Figura 30. Disectando en campo con equipo apropiado

Figura 31. Hielo seco necesario para congelar las muestras

Para la captura de roedores se utilizaron trampas Sherman (8 x 9 x 23cm; H. B. Sherman Trap .Co, Tallase FL) (Figs, 32 y 33).

Figura 32. Marcando y cebando trampas Sherman

Figura 33. Marcando trampas Sherman

y se utilizó crema de cacahuate, masa de maíz y una mezcla de granos (avena ,sorgo, maíz mezclados con crema de cacahuate) como atrayente alimenticio (figuras 34, 35, 36, 37 y 38).

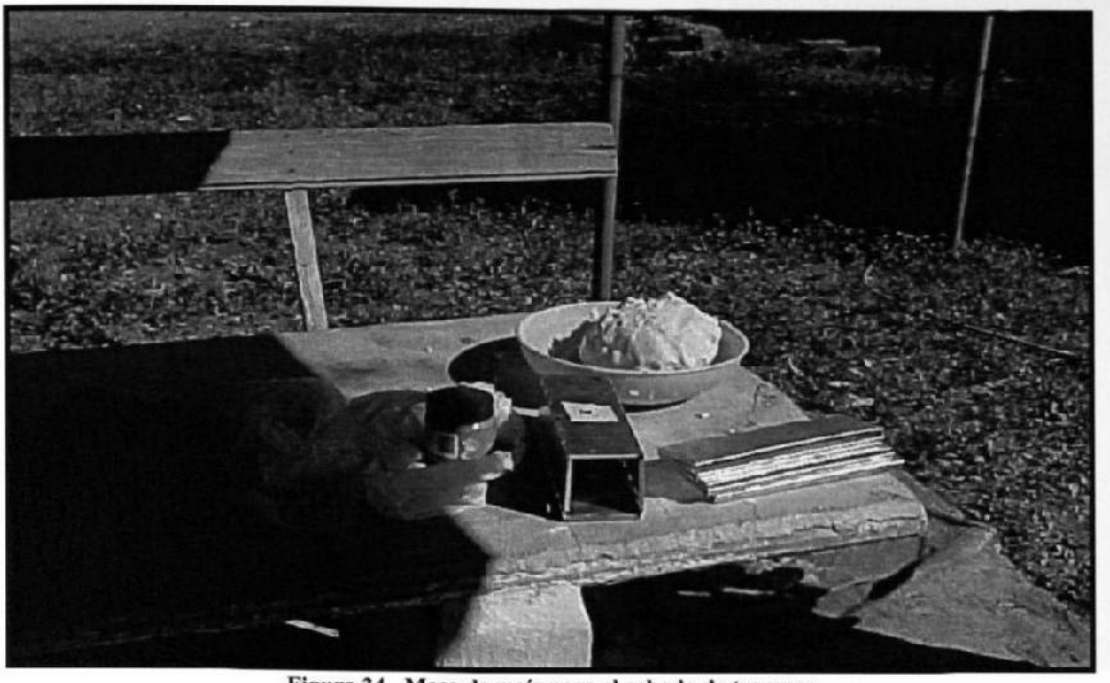

Figura 34. Masa de maíz para el cebado de trampas

Figura 35. Crema de cacahuate como atrayente alimenticio

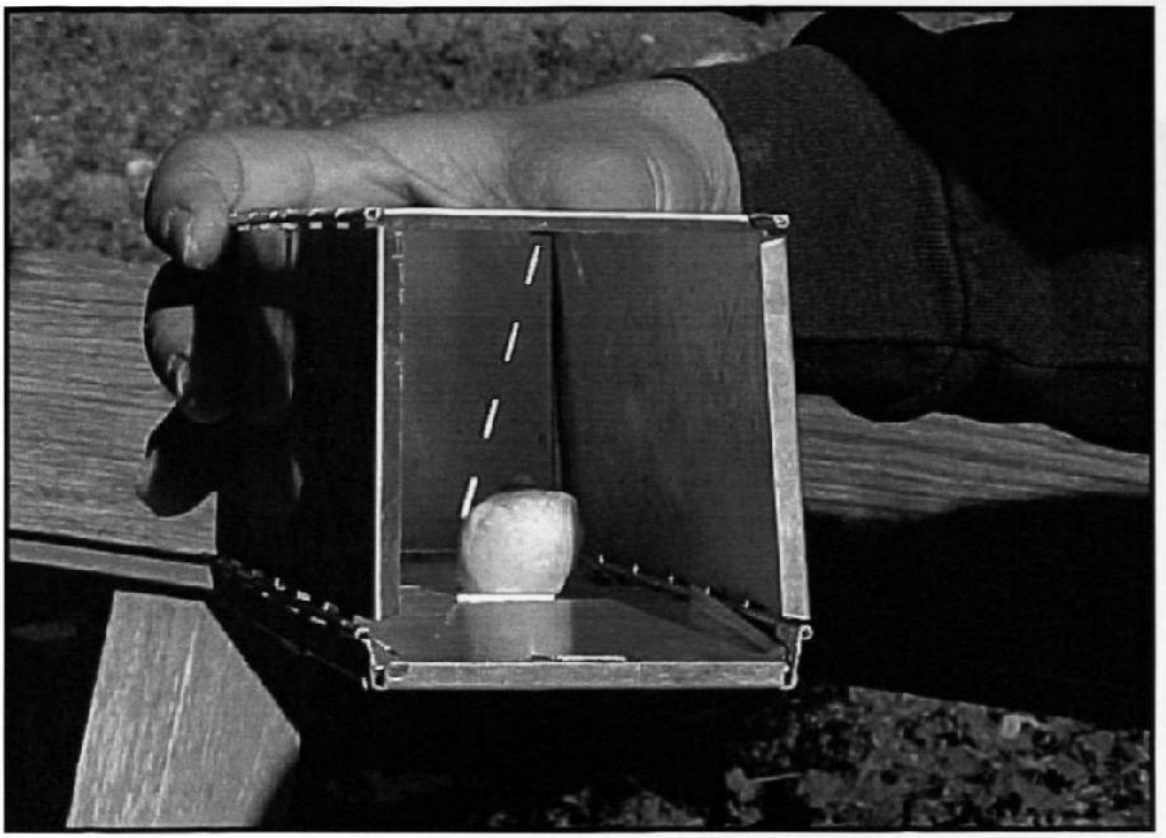

Figura 36. Trampa cebada

Figura 37. Mezcla de avena y sorgo para cebado

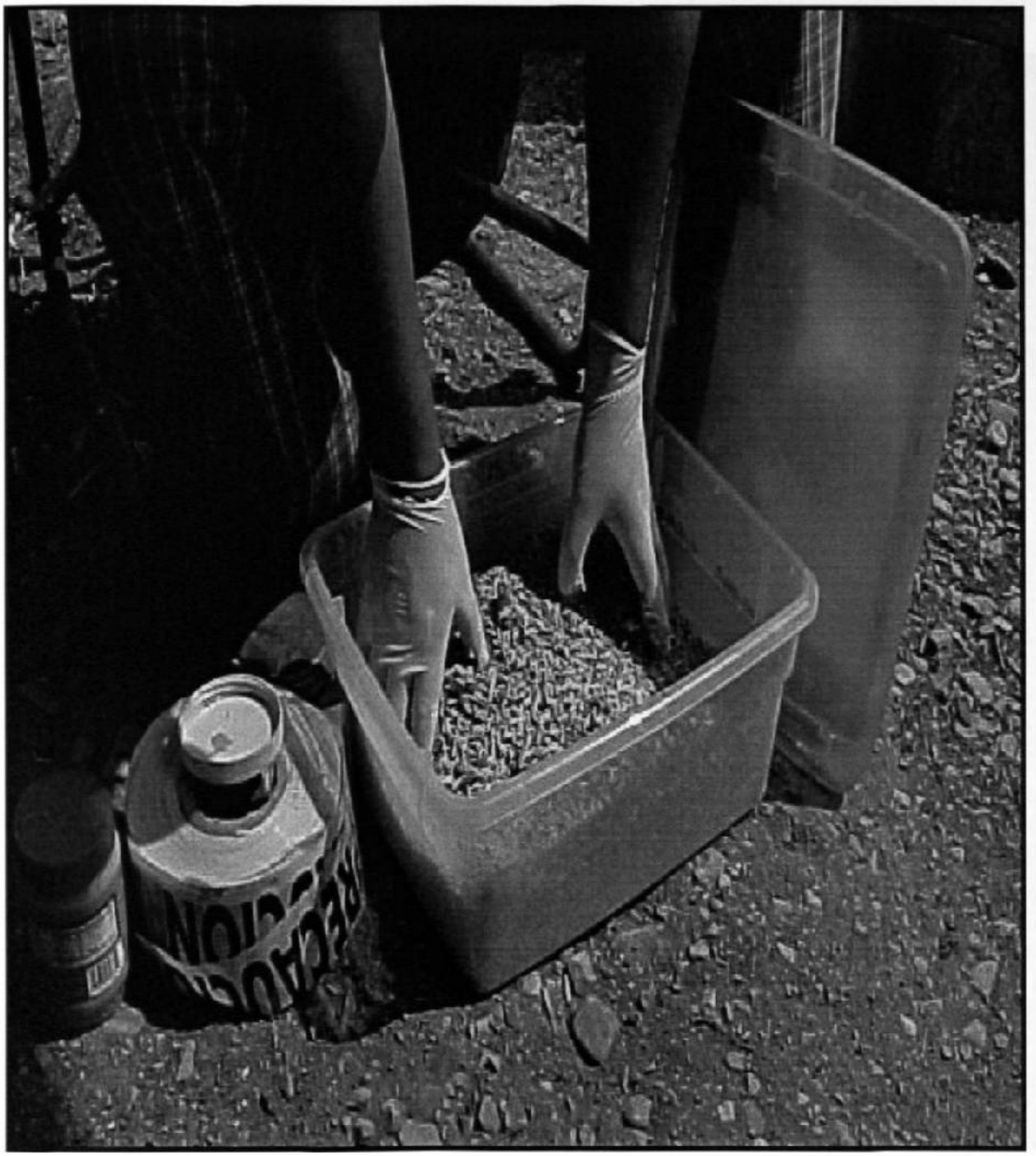

Figura 38. Mezclando granos con crema de cacahuate

Las trampas fueron colocadas y cebadas en lugares estratégicos (figuras 39, 40, 41 y 42)

