



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN
Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**DIVERSIDAD DE ROEDORES Y SU RELACIÓN CON LA
DINÁMICA DE AGENTES INFECCIOSOS Y FRECUENCIA DE
ENCUENTROS ENTRE RESERVORIOS DEL NOROESTE DE
CHIHUAHUA**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:
ANDRÉ VÍCTOR RUBIO CARRASCO

TUTOR PRINCIPAL:
GERARDO SUZÁN AZPIRI
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

COMITÉ TUTOR:
GERARDO JORGE CEBALLOS GONZÁLEZ
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

RURIK HERMANN LIST SÁNCHEZ
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

MÉXICO, D.F. AGOSTO 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DEDICATORIA

A Daniela, Julián y a mi Padre Jorge

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis se realizó gracias al apoyo de los proyectos CONACyT 118316 y 179482 y Scott Neotropical Fund (Cleveland Metroparks Zoo y Cleveland Zoological Society). Mis estudios de Doctorado fueron financiados por el programa Becas-Chile para estudios de Doctorado en el extranjero. Agradezco también al Posgrado en Ciencias de la Salud y la Producción Animal por el financiamiento otorgado a través de la beca PAEP para asistir al congreso Internacional One Health en Holanda.

Agradezco al Dr. Gerardo Suzán por la oportunidad que me brindó de venir a México a trabajar con él, por el apoyo que me otorgó todo este tiempo en mi investigación y también por invitarme a participar en otras investigaciones.

A Rafael Ávila por toda su ayuda, la cual fue fundamental para el desarrollo de esta tesis.

A mi comité Tutorial, los Doctores Rurik List y Gerardo Ceballos, por su apoyo y aporte en este proyecto de tesis. Agradezco a la Dra. Rosa Elena Sarmiento quien me dio la oportunidad de aprender en su laboratorio algunas técnicas que fueron importantes para esta tesis.

A mis sinodales, Dra. Susana Mendoza, Dr. José Juan Martínez Maya, Dr. Diego Santiago y Dr. Francisco Galindo por sus comentarios y sugerencias que enriquecieron esta tesis.

A los doctores Michael Kosoy y Kenneth Gage quienes me dieron la oportunidad de trabajar en el CDC donde se realizaron los análisis de *Bartonella*. A Lynn Osikowicz y Ying Bai por su gran ayuda en el trabajo de laboratorio. También agradezco al Dr. Tony Schountz por ayudarnos en los análisis serológicos de hantavirus.

Esta tesis habría sido imposible de realizar sin la ayuda del gran equipo de Janos. Mis infinitos agradecimientos a: Ana Laura Viguera por ser una gran compañera y amiga quien me ha ayudado y apoyado muchísimo en distintos aspectos de esta investigación. A Adriana Fernández por su grato compañerismo tanto en el campo como en la estancia en el CDC. A Shiara González por su gran entusiasmo en el campo y por darme la oportunidad de sentir la experiencia extrema y casi

imposible de caer a un guardaganado. A Paola Martínez por toda su ayuda y por sus muy ricos tacos de papas que saciaban el hambre en el campo. A Karen Moreno por su amistad menonita y ayuda en el campo. A Andrés Mauricio López por su gran ayuda en la implementación de los encierros del experimento y por ser un fiel compañero de cervezas durante las calurosísimas jornadas de trabajos de campo. A Hugo Mendoza por los buenos momentos compartidos en el campo y por soportarme como asesor. A Jonathan López y Manuel Moguel quienes hicieron muy gratas las salidas de campo que compartimos. Gracias a todos por su amistad.

Para el trabajo de campo también recibí mucha ayuda de Rodrigo Sierra y Eduardo Ponce quienes nos abrieron las puertas de la Estación de Janos. Don Jorge Díaz quien nos ayudó muchísimo en la parte logística, al igual que José Luis García. Muchas gracias a Antonio Esquer por permitirme realizar los encierros del experimento en el Rancho El Uno.

Quiero agradecer enormemente al Grupo de Ecología de Enfermedades de la FMVZ quienes han sido excelentes compañeros, de los cuales he aprendido mucho y que han hecho mi estadía en México muy agradable. En especial quiero agradecer a María José Tolsá, quien fue la primera compañera del grupo que conocí y desde siempre hemos compartido con mucho entusiasmo nuestra pasión por la ecología de enfermedades.

Agradezco a mi Padre que siempre me ha apoyado con muchas ganas mi interés por la ciencia y la investigación y ha sido un ejemplo a seguir.

Agradezco a mi suegra Angélica por estar siempre dispuesta a ayudar y apoyar desde la distancia y en sus viajes a México.

A Daniela, mi compañera de vida, por todo su amor, paciencia y apoyo. Gracias por acompañarme en esta etapa tan importante para mí.

A mi hijo Julián que llegó el último año del Doctorado y que nos da alegría día a día.

TRABAJOS GENERADOS DE LA TESIS

ARTÍCULOS EN REVISTAS INDIZADAS

Publicados y en prensa:

Rubio AV, Ávila-Flores R, Suzán G. 2014. Responses of small mammals to habitat fragmentation: epidemiological considerations for rodent-borne hantaviruses in the Americas. *EcoHealth* 11: 526-533.

Rubio AV, Ávila-Flores R, Osikowicz LM, Bai Y, Suzán G, Kosoy MY. 2014. Prevalence and genetic diversity of *Bartonella* strains in rodents from northwestern Mexico. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 14: 838-845.

Rubio AV, Viguera-Galván AL, Schountz T, Moreno-Torres K, List R, Sarmiento-Silva RE, Avila-Flores R, Suzán G. Abundance of hantavirus hosts in a landscape with black-tailed prairie dog colonies in northwestern Mexico. *Mammalian Biology* doi: 10.1016/j.mambio.2015.06.004

En preparación:

Rubio AV, Ávila-Flores R, List R, Mills JN, Castro-Arellano I, Suzán G. Inter and intraspecific encounters of a hantavirus reservoir in outdoor enclosures with different rodent diversity.

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| Resumen | IX |
| Abstract | X |
| Introducción | 1 |
| Revisión de Literatura | 4 |
| Capítulo 1. Respuestas de pequeños mamíferos a la fragmentación de hábitat: consideraciones epidemiológicas para hantavirus en América | 10 |
| Capítulo 2. Abundancia de reservorios de hantavirus en un paisaje con colonias de perrito de las praderas de cola negra en el noroeste de México | 21 |
| Capítulo 3. Encuentros intra e interespecíficos de <i>Peromyscus maniculatus</i> en encierros con diferente diversidad de roedores | 27 |
| Capítulo 4. Prevalencia y diversidad genética de cepas de <i>Bartonella</i> en roedores del noroeste de México | 43 |
| Capítulo 5. Prevalencia de <i>Bartonella</i> sp. en roedores y su asociación con la diversidad de especies en el noroeste de México | 52 |
| Discusión General | 65 |
| Referencias | 68 |

ÍNDICE DE CUADROS

Capítulo 1

| | |
|-------------------|----|
| Table 1 | 14 |
| Table appendix S1 | 19 |
| Table appendix S2 | 20 |

Capítulo 2

| | |
|---------|----|
| Table 1 | 24 |
| Table 2 | 24 |

Capítulo 3

| | |
|------------|----|
| Cuadro 3.1 | 32 |
|------------|----|

Capítulo 4

| | |
|---------|----|
| Table 1 | 46 |
| Table 2 | 47 |
| Table 3 | 48 |

Capítulo 5

| | |
|------------|----|
| Cuadro 5.1 | 59 |
|------------|----|

ÍNDICE DE FIGURAS

Capítulo 1

| | |
|----------|----|
| Figure 1 | 14 |
| Figure 2 | 15 |

Capítulo 2

| | |
|----------|----|
| Figure 1 | 23 |
| Figure 2 | 25 |

Capítulo 3

| | |
|------------|----|
| Figura 3.1 | 35 |
| Figura 3.2 | 36 |
| Figura 3.3 | 37 |

Capítulo 4

| | |
|----------|----|
| Figure 1 | 49 |
|----------|----|

RESUMEN

En años recientes ha existido un creciente interés en los estudios acerca de la relación entre la biodiversidad y agentes infecciosos. Esto se debe a que la pérdida de biodiversidad puede ser un factor importante en la aparición de brotes de enfermedades infecciosas emergentes zoonóticas. En esta tesis se examinaron distintas temáticas de la relación entre la diversidad de roedores y prevalencia de patógenos (*Bartonella* spp. y hantavirus) o factores de riesgo que pueden influir en la prevalencia, como la abundancia de reservorios o tasas de encuentro entre reservorios. En el primer capítulo se evaluó las respuestas de pequeños mamíferos a la fragmentación de hábitat en América, la cual permitió concluir que existe un patrón donde las abundancias de reservorios de hantavirus aumentan con la fragmentación y la riqueza de especies disminuye. Ambos efectos pueden aumentar el riesgo de exposición para los humanos (hipótesis del efecto de dilución). En el segundo capítulo, se sugiere que una especie clave para el pastizal del noroeste de Chihuahua (*Cynomys ludovicianus*) puede influir indirectamente en prevenir el aumento en la distribución y abundancia de los reservorios de hantavirus en la zona, debido a que ayuda a evitar la expansión del principal hábitat de las especies reservorios. En el tercer capítulo se encontró que los reservorios de hantavirus en el noroeste de Chihuahua presentan diferencias en patrones de actividad horaria con algunas especies que coexisten con ellos, donde algunas especies presentan mayores actividades al comienzo de la noche, mientras que los reservorios son más activos más tarde en la noche. También se encontraron diferencias en la frecuencia de encuentros interespecíficos entre ciertas especies no reservorios con las especies reservorios. Estos factores (tasas de encuentros, patrones de actividad horaria) pueden influir en las frecuencias de encuentros entre reservorios y potencialmente en la transmisión de hantavirus, aunque en este estudio no se encontró una diferencia entre las frecuencias de encuentros entre reservorios que habitaban en encierros con distinta diversidad de roedores. Los últimos dos capítulos fueron sobre *Bartonella* spp. en roedores del noroeste de Chihuahua. Se encontraron nuevas cepas de *Bartonella* y se encontró una relación negativa entre la prevalencia de *Bartonella* spp. y la diversidad de especies, solamente a una escala regional de análisis, por lo que se sugiere que actúa el efecto de dilución. Finalmente, los resultados obtenidos en esta tesis permiten demostrar que en la zona de estudio la diversidad de roedores o la identidad de ciertas especies pueden ser importantes para la dinámica de transmisión de patógenos o para variables que pueden influir en la prevalencia, como las frecuencias de encuentros o la abundancia de reservorios.

Palabras claves: Chihuahua, efecto de dilución, patógenos zoonóticos, pequeños mamíferos

ABSTRACT

In recent years, there has been an increasing interest about studies on the relationship between biodiversity and infectious agents. This is because biodiversity loss is one of the causes of the recent emerging infectious disease outbreaks. This dissertation examined several topics of the relationship between species diversity and pathogen prevalence (*Bartonella* spp. and hantavirus) or risk factors that may influence prevalence, such as reservoir host abundances or encounter rates between reservoir hosts. The first chapter analyzed small mammals responses to habitat fragmentation in the American continent. There was a pattern where reservoir host abundances generally increase with fragmentation and also species richness decreases. Both effects may increase disease risk exposure to humans, according to the dilution effect hypothesis. Findings from the second chapter suggest that a keystone species from grasslands of northwestern Mexico (*Cynomys ludovicianus*) may indirectly prevent the increase of distribution and abundance of hantavirus reservoir hosts because it helps prevent the expansion of the main habitat of reservoir hosts. In the third chapter, hantavirus reservoir hosts differed from other species in activity patterns, where some species were more active at the beginning of the night, whereas reservoir hosts were more active later in the night. In addition, some species (non-reservoirs) had differences in the frequency of encounters with reservoir hosts. These factors (encounter rates and activity patterns) can influence intraspecific contacts between reservoir hosts, and potentially hantavirus transmission, although no differences in encounter frequencies between reservoir hosts were found among hosts inhabiting enclosures with different degree of rodent diversity. The last two chapters were studies on *Bartonella* spp. in rodents from northwestern Chihuahua. New *Bartonella* strains were found and also there was a negative relationship between *Bartonella* prevalence and rodent diversity, only at a regional scale, suggesting a dilution effect. Finally, this dissertation showed that in the study site, rodent diversity or the identity of certain species can be important for pathogen transmission dynamics or for variables that can influence prevalence, such as encounter frequency or reservoir abundances.

Key words: Chihuahua, dilution effect, rodent-borne pathogens, small mammals

INTRODUCCIÓN

A nivel global existe una continua modificación y pérdida de biodiversidad, lo cual modifica las interacciones entre especies y los procesos ecosistémicos, afectando negativamente los bienes y servicios que provee la biodiversidad al ser humano (Cardinale *et al.*, 2012). A la vez, en las últimas décadas ha existido un creciente número de enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes que afectan al ser humano, las cuales provienen mayoritariamente de los animales (60%) y principalmente de la fauna silvestre (Jones *et al.*, 2008). Debido a que se ha sugerido que una de las causas de esta aparición de enfermedades es la pérdida de biodiversidad (Keesing *et al.*, 2010), últimamente ha existido un creciente interés en las investigaciones acerca de la relación entre la biodiversidad y agentes infecciosos. Las especies hospederas varían entre si en la capacidad de ser infectadas y de transmitir un patógeno, por lo que los cambios en la diversidad de especies afectan la composición y estructura de las comunidades y pueden modificar la transmisión de agentes infecciosos (Keesing *et al.*, 2006; Keesing *et al.*, 2010).

Una mayor biodiversidad puede disminuir (hipótesis del efecto de dilución), aumentar (hipótesis del efecto de amplificación) o no influir en la transmisión de agentes infecciosos entre hospederos silvestres (Keesing *et al.*, 2010; Cardinale *et al.* 2012; Ostfeld & Keesing, 2012). Esto va a depender de las características de los hospederos, así como del tipo de agente y los ecosistemas en que habitan (Wood *et al.*, 2014). El efecto de dilución ocurre cuando hay una relación negativa entre la biodiversidad (diversidad de especies) y la prevalencia del patógeno (a mayor diversidad de especies, menor la prevalencia de infección, e.g. Johnson *et al.*, 2013). Los mecanismos a través del cual actúa este efecto pueden ser la reducción de encuentros entre individuos susceptibles e infectados, la disminución de la densidad de hospederos, o reducción de la sobrevivencia de los hospederos, entre otros (Keesing *et al.*, 2006). Por otro lado, el efecto de amplificación ocurre cuando existe una relación positiva entre la biodiversidad y la prevalencia de un patógeno. Este efecto se produce cuando en una comunidad de especies el aumento de la diversidad aumenta el número de hospederos competentes, los cuales pueden aumentar la

tasa de transmisión y por ende aumentar la prevalencia de un patógeno (Keesing *et al.*, 2006). Se ha sugerido que el efecto de dilución ocurre en diversos ambientes y con diversos patógenos causales de enfermedades zoonóticas como *Borrelia burgdorferi* (enfermedad de Lyme), virus Louping ill (encefalomielitis ovina), hantavirus (síndrome cardiopulmonar por hantavirus), *Leptospira* spp. (leptospirosis), *Schistosoma mansoni* (Schistosomiasis), entre otros (Ostfeld & Keesing, 2000; Gilbert *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2009; Suzán *et al.*, 2009; Derne *et al.*, 2011). Esta evidencia científica ha llevado a considerar el efecto de dilución de la biodiversidad como un servicio ecosistémico para el ser humano, al reducir el riesgo de emergencia o transmisión de ciertos agentes zoonóticos (Ostfeld & Keesing, 2012; Hough, 2014). Sin embargo, algunos investigadores indican que se debe tomar con cautela esta afirmación debido a que consideran que aun falta investigación y evidencia robusta sobre la existencia de una tendencia o un patrón claro de la relación entre la diversidad de especies y la transmisión de patógenos, tanto a nivel de diferentes patógenos como a diferentes escalas locales y regionales (Salked *et al.*, 2013; Hough 2014; Wood *et al.*, 2014).

El objetivo de esta tesis fue estudiar distintas temáticas de la relación entre la diversidad de especies y prevalencia de patógenos (o factores de riesgo que pueden influir en la prevalencia, como la abundancia de reservorios o tasas de encuentro entre reservorios). Para ello se realizaron estudios de meta-análisis, estudios observacionales de campo y experimentales de campo. Los patógenos estudiados fueron los hantavirus y *Bartonella*. Los hantavirus (familia *Bunyaviridae*) son un grupo de virus patógenos cuyos reservorios son roedores y producen fiebres hemorrágicas en el humano en gran parte del mundo (Jonsson *et al.*, 2010). Algunas especies de bacterias del género *Bartonella* son zoonóticas, se transmiten por vectores y los roedores son el principal grupo de mamíferos reservorios (Buffet *et al.*, 2013).

El área de estudio de esta tesis fue la Reserva de la Biósfera de Janos y Municipios aledaños, ubicados en el noroeste de Chihuahua. Esta región presentaba buenas condiciones para realizar este estudio debido a que es un área en la que ya se ha reportado la presencia o anticuerpos de hantavirus y *Bartonella* sp. (Bai *et al.*, 2009; Moreno-Torres *et al.*, en prensa), y geográficamente se encuentra cercana a localidades de Estados Unidos donde se

han reportado reservorios para ambos agentes infecciosos (Yates *et al.*, 2002; Bai *et al.*, 2009). El área de estudio es, además, una zona heterogénea con gran diversidad de roedores y con comunidades de roedores y vegetación contrastantes.

En el Capítulo 1 se realizó un meta-análisis de los efectos de la fragmentación del hábitat sobre la diversidad de pequeños mamíferos y las abundancias de roedores reservorios de hantavirus, con el fin de identificar patrones que puedan implicar riesgos potenciales para la transmisión de éstos patógenos, bajo los supuestos de que la transmisión de hantavirus entre hospederos ocurre bajo el efecto de dilución. En el Capítulo 2 se analizó el efecto de un especie clave de los ecosistemas de pastizales de Norte América (*Cynomys ludovicianus*) sobre las comunidades de roedores, en particular sobre las abundancias de reservorios de hantavirus y la prevalencia de hantavirus en éstos. En el Capítulo 3 se realizó un estudio experimental de campo donde se estudió la influencia de la diversidad de especies sobre las frecuencias de encuentros intra e interespecíficos de un reservorio de hantavirus (*Peromyscus maniculatus*). El Capítulo 4 fue un estudio acerca de la prevalencia y diversidad genética de *Bartonella* en roedores del noroeste de Chihuahua, con el fin de tener información para el Capítulo 5, en el cual se estudió la relación entre la diversidad de roedores y la prevalencia de *Bartonella* sp. Cada Capítulo presenta sus respectivos antecedentes, objetivos e hipótesis.

REVISIÓN DE LITERATURA

1. Enfermedades infecciosas emergentes

Las enfermedades infecciosas emergentes (EIEs) se pueden definir como enfermedades nuevas que han aparecido en una población o que ya han existido previamente, pero están rápidamente aumentando su incidencia o rango geográfico (Morse, 1995). Esta definición comenzó utilizándose para enfermedades que afectan a los seres humanos, pero luego también se acuñó para enfermedades que afectan a animales (domésticos y silvestres), a cultivos agrícolas y plantas silvestres (Daszak & Cunningham, 2002).

Jones *et al.* (2008) realizaron una revisión de todos los eventos de EIEs que afectaron al humano desde 1940 hasta 2004, encontrando un total de 335 eventos, de los cuales un 60.3% eran de patógenos zoonóticos (transmisión animal-humano) y de éstos, el 71.8% provenían de animales silvestres. Los principales agentes infecciosos que producen EIEs son bacterias o rickettsias, seguidas por los virus o priones y después los protozoarios, hongos y helmintos, respectivamente.

El evento clave de la mayoría de las EIEs es un cambio en la ecología hospedero-parásito resultante de actividades antropogénicas, como los cambios en el uso del suelo (e.g. agricultura, ganadería) y la urbanización con su consecuente contaminación, entre otros (Daszak *et al.*, 2000).

Dentro de las EIEs se encuentran los hantavirus y las bacterias del género *Bartonella*, los cuales se estudian en esta tesis. A continuación se presentan antecedentes de estos agentes infecciosos.

1.1. Hantavirus

Los virus ARN del género hantavirus (Familia *Bunyaviridae*) en la actualidad son considerados dentro de los más importantes patógenos zoonóticos transmitidos por roedores (Jonsson *et al.*, 2010). Los hantavirus están ampliamente distribuidos en el mundo y producen dos enfermedades en el humano: la Fiebre Hemorrágica con Síndrome Renal en Europa y Asia con una tasa de mortalidad de 0.1 a 15% (Muranyi *et al.*, 2005; Kariwa *et al.*, 2007) y el Síndrome Pulmonar por Hantavirus en América, con una tasa de mortalidad

de hasta el 40% (Jonsson *et al.*, 2010). Los principales virus en Europa y Asia que causan enfermedad en el humano son Hantaan virus, Dobrava virus, Puumala virus y Seoul virus. En América, son el Sin Nombre virus, Andes virus y Laguna Negra virus (Jonsson *et al.*, 2010). La infección en el humano ocurre por la inhalación de partículas del virus provenientes de la orina o excretas de roedores infectados. Cada hantavirus está asociado a una o pocas especies de roedores (familia *Muridae* o *Cricetidae*), que actúan como reservorios específicos en una región geográfica determinada. El alto grado de correspondencia topológica entre las filogenias de los hantavirus y sus respectivos hospederos indican un alto grado de coespeciación parásito-hospedero (Plyusnin & Morzunov, 2001). La transmisión entre roedores es horizontal y principalmente por contactos agresivos, exposición a la saliva y excretas (Glass *et al.*, 1998; Hinson *et al.*, 2004). La prevalencia y transmisión de hantavirus puede estar regulada o influenciada por diversos factores que pueden aumentar el éxito reproductivo y/o las densidades poblacionales y por ende, la transmisión entre hospederos: (1) ambientales, como el clima y el alimento, donde un aumento de lluvias incrementa los recursos alimenticios. (2) antropogénicos (e.g. cambios en el uso de suelo); (3) genéticos (variación entre individuos o poblaciones), (4) conductuales (e.g. selección de hábitat), y (5) fisiológicos (e.g. inmunosupresión asociado a estrés) (Mills, 2005).

1.1.2. Hantavirus en América

En el año 1993 se registró un brote de una enfermedad respiratoria en la región de Four Corners en el suroeste de EUA, dando como resultado la mortalidad del 70% de los pacientes afectados. El agente etiológico responsable de este brote fue un hantavirus nombrado posteriormente como “Sin Nombre Virus” y se le denominó a la enfermedad como Síndrome Pulmonar por Hantavirus (Nichol *et al.*, 1993). El principal reservorio de este hantavirus es el *Peromyscus maniculatus* (Childs *et al.*, 1994). Desde ese episodio, se han reportado brotes de Síndrome Pulmonar por hantavirus en Centro y Sudamérica (Toro *et al.*, 1998, Vincent *et al.*, 2000). Actualmente se han encontrado más de 40 genotipos de hantavirus en América, de los cuales alrededor de 20 se sabe que producen enfermedad en humanos (Hjelle & Torres-Pérez, 2010).

En México se han descrito 4 hantavirus en roedores: El Moro Canyon virus, Playa de Oro virus, Limestone Canyon virus y el Sin Nombre virus (Hjelle *et al.*, 1995, Mantooth *et al.*, 2001, Chu *et al.*, 2008, Milazzo *et al.*, 2012). Además, tres posibles nuevos hantavirus se han descrito recientemente: Carrizal virus, Huitzilac virus y Montano virus (Kariwa *et al.*, 2012). Sin embargo, estas cepas pueden ser consideradas miembros de otros hantavirus descritos en México anteriormente (Milazzo *et al.*, 2012). De todos estos virus, solamente el Sin Nombre virus se sabe que causa enfermedad en los humanos. Se han realizado varios estudios serológicos de hantavirus en México, donde se han encontrado roedores positivos en los siguientes estados: Chiapas, Colima, Chihuahua, Distrito Federal, Estado de México Hidalgo, Jalisco, Morelos, Oaxaca, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán y Zacatecas (Mantooth *et al.*, 2001, Suzán *et al.*, 2001, Chu *et al.*, 2008, Castro-Arellano *et al.*, 2009, Milazzo *et al.*, 2012, Arellano *et al.*, 2012, Kariwa *et al.*, 2012, Moreno-Torres *et al.*, En prensa). Si bien no hay reportes de Síndrome Pulmonar por hantavirus a la fecha en México (Vázquez-Pérez *et al.*, 2012), existen reportes de humanos seropositivos a hantavirus en Colima, Chihuahua, Distrito Federal, Guanajuato, Hidalgo y Yucatán (Flores & Morales, 2001, Vado-Solís *et al.*, 2003).

1.2. *Bartonella*

El género *Bartonella* son un grupo de bacterias Gram-negativas que parasitan el endotelio y células rojas de los mamíferos. Se transmiten a los hospederos mediante vectores, principalmente pulgas (Gutiérrez *et al.*, 2015). En los últimos años estas bacterias han sido de preocupación para la salud pública (Breitschwerdt *et al.*, 2010). Actualmente existen 33 especies de *Bartonella* y los roedores están asociados a 20 de éstas (Buffet *et al.*, 2013). Las especies de *Bartonella* de roedores que causan enfermedad en el humano son *B. tribocorum* y *B. elizabethae* (distribuidas mundialmente); *B. grahamii*, *B. rochalimae* y *B. washoensis* (en el hemisferio norte), y *B. vinsonii subsp. arupensis* (en Norte América) (Daly *et al.*, 1993, Kerkhoff *et al.*, 1999, Welch *et al.*, 1999, Kosoy *et al.*, 2003, 2010). Los síntomas y manifestaciones clínicas son fiebre, miocarditis, endocarditis, linfadenitis, entre otros (Kaiser *et al.*, 2011).

1.2.1. *Bartonella* en roedores de América

La mayoría de los estudios acerca de *Bartonella* spp., en roedores en América han sido realizados en Estados Unidos y Canadá (Gutiérrez *et al.*, 2015). Estos se enfocan principalmente en estudios ecológicos, epidemiológicos y filogenéticos (e.g. Jardine *et al.*, 2005, 2006, Bai *et al.*, 2007, Morway *et al.*, 2008, Gundi *et al.*, 2012). En Sudamérica, sólo se han realizado dos estudios (Gutiérrez *et al.*, 2015), uno en Perú (Birtles *et al.*, 1999) y el otro en Brasil (Costa *et al.*, 2014). En México, existe un estudio donde encontraron roedores positivos a *Bartonella* sp. en el noroeste de Chihuahua y otro en el estado de Sonora donde encontraron pulgas de roedores positivas a distintas cepas de *Bartonella* (Zapata, 2012). Aparte de esta tesis (ver Capítulo 4), no se han realizado otros estudios que reporten las diferentes cepas de *Bartonella* en roedores mexicanos.

2. Biodiversidad y dinámica de agentes infecciosos

Debido a que muchos patógenos zoonóticos provienen y se transmiten desde la fauna silvestre (Jones *et al.*, 2008), en los últimos años ha existido un gran interés en el estudio de la biodiversidad y su relación con agentes infecciosos, tanto zoonóticos como agentes que afectan a la vida silvestre. Dentro de esta temática, basado en estudios empíricos y teóricos, se definieron dos fenómenos de los efectos de la biodiversidad sobre la prevalencia de patógenos, los que pueden influir en el riesgo de infección en los seres humanos o en la vida silvestre (Keesing *et al.*, 2006). El primero, denominado “efecto de dilución” (ED), ocurre cuando hay una relación negativa entre la biodiversidad y la prevalencia del patógeno (a mayor biodiversidad, menor la prevalencia de infección), mientras que el “efecto de amplificación” (EA) es el efecto contrario, donde la biodiversidad aumenta la prevalencia de los patógenos (Keesing *et al.*, 2006).

En una revisión de Ostfeld y Keesing (2012), se indica que existen más trabajos que sugieren el ED que el EA. Encuentran 30 artículos sobre evidencias del ED en animales, versus solamente 2 sobre EA. En patógenos de plantas, encontraron 91 sobre el ED y 16 trabajos sobre EA. Los primeros estudios sobre el ED fueron realizados en el noreste de Estados Unidos, con la bacteria *Borrelia burgdorferi*, que produce la enfermedad de Lyme en humanos (LoGiudice *et al.*, 2003). Posteriormente, se ha sugerido que este fenómeno

ocurre en diversos ecosistemas y diversos patógenos (Keesing *et al.*, 2010; Ostfeld & Keesing, 2012). Por ejemplo, en patógenos transmitidos por vectores como el virus del Oeste del Nilo, Malaria y *Bartonella* (Ezenwa *et al.*, 2006; Carlson *et al.*, 2009; Kedem *et al.*, 2014, pero ver Kilpatrick *et al.*, 2006) y patógenos de transmisión directa como hantavirus, hongo quítrido, *Leptospira*, *Mycobacterium bovis*, entre otros (e.g. Suzán *et al.*, 2009; Derne *et al.*, 2011; Searle *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2013).

