esta vía de contagio representaría un evento muy poco frecuente, dado que no existen registros de su ocurrencia en ningún otro hantavirus y aun dentro del linaje AND Sout dicha vía es excepcional.

La comparación de los segmentos S y M de las cepa transmisora y no transmisora no presentó diferencias estructurales significativas. Sin embargo la cepa transmisora presentó un aminoácido cys en la posición aminoacídica 511 único respecto de los demás hantavirus asociados al SPH. El cambio de un nucleótido para el enterovirus causante de la poliomiелitis en una región no codificante es el responsable de la reversión de la variante atenuada vacunal a la cepa salvaje (Guillot S. et al., 1994).

La cys podría originar la formación de un puente bisulfuro distinto en la glicoproteína alterando la conformación espacial de la misma, pudiendo en tal caso utilizar con mayor eficiencia su receptor celular o incluso utilizar algún receptor alternativo, lo que incluso podría explicar la capacidad única del virus Andes, respecto de cualquier otro hantavirus de producir una infección aguda en hamsters. La importancia de la cys 511 se ve atenuada por su ubicación en la glicoproteína G1 ya que este aminoácido se encontraría en el dominio transmembrana de la G1.

Además de la cys se detectó la presencia de una pro única en la posición 721. Al igual que lo discutido para la cys, serían necesarios estudios de mutagénesis dirigidos así como estudios de modelaje tridimensional de las glicoproteínas para determinar como interactúan y que efectos conformacionales causarían las mutaciones descritas en dicha interacción y por consiguiente como se modificaría la unión de las glicoproteínas virales con su receptor celular.

Alternativamente la diferencia entre la cepa transmisora y las restantes podría deberse a una alteración en la regulación de la transcripción /

replicación viral asociada a los extremos de los segmentos virales y a las secuencias repetitivas, sin embargo ninguno de estos cambios se observó para la cepa transmisora. No obstante se han reportado mutaciones puntuales involucradas en la adaptación de virus aislados al cultivo celular (Lundkvist A. et al., 1997 y Nemirov K. et al., 2003), lo que indicaría tal vez la existencia de otras posiciones aún no determinadas importantes en la regulación de la expresión viral.

En relación al estudio del segmento L asociado a la transmisión interhumana no sería de utilidad dado que sólo existen 5 segmentos L completamente secuenciados para todos los hantavirus. Además la variabilidad de éstos parece ser muy baja, conservándose incluso comparando contra virus de otros géneros virales dentro de la familia *Bunyaviridae*. Probablemente el elevado porcentaje de conservación se deba a la función de ARN polimerasa codificada por este segmento, la cual se encuentra sometida a una alta presión de selección.

Una posibilidad para una nueva etapa de investigación del tema de esta tesis sería generar reasociantes a través de coinfecciones *In Vitro* y la posterior infección de hamsters para poder determinar el segmento viral involucrado en la patogénesis diferencial del virus Andes y su capacidad única en la infección de dicho animal. Estudios posteriores de recombinantes nos permitirían establecer la región involucrada, mientras que finalmente mutaciones o deleciones puntuales establecerían los aminoácidos implicados o las regiones nucleotídicas regulatorias responsables de tales cambios.

La existencia de variantes virales con alteraciones en sus propiedades biológicas incluyendo la transmisión interhumana y alteraciones en su patogenicidad para el hombre, dentro del agrupamiento de Andes podría deberse a distintos factores como: I) los hábitos del roedor reservorio, II) excreción de virus infectivo, III) adaptación del virus en el roedor reservorio, IV) mutaciones en el virus capaces de limitar la interacción virus-receptor celular o V) mutaciones capaces de inhibir la replicación viral generando únicamente infecciones crónicas. En este sentido, análisis comparativos realizados entre las secuencias disponibles del virus Maciel (Mac), el cual hasta el momento no ha podido asociarse a ningún caso humano y las variantes del virus Andes no permitieron detectar la presencia de alteraciones tanto nucleotídicas como aminoacídicas significativas asociadas a la patogenicidad involucrada en el SPH.

En conclusión, se describió la existencia de una especie de hantavirus nueva, el virus Andes. Se describió además la existencia de 5 linajes presentes en 3 regiones geográficas de nuestro país. Se caracterizaron en forma completa los segmentos genómicos S y M del virus prototipo Andes Sout. Se realizaron estudios de los extremos genómicos virales relacionados a la replicación del virus Andes Sout. A partir del estudio de un brote de hantavirus ocurrido en el "El Bolsón" se determinó, por primera vez, la transmisión interhumana en hantavirus. Con el objeto de realizar un estudio comparativo entre la cepa asociada a transmisión interhumana y una no

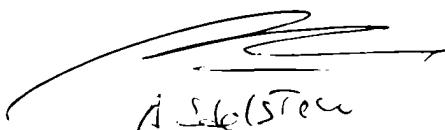
transmisora, se amplificaron los segmentos S y M completos del virus Andes Cent Plata.

Seguramente en el futuro encontraremos nuevos hantavirus. Algunos de los cuales se encontrarán asociados a la subfamilia *Sigmodontinae*, y probables responsables SPH. Seguramente algunos de los virus aun no asociados a casos humanos, como por ejemplo MAC o PRM, podrían ser detectados como patógenos para el hombre.

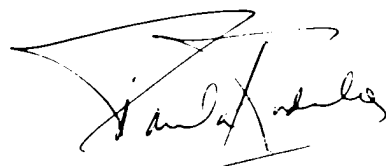
Debemos recordar que la vigilancia del SPH se basa en un compromiso respiratorio y no en otros posibles síntomas de la infección, de esta forma seguramente debemos estar subestimando el número de casos que, por ejemplo, presentan un compromiso renal.

Por otro lado, resulta improbable que el cuadro de SPH descrito para el virus Andes esté confinado únicamente a los virus de las especies de *Oligoryzomys* debido a que un número de casos asociados a virus sudamericanos son también característicos de SPH asociado al grupo Andes.

En primera instancia, la evolución lenta conjuntamente con una distribución geográfica estable que presentan los hantavirus debido a la fuerte relación de los virus con su roedor reservorio, sería alentador en cuanto al desarrollo de una vacuna efectiva. Sin embargo, la elevada diversidad genética presente en los hantavirus, donde sólo en América una docena de virus son capaces de causar SPH, ponen en duda la existencia de una protección cruzada eficiente.



A. S. Steele



Bibliografía

BIBLIOGRAFIA

- Abbott KD, Ksiazek TG, Mills JN. (1999). Long-term hantavirus persistence in rodent populations in central Arizona. *Emerg Infect Dis.* Jan-Feb;5(1):102-12.
- Akhmatova N. K., Yusupova R. S, Khaiboullina S. F and. Sibiryak S. V. (2003). "Lymphocyte Apoptosis during Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome". *Russ J Immunol.* 8: 1, 37-46.
- Antic, D., Yong Kang, C., Spik, K., Schmaljohn, C., Vapalahti, O. and Vaheri, A. (1992). Comparison of the deduced gene products of the L, M and S genome segments of hantaviruses. *Virus Research* 24:35-46.
- Antoniadis A., Stylianakis A., Papa A., Alexiou-Daniel S., Lampropoulos A., Nichol S. T., Peters C. J. and. Spiropoulou C. F. (1996). "Direct genetic detection of Dobrava virus in Greek and Albanian patients with hemorrhagic fever with renal syndrome". *J Infect Dis.* 174: 407–410.
- Araki K., Yoshimatsu K., Lee B. H, Kariwa H, Takashima I. and Arikawa J. (2003). "Hantavirus-specific CD8(+)-T-cell responses in newborn mice persistently infected with Hantaan virus". *J Virol.* 77: 15, 8408-17.
- Arikawa, J., Yao, J. S., Yoshimatsu, K., Takashima, I. and Hashimoto, N. (1992). "Protective role of antigenic sites on the envelope protein of Hantaan virus defined by monoclonal antibodies". *Arch Virol.* 126: 1-4, 271-81
- Asada, H., Balachandra, K., Tamura, M., Kondo, K. and Yamanishi, K. (1989). "Cross-reactive immunity among different serotypes of virus causing haemorrhagic fever with renal syndrome". *J Gen Virol.* 70 (Pt 4): 819-25
- Avsic-Zupanc, T., Toney, A., Anderson, K., Chu, Y.-K. & Schmaljohn, C.S. (1995). "Genetic and antigenic properties of Dobrava virus: a unique member of the Hantavirus genus, family Bunyaviridae". *Journal of General Virology* 76: 2801-2808.
- Begon, M., S.M.Hazel, D.Baxby, K. Bown, R. Cavanagh, J.Chantrey, T. Jones and M. Bennett. (1999)."Transmission dynamics of zoonotic pathogen within and between wildlife host species". *Proc. R. Soc. Lond.B* 266: 1939-1945.
- Bishop, D. H., Beaty, B. J., and Shope, R.E. (1980). Recombination and gene coding assignments of bunyaviruses and arenaviruses. *Ann. N.Y. Acad Sci.* 354: 84.
- Boroja, M., Barrie, J. R. and Raymond, G. S. (2002). "Radiographic findings in 20 patients with Hantavirus pulmonary syndrome correlated with clinical outcome". *AJR Am J Roentgenol.* 178: 1: 159-63.