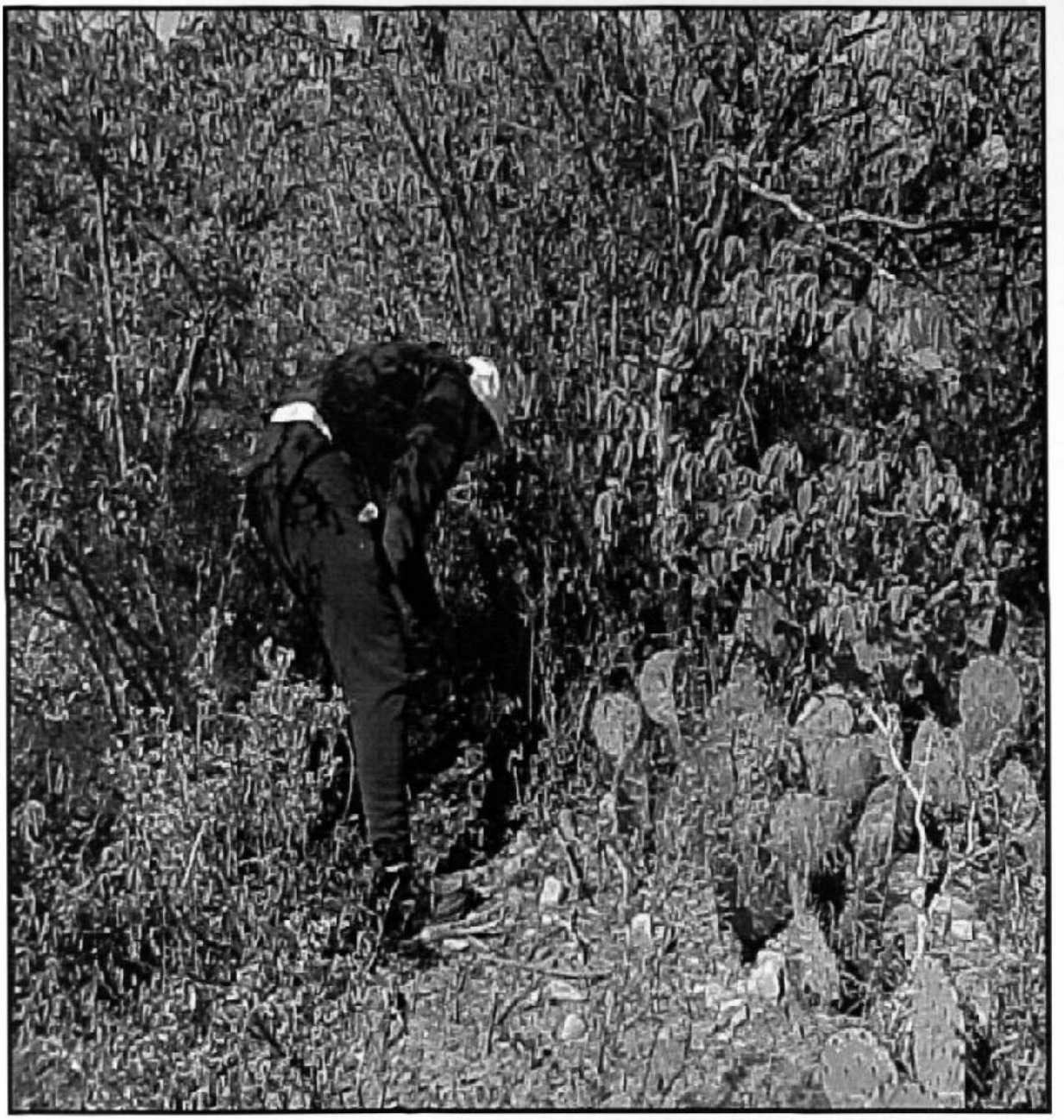

Figura 39. Colocando trampas

Figura 40. Colocando trampas

donde se observó actividad por los roedores (heces, huellas, refugios, madrigueras etc.). Cada trampa fue colocada separada de 15-20 mts. y fueron colocadas en forma lineal. Las líneas de trampas se colocaron en áreas que estuvieran fuera de la vista de caminos, veredas, rutas u otras áreas de actividad humana. Se evitó áreas frecuentadas por ganado para evitar que los animales destruyeran las trampas o tropezaran accidentalmente con ellas. Se indicó el comienzo de cada línea de trampas con un pequeño pedazo de cinta atada y marcada con el número de línea de trampas. En zonas de matorrales, fue necesario marcar la ubicación de cada trampa. Al colocar cada trampa, se controló el mecanismo disparador para comprobar su ajuste y sensibilidad. Las trampas fueron colocadas antes de que oscureciera. Si las trampas fueron colocadas varias horas antes de la puesta del sol, o se dejaron abiertas durante el día, se revisaron frecuentemente, especialmente en época de calor, para la captura de animales diurnos. Se evitó colocar las trampas de manera que quedaran expuestas al sol directo.

Figura 41. Colocando trampas

Figura 42. Colocando trampas

Después de finalizar cada línea de trampas, se completó un formulario de control de trampas y se incluyo el número de cada tipo de trampas colocadas en cada línea.

Se completó el formulario de evaluación del tipo hábitat, para cada línea de trampas o grupo de líneas de trampas en un hábitat distinto. Y se utilizó, un sistema de posición global GPS (marca GARMIN GPS 12) del inglés *Global Positioning Syste*m para registrar la latitud y longitud exactas (figura 43).

Figura 43. Ubicando con el GPS longitud y latitud exactas

5.8 CAPTURA Y TRANSPORTE DE LOS ROEDORES

Las trampas fueron revisadas lo más temprano posible en la mañana, especialmente en tiempo cálido. Se revisó cada trampa para ver si hubo captura o si fue visitada. Si las trampas fueron visitadas, pero sin capturar ejemplares (contiene orina, materia fecal o material de nido), se colocó la trampa en doble bolsa plástica para ser descontaminada y verificar su funcionamiento adecuado. Y se reemplazo la trampa por una limpia en el lugar.

Figura 44. Recogiendo trampas

Las trampas que contenían roedores capturados fueron manipulados con guantes de goma gruesa. No se recomienda el uso de guantes de cuero, debido a que estos no pueden ser descontaminados con desinfectante. Las trampas que contenían roedores fueron colocadas inmediatamente dentro de una bolsa plástica doble y cerrada perfectamente. Las bolsas fueron abiertas solamente cuando se llegó al lugar de procesamiento y con ropa protectora, incluso tapabocas se dispuso de las mismas (Fig. 45).

Figura 45. Roedor en bolsa con anestesia

Se deberá tomar en cuenta que si se han generado aerosoles, estos se encuentran concentrados en una pequeña área dentro de la bolsa. Las bolsas con los roedores fueron transportadas en la parte trasera de una camioneta para proteger a los pasajeros.

Las trampas que contuvieron animales capturados o que fueron visitadas por animales (demostrado por la presencia de orina, materia fecal o materiales de nido) fueron descontaminadas antes de volverlas a usar o guardarlas. Se colocaron los roedores capturados en bolsas plásticas en un área fría, a la sombra. Las bolsas pueden abrirse para permitir que le circule aire a los animales.

Si el éxito de trampeo fue razonable (10% o mejor), las trampas se dejaron en el mismo lugar por una segunda noche; en caso contrario, se colocaron en otro lugar de colecta.

Se seleccionó un sitio de procesamiento que esté relativamente apartado, fuera de la vista de cualquier actividad humana y que no esté cerca del ganado u otros animales de preferencia al aire libre (figs. 46 y 47).

Figura 46. Procesando los ratones al aire libre

Figura 47. Colectando muestra de sangre

Todo el personal que participó en la manipulación de roedores o trampas uso ropa protectora completa, incluso vestimenta desechable u overol (de preferencia desechable), cubrebotas desechables, dos pares de guantes de látex, anteojos de seguridad y tapabocas. Dentro de las bolsas plásticas que contienen las trampas con los animales capturados se colocó un trozo de algodón o gasa empapado en cloroformo, (una bolsa de cierre hermético de 30 cm. x 30 cm.). Se saco la trampa que contenía el animal de su bolsa plástica. Luego, se saco de la bolsa el roedor, y se sello la bolsa y se coloco el animal sobre una superficie limpia (dos capas de toalla de papel blanco pueden funcionar bien) para el procesamiento.

Los roedores que fueron capturados no fueron manipulados fuera de las trampas a menos que estuvieran profundamente anestesiados. Se utilizó un anestésico por inhalación el cual fue cloroformo ya que los hace permanecer inconscientes por más tiempo.

5.9 OBTENCIÓN DE DATOS REPRODUCTIVOS Y MEDIDAS ESTÁNDAR DE ROEDORES

Los datos se almacenaron en formularios y se registraron en un documento estandarizado:

5.9.1 Anotación de sexo y la condición reproductiva del animal

Para los machos, los testículos pueden haber descendido dentro del escroto o ser abdominales. Para las hembras, la vagina puede estar perforada o cerrada. Los pezones pueden ser pequeños o estar agrandados, y distinguirse entre lactantes o no lactantes (esto se determina apretando suavemente un pezón entre el pulgar y el dedo índice) (fig. 48).