Los mecanismos por los cuales pueden actuar el ED o el EA se deben básicamente a 2 variables (Keesing *et al.*, 2006): (1) cambios en las abundancias de los hospederos o vectores. Por ejemplo, al aumentar la diversidad de especies, esto hace que disminuya las abundancias o densidades de los reservorios de un patógenos determinado, lo que puede aumentar la transmisión del patógeno. Por el contrario, si el patógeno es multi-hospedero, el aumento de la diversidad de especies puede aumentar las abundancias de los reservorios. (2) Cambios en las conductas de los hospederos o vectores. Por ejemplo, un aumento en la diversidad de especies puede disminuir las tasas de contacto entre reservorios de un patógeno de transmisión directa, lo que puede llevar a una disminución de la transmisión y prevalencia. Los cambios en abundancias o conductas de los hospederos o vectores pueden ser influenciados por los cambios en la diversidad de especies de un mismo nivel de la cadena trófica (e.g. diversidad de roedores) o también por cambios en la diversidad de especies de otros niveles, por ejemplo, depredadores que influyen en las abundancias de hospederos (al depredarlos) o modificando las conductas de los hospederos (e.g. cambios en los patrones de actividad, reducción o aumento en sus movimientos) (Keesing *et al.*, 2006; Keesing *et al.*, 2010).

Algunos investigadores indican que se debe tomar con cautela la afirmación de que el ED es frecuente en distintos patógenos y ecosistemas, debido a que consideran que aun falta investigación y evidencia robusta sobre la existencia de una tendencia o un patrón claro de la relación entre la diversidad de especies y la transmisión de patógenos (Salked *et al.*, 2013; Hough 2014; Wood *et al.*, 2014). Salked *et al.* (2013) realizaron un meta-análisis sobre datos de estudios del ED en patógenos zoonóticos como hantavirus, enfermedad de lyme y virus del Oeste del Nilo, y concluyen que el efecto de dilución es un fenómeno local (que depende de la composición de los reservorios y su ecología), más que un patrón

general de la biodiversidad a nivel mundial. Wood *et al.* (2014), sugieren que los estudios del ED se han enfocado en pocos patógenos, y que en la mayoría de los patógenos zoonóticos ocurriría más frecuentemente el efecto de amplificación, dado las características de éstos (e.g. ciclos de vida, multi-hospederos).

2.1. Biodiversidad, hantavirus y *Bartonella*

Los hantavirus han sido de los patógenos que más se han estudiado en cuanto a la relación de la biodiversidad y la prevalencia de infección, donde los 13 estudios actuales sobre este tema sugieren una relación negativa de la diversidad de especies con la prevalencia de infección, consistente con el ED (Khalil *et al.*, 2014). Estos estudios se han realizado en Europa (Puumala virus), Norte América (Sin Nombre virus), Centro América (Choclo y Calabazo virus) y Sudamérica (Andes virus) (e.g. Tersago *et al.*, 2008; Clay *et al.*, 2009; Suzán *et al.*, 2009; Piudo *et al.*, 2011; Carver *et al.*, 2011; Voutilainen *et al.*, 2012). Los estudios anteriores se han enfocado en asociar a la prevalencia de hantavirus con la diversidad de especies en comunidades de roedores. Por otro lado, Orrok *et al.* (2011) sugieren además que la riqueza de depredadores también puede influir en la prevalencia de Sin Nombre virus en islas de California.

Tres estudios en Asia, Europa y Norte América han indicado que la adición de especies de roedores en un sistema, o ambientes con una mayor riqueza o diversidad de roedores disminuyen la prevalencia de ciertas cepas de *Bartonella*, actuando el ED (Telfer *et al.*, 2005; Bai *et al.*, 2009; Kedem *et al.*, 2014). Además, un estudio reciente indica que la remoción de grandes herbívoros en el Este de África (cebras, gacelas, elefantes, etc.), aumentan la abundancia de roedores reservorios infectados con *Bartonella* spp. (Young *et al.*, 2014). Los autores sugieren que el efecto de la remoción de grandes herbívoros sobre las poblaciones de roedores reservorios y la transmisión de *Bartonella* spp. se puede deber a una regulación de los reservorios de forma directa (competencia por recursos) y de forma indirecta (cambios en las estructuras vegetales que podrían afectar la preferencias de hábitat de los roedores). Este estudio abre nuevas formas de estudiar la importancia de la biodiversidad en las dinámicas de patógenos.

CAPÍTULO 1

RESPUESTAS DE PEQUEÑOS MAMÍFEROS A LA FRAGMENTACIÓN DE HÁBITAT: CONSIDERACIONES EPIDEMIOLÓGICAS PARA HANTAVIRUS EN AMÉRICA

Original Contribution

Responses of Small Mammals to Habitat Fragmentation: Epidemiological Considerations for Rodent-Borne Hantaviruses in the Americas

André V. Rubio,¹ Rafael Ávila-Flores,² and Gerardo Suzán¹

¹Departamento de Etología, Fauna Silvestre y Animales de Laboratorio, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, C.P. 04510 Mexico, Distrito Federal, Mexico

²División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Km 0.5 Carretera Villahermosa-Cárdenas, C.P. 86039 Villahermosa, Tabasco, Mexico

Abstract: Rodent-borne hantaviruses are a group of zoonotic agents that cause hemorrhagic fever in humans. The transmission of hantaviruses among rodent hosts may be higher with the increase of reservoir host abundance in a given area (density-dependent transmission) and with the decrease of small mammal diversity (dilution effect phenomenon). These population and community parameters may be modified by habitat fragmentation; however, studies that focus on fragmentation and its effect on hantavirus infection risk are scarce. To further understanding of this issue, we assessed some population and community responses of rodents that may increase the risk for hantavirus transmission among wildlife hosts in the Americas. We conducted a meta-analysis of published studies to assess the responses of small mammals to fragmentation of native habitats, relative to patch size. Our analyses included five countries and 14 case studies for abundance of reservoir hosts (8 species) and 15 case studies for species richness. We found that a reduction of patch area due to habitat fragmentation is associated with increased reservoir host abundances and decreased small mammal richness, which is mainly due to the loss of non-host small mammals. According to these results, habitat fragmentation in the Americas should be considered as an epidemiological risk factor for hantavirus transmission to humans. These findings are important to assess potential risk of infection when fragmentation of native habitats occurs.

Keywords: disease risk, emerging infectious diseases, meta-analysis, patch size effect, rodents, zoonosis

INTRODUCTION

Rodents, the most diverse order of mammals, are involved in the transmission of several zoonotic pathogens. In recent

Electronic supplementary material: The online version of this article (doi:10.1007/s10393-014-0944-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Published online: May 21, 2014

Correspondence to: André V. Rubio, e-mail: airubio@uc.cl

years, diseases caused by hantaviruses (family *Bunyaviridae*, genus *Hantavirus*) have emerged as some of the most important rodent-borne zoonoses (Jonsson et al. 2010). These globally widespread viruses are the etiological agents of hemorrhagic fever with renal syndrome in Eurasia (Old World hantaviruses) and hantavirus pulmonary syndrome in the Americas (HPS; New World hantaviruses) (Jonsson et al. 2010). To date, more than 40 genotypes of hantaviruses have been reported in the Americas, from which 20

are associated with diseases in humans (Hjelle and Torres-Pérez 2010).

The expansion of human activities at expenses of natural environments (deforestation, agriculture, urbanization, etc.) may result in changes in hantavirus infection dynamics, sometimes creating conditions for the emergence of rodent-borne hemorrhagic fevers (e.g., Lee et al. 1980; Zeitz et al. 1995; Yahnke et al. 2001; Ruedas et al. 2004; Dearing and Disney 2010). The change of rodent community structure in human-dominated landscapes could be an important driver of these outbreaks, mainly because of two factors: (1) the increase of reservoir host abundance, as there is evidence that several hantaviruses are horizontally transmitted in a density-dependent manner (Niklasson et al. 1995; Mills et al. 1999; Madhav et al. 2007); and (2) the decrease of small mammal diversity, as hantaviruses may increase their infection prevalence in rodent hosts inhabiting species-poor communities, a phenomenon called dilution effect (Keesing et al. 2006). This phenomenon, originally described for vector-borne pathogens (Keesing et al. 2006), is suggested to occur in some Old World and New World hantaviruses such as Choclo virus, Puumala virus, and Sin Nombre virus (Tersago et al. 2008; Clay et al. 2009; Disney and Ruedas 2009; Suzán et al. 2009; Carver et al. 2011a; Voutilainen et al. 2012). Furthermore, both driving factors could operate synergistically to influence disease transmission among hosts.

Habitat fragmentation is a worldwide phenomenon that modifies the composition and structure of communities (Fahrig 2003). Frequently, habitat fragmentation tends to simplify communities: whereas generalist species (those that have a high adaptability to a wide range of habitats and food sources) become dominant, specialist species tend to reduce their abundance and richness (Ewers and Didham 2006). However, this pattern does not always occur (Fahrig 2003). Because the most competent hosts of hantaviruses are expected to have generalist habits (Dearing and Disney 2010), habitat fragmentation should increase the abundance of reservoir hosts. Consequently, and in agreement with the dilution effect hypothesis and the density-dependent transmission, hantavirus prevalence in reservoir hosts should increase in fragmented landscapes. However, in spite of the wide geographic distribution of different hantaviruses in the Americas and the widely distributed phenomenon of habitat fragmentation, very few studies have empirically analyzed the relationships between fragmentation and hantavirus prevalence and/or population and community parameters of small mammals that

may influence hantavirus dynamics. In two studies, fragmentation increased hantavirus (Sin Nombre virus) prevalence in the reservoir host (*Peromyscus maniculatus*) in North America (Langlois et al. 2001; Mackelprang et al. 2001). In another study, the abundance of *Oligoryzomys fulvescens* and *Zygodontomys brevicauda* (reservoir hosts of Choclo and Calabazo virus) increased (while the diversity of small mammals decreased) at the edge of tropical forest fragments in Panama (Suzán et al. 2008). Further information is needed to establish the direction, strength, and generalization of the relationships between habitat fragmentation and the risk of hantavirus infection in the Americas.

In this study, we assessed the general effect of habitat fragmentation on species richness of the rodent communities, and population abundance of reservoir hosts that are involved in hantavirus dynamics. We hypothesized that fragmentation of native habitats is associated with a reduction in species richness and an increase in the abundance of hantavirus reservoirs. To test this hypothesis, we conducted a meta-analysis of published studies concerning the responses of non-volant small mammals (rodents and marsupials) to habitat fragmentation in the Americas. We discussed the potential implications of our findings in relation to the epidemiological risk for hantavirus transmission to humans.

METHODS

Data Collection

We searched scientific publications in the Web of Science and Scopus databases to track original research articles focused on small mammal assemblages in fragmented habitats, published from 1985 to 2012. We used a combination of key words: “fragmentation*,” “small mammal*,” “rodent*,” and the genus names of hantavirus reservoirs in the Americas according to Jonsson et al. (2010). Articles included could either report on observational or experimental studies. We evaluated the effects of fragmentation of native habitats relative to patch size, not relative to edge effects or the degree of isolation (e.g., Markl et al. 2012; Vargas et al. 2012). Therefore, articles included in the analysis had to report comparisons of native fragment remnants of different sizes or comparisons of native fragments versus continuous native habitats. If a study made paired comparisons of patch sizes separately (e.g., small vs. large and medium vs. large patches), we only used the

outcomes resultant from the comparisons between the smallest and the largest patches (Markl et al. 2012). Then, the following information was recorded for each reference: (1) abundance of reservoir hosts (at species level); (2) abundance of small mammal species that are not hantavirus reservoirs (non-host, hereafter); (3) species richness (cumulative number of small mammal species); (4) original biome at the study area (e.g., Mediterranean ecosystems, temperate forests, tropical forests, deserts, etc.); (5) sample size; and (6) statistical results, if possible. Non-host small mammals were considered the species belonging to genera that are not reported as hantavirus reservoir hosts by Jonsson et al. (2010); data for non-host species were included only in articles that had at least one reservoir host. If there was more than one article with the same study area, we selected the one that had a larger sample size, and/or a longer sampling period. Each comparison was considered an independent case study and articles might be comprised of more than one comparison. For example, whenever there was more than one reservoir species in the same study, each of them was considered an independent case study.

Data Analysis

To measure whether there was a pattern (increase or decrease) of change in abundance and species richness in response to habitat fragmentation (patch size reduction), we calculated the effect sizes (ESs) to perform the meta-analysis. Correlation coefficient r was calculated for each entry in the database, which we then converted into Fisher's z transform, a measure of ES (Rosenberg et al. 2000). When a study did not report a correlation coefficient, we estimated r from other statistical data such as F , t , and P (Rosenberg et al. 2000), or from raw data when articles included them. Confidence intervals (CIs) of ES were estimated from the ES and their variances through bootstrap re-sampling procedures (999 iterations) (Rosenberg et al. 2000), using random-effect models as we assumed ES varied randomly among comparisons (Gurevitch and Hedges 2001). A negative ES indicates that abundance or richness decrease with fragmentation, while positive ES indicates that abundance or richness increase with fragmentation.

Data were grouped into categories (e.g., climate, genera, species) to detect patterns in the response to fragmentation depending on ecological or taxonomic attributes. We only performed comparisons when sample

size of ESs were ≥ 5 in each group. Heterogeneity of ES within and between groups was examined with Q statistics (Hedges and Olkin 1985). This test is analogous to an ANOVA, testing whether the variance of ES is greater than expected by chance alone (Rosenberg et al. 2000).

As a complement to the ES analysis of species richness, we used two-proportion Z test to compare the proportion of reservoir hosts (plus species that belong to the same genus) and non-host species that were absent in either small fragments or continuous habitat (or larger fragments). In case the meta-analysis showed that species richness decreased in smaller fragments, we identified which species were lost in small fragments, but that were present in large fragments or continuous habitat. In case richness increased in small fragments, we identified which species were absent in large fragments or continuous habitat.

We considered the possibility of publication bias because the probability of publication of a given study increases if it reports significant results (Arnqvist and Wooster 1995). Publication bias was assessed through Kendall's Tau and Spearman rank correlation tests (Rosenberg et al. 2000). In addition, we used the Rosenthal fail-safe method to estimate the number of null results that would need to be added to the meta-analysis to nullify its overall ES (Rosenthal 1979). All meta-analyses were performed in the meta-analytic software MetaWin version 2.0 (Rosenberg et al. 2000).

RESULTS

Our final database included 19 papers reporting quantitative information satisfying our criteria for the meta-analysis (see Supplementary material, Appendix S1), and they included studies conducted in five countries (Brazil, Chile, Canada, USA, and Venezuela). Thirteen papers were used for the analysis of reservoir host abundance (including eight species) and seven papers for non-host species. From these articles, 14 independent case studies were analyzed for abundance of reservoir hosts (Table 1) and 30 for non-host species (see Supplementary material, Appendix S2). Fourteen papers were used for the analysis of species richness, comprising 15 independent case studies. Ten articles reported data on species that disappeared in small fragments.

We found that a reduction of habitat patch size by habitat fragmentation had a significant positive effect in the overall ES for abundance of reservoir hosts, with an average

Table 1. Hantavirus reservoir hosts analyzed in this study, and their respective hantavirus strain and distribution, according to Jonsson et al. 2010

| Hantavirus reservoir hosts | Country of study | Number of cases | Hantavirus strain | Geographic distribution of virus |
|-----------------------------------|------------------|-----------------|---|----------------------------------|
| <i>Akodon montensis</i> | Brazil | 1 | Ape Aime virus, Jaborá virus, Juquitiba-like virus* | Brazil, Paraguay |
| <i>Microtus pennsylvanicus</i> | USA | 1 | Prospect Hill virus | Maryland |
| <i>Oligoryzomys longicaudatus</i> | Chile | 1 | Andes virus*, Oran virus* | Argentina and Chile |
| <i>Oligoryzomys nigripes</i> | Brazil | 1 | Itapúa virus, Juquitiba virus*, Juquitiba-like virus* | Brazil, Paraguay |
| <i>Peromyscus leucopus</i> | USA | 3 | Monongahela virus*, New York virus* | North America |
| <i>Peromyscus maniculatus</i> | Canada, USA | 3 | Sin Nombre virus* | North America |
| <i>Rattus rattus</i> | Chile, USA | 3 | Gou virus, Seoul virus* | China, Worldwide |
| <i>Zygodontomys brevicauda</i> | Venezuela | 1 | Calabazo virus | Panama |

* Hantavirus strains known to produce disease in humans.

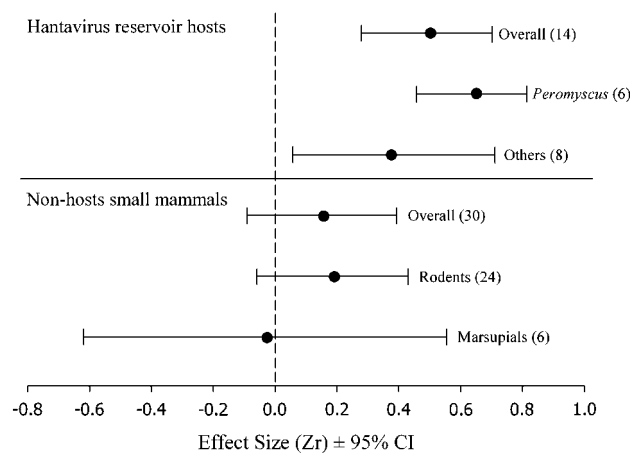


Figure 1. Effect sizes $\pm 95\%$ CI of small mammal abundances (hantavirus reservoir host and non-host small mammals) associated with patch size reduction. Sample size of effect sizes are shown in parentheses. The vertical dashed line indicates the 0 value. Effects are statistically significant when the 95% CI of effect sizes do not overlap with 0.

ES of 0.51 (IC 0.29–0.70) (Fig. 1). Only the species of the genus *Peromyscus* (*Peromyscus leucopus* and *P. maniculatus*) had a sample size ≥ 5 ; therefore, two groups were formed: *Peromyscus* species and the rest of reservoir species. Habitat fragmentation had a significant positive effect for both groups (Fig. 1), and the groups did not differ significantly in their response to fragmentation ($Q_{\text{within}} = 12$; $P = 0.44$; $Q_{\text{between}} = 1.9$; $P = 0.17$). In contrast, abundance of non-host species did not present a significant effect, either for the overall ES or in separate groups (rodents or marsupials) (Fig. 1). Groups did not differ in heterogeneity of ES ($Q_{\text{within}} = 25.9$; $P = 0.6$; $Q_{\text{between}} = 0.4$; $P = 0.5$).

Habitat fragmentation had a significant negative effect on total species richness, with an average ES of -0.46 (IC -0.72 to -0.20) (Fig. 2). Only rodent communities in tropical forests had a sample size ≥ 5 ; therefore, two groups were formed: tropical forests and all other biomes (Mediterranean ecosystems, temperate forests, and boreal forests). Both groups had a significant negative response to habitat fragmentation (Fig. 2). No significant heterogeneity was found between ES of groups ($Q_{\text{within}} = 13.7$; $P = 0.4$; $Q_{\text{between}} = 0.002$; $P = 0.97$). The decrease of species richness in small fragments is mainly due to the loss of non-host small mammals, as 78% of species expected in the

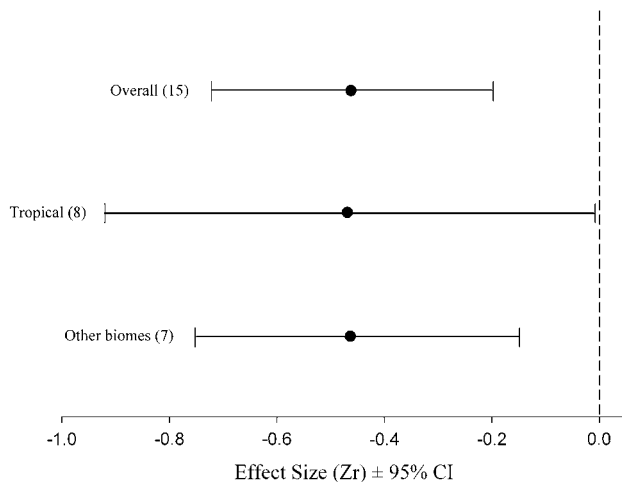


Figure 2. Effect sizes $\pm 95\%$ CI of small mammal richness associated with patch size reduction. Sample size of effect sizes are shown in parentheses. “Other biomes” include Mediterranean ecosystem ($n = 3$), temperate forest ($n = 2$), and boreal forest ($n = 2$). The interpretation of graph is the same as found in Fig. 1.

habitat that were absent in small fragments were non-host species ($n = 37$; $Z = 3.45$; $P < 0.001$).

No publication bias was detected in data used on the assessment of overall ES, either for reservoir host abundance (Kendall’s Tau = 0.19; $P = 0.34$; Spearman $R_s = 0.27$; $P = 0.36$) or small mammal richness (Kendall’s Tau = -0.05 ; $P = 0.80$; Spearman $R_s = -0.04$; $P = 0.88$). Rosenthal’s fail-safe numbers also suggested no bias among study cases. Under this criterion, at least 146 non-significant study cases for reservoir host abundance, and 145 for species richness would need to be added to the analysis to change results from significant to nonsignificant.

DISCUSSION

The meta-analysis showed that there were significant changes in reservoir host abundances (positive ES) and total species richness (negative ES) associated with fragmentation of native habitats, in agreement with our hypothesis. The results of publication bias analyses suggest that the above results were not the result of publication bias. According to the model of density-dependent transmission, an increase in the abundance of hosts associated with fragmentation should increase the risk of hantavirus transmission, given that it may increase interactions among reservoir hosts, resulting in an increase of infected animals (Dobson and Hudson 1995; Begon et al. 2002). Several studies have provided evidence supporting a positive rela-

tionship between host density and hantavirus infection prevalence (e.g., Niklasson et al. 1995; Escutenaire et al. 1997; Olsson et al. 2002). In the Americas, this finding have been reported particularly for Sin Nombre virus, including the delayed density-dependence phenomenon (Mills et al. 1999; Yates et al. 2002; Madhav et al. 2007; Carver et al. 2011b), which is a time lag between increases in population density and increases in infection prevalence in host populations. However, because some studies have reported no relationship or an inverse relationship between host densities and hantavirus prevalence (Boone et al. 1998; Abbott et al. 1999; Douglass et al. 2001), the density-dependence transmission in hantavirus is not a clear pattern.

Some of the species analyzed here are involved in the transmission of hantaviruses that cause diseases of concern for humans. For example, *P. leucopus* and *P. maniculatus* are implicated in the transmission of three hantaviruses that cause HPS in North America (Table 1). Other important reservoir hosts included in the analysis were *Akodon montensis*, *Oligoryzomys longicaudatus*, and *Oligoryzomys nigripes*, which transmit hantaviruses that cause HPS in Argentina, Chile, and Brazil (Table 1). The invasive *Rattus rattus* is another hantavirus reservoir host that has relevance for public health due to the several zoonotic diseases that it can transmit, such as the worldwide-distributed Seoul virus (Wang et al. 2000). There are reports of *R. rattus* infected with New World hantaviruses, including Andes virus (Lobos et al. 2005), which might increase the epidemiological risk associated with this species.

Regarding non-host small mammals, we did not find any significant patterns, which may be a consequence of the broad range of ecological traits associated with species included in this group. However, when species richness decreases in response to fragmentation, the non-host species are the ones that tend to disappear as fragment size decreases. Therefore, a decrease in species diversity may increase the probability of hantavirus transmission among individual hosts (Tersago et al. 2008; Clay et al. 2009; Suzán et al. 2009; Carver et al. 2011a), in agreement with the dilution effect hypothesis (Keasing et al. 2006; Ostfeld and Keasing 2012). The increase in reservoir host abundance and the decrease in species richness may act synergistically to increase prevalence in rodent hosts, in turn increasing the threat of transmission to humans.

Assessing general patterns of small mammal communities by using approaches such as meta-analysis produces valuable information for understanding the effects of hu-

man disturbances on the dynamics of prevalence in host species and potential pathogen transmission. Although this study only addressed one component of habitat fragmentation, other features associated with fragmented landscapes such as degree of isolation between patches, edge effect, and matrix composition, have important consequences for the structure of wildlife communities (Pardini 2004; Debinski 2006; Prugh et al. 2008; Brady et al. 2011). Therefore, these variables may also influence the transmission dynamics and risk of hantavirus infection in humans (Suzán et al. 2012). Further studies should verify if the increase of reservoir host abundance and decrease of small mammal diversity due to habitat fragmentation result in an increase of hantavirus infection prevalence in reservoir hosts in different geographic regions.

Recently, new geographic locations of hantavirus detection and novel hantaviruses are being described in the Americas (Cruz et al. 2012; Kariwa et al. 2012; Matheus et al. 2012) and in other parts of the world (Blasdel et al. 2011; Zhang et al. 2011; Guo et al. 2013). Because changes in natural environments due to human activities will continue occurring on a large scale, modifying biodiversity composition (Brooks et al. 2002; Myers et al. 2013), and because contrasting results have been reported on the effects of human disturbance on hantavirus dynamics (Dearing and Disney 2010), more investigation is necessary to understand the relationships between hantaviruses, their hosts, and the environment.

CONCLUSION

In conclusion, the increase in reservoir host abundance and the decrease in small mammal richness are general patterns associated with habitat fragmentation in several areas in the Americas. Our findings support the claim that habitat fragmentation has the potential to increase epidemiological risk of hantavirus transmission among hosts in the Americas, under the assumptions that hantavirus transmission is generally influenced by the abundance of reservoir hosts (density-dependence transmission) and/or the diversity of small mammal communities per se (the dilution effect phenomenon). Despite the study's limitation of including data for only eight reservoir species of hantaviruses, some of the included species are of epidemiological importance because they are known to transmit relevant hantavirus strains to humans. To our knowledge, this is the first meta-analysis that addresses the responses of small mammals to

habitat fragmentation applied to epidemiological risk assessments. Given that the effects of human disturbance on wildlife communities can modify the dynamics of zoonotic diseases in reservoir hosts, our results are important to consider in assessing disease risk resulting from fragmentation of native habitats.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Disease Ecology Group (FMVZ, UNAM), Gerardo Ceballos, Rurik List, Catherine Machalaba, and two anonymous reviewers for comments and suggestions that improved this manuscript, and the Postgraduate Program (FMVZ, UNAM) for support. We are grateful to Carolyn Brown and Kendra Shannon (UNAM-Canada) for reviewing the English of an early version of this manuscript. A.V. Rubio is supported by a CONICYT Becas-Chile Scholarship.

