

XIII. HANTAVIRUS

Prof. Angel Goyenechea Hernández y Lic. Odalys Valdés Ramírez MsC

I.-Definición de un caso clínico:

Aparición de una enfermedad febril (temperatura de 38.3°C (101°F) que requiere administración de oxígeno suplementario.

Edema intersticial difuso bilateral que se parece al síndrome de insuficiencia respiratoria del adulto (SIRA), y

Que se presenta en el término de 72 horas de la hospitalización, en una persona que había estado sana ó

Enfermedad inexplicable que culmina en la muerte, y un estudio de necropsia que señala la presencia de edema pulmonar no cardiogénico sin una causa específica e identificable de muerte.

I.1.-Clasificación de casos:

SOSPECHOSO: Caso compatible con la descripción clínica.

CONFIRMADO: Caso sospechoso del que se tiene confirmación por estudios de laboratorio.

II.-Criterios para confirmar el diagnóstico por Laboratorio:

Presencia de anticuerpos IgM específicos contra hantavirus, o un incremento de cuatro veces o mayor en los títulos de anticuerpos IgG, o

Positividad de los resultados de la transcriptasa inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) respecto al ARN de hantavirus. ó

Resultados inmunohistoquímicos positivos de la presencia de antígeno de hantavirus.

III.-Situación Epidemiológica en la Región:

En la primavera de 1993, en el sudeste de E.U. en la zona conocida por “Four Corner”, se produjo un brote epidémico de una enfermedad desconocida hasta el momento. Debido a las manifestaciones pulmonares y ser causada por un hantavirus, fue denominada Síndrome Pulmonar por Hantavirus (SPH) y al hantavirus se le denominó “Virus Sin Nombre”(VSN).

Esta situación fue consecuencia de un aumento de la población de roedores en contacto con el hombre y se debió a cambios climáticos y condiciones ecológicas.

Esta no es una enfermedad nueva sino que su identificación es reciente. Probablemente, las cepas de hantavirus habían estado viviendo en los roedores hospederos durante miles de años.

A partir de ese momento, además de los E.U. otros países han reportado casos de SPH: Canadá, Argentina, Chile, Brasil, Uruguay, Bolivia, Paraguay y mas recientemente en el año 2000 Panamá.

Los hantavirus constituyen un género dentro de la Familia Bunyaviridae. Son virus de envoltura lipídica con un genoma de ARN de sentido negativo, trisegmentado, es decir, está compuesto por tres segmentos de ARN de cadenas negativa, uno largo (L) que codifica la Polimerasa, uno mediano (M) que codifica las Glicoproteínas G1 y G2 y uno pequeño (S) que codifica la proteína de la Nucleocápside. Tiene forma esférica u ovalada de 95 a 110 nm de diámetro. Son susceptible a la mayoría de los desinfectantes: soluciones de hipoclorito diluido, fenoles, detergentes, formalina alcohol y pH ácidos.

En la Región hasta el momento se han detectado distintas especies del hantavirus, con diferentes reservorios en diferentes regiones geográficas, lo que significa que pueden haber otras especies por detectar.

Especies de Hantavirus productores del Síndrome Pulmonar por Hantavirus:

Espece	Reservorio	Distribución geográfica	Distribución del reservorio
Sin Nombre (SN)	Peromyscus maniculatus	E. U.	Alaska, Canadá, E.U, México.
New York (NY)	Peromyscus leucopus	E.U.	EU, Canadá, Costas del Caribe, Venezuela
Black Creek Canal (BCC)	Sigmodon hispidus	E. U.	EU, México, Centro América Colombia, Venezuela.
Andes (AND)	Olygoryzomus longicudatus	Argentina	Los Andes, Chile, Argentina.
Sin nombrar	Calomys laucha	Paraguay	Argentina, Uruguay, Bolivia, Paraguay, Brasil.
Nuevo tipo	Sigmodon	Panamá	

IV.-ASPECTOS CLÍNICOS

Fase inicial: o prodrómica: dura entre 3 – 6 días y sus síntomas son muy semejantes a los de un cuadro gripal (fiebre de iniciación brusca sobre 38°C, cefalea, osteomiálgias generalizada, coriza, tos, vómitos y náuseas, diarrea y dolor abdominal).