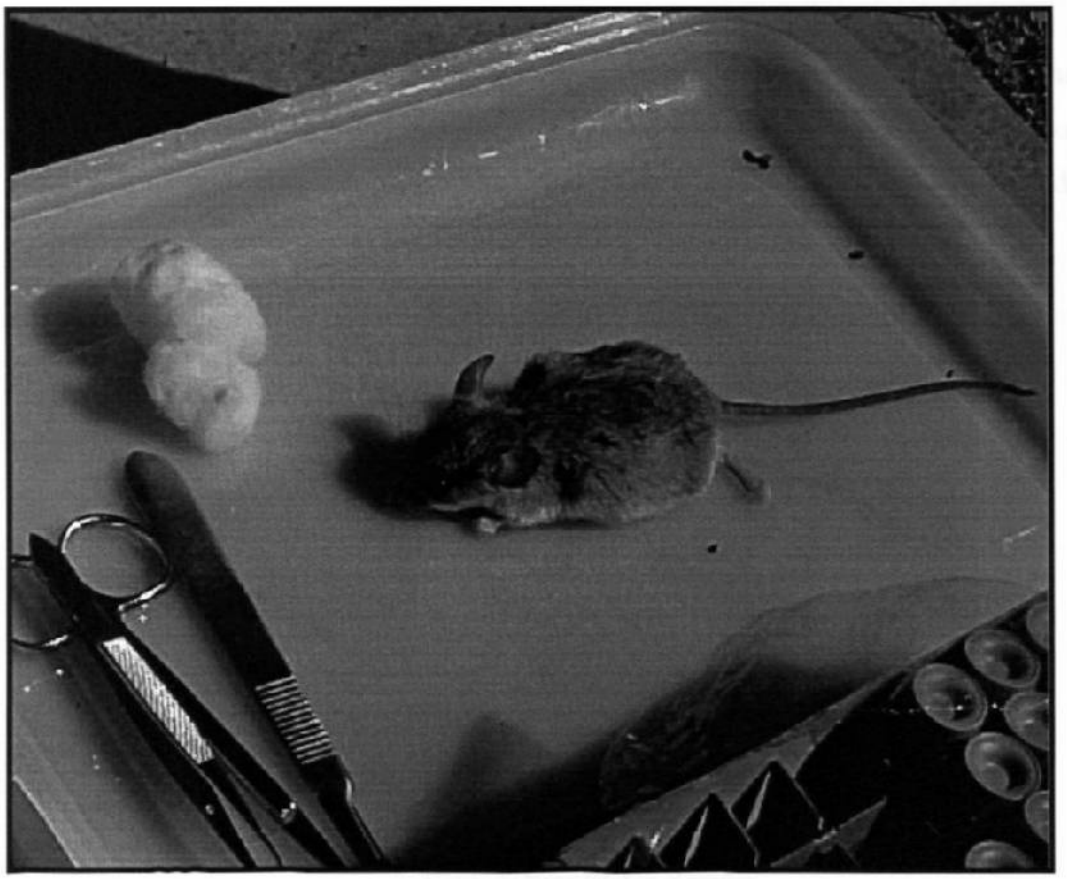

Figura 48. Identificando sexo y estado reproductivo

5.9.2 La edad: del animal puede registrarse (subjetivamente) según las medidas y características de pelaje como juvenil, adulto joven o adulto, (fig. 49).

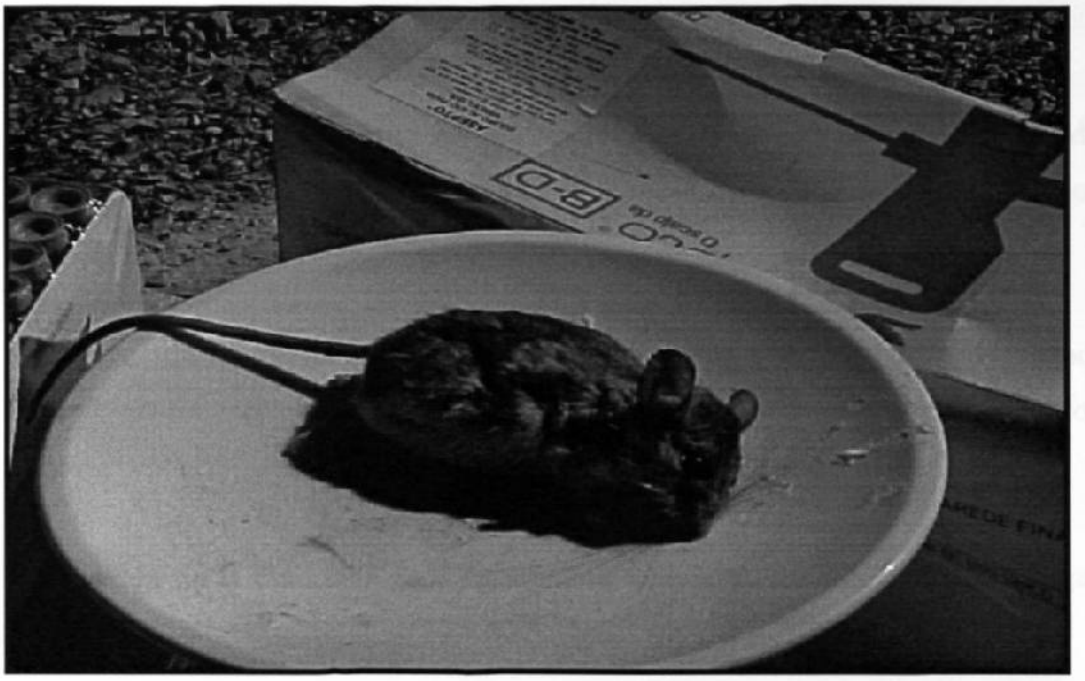

Figura 49. Calculando edad del roedor

5.9.3 Largo total: Se coloca el animal sobre una superficie con la parte ventral hacia arriba y se sostiene de modo que el cuerpo y la cola estén derechos y tirantes pero no estirados. Se mide la distancia desde la punta de la nariz a la punta de la parte carnosa de la cola; excluir cualquier pelo que se proyecte más allá de la punta (fig. 50).

Figura 50. Midiendo largo total en el roedor

5.9.4 Largo de la cola: Se coloca el animal con la parte ventral hacia abajo y se dobla la cola hacia arriba en un ángulo recto. Medir desde la curvatura de la base posterior de la cola hasta la punta de la parte carnosa, excluir los pelos que se proyectan más allá.

5.9.5 Oreja: Se inserta la punta de una regla en la muesca de la base de la oreja y se mide el largo máximo a la porción distal del pabellón de la oreja (apariencia media); excluir los pelos que se proyectan más allá de la porción carnosa.

5.9.6 Registro de la presencia de cualquier cicatriz que haya en el cuerpo, especialmente en las orejas y la cola. Esto puede ser indicativo de encuentros agresivos entre roedores.

