

BROTE EPIDEMICO DEL SINDROME PULMONAR POR HANTAVIRUS EN LA ARGENTINA EVIDENCIA MOLECULAR DE LA TRANSMISION PERSONA A PERSONA DEL VIRUS ANDES

PAULA J. PADULA, ALEXIS EDELSTEIN, SERGIO D.L. MIGUEL, NORA M. LOPEZ, CARLOS M. ROSSI,
 ROBERTO D. RABINOVICH

Servicio de Biología Molecular, Departamento de Virología, Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud, ANLIS Dr. Carlos G. Malbrán, Buenos Aires

Los hantavirus, miembros de la familia *Bunyaviridae*, son virus envueltos de genoma trisegmentado, con polaridad negativa. Se mantienen en la naturaleza principalmente en un reservorio específico, roedor o insectívoro, no conociéndose vectores o reservorios de mayor movilidad tales como insectos, aves o humanos. Muchos hantavirus han sido asociados con enfermedades zoonóticas¹.

Los hantavirus del viejo mundo, Hantaan (HTN), Seoul (SEO), y Puumala (PUU), son agentes causales de fiebres hemorrágicas con síndrome renal (HFRS) en China, Corea, Rusia y Europa. La mortalidad en los casos de HFRS varía entre 3 - 7% para HTN y 0,1 - 0,2% para Puumal²⁻³.

En 1993, en América del Norte la infección con hantavirus fue asociada con otro tipo de patología: el Síndrome Pulmonar por Hantavirus (SPH) caracterizado por un prodromo febril seguido de una brusca aparición de edema pulmonar no cardiogénico, infiltrado pulmonar y muerte en alrededor del 50% de los casos⁴. Este síndrome es causado por varios hantavirus tales como el virus Sin Nombre (SN)^{5,6} cuyo reservorio es el *Peromyscus maniculatus*⁷, el virus Black Creek Canal (BCC) transmitido por *Sigmodon hispidus*⁸, el virus Bayou asociado a *Orizomys palustris*⁹ y el virus New York (NY) cuyo reservorio es el *Peromyscus leucopus*¹⁰.

Hasta el presente se han registrado entre 350 y 400 casos de SPH en las Américas siendo los tres países más afectados los EE.UU., Argentina y Chile, en ese orden. Las tasas de mortalidad fueron de alrededor del 50%. Una cantidad creciente de hantavirus asociados o no a enfermedad han sido caracterizados recientemente.

Los factores que determinan la patogenicidad de los hantavirus no son aún bien conocidos. Para hantavirus del mismo tipo se han encontrado que variantes con

reasociación genómica,¹¹ o que difieren en su palmitación¹² pueden tener mayor virulencia.

La exposición del hombre a los hantavirus ocurre principalmente a través del tracto respiratorio, por inhalación accidental de orina, heces o saliva de roedores infectados. En los Estados Unidos de Norteamérica se observó que la distribución de casos de SPH es paralela a la de sus roedores reservorios y, en la mayoría de los pacientes con SPH de ese país se ha podido determinar claramente exposición peridoméstica, recreacional o ocupacional con los roedores^{13,14}. Una evaluación entre trabajadores de la salud expuestos al contacto con pacientes con SPH confirmado¹⁵ y una reciente revisión de grupos familiares infectados con SN sugieren que la transmisión entre humanos de este virus es muy rara si es que alguna vez ocurre.¹⁶ En América del Sur, existe evidencia serológica de la infección humana con hantavirus en la población general en, Argentina, Bolivia y Uruguay^{17,18}. Durante los últimos años han sido reportados casos de SPH en Brasil¹⁹; Chile²⁰; Paraguay²¹; Uruguay (datos no publicados) y Argentina²². Los primeros hantavirus caracterizados en Argentina y Chile correspondieron a un nuevo tipo denominado virus Andes, emparentado aunque claramente distinto de los virus causantes de SPH en EE.UU.²³.

Durante la primavera de 1996 se produjeron 20 casos en un área de 150 km alrededor de El Bolsón incluyendo Bariloche y Esquel, un aumento considerable teniendo en cuenta que el año anterior sólo se habían registrado 6 casos en esa área. Además tres personas adquirieron la enfermedad después de estar en contacto con esos pacientes. Los estudios epidemiológicos sugirieron que la infección podría haber ocurrido por transmisión persona a persona^{24,25}. Este tipo de transmisión no había sido demostrado nunca para hantavirus.

En este trabajo se evaluó la transmisión persona a persona mediante la comparación entre diferentes secuencias virales de casos humanos ocurridos durante ese brote epidémico (septiembre de 1996 a enero de 1997).

Materiales y métodos

Población estudiada:

Se examinaron 16 personas con infección confirmada con hantavirus, todos relacionados epidemiológicamente, otros 6 casos de SPH no relacionados y 3 descriptos anteriormente. Con propósitos comparativos se incluyó un caso que pertenecía a otra región, Orán, Salta, en el norte de Argentina. Los datos de contacto epidemiológicos de estos casos están descriptos en la tabla 1.

Extracción del ARN, amplificación por RT-PCR y secuenciación

La extracción de ARN se efectuó a partir de tejido de autopsia, de sangre total, coágulo sanguíneo o suero²⁶. La amplificación del ARN viral fue realizada con la reacción de RT-PCR anidada o semianidada. Los productos de la PCR fueron separados y purificados en gel de agarosa, posteriormente las secuencias fueron obtenidas por el método de elongación cíclica de cadena utilizando los didesoxinucleótidos como terminadores de las mismas.