- Bowen, M. D., Kariwa, H., Rollin, P. E., Peters, C. J., and Nichol, S. T. (1995). "Genetic characterization of a human isolate of Puumala hantavirus from France". *Virus Research* 38:279-289.
- Brummer-Korvenkontio, M., Vaheri, A., Hovi, T., von Bonsdorff, C.-H., Vuorimies, J., Manni, T., Penttinen, K., Oker-Blom, N. & Lahdevirta, J. (1980). "Nephropathia epidemica: detection of antigen in bank voles and serologic diagnosis of human infections". *Journal of Infectious Diseases* 141: 131-134.
- Calisher, C.H., W.P. Sweeney, J.N. Mills And B.J. Beaty.(1999). "Natural history of Sin Nombre virus in western Colorado". *Emerg.Infect. Dis.* 5: 126-134.
- Calisher, C.H. J.N. Mills, W.P. Sweeney, J.R. Choate, D.E. Sharp, K.M. Canestorp, And B.J. Beaty. (2001). "Do unusual site-specific population dynamics of rodent reservoirs provide clues to the natural history of Hantaviruse?". *J.Wildlif. Dis* 37(2): 280-288.
- Cantoni G, Padula P, Calderon G, Mills J, Herrero E, Sandoval P, Martinez V, Pini N, Larrieu E. (2001). "Seasonal variation in prevalence of antibody to hantaviruses in rodents from southern Argentina". *Trop Med Int Health* 6(10):811-6.
- Chernukha YG, Evdokimova OA, Chechovich AV. (1986). "Results of karyologic and immunobiological studies of the striped field mouse (*Apodemus agrarius*) from different areas of its range (in Russian)". *Zool J.* 65:471-475
- Chen HX, Qiu FX, Dong BJ. (1986). Epidemiological studies on hemorrhagic fever with renal syndrome in China. *J Infect Dis*;154:394-398
- Chen HX, Qiu FX. (1993). "Epidemiologic surveillance on the hemorrhagic fever with renal syndrome in China". *Chin Med J.* 106: 857-863
- Chizhikov, V. E., Spiropoulou, C. F., Morzunov, S. P., Monroe, M. C., Peters, C. J. and Nichol, S. T. (1995). "Complete genetic characterization and analysis of isolation of Sin Nombre virus". *Journal of Virology* 69: 8132-8136.
- Chomczynski, P. and Sacchi, N. (1987). "Single-step of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction". *Anal. Biochem.* 162: 150-159.
- Clement, J., Heyman, P., McKenna, P., Colson, P. and Avsic-Zupanc, T. (1997). "The hantaviruses of Europe: from the bedside to the bench". *Emerg Infect Dis.* 3: 2, 205-11.
- Custer, D. M., Thompson, E., Schmaljohn, C. S., Ksiazek, T. G. and Hooper, J. W. (2003). "Active and passive vaccination against hantavirus pulmonary

syndrome with Andes virus M genome segment-based DNA vaccine". *J Virol.* 77: 18, 9894-905.

Dobson, A.P. And P.J. Hudson. (1995). "Microparasites: observed patterns in wild animal populations". In: Grenfell, BT, AP Dobson (eds) *Ecology of infectious diseases in natural populations* 52-89. Cambridge University Press, Cambridge, UK.

Domingo E, Menendez-Arias L, Holland JJ. (1997). RNA virus fitness. *Rev Med Virol.* Jul;7(2):87-96.

Douglass, R.J., T. Wilson, W.J. Semmens, S.N. Zanto, C.W. Bond, R.C. Van Horn And Jn.Mills. (2001). "Longitudinal studies of Sin Nombre virus in deer mouse-dominated ecosystems of Montana". *Am.J. Trop. Med. Hyg.* 65(1): 33-41.

Duchin, J. S., Koster, F. T., Peters, C. J., Simpson, G. L., Tempest, B., Zaki, S. R., Ksiazek, T. G., Rollin, P. E., Nichol, S., Umland, E. T. and et al. (1994). Hantavirus pulmonary syndrome: A clinical description of 17 patients with a newly recognized disease. The Hantavirus Study Group [see Comments]. *N Engl J Med.*; 330:949–955.

Elliott RM. 1985. Identification of nonstructural proteins encoded by viruses of the Bunyamwera serogroup (family Bunyaviridae). *Virology*;143:119–126.

Elliott, R. M., Schmaljohn, C. S., and Collett, M. S. (1991). "Bunyaviridae genome structure and gene expression". *Current Topics in Microbiology and Immunology* 169: 91-141.

Elliott, R. M. (1994). "Isolation of the causative agent of hantavirus pulmonary syndrome". *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 51 (1):102-108.

Elliott, R. M. (1996). "The Bunyaviridae" book. New York: Plenum Press.

Enria, D. A., Briggiler, A. M., Pini, N. and Levis, S. (2001). "Clinical manifestations of New World hantaviruses". *Curr Top Microbiol Immunol.* 256: 117-34.

Ferrer, J. F., Galligan, D., Esteban, E., Rey, V., Murua, A., Gutierrez, S., Gonzalez, L., Thakuri, M., Feldman, L., Poiesz, B. and Jonsson, C. (2003). "Hantavirus infection in people inhabiting a highly endemic region of the Gran Chaco territory, Paraguay: association with *Trypanosoma cruzi* infection, epidemiological features and haematological characteristics". *Ann Trop Med Parasitol.* 97: 3, 269-80.

Fulhorst, C. F., Monroe, M. C., Salas, R. A., Duno, G., Utrera, A., Ksiazek, T. G., Nichol, S. T., de Manzione, N. M., Tovar, D. and Tesh, R. B. (1997). "Isolation, characterization and geographic distribution of Cano Delgadito virus, a newly discovered South American hantavirus (family Bunyaviridae)". *Virus Res.* 51: 2, 159-71

Garcin, D., Lezzi, M., Dobbs, M., Elliott, R. M., Schmaljohn, C., Kang, C. Y. and Kolakofsky, D. (1995). "The 5' ends of Hantaan virus (Bunyaviridae) RNAs suggest a prime-and-realign mechanism for the initiation of RNA synthesis". *Journal of Virology* 69: 5754-5762.

Giorgi C, Accardi L, Nicoletti L, Gro MC, Takehara K, Hilditch C, Morikawa S, Bishop DH. (1991) "Sequences and coding strategies of the S RNAs of Toscana and Rift Valley fever viruses compared to those of Punta Toro, Sicilian Sandfly fever, and Uukuniemi viruses". *Virology*;180(2):738-53.

Gouvea V, Brantly M. (1995). Is rotavirus a population of reassortants? *Trends Microbiol.* 3(4):159-62. Review.

Guillot S, Otelea D, Delpeyroux F, Crainic R. (1994). "Point mutations involved in the attenuation/neurovirulence alternation in type 1 and 2 oral polio vaccine strains detected by site-specific polymerase chain reaction.Vaccine". May; 12(6):503-7.