REFERENCES

- Abbott KD, Ksiazek TG, Mills JN (1999) Long-term hantavirus persistence in rodent populations in central Arizona. *Emerging Infectious Diseases* 5:102–112
- Arnqvist G, Wooster D (1995) Meta-analysis: synthesizing research findings in ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution* 10:236–240
- Begon M, Bennett M, Bowers R, French N, Hazel S, Turner J (2002) A clarification of transmission terms in host-microparasite models: numbers, densities and areas. *Epidemiology and Infection* 129:147–153
- Blasdel K, Cosson JF, Chaval Y, Herbreteau V, Douangboupha B, Jittapalpong S, et al. (2011) Rodent-borne hantaviruses in Cambodia, Lao PDR, and Thailand. *EcoHealth* 8:432–443
- Boone JD, Otteson EW, McGwire KC, Villard P, Rowe JE, St Jeor SC (1998) Ecology and demographics of hantavirus infections in rodent populations in the Walker River Basin of Nevada and California. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 59:445–451
- Brady MJ, McAlpine CA, Possingham HP, Miller CJ, Baxter GS (2011) Matrix is important for mammals in landscapes with small amounts of native forest habitat. *Landscape Ecology* 26:617–628
- Brooks TM, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Da Fonseca GA, Rylands AB, Konstant WR, et al. (2002) Habitat loss and extinction in the hotspots of biodiversity. *Conservation Biology* 16:909–923
- Carver S, Kuenzi A, Bagamian KH, Mills JN, Rollin PE, Zanto SN, et al. (2011) A temporal dilution effect: hantavirus infection in deer mice and the intermittent presence of voles in Montana. *Oecologia* 166:713–721
- Carver S, Trueax JT, Douglass R, Kuenzi A (2011) Delayed density-dependent prevalence of Sin Nombre virus infection in deer

- mice (*Peromyscus maniculatus*) in central and western Montana. *Journal of Wildlife Diseases* 47:56–63
- Clay CA, Lehmer EM, Jeor SS, Dearing MD (2009) Sin Nombre virus and rodent species diversity: a test of the dilution and amplification hypotheses. *PLoS One* 4:e6467
- Cruz CD, Forshey BM, Vallejo E, Agudo R, Vargas J, Blazes DL, et al. (2012) Novel strain of Andes virus associated with fatal human infection, central Bolivia. *Emerging Infectious Diseases* 18:750–757
- Debinski DM (2006) Forest fragmentation and matrix effects: the matrix does matter. *Journal of Biogeography* 33:1791–1792
- Dearing MD, Dizney L (2010) Ecology of hantavirus in a changing world. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1195:99–112
- Dizney LJ, Ruedas LA (2009) Increased host species diversity and decreased prevalence of Sin Nombre virus. *Emerging Infectious Diseases* 15:1012–1018
- Dobson AP, Hudson PJ (1995) Microparasites: Observed patterns in wild animal populations. In: *Ecology of Infectious Diseases in Natural Populations*, Grenfell BT, Dobson A (editors), Cambridge: Cambridge University Press, pp 52–89
- Douglass RJ, Wilson T, Semmens WJ, Zanto SN, Bond CW, Van Horn RC, et al. (2001) Longitudinal studies of Sin Nombre virus in deer mouse-dominated ecosystems of Montana. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 65:33–41
- Escutenaire S, Thomas I, Clement J, Verhagen R, Chalon P, Pastoret PP (1997) Hantavirus epidemiology in red bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Annales de Médecine Veterinaire* 141:471–476
- Ewers RM, Didham RK (2006) Confounding factors in the detection of species responses to habitat fragmentation. *Biological Reviews* 81:117–142
- Fahrig L (2003) Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology and Systematics* 34:487–515
- Guo W-P, Lin X-D, Wang W, Tian J-H, Cong M-L, Zhang H-L, et al. (2013) Phylogeny and origins of hantaviruses harbored by bats, insectivores, and rodents. *PLoS Pathogens* 9:e1003159
- Gurevitch J, Hedges VL (2001) Meta-analysis: combining the results of independent experiments. In: *Design and Analysis of Ecological Experiments*, Scheiner SM, Gurevitch J (editors), New York: Oxford University Press, pp 347–369
- Hedges LV, Olkin I (1985) *Statistical Methods for Meta-analysis*, Boston: Academic Press
- Hjelle B, Torres-Pérez F (2010) Hantaviruses in the Americas and their role as emerging pathogens. *Viruses* 2:2559–2586
- Jonsson CB, Moraes Figueiredo LT, Vapalahti O (2010) A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clinical Microbiology Reviews* 23:412–441
- Kariwa H, Yoshida H, Sanchez-Hernandez C, de Romero-Almaraz ML, Almazan-Catalan AJ, Ramos C, et al. (2012) Genetic diversity of hantaviruses in Mexico: identification of three novel hantaviruses from Neotominae rodents. *Virus Research* 163:486–494
- Keesing F, Holt RD, Ostfeld RS (2006) Effects of species diversity on disease risk. *Ecology Letters* 9:485–498
- Langlois JP, Fahrig L, Merriam G, Artsob H (2001) Landscape structure influences continental distribution of hantavirus in deer mice. *Landscape Ecology* 16:255–266
- Lee H, Bark D, Baek L, Choi K, Whang Y, Woo M (1980) Korean hemorrhagic fever patients in urban areas of Seoul. *Korean Journal of Virology* 10:1–6
- Lobos G, Ferres M, Palma RE (2005) Presencia de los géneros invasores *Mus* y *Rattus* en áreas naturales de Chile: un riesgo ambiental y epidemiológico. *Revista Chilena de Historia Natural* 78:113–124
- Mackelprang R, Dearing MD, St Jeor S (2001) High prevalence of Sin Nombre virus in rodent populations, central Utah: a consequence of human disturbance? *Emerging Infectious Diseases* 7:480–482
- Madhav NK, Wagoner KD, Douglass RJ, Mills JN (2007) Delayed density-dependent prevalence of Sin Nombre virus antibody in Montana deer mice (*Peromyscus maniculatus*) and implications for human disease risk. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 7:353–364
- Matheus S, Lavergne A, de Thoisy B, Dussart P, Lacoste V (2012) Complete genome sequence of a novel hantavirus variant of Rio Mamore virus, Maripa virus, from French Guiana. *Journal of Virology* 86:5399
- Markl J, Schleunig M, Forget P, Jordano P, Lambert J, Traveset A, et al. (2012) Meta-analysis of the effects of human disturbance on seed dispersal by animals. *Conservation Biology* 26:1072–1081
- Mills JN, Ksiazek TG, Peters C, Childs JE (1999) Long-term studies of hantavirus reservoir populations in the southwestern United States: a synthesis. *Emerging Infectious Diseases* 5:135–142
- Myers SS, Gaffikin L, Golden CD, Ostfeld RS, Redford KH, Ricketts TH, et al. (2013) Human health impacts of ecosystem alteration. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110:18753–18760
- Niklasson B, Hornfeldt B, Lundkvist A, Björsten S, Leduc J (1995) Temporal dynamics of Puumala virus antibody prevalence in voles and of nephropathia epidemica incidence in humans. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 53:134–140
- Olsson GE, White N, Ahlm C, Elgh F, Verlemeyr AC, Juto P, et al. (2002) Demographic factors associated with hantavirus infection in bank voles (*Clethrionomys glareolus*). *Emerging Infectious Diseases* 8:924–929
- Ostfeld RS, Keesing F (2012) Effects of Host Diversity on Infectious Disease. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 43:157–182
- Pardini R (2004) Effects of forest fragmentation on small mammals in an Atlantic Forest landscape. *Biodiversity & Conservation* 13:2567–2586
- Prugh LR, Hodges KE, Sinclair AR, Brashares JS (2008) Effect of habitat area and isolation on fragmented animal populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:20770–20775
- Rosenberg MS, Adams DC, Gurevitch J (2000) *MetaWin: Statistical Software for Meta-analysis*, Sunderland, MA: Sinauer Associates
- Rosenthal R (1979) The file drawer problem and tolerance for null results. *Psychological Bulletin* 86:638–641
- Ruedas LA, Salazar-Bravo J, Tinnin DS, Armien B, Cáceres L, García A, et al. (2004) Community ecology of small mammal populations in Panama following an outbreak of hantavirus pulmonary syndrome. *Journal of Vector Ecology* 29:177–191
- Suzán G, Armien A, Mills JN, Marce E, Ceballos G, Avila M, et al. (2008) Epidemiological considerations of rodent community composition in fragmented landscapes in Panama. *Journal of Mammalogy* 89:684–690
- Suzán G, Marce E, Giermakowski JT, Mills JN, Ceballos G, Ostfeld RS, et al. (2009) Experimental evidence for reduced rodent

- diversity causing increased hantavirus prevalence. *PLoS One* 4:e5461
- Suzán G, Esponda F, Carrasco-Hernández R, Aguirre AA (2012) Habitat Fragmentation and Infectious Disease Ecology. In: *New Directions in Conservation Medicine: Applied Cases of Ecological Health*, Aguirre AA, Ostfeld RS, Daszak P (editors), New York: Oxford University Press, pp 135–150
- Tersago K, Schreurs A, Linard C, Verhagen R, Van Dongen S, Leirs H (2008) Population, environmental, and community effects on local bank vole (*Myodes glareolus*) Puumala virus infection in an area with low human incidence. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 8:235–244
- Vargas RR, Fontúrbel FE, Bonacorso E, Simonetti JA (2012) Variation in reproductive life-history traits of birds in fragmented habitats: a review and meta-analysis. *Bird Conservation International* 22:462–467
- Voutilainen L, Savola S, Kallio ER, Laakkonen J, Vaheri A, Vapalahti O, et al. (2012) Environmental change and disease dynamics: effects of intensive forest management on Puumala hantavirus infection in boreal bank vole populations. *Plos One* 7:e39452
- Wang H, Yoshimatsu K, Ebihara H, Ogino M, Araki K, Kariwa H, et al. (2000) Genetic diversity of hantaviruses isolated in China and characterization of novel hantaviruses isolated from *Niviventer confucianus* and *Rattus rattus*. *Virology* 278:332–345
- Yahnke CJ, Meserve PL, Ksiazek TG, Mills JN (2001) Patterns of infection with Laguna Negra virus in wild populations of *Calomys laucha* in the central Paraguayan chaco. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 65:768–776
- Yates TL, Mills JN, Parmenter CA, Ksiazek TG, Parmenter RR, Vande Castle JR, et al. (2002) The ecology and evolutionary history of an emergent disease: hantavirus pulmonary syndrome. *BioScience* 52:989–998
- Zhang Y, Yuan J, Yang X, Zhou J, Yang W, Peng C, et al. (2011) A novel hantavirus detected in Yunnan red-backed vole (*Eothenomys miletus*) in China. *Journal of General Virology* 92:1454–1457
- Zeitz PS, Butler JC, Cheek JE, Samuel MC, Childs JE, Shands LA, et al. (1995) A case-control study of hantavirus pulmonary syndrome during an outbreak in the southwestern United States. *Journal of Infectious Diseases* 171:864–870

Appendix S1.

Publications used for the meta-analysis

| Data* | Country | Authors | Year | Reference |
|---------|-----------|-------------------------|------|---|
| H | USA | Anderson and Meikle | 2006 | <i>Acta theriologica</i> 51:43-51 |
| R | Brazil | Asfora and Pontes | 2009 | <i>Biota Neotropica</i> 9:31-35 |
| H, R | USA | Bolger et al. | 1997 | <i>Ecological Applications</i> 7:552-563 |
| H | USA | Bowers and Dooley | 1999 | <i>Landscape Ecology</i> 14:381-389 |
| R | Brazil | Cáceres et al. | 2010 | <i>Journal of Natural History</i> 44:491-512 |
| R | Brazil | de Lima and Gascon | 1999 | <i>Biological Conservation</i> 91:241-247 |
| H, N, R | Chile | Fernández and Simonetti | 2013 | <i>Urban Ecosystems</i> 16:377-387 |
| H | USA | Hanser and Huntly | 2006 | <i>Journal of Mammalogy</i> 87:1165-1174 |
| H, N, R | Chile | Kelt | 2000 | <i>Biological Conservation</i> 92:345-358 |
| H, N, R | Venezuela | Lambert et al. | 2003 | <i>Journal of Zoology</i> 260:179-187 |
| H, N, R | USA | Nupp and Swihart | 2000 | <i>Journal of Mammalogy</i> 81:512-526 |
| R | Brazil | Pardini | 2004 | <i>Biodiversity & Conservation</i> 13:2567-2586 |
| N, R | Brazil | Pardini et al. | 2005 | <i>Biological Conservation</i> 124:253-266 |
| H, N, R | Brazil | Passamani and Fernández | 2011 | <i>Journal of Natural History</i> 45:553-565 1B |
| H, N, R | Canada | Silva | 2001 | <i>Canadian Journal of Zoology</i> 79:2063-2071 |
| H, R | Canada | Silva et al. | 2005 | <i>Biological Conservation</i> 126:556-568 |
| H | Brazil | Umetsu and Pardini | 2007 | <i>Landscape Ecology</i> 22:517-530 |
| R | Brazil | Vaz et al. | 2007 | <i>Parasitology</i> 134:1785 |
| H | USA | Wilder and Meikle | 2006 | <i>Journal of Mammalogy</i> 87:117-123 |

*H = Hantavirus reservoir host, N = Non-host small mammals, R = species richness

Appendix S2.

List of non-host species included in the meta-analysis

| Order | Family | Species |
|-----------------|-------------|--|
| Rodentia | Abrocomidae | <i>Abrocoma benetti</i> |
| Rodentia | Cricetidae | <i>Abrothrix longipilis</i> |
| Rodentia | Cricetidae | <i>Abrothrix olivaceus</i> |
| Rodentia | Cricetidae | <i>Brucepattersonius aff. Iheringi</i> |
| Rodentia | Cricetidae | <i>Delomys sp.</i> |
| Rodentia | Cricetidae | <i>Delomys sublineatus</i> |
| Rodentia | Cricetidae | <i>Euryoryzomys russatus</i> |
| Rodentia | Sciuridae | <i>Glaucomys volans</i> |
| Rodentia | Dipodidae | <i>Napaeozapus insignis</i> |
| Rodentia | Cricetidae | <i>Oecomys speciosus</i> |
| Rodentia | Muridae | <i>Phyllotis darwini</i> |
| Rodentia | Cricetidae | <i>Rhipidomys mastacalis</i> |
| Rodentia | Sciuridae | <i>Sciurus aestuans</i> |
| Rodentia | Sciuridae | <i>Sciurus carolinensis</i> |
| Rodentia | Sciuridae | <i>Tamias striatus</i> |
| Rodentia | Sciuridae | <i>Tamiasciurus hudsonicus</i> |
| Rodentia | Cricetidae | <i>Thaptomys nigrita</i> |
| Rodentia | Echimyidae | <i>Trinomys paratus</i> |
| Didelphimorphia | Didelphidae | <i>Thylamys elegans</i> |
| Didelphimorphia | Didelphidae | <i>Marmosops incanus</i> |
| Didelphimorphia | Didelphidae | <i>Gracilinanus microtarsus</i> |
| Didelphimorphia | Didelphidae | <i>Didelphis aurita</i> |
| Didelphimorphia | Didelphidae | <i>Caluromys philander</i> |
| Didelphimorphia | Didelphidae | <i>Marmosa paraguayanus</i> |

CAPÍTULO 2

ABUNDANCIA DE RESERVORIOS DE HANTAVIRUS EN UN PAISAJE CON COLONIAS DE PERRITO DE LAS PRADERAS DE COLA NEGRA EN EL NOROESTE DE MÉXICO



Contents lists available at ScienceDirect

Mammalian Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mambio



Short Communication

Abundance of hantavirus hosts in a landscape with black-tailed prairie dog colonies in northwestern Mexico

Q1 André V. Rubio^{a,*}, Ana L. Viguera-Galván^{a,b}, Tony Schountz^c, Karla Moreno-Torres^d, Rurik List^e, Rosa E. Sarmiento-Silva^b, Rafael Ávila-Flores^f, Gerardo Suzán^a

^a Departamento de Etología, Fauna Silvestre y Animales de Laboratorio, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, Distrito Federal, Mexico

^b Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, C.P. 04510, Distrito Federal, Mexico

^c Department of Microbiology, Immunology and Pathology, Colorado State University, 1619 Campus Delivery, Fort Collins, CO 80523, USA

^d Department of Veterinary Preventive Medicine, The Ohio State University, 1920 Coffey Road, Columbus, OH 43210, USA

^e Departamento de Ciencias Ambientales CBS Universidad Autónoma Metropolitana-Lerma, Hidalgo Pte. 46, Col. La Estación Lerma, C.P. 52006, Estado de México, Mexico

^f División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, km 0.5 carretera Villahermosa-Cárdenas, C.P. 86039, Villahermosa, Tabasco, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 April 2015

Accepted 9 June 2015

Handled by Frank E. Zachos

Available online xxx

Keywords:

Cynomys
Grasslands
Hantavirus
Prairie dog
Small mammals

ABSTRACT

In order to assess the influence of habitat type on the abundance and distribution of hantavirus reservoir hosts and on the prevalence of hantavirus antibodies, we compared communities of small mammals among three dominant habitats in northwestern Mexico (grassland with prairie dogs colonies, grassland without prairie dogs colonies and mesquite shrubland). Grassland habitats had a very low abundance of hantavirus reservoir hosts (*Peromyscus leucopus* and *P. maniculatus*), whereas mesquite shrubland harbored a significantly higher abundance of reservoir hosts. Seropositive hosts were found in mesquite and grassland without prairie dogs (32% overall seroprevalence), but due to the small sample size of hantavirus hosts in grasslands, we could not compare seroprevalence among habitats. Areas with higher abundance of hantavirus hosts can increase the risk of human infections in other systems; therefore, mesquite shrubland may be the habitat that represents the highest risks for human exposure to hantavirus in this area. Given that the black-tailed prairie dog prevents the expansion of mesquite shrubland into grassland habitats, their colonies may indirectly prevent hantavirus host dispersion and expansion throughout this landscape. Future investigations are needed to further understand potential effects of prairie dog colonies on hantavirus epidemiology.

© 2015 Published by Elsevier GmbH on behalf of Deutsche Gesellschaft für Säugetierkunde.

Q3 The black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*, hereafter
Q4 prairie dog) is considered a keystone species of grasslands in North America (Lomolino and Smith, 2004); their grazing and burrowing activities significantly alter grassland landscapes, creating and modifying habitat for other species (Lomolino and Smith, 2004). Prairie dog-driven changes in habitats can alter the structure and composition of small mammal assemblages (Cully et al., 2010), which may in turn, modulate the transmission and persistence rodent-borne diseases.

Hantaviruses (family *Bunyaviridae*, genus *Hantavirus*) are tri-segmented negative sense single stranded RNA viruses, which cause hantavirus pulmonary syndrome in humans in the American continent (Jonsson et al., 2010). Commonly, each unique virus type is maintained in nature by a single rodent host species (Jonsson et al., 2010). The transmission of hantavirus within host populations is believed to occur mainly through aggressive encounters between rodents (Mills et al., 1997). Composition and structure of small mammal communities (and indirectly, habitat type) are recognized as important drivers of hantavirus prevalence in rodent hosts (Khalil et al., 2014). Therefore, the presence and activities of prairie dogs may indirectly alter hantavirus dynamics by influencing the distribution and abundance of hantavirus hosts. To our knowledge, this topic has not been addressed.

The Janos-Casas Grandes region, located in northwestern Chihuahua, Mexico, is at the southernmost end of this prairie dog

* Corresponding author.

E-mail addresses: andre.rubio@gmail.com (A.V. Rubio), ana.viguera09@gmail.com (A.L. Viguera-Galván), tony.schountz@colostate.edu (T. Schountz), irazema.moreno@gmail.com (K. Moreno-Torres), r.list@correo.ler.uam.mx (R. List), rosass@unam.mx (R.E. Sarmiento-Silva), rafaelavilaf@yahoo.com.mx (R. Ávila-Flores), gerardosuz@gmail.com (G. Suzán).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mambio.2015.06.004>

1616-5047/© 2015 Published by Elsevier GmbH on behalf of Deutsche Gesellschaft für Säugetierkunde.

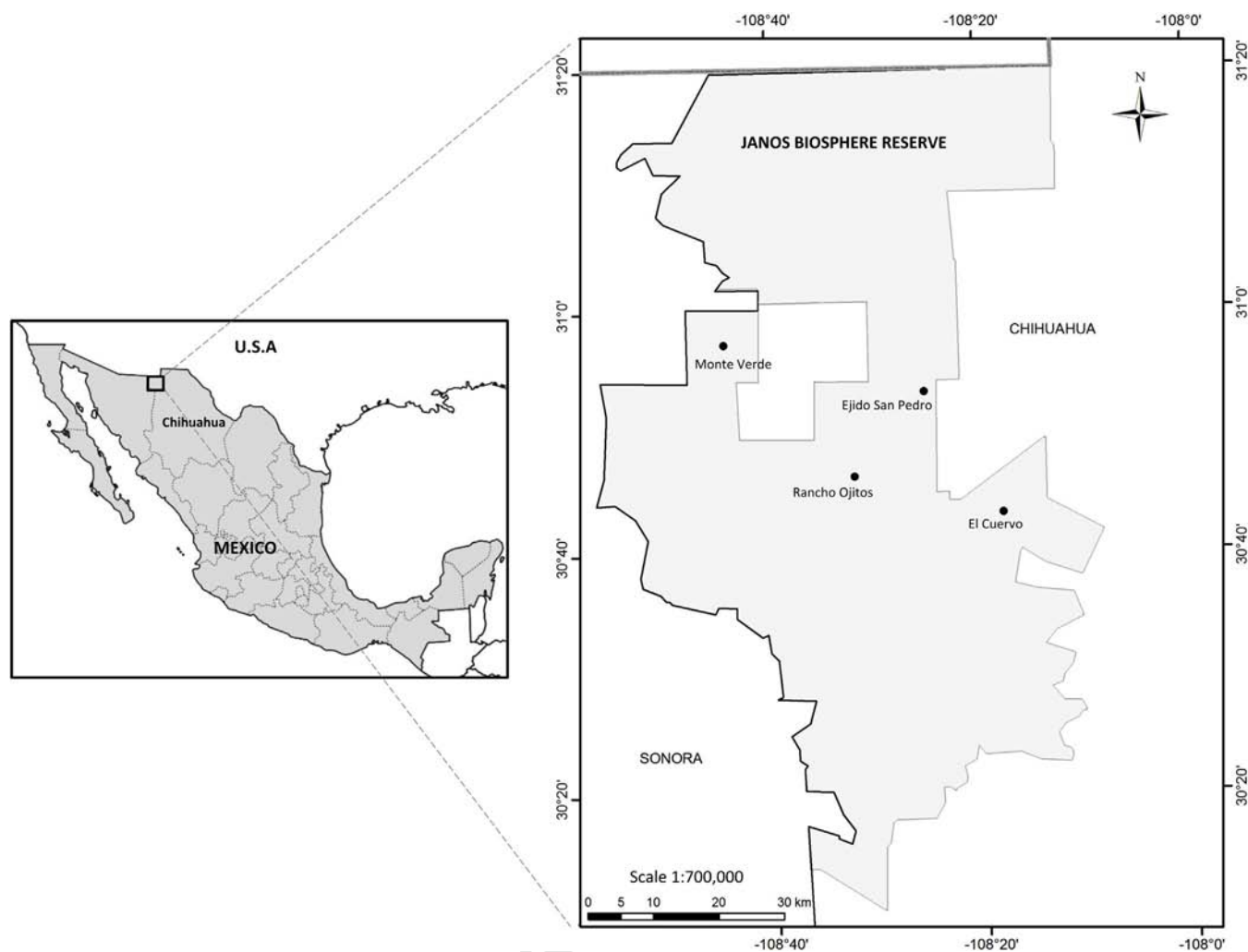


Fig. 1. Map of the study site. The Janos Biosphere Reserve is in gray and the four study areas are the black dots.

species (Avila-Flores et al., 2012). This area also exhibits biotic and abiotic features (e.g. rodent community composition and environmental conditions) that are similar to those of the southwestern United States where hantavirus pulmonary syndrome has been reported since 1993 (Knust and Rollin, 2013). Although no cases of hantavirus pulmonary syndrome in humans have been reported in the Janos-Casas Grandes region, there is evidence of hantavirus seropositivity in rodents (Moreno-Torres et al., in press).

Within this framework, we compared communities of small mammals among three different habitats in the Janos-Casas Grandes region (grassland in prairie dog colonies, desert grassland with no prairie dogs, and mesquite shrubland), in order to assess the influence of habitat type on the abundance and distribution of rodent reservoir hosts and on hantavirus antibody prevalence in hosts. Based on results of a previous small-scale study (Moreno-Torres et al., in press), we expected to find a lower abundance of reservoir hosts and a lower seroprevalence of hantavirus in reservoir hosts within the prairie dog habitat compared to the other two habitats. A decrease in abundance of reservoir hosts within prairie dog colonies could be a pathway by which prairie dogs indirectly decrease the risk of human exposure to hantavirus.

The study was conducted in the Janos Biosphere Reserve, in northwestern Chihuahua, Mexico, approximately 50 km south of the border with the U.S. (Fig. 1). The landscape is dominated by a mosaic of desert grasslands and shrublands with interspersed patches of riparian vegetation, agricultural lands, and human

settlements. We selected four large areas (>50 km²; ≥15 km apart; Fig. 1) to have an adequate representation of the regional range of ecological conditions. In four sampling periods (May and October 2012, and March and October 2013), nocturnal rodents were live-trapped in 6–10 sampling plots (≥600 m apart from each other) in each four areas. Sampling plots were placed in the three dominant habitat types: (1) grasslands with active prairie dog colonies, (2) grasslands without prairie dog colonies, and (3) mesquite shrublands (*Prosopis* spp.). Differences in the number of sampling plots from each habitat were due to logistical constraints and field accessibility (see Table 1 for number of sampling plots). In 2012 sampling, each plot was a 5 × 5 grid consisting of 25 Sherman traps (8 × 8 × 23 cm; H.B. Sherman traps, Tallahassee, FL) with traps set at 10 m intervals. In 2013, the plots were adjusted to a 7 × 7 grid (49 traps) with same distance among traps. Each plot was sampled during three consecutive nights at each sampling period. Once captured, animals were identified, weighed, sexed and ear-tagged. Blood was collected from the retro-orbital sinus (~0.1 mL) using capillary tubes and transferred the blood to Nobuto blood filter strips (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL). After handling, animals were released at the site of capture. In some instances, individuals were euthanized after sample collection using an overdose of isoflurane (Sofloran, PISA, Mexico) to confirm species identification and for further tissue analyses. Procedures for trapping and handling rodents met the guidelines of the American Society of Mammalogists (Sikes and Gannon, 2011) and were approved by the animal

Table 1

Numbers of individual rodents captured in each habitat type^a and number of hantavirus-seropositive reservoir hosts. In parenthesis are the numbers of individuals per 100 station-nights.

| Species | 2012 | | | 2013 | | | Total |
|--|----------------|--------------|----------------|---------------|---------------|---------------|------------|
| | MS | GLPD | GL | MS | GLPD | GL | |
| <i>Baiomys taylori</i> | 1 (0.04) | 0 (0.00) | 6 (0.32) | 0 (0.00) | 0 (0.00) | 0 (0.00) | 7 (0.06) |
| <i>Chaetodipus hispidus</i> | 3 (0.13) | 4 (0.35) | 0 (0.00) | 1 (0.04) | 0 (0.00) | 4 (0.19) | 12 (0.10) |
| <i>Chaetodipus penicillatus</i> | 39 (1.73) | 2 (0.18) | 0 (0.00) | 54 (2.04) | 6 (0.29) | 0 (0.00) | 101 (0.84) |
| <i>Dipodomys merriami</i> | 123 (5.47) | 20 (1.78) | 3 (0.16) | 126 (4.76) | 20 (0.97) | 2 (0.10) | 294 (2.45) |
| <i>Dipodomys ordii</i> | 2 (0.09) | 0 (0.00) | 2 (0.11) | 0 (0.00) | 0 (0.00) | 0 (0.00) | 4 (0.03) |
| <i>Dipodomys spectabilis</i> | 31 (1.38) | 12 (1.07) | 20 (1.07) | 15 (0.57) | 22 (1.07) | 16 (0.78) | 116 (0.97) |
| <i>Onychomys arenicola</i> | 30 (1.33) | 20 (1.78) | 2 (0.11) | 14 (0.53) | 19 (0.92) | 3 (0.15) | 88 (0.73) |
| <i>Onychomys leucogaster</i> | 3 (0.13) | 2 (0.18) | 0 (0.00) | 8 (0.30) | 0 (0.00) | 0 (0.00) | 13 (0.11) |
| <i>Neotoma albigula</i> | 3 (0.13) | 0 (0.00) | 0 (0.00) | 1 (0.04) | 0 (0.00) | 0 (0.00) | 4 (0.03) |
| <i>Perognathus flavus</i> | 6 (0.27) | 19 (1.67) | 16 (0.85) | 5 (0.19) | 9 (0.44) | 14 (0.68) | 69 (0.57) |
| <i>Peromyscus leucopus</i> ^b | 10 (0.44) | 0 (0.00) | 0 (0.00) | 11 (0.42) | 0 (0.00) | 3 (0.15) | 24 (0.20) |
| <i>Peromyscus maniculatus</i> ^b | 16 (0.71) | 1 (0.09) | 0 (0.00) | 20 (0.76) | 0 (0.00) | 1 (0.05) | 38 (0.32) |
| <i>Reithrodontomys</i> sp. | 1 (0.04) | 0 (0.00) | 0 (0.00) | 0 (0.00) | 0 (0.00) | 0 (0.00) | 1 (0.01) |
| Total | 268 (11.91) | 80 (7.11) | 49 (2.61) | 255 (9.64) | 76 (3.69) | 43 (2.09) | 771 (6.42) |
| Number of sampling plots ^c | 15 (M), 15 (O) | 7 (M), 8 (O) | 13 (M), 12 (O) | 9 (MR), 9 (O) | 6 (MR), 8 (O) | 8 (MR), 6 (O) | |
| Seropositive reservoir hosts | 4 | 0 | – | 14 | – | 2 | 20 |

^a MS = mesquite shrublands; GLPD = grasslands with active prairie dog colonies; GL = grasslands without prairie dog colonies.

^b Hantavirus reservoir hosts.

^c M = May; O = October; MR = March.

care committee of the Universidad Nacional Autónoma de México and by the Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Mexico (license no. FAUT-0250).

Serum samples of hantavirus reservoir hosts (hereafter hantavirus hosts) were tested for immunoglobulin G (IgG) reactive against Sin Nombre virus, using an enzyme immunoassay that has been previously described (Schountz et al., 2007). This serologic test was performed at the Arthropod-borne and Infectious Diseases Laboratory, Colorado State University.

We compared the following variables among habitats, using the Kruskal–Wallis test followed by a post hoc test: species richness (number of species), diversity (Shannon index), population abundance of hantavirus hosts (minimum number of individuals known to be alive during the 3-day trapping session at each site; Carver et al., 2011), and relative abundance of hantavirus hosts (proportion of individual hantavirus hosts in relation to all species captures). In addition, data on species abundance (species with at least five individuals in total) and habitat type in each sampling plot was used to run a canonical correspondence analysis (CCA). The CCA provides an exploratory analysis of potential relationships between species abundance and habitat type. In the CCA, the ordination axis of species is defined in combination with the habitat type, producing bivariate diagrams (biplots). The CCA identifies for each ordination axis the habitat that is more strongly related to the species distribution. The significance of the ordination of CCA was assessed by Monte Carlo permutation test. Statistical analyses were performed using the programs PAST 2.27 (Hammer et al., 2001) and STATISTICA 7.0 (Statsoft).