Los cebadores utilizados para la amplificación de los diferentes fragmentos de S y M (G1a y G2) fueron previamente descriptos^{23, 25}. Para la amplificación de G1b en el segmento M se utilizaron los cebadores SM 1687C, SM 1723C, ASM 2016R, SM 2255R²⁷.

Comparación de homologías de secuencias y análisis filogenético

Para el análisis de las secuencias aminoácidas y nucleotídicas se analizaron fragmentos de dos regiones que codifican para G1, llamadas G1a (nts 88 a 595) y G1b (1736 a 1992); una región que codifica para G2 llamada G2 (nts 2780 a 2946) todas ellas relativas a la numeración del fragmento M del virus SN. También se utilizó un fragmento de la región 3' no codificante del segmento S (nts 1696 a 1838), numerados en el sentido antígenómico relativos al virus Andes.

Las secuencias fueron alineadas utilizando los programas NALIGN y PALIGN de PCGENE software de Intelligenetics Inc. (Mountain View CA).

Los árboles de máxima parsimonia fueron obtenidos utilizando el Phylip package versión 3.52.²⁸ La validez de los agrupamientos filogenéticos fue estimada mediante el método de remuestros al azar conocida como bootstrap. Los porcentajes de bootstrap fueron obtenidos a partir de 500 repeticiones.

Resultados

Análisis comparativo de las secuencias

En los casos de SPH examinados se detectó material genético de origen viral ya sea de muestras de tejidos de autopsia, sangre o suero. Para establecer posibles relaciones entre los casos fue necesario comparar secuencias virales entre contactos, entre casos geográfica o temporalmente relacionados y con casos de SPH previamente caracterizados. Las secuencias de productos de PCR fueron obtenidas tanto del segmento viral S como del M. Para la comparación de la secuencia nucleotídica se utilizó G1a, la región amino terminal de

G1 y un fragmento de G2 región debido a que estas zonas han sido muy utilizadas en estudios comparativos de hantavirus^{29, 30}. También se analizó la región 3'-NCR que ha demostrado ser útil en estudios evolutivos del hantavirus^{31, 32}. Para disminuir la probabilidad de encontrar por azar secuencias idénticas, se utilizó otra región de G1, denominada G1b²⁷. La secuenciación fue llevada a cabo sobre ambas cadenas de DNA con resultados consistentes. Como las secuencias fueron obtenidas secuenciando directamente los productos de RT-PCR, ellas representan un promedio de las secuencias presentes y las diferencias no pueden ser atribuidas a errores de la enzima, que pudieran haber ocurrido durante la amplificación. Además múltiples reiteraciones con la misma muestra y diferente extracción o con otros órganos dieron el mismo resultado.

Los porcentajes de identidad entre las secuencias nucleotídicas y aminoácidas de G1a, G1b y G2 codificados por el segmento M (Tabla 2) y de secuencias nucleotídicas del fragmento 3' NCR del segmento S (Tabla 3) se compararon con los obtenidos con hantavirus ya caracterizados. Dieciséis casos (I, A, B, P, L, Q, K, J, H, F, O, N, C, M, E, D) que tuvieron la misma secuencia, a la que denominamos Epilink/96, en los fragmentos G1a, G1b, G2, del segmento M y en el fragmento 3' NCR del segmento S tuvieron contactos con otros pacientes de SPH. Sin embargo, las secuencias de los dos casos humanos de El Bolsón, T y G, provenientes de pacientes contemporáneos pero no relacionados epidemiológicamente resultaron diferentes de Epilink/96 y también entre sí. T difirió de Epilink/96 en 1 de 167 nucleótidos en el fragmento G2, en 2 de 143 en el fragmento S y fue idéntico en G1a. Mientras G difirió en 8 de 167 nts en G2 y 4 de 172 en la porción aminoterminal de G1a.

Ninguno de los virus correspondientes al sur de Argentina y Chile difirieron entre sí más de 9,1% de los 9,1% en las regiones de S o M analizadas.

También se encontró que en todas las muestras del sur argentino y chileno los patrones de inserción-delección del fragmento del 3'-NCR del segmento S eran idénticos, además el motivo CTACCTCA, que se supone que puede tener función regulatoria, fue encontrado 3 veces en cada secuencia en las mismas posiciones sin ninguna variación. Las observaciones anteriores sugieren un estrecho parentesco entre estos virus.

Análisis filogenético

Para estudiar las relaciones filogenéticas se utilizó la región amino terminal del fragmento G1a (nts 88-259), y el fragmento G2 (nts 2780-2946) del segmento M ya que estaban disponibles para todos los casos estudiados en este trabajo.

Los árboles construidos con el método de máxima parsimonia (Fig. 1) mostraron que las secuencias de

TABLA 1

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

SCC: Sin contacto conocido

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

* Visitantes de El Bolsón

Argentina y Chile forman un mismo grupo que incluye al virus Andes AH1, el primero reportado en esta región; este agrupamiento está validado por un bootstrap del 99%. Este valor alto de bootstrap demuestra que el agrupamiento es muy sólido según este método filogenético. La secuencia correspondiente al norte de Argentina SAL-1/96 aparece como la más divergente de este grupo. A su vez este grupo se relaciona con una secuencia de

Paraguay, correspondiente al virus Laguna Negra. Las secuencias de América del Sur se agruparon con la rama formada por los virus BAY y BCC y están menos emparentadas con otras secuencias americanas. El virus Epilink/96 está relacionado más estrechamente con ESQ-1/96 y T que con las demás secuencias. Se puede observar que las secuencias chilenas no se agrupan en un grupo definido, pero el registro de los viajes de esas

TABLA 2.- Homología aminoacídica y nucleotídica entre secuencias del segmento M de hantavirus del sur de Argentina y Chile y dos característicos de EE.UU.