Hart., C.A. And M., Bennett. (1999). "Hantavirus infection: epidemiology and pathogenesis". *Microbes and Infection*, 1: 1229-1237.

Henderson, W. W., Monroe, M. C., St Jeor, S. C., Thayer, W. P., Rowe, J. E., Peters, C. J. and Nichol, S. T. (1995). "Naturally occurring Sin Nombre virus genetic reassortants". *Virology*. 214: 602-10

Hjelle,B., Chavez-Giles, F., Torrez-Martinez, N., Yates, T., Sarisky, J., Webb, J. & Ascher, M. (1994). "Genetic identification of a novel hantavirus of the harvest mouse *Reithrodontomys megalotis*". *Journal of Virology* 68: 6751-6754.

Hjelle,B., Anderson, B., Torrez-Martinez, N., Song, W., Gannon, W.L. & yates, T.L. (1995a). "Prevalence and geographic variation of hantaviruses of New World harvest mice (*Reithrodontomys*): identification of a divergent genotype from Costa Rican *Reithrodontomys mexicanus*". *Virology* 207:452-459.

Hjelle,B., Lee, S.-W., Torrez-Martinez, N., Song, J.-W., Yanagihara, R., Gavrilovskaya, I. & Mackow, E.R. (1995b). "Molecular linkage of Hantavirus pulmonary syndrome to the white-footed mouse, *Peromyscus leucopus*: genetic characterization of the M genome of New York virus". *Journal of Virology* 69:8137-8141.

Hjelle, B., Lee, S. W., Song, W., Torrez-Martinez, N., Song, J. W., Yanagihara, R., Gavrilovskaya, I. and Mackow, E. R. (1995c). "Molecular linkage of hantavirus pulmonary syndrome to the white-footed mouse, *Peromyscus leucopus*: Genetic characterization of the M genome of New York virus". *J Virol*; 69:8137-8141.

- Hjelle, B., Torrez-Martinez, N. & Koster, F. (1996). "Hantavirus pulmonary syndrome-related virus from Bolivia". *Lancet* 347: 8993, 57
- Hooper, J.W., T. Larsen, D.M. Custer, C.S. Schmaljohn. (2001a). "A lethal disease model for hantavirus pulmonary syndrome". *Virology*, 289(1):6-14.
- Hooper, J. W., Custer, D. M., Thompson, E. and Schmaljohn, C. S. (2001b). "DNA vaccination with the Hantaan virus M gene protects Hamsters against three of four HFRS hantaviruses and elicits a high-titer neutralizing antibody response in Rhesus monkeys". *J Virol*. 75: 8469-77
- Horling J, Lundkvist A, Huggins JW, Niklasson B. (1992) "Antibodies to pumala virus in humans determined by neutralization test". *J Virol Methods* 39:139–147.
- Horling, J., Chizhikov, V., Lundkvist, A., Jonsson, M., Ivanov, L., Dekonenko, A., Niklasson, B., Dzagurova, T., Peters, C.J., Tkachenko, E. & Nichol, S. (1996). "Kabarovsk virus: a phylogenetically and serologically distinct hantavirus isolated from *Microtus fortis* trapped in far-east Russia". *Journal of General Virology* 77:687-694.
- Hutchinson, K. L., Peters, C. J. and Nichol, S. T. (1996). "Sin Nombre virus mRNA synthesis". *Virology*. 224: 139-49
- Hung T, Chou ZY, Zhao TX, Xia SM, Hang CS. (1985). "Morphology and morphogenesis of viruses of hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS). I. Some peculiar aspects of the morphogenesis of various strains of HFRS virus." *Intervirology*; 23 (2):97-108.
- Isegawa, J., Tanishita, O., Ueda, S. and Yamanishi, K. (1994). "Association of serine in position 1124 of Hantaan virus glycoprotein with virulence in mice". *Journal of general Virology* 75:3273-3278.
- Iversson, L. B., da Rosa, A. P., Rosa, M. D., Lomar, A. V., Sasaki Mda, G. and LeDuc, J. W. (1994). "[Human infection by Hantavirus in southern and southeastern Brazil]". *Rev Assoc Med Bras*. 40: 2, 85-92.
- Jenison, S., Hjelle, B., Simpson, S., Hallin, G., Feddersen, R. and Koster, F. (1995). "Hantavirus pulmonary syndrome: clinical, diagnostic, and virologic aspects". *Semin Respir Infect*. 10: 259-269
- Johnson, A. M., Bowen, M. D., Ksiazek, T. G., Williams, R. J., Bryan, R. T., Mills, J. N., Peters, C. J. and Nichol, S. T. (1997). "Laguna Negra virus associated with HPS in Western Paraguay and Bolivia". *Virology*; 238: 115-127.
- Johnson, A. M., de Souza, L. T., Ferreira, I. B., Pereira, L. E., Ksiazek, T. G., Rollin, P. E., Peters, C. J. and Nichol, S. T. (1999). "Genetic investigation of novel hantaviruses causing fatal HPS in Brazil". *J Med Virol*; 59:527-35.

- Khan, A. S., Spiropoulou, C. F., Morzunov, S., Zaki, S. R., Kohn, M. A., Nawas, S. R., McFarland, L. and Nichol, S. T. (1995). "Fatal illness associated with a new hantavirus in Louisiana". *J Med Virol*; 46:281–286.
- Koch, J., Liang, M., Queitsch, I., Kraus, A. A. and Bautz, E. K. (2003). "Human recombinant neutralizing antibodies against hantaan virus G2 protein". *Virology*. 308: 1, 64-73
- Ksiazek, T. G., Nichol, S. T., Mills, J. N., Groves, M. G., Wozniak, A., McAdams, S., Monroe, M. C., Johnson, A. M., Martin, M. L., Peters, C. J. and Rollin, P. E. (1997). "Isolation, genetic diversity, and geographic distribution of Bayou virus (Bunyaviridae: hantavirus)". *Am J Trop Med Hyg*; 57: 445–448.
- Kanrerva, M., Paakkala, A., Mustonen, J., Paakkala, T., Lahtela, J. and Pasternack, A. (1996). "Pulmonary involvement in nephropathia epidemica: radiological findings and their clinical correlations": (submitted).
- Ketai, L. H., M. R. Williamson, R. J. Telepak, H. Levy, F. T. Koster, K. B. Nolte and S.E. Allen. (1994). "Hantavirus pulmonary syndrome: radiographic findings in 16 Patients". *Radiology*. 191:665-668.
- Korber B, Myers G. (1992). "Signature pattern analysis: a method for assessing viral sequence relatedness". *AIDS Res Hum Retroviruses*. Sep;8(9):1549-60.
- Koster, F and H. Levy. (1999). "Clinical manifestations and treatment of HPS, p.33-38. In W.H. Lee, C. Calisher, and C. Schmaljohn (ed.), *Manual of hemorrhagic with renal syndrome and hantavirus pulmonary syndrome*. WHO Collaborating Center for Virus Reference and Research (Hantaviruses)". Asan Institute for Life Sciences, Seoul, Korea.
- Kushner, S. (1978). "An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1 derived plasmids", in *Genetic engineering* p. 17-23 Elsevier North; 3.Holland Biomedical Press
- Kyte J, Doolittle RF. (1982) "A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein". *J Mol Biol*. 5;157(1):105-32.
- Langlois, J.P., L. Fahrig, G. Merriam And H. Artsob. (2001). "Landscape structure influences continental distribution of Hantavirus in deer mice". *Landscape Ecology* 16:255-266.
- Lazaro, ME, Resa AM, Levis SC, Riva Posse C, Zamengo L, Mereob JC, Rojo I, Buzzo F y Enria D. (1995) 1er Congreso Latinoamericano de Zoonosis, p126. Buenos Aires.
- Lazaro ME, Resa AJ, Barclay CM, Calanni L, Samengo L, Martinez L, Padula PJ, Pini N, Lasala MB, Elsner B, Enria DA. (2000). "Hantavirus pulmonary syndrome in southern Argentina". *Medicina (Bs As)*.60(3):289-301.