In total, 753 individuals were captured 771 times during 12,012 trap-nights. Rodents belonged to 13 rodent species of families Cricetidae and Heteromidae (Table 1). Hantavirus hosts captured were *Peromyscus maniculatus* and *P. leucopus*, which are known

to be the main reservoirs of Sin Nombre virus (*P. maniculatus*), Monongahela virus and New York virus (*P. leucopus*) (Jonsson et al., 2010). In Mexico, both species have been reported infected with Sin Nombre virus (Milazzo et al., 2012).

Grasslands without prairie dog colonies differed from the other two habitats in rodent composition (Table 1). Richness, species diversity, abundance of hantavirus hosts and relative abundance of hantavirus hosts were significantly higher in the mesquite shrubland (Table 2), while no differences were found between both grassland habitats (Table 2). The ordination generated by CCA was statistically significant (Monte Carlo permutation test $P < 0.001$). Variation in rodent composition among habitat types was explained completely (100%) by the first two axes extracted from CCA (Fig. 2). The CCA showed that some species are closely associated to particular habitats (Fig. 2), though most of them can be found in more than one habitat type (Table 1). Remarkably, hantavirus hosts were more associated to mesquite shrubland (Fig. 2). The overall seroprevalence in hosts was 32% (21–45%; 95% confidence intervals) (*P. leucopus* = 32% and *P. maniculatus* = 33%; Table 1). Given the small number of hantavirus hosts in grasslands ($n = 5$), we could not conduct a statistical test to compare seroprevalence among habitats.

Our results showed that rodent assemblages in the three habitat types differed in composition and structure, which has been previously reported for the region (Ceballos et al., 2010; Moreno-Torres et al., in press). We expected to find the lowest abundance of hantavirus hosts in habitats within prairie dog colonies, however, our results showed that both grassland habitats had a very low abundance of hantavirus hosts. Clearly, mesquite shrubland is the main habitat of hantavirus hosts in the region. Because mesquite shrubland supports the highest abundance of hantavirus hosts and infected hosts, it may be the habitat that represents the highest risks

Table 2

Rodent community variables in each habitat type (median; lower and upper quartile). Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$, Kruskal–Wallis test and post hoc test) between habitat types (abbreviations are in Table 1).

| | MS | GLPD | GL | H | P |
|--|---------------|-------------|-------------|------|--------|
| Richness | 4.5; 3–6a | 2; 0–3b | 1.5; 1–3b | 55.8 | <0.001 |
| Diversity | 1.2; 1.0–1.4a | 0.6; 0–0.9b | 0.3; 0–0.7b | 51.5 | <0.001 |
| Abundance of hantavirus hosts ^a | 0.7; 0–2.4a | 0; 0–0b | 0; 0–0b | 35.9 | <0.001 |
| Relative abundance of hantavirus hosts | 0.1; 0–0.2a | 0; 0–0b | 0; 0–0b | 30.3 | <0.001 |

^a Standardized by trapping effort.

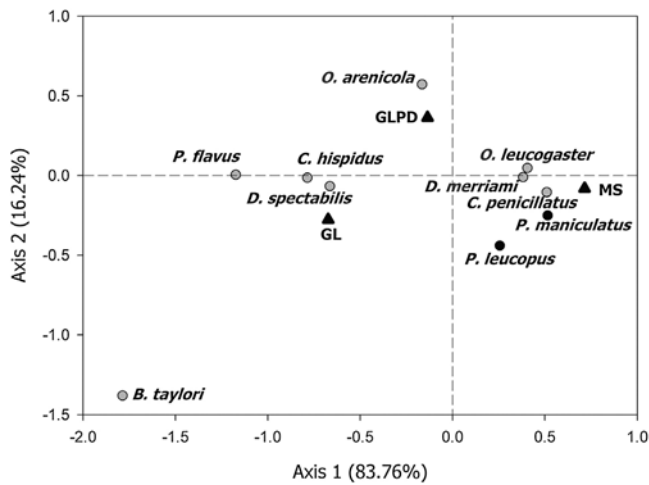


Fig. 2. Biplot of canonical correspondence analysis showing the association between rodent species (circles) and habitat types (triangles) in northwestern Chihuahua. Black circles indicate hantavirus reservoir hosts. Habitat type abbreviations are in Table 1.

for human exposure to hantavirus in this region, since areas with higher abundance of hantavirus hosts and infected hosts (regardless of prevalence of infection) can increase the risk of human infections in other ecosystems (Kallio et al., 2009; Calisher et al., 2011). Therefore, prairie dog colonies seem not to be an important factor to reduce hantavirus reservoir host abundances within grasslands. However, prairie dogs may indirectly prevent hantavirus host dispersion and expansion throughout this landscape because they consume the seeds and seedlings of mesquite shrubs, which helps protect grassland ecosystems from shrub invasion (Weltzin et al., 1997). In fact, several lines of evidence indicate that mesquite shrublands are expanding in the Janos-Casas Grandes region at expenses of grassland, partly because of the decline of prairie dog colonies (Ceballos et al., 2010).

The grasslands of the Janos-Casas Grandes region support a large prairie dog complex (~14,000 ha), and is the only significant complex left in the arid grassland system of the American Southwest and northwestern Mexico (Ceballos et al., 2005). Unfortunately, this prairie dog complex has declined around 70% since 1988, as a consequence of natural droughts and anthropogenic activities, with the resulting expansion of mesquite shrublands (Ceballos et al., 2010; Avila-Flores et al., 2012). Therefore, our results identify a potential indirect effect of prairie dogs on hantavirus host distributions at the landscape level, which can highlight the benefits of prairie dog conservation efforts in this region where human settlements and farming activities are increasing. Future investigations to further understand the role of prairie dog colonies on hantavirus epidemiology should include a fine-scale assessment of habitat and microhabitat preferences by hantavirus hosts and relationships of prairie dog colony features (e.g. area, density) with hantavirus prevalence.

Because the black-tailed prairie dog has a wide geographic distribution (from Canada to Mexico), there is a high variation in the structure and composition of rodent assemblages within their colonies along latitudinal and longitudinal gradients (Cully et al., 2010). In other regions, hantavirus reservoir hosts such as *P. maniculatus*, are more abundant within prairie dog colonies than grasslands off-colonies (e.g. Ray and Collinge, 2006; Cully et al., 2010). Therefore, the role of prairie dogs on hantavirus epidemiology may differ through their geographic distribution.

Keystone species such as prairie dogs can strongly influence taxonomic, phylogenetic and functional structure within host communities and metacommunities, which in turn, can influence

disease dynamics at local and regional scales (Suzán et al., 2015). In this context, we suggest that the study of the effects of keystone species on infectious diseases is a promising research area considering the wide spectrum of taxonomic groups they belong to, the variety of ecosystems they inhabit, and their influence on habitats, communities and ecosystems.

Acknowledgements

Funding for the study was provided by CONACyT project no. 179482 and the Scott Neotropical Fund Award (Cleveland Metroparks Zoo & the Cleveland Zoological Society). We thank A. Fernández, S. González, P. Martínez, H. Mendoza, M. Verona, A. López, K. Moreno, J. López and M. Moguel for assistance during field sampling and Gerardo Ceballos for support. We are grateful to J. Diaz, E. Ponce and R. Sierra (Janos Grassland Biological Station, IE-UNAM) for logistical support in the field. We thank Emmanuel Serrano and two anonymous reviewers for many helpful suggestions. A.V. Rubio was supported by a CONICYT Becas-Chile PhD Scholarship. A.L. Viguera-Galván was supported by a CONACyT MSc scholarship.

References

Avila-Flores, R., Ceballos, G., de Villa-Meza, A., List, R., Marcé, E., Pacheco, J., Sánchez-Azofeifa, G.A., Boutin, S., 2012. Factors associated with long-term changes in distribution of black-tailed prairie dogs in northwestern Mexico. *Biol. Conserv.* 145, 54–61.

Calisher, C.H., Mills, J.N., Root, J.J., Doty, J.B., Beaty, B.J., 2011. The relative abundance of deer mice with antibody to Sin Nombre virus corresponds to the occurrence of hantavirus pulmonary syndrome in nearby humans. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11, 577–582.

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

Ceballos, G., Davidson, A., List, R., Pacheco, J., Manzano-Fischer, P., Santos-Barrera, G., Cruzado, J., 2010. Rapid decline of a grassland system and its ecological and conservation implications. *PLoS ONE* 5, e8562.

Ceballos, G., Pacheco, J., List, R., Manzano-Fischer, P., Santos, G., Royo, M., 2005. Prairie dogs, cattle, and crops: diversity and conservation of the grassland–shrubland habitat mosaics in northwestern Chihuahua, Mexico. In: Cartron, J.-L.E., Ceballos, G., Felger, R.S. (Eds.), *Biodiversity, Ecosystems, and Conservation in Northern Mexico*. Oxford University Press, New York, pp. 425–438.

Cully, J.F., Collinge, S.K., VanNimwegen, R.E., Ray, C., Johnson, W.C., Thiagarajan, B., Conlin, D.B., Holmes, B.E., 2010. Spatial variation in keystone effects: small mammal diversity associated with black-tailed prairie dog colonies. *Ecography* 33, 667–677.

Hammer, Ø., Harper, D., Ryan, P., 2001. PAST: Paleontological Statistics Software Package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 4, 9.

Jonsson, C.B., Moraes Figueiredo, L.T., Vapalahti, O., 2010. A global perspective on hantavirus ecology, epidemiology, and disease. *Clin. Microbiol. Rev.* 23, 412–441.

Kallio, E.R., Begon, M., Henttonen, H., Koskela, E., Mappes, T., Vaheri, A., Vapalahti, O., 2009. Cyclic hantavirus epidemics in humans—predicted by rodent host dynamics. *Epidemics* 1, 101–107.

Khalil, H., Hörnfeldt, B., Evander, M., Magnusson, M., Olsson, G., Ecke, F., 2014. Dynamics and drivers of hantavirus prevalence in rodent populations. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 14, 537–551.

Knust, B., Rollin, P.E., 2013. Twenty-year summary of surveillance for human hantavirus infections, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 1934–1937.

Lomolino, M.V., Smith, G.A., 2004. Terrestrial vertebrate communities at black-tailed prairie dog (*Cynomys ludovicianus*) towns. *Biol. Conserv.* 115, 89–100.

Milazzo, M.L., Cajimat, M.N., Romo, H.E., Estrada-Franco, J.G., Iñiguez-Dávalos, L.I., Bradley, R.D., Fulhorst, C.F., 2012. Geographic distribution of hantaviruses associated with neotomine and sigmodontine rodents, Mexico. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 571–576.

Mills, J.N., Ksiazek, T.G., Ellis, B.A., Rollin, P.E., Nichol, S.T., Yates, T.L., Gannon, W.L., Levy, C.E., Engelthaler, D.M., Davis, T., Tanda, D.T., Frampton, J.W., Nichols, C.R., Peters, C.J., Childs, J.E., 1997. Patterns of association with host and habitat: antibody reactive with Sin Nombre virus in small mammals in the major biotic communities of the southwestern United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56, 273–284.

Moreno-Torres, K., Gual-Sill, F., Morales-Jiménez, R., Rubio, A.V., Ceballos, G., Suzán, G., 2015. Serological survey of hantavirus in rodents from prairie dog ecosystems in Chihuahua, Mexico. *Southwest. Nat.* (in press).

Ray, C., Collinge, S.K., 2006. Potential effects of a keystone species on the dynamics of sylvatic plague. In: Collinge, S.K., Ray, C. (Eds.), *Disease Ecology: Community*

- 290 Structure and Pathogen Dynamics. Oxford University Press, New York, pp.
291 202–217.
- 292 Schountz, T., Calisher, C.H., Richens, T.R., Rich, A.A., Doty, J.B., Hughes, M.T., Beaty,
293 B.J., 2007. Rapid field immunoassay for detecting antibody to Sin Nombre virus
294 in deer mice. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 1604–1607.
- 295 Sikes, R.S., Gannon, W.L., 2011. Guidelines of the American Society of
296 Mammalogists for the use of wild mammals in research. *J. Mammal.* 92,
235–253.
- Suzán, G., García-Peña, G.E., Castro-Arellano, I., Rico, O., Rubio, A.V., Tolsá, M.J.,
297 Roche, B., Hosseini, P.R., Rizzoli, A., Murray, K.A., Zambrana-Torrelío, C.,
298 Vittecoq, M., Bailly, X., Aguirre, A.A., Daszak, P., Prieur-Richard, A.-H., Mills, J.N.,
299 Guégan, J.F., 2015. Metacommunity and phylogenetic structure determines
300 infectious disease patterns in time and space. *Ecol. Evol.* 5, 865–873.
- 301
302 Weltzin, J.F., Archer, S., Heitschmidt, R.K., 1997. Small-mammal regulation of
303 vegetation structure in a temperate savanna. *Ecology* 78, 751–763.

UNCORRECTED PROOF

CAPÍTULO 3

ENCUENTROS INTRA E INTERESPECÍFICOS DE UNA ESPECIE RESERVORIO DE HANTAVIRUS EN ENCIERROS CON DIFERENTE DIVERSIDAD DE ROEDORES

Encuentros intra e interespecíficos de una especie reservorio de hantavirus en encierros con diferente diversidad de roedores

Resumen

El estudio de las tasas de contacto y encuentros entre roedores reservorios y la influencia de otras especies no reservorios sobre éstas, son variables de importancia para entender mejor la dinámica de patógenos de transmisión directa en hospederos silvestres. En este estudio se realizó un experimento de encierros en el campo donde se manipuló la diversidad de roedores con el fin de estudiar la influencia de la diversidad de especies sobre las frecuencias de encuentros intraespecíficos de un reservorio de hantavirus (*Peromyscus maniculatus*, PM) y encuentros interespecíficos entre PM y otros roedores no reservorios. Para medir los encuentros, se instalaron estaciones forrajeras y cámaras infrarrojas en tres tratamientos que consistieron en encierros con distinta diversidad de especies. No se encontraron diferencias en la frecuencia de encuentros entre PM en los tres distintos tratamientos, pero si se encontraron diferencias en los contactos interespecíficos, donde *Dipodomys merriami* es la especie que más interactúa con PM con una conducta agresiva. Además existieron diferencias en los patrones de actividad horaria entre PM y dos especies (*D. merriami* y *C. penicillatus*). Los resultados indican que al menos en una escala espacial pequeña como los encierros, la presencia de otras especies no influye en las tasas de encuentro entre PM, pero se sugiere que se debe seguir estudiando este tema mediante otras combinaciones de especies en los encierros, al igual que usando encierros de distintos tamaños. Este es el primer estudio que investiga la influencia de la diversidad de especies sobre las tasas de contacto de un roedor mediante una aproximación experimental con encierros en el campo.

INTRODUCCIÓN

El ratón venado (*Peromyscus maniculatus*; “PM”) es un roedor generalista que se distribuye en gran parte de Norte América y es el reservorio de Sin Nombre virus (Childs *et al.*, 1994), el principal hantavirus causante del síndrome cardiopulmonar por hantavirus en Norte América (Knust & Rollin, 2013). La transmisión de Sin Nombre virus entre hospederos silvestres, así como en otros hantavirus estudiados, se sugiere que ocurre principalmente mediante contacto directo, a través de encuentros agresivos entre un individuo infectado y otro susceptible (Mills, 1999; Calisher *et al.*, 1999). Es por ello que estudiar las tasas de contactos entre hospederos es importante para entender mejor las dinámicas de transmisión de patógenos como los hantavirus.

Los hantavirus se encuentran entre los patógenos que más se ha estudiado el efecto de dilución, un fenómeno en el cual un aumento en la diversidad de especies disminuye la prevalencia de patógenos (Keesing *et al.*, 2006). Se sugiere que este fenómeno actúa en diversos ecosistemas y distintos hantavirus como el Sin Nombre virus, Choclo virus y Calabazo virus en América (Clay *et al.*, 2009a; Suzán *et al.*, 2009; Carver *et al.*, 2011), así como en Puumala virus en Europa (Tersago *et al.*, 2008; Voutilainen *et al.*, 2012). Para patógenos de transmisión directa como los hantavirus, uno de los mecanismos del efecto de dilución que se sugiere es la reducción de encuentros entre individuos susceptibles e infectados cuando aumenta la diversidad de especies, debido a que en una comunidad de roedores existen especies competentes y especies no competentes para la transmisión de los patógenos (Keesing *et al.*, 2006). Estas últimas pueden disminuir las tasas de encuentros entre especies competentes, y esto podría disminuir la transmisión del patógeno. Este mecanismo ha sido poco estudiado empíricamente en los estudios del efecto de dilución. A la fecha, solo un estudio ha abordado la relación de la diversidad de roedores, la prevalencia de hantavirus (Sin Nombre virus) y las tasas de encuentros intraespecíficos de PM, encontrando que la prevalencia y las tasas de encuentro son menores en sitios con mayor diversidad de roedores, apoyando el mecanismo de disminución de contactos entre hospederos reservorios (Clay *et al.*, 2009b).

En este estudio se abordó el efecto de la diversidad de roedores sobre ciertas conductas de PM, las cuales pueden tener implicaciones para la transmisión de hantavirus. Se analizaron las frecuencias de encuentros intraespecíficos de PM y encuentros interespecíficos de PM con tres especies de roedores no reservorios de hantavirus. Además, se analizó si los patrones de actividad horaria de PM se modifican con la presencia de otras especies de roedores y si las actividades horarias de las otras especies de roedores son similares a PM. Estos factores podrían influir en la tasa de encuentros entre roedores. Para estos objetivos, se realizó un estudio manipulativo con encierros en un hábitat de matorrales áridos en el noroeste de Chihuahua, México. Una manera de realizar un estudio controlado en el campo es mediante encierros que son ambientes más naturales que las condiciones de laboratorio y se han utilizado en investigaciones de roedores silvestres (e.g. Fuller, 1996; Steinmann *et al.*, 2005; Bagamian *et al.*, 2012). Mediante esta aproximación experimental se controló la densidad y diversidad de roedores, colocando individuos de PM en ambientes con diferente diversidad de roedores. La predicción fue que el número de encuentros intraespecíficos de PM disminuye cuando se encuentra coexistiendo con otras especies de roedores y que las frecuencias de encuentros interespecíficos de PM con otros roedores dependen de la identidad de la otra especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y encierros

El experimento se llevó a cabo en marzo, abril y mayo de 2014 en el Rancho El Uno (30°50'17"N, 108°25'36"O) (propiedad de la ONG The Nature Conservancy), ubicado en la Reserva de la Biosfera de Janos, en el noroeste de Chihuahua, México. Esta zona está dominada por pastizales y matorrales áridos. Tres encierros se instalaron en zonas de matorral de mezquite donde se encuentra una mayor riqueza y diversidad de roedores en el área y es el hábitat de preferencia de PM en este ecosistema (Ceballos *et al.*, 2010). Cada encierro consistió en una cuadrícula de 30 m x 30 m (0.1 ha) hecha de hojas de aluminio (Bagamian *et al.*, 2012). Cada muro tuvo 1 m de altura y 0.6 m de profundidad bajo tierra para evitar el escape y la introducción de roedores y otros animales no voladores

(Bagamian *et al.*, 2012). La vegetación dentro de los encierros consistió en arbustos de mezquite (*Prosopis glandulosa*) con una distribución espacial similar entre encierros y que cubrían una superficie de entre 300 a 315 m² (33-35% de la superficie de cada encierro). Pevio al comienzo del estudio se instalaron trampas Sherman (8 x 8 x 23 cm; H.B. Sherman traps, Tallahassee, FL) dentro de cada encierro por 4 días consecutivos con el fin de retirar a todos los roedores presentes.

Diseño experimental

El experimento consistió en tres tratamientos con el mismo número de individuos de PM, pero con distinta diversidad de especies cada uno (Cuadro 1). Con este diseño se intentó simular 3 ambientes distintos que presentan la misma densidad de PM, y así controlar la densidad de reservorios y enfocarse solamente en el efecto de otras especies de roedores sobre las conductas de PM. Las otras especies fueron dos heterómidos: la rata canguro de Merriam (*Dipodomys merriami*; DM), el ratón de abazones del desierto (*Chaetodipus penicillatus*; CP), y un cricétido: el ratón chapulinero (*Onychomys arenicola*; OA). Estas especies fueron escogidas debido a que son las más abundantes en el área de estudio (Capítulo 2 de esta tesis) y no están descritas como reservorios de hantavirus. Debido a que los PM machos son los responsables de la mayoría de las transmisiones de hantavirus (Sin Nombre Virus) en poblaciones silvestres (Mills *et al.*, 2010), en cada tratamiento se puso tres machos de esta especie y una hembra (Cuadro 3.1). Las ratas canguro también tuvieron esta misma proporción de sexos, mientras que las otras dos especies fueron solamente 2 machos (Cuadro 3.1). Esto debido a que se quiso tener un mínimo de 2 machos por cada especie y tener una proporción parecida de machos en referencia a la especie focal (PM). Todos los individuos de cada tratamiento provenían de distintos sitios de captura (ver detalle en colecta de roedores), con el propósito de que exista una probabilidad mínima de que hayan tenido contacto entre los mismos individuos antes del experimento. Cada individuo fue incluido en cada tratamiento de forma aleatoria. Si bien las densidades de roedores en el área de estudio son menores a las que presenta cada encierro, se quiso incluir un número mayor de individuos para poder realizar análisis estadísticos. De acuerdo a

nuestros datos previos (Rubio *et al.*, datos no publicados), la densidad en un área de 0.1 ha, puede llegar a tener 1 individuo PM y una densidad total de 6 individuos.

Se realizó un total de 6 muestreos en cada tratamiento. Cada muestreo se consideró una réplica independiente (un total de 6 réplicas por cada tratamiento), debido a que se utilizaron distintos individuos para cada muestreo en cada tratamiento. Además, en cada muestreo se realizaba una rotación de encierro por cada tratamiento para evitar un sesgo debido a posibles diferencias entre los encierros. El muestreo comenzaba cuando se introducían todos los individuos (en los 3 tratamientos paralelamente) y duraba 6 noches. Las dos primeras noches se dejaban para la adaptación de los roedores a los encierros y las siguientes 4 noches eran tomadas en cuenta para el estudio. Una vez terminado cada muestreo, los roedores eran capturados y liberados en el mismo sitio donde fueron capturados inicialmente.

Cuadro 3.1. Número de individuos por especie, riqueza y diversidad de especies (índice de Shannon) en cada tratamiento del experimento. Entre paréntesis se encuentra el número de individuos de cada sexo (M = macho; H = hembra).

| Especie | Tratamiento 1 | Tratamiento 2 | Tratamiento 3 |
|------------------------|---------------|---------------|---------------|
| <i>P. maniculatus</i> | 4 (3 M, 1 H) | 4 (3 M, 1 H) | 4 (3 M, 1 H) |
| <i>D. merriami</i> | - | 4 (3 M, 1 H) | - |
| <i>C. penicillatus</i> | - | - | 2 (2 M) |
| <i>O. arenicola</i> | - | - | 2 (2M) |
| Riqueza de especies | 1 | 2 | 3 |
| Diversidad de especies | 0 | 0.7 | 1.04 |

Colecta de roedores

Para la colecta de individuos, en zonas de matorral de mezquite se instalaron transectos de 20 a 30 trampas Sherman (8 x 8 x 23 cm) distanciadas a 10 m entre si. Cada transecto estuvo separado de otro por al menos 700 m. Una vez capturados los individuos de las

especies requeridas para el experimento, se tomaron medidas morfométricas, sexo, estado reproductivo y edad. Para cada especie se escogieron individuos adultos, las hembras sin estado reproductivo activo (vagina no perforada y sin evidencia de gravidez o aumento en el tamaño de pezones) y los machos escrotados o no escrotados, pero en proporciones iguales para cada especie y para cada tratamiento. Los individuos seleccionados fueron marcados con aretes metálicos numerados y mantenidos por separado en cajas de madera con agua y alimento antes de la liberación en los encierros. Los individuos no seleccionados fueron liberados en los mismos sitios de captura.

Encuentros intra e interespecíficos y patrones de actividad

El registro de las actividades horarias y de encuentros entre individuos se realizó mediante cámaras trampa. En cada tratamiento se instaló una cuadrícula de 4 x 3 estaciones forrajeras (n = 12), distanciadas 6 y 7.5 m entre sí. Cada estación se componía de una cámara trampa infrarroja (Bushnell Trophy Cam modelo 119537C, Bushnell Optics, Overland Park, Kansas) ubicada a 2 m de distancia de un arbusto. Enfrente de la cámara (1.7 metros aprox.) se ponían ~ 30 grs de avena mezclada con esencia de vainilla semi cubierta con tierra del lugar. Las cámaras estaban programadas para grabar videos de 30 seg. cada vez que se detectaba un movimiento y se registraba la hora de la grabación. Cada cámara grababa una superficie de suelo de 1.5 m² aproximadamente (un total de 18 m² por encierro). Previamente se realizaron pruebas en el laboratorio y en el campo para probar la detección de roedores con ese modelo de cámara. Las cámaras eran revisadas diariamente para su funcionamiento.

Se registró la hora de cada visita de un individuo a una estación forrajera y cuando se registraban videos continuamente de una misma visita, todos se consideraron como una sola visita. Debido a la dificultad de identificar individualmente a los roedores en los videos, todos los registros se consideraron a nivel de especie y no de individuos. Los encuentros entre individuos se clasificaron en 3 categorías: 1. Agresivo (peleas o persecuciones), 2. Pasivo (individuos presentes en la estación forrajera al mismo tiempo y sin acciones agresivas) y 3. Evasivo (uno o más individuos al percatarse de la presencia de otro individuo se retiran del lugar o visitan a la estación apenas se vaya otro individuo). Los

videos de encuentros se tomaron como un encuentro independiente cuando presentaban un lapso de tiempo entre si mayor a 10 minutos.

Análisis de datos

El número de visitas de PM a las estaciones forrajeras se comparó entre tratamientos mediante Análisis de Varianza de una vía. Para la comparación del número de encuentros intra e interespecíficos entre los tratamientos, se utilizaron pruebas de t de Student y Análisis de Varianza de una vía. En las comparaciones de encuentros intraespecíficos, se tomó en cuenta todos los tipos de encuentros juntos y también sólo encuentros agresivos. Para todos los análisis anteriores, en caso de que la distribución de los datos no fuera normal, éstos fueron normalizados usando el logaritmo natural de los datos. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa STATISTICA 7.0 (Statsoft). La actividad horaria de los roedores se estimó midiendo las frecuencias de visitas a las estaciones forrajeras por horario de cada especie y el promedio de hora de las visitas durante el día y su desviación estándar. Para comparar la distribución entre las actividades horarias de PM entre tratamientos y entre especies, se utilizó la prueba no paramétrica de Watson (Zar, 1998). Para esta prueba se utilizó el programa Oriana 4.02 (Kovach, 2011).

RESULTADOS

Se obtuvo un total de 10,864 registros de visitas a las estaciones forrajeras. De éstas, 6,251 fueron de PM, 3,441 de DM, 555 de CP y 441 de OA. En general PM tiene una conducta forrajera solitaria (95% de las visitas a las estaciones tenía la presencia de un solo individuo PM). Los encuentros intraespecíficos de PM fueron 278 en total y el mayor número de encuentros fueron agresivos (Figura 3.1). No hubo diferencias significativas entre los tres tratamientos en el número de visitas de PM a las estaciones ($F_{(2,15)} = 0.49$; $P = 0.63$; Figura 3.2a). Tampoco existieron diferencias significativas en el número de encuentros de PM entre tratamientos (todos los tipos de encuentros juntos) ($F_{(2,15)} = 0.22$; $P = 0.8$; Figura 3.2b), ni diferencias entre tratamientos tomando en cuenta solamente las conductas agresivas ($F_{(2,15)} = 0.07$; $P = 0.94$; Figura 3.2c). Los encuentros interespecíficos con PM

fueron en total 159. Si hubo una diferencia significativa entre encuentros intraespecíficos, donde el tratamiento 2 (PM-DM) tuvo más encuentros que el tratamiento 3 (PM-CP y OA) ($t = 4.37$; $P = 0.001$; Figura 3.2d). Los principales tipos de encuentros entre PM y DM fueron agresivos, seguidos por los encuentros evasivos (Figura 3.1). Los encuentros con las otras dos especies fueron muy bajos y en general también son encuentros agresivos o evasivos (Figura 3.1).