5.9.7 Anotación de la presencia de ectoparásitos, tales como ácaros, garrapatas, pulgas o moscardones.

Figura 51. Roedor identificado

Para la preparación de los especimenes se siguió los criterios de Hall, 1962; así mismo los roedores fueron identificados hasta especie mediante claves taxonómicas de Jiménez.1999, se dan nombres vulgares de las especies capturadas (Jiménez ,1999). Las medidas se especifican en centímetros, y su peso en gramos. Los ejemplares examinados están depositados en el Laboratorio de Entomología Medica en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, con su número de registro y sus datos correspondientes en las cuales se menciona el lugar y fecha de colecta fig. 51).

5.10 Obtención de sangre y tejido

Las muestras de sangre fueron obtenidas *in situ* mediante punción cardiaca ya que se obtiene más cantidad de sangre a través de este método. Se colocó al animal sobre una superficie plana, con la parte ventral hacia arriba. Se moja el abdomen y el tórax con alcohol y se limpian con una gasa limpia. La posición del latido del corazón puede ubicarse frecuentemente al tocar con el dedo índice. Con el dedo índice de la mano izquierda, se ubica la protuberancia xifoidea. Con la jeringa en la mano derecha, se inserta la aguja justo debajo de este punto y se retira el émbolo suavemente para crear un ligero vacío. Continuar presionando la aguja dentro de la cavidad torácica en un ángulo de 20° sobre la horizontal, hasta que se penetre al corazón y la sangre comience a fluir. Se retira el émbolo lentamente hasta que la jeringa se llene, manteniendo un ligero vacío. Si antes de que se haya obtenido suficiente sangre el flujo cesa, se retira la aguja suavemente. Una vez llena la aguja se saca y se expele suavemente la sangre dentro de un criovial rotulado. Concluido lo anterior se descarta la jeringa y aguja dentro de un recipiente para material punzante. Enroscar debidamente la tapa del criovial y limpiar con una toalla de papel o gasa y desinfectante cualquier derrame de sangre sobre el mismo. La sangre fue extraída a través de jeringas estériles (Figs. 52, 53 y 54) y se almacenó en crioviales.

Figura 52. Extrayendo sangre por punción cardiaca

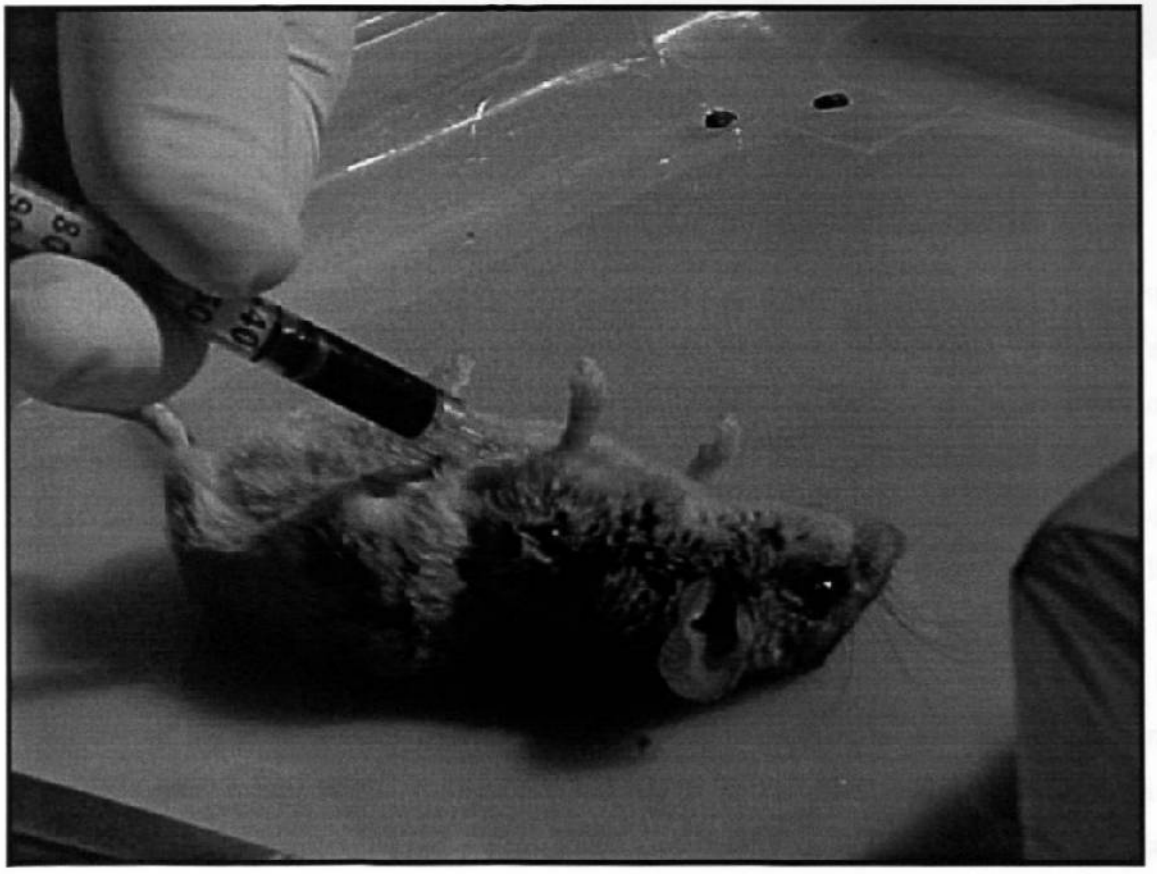

Figura 53. Extrayendo sangre por punción cardiaca

Figura 54. Depositando la sangre en un criovial rotulado

5.11 Obtención de tejidos

Si el animal no murió durante el sangrado, se realizó la eutanasia antes de la autopsia. Este procedimiento se realizó por medio de una sobredosis de anestesia, colocando el animal en una cámara con una fuente de dióxido de carbono (hielo seco). Se esterilizó sobre un mechero de alcohol las tijeras y las pinzas y se colocaron sobre una gradilla de modo que la porción esterilizada no toque ninguna superficie. Se colocó el roedor sobre una toalla de papel con su parte ventral hacia arriba. Se limpió la superficie ventral con una almohadilla de algodón. Se pellizcó y levantó la piel de la parte baja del abdomen con los dedos o la pinza, colocándose la tijera por debajo del pellizcó y, con un simple tijeretazo, se corto la piel y la musculatura abdominal. Se insertó una hoja de la tijera en la incisión y se hizo uno o dos cortes en forma de "V" sobre cada lado de la pared abdominal; se retrajo la piel cortada y la musculatura más allá del diafragma para exponer completamente la cavidad abdominal. Y se colocaron las tijeras usadas en una bandeja con Lysol® (figs. 55 y 56).