- Lee, H. W. & Lee, P.W. (1976). "Korean hemorrhagic fever. Demonstration of causative antigen and antibodies". Korean Journal of Internal Medicine 19, 371-383.
- Lee, h.W., Bark, D.H., Baek, L.J., Choi, K.S., Whang, Y.N. & Woo, M.S. (1980). "Korean hemorrhagic fever in urban areas of Seoul". Journal of Korean Society of Virology 10:1-6.
- Lee HW, Baek LJ, Johnson KM. (1982) "Isolation of hanta virus, the etiologic agent of korean hemorrhagic fever, from wild urban rats". J Infect Dis. 146:638-644.
- Lee HW. (1982) "Korean hemorrhagic fever". Prog Med Virol. 28:96-113.
- Lee, H. W., Lee, P.W., Baek, L. J. and Chu, Y. K. (1990). "Geographical distribution of hemorrhagic fever with renal syndrome and hantaviruses". Archives of Virology (Supplement) 1:5-18.
- Lee, J.S. (1999). "Clinical manifestations and treatment of HFRS and HPS", p.18-27. In W.H. Lee, C. Calisher, and C. Schmaljohn (ed.), Manual of hemorrhagic with renal syndrome and hantavirus pulmonary syndrome. WHO Collaborating Center for Virus Reference and Research (Hantaviruses). Asan Institute for Life Sciences, Seoul, Korea.
- Levis, S., Morzunov, S. P., Rowe, J. E., Enria, D., Pini, N., Calderon, G., Sabattini, M. and St Jeor, S. C. (1998). "Genetic diversity and epidemiology of hantaviruses in Argentina". J Infect Dis. 177: 3, 529-38.
- Lopez, N., Padula, P., Rossi, C., Miguel, S., Edelstein, A., Ramirez, E. and Franze-Fernandez, M. T. (1997). "Genetic characterization and phylogeny of Andes virus and variants from Argentina and Chile". Virus Res; 50:77-84.
- Lundkvist, A. and B. Niklasson. (1994). "Haemorrhagic fever with renal syndrome and other hantavirus infections". Rev Med Virol, 4: 177-184.
- Lundkvist, A., Cheng, Y., Sjolander, K. B., Niklasson, B., Vaheri, A. and Plyusnin, A. (1997). "Cell culture adaptation of Puumala hantavirus changes the infectivity for its natural reservoir, Clethrionomys glareolus, and leads to accumulation of mutants with altered genomic RNA S segment". J Virol. 71: 12, 9515-23
- Lyubsky, S., Gavrilovskaya, I., Luft, B. and Mackow, E. (1996). "Histopathology of Peromyscus leucopus naturally infected with pathogenic NY-1 hantaviruses: pathologic markers of HPS viral infection in mice". Lab Invest. 74: 3, 627-33
- Maiztegui JI, Becker JL, Le Duc JW. (1983). "Actividad del virus de la fiebre hemorragica de Corea o virus muroide en ratas del puerto de la ciudad de Buenos Aires". Medicina (Buenos Aires); 43:871.

Manual of Hemorrhagic Fever with Renal Syndrome and Hantavirus Pulmonary Syndrome. WHO Collaborating Centre for Virus Reference and Research (Hantavirus); (1999).

Markotic, A., Kuzman, I., Babic, K., Gagro, A., Nichol, S., Ksiazek, T. G., Rabatic, S. and Dekaris, D. (2002). "Double trouble: hemorrhagic fever with renal syndrome and leptospirosis". *Scand J Infect Dis.* 34: 3, 221-4.

Marshall, L.G. (1979). "A model for paleobiogeography of South America cricetine rodents". *Paleobiology* 5(2):126-132.

Martin ML, Lindsey-Regnery H, Sasso DR, McCormick JB, Palmer E. (1985). "Distinction between Bunyaviridae genera by surface structure and comparison with Hantaan virus using negative stain electron microscopy". *Arch Virol.*;86 (1-2):17-28

Martinez VP, Colavecchia S, Garcia Alay M, Suzuki B, Trincheri A, Busto S, Rabinovich R, Padula P. (2001). "Hantavirus pulmonary syndrome in Buenos Aires Province". *Medicina (B Aires).*;61(2):147-56.

McCormick JB, Sasso DR, Palmer EL, Kiley MP. (1982). "Morphological identification of the agent of Korean haemorrhagic fever (Hantaan virus) as a member of the Bunyaviridae". *Lancet.* Apr 3;1(8275):765-8.

Mendes, W. S., Aragao, N. J., Santos, H. J., Raposo, L., Vasconcelos, P. F., Rosa, E. S. and Elkhoury, M. R. (2001). "Hantavirus pulmonary syndrome in Anajatuba, Maranhao, Brazil". *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 43: 237-40

Meyer, B. J. and Schmaljohn, C. S. (2000). "Persistent hantavirus infections: characteristics and mechanisms". *Trends Microbiol.* 8: 2, 61-7

Mills, J.N., Yates T., Ksiazek T.G., Peters C.J., and Childs J.E.. (1999a). "Long term studies of Hantavirus reservoir populations in the southwestern United States: Rationale, Potential and Methods". *Emerg.Infect. Dis.* 5(1): 95-101.

Mills, J.N., Ksiazek T.G., Peters C.J, and Childs J.E. (1999b). "Long term studies of Hantavirus reservoir populations in southwestern United States. A synthesis". *Emerg. Infect.Dis.* 5(1): 135-142.

Monroe MC, Morzunov SP, Johnson AM, et al. (1999) "Genetic diversity and distribution of Peromyscus-borne hantaviruses in North America". *Emerg Infect Dis*;5:75–86.

Moolenaar, R. L., Dalton, C., Lipman, H. B., Umland, E. T., Gallaher, M., Duchin, J. S., Chapman, L., Zaki, S. R., Ksiazek, T. G., Rollin, P. E. and et al. (1995). "Clinical features that differentiate Hantavirus Pulmonary Syndrome from three other acute respiratory illnesses". *Clin. Infect. Dis.* 21:643-649.

- Morzunov, S. P., Feldman, H., Spiropoulou, C. F., Semenova, V. A., Rollin, P. E., Ksiazek, T. G., Peters, C. J. and Nichol, S. T. (1995). "A newly recognized virus associated with fatal case of hantavirus pulmonary syndrome in Louisiana". *Journal of Virology* 69: 1980-1983.
- Morzunov, S. P., Rowe, J. E., Ksiazek, T. G., Peters, C. J., St Jeor, S. C. and Nichol, S. T. (1998). "Genetic analysis of the diversity and origin of hantaviruses in *Peromyscus leucopus* mice in North America". *J Virol*; 72:57-64.
- Murphy FA, Johnson KM. (1995) "An exotic viral disease acquired in a laboratory" *N Engl J Med*. Aug 3; 333(5):317-8
- Murua, R., M. Navarrete, R. Cadiz, R. Figueroa, P. Padula, L. Zaror, R. Mansilla, L.A. Gonzalez, Y A. Muñoz-Pedrerros. (2003). "Síndrome Pulmonar por Hantavirus: situación de los roedores reservorios y la población humana en la décima Region, Chile". *Rev.Méd Chile* 131:169-176.
- Mustonen, J., Brummer-Korvenkontti, M., Hedman, K., Pasternack, A., Pietila, K. and Vaheiri, A. (1994). "Nephropatia epidemica in Finland: a retrospective study of 126 cases". *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 26, 7-13.
- Nemirov, K., Lundkvist, A., Vaheiri, A. and Plyusnin, A. (2003). "Adaptation of Puumala hantavirus to cell culture is associated with point mutations in the coding region of the L segment and in the noncoding regions of the S segment". *J Virol*. 77: 16, 8793-800
- Netski, D., Thran, B. H. and St Jeor, S. C. (1999). "Sin Nombre virus pathogenesis in *Peromyscus maniculatus*". *J Virol*. 73: 1, 585-91
- Nichol, S.T., Spiropoulou, C. F., Morzunov, S., Rollin, P. E., Ksiazek, T. G., Feldmann, H., Sanchez, A., Childs, J., Zaki, S. and Peters, C. J. (1993). Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science* 262, 914-917.
- O' Connor, C.S., J.P. Hayes And S.C. St.Jeor.(1997). Sin Nombre virus does not impair respiratory function of wild deer mice. *J Mammal* 78: 661-668
- Padula PJ, Edelstein A, Miguel SD, Lopez NM, Rossi CM, Rabinovich RD. (1998) "Epidemic outbreak of Hantavirus pulmonary syndrome in Argentina. Molecular evidence of person to person transmission of Andes virus" *Medicina (B Aires)*.;58 Suppl 1:27-36. Spanish.
- Padula PJ, Edelstein A, Miguel SD, Lopez NM, Rossi CM, Rabinovich RD. (1998) "Hantavirus pulmonary syndrome outbreak in Argentina: molecular evidence for person-to-person transmission of Andes virus". *Virology*. Feb 15;241(2):323-30.
- Padula PJ, Rossi CM, Della Valle MO, Martinez PV, Colavecchia SB, Edelstein A, Miguel SD, Rabinovich RD, Segura EL. (2000a) "Development