Fragmento M	BCC			BAY			CH-1/96			CH-2/96			CH-3/96			ESQ-1/96			
	G1a	G1b	G2	G1a	G1b	G2	G1a	G1b	G2	G1a	G1b	G2	G1a	G1b	G2	G1a	G1b	G2	
BCC																			
BAY	80,2	91,8	87,3	-	73,7	80,9	79,0	64,6	70,4	74,3	62,4	73,9	73,7	63,2	71,2	64,0	72,0	74,3	
Ch-1/96	56,8	82,4	76,4	52,7	82,4	76,4	61,4	70,7	72,4	70,7	61,8	75,1	70,1	61,8	73,2	61,2	75,5	70,7	
CH-2/96	56,2	82,4	76,4	52,1	82,4	76,4	99,4	100	100	100	92,9	93,0	94,6	93,1	93,8	93,5	93,4	94,6	
CH-3/96	56,2	82,4	76,4	52,1	82,4	76,4	99,4	100	100	100	100	100	100	96,1	94,2	95,9	93,8	97,6	
ESQ-1/96	56,2	81,2	74,6	52,1	81,2	74,6	99,4	98,8	98,8	96,2	100	98,8	98,2	100	98,8	98,2	98,8	98,2	
U (ESQ-2/96)	56,2	82,4	76,4	52,1	82,4	76,4	99,4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	98,8	98,2	
ESQ-3/96	56,2	82,4	76,4	52,1	82,4	76,4	99,4	100	100	100	100	100	100	100	100	100	98,8	98,2	
AH-1	56,2	82,4	78,2	52,1	82,4	78,2	99,4	100	100	98,2	100	100	98,2	100	100	100	98,8	96,4	
Eplink/96	56,2	81,2	74,6	52,1	81,2	74,6	99,4	98,8	98,8	98,2	100	98,8	98,2	100	98,8	100	100	100	
T	56,1	NA	74,6	50,9	NA	74,6	100*	NA	NA	98,2	100*	NA	98,2	100*	NA	100*	NA	100	
G	56,1	NA	78,2	50,9	NA	78,2	100*	NA	NA	98,2	100*	NA	98,2	100*	NA	100*	NA	96,4	

TABLA 2 (Continuación)

Fragmento M (% de identidad)	U (ESQ-2/96)			ESQ-3/96			AH-1			Eplink/96			T			G			
	G1a	G1b	G2	G1a	G1b	G2	G1a	G1b	G2	G1a	G1b	G2	G1a	G1b	G2	G1a	G1b	G2	
BCC	63,2	74,3	73,7	63,2	74,3	74,9	64,0	73,5	75,5	64,2	72,0	74,3	61,6	73,7	62,2	75,5			
BAY	61,6	75,5	70,1	61,6	75,5	72,5	62,4	75,5	72,5	61,2	75,5	70,7	61,6	70,1	61,1	72,5			
Ch-1/96	92,1	94,2	94,6	92,7	94,2	94,6	92,5	94,6	93,4	93,3	93,4	94,6	92,4	85,6	91,3	93,4			
CH-2/96	96,7	95,3	100	97,2	95,3	97,6	95,3	95,7	95,2	95,7	93,8	97,6	95,9	94,0	97,1	95,2			
CH-3/96	95,7	94,9	95,8	95,5	94,9	94,6	97,6	96,9	97,0	96,1	94,9	95,8	97,7	97,0	98,8	97,0			
ESQ-1/96	95,9	94,6	97,6	96,1	94,6	96,4	96,3	95,7	95,2	99,8	100	100	100	95,2	97,7	95,2			
U (ESQ-2/96)	-	-	-	99,2	100	97,6	95,3	96,5	95,2	95,7	94,6	97,6	94,8	99,4	95,9	95,2			
ESQ-3/96	100	100	100	100	100	98,2	95,1	96,5	94,0	95,9	94,6	96,4	95,9	97,0	95,9	94,0			
AH-1	100	100	98,2	100	100	98,2	100	-	96,1	96,1	95,7	95,2	98,3	95,8	99,4	100			
Eplink/96	100	98,8	98,2	100	98,8	98,2	100	98,8	96,4	100	94,6	96,4	100	94,6	97,7	95,2			
T	100*	NA	98,2	100*	NA	98,2	100*	NA	96,4	100*	NA	100	-	-	97,7	94,6			
G	100*	NA	98,2	100*	NA	98,2	100	NA	100*	100*	NA	96,4	100	99,4	99,4	100			

Los valores por arriba de la diagonal corresponden a la homología entre secuencias nucleotídicas, los valores bajo la diagonal a las homologías entre secuencias aminoacídicas G1a, G1b, y G2 están definidos en materiales y métodos

*Se analizaron sólo los nucleótidos 88-259

ND, no determinado

TABLA 3.- Homología nucleotídica entre secuencias del segmento S de hantavirus del sur de Argentina y Chile y dos característicos de EE.UU.