Figura 55. Iniciando disección del roedor

Figura 56. Iniciando exposición de la cavidad abdominal del roedor

Con una pinza estéril de punta roma y sin dientes, se tomaron los riñones uno por vez, y se tomaron con las pinzas para desprenderlos; estos se colocaron dentro de un criovial estéril rotulado (figs. 57 y 58).

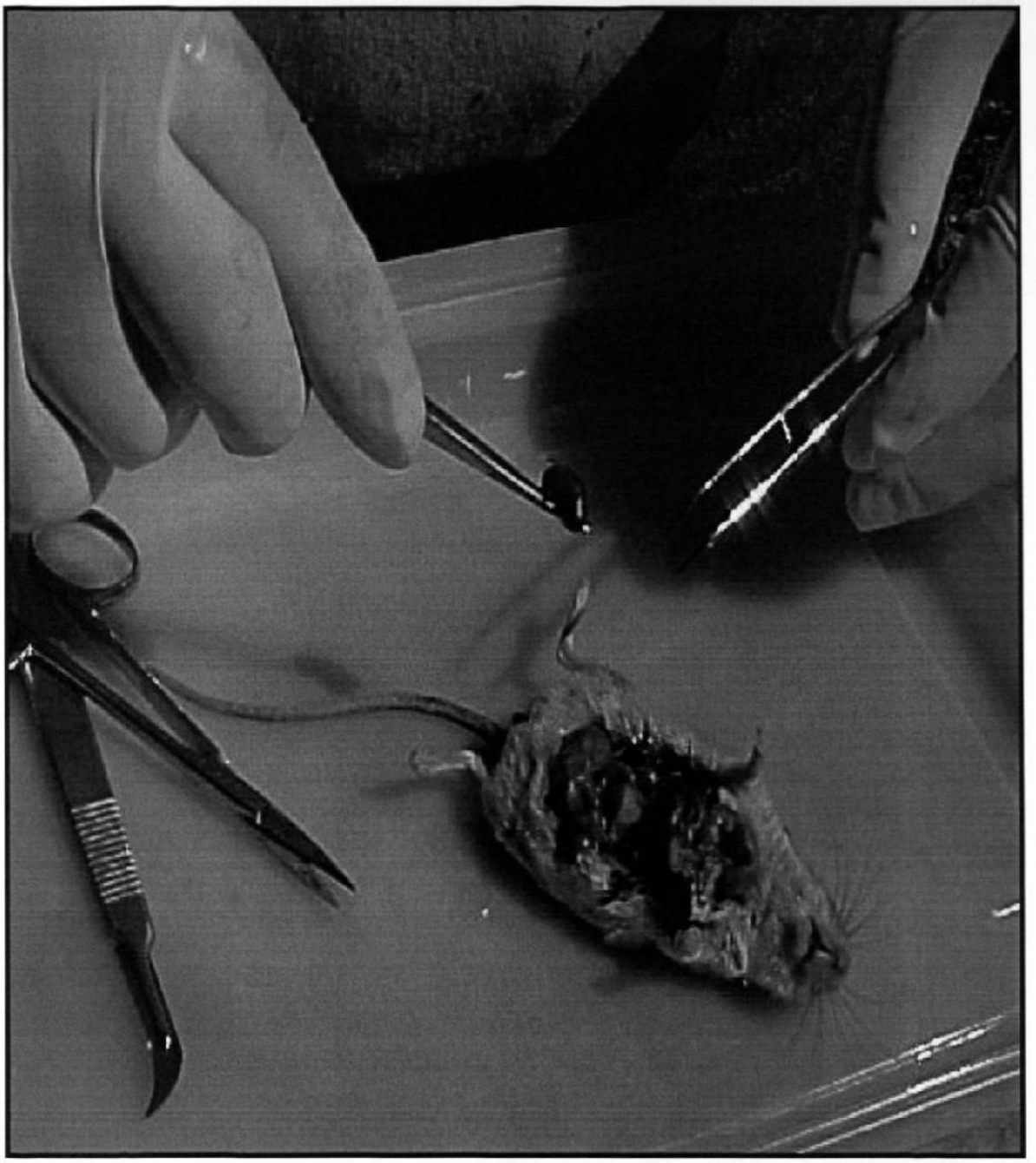

Figura 57. Exposición abdominal completa

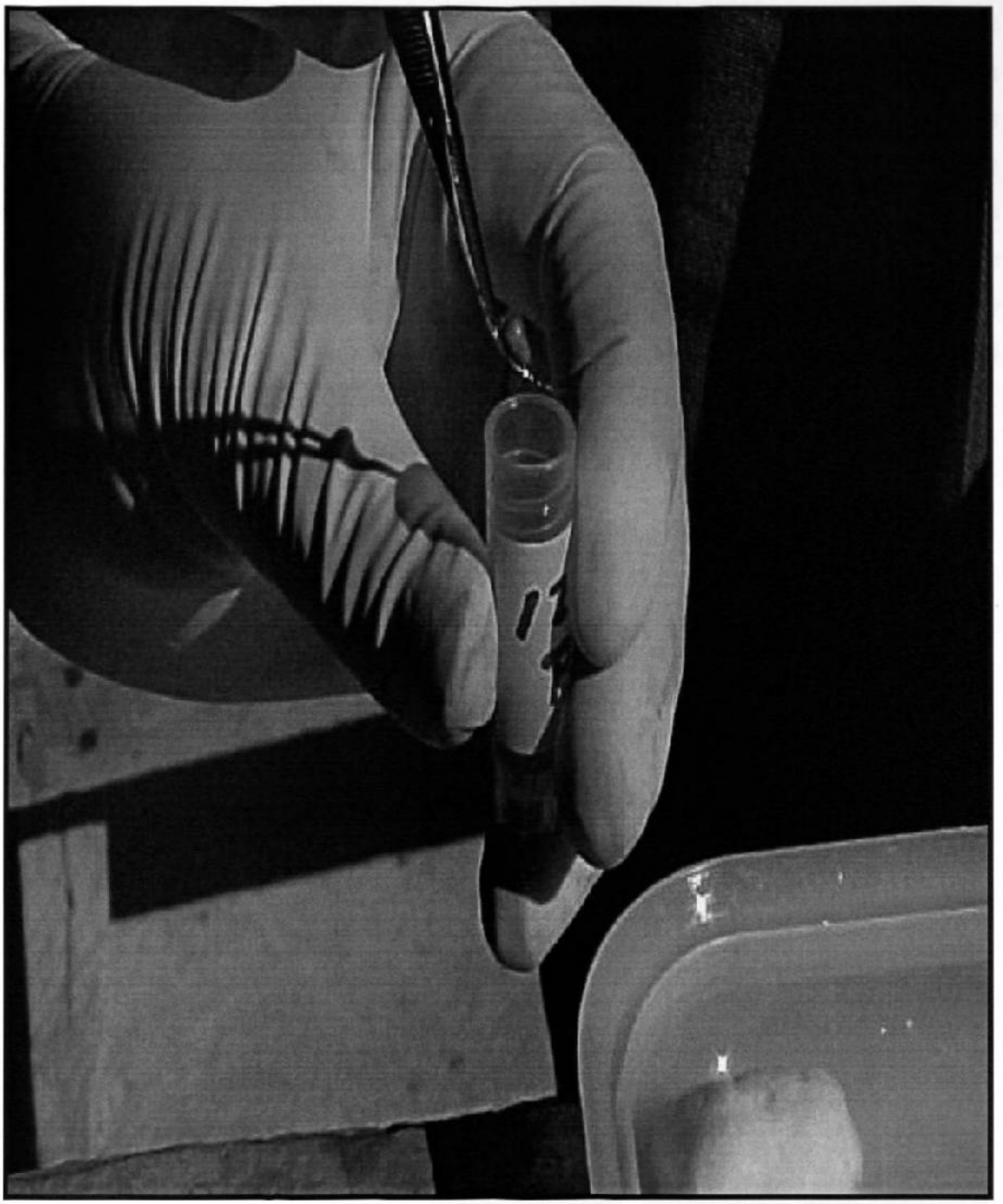

Figura 58. Colocando riñón en criovial estéril rotulado

Se tomó con la pinza el diafragma y se separó para brindar un acceso más claro a la cavidad torácica. Se colocó la pinza bajo los pulmones en el ápice de la cavidad torácica y se tomaron los pulmones (Figura 57). Se saco todo este tejido con un movimiento hacia arriba y hacia atrás y se colocó dentro de un criovial rotulado. En el caso de especies grandes, es suficiente con tomar solamente una parte del pulmón. Inmediatamente se colocaron las pinzas usadas en una bandeja con Lysol® y se desinfectaron. Se colocaron las tapas de todos los crioviales, y se rociaron todos los crioviales con desinfectante y se limpiaron de cualquier resto de sangre o tejido del