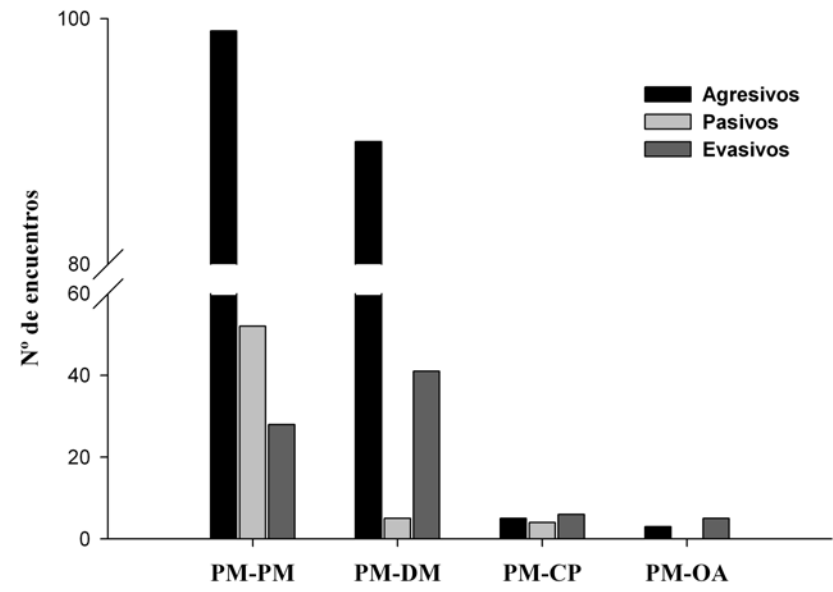


Figura 3.1. Número total de encuentros intra e interespecíficos.

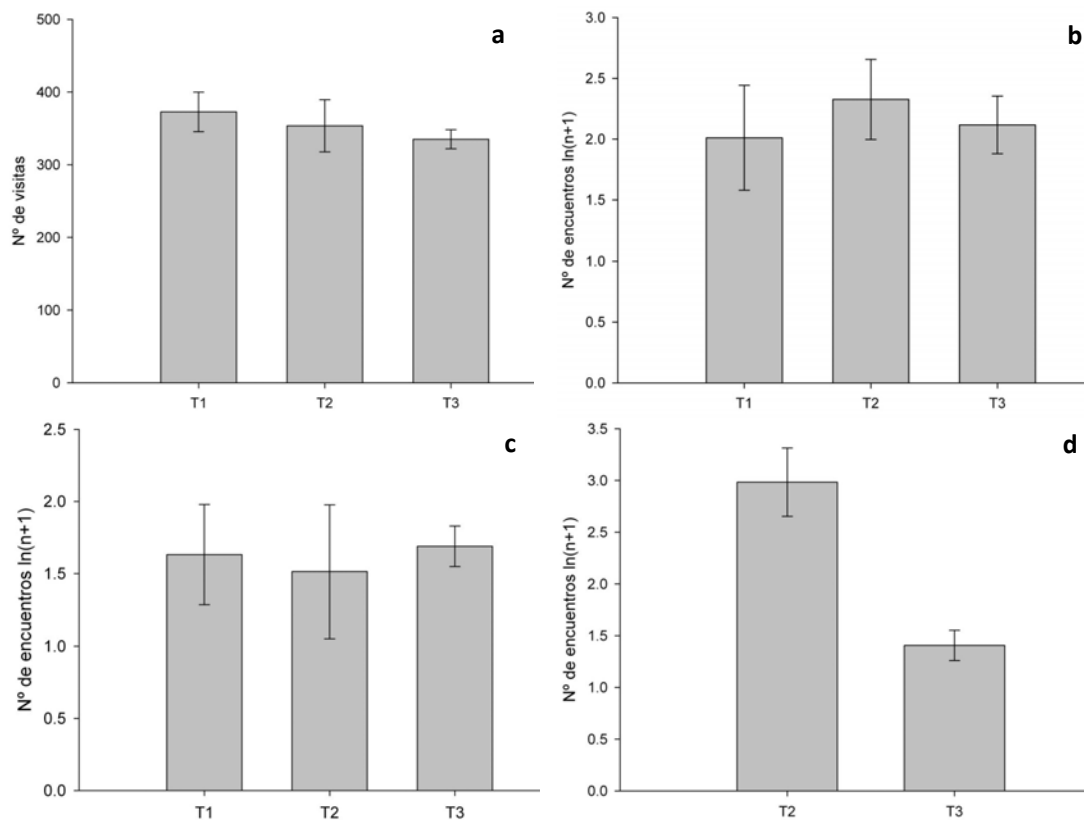


Figura 3.2. Media (\pm error estándar) de cada tratamiento (T). a) Visitas de PM a las estaciones forrajeras; b) encuentros intraespecíficos de PM; c) encuentros intraespecíficos agresivos entre PM; d) encuentros interespecíficos con PM. Para las especificaciones de cada tratamiento, ver Cuadro 1.

Con respecto a los patrones de actividad horaria, todas las especies tuvieron actividad en un rango aproximadamente de 12 horas (18:40 h - 6:40 h; Figura 3.3). No existieron diferencias en las distribuciones de actividad de PM entre los distintos tratamientos (T1-T2: $U^2 = 0.16$, $0.1 > P > 0.05$; T1-T3: $U^2 = 0.07$, $0.5 > P > 0.2$; T2-T3: $U^2 = 0.19$, $0.1 > P > 0.05$, Figura 3.3). Por otro lado, los patrones de actividad horaria entre PM y DM si difirieron significativamente ($U^2 = 2.7$; $P < 0.001$, Figura 3.3), al igual que entre PM y CP ($U^2 = 0.9$; $P < 0.001$, Figura 3.3). No hubo diferencias entre PM y OA ($U^2 = 0.11$, $0.5 > P > 0.2$, Figura 3.3). También existieron diferencias en las actividades entre CP y OA ($U^2 = 0.27$; $P < 0.02$) y DM con ambas especies (CP: $U^2 = 0.27$; $P < 0.01$; OA: $U^2 = 0.64$; $P < 0.001$, Figura 3.3).

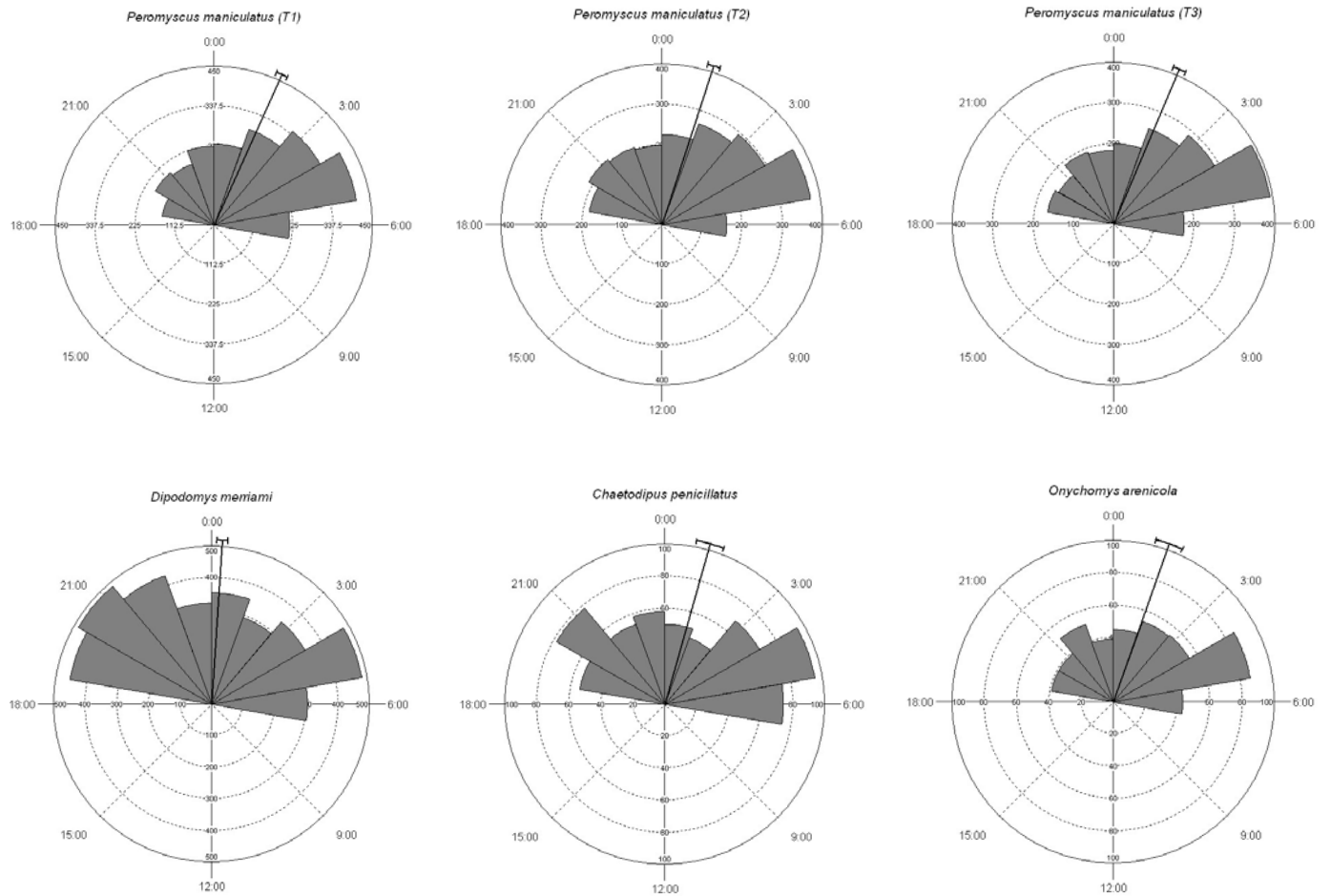


Figura 3.3. Patrones de actividad horaria de PM en los distintos tratamientos (T) y de las otras especies. Las barras grises indican el número de visitas a las estaciones forrajeras en las distintas horas del día. La línea negra indica el vector promedio y su intervalo de confianza (95%).

DISCUSIÓN

De acuerdo a nuestros resultados, PM tiene una conducta forrajera solitaria, consistente con un estudio reciente en Utah (Disney & Dearing, 2013). Ambos estudios además encontraron que las principales interacciones entre individuos PM son agresivas, las cuales se sugieren como el principal medio de transmisión de ciertos hantavirus como el Sin Nombre Virus (Mills, 1999; Calisher *et al.*, 1999). Contrario a la predicción esperada y a

los resultados de Clay *et al.* (2009b), en este estudio no se encontró una diferencia significativa en el número de encuentros intraespecíficos de PM en ambientes con distintos niveles de diversidad de roedores. Una posibilidad de esta diferencia de resultados es que en este trabajo se realizó una manipulación de las comunidades y se limitó su espacio de movimiento en los encierros. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que en la pequeña escala espacial de este estudio, la presencia de otras especies tampoco influyó en la frecuencia de visitas de PM a las estaciones forrajeras y tampoco cambió sus patrones de actividad horaria, lo cual puede influir en las tasas de encuentros intraespecíficos. Para confirmar estos resultados sobre los contactos intraespecíficos de PM en este ecosistema, se sugiere que se debiera continuar el estudio con encierros de distintos tamaños (con el fin de ver el efecto del área) y con distintas densidades de roedores y mayor número de tratamientos con distintos niveles de diversidad de especies, utilizando especies que presenten patrones de actividad similares con PM.

Algo que ha sido poco estudiado en los ensamblajes de roedores son los patrones de actividad horaria (Castro-Arellano & Lacher, 2009). En esta investigación se pudo encontrar que si bien todas las especies estudiadas son roedores nocturnos y presentan un rango de actividad horaria parecidos, varios presentan diferencias en la distribución horaria de las frecuencias de visitas a las estaciones forrajeras. Esto puede influir en las interacciones entre roedores y por ende, no todas las especies tendrían la misma probabilidad de interactuar entre sí. Se encontraron diferencias en el número de encuentros interespecíficos entre tratamientos, pero no necesariamente relacionado con las diferencias en los patrones de actividad horaria de los roedores. Por ejemplo, OA fue la única especie con un patrón de actividad horaria similar a PM, pero no encontramos muchos encuentros entre ambas especies, a diferencia de PM y DM que tienen diferencias en los patrones de actividad horaria, pero presentaron los mayores encuentros entre sí, en los cuales en su mayoría los individuos DM presentaron conductas agresivas hacia PM, los cuales tienden a escapar ante la presencia de DM. Esto indica que en ciertos casos las conductas territoriales de ciertos roedores podrían influir más sobre los encuentros intraespecíficos que los patrones de actividad dentro de un ensamblaje de roedores nocturnos. Falkenberg y Clarke (1998) encontraron que PM evita los encuentros con la rata canguro de *Ordii*

(*Dypodomys ordii*) y cambian su microhábitat por esta razón. Se ha sugerido que esta influencia de las ratas canguros sobre PM podría influir positivamente en la prevalencia de hantavirus, al concentrar individuos de PM espacialmente y por ende esto podría aumentar los contactos entre ellos (Clay *et al.*, 2009a). En este experimento no se encontró una influencia de la presencia de DM sobre el número de encuentros de PM. Esto se puede deber a que ambas especies presentan diferencias en sus patrones de actividad. También una posible limitación es que solo se midieron los contactos entre PM en las estaciones forrajeras y se desconoce los contactos entre PM en otras zonas de los encierros. Sin embargo, la medición de las frecuencias de encuentros en estaciones forrajeras se justifica debido a que las confrontaciones y contactos por recursos alimenticios son oportunidades para la transmisión de hantavirus entre individuos infectados y susceptibles, ya que se ha reportado que PM pelea agresivamente por recursos alimenticios (Healey, 1967), y es una conducta diaria a diferencia de otros contactos como por ejemplo, disputas para la reproducción (Clay *et al.*, 2009b).

Otra de las limitaciones de este estudio fue que no se pudo identificar en los videos a los individuos debido a los tamaños de los animales y sus rápidos movimientos. La identificación a nivel de individuo permite investigar si existen conductas heterogéneas entre individuos (Disney & Dearing, 2013) y realizar estudios de redes sociales (Perkins *et al.*, 2009). El uso de otras tecnologías como antenas que miden el paso de etiquetas con transpondedores en los animales y en combinación con las cámaras pueden ayudar a esta limitante (Disney & Dearing, 2013; Dearing *et al.*, 2015). Estas antenas y el material necesario para su implementación tienen un costo elevado (Dearing *et al.*, 2015), lo que evitó su uso en este estudio.

Hasta donde se sabe, este es el primer estudio en investigar las frecuencias de encuentros entre roedores mediante una aproximación experimental en encierros con distintos niveles de diversidad de especies y con la potencial implicación para la transmisión de patógenos de transmisión directa como los hantavirus. Esta metodología y los resultados encontrados indican que esta aproximación experimental puede ser válida para replicar o realizar estudios parecidos en otros ecosistemas, en los cuales se quiera

abordar factores conductuales que pueden influir en las dinámicas de transmisión de patógenos transmitidos por roedores.

De acuerdo a estos resultados y otros estudios (e.g. Clay *et al.*, 2009a), futuras investigaciones acerca de la relación entre la biodiversidad y tasa de encuentros entre roedores, es necesario estudiar a fondo la identidad, composición y ecología de las especies dentro de una comunidad, no solamente la diversidad de especies como tal.

REFERENCIAS

- BAGAMIAN, K., DOUGLASS, R., ALVARADO, A., KUENZI, A., AMMAN, B., WALLER, L. & MILLS, J. 2012. Population density and seasonality effects on Sin Nombre virus transmission in North American deermice (*Peromyscus maniculatus*) in outdoor enclosures. *Plos One*, 7.
- CALISHER, C. H., SWEENEY, W., MILLS, J. N. & BEATY, B. J. 1999. Natural history of Sin Nombre virus in western Colorado. *Emerging infectious diseases*, 5, 126.
- CARVER, S., KUENZI, A., BAGAMIAN, K. H., MILLS, J. N., ROLLIN, P. E., ZANTO, S. N. & DOUGLASS, R. 2011. A temporal dilution effect: hantavirus infection in deer mice and the intermittent presence of voles in Montana. *Oecologia*, 166, 713-721.
- CASTRO-ARELLANO, I. & LACHER, T. E., JR. 2009. Temporal niche segregation in two rodent assemblages of subtropical Mexico. *Journal of Tropical Ecology*, 25, 593-603.
- CEBALLOS, G., DAVIDSON, A., LIST, R., PACHECO, J., MANZANO-FISCHER, P., SANTOS-BARRERA, G. & CRUZADO, J. 2010. Rapid decline of a grassland system and its ecological and conservation implications. *Plos One*, 5.
- CHILDS, J. E., KSIAZEK, T. G., SPIROPOULOU, C. F., KREBS, J. W., MORZUNOV, S., MAUPIN, G. O., GAGE, K. L., ROLLIN, P. E., SARISKY, J., ENSCORE, R. E., FREY, J. K., PETERS, C. J. & NICHOL, S. T. 1994. Serologic and genetic identification of *Peromyscus maniculatus* as the primary rodent reservoir for a new hantavirus in the southwestern United States. *Journal of Infectious Diseases*, 169, 1271-1280.

- CLAY, C. A., LEHMER, E. M., JEOR, S. S. & DEARING, M. D. 2009a. Sin Nombre virus and rodent species diversity: A test of the dilution and amplification hypotheses. *Plos One*, 4.
- CLAY, C. A., LEHMER, E. M., ST JEOR, S. & DEARING, M. D. 2009b. Testing mechanisms of the dilution effect: deer mice encounter rates, Sin Nombre virus prevalence and species Diversity. *EcoHealth*, 6, 250-259.
- DEARING, M. D., CLAY, C., LEHMER, E. & DIZNEY, L. 2015. The roles of community diversity and contact rates on pathogen prevalence. *Journal of Mammalogy*, 96, 29-36.
- DIZNEY, L. & DEARING, M. D. 2013. The role of behavioural heterogeneity on infection patterns: implications for pathogen transmission. *Animal Behaviour*, 86, 911-916.
- FALKENBERG, J. C. & CLARKE, J. A. 1998. Microhabitat use of deer mice: Effects of interspecific interaction risks. *Journal of Mammalogy*, 79, 558-565.
- FULLER, C. A. 1996. Variable levels of immunity to experimental *Eimeria arizonensis* infections in natural, seminatural, and laboratory populations of deer mice (*Peromyscus maniculatus*). *Canadian Journal of Zoology*, 74, 750-757.
- HEALEY, M. C. 1967. Aggression and self-regulation of population size in deermice. *Ecology*, 377-392.
- KEESING, F., HOLT, R. D. & OSTFELD, R. S. 2006. Effects of species diversity on disease risk. *Ecology Letters*, 9, 485-498.
- KNUST, B. & ROLLIN, P. E. 2013. Twenty-year summary of surveillance for human hantavirus infections, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 19, 1934-1937.
- KOVACH, W. 2011. Oriana user's manual. *Kovach Computing Services, Pentraeth, Wales, UK*.
- MILLS, J. N., AMMAN, B. R. & GLASS, G. E. 2010. Ecology of hantaviruses and their hosts in North America. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10, 563-574.
- MILLS, J. N., KSIAZEK, T. G., PETERS, C. & CHILDS, J. E. 1999. Long-term studies of hantavirus reservoir populations in the southwestern United States: a synthesis. *Emerging Infectious Diseases*, 5, 135.
- PERKINS, S. E., CAGNACCI, F., STRADIOTTO, A., ARNOLDI, D. & HUDSON, P. J. 2009. Comparison of social networks derived from ecological data: implications for inferring infectious disease dynamics. *Journal of Animal Ecology*, 78, 1015-1022.

- STEINMANN, A. R., PRIOTTO, J. W., CASTILLO, E. A. & POLOP, J. J. 2005. Size and overlap of home range in *Calomys musculinus* (Muridae: Sigmodontinae). *Acta Theriologica*, 50, 197-206.
- SUZÁN, G., MARCE, E., GIERMAKOWSKI, J. T., MILLS, J. N., CEBALLOS, G., OSTFELD, R. S., ARMIEN, B., PASCALE, J. M. & YATES, T. L. 2009. Experimental Evidence for Reduced Rodent Diversity Causing Increased Hantavirus Prevalence. *Plos One*, 4.
- TERSAGO, K., SCHREURS, A., LINARD, C., VERHAGEN, R., VAN DONGEN, S. & LEIRS, H. 2008. Population, environmental, and community effects on local bank vole (*Myodes glareolus*) Puumala virus infection in an area with low human incidence. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 8, 235-244.
- VOUTILAINEN, L., SAVOLA, S., KALLIO, E. R., LAAKKONEN, J., VAHERI, A., VAPALAHTI, O. & HENTTONEN, H. 2012. Environmental Change and Disease Dynamics: Effects of Intensive Forest Management on Puumala Hantavirus Infection in Boreal Bank Vole Populations. *Plos One*, 7.
- ZAR, J. H. 1999. *Biostatistical analysis*, Pearson Education India.

CAPÍTULO 4

PREVALENCIA Y DIVERSIDAD GENÉTICA DE CEPAS DE *BARTONELLA* EN ROEDORES DEL NOROESTE DE MEXICO

Prevalence and Genetic Diversity of *Bartonella* Strains in Rodents from Northwestern Mexico

André V. Rubio,¹ Rafael Ávila-Flores,² Lynn M. Osikowicz,³ Ying Bai,³
Gerardo Suzán,¹ and Michael Y. Kosoy³

Abstract

Bartonella infections were investigated in wild rodents from northwestern Chihuahua, Mexico. A total of 489 rodents belonging to 14 species were surveyed in four areas. *Bartonella* bacteria were cultured from 50.1% of rodent samples (245/489). Infection rates ranged from 0% to 83.3% per rodent species, with no significant difference between sites except for *Cynomys ludovicianus*. Phylogenetic analyses of the citrate synthase gene (*gltA*) of the *Bartonella* isolates revealed 23 genetic variants (15 novel and 8 previously described), clustering into five phylogroups. Three phylogroups were associated with *Bartonella vinsonii* subsp. *vinsonii*, *B. vinsonii* subsp. *arupensis*, and *B. washoensis*, respectively. The other two phylogroups were not genetically related to any known *Bartonella* species. The genetic variants and phylogenetic groups exhibited a high degree of host specificity, mainly at the genus and family levels. This is the first study that describes the genetic diversity of *Bartonella* strains in wild rodents from Mexico. Considering that some variants found in this study are associated with *Bartonella* species that have been reported as zoonotic, more investigations are needed to further understand the ecology of *Bartonella* species in Mexican wildlife and their implications for human health.

Key Words: *Bartonella*—Prevalence—Genotypes—Small mammals—Mexico.

Introduction

BARTONELLA SPECIES ARE EMERGING vector-borne zoonotic bacteria of increasing public health concern around the world (Breitschwerdt et al. 2010, Buffet et al. 2013). This group of Gram-negative bacteria parasitizes endothelial and red blood cells of mammals. To date, 33 species of *Bartonella* have been described, from which most (around 20) have been detected in rodents (Buffet et al. 2013). Several rodent-borne *Bartonella* species or subspecies have been associated with human illness, such as the worldwide distributed *B. tribocorum* and *B. elizabethae*; *B. grahamii*, *B. rochalimae*, and *B. washoensis* in the northern hemisphere, and *B. vinsonii* subsp. *arupensis* in North America (Daly et al. 1993, Kerkhoff et al. 1999, Welch et al. 1999, Kosoy et al. 2003, Kosoy et al. 2010). Symptoms and clinical manifestations of *Bartonella* infections in humans include fever, myocarditis, endocarditis, and lymphadenitis (Kaiser et al. 2011).

In recent years, several studies have described epidemiological, ecological, and phylogenetic aspects of rodent-

associated *Bartonella* around the world (Bai et al. 2009b, Gundi et al. 2009, Tsai et al. 2010, Jiyipong et al. 2012, Paziewska et al. 2012). In North America, most studies have been in the United States and Canada (Jardine et al. 2005, Jardine et al. 2006, Bai et al. 2007, Morway et al. 2008, Gundi et al. 2012), whereas little information is available from Mexico. To our knowledge, the only investigations on bartonellae associated with rodents or their fleas in Mexico have been conducted in the states of Chihuahua (Bai et al. 2009a) and Sonora (Zapata et al., unpublished). The former study examined the prevalence of *Bartonella* spp., whereas the latter examined the molecular analysis of *Bartonella* infection in fleas from rodents. These studies were carried out in northwestern Mexico, but given the small sample sizes of these studies, as well as the lack of information about the genetic diversity of bartonellae circulating in rodents from that region, more investigation is needed. Specific studies in northwestern Mexico become relevant considering that this geographic region has biotic and abiotic features (*e.g.*, rodent community composition, and environmental conditions) that

¹Departamento de Etología, Fauna Silvestre y Animales de Laboratorio, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México.

²División Académica de Ciencias Biológicas, Universidad Juárez Autónoma de Tabasco, Tabasco, México.

³Division of Vector-Borne Diseases, Centers for Disease Control and Prevention, Fort Collins, Colorado.

are similar to those of southwestern United States regions, where human cases of rodent-associated *Bartonella* illness have been reported (Kosoy et al. 2003, Iralu et al. 2006).

The objectives of this study were to: (1) Estimate and compare the prevalence of *Bartonella* infection (among species, sites, and seasons) in wild rodents from northwestern Mexico by culturing blood; (2) evaluate the genetic diversity of *Bartonella* strains by analyzing partial sequences of the citrate synthase gene (*gltA*); (3) analyze host specificity of *Bartonella* strains; and (4) compare the isolates found in northwestern Mexico with strains of *Bartonella* that have been reported elsewhere.

Materials and Methods

Trapping localities and sampling

Rodents were live trapped within four areas (≥ 15 km apart): El Cuervo (30°44'05.65"N, 108°20'06.89"W), Monteverde (30°57'01.88"N, 108°45'25.38"W), Pancho Villa (30°54'06.61"N, 108°27'21.18"W), and Rancho Ojitos (30°46'36.70"N, 108°32'07.43"W). All areas are located in the Janos Region (Janos Biosphere Reserve and neighbor municipalities) in northwestern Chihuahua, Mexico. At each area, six to ten sampling plots were established with at least 600 meters separation from each other. The main trapping periods were in October of 2012 (fall) and late March of 2013 (early spring). Additionally, we included data of some rodents sampled in May of 2012.

Trapping locations encompassed a variety of habitats, including mainly native desert grasslands with and without black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*) colonies and shrublands (*Prosopis* spp.). Small rodents were trapped with Sherman traps (7.6 cm \times 8.9 cm \times 22.9 cm; H.B. Sherman Traps, Inc., Tallahassee, FL) baited with a mix of oats and vanilla extract. Black-tailed prairie dogs were live trapped with Tomahawk traps (7.6 cm \times 8.9 cm \times 22.9 cm; Tomahawk Live Trap Co., Tomahawk, WI) baited with a mixture of corn, oats, wheat, and molasses. Captured individuals were identified at the species level using taxonomic keys (Anderson 1972, Reid 2006). From each individual, we recorded sex and weight and obtained blood samples from the retro-orbital plexus (small rodents) or femoral vein (black-tailed prairie dogs). Blood samples were taken only once in case an individual was captured multiple times in the same trapping period. After handling, animals were ear tagged (model 1005-3; National Band and Tag Co., Newport, KY) and released at their site of capture. In some instances, individuals were euthanized after sample collection using an overdose of isoflurane (Sofloran, PISA, Hidalgo, Mexico) to confirm species identification and for further tissues analysis. In the field, blood samples were immediately stored in liquid nitrogen and then transferred to a -70°C freezer for storage. For laboratory analyses, samples were shipped on dry ice to the Bartonella Laboratory, Centers for Disease Control and Prevention (Fort Collins, CO).

All procedures for trapping and handling rodents followed the guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research (Sikes et al. 2011) and were approved by the Animal Care Committee of the Veterinary School (Universidad Nacional Autónoma de México) and by the Secretariat of Environment and Natural Resources from Mexico (Permit FAUT-0250).

Bacterial culturing

Whole blood or blood diluted in brain heart infusion medium containing 5% fungizone (Amphotericin B) was plated on agar supplemented with 5% rabbit blood. Each agar plate was divided into four parts, which were inoculated with 10 μL of blood each. Agar plates were incubated aerobically at 35°C in 5% CO_2 for up to 4 weeks. Plates were monitored for growth at least once per week after initial plating. Bacterial colonies were tentatively identified as *Bartonella* species on the basis of colony morphology. Selected colonies were harvested from initial plates or from subsequent subcultures and stored in 10% glycerol for further analysis.

PCR and sequence analyses

Cultures were verified as bartonellae by PCR amplification of a specific region of *gltA*, using primers BhCS781.p and BhCS1137.n, resulting in a 379-bp product (Norman et al. 1995). Crude DNA extracts were obtained by heating a heavy suspension of the organisms at 95°C for 15 min. The PCR amplifications were performed in a 25- μL reaction mixture containing 200 μM of each DNA template, 12.5 μL of GoTaq[®] Green Master Mix (Promega, Madison, WI), nuclease-free water, 1 μL each of 10 μM forward and reverse primers, and 2.5 μL of DNA. The PCR was carried out in a TaKaRa Thermal Cycler Dice TP600 (TaKaRa Bio. Tokyo, Japan) or PTC 200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Watertown, MA), using the following parameters: A 3-min denaturation at 95°C, followed by 35 cycles of 30 s denaturation at 95°C, 30 s annealing at 51°C, and 30 s elongation at 72°C. Amplification was completed by holding the reaction mixture at 72°C for 7 min. The PCR products were visualized for amplicons of the correct size by electrophoresis in a 1.5% agarose gel with ethidium bromide staining. Amplicons of the proper size were purified using a QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Germantown, MD) and sequenced in both directions using an Applied Biosystems Model 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Sequencing reactions were carried out in a PTC 200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research, Watertown, MA) using the same primers for PCR assay at a concentration of 3.3 μM . Cycle parameters for the sequencing reactions were 96°C for 1 min, 25 cycles of 96°C for 10 s, 50°C for 5 s, and 60°C for 4 min.