Fragmento S (% identidad)	BCC	BAY 96	CH-1/ 96	CH-2/ 96	CH-3/ 96	ESQ-1/ 96	U (ESQ- 2/96)	ESQ- 3/96	AH-1	Epilink/96	T
BCC		74,8	76,2	73,4	75,5	75,5	76,2	75,5	76,2	76,2	75,5
BAY			79	81,1	77,6	79,7	82,5	81,8	79	83,2	79,7
CH-1/96				93	97,9	99,3	97,9	97,2	100	97,9	99,3
CH-2/96					90,9	93,7	92,3	91,6	93	93,7	93,7
CH3/96						97,2	95,8	95,1	97,9	95,8	97,2
ESQ-1/96							98,6	97,9	99,3	98,6	100
U (ESQ-2/96)								99,3	97,9	98,6	98,6
ESQ-3/96									97,2	97,9	97,9
AH-1										97,9	99,3
Epilink/96											98,6

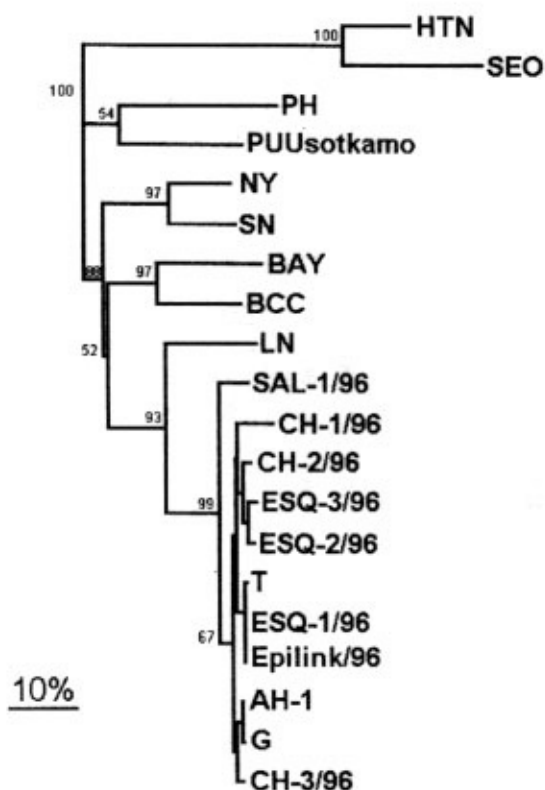


Fig. 1.- Relaciones filogenéticas entre secuencias del sur de Argentina y Chile y otros hantavirus basado en los fragmentos del segmento M: nucleótidos 88-259 y 2780-2946. Se utilizó el método de máxima parsimonia. Los porcentajes de bootstrap que corresponden a cada nodo que se indican en determinadas ramificaciones fueron obtenidos de 500 remuestros. Las distancias horizontales son proporcionales a la diferencia porcentual entre variantes virales. Las verticales son sólo para la representación gráfica.

personas es incompleto por lo que no está claro el sitio probable de infección. Además el estrecho parentesco entre las secuencias del sur de Argentina y Chile puede dificultar la distinción entre secuencias de uno u otro país.

Árboles filogenéticos construidos con el fragmento citado del segmento S también revelan que los virus del sur de Argentina y Chile se agrupan en un único cluster que incluye al virus Andes con un bootstrap del 100%.

A pesar de la relativa diversidad entre las secuencias nucleotídicas en los fragmentos secuenciados de G1 y G2, la secuencia aminoacídica deducida está conservada indicando una fuerte presión evolutiva para mantener la integridad de la expresión proteica; este hecho puede indicar que el reservorio de ambos virus es el mismo y que el virus está muy adaptado a este huésped. Esta presión evolutiva también se verificó al comprobar que el 88% de las diferencias nucleotídicas se encuentran en la tercera posición del codón y la mayoría corresponde a transiciones G-A o C-T cuyos resultados son mutaciones silentes (no modifican la secuencia aminoacídica).

Las secuencias aminoacídicas correspondientes a G1a de todos los casos fueron idénticas. En G1b Epilink/96 y la secuencia más emparentada, ESQ-1/96, se diferenciaron en un aminoácido del resto de las secuencias del sur (Isoleucina en lugar de Trionina en el residuo 642). Como muestra la Figura 2, en el fragmento G2, tanto Epilink/96 como ESQ-1 y el caso T presentaban una Alanina en lugar de Trionina en el residuo 939.

Los casos AH-1/96 y G se diferenciaron de las otras secuencias en un aminoácido mientras que SAL-1/96 mostró 2 cambios respecto de las secuencias del sur. No se encontró ningún cambio significativo tal como diferencia en las señales de glicosidación o en el patrón

	911	965
Epilink/96	GNTISGYKRM MM ATKDSFQSF N LTEPHITANKLEWIDPDGNTRD H VNLV L NRDVSF	
T	
G	...V.....T.....	
AH-1/96	...V.....T.....	
ESQ-1/96	
ESQ-2/96T.....	
ESQ-3/96T.....	
CH-1/96T.....	
CH-2/96T.....	
CH-3/96T.....	
SAL-1/96D...T.....I.....	
LNQ.L.....D...SS.....I.....	
BAY	...V..F..L.....VS.A...T.S...V...N.IK..I...I..	
BCC	...V..F..L.....VS.V...TT...S...S.IK..I..I.....	
SN	...V..FQ....R.....V.....S.R.....SSIK..I.M.....	