exterior del criovial. Las muestras (sangre, pulmón y riñón) se colocaron en hielo seco para su conservación, y para su posterior transportación al Laboratorio de Entomología Médica para su almacenamiento en el Revco a -70°C (fig. 59).

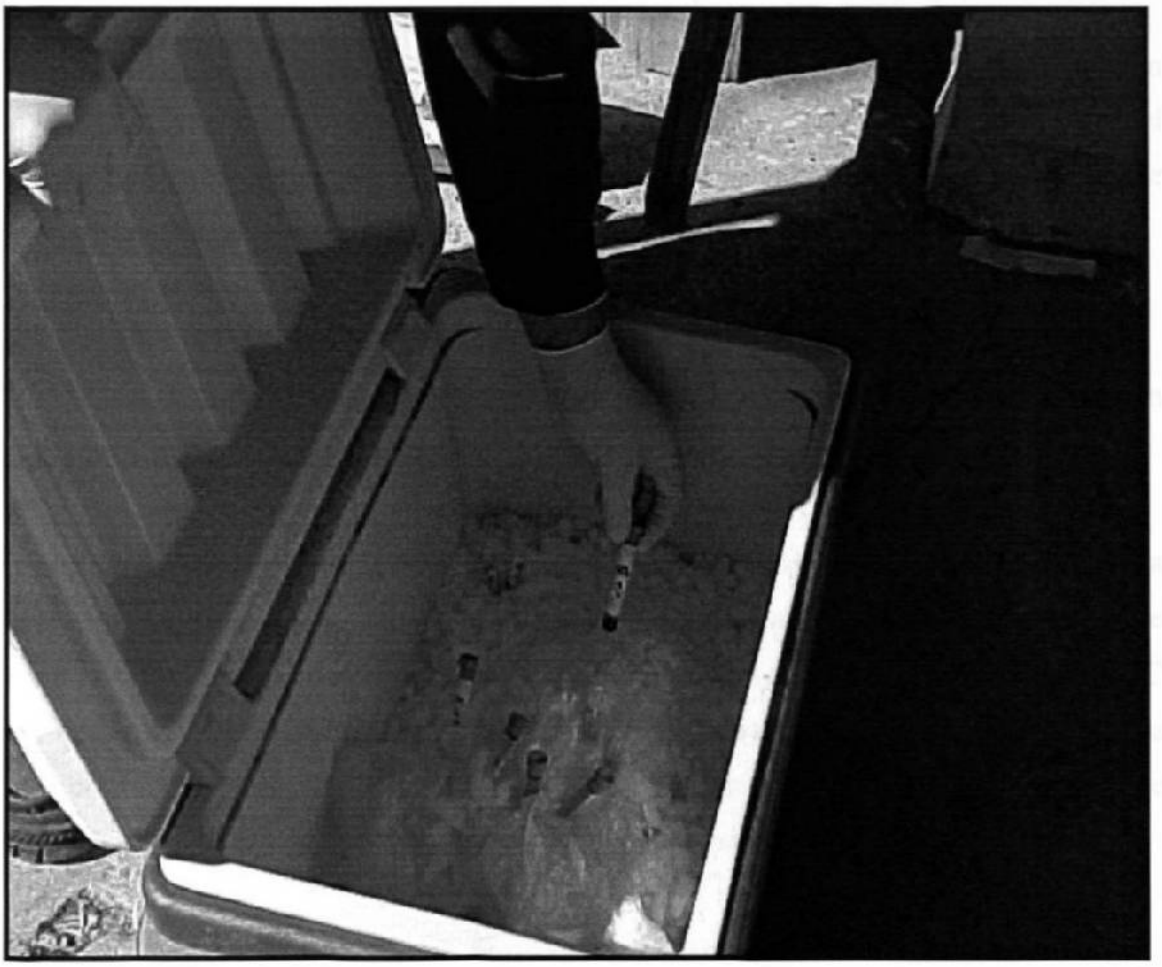

Figura 59. Colocación de muestras en hielo seco para su conservación

5.12 Procesamiento de muestras de sangre

Las muestras de sangre fueron analizadas con anticuerpos producidos con la proteína recombinante de la nucleocápside como al antígeno, el cual fue producido (Jonson, 2001) y donado por MESA STATE COLLEGE, Grand Juction, Colorado, de acuerdo al protocolo estandarizado para el método de ELISA (Mills y cols., 1997; Kemeny, 1991)

5.13 Metodología de ELISA para el SNV

La mejor alternativa para confirmar el diagnóstico de infección por Hantavirus es la determinación de anticuerpos IgM específicos utilizando la técnica de ELISA de captura (IgM), porque es una prueba con una alta especificidad, es decir una tasa baja de falsos positivos. Además posee la ventaja de que ambos anticuerpos, IgM/IgG específicos, estén presentes en las muestras obtenidas del paciente sospechoso.