and evaluation of a solid-phase enzyme immunoassay based on Andes hantavirus recombinant nucleoprotein". *J Med Microbiol.* Feb;49(2):149-55.

Padula PJ, Colavecchia SB, Martinez VP, Gonzalez Della Valle MO, Edelstein A, Miguel SD, Russi J, Riquelme JM, Colucci N, Almiron M, Rabinovich RD.(2000b) "Genetic diversity, distribution, and serological features of hantavirus infection in five countries in South America". *J Clin Microbiol.* Aug;38(8):3029-35.

Padula P, Figueroa, R, Cadiz, R, Bellomo, C, Jofre, C., Navarrete, M, Pizarro, E, Zaror, L, Rodriguez, E and Murúa R. (2003) "Experimental study in the transmission of Andes hantavirus infection in wild sigmodontine rodents". Submitted.

Papa, A., Johnson, A. M., Stockton, P. C., Bowen, M. D., Spiropoulou, C. F., Alexiou-Daniel, S., Ksiazek, T. G., Nichol, S. T. and Antoniadis, A. (1998). "Retrospective serological and genetic study of the distribution of hantaviruses in Greece". *J Med Virol*; 55:321–327

Parrington, M. A., Kang, C. Y. (1990). "Nucleotide sequence analysis of the S genomic segment of Prospect Hill virus: comparison with the prototype hantavirus". *Virology* 175, 167-175.

Peng G, Hongo S, Kimura H, Muraki Y, Sugawara K, Kitame F, Numazaki Y, Suzuki H, Nakamura K. (1996) "Frequent occurrence of genetic reassortment between influenza C virus strains in nature". *J Gen Virol.* 77 (Pt 7):1489-92.

Pilaski, J., Feldmann, H., Morzunov, S., Rollin, P. E., Ruo, S. L., Lauer, B., Peters, C. J. and Nichol, S. (1994). "Genetic identification of a new Puumala virus strain causing severe hemorrhagic fever with renal syndrome in Germany". *Journal of Infectious Diseases* 170:1456-1462.

Plyusnin, A., Vapalahti, O., Lankinen, H., Lehvaslaiho, H., Apelly, J., Myasnikov, Yu., Kallio-Kokko, H., Henttonen, H., Lundkvist, A., Brummerkorvenkontio, M., Gavrilovskaya, I. and Vaheri, A. (1994). "Tula virus: a newly detected hantavirus carried by European common voles". *Journal of Virology* 68:7833-7838.

Plyusnin, A., Vapalahti, O. and Vaheri, A. (1996). "Hantaviruses: genome structure, expression and evolution". *Journal of General Virology*, 77, 2677-2687.

Plyusnin, A., Horling, J., Kanerva, M., Mustonen, J., Cheng, Y., Vapalahti, O., Kukkonen, S. K. J., Niemimaa, J., Henttonen, H., Niklasson, B., Lundkvist, A. and Vaheri, A. (1997). "Puumala hantavirus genome in patients with nephropatia epidemica: correlation between haplotype and link to viral sequences in lical rodents". *J Clin Microbiol.* ;35(5):1090-6

Plyusnin, A. (2002). "Genetics of hantaviruses: implications to taxonomy". *Arch Virol.* 147: 4, 665-82.

Powers, A. M., Mercer, D. R., Watts, D. M., Guzman, H., Fulhorst, C. F., Popov, V. L. and Tesh, R. B. (1999). "Isolation and genetic characterization of a hantavirus (Bunyaviridae: Hantavirus) from a rodent, *Oligoryzomys microtis* (Muridae), collected in northeastern Peru". *Am J Trop Med Hyg.* 61: 1, 92-8

Rao, JKM and Argos P. (1986). A conformational preference parameter to predict helices in integral membrane proteins, *Biochem. Biophys. Acta.* 869: 197-214

Ravkov, E. V., Rollin, P. E., Ksiazek, T. G., Peters, C. J. and Nichol, S. T. (1995). "Genetic and serologic analysis of Black Creek Canal virus". *Virology* 210, 482-486.

Rawlings, J. A., Torrez-Martinez, N., Neill, S. U., Moore, G. M., Hicks, B. N., Pichuanes, S., Nguyen, A., Bharadwaj, M. and Hjelle, B. (1996). "Cocirculation of multiple hantaviruses in Texas, with characterization of the small (S) genome of a previously undescribed virus of cotton rats (*Sigmodon hispidus*)". *Am J Trop Med Hyg;* 55:672-679.

Rodriguez, L. L., J. H. Owens, C. J. Peters, and S. T. Nichol. (1998). "Genetic reassortment among viruses causing hantavirus pulmonary syndrome". *Virology* 242:99-106.

Schmaljohn CS, Hasty SE, Harrison SA, Dalrymple JM. (1983). "Characterization of Hantaan virions, the prototype virus of hemorrhagic fever with renal syndrome". *J Infect Dis.* Dec;148(6):1005-12

Schmaljohn, A. L., Li, D., Negley, D. L., Bressler, D. S., Turell, M. J., Korch, G. W., Ascher, M. S. and Schmaljohn, C. S. (1995). "Isolation and initial characterization of a newfound hantavirus from California". *Virology* 206, 963-972.

Schmaljohn, C. and Hjelle, B. (1997). "Hantaviruses: a global disease problem". *Emerg Infect Dis.* 3: 2, 95-104

Seijo, A. C. (1998). "[Pathogenesis, physiopathology, clinical manifestations and treatment of Hantavirus pulmonary syndrome]". *Medicina (B Aires).* 58 Suppl 1: 19-24

Severson W. E., Schmaljohn C. S, Javadian A. and Jonsson C. B. (2003). "Ribavirin causes error catastrophe during Hantaan virus replication". *J Virol.* 77: 1, 481-8.

Shi, X. and Elliott, R. M. (2002). "Golgi localization of Hantaan virus glycoproteins requires coexpression of G1 and G2". *Virology.* 300: 1, 31-8.

Sion, M. L., Hatzitolios, A. I., Armenaka, M. C., Toulis, E. N., Kalampalika, D. and Mikoudi, K. D. (2002). "Acute renal failure caused by leptospirosis and Hantavirus infection in an urban hospital". *Eur J Intern Med.* 13: 4, 264-268.

Spiropoulou, C. F., Morzunov, S., Feldmann, H., Sanchez, A., Peters, C. J. and Nichol, S. T. (1994). "Genome structure and variability of a virus causing hantavirus pulmonary syndrome". *Virology* 200, 715-723.

Spiropoulou C. F., Goldsmith C. S., Shoemaker T. R., Peters C. J and Compans R. W. (2003). "Sin Nombre virus glycoprotein trafficking". *Virology.* 308: 1, 48-63.

Song, J. W., Baek, L. J., Gavrilovskaya, I. N., Mackow, E. R., Hjelle, B. and Yanagihara, R. (1996). "Genetic and phylogenetic analyses of hantaviral sequences amplified from archival tissues of deer mice (*Peromyscus maniculatus nubiterrae*) captured in the eastern United States". *Arch Virol*;141:959-967.