Fig. 2 - Secuencia de aminoácidos de la región G2b de Epilink/96 alineada junto con otras secuencias de las Américas. Los puntos indican identidad respecto de la variante Epilink/96. La N puesta en negra y subrayada corresponde al sitio de potencial N-glicosilación.

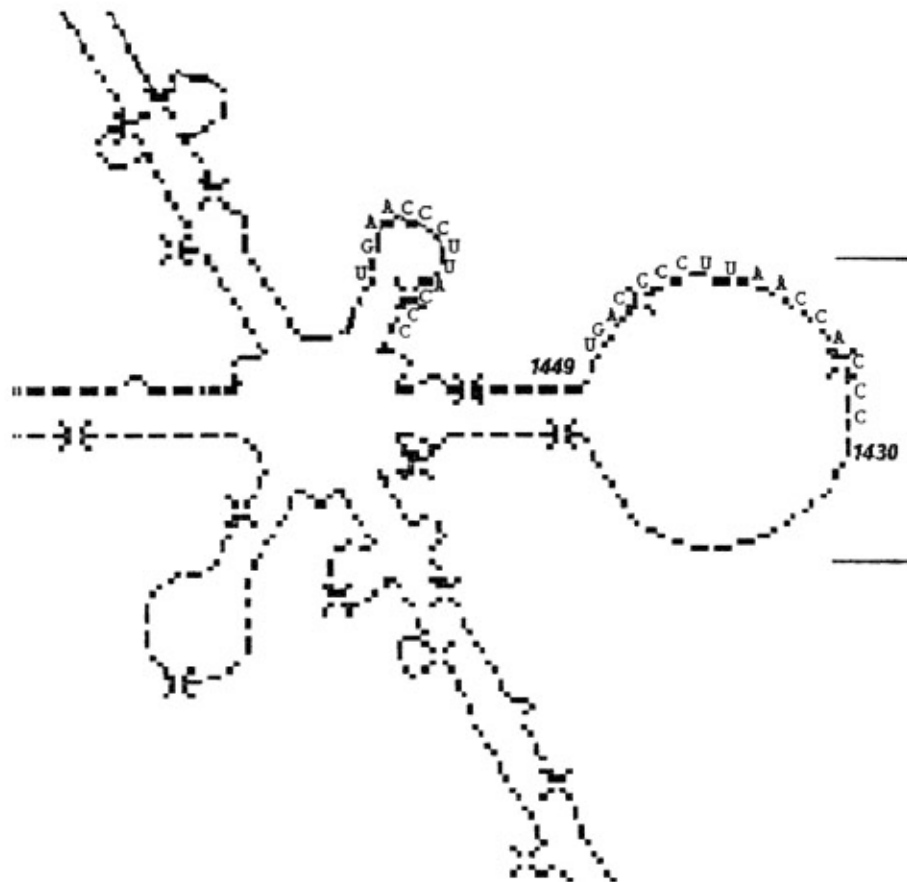


Fig. 3.- Fragmento de la estructura secundaria del ARN del segmento S del virus Andes obtenida por el método de Zuker. Secuencia propuesta como señal de terminación de la transcripción.

hidrofílico al menos en las regiones secuenciadas en este estudio.

Además de las diferencias nucleotídicas y aminoácidas que distinguen a los virus del sur de Argentina y

Chile de otros hantavirus de América, se encontró que estos últimos presentan algunas diferencias en la estructura secundaria del ARN viral deducida empleando el método de Zuker³³. Los motivos ya propuestos como

señales de terminación de la transcripción³⁴ en el virus Andes (Fig. 3) se encuentran en un bucle de 32 nucleótidos mientras en otros virus este bucle es de mucho menor longitud o inexistente.

Discusión

Aunque las variantes encontradas en el sur de Argentina y Chile fueron similares, el resultado más notable fue que los 16 casos con secuencia idéntica (Epilink/96) en los fragmentos correspondientes a G1 y G2 del segmento M y en el fragmento de la región 3' no codificante del segmento S correspondieron a los casos epidemiológicamente ligados. Cada uno de ellos había tenido contacto estrecho (cohabitación, cuidados médicos, contacto marital, viaje en el mismo automóvil) con uno o más miembros de este grupo, como se muestra en la tabla 1 y ha sido previamente informado^{24,25}. Estos casos incluyen pacientes de El Bolsón, Bariloche y Buenos Aires, distantes 150 km y 1400 km respectivamente de El Bolsón donde ocurrió el caso índice. El hecho de encontrar la misma secuencia en diferentes personas puede ser explicado de distintas maneras. Los pacientes podrían haberse infectado a partir de una única fuente o bien de distintas colonias de roedores infectados con el mismo virus, ambos supuestos se hacen menos probables a medida que aumenta la distancia geográfica entre los casos. Alternativamente la infección puede ocurrir a través de la transmisión persona a persona. Los casos registrados en Buenos Aires E y D, eran amigo y médico de C respectivamente. Los cuatro casos de Bariloche estuvieron en contacto con pacientes de El Bolsón fueron transferidos y todos ellos resultaron estar infectados con la misma variante (Epilink/96). También es importante destacar que el caso M no visitó nunca El Bolsón pero viajó en auto durante 20 hs con el caso L cuando éste era sintomático y vivía con sus padres (los casos J y H). En todos estos pacientes se encontró la variante Epilink/96. Ningún otro caso de SPH fue detectado en Buenos Aires o Bariloche durante este período. Los virus de casos posteriores registrados en Buenos Aires difirieron de los virus del sur en más de un 15% en su secuencia nucleotídica. En este contexto el hecho de encontrar la misma secuencia entre pacientes y sus contactos es una fuerte evidencia de la transmisión interhumana de la infección. Por otra parte, la cantidad de roedores presente durante esa temporada fue baja y no se detectaron roedores en el interior de las casas de las personas infectadas (Yadon, comunicación personal). Sin embargo, como puede verse en la Tabla 1 muchos casos eran familiares de otros SPH. Secuencias obtenidas en roedores infectados capturados en Lago Puelo a 15 km de El Bolsón resultaron diferentes de Epilink/96 (datos no publicados). Los datos presentados