Se ha demostrado que los anticuerpos IgM/IgG contra todos los Hantavirus conocidos en las Américas, se pueden detectar con pruebas de ELISA utilizando los antígenos del Hantavirus Sin Nombre (SNV). Estas pruebas deben realizarse bajo estrictas medidas de bioseguridad, en gabinetes con nivel de bioseguridad tres.

Para referencia Roosi, C,A. y Ksiazek, T,G.(1999).

A continuación se describe el método para procesar una muestra el cual se puede realizar en un mismo día ya que el proceso tarda de 7-8 horas.

Se coloca en una placa de ELISA 50 µl de antígeno de la proteína recombinante de la nucleocapside de SNV en 2 µg/ml de PBS durante 2 horas a 37° C. Este primer paso se puede efectuar si así se desea un día antes y almacenar las placas durante la noche a 4° C sin incubarse. Esto es recomendable ya que de esta forma al día siguiente con las placas listas el proceso se acorta en tiempo, sobre todo si se inicia tempranamente. Después de este paso, se lavan las placas con buffer de lavado por lo menos tres veces .

A continuación se adiciona a cada pozo 100 µl. de Buffer y se bloquea con leche Carnation descremada a el 1% e incuba durante 1 hora a 37° C, para posteriormente lavar las placas por tres veces nuevamente.

Enseguida se diluyen las muestras de 1:100 con Buffer y se adiciona 50 µl por duplicado y se procede a incubar a 37° C por una hora nuevamente. Después de esto, se lavan y adicionan 50 µl de anticuerpo anti-IgG de Pele (*Peromyscus leucopus*) preparado en cabra, en cada pozo y se procede a incubar por una hora a 37° C, terminado esto, se lavan y se adicionan 50 µl de anti-IgG de cabra conjugado(unido a peroxidasa), y se vuelven a incubar a 37° C por una hora, después de lo cual se lava nuevamente y se adiciona 50 µl de ABTS activado y se incuba durante 30 minutos a temperatura ambiente, para después proceder a hacer la lectura en el lector de placas a 414 nm.

Para esta prueba se utilizó un lector de microplacas marca Benchmark (BIORAD) del laboratorio de Entomología Médica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Como controles se utilizó un suero positivo y cuando menos 2 sueros negativos, las muestras se consideraron positivas cuando su absorbancia fue igual o mayor que la mostrada por el control positivo utilizado.

6. RESULTADOS

6.1 Identificación y ubicación taxonómica de especies de roedores potenciales reservorios a Hantavirus (SNV). Durante el periodo de colectas de campo de roedores comprendidas del 2001 al 2003, se colectaron un total de 286 individuos. Se registran 19 especies de roedores para el presente estudio, las cuales 14 corresponden a la familia *Muridae* y 5 a la familia *Heteromidae*. Se realizaron 17 colectas que incluyeron 13 municipios del Estado de Nuevo León y uno en Tamaulipas. Diez y siete de los muestreos de campo (94.4%) se realizaron en Nuevo León y el restante (5.6%) en Tamaulipas.

La especie mas frecuente colectada en ambos estados, correspondió al ratón de patas blancas *Peromyscus leucopus texanus* ; 68 especimenes de este roedor comprendieron el 23.8% del total de la población colectada. Con un 14.3% , *Chaetodipus hispidus*, ratón de bolsa hispido, representó la segunda especie más capturada. El 11.2% correspondió a *Neotoma micropus*, rata maderera de las planicies, demostrando con esto, que casi el 50% de los roedores colectados correspondieron a estas tres primeras especies (Tabla 1).

Tres especies altamente involucradas con seroprevalencia y transmisión del Hantavirus en Estados Unidos y Canadá, como es el caso de *Peromyscus pectoralis* (ratón de tobillos blancos), *Sigmodon hispidus* (rata jabalí) y *Peromyscus maniculatus* (ratón ciervo), representaron un interesante 18.2% del total de la muestra colectada (Tabla 1).

Las especies menormente colectadas y que correspondieron en conjunto al 1.2% del total de la muestra, fueron el ratón pigmeo del norte (*Baiomys taylorii*), *Liomys irroratus* (ratón de bolsa espinoso), la rata maderera mexicana (*Neotoma mexicana*), y *Perognathus flavus* (ratón de bolsa sedoso).

Tabla 1. Distribución y frecuencia de especies de roedores colectados durante el período de estudio en el Noreste de México

Especie	Nombre Común	Frecuencia	Porcentaje
Peromyscus leucopus texanus	Ratón de patas blancas	68	23.8%
Chaetodipus hispidus	Ratón de bolsa híspido	41	14.3%
Neotoma micropus	Rata maderera de las planicies	32	11.2%
Peromyscus pectorales	Ratón de tobillos blancos	22	7.7%
Peromyscus levipes ambiguus	Ratón de los matorrales	21	7.3%
Sigmodon hispidus	Rata Jabalí	20	7.0%
Mus musculus	Ratón domestico	18	6.3%
Chaetodipus penicillatus	Ratón de bolsa del desierto	15	5.2%
Peromyscus maniculatus	Ratón Ciervo	10	3.5%
Dipodomys merriami	Rata Canguro	9	3.1%
Onychomys leucogaster	Ratón chapulín del Norte	9	3.1%
Peromyscus eremicus	Ratón de los cactus	7	2.4%
Neotoma albigula	Rata maderera de garganta blanca	5	1.7%
Oryzomys couesi aquaticus	Rata arrocera de los pantanos	3	1.0%
Rattus rattus	Rata gris	2	0.7%
Baiomys taylorii	Ratón Pigmeo del Norte	1	0.3%
Liomys irroratus	Ratón de bolsa espinoso	1	0.3%
Neotoma mexicana	Rata maderera mexicana	1	0.3%
Perognatus flavus	Ratón de bolsa sedoso	1	0.3%
		n=286	

A continuación se presenta la descripción morfológica y distribución en el noreste de México de las diferentes especies de roedores colectadas.

6.1.1 *Peromyscus maniculatus* (Ratón ciervo)

Descripción: Dorso café claro, vientre blanco la base del pelo es gris; cola bicolor, café dorsal y blanca ventral. Es uno de los *Peromyscus* de menor tamaño; de cola corta, cubre entre el 40-45% de la longitud total Formula dentaria 1/1 – 0/0 – 0/0 – 3/3= 4/4 x 2 = 16.

Distribución: En el Altiplano Mexicano y Sierra Madre Oriental, La Ascensión, Galeana.

Figura 60. *Peromyscus maniculatus*
(Ratón ciervo)