Analysis of sequences and phylogenetic relationships were conducted using MEGA5 (Tamura et al. 2011). The sequences of this study and the known *Bartonella* species retrieved from the GenBank were aligned using ClustalW. Phylogenetic trees were drawn using the neighbor-joining method by the Kimura two-parameter distance method. Bootstrap calculation was carried out with 1000 replicates. Phylogroups were defined based on the species cutoff proposed by La Scola et al. (2003).

Statistical analysis

We used generalized linear models (GLM) with binomial distribution and logit function to identify the variables that may explain *Bartonella* prevalence in rodents (the proportion of infected rodents). The explanatory variables analyzed were host identity (rodent species), sites, and trapping period. First, we built a model that included all rodent species that had a sample size greater than 10 and then we built models for

each rodent species. For these analyses, we used data from the two main trapping periods (October, 2012, and March, 2013). For individual variables, p values ≤ 0.05 were considered statistically significant. The overall performance of each model was evaluated with Pseudo- R^2 (proportion of explained deviance). The analyses were performed in R software (R Development Core Team, 2014).

Results

Animals

A total of 489 rodent individuals were analyzed to detect the presence of *Bartonella* infection. Rodents tested represented 14 species belonging to nine genera of three families (Table 1). The most abundant species was the Merriam's kangaroo rat (*Dipodomys merriami*, 38.7%), followed by the banner-tailed kangaroo rat (*D. spectabilis*, 16.4%), and the Mearns's grasshopper mouse (*Onychomys arenicola*, 11.5%) (Table 1).

Bartonella prevalence

Bartonella cultures were obtained from blood samples of 50.1% (245/489) of tested rodents, which belong to 12 rodent species (Table 1). The prevalence of *Bartonella* infection varied between rodent host species (Table 1). According to the GLM analysis, the prevalence of *Bartonella* infection was significantly higher in some species (*D. merriami*, *D. spectabilis*, *O. arenicola*, *O. leucogaster*, *Peromyscus leucopus*, and *P. maniculatus*) than in others (*C. ludovicianus* and *C. penicillatus*) (Table 2). Also, the overall prevalence was significantly higher in the spring of 2013 (58%) than in the fall of 2012 (43.3%) (Table 2). Although the rodent communities of the four sites varied in species composition, the overall prevalence of *Bartonella* infection did not differ among them. Intraspecific comparisons showed that infection prevalence did not differ between areas, except for the black-tailed prairie dog, which exhibited a marginally significant lower prevalence in Monteverde (4.2%) compared to the other two areas ($\sim 30\%$) (Tables 1 and 2). Among the most abundant species (*C. ludovicianus*, *C. penicillatus*, *D. merriami*,

D. spectabilis, *O. arenicola*, and *P. maniculatus*), only *O. arenicola* and *P. maniculatus* species had a significantly higher prevalence of *Bartonella* in the spring of 2013 than in the fall of 2012 (Table 2).

Genetic diversity

Sequencing of the *gltA* fragment was performed randomly among 98 isolates obtained from 96 rodents. We identified 23 different genetic variants (Table 3) with 0.3–13.2% divergence among them. Of these variants, 15 were newly identified in the present study with GenBank accession numbers KJ719284–KJ719298. The other eight variants were identical to some previously described genotypes (Table 3). One grasshopper mouse (*O. leucogaster*) and one kangaroo rat (*D. spectabilis*) were concurrently infected with two genetically distinct *Bartonella* variants. The variants from the grasshopper mouse had 10.6% of divergence between them, and the variants from the kangaroo rat diverged in 0.3%.

On the basis of the sequence similarities, the 23 variants were clustered into five phylogroups (groups I–V) (Fig. 1). The genetic distances between groups ranged from 3.6% to 13.2%. Group I included five variants with 14 sequences obtained from *O. arenicola* (10), *O. leucogaster* (2), and *Neotoma albigula* (2), which clustered with *B. vinsonii* subsp. *vinsonii* (96.5–97.8% similarity). In this group, one variant identified in eight *O. arenicola* and two *O. leucogaster* was identical to a variant previously found in *O. leucogaster* from Kansas (GenBank acc. no. DQ357613; Bai et al. 2007). Group II included three variants from 10 sequences obtained from *P. maniculatus* (6), *P. leucopus* (3), and *N. albigula* (1) that were clustered with *B. vinsonii* subsp. *arupensis* (96.5–99.1% similarity). These variants are identical to previously described *Bartonella* isolates obtained from *P. maniculatus* in North Carolina and New Mexico and from *N. albigula* in New Mexico (GenBank acc. nos. AF489539, U84380, U43882, and AF148487; Kosoy et al. 1997).

Group III clustered with *B. washoensis* (96.5–96.8% similarity) and included five variants from six sequences, mainly from ground squirrels (four *C. ludovicianus* and one *Spermophilus spilosoma*), but also from one kangaroo rat

TABLE 1. PREVALENCE OF *BARTONELLA* SPP. IN RODENTS FROM FOUR AREAS IN NORTHWESTERN MEXICO (JANOS REGION, CHIHUAHUA STATE) IN 2012 (MAY 1–10 AND OCTOBER 4–16) AND 2013 (MARCH 18–30)

| Rodent family | Rodent species | El Cuervo | | Monteverde | | Pancho Villa | | Rancho Ojitos | | Overall | | | | | | |
|---------------|---------------------------------|-----------|------|------------|----|--------------|------|---------------|-----|---------|-----|------|------|-----|------|------|
| | | n | (+) | % | n | (+) | % | n | (+) | % | n | (+) | % | | | |
| Cricetidae | <i>Baiomys taylori</i> | — | — | — | — | — | 2 | 0 | 0 | — | — | — | 2 | 0 | 0 | |
| | <i>Neotoma albigula</i> | 1 | 1 | 100 | — | — | — | — | — | 3 | 2 | 66.7 | 4 | 3 | 75 | |
| | <i>Onychomys arenicola</i> | 2 | 1 | 50 | 24 | 20 | 88.3 | 12 | 9 | 75 | 18 | 15 | 83.3 | 56 | 45 | 80.4 |
| | <i>Onychomys leucogaster</i> | — | — | — | 3 | 3 | 100 | — | — | — | 9 | 7 | 77.8 | 12 | 10 | 83.3 |
| | <i>Peromyscus leucopus</i> | — | — | — | 7 | 3 | 42.9 | 2 | 1 | 50 | 7 | 4 | 57.1 | 16 | 8 | 50 |
| Heteromyidae | <i>Peromyscus maniculatus</i> | — | — | — | 13 | 8 | 61.5 | — | — | — | 11 | 4 | 36.4 | 24 | 12 | 50 |
| | <i>Chaetodipus hispidus</i> | — | — | — | 3 | 1 | 33.3 | 4 | 0 | 0 | — | — | — | 7 | 1 | 14.3 |
| | <i>Chaetodipus penicillatus</i> | — | — | — | 19 | 3 | 15.9 | — | — | — | 12 | 1 | 8.3 | 31 | 4 | 12.9 |
| | <i>Dipodomys merriami</i> | 8 | 5 | 2.5 | 79 | 44 | 55.7 | 2 | 1 | 50 | 100 | 58 | 58 | 189 | 108 | 57.1 |
| | <i>Dipodomys ordii</i> | 5 | 2 | 40 | — | — | — | — | — | — | — | — | — | 5 | 2 | 40 |
| Sciuridae | <i>Dipodomys spectabilis</i> | 17 | 6 | 35.3 | 24 | 14 | 58.3 | 14 | 9 | 64.3 | 25 | 12 | 48 | 80 | 41 | 51.3 |
| | <i>Perognathus flavus</i> | — | — | — | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 6 | 0 | 0 |
| | <i>Cynomys ludovicianus</i> | 14 | 4 | 28.6 | 24 | 1 | 4.2 | 13 | 4 | 30.8 | — | — | — | 51 | 9 | 17.6 |
| | <i>Spermophilus spilosoma</i> | — | — | — | 6 | 2 | 33.3 | — | — | — | — | — | — | 6 | 2 | 33.3 |
| Total | 47 | 19 | 40.4 | 204 | 99 | 48.5 | 51 | 24 | 47 | 187 | 103 | 55.1 | 489 | 245 | 50.1 | |

TABLE 2. GENERALIZED LINEAR MODELS OF *BARTONELLA* PREVALENCE^a

| Model | Model performance | | | Model components | | |
|---------------------------------|-------------------|--------------------|-----------------------|---------------------------|---------------|--------------------|
| | Deviance | Degrees of freedom | Pseudo-R ² | Source of variation | Estimate (SD) | p |
| All species | 51.56 | 35 | 0.60 | Intercept | -1.53 (0.48) | 0.002* |
| | | | | <i>C. penicillatus</i> | -0.19 (0.68) | 0.773 |
| | | | | <i>D. merriami</i> | 1.85 (0.43) | <0.001* |
| | | | | <i>D. spectabilis</i> | 1.71 (0.44) | <0.001* |
| | | | | <i>O. arenicola</i> | 2.81 (0.50) | <0.001* |
| | | | | <i>O. leucogaster</i> | 3.21 (0.88) | <0.001* |
| | | | | <i>P. leucopus</i> | 1.67 (0.64) | 0.009* |
| | | | | <i>P. maniculatus</i> | 1.54 (0.58) | 0.007* |
| | | | | Site (Monteverde) | 0.15 (0.40) | 0.710 |
| | | | | Site (Pancho Villa) | 0.39 (0.49) | 0.429 |
| | | | | Site (Rancho Ojitos) | 0.16 (0.41) | 0.697 |
| | | | | Trapping period (October) | -0.51 (0.21) | 0.015* |
| <i>Chaetodipus penicillatus</i> | 0.20 | 1 | 0.62 | Intercept | -1.71 (1.09) | 0.115 |
| | | | | Trapping period (October) | -0.03 (1.28) | 0.983 |
| | | | | Site (Rancho Ojitos) | -0.66 (1.25) | 0.559 |
| <i>Cynomys ludovicianus</i> | 3.69 | 2 | 0.64 | Intercept | -0.74 (0.76) | 0.330 |
| | | | | Trapping period (October) | -0.31 (0.89) | 0.726 |
| | | | | Site (Monteverde) | -2.25 (1.19) | 0.058 [†] |
| | | | | Site (Pancho Villa) | -0.02 (0.92) | 0.981 |
| <i>Dipodomys merriami</i> | 2.84 | 3 | 0.14 | Intercept | 0.54 (0.73) | 0.464 |
| | | | | Trapping period (October) | -0.10 (0.30) | 0.725 |
| | | | | Site (Monteverde) | -0.33 (0.76) | 0.671 |
| | | | | Site (Pancho Villa) | -0.48 (1.59) | 0.761 |
| | | | | Site (Rancho Ojitos) | -0.19 (0.76) | 0.806 |
| <i>Dipodomys spectabilis</i> | 5.36 | 3 | 0.41 | Intercept | -0.46(0.56) | 0.410 |
| | | | | Trapping period (October) | -0.28 (0.47) | 0.555 |
| | | | | Site (Monteverde) | 0.97 (0.66) | 0.140 |
| | | | | Site (Pancho Villa) | 1.21 (0.76) | 0.110 |
| | | | | Site (Rancho Ojitos) | 0.55 (0.65) | 0.399 |
| <i>Onychomys arenicola</i> | 1.66 | 3 | 0.90 | Intercept | 1.66 (2.02) | 0.412 |
| | | | | Trapping period (October) | -3.32 (0.75) | 0.007* |
| | | | | Site (Monteverde) | 2.49 (2.08) | 0.231 |
| | | | | Site (Pancho Villa) | 0.89 (2.09) | 0.671 |
| | | | | Site (Rancho Ojitos) | 2.40 (2.10) | 0.253 |
| <i>Peromyscus maniculatus</i> | 0.84 | 1 | 0.90 | Intercept | 0.85 (0.64) | 0.181 |
| | | | | Trapping period (October) | -2.65 (1.27) | 0.036* |
| | | | | Site (Rancho Ojitos) | -0.20 (1.04) | 0.844 |

^aResults are presented for all species combined and for those species having at least 10 sampled individuals.

**p* ≤ 0.05.

[†]Marginally significant.

(*D. merriami*). Three of these variants were identical to variants obtained from *Bartonella* isolates of *C. ludovicianus* (GenBank acc. nos. AF440276, AF440276, DQ897367; Kosoy et al. 2003, Stevenson et al. 2003, Bai et al. 2008) and their fleas (GenBank acc. no. AF440732; Stevenson et al. 2003) in Colorado. Group IV included seven variants. One variant was represented by sequences obtained from one *O. arenicola* and three *O. leucogaster*. Four variants were obtained from either *D. merriami* or *D. spectabilis*, whereas one variant was found in sequences of five heteromyid species:

D. spectabilis (10), *D. merriami* (2), *D. ordii* (1), *Chaetodipus hispidus* (1), and *Chaetodipus penicillatus* (1). Another variant was identical to the sequence described previously in *O. leucogaster* from Kansas (GenBank acc.no. DQ357612; Bai et al. 2007). The closest *Bartonella* species to this group is *B. grahamii* with 97.1–97.8% similarity. Group V consisted of three variants—one variant from 11 sequences of *D. spectabilis*; one variant from eight *D. merriami*, one *D. spectabilis*, and one *O. arenicola*; and one variant from four heteromyid species (16 *D. merriami*, one *D. ordii*, one *D. spectabilis*, and one

TABLE 3. *BARTONELLA* VARIANTS IDENTIFIED IN THE PRESENT STUDY, NUMBER OF SEQUENCES OF EACH VARIANT, THEIR RODENT HOSTS^a AND SITES^b

| Acc. no. | Host species (no. seq.) | Total no. seq. | Sites | Phylogroup |
|-----------------------|---|----------------|------------|------------|
| DQ357613 ^c | OA (8), OL (2) | 10 | M, P, R | I |
| KJ719284 | OA (1) | 1 | M | I |
| KJ719285 | OA (1) | 1 | M | I |
| KJ719286 | NA (1) | 1 | R | I |
| KJ719287 | NA (1) | 1 | R | I |
| AF148487 ^c | NA (1) | 1 | E | II |
| AF489539 ^c | PM (5), PL (2) | 7 | M, R | II |
| U84382 ^c | PM (1), PL (1) | 2 | M, P | II |
| KJ719288 | SS (1) | 1 | M | III |
| AF440275 ^c | CL (1), DM (1) | 2 | E, R | III |
| AF439751 ^c | CL (1) | 1 | P | III |
| DQ897367 ^c | CL (1) | 1 | M | III |
| KJ719289 | CL (1) | 1 | P | III |
| DQ357612 ^c | OL (3), OA (1) | 4 | R | IV |
| KJ719290 | DS (2) | 2 | E, P | IV |
| KJ719291 | DS (1) | 1 | R | IV |
| KJ719292 | DM (1) | 1 | R | IV |
| KJ719293 | DS (10), DM (2), DO (1), CH (1), CP (1) | 15 | E, M, P, R | IV |
| KJ719294 | DM (2) | 2 | R | IV |
| KJ719295 | DM (1) | 1 | M | IV |
| KJ719296 | DS (11) | 11 | E, M, R, P | V |
| KJ719297 | DM (8), DS (1), OA (1) | 10 | E, M, R, P | V |
| KJ719298 | DM (16), DS (1), DO (1), CP (1), OA (2) | 21 | C, M, R | V |

^aCH, *Chaetodipus hispidus*; CP, *Chaetodipus penicillatus*; CL, *Cynomys ludovicianus*; DM, *Dipodomys merriami*; DO, *Dipodomys ordii*; DS, *Dipodomys spectabilis*; NA, *Neotoma albigula*; OA, *Onychomys arenicola*; OL, *Onychomys leucogaster*; PL, *Peromyscus leucopus*; PM, *Peromyscus maniculatus*; SS, *Spermophilus pilosoma*.

^bE, El Cuervo; M, Monteverde; P, Pancho Villa; R, Rancho Ojitos.

^cVariant previously described elsewhere.

C. penicillatus), and two *O. arenicola*. No variant from this group has been previously described.

Discussion

The overall prevalence of *Bartonella* in rodents from the region of Janos (~50%) was comparable with reports from other regions of North America (Kosoy et al. 1997, Jardine et al. 2005, Bai et al. 2007) and varied significantly among host species, which is similar to the pattern observed in other areas. For example, the high prevalence reported in this study for *Onychomys* and *Peromyscus* (~40–80%) falls within the range observed in the United States (Kosoy et al. 1997, Bai et al. 2007, Bai et al. 2011). Similarly, the low prevalence found in *Chaetodipus* spp. (~12%) is in agreement with the prevalence of *Bartonella* reported for these rodents in the United States (Bai et al. 2007, Bai et al. 2009a). On the other hand, the lack of spatial variation among sites in the prevalence of *Bartonella* found in this study is similar to the pattern observed in other studies from North America (Holmberg et al. 2003, Jardine et al. 2005). The only difference in prevalence between sites was observed in *C. ludovicianus*. However, further studies are required to

confirm this observation, considering that the sample size was relatively small (13–24 individuals per study area) and the result was marginally significant. Previous studies in more northern locations have reported a higher prevalence of *Bartonella* in rodents during the late summer and fall than other seasons (Fichet-Calvet et al. 2000, Kosoy et al. 2004, Jardine et al. 2006). Different from that, the overall prevalence in this study was higher in early spring than in fall. More extensive long-term studies are necessary to have a better understanding of the temporal dynamics of *Bartonella* in this region.

Phylogenetic analyses of the *gltA* sequence obtained from *Bartonella* cultures revealed that rodent communities from the Janos region harbor diverse *Bartonella* strains representing a variety of species. The five phylogroups detected indicated at least five species or subspecies of *Bartonella*. Groups I, II, and III are associated with previously described *Bartonella* species or subspecies from North America: *B. vinsonii* subsp. *vinsonii*, *B. vinsonii* subsp. *arupensis*, and *B. washoensis*, respectively (Kosoy et al. 1997, Jardine et al. 2005, Bai et al. 2007, Bai et al. 2008, Bai et al. 2011). Two of these species (*B. vinsonii* subsp. *arupensis* and *B. washoensis*) have been described as zoonotic pathogens (Welch et al. 1999, Kosoy et al. 2003). This warrants further study to understand their potential role in causing human diseases in Mexico. The remaining groups (IV and V) may represent new species of *Bartonella*; however, further studies are required to describe this group fully.

Although a portion of the *gltA* gene is commonly used for identifying *Bartonella* isolates from rodents (Buffet et al. 2013), we realize that this is not a sufficient approach for characterization of *Bartonella* species. It was used in our study only for comparing the obtained isolates with other rodent-associated *Bartonella* species. A genomic analysis of the obtained strains would be desirable in the future.

Host specificity of *Bartonella* species has been described in North American rodents from field and laboratory studies (Kosoy et al. 1997, Kosoy et al. 2000, Jardine et al. 2005, Bai et al. 2007, Bai et al. 2011), whereas in some other parts of the world, specifically in Europe, this is not a clear pattern (Buffet et al. 2013). Our phylogenetic analysis of *Bartonella* sequences clearly demonstrated an evident pattern of host specificity, particularly at the rodent genus level (genetic variants) and rodent genus or family level (phylogenetic groups). Group I was composed by variants found in grasshopper mice (*Onychomys* spp.) and *N. albigula*. Group II is associated with *B. vinsonii* subsp. *arupensis*, which is specific to mice of the genus *Peromyscus* (Bai et al. 2011). Group III included variants clustered with *B. washoensis*, which has been shown specific to sciurid rodents (Kosoy et al. 2003, Stevenson et al. 2003, Bai et al. 2008, Inoue et al. 2011). Variants from heteromyid rodents (*Dipodomys* spp. and *Chaetodipus* spp.) were clustered in groups IV and V.

Although some variants from heteromyid rodents were shared between more than one species, there is a certain degree of host specificity for variants from the most common heteromyid species (*D. merriami* and *D. spectabilis*). Some variants associated with heteromyid rodents were also found in *O. arenicola*. A similar pattern was observed by Bai et al. (2007), who suggested that *O. leucogaster* is an occasional host of some *Bartonella* strains that are specific to other rodent species. In that study, the authors hypothesized that this

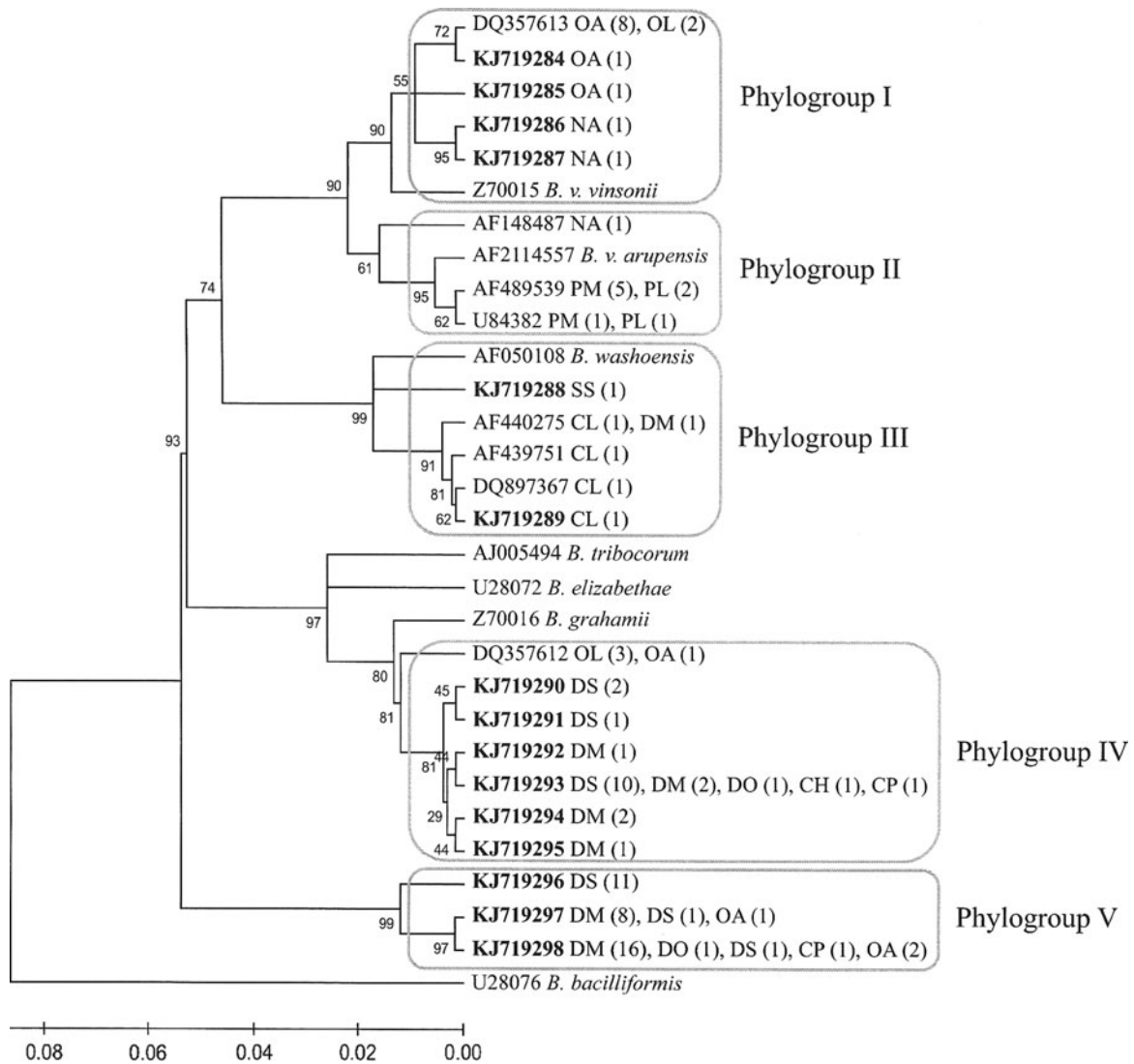


FIG. 1. Phylogenetic classification of 98 *Bartonella* genotypes based on *gltA* gene sequences detected in 96 rodents from northwestern Mexico. The phylogenetic tree was constructed by the neighboring-joining method, and bootstrap values were calculated with 1000 replicates. Each genotype is indicated by its GenBank accession number, with novel genetic variants in boldface. After each accession number is the rodent species from which *Bartonella* isolates of the genotype were obtained. Numbers in parentheses are the number of isolates obtained from rodents of the indicated species. Species abbreviations are in Table 3. The sequences were classified into five phylogroups, each indicated by a rectangle. A criterion of $\geq 96\%$ homology to *gltA* was used to define phylogroups (La Scola et al. 2003).

observation can be explained by specific behavior of grasshopper mice that use borrows from other rodent species and also prey on them occasionally. In this study, the infection of a kangaroo rat (*D. merriami*) with a variant specific to *C. ludovicianus* might represent another example of spillover of a *Bartonella* strain between rodent species.

Multiple genotypes of *Bartonella* have been found in a single animal host (Birtles et al. 2001, Jardine et al. 2005). In the present study, two samples, one from *O. leucogaster* and one from *D. spectabilis*, tested positive to two different variants, providing evidence that simultaneous infection with multiple strains of *Bartonella* can occur in individuals within the rodent community from northwestern Mexico. Eight out of 23 genotypes detected in this study were identical to *Bartonella* genotypes found in the same rodent hosts (genus

or species) from different regions of the United States, which is in agreement with other studies showing that certain *Bartonella* strains can be distributed across large geographic areas (Jardine et al. 2005), even in different continents (Ellis et al. 1999), according to the distribution of their hosts (Buffet et al. 2013).

To our knowledge, this is the first study on the genetic diversity of *Bartonella* strains from Mexican rodents. Because some variants found in this study were associated with *Bartonella* strains that can cause human illness, and because the number of *Bartonella* species described as zoonotic pathogens is increasing, it is important to extend investigations on *Bartonella* strains circulating in Mexican wildlife to understand their dynamics and to identify potential risks for human populations.

Acknowledgments

Funding for the study was provided by CONACyT project no. 179482, the Scott Neotropical Fund Award (Cleveland Metroparks Zoo and the Cleveland Zoological Society), and the CDC Global Diseases Detection program. The authors thank A. Fernández, A. Viguera, S. González, P. Martínez, M. Verona, A. López, and K. Moreno for assistance during field sampling. We are grateful to J. Diaz, E. Ponce, and R. Sierra (Janos Grassland Biological Station, IE-UNAM) for logistical support in the field. A.V Rubio is supported by a CONICYT Becas-Chile Scholarship. G. Suzán acknowledges the support provided by DGAPA-UNAM and CONACyT.