Stohwasser, R., Giebel, L. B., Zoller, L., Bautz, E. K. and Darai, G. (1990). "Molecular characterization of the RNA S segment of nephropathia epidemica virus strain Hällnas B1". *Virology*;174-86.

Suarez, O. V., Cueto, G. R., Cavia, R., Gomez Villafane, I. E., Bilenca, D. N., Edelstein, A., Martinez, P., Miguel, S., Bellomo, C., Hodara, K., Padula, P. J. and Busch, M. (2003). "Prevalence of infection with hantavirus in rodent populations of central Argentina". *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 98: 6, 727-32.

Swofford DL, Waddell PJ, Huelsenbeck JP, Foster PG, Lewis PO, Rogers JS. (2001). "Bias in phylogenetic estimation and its relevance to the choice between parsimony and likelihood methods". *Syst Biol.* Aug;50(4):525-39

Tiley, L. S., Hagen, M., Matthews, J. T. and Kristal, M. (1994). Sequence specific binding of the influenza virus RNA polymerase to sequence located at the 5' ends of the viral RNAs. *Journal of Virology* 68, 5108-5116.

Toro, J., Vega, J. D., Khan, A. S., Mills, J. N., Padula, P., Terry, W., Yadon, Z., Valderrama, R., Ellis, B. A., Pavletic, C., Cerda, R., Zaki, S., Shieh, W. J., Meyer, R., Tapia, M., Mansilla, C., Baro, M., Vergara, J. A., Concha, M., Calderon, G., Enria, D., Peters, C. J. and Ksiazek, T. G. (1998). "An outbreak of hantavirus pulmonary syndrome, Chile, 1997". *Emerg Infect Dis.* 4: 4, 687-94

Vaheri, A. (1996a). Puumala hantavirus genome in patients with nephropatia epidemica: correlation between haplotype and link to viral sequences in lical rodents. (Submitted)

Vincent Mj, Quiroz E, Gracia F, Sanchez A., Ksiazek T., Kitsutani P, Ruedas L., Tinnin DS., Caceres L., Garcia A, Rollin PE, Mills J.N., Peters CJ, Nichol ST. (2000). "Hantavirus pulmonary syndrome in Panama: identification of novel hantaviruses and their likely reservoirs". *Virology.* 10;277(1):14-9.

Vitek CR, Ksiazek TG, Peters CJ, Breiman RF. (1996). "Evidence against infection with hantaviruses among forest and park workers in the southwestern United States". *Clin Infect Dis*;23:283–285.

Weissenbacher M, Lee HW, Cura E, Segura E. (1986). "Prevalencia de anticuerpos contra el virus Hantaan en habitantes de Argentina y países limítrofes". II Conferencia Argentino de Virología. Córdoba 20-24 de octubre de

Weissenbacher M, Merani MS, Hodara VL, Lee HW. (1988). "Hantavirus infección among laboratory personnel and experimental rodents in Argentina". Segunda Conferencia Internacional sobre el impacto de las enfermedades virales en el desarrollo de países de Latinoamérica y la región del Caribe, organizada por Internacional Committee representing the argentinian Society of Virology and the Argentinian Society of Microbiology. Mar del Plata, 20-26 de marzo

Weissenbacher MC, Merani MS, Hodara VL, de Villafane G, Gajdusek DC, Chu YK, Lee HW. (1990). "Hantavirus infection in laboratory and wild rodents in Argentina". *Medicina (B Aires)*;50 1):43-6.

White, J.D., Shirey, F.G., French, G.R., Huggings, J.W., Brand, O.M. and Lee, H.W. (1982). "Hantaan virus, a etiological agent of Korean haemorrhagic fever, has Bunyaviridae-like morphology". *Lancet* 1:768.

Williams, R. J., Bryan, R. T., Mills, J. N., Palma, R. E., Vera, I., De Velasquez, F., Baez, E., Schmidt, W. E., Figueroa, R. E., Peters, C. J., Zaki, S. R., Khan, A. S. and Ksiazek, T. G. (1997) "An outbreak of hantavirus pulmonary syndrome in western Paraguay". *Am J Trop Med Hyg*; 57:274–282.

Xiao SY, Leduc JW, Chu YK, Schmaljohn CS. (1994). "Phylogenetic analyses of virus isolates in the genus Hantavirus, family Bunyaviridae". *Virology*;198:205-217.

Xu, X., Ruo, S. L., McCormick, J. B. and Fisher-Hoch, S. P. (1992). "Immunity to Hantavirus challenge in *Meriones unguiculatus* induced by vaccinia-vectored viral proteins". *Am J Trop Med Hyg*. 47: 4, 397-404

Yadon, Z. (1998). "[Epidemiology of Hantavirus pulmonary syndrome in Argentina (1991-1997)]". *Medicina (B Aires)*. 58 Suppl 1: 25-6

Yasumura, Y. & Kawatana, Y. (1963). "Studies of SV40 virus in tissue culture cells". *Nippon Rinsho* 21:1201-1215.

Zaki, S. R., Greer, P. W., Coffield, L. M., Goldsmith, C. S., Nolte, K. B., Foucar, K., Feddersen, R. M., Zumwalt, R. E., Miller, G. L., Khan, A. S. and et al. (1995). "Hantavirus pulmonary syndrome: Pathogenesis of an emerging infectious disease". *Am J Pathol*; 146:552–579.

Zeitz PS, Graber JM, Voorhees RA. (1997). "Assessment of occupational risk for hantavirus infection in Arizona and New Mexico". *J Occup Environ Med*;39: 463–467.

Zhang, X. K., Takashima, I. and Hashimoto, N. (1989). "Characteristics of passive immunity against hantavirus infection in rats". *Arch Virol.* 105: 3-4, 235-46

Zuker, M (1989). "On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule". *Science* 224, 48-52

Anexo


```

LLIPTITMIILKILRLLTFSCSHYSTESKFKAILERVKVEYQKTMGSMVCDACHHECETAKELETHHKSCPEGQCPYCMTMTTESTESA
LLIPAVTLIILKILRLLTFSCSHYSTESKFKVILERVKVEYQKTMGSMVCDI CHHECETAKELETHHKSCPEGQCPYCMTITESTESA
LLIPAITLIVLKLRLTFSCSHYSKESRFFKILEKVKVEYQKTMGSMVCDI CHHDCEAKELDTHHKSCPEGQCPYCMTMTTESTESA
LLIPLITLIILKILRLLTYSCSHYSSESFKFKFILEKVKVEYQKTMGSMVCDVNCHECETAKELDCHKKSCEAGQCPYCMTTESTESA
LLIPAVTMVILKTLRLLTYSCSHYSTESKFKIILEKVKVEYQKTMGSMVCDI CHHECETAKELEGHKKSCEAGQCPYCMTTEATESA
LLIPTTTMVLKMLRLLTYSCSHYSTESKFKVILEKVKVEYQKTMGSMVCDI CHHECETAKELESHHKSCADGQCPYCMTITEATESA
LLIPAITLVVLKFLKMATFSCSHYTNESKFKFILEKVKVEYQKTMGSMVCDI CHHECETAKELESHKQSCINGQCPYCMTTEATESA
LLIPAITLVVLKFLKMATFSCSHYTNESKFKFILEKVKVEYQKTMGSMVCDI CHHECETAKELESHKQSCINGQCPYCMTTEATESA
LLIPAITLVVLKFLKMATFSCSHYTNESKFKFILEKVKVEYQKTMGSMVCDI CHHECETAKELESHKQSCINGQCPYCMTTEATESA
VLI PAVTLIILKVLRLVTFSCSHYTNESKFKFILEKVKVEYQKTMGSMVCDVCHHECETAKELESHRQSCINGQCPYCMTITEATESA
LLIPGITLIVLKLKILTYSCSHYSSESFKFMILEKVKVEYQKTMGSMVCDI CHHECETVKELESHKQSCVEGQCPYCMTVTEATQSA
LAIPLLSMIIRFLLIFFYLCSKYSTDSKFKLIEKVKQVEYQKTMGSMVCEVCOQGCETAKELESHHKSCPHGQCPYCLNPTEATESA
LLIPIISLVSIKIMLLFAYMCSKYNSDKFRLLIEKVKQVEYQKTMGSMVCEVQCECEMAKELESHHKSCPNMGCPYCMNPTTESTESA
VLIPTITMILLKILIAFAYLCSKYNTDSKFRILVEKVKVEYQKTMGSMVCEVCOQYECETAKELESHRKSISGSCPYCLNPSEATPSA
LLIPTITLAVLVKFIANILHTNSQENRFKILKVKVEEFEKTKGSMVCEVCKYECETSKELKAHNLSQPQSKCPYCFTHCEPTEAT
VLI PA TLAILLVKFFANILHTNSQENRFKILRKIIEEFEKTKGSMVCEI CKYECETLKLKAHNLSQVQGCPCYCFTHCEPTETA
LLIPSITLAVLIVLKFFAAILHNSSQENRFKILRKIIEEFEKTKGSMVCEVCKYECETGKELKAHNLSQPQSQPCYCFTHCELTESA
VLI PAITFIILTVLKFIANIFHTSNQENRLKSVLRKIIEEFEKTKGSMVCDVCKYECETYKELKAHGVSCPQSQPCYCFTHCEPTEAA
: ** : : : : . : : : : : : * : : * * * * * : * : * * * * . * * * * : :