acá muestran que en la variante Epilink/96 no se produjo ningún cambio en las regiones secuenciadas (un total de 1075 nucleótidos), durante la transmisión persona a persona. Una publicación reciente³⁵, utilizando alrededor de 500 nucleótidos, sugiere que para obtener el sitio preciso de infección se requiere que las secuencias obtenidas en el humano sean idénticas a la de los roedores de ese lugar. Un criterio similar podría ser requerido para demostrar la transmisión persona a persona en un caso determinado. Este tipo de transmisión no ha sido informada en Salta, donde se han producido un número mayor de casos. Respecto del virus Andes AH1, el primer caso caracterizado proveniente de El Bolsón, correspondió a un grupo familiar en el que dos de las tres personas con SPH murieron, aunque sólo se tomaron muestras de una de ellas. Recientemente se han registrado grupos de SPH en familias de el sur de Chile. En ambos casos en los alrededores de las viviendas de estos pacientes se registró una alta densidad de roedores³⁶. También se reportaron algunos grupos familiares de SPH relacionados a la infección con el virus Sin Nombre. En uno de ellos, 2 de 4 pacientes adultos que compartían la misma casa murieron.⁶ En otro grupo familiar un niño de 4 años de edad sobrevivió en tanto su madre murió 12 días después del comienzo de la enfermedad del niño³⁷. En todos los casos de infección con Sin Nombre los pacientes podrían haber estado expuestos al contacto con roedores infectados¹⁶. Sin embargo, la transmisión persona a persona no puede descartarse, en especial teniendo en cuenta que las fechas de inicio de la enfermedad entre los miembros de esos grupos ocurrieron en forma escalonada. En el brote argentino, a diferencia de lo observado con SN el contacto con roedores no fue evidente. Otro grupo compuesto por tres hermanos con HPS fue detectado en Brasil³⁸.

Los virus Sin Nombre y Andes, aunque emparentados, son lo suficientemente diferentes como para explicar posibles diferencias en su comportamiento biológico, incluyendo el patrón de transmisión.

Es de interés que sólo un linaje fue encontrado en las 25 muestras del sur de Chile y Argentina. A pesar de la distancia geográfica Salta-1/96 muestra pocos cambios respecto de las otras secuencias en su secuencia aminoacídica.

El probable reservorio del virus, *Oligoryzomys longicaudatus* fue encontrado tanto en El Bolsón como en Salta³⁹ (Yadon, comunicación personal). Las evidencias moleculares halladas son completamente consistentes con la hipótesis de la transmisión persona a persona deducida a partir de los datos epidemiológicos (Yadon, comunicación personal)^{24,25}, y muestran la posible existencia de cadenas de transmisión de 3 o 4 miembros. Considerando que todos los casos Epilink/96 pueden haber ocurrido después de una única transmisión de roedor a humano, el número de casos originados por la

transmisión a partir de roedores sería similar a la del año anterior.

Por otra parte Bariloche no debería ser incluida en el área endémica, ya que los cuatro casos que se registraron en esa ciudad estaban relacionados con pacientes de El Bolsón.

La infección de los humanos con hantavirus, tal como ocurre en otras zoonosis, es un evento irrelevante para el mantenimiento del virus en la naturaleza, con pocas excepciones como la Fiebre Amarilla Urbana y el Dengue. Teniendo esto en cuenta no debe llamar la atención que virus emparentados tengan distinta habilidad para infectar humanos o para ser diseminados por ellos. Por ejemplo, para los virus Lassa y Machupo la transmisión entre humanos es posible mientras que para otros arenavirus como LCM no está registrada⁴⁰. Respecto de los hantavirus se ha asociado diferente patogenicidad para el hombre dependiendo del reservorio del virus, más aún, para algunos hantavirus se desconoce que puedan infectar humanos, por lo tanto no sería sorprendente que la capacidad de ser transmitido de humano a humano puede estar asociada a una variante particular.

Todos los virus secuenciados correspondientes al sur argentino-chileno fueron muy similares, sin embargo es sabido que a veces cambios menores en las secuencias nucleotídicas o aminoacídicas generan cambios importantes en las propiedades biológicas de los virus. Hasta el presente no se sabe si la principal ruta de infección puede ser la parenteral, aerosoles, el contacto persona a persona o con objetos contaminados. Varios cofactores pueden influir en la transmisión, incluyendo el estadio de la enfermedad, la carga viral, coinfección con otros patógenos y el tipo de virus. La identificación de los factores fisiológicos o constitucionales que contribuyen a la susceptibilidad también debe ser investigada.