Compromisos respiratorios: el cuadro se agrava rápidamente con complicaciones cardiopulmonares, caracterizado por aumento de la fiebre, taquicardia, taquipnea. El compromiso respiratorio puede continuar progresando desde una baja saturación de Oxígeno y edema pulmonar intersticial, hasta llegar a un cuadro semejante al Síndrome de Distress Respiratorio (SDR) y evoluciona a una insuficiencia respiratoria severa en pocas horas. El tiempo medio entre la aparición de los primeros síntomas cardiopulmonares y la muerte es de 8 días (rango 2 – 6).

IV.1.-Diagnóstico diferencial:

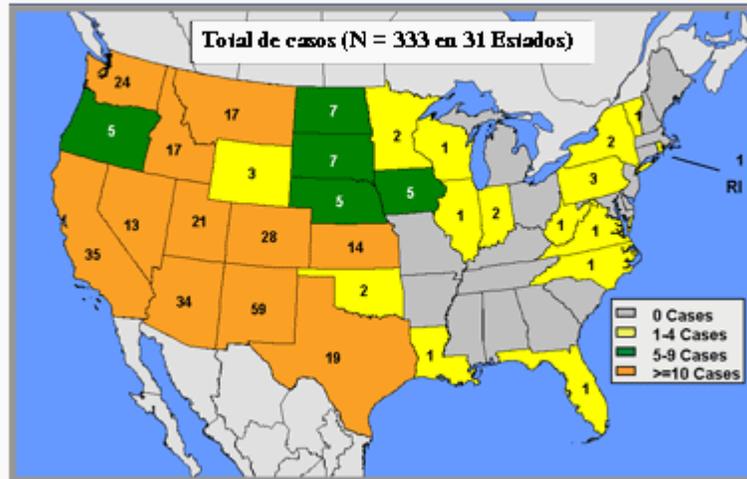
Al inicio y antes de la identificación del agente causal, hacer el diagnóstico diferencial con enfermedades enzoóticas propias de las Américas: leptospirosis, turalemia, tífus murino, fiebre recurrente de *Borrelia hermesii*, dengue clásico y hemorrágico, gripe, así como las enfermedades por parvovirus y arenavirus.

En el mapa 1 se presenta un resumen de la distribución de los casos de SPH en la región de Las Américas, con un total de 1103 casos en 9 países.



En el mapa 2 se presentan los casos reportados en los Estados Unidos. De 333 casos reportados falleció el 38%.

Casos de Síndrome Pulmonar de Hantavirus reportados en Estados Unidos. Abril/1993-Enero/2003.



IV.2.-Diagnóstico virológico:

Muestras: sangre (el coágulo para PCR y el suero para serología).

Casos fallecidos: tejidos de pulmón.

De roedores se investigaran las mismas muestras.

Para la toma de muestras, conservación y traslado, se tomarán todas las medidas de Bioseguridad que ya han sido señaladas anteriormente, al igual que para su manipulación e investigaciones que se realicen en el Laboratorio.

V.-Determinación de anticuerpos humanos IgM contra Hantavirus por ELISA de captura:

Equipos:

- Gabinete de seguridad Vertical (Clase IIABb3)
- Lavador de placas.
- Lector de placas.
- Incubadora de 37°C.
- Congelador de -20°C.
- Congelador de -70°C.

Materiales y Reactivos:

- Pipetas (20, 200, 1000µL).