```

```

LLAHFSICKLTNRFQENLKKSLKRPEVKQGRYRITLGVFRYKSRCYVGLVWGVLLTTELIWAASADTFLMESGWSDTAHGVGIVPMKT
LQAHFAICKLTNRFQENLKKSLKRPEVRKGCYRTLGVFRYKSRCYVGLVWGI LLTTELI IWAASADTFLMESGWSDTAHGVGII PMKT
LQAHFSVCKLTNRFQENLKKSLKHPVEVKQGCYRTLGVFRYKSRCYVGLVWGLLLTTELI IWAASAE TFLMESGWSDTAHGVGIVPMRT
LQAHFAICKLTSRFQENLKKSLKRQDVKPGCYRTLGVFRYKSRCYVGLVWGFLLTIELIWAASADTFLLEPGWTDTAHGVGMI PMKT
LQAHYAVCKLTGRFQEA LKKSLKPEVKRGCYRTLGVFRYKSRCYVGLVWVFLLLTLELIVWAASADTFLVEVWGS DTAHGVGDI PMKT
LQAHYAVCKLTGRFHEALKKSLKPEVQRGCYRTLGVFRYKSRCYVGLVWVCLLLTLELIVWAASADTFLLEPGWSDTAHGVGDI PMKT
LQAHYSICKLTGRFQEA LKKSLKPEVKKGCYRTLGVFRYKSRCYVGLVWCVLLTCELIVWAASAE TFLLESGWSDTAHGVGEVPMKT
LQAHYSICKLTGRFQEA LKKSLKPEVKRGCYRTLGVFRYKSRCYVGLVWCVLLTCELIVWAASAE TFLLESGWSDTAHGVGEI PMKT
LQAHFAICKLTGRFQEA LKKSLKPEVRKGCYRTLGVFRYKSRCYVGLVWCVLLTCELIVWAASAE TFLLESGWSDTAHGVGEVPMKT
LQAHFAICKLTGRFQEA LKKSLKPEVRKGCYRTLGVFRYKSRCYVGLVWCVLLTCELIVWAASAE TFLLESGWSDTAHGVGEVPMKT
LQAHYSICKLTGRFQEA LKKSLKPEVKKGCYRTLGVFRYKSRCYVGLVWCVLLTCEI VIWAASAE TFLMESGWSDTAHGVGEI PMKT
LQAHYSICKLTGRFHEALKKSLKPEVHRGCYRTLGVFRYKSRCYVGLVWCVLLTIELVWAASAE TFLLEPGWSDTAHGVGELPLKT
LQAHFKVCKLTTRFQENLKKSLSTYEPKRGYRITLSMFRYKSKCYVGLVWCILLTMELIWAASAE TINLEPGWTDTAHGSII PLKT
LQAHFKVCKLTTRFQENLRKSLNPYEPKRGYRITLSVFRYKSRCYVGLVWCILLVLELIVWAASADTVEIKTGWTDTAHAGVI PLKS
LQAHFKVCKLTTRFQENLKKSLTMYEPMQGCYRITLSLFRYKSRFFVGLVWCMLLVLELIVWAASAE TQNLNDGWTDTAHGSII PMKA
FKAHYKVCQATHRFREDLKKTVTPQTVGPGCYRITLNLFRYKSRCYILTMWFLLSIESIMWAASAE I PLVPLWTDNAHGIGSVPMHT
IQAHYKVCQATHRFREDLKKTVTPQNI GPGCYRITLNLFRYKSRCYILTMWTLII IESILWAASAE I PLVPLWTDNAHGVGIVPMHT
FQAHYKVCQATHRFREDLKKTVTPQNT PGCYRITLNLFRYKSRCYIFTMWIFLLVLESILWAASAE TPLTPVWTDNAHGVGIVPMHT
: ** : * : * * * : * : : : . * * * * : * * * * : : : * ** * : : * * * * : : * . * * * * : : : :

```

```

DLELDFALASSSSYSYRRLVNPANKEETLPPHFQLDKQVVAEIQNLGHWMDGTFNIKTAFHCYGECKKYAYPWQAKCFPEKDYQY
DLELDFALASSSSYSYRRLVNPANQEETLPPHFQLDKQVVAEIQNLGHWMDGTFNIKTAFHCYGECKKYAYPWQAKCFPEKDYQY
DLELDFALASSSSYSYRRLVNPANTEETLPPHFLQLEKQVVAEIQNLGHWMDGTFNIKTAFHCYGECKKYAYPWQAKCFPEKDYQY
DLELDFALPSSSSYNRYRRTIMNPANGEEKIPFHVQIERQTVHADIQVLGHWMDAIFNIKTAFHCFGECKRYVYPWQSAKCFPEKDYQY
DLELDFAIASSSSYSYRRLVNPANPEESVPPHFQLERQVIHAEIQSLGHWMDATFNIKTAFHCYGECKRYSPWQTAKCFPEKDYQY
DLELDFAI PSSSSYSYRRLVNPANSDETVPPHFQLERQVIHAEIQSLGHWMDATFNII SAFHCYGECKKYSPWQAKCFPEKDYQY
DLELDFSLPSSSSYSYRRLVNPANKEESIPPHFQMEKQVIHAEIQTLGHWMDATFNIKTAFHCYACQKYSYPWQAKCFPEKDYQY
DLELDFSLPSSSSYSYRRLVNPANKEESIPPHFQMEKQVIHAEIQTLGHWMDATFNIKTAFHCYACQKYSYPWQAKCFPEKDYQY
DLELDFSLPSSSSYSYRRLVNPANKEESIPPHFQMEKQVIHAEIQNLGHWMDATFNIKTAFHCYACQKYSYPWQAKCFPEKDYQY
DLELDFSLPSSSSYSYRRLVNPANKEESIPPHFQMEKQVIHAEIQTLGHWMDATFNIKTAFHCYACQKYSYPWQAKCFPEKDYQY
DLELDFSLPSSSSYSYRRLVNPANKEESIPPHFQMEKQVIHAEIQSLGHWMDATFNIKTAFHCYACQKYSYPWQAKCFPEKDYQY
DLELDFSLPSSSSYSYRRLVNPANKEESIPPHFQMEKQVIHAEIQPLGHWMDATFNIKTAFHCYACQKYSYPWQTSKCFPEKDYQY
DLELDFSLPSSSSYSYRRLVNPANKEESLPPHFQMEKQVIHAEIQSLGHWMDATFNIKTAFHCYACQKYSYPWQAKCFPEKDYQY
DLELDFSLPSSATYTYRRELQNPANQEKI PPHFQMERQVIHAEIQHLGHWMDGTFNLKTA FHCYGSCKIYAYPWQAKCFLEKDFEF
DLELDFSLPSSATYIYRDLQNPANEQERIPPHFQLRQVIHAEIQNLGHWMDGTFNLKTSFHCYGACEKYAYPWQAKCFLEKDYEF
DLELDFSLPSSATYRQLQNPANEQEKIPPHLQISKQVIHAEIQHLGHWMDATFNKTA FHCYGSCEKYAYPWQAGCFVEKDYEY
DLELDFSLPSSSKYTYRRLVNPVNTQGVQLHIEIEEQIGADVHHLGHWF DARLNLKTSFHCYGACSKYQYPWHTAKCHFPEKDYEY
DLELDFSLPSSRYTYRRLVNPVNDQQSVSLHIEIESQIGADVHHLGHWF DARLNLKTSFHCYGACTKYQYPWHTAKCHFPEKDYEY
DLELDFSLPSSSKYTYRRLVNPVNDQQSVSLHIEIESQIGADVHHLGHWF DGRNLKTSFHCYGACTKYEYPWHTAKCHFERDFEY
DLELDFSLTSSSKYTYRRLVNPLEEASIDLHIEIEEQITGVVHALGHWF DGRNLKTSFHCYGACTKYEYPWHTAKCHYERDYQY
***** : : * * * : * * * : . : : : * : : . * : : : * * * * : * : * * * * : : * . * * * * : : : :