Author Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Anderson S. 1972. Mammals of Chihuahua. Taxonomy and distribution. *B Am Mus Nat Hist* 1972; 148:149–410.
- Bai Y, Kosoy MY, Cully JF, Bala T, et al. Acquisition of nonspecific *Bartonella* strains by the northern grasshopper mouse (*Onychomys leucogaster*). *FEMS Microbiol Ecol* 2007; 61:438–448.
- Bai Y, Kosoy M, Martin A, Ray C, et al. Characterization of *Bartonella* strains isolated from black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*). *Vector Borne Zoonotic Dis* 2008; 8:1–6.
- Bai Y, Kosoy M, Calisher C, Cully Jr J, et al. Effects of rodent community diversity and composition on prevalence of an endemic bacterial pathogen—*Bartonella*. *Biodiversity* 2009a; 10:3–11.
- Bai Y, Kosoy MY, Lerthusnee K, Peruski LF, et al. Prevalence and genetic heterogeneity of *Bartonella* strains cultured from rodents from 17 provinces in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 2009b; 81:811–816.
- Bai Y, Calisher CH, Kosoy MY, Root JJ, et al. Persistent infection or successive reinfection of deer mice with *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis*. *Appl Environ Microb* 2011; 77:1728–1731.
- Birtles R, Hazel S, Bennett M, Bown K, et al. Longitudinal monitoring of the dynamics of infections due to *Bartonella* species in UK woodland rodents. *Epidemiol Infect* 2001; 126:323–329.
- Breitschwerdt EB, Maggi RG, Chomel BB, Lappin MR. Bartonellosis: An emerging infectious disease of zoonotic importance to animals and human beings. *J Vet Emerg Crit Care* 2010; 20:8–30.
- Buffet J-P, Kosoy M, Vayssier-Taussat M. Natural history of *Bartonella*-infecting rodents in light of new knowledge on genomics, diversity and evolution. *Future Microbiol* 2013; 8:1117–1128.
- Daly JS, Worthington MG, Brenner DJ, Moss CW, et al. Rochalimaea-Elizabethae sp-nov isolated from a patient with endocarditis. *J Clin Microbiol* 1993; 31:872–881.
- Ellis B, Regnery R, Beati L, Bacellar F, et al. Rats of the genus *Rattus* are reservoir hosts for pathogenic *Bartonella* species: An Old World origin for a New World disease? *J Infect Dis* 1999; 180:220–224.
- Fichet-Calvet E, Jomaa I, Ismail RB, Ashford R. Patterns of infection of haemoparasites in the fat sand rat, *Psammomys obesus*, in Tunisia, and effect on the host. *Ann Trop Med Parasit* 2000; 94:55–68.
- Gundi VAKB, Taylor C, Raoult D, La Scola B. *Bartonella rattaaustraliani* sp nov., *Bartonella queenslandensis* sp nov and *Bartonella coopersplainsensis* sp nov., identified in Australian rats. *Int J Syst Evol Micr* 2009; 59:2956–2961.
- Gundi VAKB, Billeter SA, Rood MP, Kosoy MY. *Bartonella* spp. in rats and zoonoses, Los Angeles, California, USA. *Emerg Infect Dis* 2012; 18:631–633.
- Holmberg M, Mills J, McGill S, Benjamin G, et al. *Bartonella* infection in sylvatic small mammals of central Sweden. *Epidemiol Infect* 2003; 130:149–157.
- Inoue K, Kabeya H, Hagiya K, Kosoy MY, et al. Multi-locus sequence analysis reveals host specific association between *Bartonella washoensis* and squirrels. *Vet Microbiol* 2011; 148:60–65.
- Iralu J, Bai Y, Crook L, Tempest B, et al. Rodent-associated *Bartonella* febrile illness, southwestern United States. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 1081–1086.
- Jardine C, Appleyard G, Kosoy MY, McColl D, et al. Rodent-associated *Bartonella* in Saskatchewan, Canada. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2005; 5:402–409.
- Jardine C, McColl D, Wobeser G, Leighton FA. Diversity of *Bartonella* genotypes in Richardson's ground squirrel populations. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2006; 6:395–403.
- Jiyipong T, Jittapalpong S, Morand S, Raoult D, et al. Prevalence and genetic diversity of *Bartonella* spp. in small mammals from Southeastern Asia. *Appl Environ Microb* 2012; 78:8463–8466.
- Kaiser PO, Riess T, O'Rourke F, Linke D, et al. *Bartonella* spp.: Throwing light on uncommon human infections. *Int J Med Microbiol* 2011; 301:7–15.
- Kerckhoff FT, Bergmans AMC, van der Zee A, Rothova A. Demonstration of *Bartonella grahamii* DNA in ocular fluids of a patient with neuroretinitis. *J Clin Microbiol* 1999; 37:4034–4038.
- Kosoy MY, Regnery RL, Tzianabos T, Marston EL, et al. Distribution, diversity, and host specificity of *Bartonella* in rodents from the southeastern United States. *Am J Trop Med Hyg* 1997; 57:578–588.
- Kosoy M, Saito E, Green D, Marston E, et al. Experimental evidence of host specificity of *Bartonella* infection in rodents. *Comp Immunol Microb* 2000; 23:221–238.
- Kosoy M, Murray M, Gilmore RD, Bai Y, et al. *Bartonella* strains from ground squirrels are identical to *Bartonella washoensis* isolated from a human patient. *J Clin Microbiol* 2003; 41:645–650.
- Kosoy M, Mandel E, Green D, Marston E, et al. Prospective studies of *Bartonella* of rodents. Part I. Demographic and temporal patterns in population dynamics. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2004; 4:285–295.
- Kosoy M, Bai Y, Sheff K, Morway C, et al. Identification of *Bartonella* infections in febrile human patients from Thailand and their potential animal reservoirs. *Am J Trop Med Hyg* 2010; 82:1140–1145.
- La Scola B, Zeaiter Z, Khamis A, Raoult D. Gene-sequence-based criteria for species definition in bacteriology: The *Bartonella* paradigm. *Trends Microbiol* 2003; 11:318–321.
- Morway C, Kosoy M, Eisen R, Monteneri J, et al. A longitudinal study of *Bartonella* infection in populations of woodrats and their fleas. *J Vector Ecol* 2008; 33:353–364.
- Norman AF, Regnery R, Jameson P, Greene C, et al. Differentiation of *Bartonella*-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. *J Clin Microbiol* 1995; 33:1797–1803.

- Paziewska A, Harris PD, Zwolinska L, Bajer A, et al. Differences in the ecology of *Bartonella* infections of *Apodemus flavicollis* and *Myodes glareolus* in a boreal forest. *Parasitology* 2012; 139:881–893.
- Reid FA. A *Field Guide to Mammals of North America*, 4th ed. New York: Houghton Mifflin, 2006:579.
- Sikes RS, Gannon WL, The Animal Care And Use Committee. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *J Mammal* 2011; 92:235–253.
- Stevenson HL, Bai Y, Kosoy MY, Monteneri JA, et al. Detection of novel *Bartonella* strains and *Yersinia pestis* in prairie dogs and their fleas (Siphonaptera: Ceratophyllidae and Pulicidae) using multiplex polymerase chain reaction. *J Med Entomol* 2003; 40:329–337.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011; 28:2731–2739.
- Tsai Y-L, Chuang S-T, Chang C-C, Kass PH, et al. *Bartonella* species in small mammals and their ectoparasites in Taiwan. *Am J Trop Med Hyg* 2010; 83:917–923.
- Welch DF, Carroll KC, Hofmeister EK, Persing DH, et al. Isolation of a new subspecies, *Bartonella vinsonii* subsp *arpensis*, from a cattle rancher: Identity with isolates found in conjunction with *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti* among naturally infected mice. *J Clin Microbiol* 1999; 37:2598–2601.

Address correspondence to:

Gerardo Suzán
Departamento de Etología, Fauna
Silvestre y Animales de Laboratorio
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Universidad Nacional Autónoma de México
Avenida Universidad 3000
Ciudad Universitaria
Distrito Federal, C.P. 04510
Mexico

E-mail: gerardosuz@gmail.com

CAPÍTULO 5

PREVALENCIA DE *BARTONELLA* SPP. EN ROEDORES Y SU ASOCIACIÓN CON LA DIVERSIDAD DE ESPECIES EN EL NOROESTE DE MÉXICO

Prevalencia de *Bartonella* spp. en roedores y su asociación con la diversidad de especies en el noroeste de México

Resumen

El efecto de dilución ocurre cuando la diversidad de especies disminuye la prevalencia de un patógeno. Al menos tres trabajos sugieren que este fenómeno actúa en *Bartonella*, un género de bacterias de las cuales varias especies son zoonóticas. En el presente estudio se analizó la relación entre la diversidad de roedores en el noroeste de Chihuahua con la prevalencia de *Bartonella* spp. en los roedores hospederos. Se encontró que a una escala regional, estaría actuando el efecto de dilución, pero cuando se analizaron los datos a escalas locales, los resultados no arrojaron una relación significativa entre la diversidad de roedores y la prevalencia de infección de *Bartonella* spp. Cuando se analizó la prevalencia de infección en la especie más abundante de la zona (*Dipodomys merriami*) tampoco se encontraron resultados significativos de la asociación entre la diversidad de roedores y prevalencia de *Bartonella* spp. Los resultados indican que es importante examinar el efecto de dilución a diferentes escalas espaciales y además que pueden haber diferencias en los resultados cuando se evalúa toda la comunidad de patógenos en comparación a cuando el estudio se enfoca en las cepas que infectan a una especie de hospedero en particular.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas se ha sugerido que la diversidad de especies silvestres puede jugar un papel relevante en la transmisión de ciertos patógenos, muchos de ellos zoonóticos (Keesing *et al.*, 2010). En algunos sistemas, la prevalencia de patógenos disminuye en ambientes con mayor diversidad de especies, fenómeno denominado “efecto de dilución” (Keesing *et al.*, 2006). Este predice que la diversidad de especies disminuye la prevalencia del patógeno, a través de mecanismos como la reducción de encuentros entre hospederos infectados y susceptibles, disminución de la densidad de hospederos competentes, reducción de encuentros entre hospederos y vectores (Keesing *et al.*, 2006). El fenómeno contrario es el “efecto de amplificación”, el cual ocurre cuando existe una relación positiva entre la diversidad de especies y la prevalencia de un patógeno. Este efecto se produce, por ejemplo, cuando en una comunidad de especies el aumento de la diversidad aumenta el número de hospederos competentes, los cuales pueden aumentar la tasa de transmisión y por ende aumentar la prevalencia de un patógeno (Keesing *et al.*, 2006). La evidencia actual indica que el efecto de dilución sería más común que el efecto de amplificación (Ostfeld & Keesing, 2012, pero ver Salked *et al.*, 2013). Se ha sugerido que el efecto de dilución ocurre en diversos ambientes y con diversos patógenos transmitidos por vectores como *Borrelia burgdorferi*, virus Louping ill y Virus del Oeste del Nilo (e.g. Ostfeld & Keesing, 2000; Gilbert *et al.*, 2001; Ezenwa *et al.*, 2006), y patógenos de transmisión directa como hantavirus en roedores, enfermedades fúngicas en plantas, *Mycobacterium bovis* en mamíferos, *Batrachochytrium dendrobatidis* en anfibios, entre otros (e.g. Hall *et al.*, 2009; Suzán *et al.*, 2009; Searle *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2013). A pesar de ello, el efecto de dilución ha generado críticas, las cuales apuntan entre otras cosas, a la falta de evidencia de ser un patrón general a nivel de distintos patógenos y también por la falta de análisis a diferentes escalas espaciales y temporales (Salked *et al.*, 2013; Wood *et al.*, 2014; Pfäffle *et al.*, 2015).

Las bacterias del género *Bartonella* son patógenos zoonóticos transmitidos por vectores (e.g. pulgas, garrapatas) y que últimamente han generado gran interés mundial para la salud pública (Breitschwerdt *et al.*, 2010, Buffet *et al.*, 2013). Estas bacterias Gram-

negativas parasitan las células rojas y endoteliales de mamíferos. Varias cepas zoonóticas son transmitidas por roedores (Buffet *et al.*, 2013), las cuales producen síntomas y manifestaciones clínicas como fiebre, miocarditis, endocarditis, linfadenitis, entre otros (Kaiser *et al.*, 2011). Con respecto al efecto de la diversidad de hospederos y *Bartonella*, tres estudios en Asia, Europa y Norte América han indicado que en ambientes con una mayor riqueza o diversidad de roedores existe una menor prevalencia de ciertas cepas de *Bartonella*, actuando así el efecto de dilución (Telfer *et al.*, 2005; Bai *et al.*, 2009; Kedem *et al.*, 2014).

En este estudio se analizó la asociación entre la diversidad de especies y la prevalencia de *Bartonella* en un sistema en el noroeste de Chihuahua, México, el cual alberga una alta diversidad de especies de roedores y hábitats contrastantes con diferente composición de roedores (Ceballos *et al.*, 2010). Primero, el enfoque consistió en ver la asociación entre la diversidad de roedores y la prevalencia de *Bartonella* spp. a dos escalas espaciales (local y regional) y luego se evaluó la asociación entre la diversidad de roedores y la prevalencia del roedor dominante de la zona, la rata canguro de Merriam (*Dipodomys merriami*), un roedor que habita en distintos hábitats en la zona, lo cual hace que coexista con distintas especies de roedores dependiendo del hábitat en que esté presente. Las cepas de *Bartonella* de roedores en Norte América presentan una especificidad de hospederos a nivel de género principalmente (Kosoy *et al.*, 2000, Bai *et al.*, 2007; Rubio *et al.*, 2014), incluyendo las cepas de *Bartonella* que infectan a las especies del género *Dipodomys* (Rubio *et al.*, 2014). Por lo tanto, la prevalencia de *Bartonella* spp. en *D. merriami* puede estar influenciada positivamente por la presencia y abundancia de otros roedores del género *Dipodomys* y negativamente por roedores de otros géneros. Además, en la zona existen dos especies de roedores del género *Onychomys*, los cuales debido a sus conductas de usurpar madrigueras de otras especies e incluso depredar a otros roedores, pueden adquirir cepas de *Bartonella* no específicas de ellos (Bai *et al.*, 2007), incluyendo cepas específicas de *Dipodomys* spp. (Rubio *et al.*, 2014). Por lo tanto, la presencia de estas especies pueden también influir en la prevalencia de *Bartonella* spp. que infectan a *D. merriami*.

En base a estos antecedentes, la hipótesis fue que a mayor diversidad de especies de roedores de géneros diferentes a *Dipodomys* spp., menor es la prevalencia de *Bartonella*

spp. (efecto de dilución), tanto a nivel de todas las especies de roedores (y ambas escalas especiales), como también específicamente la prevalencia en *D. merriami*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El área de estudio se encontró ubicada en la Reserva de la Biosfera de Janos y zonas aledañas, las cuales pertenecen a la región de Janos-Casas Grandes, Chihuahua, aproximadamente 50 km hacia el sur de la frontera con Estados Unidos. El paisaje está dominado por un mosaico de pastizales y matorrales áridos con parches de vegetación riparia, tierras agrícolas y asentamientos humanos. Para el estudio se seleccionaron 4 subregiones (>50 km²; distanciadas \geq 15 km entre si): El Cuervo (30° 44' 05.65''N, 108° 20' 06.89''O), Monte Verde (30° 57' 01.88''N, 108° 45' 25.38''O), Pancho Villa (30° 54' 06.61''N, 108° 27' 21.18''O) y Rancho Ojitos (30° 46' 36.70''N, 108° 32' 07.43''O) (ver Figura 1 en Capítulo 2 de esta tesis).

Diseño de estudio y toma de muestras

En cada subregión se instalaron de 6 a 10 sitios de muestreo (distanciados \geq 600 m entre si) que consistieron en cuadrantes de trampas Sherman (8 x 8 x 23 cm; H.B. Sherman traps, Tallahassee, FL) para la captura viva de roedores. Estos sitios de muestreo estuvieron ubicados principalmente en 3 distintos hábitats, con el propósito de obtener una gran variedad de especies de roedores: matorrales de mezquite (*Prosopis* spp.), pastizales con presencia de colonias de perritos de la pradera (*Cynomys ludovicianus*) y pastizales sin colonias de perritos de la pradera. Los pastizales se componen de pastos y hierbas anuales tales como *Bouteloa* spp., *Aristida hamulosa*, and *Fouqueria splendens*.

Los muestreos se realizaron en Octubre de 2012 y Marzo de 2013. En el 2012, los cuadrantes fueron de 25 trampas Sherman espaciadas a intervalos de 10 metros en una cuadrícula de 5 x 5 (0.25 hectáreas). En el 2013, para estudios paralelos sobre hantavirus y sus reservorios, los cuadrantes aumentaron a cuadrículas de 7 x 7 (49 trampas, 0.49 hectáreas). En cada cuadrante, las trampas estuvieron activadas 3 noches seguidas. Los ejemplares capturados fueron identificados hasta especie y se obtuvo datos de sexo, peso,

medidas morfométricas, estado reproductivo y edad. La toma de muestras de sangre se realizó por punción del plexo infraorbital, la sangre se colectó con un tubo capilar heparinizado y fue almacenada en criotubos. Cada ejemplar se marcó con un arete metálico numerado y se liberó en el mismo sitio de captura, una vez terminado el manejo del animal. Algunos ejemplares fueron sacrificados para posterior identificación y otros análisis de tejidos. Las muestras de sangre fueron puestas en nitrógeno líquido inmediatamente tomada la muestra y posteriormente en el laboratorio fueron almacenadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Para los análisis de laboratorio, las muestras fueron enviadas en hielo seco al Centro de Control y Prevención de Enfermedades (CDC) en Fort Collins, Colorado.

Todos los procedimientos de captura y manejo de los animales siguieron las directrices para el uso de mamíferos silvestres de la Sociedad Americana de Mastozoología (Sikes *et al.*, 2011) y fueron aprobados por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (CICUAE), FMVZ, UNAM. Además se contó con el permiso de captura de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (Permiso FAUT-0250).

Análisis de Bartonella

Para la detección de la infección de *Bartonella* spp. en sangre, cada muestra se sembró en un cultivo celular en placas agar suplementadas con 5% de sangre de conejo, las cuales se incubaron a $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un ambiente con 5% de CO_2 hasta cuatro semanas. Las colonias sospechosas de *Bartonella* fueron cosechadas y posteriormente se verificaron como *Bartonella* spp. mediante amplificación por PCR de una región específica del gen *gltA*, utilizando los cebadores BhCS781.p y BhCS1137.n (Norman *et al.*, 1995). Para mayor detalle, ver el Capítulo 4 de esta tesis.

Análisis estadísticos

Para cada cuadrante se estimó la diversidad de especies mediante el índice de Simpson. También se estimó la abundancia de *D. spectabilis* y *Onychomys* spp. mediante el número mínimo de animales vivos (Carver *et al.*, 2011a). Debido a las diferencias de esfuerzo de

captura entre ambos periodos de muestreo, la abundancia se estandarizó por esfuerzo de captura (abundancia/número de trampas x 100).

Para analizar las variables que explican la prevalencia (proporción de individuos infectados de la muestra) de *Bartonella* spp. tanto en toda las especies como en *D. merriami*, se realizaron Modelos Lineales Generalizados de distribución binomial y función logit. Las variables explicativas fueron la diversidad de especies y las abundancias de *D. spectabilis* y *Onychomys* sp. (para el análisis con la prevalencia de *D. merriami*).

RESULTADOS

Se capturó un total de 484 roedores, pertenecientes a dos familias, siete géneros y 11 especies: *Chaetodipus hispidus*, *C. penicillatus*, *Dipodomys merriami*, *D. spectabilis*, *Peromyscus leucopus*, *P. maniculatus*, *Onychomys arenicola*, *O. leucogaster*, *Perognathus flavus*, *Neotoma albigula*, *Baiomys taylori*. Treinta y seis cuadrantes presentaron al menos cuatro individuos y fueron usados para los análisis. Para el análisis de la escala local, solamente se utilizaron las subregiones Ojitos y Monte Verde por presentar un mayor número de cuadrantes (n = 16 y 12, respectivamente). En 25 cuadrantes se obtuvieron al menos 4 individuos de *D. merriami* y se usaron para el análisis específico de esta especie.

La asociación entre la prevalencia de *Bartonella* spp. y la diversidad de especies fue significativa en el análisis a escala regional ($P = 0.03$; Cuadro 1), donde a mayor diversidad de especies, menor es la prevalencia. Por otro lado, la escala local no arrojó un resultado significativo (Cuadro 5.1). Con respecto al análisis de la prevalencia de *D. merriami*, ninguna variable fue significativa (Cuadro 5.1).

Cuadro 5.1. Modelos lineales generalizados de prevalencia de *Bartonella* spp.

| Modelo | VARIABLES explicativas | Coef. de la variable (error estándar) | <i>p</i> | Pseudo-R ² |
|--------------------|------------------------------|--|----------|-----------------------|
| Regional | Diversidad | -1.68 (0.5) | 0.03 | 0.10 |
| Local, Monte Verde | Diversidad | -1.11 (1.1) | 0.31 | 0.09 |
| Local, Ojitos | Diversidad | -0.67 (1.5) | 0.65 | 0.02 |
| <i>D. merriami</i> | Diversidad | -2.03 (1.28) | 0.11 | 0.12 |
| | Abund. <i>D. spectabilis</i> | 4.62 (9.7) | 0.63 | |
| | Abund. <i>Onychomys</i> spp. | 2.74 (11.3) | 0.81 | |

DISCUSIÓN

La diversidad de especies puede influenciar la prevalencia de ciertos patógenos en hospederos silvestres, tal como sugiere nuestro resultado del análisis a escala regional. Este resultado es consistente con otros estudios en otras zonas geográficas, donde sugieren que actúa el efecto de dilución en bartonellas asociadas a roedores (Telfer *et al.*, 2005; Bai *et al.*, 2009; Kedem *et al.*, 2014). Las bartonellas son transmitidas en los roedores principalmente por pulgas (Gutiérrez *et al.*, 2015) y en la zona de estudio, las pulgas tienen un alto grado de especificidad por sus hospederos (Fernández, datos no publicados). Esto hace que las bartonellas y sus hospederos no sean un sistema ideal para que actúe el efecto de dilución, ya que en general el efecto de dilución ocurre cuando los vectores o los patógenos de transmisión directa son generalistas. Sin embargo, se pueden estar dando ciertos mecanismos del efecto de dilución donde ciertas conductas de los hospederos provoquen estas diferencias en las prevalencias en las distintas comunidades. Por ejemplo, una mayor diversidad de especies puede disminuir los encuentros entre individuos de una misma especie (Keesing *et al.*, 2006), y por ende, disminuir también los encuentros entre las pulgas y otros hospederos específicos para ellas.

El estudio a diferentes escalas espaciales nos puede generar un mayor entendimiento de la ecología de enfermedades (Ostfeld *et al.*, 2005). En este estudio no se encontró una asociación significativa entre la prevalencia del patógeno y la diversidad de especies a un nivel local de análisis, a diferencia del análisis a escala regional. Estos distintos resultados

pueden deberse a que al ampliar el análisis a una mayor zona geográfica, encontremos mayores gradientes y contrastes entre las comunidades de hospederos y por ende, mayores diferencias en las prevalencias de infección. Resultados similares se han visto, por ejemplo, en la influencia de la abundancia de un reservorio de hantavirus sobre Sin Nombre virus, donde Carver *et al.* (2011b) encuentran una relación entre ambas variables a una escala regional, pero no local.

El análisis enfocado a la prevalencia de *Bartonella* spp. en *D. merriami*, no arrojó una relación significativa con la diversidad de especies, lo que nos puede sugerir que las distintas bartonellas de una misma zona geográfica pueden tener distintas respuestas a los cambios de diversidad de especies en las comunidades. Esto puede ser importante a la hora de enfocarnos en un grupo de patógenos de un mismo género o a una especie de patógeno en particular. Al igual que con sus hospederos, las bartonellas en el área de estudio presentan cierto grado de especificidad con sus vectores (pulgas) (Fernández, datos no publicados), por lo que las características de cada vector puede ser un factor que explique estos distintos resultados.

Además de la influencia de la diversidad de especies sobre la prevalencia de patógenos, la composición de las comunidades y en particular la identidad de ciertas especies dentro de las comunidades pueden influir en la transmisión de los patógenos, fenómeno denominado “efecto de la identidad” (Hantsch *et al.*, 2013). En este estudio no se encontró una relación entre la prevalencia de infección en *D. merriami* y otras especies de roedores que se sabe que se pueden infectar con las mismas cepas de *Bartonella* y que potencialmente podrían influir en la prevalencia de *Bartonella* en esta especie.

Debido a la gran diversidad de genotipos, hospederos y vectores que presentan las bartonellas (Buffet *et al.*, 2013), el estudio de la ecología de estas bacterias es complejo. Si bien existe evidencia de que la diversidad de especies puede disminuir las prevalencias de *Bartonella* en los hospederos, este estudio encontró que el potencial efecto de la diversidad de especies puede depender de las escalas espaciales que se estudien, así como también de las distintas especies de *Bartonella*.

REFERENCIAS

- BAI, Y., KOSOY, M. Y., CALISHER, C. H., CULLY, J. F. & COLLINGE, S. K. 2009. Effects of rodent community diversity and composition on prevalence of an endemic bacterial pathogen - *Bartonella*. *Biodiversity*, 10.
- BAI, Y., KOSOY, M. Y., CULLY, J. F., BALA, T., RAY, C. & COLLINGE, S. K. 2007. Acquisition of nonspecific *Bartonella* strains by the northern grasshopper mouse (*Onychomys leucogaster*). *FEMS microbiology ecology*, 61, 438-448.
- BREITSCHWERDT, E. B., MAGGI, R. G., CHOMEL, B. B. & LAPPIN, M. R. 2010. Bartonellosis: an emerging infectious disease of zoonotic importance to animals and human beings. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 20, 8-30.
- BUFFET, J.-P., KOSOY, M. & VAYSSIER-TAUSSAT, M. 2013. Natural history of *Bartonella*-infecting rodents in light of new knowledge on genomics, diversity and evolution. *Future microbiology*, 8, 1117-1128.
- CARVER, S., KUENZI, A., BAGAMIAN, K. H., MILLS, J. N., ROLLIN, P. E., ZANTO, S. N. & DOUGLASS, R. 2011a. A temporal dilution effect: hantavirus infection in deer mice and the intermittent presence of voles in Montana. *Oecologia*, 166, 713-721.
- CARVER, S., TRUEAX, J. T., DOUGLASS, R. & KUENZI, A. 2011b. Delayed density-dependent prevalence of Sin Nombre virus infection in deer mice (*Peromyscus maniculatus*) in central and western Montana. *Journal of Wildlife Diseases*, 47, 56-63.
- CEBALLOS, G., DAVIDSON, A., LIST, R., PACHECO, J., MANZANO-FISCHER, P., SANTOS-BARRERA, G. & CRUZADO, J. 2010. Rapid decline of a grassland system and its ecological and conservation implications. *Plos One*, 5.
- EZENWA, V. O., GODSEY, M. S., KING, R. J. & GUPTILL, S. C. 2006. Avian diversity and West Nile virus: testing associations between biodiversity and infectious disease risk. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 273, 109-117.
- GILBERT, L., NORMAN, R., LAURENSEN, K. M., REID, H. W. & HUDSON, P. J. 2001. Disease persistence and apparent competition in a three-host community: an

- empirical and analytical study of large-scale, wild populations. *Journal of Animal Ecology*, 70, 1053-1061.
- GUTIÉRREZ, R., KRASNOV, B., MORICK, D., GOTTLIEB, Y., KHOKHLOVA, I. S. & HARRUS, S. 2015. *Bartonella* Infection in Rodents and Their Flea Ectoparasites: An Overview. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 15, 27-39.
- HALL, S. R., BECKER, C. R., SIMONIS, J. L., DUFFY, M. A., TESSIER, A. J. & CACERES, C. E. 2009. Friendly competition: evidence for a dilution effect among competitors in a planktonic host-parasite system. *Ecology*, 90, 791-801.
- HANTSCH, L., BRAUN, U., SCHERER-LORENZEN, M. & BRUELHEIDE, H. 2013. Species richness and species identity effects on occurrence of foliar fungal pathogens in a tree diversity experiment. *Ecosphere*, 4, 81.
- HUANG, Z. Y., DE BOER, W. F., VAN LANGEVELDE, F., XU, C., JEBARA, K. B., BERLINGIERI, F. & PRINS, H. H. 2013. Dilution effect in bovine tuberculosis: risk factors for regional disease occurrence in Africa. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280, 20130624.
- KAISER, P. O., RIESS, T., O'ROURKE, F., LINKE, D. & KEMPF, V. A. 2011. *Bartonella* spp.: throwing light on uncommon human infections. *International Journal of Medical Microbiology*, 301, 7-15.
- KEDEM, H., COHEN, C., MESSIKA, I., EINAV, M., PILOSOFF, S. & HAWLENA, H. 2014. Multiple effects of host-species diversity on coexisting host-specific and host-opportunistic microbes. *Ecology*, 95, 1173-1183.
- KEESING, F., BELDEN, L. K., DASZAK, P., DOBSON, A., HARVELL, C. D., HOLT, R. D., HUDSON, P., JOLLES, A., JONES, K. E., MITCHELL, C. E., MYERS, S. S., BOGICH, T. & OSTFELD, R. S. 2010. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature*, 468, 647-652.
- KEESING, F., HOLT, R. D. & OSTFELD, R. S. 2006. Effects of species diversity on disease risk. *Ecology Letters*, 9, 485-498.
- KOSOY, M., SAITO, E., GREEN, D., MARSTON, E., JONES, D. & CHILDS, J. 2000. Experimental evidence of host specificity of *Bartonella* infection in rodents. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 23, 221-238.

- NORMAN, A., REGNERY, R., JAMESON, P., GREENE, C. & KRAUSE, D. 1995. Differentiation of Bartonella-like isolates at the species level by PCR-restriction fragment length polymorphism in the citrate synthase gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 33, 1797-1803.
- OSTFELD, R. S., GLASS, G. E. & KEESING, F. 2005. Spatial epidemiology: an emerging (or re-emerging) discipline. *Trends in Ecology & Evolution*, 20, 328-336.
- OSTFELD, R. S. & KEESING, F. 2000. Biodiversity and disease risk: The case of lyme disease. *Conservation Biology*, 14, 722-728.
- OSTFELD, R. S. & KEESING, F. 2012. Effects of Host Diversity on Infectious Disease. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43, 157-182.
- PFÄFFLE, M., LITWIN, N., PETNEY, T., PFÄFFLE, M., LITWIN, N. & PETNEY, T. N. 2015. The relationship between biodiversity and disease transmission risk. *International Journal of Nanomedicine*, 10, 2423-2439.
- RUBIO, A. V., AVILA-FLORES, R., OSIKOWICZ, L. M., BAI, Y., SUZÁN, G. & KOSOY, M. Y. 2014. Prevalence and Genetic Diversity of Bartonella Strains in Rodents from Northwestern Mexico. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 14, 838-845.
- SALKELD, D. J., PADGETT, K. A. & JONES, J. H. 2013. A meta-analysis suggesting that the relationship between biodiversity and risk of zoonotic pathogen transmission is idiosyncratic. *Ecology Letters*.
- SEARLE, C. L., BIGA, L. M., SPATAFORA, J. W. & BLAUSTEIN, A. R. 2011. A dilution effect in the emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 16322-16326.
- SIKES, R. S. & GANNON, W. L. 2011. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *Journal of Mammalogy*, 92, 235-253.