Dada la posibilidad del contagio entre humanos debe enfatizarse la necesidad del estricto cumplimiento de las precauciones universales de bioseguridad para controlar la transmisión nosocomial. También debe remarcarse la necesidad del seguimiento de los contactos a fin de evitar el contagio y favorecer tratamientos tempranos. Sin embargo, hasta el presente el contagio entre humanos sólo se ha demostrado una vez para una variante del virus Andes por lo cual los esfuerzos deben destinarse prioritariamente a evitar el contacto con roedores reservorios que son la fuente primaria de la infección.

Los resultados presentados aquí, muestran la utilidad de la secuenciación de los productos de PCR para identificar los virus presentes en la región y determinar las características moleculares de virus semejantes o no a Epilink/96. Estas técnicas pueden ser útiles en el futuro para analizar los modos de transmisión del virus Andes contribuyendo a diseñar estrategias para el control de la infección. Además pueden servir para mejorar

un criterio de aplicación de tratamiento temprano a los contactos. La investigación de las propiedades de virulencia e infectividad requieren el aislamiento del virus Andes y la comparación de la secuencia completa de los segmentos M y S de variantes transmisibles y no transmisibles. Este nuevo tipo de hantavirus causante de SPH tiene la propiedad de ser el primero asociado a una enfermedad severa, predominantemente pulmonar transmisible de persona a persona.

Agradecimientos: Agradecemos la contribución de los médicos que estuvieron a cargo de los pacientes por sus valiosas sugerencias y opiniones, especialmente a E. Argüello, C. Barklay, L. Bogni, M. Cacace, M. del Castillo, M. Clara, M.B. Lasala, M.E. Lázaro, E. Ramírez, A. Resa, S. Wiski. Agradecemos también la valiosa cooperación técnica de María Cristina Osés y Daniel Gutson.

Bibliografía

1. Plyusnin A, Vapalahti O, Vaheri A. Hantaviruses: genome structure, expression and evolution. *J Gen Virol* 1996; 77: 2677-87.
2. Lee HW, Lee PW, Baek LK, Chu YK. Geographical distribution of hemorrhagic fever with renal syndrome and hantaviruses. *Arch Virology* 1990; (Suppl)1, 5-18.
3. Mustonen J, Brummer-Korvenkontio M, Hedman K, Pasternak A, Pietilä K, Vaheri A. Nephropathia epidemica in Finland: a retrospective study of 126 cases. *Scandinavian J Infect Dis* 1994; 26; 7-13.
4. Elliott RM. Isolation of the causative agent of hantavirus pulmonary syndrome. *Am J Trop Med Hyg.* 1994; 51; 102-8.
5. Nichol ST, Spiropoulou CF, Morzunov S, Rollin PE, Ksiazek TG, Feldmann H, et al. Genetic identification of a novel hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness in the southwestern United States. *Science* 1993; 262: 914-7.
6. Duchin JS, Koster FT, Peters CJ, Simpson GL, Tempest B, Zaki S, et al. Hantavirus Study Group. Hantavirus pulmonary syndrome: A clinical description of 17 patients with a newly recognized disease. *N Engl J Med* 1994; 330: 949-55.
7. Childs JE, Ksiazek TG, Spiropoulou CF, et al. Serologic and genetic identification of *Peromyscus maniculatus* as the primary rodent reservoir for a new hantavirus in the southwestern United States; *J Infect Dis.* 1994; 169; 1271-80.
8. Ravkov EV, Rollin PE, Ksiazek TG, Peters CJ, Nichol ST. Genetic and serologic analysis of Black Creek Valley virus and its association with human disease and *Sigmodon hispidus* infection. *Virology* 1995; 210, 482-9.
9. Morzunov S, Feldmann H, Spiropoulou CF, Semenova VA, Rollin PE, Ksiazek TG, et al. A newly recognized virus associated with a fatal case of hantavirus pulmonary syndrome in Louisiana. *J Virol* 1995; 69; 1980-3.
10. Hjelle B, Lee SW, Song W, Torrez-Martinez N, Song JW, Yanagihara R, et al. Molecular linkage of hantavirus pulmonary syndrome to the white-footed mouse, *Peromyscus leucopus*: genetic characterization of the M genome of New York virus. *J Virol* 1995; 69: 8137-41.
11. Schmaljohn AL, Li D, Negley DL, Bressler DS, Turrell MJ, Korch GW, et al. Isolation and initial characterization of a