```


LRGSNTVKVVGKGGHSSSLFKCCHDHTDCTEEGLAASPPHLDRVTGYNQIDS DKVYDDGAPPCTIKCWFTKSGEWLLGILNGNWVVAV
 LRGSNTVKVVGKGGHSGSLFKCCHDHTDCTEEGLAASPPHLDRVTGYNQIDS DKVYDDGAPPCTIKCWFTKSGEWLLGILNGNWVVAV
 LRGSNTVKVVGKGGHSGSLFKCCHDHTDCTEEGLAASPPHLDRVTGYNQIDS DKVYDDGAPLCSVKCWFTKSGEWLLGILNGNWVVAV
 IRGTNTVVRVVGKGGHSGSLFRCCCHDNECTKEGLSATAPHLDRVTGYNQIDS DKVYDDGAPPCTMKCWFKKSGEWLLGIISGNWIVVAV
 VRGSNTIKVVGKGGHSGSLFKCCHDKDCAGTGLSASAPHLERVTGYNQVDS DKVYDDGAPPCSI KCWFKKSGEWLLGILSGNWVVAV
 VRGSNTVKIVGKGGHSGSTFRCCCHDKDCTSNGLLASAPHLERVTGYNQIDS DKVYDDGAPPCSI KCWFKKSGEWLLGILNGNWVVAV
 ARGSNVTKVVGKGGHSGSLHRCCHDHTDCSSEGLVASAPHLERVTGYNQIDS DKVYDDGAPPCTFKCWFTKSGEWLLGILNGNWIVVVV
 ARGSNVTKVVGKGGHSGSSFKCCHDHTDCSSEGLVASAPHLERVTGYNQIDS DKVYDDGAPPCTFRCWFTKSGEWLLGILNGNWIVVVV
 ARGSNVTKVVGKGGHSGSSFKCCHDHTDCSSEGLVASAPHLERVTGYNQIDS DKVYDDGAPPCTFKCWFTKSGEWLLGILNGNWIVVVV
 ARGSNVTKVVGKGGHSGSSFKCCHDHTDCSSEGLVASAPHLERVTGLNQIDS DKVYDDGAPPCTFKCWFTKSGEWLLGILNGNWIVVVV
 ARGSNVTKVVGKGGHSGSSFKCCHDHTDCSSEGLLASAPHLERVTGYNQIDS DKVYDDGAPPCTFKCWFTKSGEWLLGILNGNWIVVVV
 ARGSNVTKVVGKGGHSGSSFKCCHDSDCSSEGLMASAPHLERVTGYNQIDS DKVYDDGAPPCSI KCWFTKSGEWLLGILNGNWIVVAV
 VRGQNTVHVVGKGGHSGSKFMCCHDKKCSATGLVAAAPHLDRVTGYNQIDT NKVFDDGAPCGVHCWFKKSGEWLLGILSGNWMVVAV
 VRGQNTVHILGKGGHSGSKFMCCHSTECSSSTGLTAAAPHLDRVTGYNVIDNDKVFDDGSGPECGVHCWFKKSGEWLLGILSGNWMVVAV
 VRGQNTIHVVGKGGHSGSKFMCCHDTKCSSTGLVAAAPHLDRVTGYNQADS DKIFDDGAPCGMCSWFKKSGEWLLGILNGNWVVAV
 VRGQNTVKISGKGGHSGSSFKCCHGVDCSSNGLQANPPHLDRVAGVSELTNEKVYDDGAPCGIACWFKKSGEWVKGIFSGNWIVLIV
 SRGQNTVKITGKGGHSGSSFKCCHGKECSLTGLQASAPHLDKVNGISELENEKVYDDGAPCGITCWFKKSGEWVMIINGNWVVLIV
 VRGQNTVKVSGKGGHSGSSFKCCHGNDCSQQGLQASAPHLDKVNGIVEQESTQVYDDGAPCGISWFKKSGEWIKGIFSGNWIVIVV
 TRGQNTVKVSGKGGHSGSTFRCCCHGEDCSQIGLHAAAPHLDKVNGISEIENSKVYDDGAPCGIKCWFKKSGEWISGIFSGNWIVLIV
 ** *::: *****. ***. *: ** * .::: * * .::: * * * . *

LIVILILSILLESFF PIRGRKNKSN--
 LIVILILSILLESFF PVRSRKNKAN--
 LVVILILSILLESFF PIRSKKSKPN--
 LIIILVISILLESFF PVRSHKKKL---
 LVVILLISIVLESFL PIRSHKKQL---
 LVIIILSIFLESFF PIRSHKKQL---
 LVVVLIFSIILENIL PRRGHKKTV---
 LIVVLIFSIVLESIL PRRGHKKAV---
 LVVVLIFSIILESIL PRRGHKKTV---
 LVVVLIFSIILESIL PRRGHKKTV---
 LVVILILSIIMFVSL PRRGHKKTV---
 LVIIILSIILESFL PRRSHKKNV---
 LIALFIFSLLESFL PRRQNYKKNK--
 LVVLLISIFLESFL PRRVVHKKSS--
 LIALLISIFLFAK PRRPSYKKDHKE
 LVVLLISLILGIF PVRKHKKS----
 LVVLLFSLILSIL PVRKHKKS----
 LIVLFILSLILSFL PIRKHKRS----
 LVVLLFSLVLLSIL PVRKHKKS----
 * .::: * * * . * * *



Agradecimientos

Quiero agradecer a todas las personas que estuvieron a mi lado en esta "larga" etapa de mi carrera.

En primer lugar al Instituto Malbrán en sus autoridades y personal, por haberme brindado un lugar de trabajo para la realización de esta tesis.

Quiero agradecerle especialmente a Paula porque más allá de guiarme en la realización de mi tesis, contribuyó en mi formación tanto científica como humana.

A quienes estuvieron directamente vinculados a este trabajo: a Paulita, Carla y Silvana. Con quienes además mantuve innumerables charlas para mejorar el universo "Malbrán".

A Dani por nuestros "brain-storming" que extraño y por corregir esta tesis.

A Marcelo, Sergio y Ale compañeros de ciencia y mucho más.

A Alicia por su colaboración inagotable.

A Cris, por ser Cris....

A mi consejera de estudios, la Dra Lilia Lauría por sus valiosas observaciones.

A Jorge Baldoni por su constante interés en nuestro futuro.

A Ana y Guido por su eterna paciencia..

A mis amigos: Sergio, Luciana, Alejandro, Guille, Andrea, Alejandro Gaita y su futura esposa Laura, Marcelo, Paula, Noel y Hernán, Ramiro y Karin.

A mis padres por su gran apoyo. A mis suegros, mis segundos padres.

Y muy especialmente a Laura y Ariel..., los principales motores de esta tesis.

Gracias a todos