- SUZÁN, G., MARCE, E., GIERMAKOWSKI, J. T., MILLS, J. N., CEBALLOS, G., OSTFELD, R. S., ARMIEN, B., PASCALE, J. M. & YATES, T. L. 2009. Experimental Evidence for Reduced Rodent Diversity Causing Increased Hantavirus Prevalence. *Plos One*, 4.
- TELFER, S., BOWN, K. J., SEKULES, R., BEGON, I., HAYDEN, T. & BIRTLES, R. 2005. Disruption of a host-parasite system following the introduction of an exotic host species. *Parasitology*, 130, 661-668.
- WOOD, C. L., LAFFERTY, K. D., DELEO, G., YOUNG, H. S., HUDSON, P. J. & KURIS, A. M. 2014. Does biodiversity protect humans against infectious disease? *Ecology*, 95, 817-832.

DISCUSIÓN GENERAL

Uno de los temas que ha generado gran interés dentro de la disciplina de la ecología de enfermedades y también en otras disciplinas del área ambiental y del área de la salud, son los efectos que puede tener la biodiversidad sobre las dinámicas de patógenos y el riesgo para el ser humano. Ciertas actividades antropogénicas como la agricultura y urbanización entre otras, provocan una reducción y fragmentación de los hábitats naturales, lo cual ha conducido a modificaciones y pérdida de la biodiversidad. A su vez, esto cambia las estructuras y composiciones de las comunidades de hospederos silvestres de patógenos zoonóticos y puede generar cambios en la transmisión de los mismos. En este contexto se enmarcó esta tesis, cuyos objetivos fueron examinar aspectos de la biodiversidad y su relación con la prevalencia de agentes infecciosos zoonóticos o con variables poblacionales y conductuales de los reservorios.

Primero se examinó las respuestas de los pequeños mamíferos de América a la fragmentación de hábitat, que es uno de los factores que más modifica la biodiversidad y las comunidades silvestres (Fahrig, 2003). Si bien existen muchos estudios sobre fragmentación, pocos abordan temáticas de patógenos (Suzán *et al.*, 2012). Se estudiaron variables que pueden influir en la prevalencia de hantavirus como las abundancias y la riqueza de roedores. Encontramos que cuando se fragmentan los hábitats naturales, en general los reservorios de hantavirus aumentan su abundancia, mientras que otras especies no reservorios disminuyen, lo que puede ser un potencial riesgo para el ser humano, bajo el supuesto que en los hantavirus actúa el efecto de dilución. Los resultados de este capítulo pueden servir de información, por ejemplo, para el manejo de paisajes con un alto grado de fragmentación y en lugares donde el hantavirus es un riesgo para la salud pública. Continuando con hantavirus, los siguientes dos capítulos fueron estudios de campo, donde se estudiaron dos aspectos muy poco conocidos en la literatura actual sobre ecología de hantavirus y sus reservorios. Primero, se examinó el posible efecto indirecto de una especie clave de los ecosistemas de pastizal (perrito de las praderas, *Cynomys ludovicianus*) sobre las comunidades de roedores del noroeste de Chihuahua, con un enfoque en la abundancia

de las especies reservorios de hantavirus y la prevalencia en éstos. El principal resultado fue que el hábitat donde más abundan los reservorios es el matorral de mezquite, el cual es controlado por los perritos de las praderas, los cuales evitan la expansión de esta vegetación. Este resultado nos demuestra que la conservación del perrito de la pradera puede ser importante no sólo para el ecosistema de pastizal, sino directamente para la salud humana, al evitar que el principal hábitat de los reservorios de hantavirus en esa zona se expanda. Este capítulo abre una temática que no se había investigado antes con ninguna especie clave en el mundo, hasta donde sabemos. El último capítulo sobre hantavirus se enfocó en aspectos conductuales de los reservorios que podrían influir en la transmisión de estos virus. Para ello se realizó una aproximación experimental en el campo, una metodología poco usada en estos tipos de estudios. Encontramos que los reservorios no cambian sus patrones de actividad ante la presencia de otras 3 especies de roedores y tampoco modificaron sus frecuencias de encuentros. Otro resultado interesante fue que se encontraron diferencias en los patrones de actividad entre algunas especies, al igual que diferencias entre especies en las interacciones con la especie reservorio de hantavirus.

Los dos últimos capítulos se enfocaron en las bacterias del género *Bartonella*. Debido a que existía muy poca información sobre estas bacterias en roedores de México, primero se realizó un estudio para conocer las distintas cepas en los roedores del área de estudio y la prevalencia de infección. Se pudo detectar una alta prevalencia general (cercana al 50%), también diferencias en las prevalencias entre especies y distintos genotipos de *Bartonella* asociados a ciertos géneros o especies de roedores. Con esta información se analizó la relación de la prevalencia de *Bartonella* spp. con la diversidad de especies en dos escalas espaciales, las cuales arrojaron distintos resultados, indicando la importancia de estudiar esta temática en diferentes escalas espaciales.

Debido a la relevancia del papel de la biodiversidad en la dinámica de transmisión de patógenos, la relación biodiversidad-patógenos ha sido en los últimos años muy estudiada (Keesing *et al.*, 2010; Cardinale *et al.*, 2012; Estrada-Peña *et al.*, 2014), siendo actualmente unos de los temas que más ha interesado a los investigadores de área de la ecología de enfermedades. A pesar del creciente avance en esta temática, aun existen muchas interrogantes con respecto a las generalidades y patrones que pueden presentarse en

la relación biodiversidad-patógenos, como por ejemplo el efecto de dilución, el cual por un lado, cada vez existen más evidencias de este fenómeno en distintos sistemas, pero a la vez aumentan las críticas a la generalidad de fenómeno por la falta de estudios en distintos patógenos, distintas escalas espaciales y geográficas (Salked *et al.*, 2013; Wood *et al.*, 2014; Ostfeld & Keesing 2013; Wood & Lafferty, 2013). Para profundizar en esta temática, esta tesis abordó distintos estudios de la relación biodiversidad-patógenos con enfoques que no se han estudiado mucho anteriormente, como el papel de una especie clave, el análisis a diferentes escalas espaciales y la utilización de experimentos de campo. En general los resultados obtenidos en los distintos capítulos de esta tesis demostraron que la diversidad de roedores o la identidad de ciertas especies pueden ser importantes para la dinámica de transmisión de patógenos o para variables que pueden influir en la prevalencia, como las frecuencias de encuentros o la abundancia de reservorios. En un plano local (zona del noroeste de Chihuahua), esta tesis aportó resultados sobre hantavirus y *Bartonella* spp. y las comunidades de hospederos, los cuales pueden ser útiles para planes de manejo de la Reserva de la Biósfera de Janos y zonas aledañas. Por ejemplo, la preservación y recuperación del perrito de la pradera como un especie que evita la expansión del hábitat con mayor abundancia de reservorios de hantavirus. Por otro lado, a nivel general, esta tesis aportó a la investigación de la relación entre la diversidad de especies y dinámica de patógenos con temáticas y aproximaciones novedosas que pueden servir como modelo para continuar estudiando y profundizando en estos temas en distintas zonas geográficas y con distintos patógenos.

REFERENCIAS

- ARELLANO, E., CASTRO-ARELLANO, I., SUZÁN, G., GONZÁLEZ-CÓZATL, F. X. & JIMÉNEZ, R. M. 2012. Antibody Seroprevalence to Hantaviruses in Rodents from Reserva De La Biosfera Sierra De Huautla, Morelos. *Western North American Naturalist*, 72, 105-109.
- BAI, Y., KOSOY, M. Y., CALISHER, C. H., CULLY, J. F. & COLLINGE, S. K. 2009. Effects of rodent community diversity and composition on prevalence of an endemic bacterial pathogen - *Bartonella*. *Biodiversity*, 10.
- BAI, Y., KOSOY, M. Y., CULLY, J. F., BALA, T., RAY, C. & COLLINGE, S. K. 2007. Acquisition of nonspecific *Bartonella* strains by the northern grasshopper mouse (*Onychomys leucogaster*). *FEMS Microbiology Ecology*, 61, 438-448.
- BIRTLES, R. J., CANALES, J., VENTOSILLA, P., ALVAREZ, E., GUERRA, H., LLANOS-CUENTAS, A., RAOULT, D., DOSHI, N. & HARRISON, T. G. 1999. Survey of *Bartonella* species infecting intradomicillary animals in the Huayllacallán Valley, Ancash, Peru, a region endemic for human bartonellosis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60, 799-805.
- BREITSCHWERDT, E. B., MAGGI, R. G., CHOMEL, B. B. & LAPPIN, M. R. 2010. Bartonellosis: an emerging infectious disease of zoonotic importance to animals and human beings. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 20, 8-30.
- BUFFET, J.-P., KOSOY, M. & VAYSSIER-TAUSSAT, M. 2013. Natural history of *Bartonella*-infecting rodents in light of new knowledge on genomics, diversity and evolution. *Future microbiology*, 8, 1117-1128.
- CARDINALE, B. J., DUFFY, J. E., GONZALEZ, A., HOOPER, D. U., PERRINGS, C., VENAIL, P., NARWANI, A., MACE, G. M., TILMAN, D., WARDLE, D. A., KINZIG, A. P., DAILY, G. C., LOREAU, M., GRACE, J. B., LARIGAUDERIE, A., SRIVASTAVA, D. S. & NAEEM, S. 2012. Biodiversity loss and its impact on humanity. *Nature*, 486, 59-67.
- CARLSON, J. C., DYER, L. A., OMLIN, F. X. & BEIER, J. C. 2009. Diversity cascades and malaria vectors. *Journal of Medical Entomology*, 46, 460-464.
- CARVER, S., KUENZI, A., BAGAMIAN, K. H., MILLS, J. N., ROLLIN, P. E., ZANTO, S. N. & DOUGLASS, R. 2011. A temporal dilution effect: hantavirus infection in deer mice and the intermittent presence of voles in Montana. *Oecologia*, 166, 713-721.

- CASTRO-ARELLANO, I., SUZÁN, G., LEÓN, R. F., JIMÉNEZ, R. M. & LACHER, T. E. 2009. Survey for antibody to hantaviruses in Tamaulipas, Mexico. *Journal of Wildlife Diseases*, 45, 207-212.
- CHILDS, J. E., KSIAZEK, T. G., SPIROPOULOU, C. F., KREBS, J. W., MORZUNOV, S., MAUPIN, G. O., GAGE, K. L., ROLLIN, P. E., SARISKY, J., ENSCORE, R. E., FREY, J. K., PETERS, C. J. & NICHOL, S. T. 1994. Serologic and genetic identification of *Peromyscus maniculatus* as the primary rodent reservoir for a new hantavirus in the southwestern United States. *Journal of Infectious Diseases*, 169, 1271-1280.
- CHU, Y.-K., OWEN, R. D., SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, C., ROMERO-ALMARAZ, M. D. L. & JONSSON, C. B. 2008. Genetic characterization and phylogeny of a hantavirus from Western Mexico. *Virus Research*, 131, 180-188.
- CLAY, C. A., LEHMER, E. M., JEOR, S. S. & DEARING, M. D. 2009. Sin Nombre Virus and Rodent Species Diversity: A Test of the Dilution and Amplification Hypotheses. *Plos One*, 4.
- COSTA, F., PORTER, F. H., RODRIGUES, G., FARIAS, H., DE FARIA, M. T., WUNDER, E. A., OSIKOWICZ, L. M., KOSOY, M. Y., REIS, M. G. & KO, A. I. 2014. Infections by *Leptospira interrogans*, Seoul Virus, and *Bartonella* spp. Among Norway Rats (*Rattus norvegicus*) from the Urban Slum Environment in Brazil. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 14, 33-40.
- DALY, J. S., WORTHINGTON, M. G., BRENNER, D. J., MOSS, C. W., HOLLIS, D. G., WEYANT, R. S., STEIGERWALT, A. G., WEAVER, R. E., DANESHVAR, M. I. & O'CONNOR, S. P. 1993. *Rochalimaea elizabethae* sp. nov. isolated from a patient with endocarditis. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 872-881.
- DASZAK, P. & CUNNINGHAM, A. A. 2002. Emerging infectious diseases: a key role for conservation medicine. *Conservation medicine: Ecological health in practice*, 40-61.
- DASZAK, P., CUNNINGHAM, A. A. & HYATT, A. D. 2000. Wildlife ecology - Emerging infectious diseases of wildlife - Threats to biodiversity and human health. *Science*, 287, 443-449.
- DERNE, B. T., FEARNLEY, E. J., LAU, C. L., PAYNTER, S. & WEINSTEIN, P. 2011. Biodiversity and leptospirosis risk: A case of pathogen regulation? *Medical Hypotheses*, 77, 339-344.
- ESTRADA-PEÑA, A., OSTFELD, R. S., PETERSON, A. T., POULIN, R. & DE LA FUENTE, J. 2014. Effects of environmental change on zoonotic disease risk: an ecological primer. *Trends in parasitology*, 30, 205-214.

- EZENWA, V. O., GODSEY, M. S., KING, R. J. & GUPTILL, S. C. 2006. Avian diversity and West Nile virus: testing associations between biodiversity and infectious disease risk. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 273, 109-117.
- FAHRIG, L. 2003. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 34, 487-515.
- FLORES, L. & MORALES, J. 2001. Situación de los hantavirus en México. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*, 21, 575.
- GILBERT, L., NORMAN, R., LAURENSEN, K. M., REID, H. W. & HUDSON, P. J. 2001. Disease persistence and apparent competition in a three-host community: an empirical and analytical study of large-scale, wild populations. *Journal of Animal Ecology*, 70, 1053-1061.
- GLASS, G., CHILDS, J., KORCH, G. & LEDUC, J. 1988. Association of intraspecific wounding with hantaviral infection in wild rats (*Rattus norvegicus*). *Epidemiology and Infection*, 101, 459-472.
- GUNDI, V., BILLETER, S. A., ROOD, M. P. & KOSOY, M. Y. 2012. *Bartonella* spp. in rats and zoonoses, Los Angeles, California, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 18, 631-633.
- GUTIÉRREZ, R., KRASNOV, B., MORICK, D., GOTTLIEB, Y., KHOKHLOVA, I. S. & HARRUS, S. 2015. *Bartonella* Infection in Rodents and Their Flea Ectoparasites: An Overview. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 15, 27-39.
- HINSON, E. R., SHONE, S. M., ZINK, M. C., GLASS, G. E. & KLEIN, S. L. 2004. Wounding: the primary mode of Seoul virus transmission among male Norway rats. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 70, 310-317.
- HJELLE, B., ANDERSON, B., TORREZ-MARTINEZ, N., SONG, W., GANNON, W. L. & YATES, T. L. 1995. Prevalence and geographic genetic variation of hantaviruses of New World harvest mice (*Reithrodontomys*): identification of a divergent genotype from a Costa Rican *Reithrodontomys mexicanus*. *Virology*, 207, 452-459.
- HJELLE, B. & TORRES-PEREZ, F. 2010. Hantaviruses in the Americas and Their Role as Emerging Pathogens. *Viruses*, 2, 2559-2586.
- HOUGH, R. L. 2014. Biodiversity and human health: evidence for causality? *Biodiversity and conservation*, 23, 267-288.
- HUANG, Z. Y., DE BOER, W. F., VAN LANGEVELDE, F., XU, C., JEBARA, K. B., BERLINGIERI, F. & PRINS, H. H. 2013. Dilution effect in bovine tuberculosis:

- risk factors for regional disease occurrence in Africa. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 280, 20130624.
- JARDINE, C., APPELYARD, G., KOSOY, M. Y., MCCOLL, D., CHIRINO-TREJO, M., WOBESER, G. & LEIGHTON, F. A. 2005. Rodent-associated *Bartonella* in Saskatchewan, Canada. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 5, 402-409.
- JARDINE, C., MCCOLL, D., WOBESER, G. & LEIGHTON, F. A. 2006. Diversity of *Bartonella* genotypes in Richardson's ground squirrel populations. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 6, 395-403.
- JOHNSON, P. T. J., LUND, P. J., HARTSON, R. B. & YOSHINO, T. P. 2009. Community diversity reduces *Schistosoma mansoni* transmission, host pathology and human infection risk. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 276, 1657-1663.
- JOHNSON, P. T. J., PRESTON, D. L., HOVERMAN, J. T., & RICHGELS, D K. L. 2013. Biodiversity reduces disease through predictable changes in host community competence. *Nature*, 494, 230-234.
- JONES, K. E., PATEL, N. G., LEVY, M. A., STOREYGARD, A., BALK, D., GITTLEMAN, J. L. & DASZAK, P. 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, 451, 990-U4.
- JONSSON, C. B., MORAES FIGUEIREDO, L. T. & VAPALAHTI, O. 2010. A Global Perspective on Hantavirus Ecology, Epidemiology, and Disease. *Clinical Microbiology Reviews*, 23, 412-+.
- KAISER, P. O., RIESS, T., O'ROURKE, F., LINKE, D. & KEMPF, V. A. 2011. *Bartonella* spp.: throwing light on uncommon human infections. *International Journal of Medical Microbiology*, 301, 7-15.
- KARIWA, H., YOSHIDA, H., SANCHEZ-HERNANDEZ, C., DE LOURDES ROMERO-ALMARAZ, M., ALBERTO ALMAZAN-CATALAN, J., RAMOS, C., MIYASHITA, D., SETO, T., TAKANO, A., TOTANI, M., MURATA, R., SAASA, N., ISHIZUKA, M., SANADA, T., YOSHII, K., YOSHIMATSU, K., ARIKAWA, J. & TAKASHIMA, I. 2012. Genetic diversity of hantaviruses in Mexico: Identification of three novel hantaviruses from Neotominae rodents. *Virus Research*, 163, 486-494.
- KARIWA, H., YOSHIMATSU, K. & ARIKAWA, J. 2007. Hantavirus infection in East Asia. *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, 30, 341-356.

- KEDEM, H., COHEN, C., MESSIKA, I., EINAV, M., PILOSOFF, S. & HAWLENA, H. 2014. Multiple effects of host-species diversity on coexisting host-specific and host-opportunistic microbes. *Ecology*, 95, 1173-1183.
- KEESING, F., BELDEN, L. K., DASZAK, P., DOBSON, A., HARVELL, C. D., HOLT, R. D., HUDSON, P., JOLLES, A., JONES, K. E., MITCHELL, C. E., MYERS, S. S., BOGICH, T. & OSTFELD, R. S. 2010. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. *Nature*, 468, 647-652.
- KEESING, F., HOLT, R. D. & OSTFELD, R. S. 2006. Effects of species diversity on disease risk. *Ecology Letters*, 9, 485-498.
- KERKHOFF, F., BERGMANS, A., VAN DER ZEE, A. & ROTHOVA, A. 1999. Demonstration of *Bartonella grahamii* DNA in ocular fluids of a patient with neuroretinitis. *Journal of clinical microbiology*, 37, 4034-4038.
- KHALIL, H., HÖRNFELDT, B., EVANDER, M., MAGNUSSON, M., OLSSON, G. & ECKE, F. 2014. Dynamics and Drivers of Hantavirus Prevalence in Rodent Populations. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 14, 537-551.
- KILPATRICK, A. M., DASZAK, P., JONES, M. J., MARRA, P. P., & KRAMER, L. D. 2006. Host heterogeneity dominates West Nile virus transmission. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 273, 2327-2333.
- KOSOY, M., BAI, Y., SHEFF, K., MORWAY, C., BAGGETT, H., MALONEY, S. A., BOONMAR, S., BHENGSRISRI, S., DOWELL, S. F. & SITDHIRASDR, A. 2010. Identification of *Bartonella* infections in febrile human patients from Thailand and their potential animal reservoirs. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 82, 1140-1145.
- KOSOY, M., MURRAY, M., GILMORE, R. D., BAI, Y. & GAGE, K. L. 2003. *Bartonella* strains from ground squirrels are identical to *Bartonella washoensis* isolated from a human patient. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 645-650.
- LOGIUDICE, K., OSTFELD, R. S., SCHMIDT, K. A. & KEESING, F. 2003. The ecology of infectious disease: Effects of host diversity and community composition on Lyme disease risk. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100, 567-571.
- MANTOOTH, S. J., MILAZZO, M. L., BRADLEY, R. D., HICE, C. L., CEBALLOS, G., TESH, R. B. & FULHORST, C. F. 2001. Geographical distribution of rodent-associated hantaviruses in Texas. *Journal of Vector Ecology*, 26, 7-14.
- MILAZZO, M. L., CAJIMAT, M. N., ROMO, H. E., ESTRADA-FRANCO, J. G., IÑIGUEZ-DÁVALOS, L. I., BRADLEY, R. D. & FULHORST, C. F. 2012.

- Geographic Distribution of Hantaviruses Associated with Neotomine and Sigmodontine Rodents, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 18, 571.
- MILLS, J. 2005. Regulation of rodent-borne viruses in the natural host: implications for human disease. *Infectious Diseases from Nature: Mechanisms of Viral Emergence and Persistence*. Springer.
- MORENO-TORRES, K., GUAL-SILL, F., MORALES-JIMÉNEZ, R., RUBIO, A.V., CEBALLOS, G., SUZÁN, G. En Prensa. Serological survey of hantavirus in rodents from prairie dog ecosystems in Chihuahua, Mexico. *Southwestern Naturalist*.
- MORSE, S. S. 1995. Factors in the emergence of infectious diseases. *Emerging Infectious Diseases*, 1, 7-15.
- MORWAY, C., KOSOY, M., EISEN, R., MONTENIERI, J., SHEFF, K., REYNOLDS, P. J. & POWERS, N. 2008. A longitudinal study of *Bartonella* infection in populations of woodrats and their fleas. *Journal of Vector Ecology*, 33, 353-364.
- MURANYI, W., BAHR, U., ZEIER, M. & VAN DER WOUDE, F. J. 2005. Hantavirus infection. *Journal of the American Society of Nephrology*, 16, 3669-3679.
- NICHOL, S. T., SPIROPOULOU, C. F., MORZUNOV, S., ROLLIN, P. E., KSIAZEK, T. G., FELDMANN, H., SANCHEZ, A., CHILDS, J., ZAKI, S. & PETERS, C. J. 1993. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science*, 262, 914-917.
- ORROCK, J. L., ALLAN, B. F. & DROST, C. A. 2011. Biogeographic and ecological regulation of disease: Prevalence of Sin Nombre virus in island mice is related to island area, precipitation, and predator richness. *The American Naturalist*, 177, 691-697.
- OSTFELD, R. S. & KEESING, F. 2000. Biodiversity and disease risk: The case of lyme disease. *Conservation Biology*, 14, 722-728.
- OSTFELD, R. S. & KEESING, F. 2012. Effects of Host Diversity on Infectious Disease. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 43, 157-182.
- OSTFELD, R. S. & KEESING, F. 2013. Straw men don't get Lyme disease: response to Wood and Lafferty. *Trends in Ecology & Evolution*, 28, 502-503.
- PIUDO, L., MONTEVERDE, M. J., WALKER, R. S. & DOUGLASS, R. J. 2011. Rodent community structure and Andes virus infection in sylvan and peridomestic habitats in northwestern Patagonia, Argentina. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11, 315-324.

- PLYUSNIN, A., MORZUNOV, S. P. 2001. Virus evolution and genetic diversity of hantaviruses and their rodent hosts. En: Hantaviruses. Springer Berlin Heidelberg, p. 47-75.
- SALKELD, D. J., PADGETT, K. A. & JONES, J. H. 2013. A meta-analysis suggesting that the relationship between biodiversity and risk of zoonotic pathogen transmission is idiosyncratic. *Ecology Letters*, 5, 679–686,
- SEARLE, C. L., BIGA, L. M., SPATAFORA, J. W. & BLAUSTEIN, A. R. 2011. A dilution effect in the emerging amphibian pathogen *Batrachochytrium dendrobatidis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 16322-16326.
- SUZÁN, G., CEBALLOS, G., MILLS, J., KSIAZEK, T. G. & YATES, T. 2001. Serologic evidence of hantavirus infection in sigmodontine rodents in Mexico. *Journal of Wildlife Diseases*, 37, 391-393.
- SUZÁN, G., ESPONDA, F., CARRASCO-HERNÁNDEZ, R. & AGUIRRE, A. A. 2012. Habitat fragmentation and infectious disease ecology. *New Directions in Conservation Medicine: Applied Cases of Ecological Health*, 135-150.
- SUZÁN, G., MARCE, E., GIERMAKOWSKI, J. T., MILLS, J. N., CEBALLOS, G., OSTFELD, R. S., ARMIEN, B., PASCALE, J. M. & YATES, T. L. 2009. Experimental Evidence for Reduced Rodent Diversity Causing Increased Hantavirus Prevalence. *Plos One*, 4.
- TELFER, S., BOWN, K. J., SEKULES, R., BEGON, I., HAYDEN, T. & BIRTLES, R. 2005. Disruption of a host-parasite system following the introduction of an exotic host species. *Parasitology*, 130, 661-668.
- TERSAGO, K., SCHREURS, A., LINARD, C., VERHAGEN, R., VAN DONGEN, S. & LEIRS, H. 2008. Population, environmental, and community effects on local bank vole (*Myodes glareolus*) Puumala virus infection in an area with low human incidence. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 8, 235-244.
- TORO, J., VEGA, J. D., KHAN, A. S., MILLS, J. N., PADULA, P., TERRY, W., YADÓN, Z., VALDERRAMA, R., ELLIS, B. A. & PAVLETIC, C. 1998. An outbreak of hantavirus pulmonary syndrome, Chile, 1997. *Emerging Infectious Diseases*, 4, 687.
- VADO-SOLÍS, I., PÉREZ-OSORIO, C., LARA-LARA, J., RUIZ-PIÑA, H. A., CÁRDENAS-MARRUFO, M., MILAZZO, M. L., FULHORS, C. F. & ZAVALA-VELÁZQUEZ, J. 2003. Evidencia serológica de infección por Hantavirus en población humana del estado de Yucatán, México. *Revista Biomédica*, 14, 221-225.

- VÁZQUEZ-PÉREZ, J., MORENO-VALENCIA, Y. & PÉREZ-PADILLA, R. ¿ Dónde están las neumonías por hantavirus en México?. *Neumología y Cirugía de Tórax*, 71, 287-288.
- VINCENT, M. J., QUIROZ, E., GRACIA, F., SANCHEZ, A. J., KSIAZEK, T. G., KITSUTANI, P. T., RUEDAS, L. A., TINNIN, D. S., CACERES, L. & GARCIA, A. 2000. Hantavirus pulmonary syndrome in Panama: identification of novel hantaviruses and their likely reservoirs. *Virology*, 277, 14-19.
- VOUTILAINEN, L., SAVOLA, S., KALLIO, E. R., LAAKKONEN, J., VAHERI, A., VAPALAHTI, O. & HENTTONEN, H. 2012. Environmental Change and Disease Dynamics: Effects of Intensive Forest Management on Puumala Hantavirus Infection in Boreal Bank Vole Populations. *Plos One*, 7.
- WELCH, D. F., CARROLL, K. C., HOFMEISTER, E. K., PERSING, D. H., ROBISON, D. A., STEIGERWALT, A. G. & BRENNER, D. J. 1999. Isolation of a New Subspecies, *Bartonella vinsoni* subsp. *arupensis*, from a Cattle Rancher: Identity with Isolates Found in Conjunction with *Borrelia burgdorferi* and *Babesia microti* among Naturally Infected Mice. *Journal of clinical microbiology*, 37, 2598-2601.
- WOOD, C. L. & LAFFERTY, K. D. 2013. Biodiversity and disease: a synthesis of ecological perspectives on Lyme disease transmission. *Trends in Ecology & Evolution*, 28, 239-247.
- WOOD, C. L., LAFFERTY, K. D., DELEO, G., YOUNG, H. S., HUDSON, P. J. & KURIS, A. M. 2014. Does biodiversity protect humans against infectious disease? *Ecology*, 95, 817-832.
- YATES, T. L., MILLS, J. N., PARMENTER, C. A., KSIAZEK, T. G., PARMENTER, R. R., VANDE CASTLE, J. R., CALISHER, C. H., NICHOL, S. T., ABBOTT, K. D. & YOUNG, J. C. 2002. The Ecology and Evolutionary History of an Emergent Disease: Hantavirus Pulmonary Syndrome. *Bioscience*, 52, 989-998.
- YOUNG, H. S., DIRZO, R., HELGEN, K. M., MCCAULEY, D. J., BILLETER, S. A., KOSOY, M. Y., OSIKOWICZ, L. M., SALKELD, D. J., YOUNG, T. P. & DITTMAR, K. 2014. Declines in large wildlife increase landscape-level prevalence of rodent-borne disease in Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111, 7036-7041.
- ZAPATA, C. 2014. Desarrollo del protocolo epidemiológico para la reintroducción de perritos de la pradera de cola negra (*Cynomys ludovicianus*) en el municipio de Santa Cruz, Sonora México, como modelo para los lineamientos de reintroducción de especies silvestres. Tesis de Maestría, UNAM.