- newfound hantavirus from California. *Virology* 1995; 206: 963-72.
12. Isegawa J, Tanishita O, Oeda S, Yamanishi K. Association of serine in position 1124 of Hantaan virus glycoprotein with virulence in mice. *J Gen Virol* 1994; 75: 3273-8.
 13. Khan AS, Ksiazek TG, Peters CJ. Hantavirus pulmonary syndrome. *Lancet* 1996; 347: 739-41.
 14. Nichol ST (1996). Hantavirus pulmonary syndrome and newly described hantaviruses in the United States. in: *The Bunyaviridae*, RM. Elliott (ed.) New York: Plenum, 1996: pp 269-80.
 15. Vitek CR, Breiman RF, Ksiazek TG, Rollin PE, McLaughlin JC, Umland ET, et al. Evidence against person-to-person transmission of hantavirus to health care. *Clinical Infection Diseases* 1996; 22: 824-6.
 16. Wells RM, Young J, Williams RJ, Armstrong LR, Busico K, Khan AS, et al. Hantavirus transmission in the United States. *Emer Infect Dis* (in press)
 17. Weissenbacher M, Cura E, Segura EL, Hortal M, Baek LJ, Chu YK, Lee HW. Serological evidence of human hantavirus infection in Argentina Bolivia and Uruguay. *Medicina (Buenos Aires)* 1996; 56: 17-22.
 18. parisi MN, Enría DA, Pini NC, Sabbatini MS. Detección retrospectiva de infecciones clínicas por hantavirus en la Argentina. *Medicina (Buenos Aires)*; 1996; 56: 1-13.
 19. Iversson LB, Branquinho MS, Rosa MD. Serologic survey on hantavirus human infection in Jujuitiba state of Sao Paulo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* (Suppl) 1995; 53 (Suppl): abstract 439.
 20. López N, Padula P, Rossi C, Miguel S, Edelstein A, Ramírez E, Franze-Fernández MT. Genetic characterization and phylogeny of Andes virus and variants from Argentina and Chile. *Virus Res* 1997; 50: 77-84.
 21. Williams R, Bryan R, Mills H, Palma I, Vera I, Velásquez F, et al. Hantavirus pulmonary syndrome in Western Paraguay. *Am J Trop Med Hyg* (1996) (Suppl), abstract 30.
 22. Levis SC, Briggiler AM, Cacass M (19. Emergence of hantavirus pulmonary syndrome in Argentina. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 53 (Suppl), abstract 441.
 23. López N, Padula P, Rossi C, Lázaro ME, Franze-Fernández MT. Genetic identification of a new hantavirus causing severe pulmonary syndrome in Argentina. *Virology* 1996; 220: 223-6.
 24. Enría D, Padula P, Segura EL, Pini N, Edelstein A, Riva Posse C, Weissenbacher MC. Hantavirus pulmonary syndrome in Argentina. Possibility of person to person transmission. *Medicina (Buenos Aires)*; 1996; 56: 709-11.
 25. Wells RM, Sosa Stani S, Yadon ZE, Enría E, Padula P, Pini N, Mills JN, Peters CJ, Segura EL, and the Hantavirus Pulmonary Syndrome Study Group for Patagonia. An unusual hantavirus outbreak in southern Argentina: person to person transmission? *Emer Infect Dis* 1997; 3: 171-4.
 26. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step of RNA iso-lation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chlo-roform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162: 150-9.
 27. Johnson AM, Bowen MD, Ksiazek TG, Williams RJ, Bryan RT, Mills JN et al. Laguna Negra virus associated with HPS in Western Paraguay and Bolivia, 1997 (submitted for publication).
 28. Felsenstein J, PHYLIP (Phylogeny Inference Package); 1993; versión 3,5 c.
 29. Xiao SY, Leduc JW, Chu YK, Schmaljohn CS. Phylogenetic analyses of virus isolates in the genus Hantavirus, Family Bunyaviridae. *Virology* 1994; 198: 205-17.
 30. Henderson WW, Monroe M, St Jeor SC, Thayer WP Rowe JE, Peters CJ, Nichol ST. Naturally occurring Sin Nombre virus genetic reassortants. *Virology* 1995; 214: 602-10.
 31. Spiropoulou CF, Morzunov S, Feldman H, Sánchez A, Peters CJ, Nichol ST. Genome structure and variability of a virus causing hantavirus pulmonary syndrome. *Virology* 1994; 200: 715-23.
 32. Plyusnin A, Valpalahti O, Lehtväslaiho H, Apekina N, Mikhailova T, Gavrilovskaya I, et al. Genetic variation of wild Puumala viruses within the serotype, local rodent populations and individual animal. *Virus Res* 1995; 38: 25-41.
 33. Zuker M. On finding all suboptimal foldings of an RNA molecule. *Science* 1989; 224: 48-52.
 34. Hutchinson KL, Peters CJ, Nichol ST. Sin Nombre virus mRNA synthesis. *Virology* 1996; 224: 139-49.
 35. Hjelle B, Torrez Martinez N, Koster FT, Jay M, Ascher MS, Brown T, et al. Epidemiologic linkage of rodent and human hantavirus genomic sequences in case investigations of hantavirus syndrome. *J Infect Dis* 1996; 173: 4 781-6.
 36. Centers for Disease Control and prevention. Hantavirus Pulmonary Syndrome-Chile 1997; *MMWR* 1997; 46: 949-51.
 37. Armstrong LF, Bryan RT, Sarisky J, Kahn AS, Rowe T, Ettestad PJ, Cheek JE, et al. Mild hantaviral disease caused by Sin Nombre virus in a four year old child. *Pediatr Infect Dis J* 1995; 14: 1108-10.
 38. Zapparoli MA, Iversson LB, Rosa MD. Investigation on case-contacts of human disease caused by hantavirus in Jujuitiba, state of Sao Paulo, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 53: (Suppl), abstr 439.
 39. Levis SC, Calderón GE, Pini N, Ksiazek TG, Peters CJ, Enría DA. Síndrome pulmonar por hantavirus (SPH): Resultados preliminares de estudios orientados a establecer los potenciales reservorios de hantavirus en la Argentina. Congreso de Tandil, 1996; abstract 144.
 40. Peters CJ, Buchmeier M, Rollin PE, Ksiazek TG. Arenaviruses. in: *Fields Virology*, Third Edition, B.N. Fields, et al. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1996.