- Pipetas multicanales de 10 – 50 y de 100 - 500 μ L
- Puntas de pipetas de 20, 200, 1000 μ L).
- Placas de ELISA de 96 pocillos, Dinotech cat.No. 001-010-2101 o F8 NUNC Maxisorp o PVC flexible Falcon cat. 3911 fondo en U.
- Guantes desechables.
- Batas.
- Tubos (Titertubes o gradillas de microtubos cat223 – 9390, Biorad)
- Toallas adsorbentes (Benchmate).
- PBS 0.01 M pH 7.4 con Tween 20 (0.1%). ph 7.4 con o sin timerosal.
- Diluyente de sueros: Regulador de lavado con 5% de leche descremada, pH 7.4 y timerosal 1:10,000.
- Capturador: goat anti-human IgM (Kirkegaard and Perry cat. 475 – 1008).
- Antígeno recombinante SNV obtenido del CDC.
- Antígeno control obtenido del CDC.

Sueros:

- Positivos: sueros convalecientes
- Negativo: utilice por lo menos 5 – 6 de personas conocidas como negativas para hantavirus.
- Conjugado antihumano: Inmunoglobulina anti- mouse IgG en cabra (cadena H&L) conjugada con peroxidasa (Pierce cat. No. 31446).
- Sustrato para peroxidasa ABTS (Kirkegaard and Perry cat. No. 506201). Combinados 1:1
- Suero humano normal (sin anticuerpo contra hantavirus)

V.1.-Instrucciones Especiales:

Mantener controlada la temperatura del cuarto, recordando que las determinaciones son enzimáticas.

- 1.- Los sustratos ABTS y soluciones B deben mantenerse a 4°C, los antígenos reconstruidos a -70°C y todos los demás deben almacenarse a -20°C.
- 2.- Utilice de 5 – 6 sueros negativos cada vez que realice la prueba. El promedio y las desviaciones estándar de los valores de las DO.ajustadas de estos sueros se acumulan y usan para

calcular un valor igual al promedio mas 3 desviaciones estándar y ello representa el valor de corte (cut off) de la prueba.

3.- Las puntas de las pipetas utilizadas en la preparación de las diluciones de sueros deben descartarse en recipientes con hipoclorito de sodio recién preparado.

4.- Prediluya los sueros 1:25.

5.- Se utilizan volúmenes de 100 μ L.

6.- Sea conservador(a) al interpretar los ensayos de IgM, valores marginales pueden indicar reacciones cruzadas con otros virus o ruidos en el sistema.

V.1.1.-PROCEDIMIENTO:

1.- Cubra toda la microplaca con 100 μ L de anti-human IgM 1:500 en PBS pH 7.4 y mantenga sellada con parafina.

2.- Absorba a 4°C toda la noche.

3.- Lave de cuatro a seis veces con regulador de lavado.

4.- Añada a todo el microplato 100 μ L del diluyente del suero.

5.- Tome 33 μ L de la predilución del suero de cada suero (positivo, negativo y desconocidos) y añadirlo a la columna A del microplato con el captador anti IgM y pasar sucesivamente 33 μ L hasta la columna D. Descartar los últimos 33 μ L y cargar nuevamente con la misma punta de pipeta 33 μ L de la predilución 1:25 para agregar a la columna E y pasar sucesivamente 33 μ L hasta la columna H. Así tenemos los sueros diluidos 1:100,

1: 400, 1:1600, 1: 1:6400.

6.- Incube a 37°C por una hora en cámara húmeda.

7.- Lave de cuatro a seis veces con el regulador del lavado.

8.- Diluya 1:2 los antígenos recombinantes y control .El diluyente de los antígenos debe tener suero humano normal a una concentración de 1:50.

9.- Agregar 100 μ L del antígeno normal a las columnas de la E a la F. Puede utilizar las mismas puntas de pipeta para agregar el antígeno recombinante de las columnas de la A a la D.

10.-Incube a 37°C por una hora en cámara húmeda.

11.- Lave de cuatro a seis veces con el regulador de lavado.

12.- Añada el suero hiperinmune de ratón (anti-FCV) diluido 1: 2000 en PBS con 0/1% de Tween 20, 5% de leche descremada y timerosal al 1%.

13.- Incube a 37°C por una hora en cámara húmeda.

14.- Lave de cuatro a seis veces con el regulador del lavado.

15.- Añada el conjugado anti-ratón en cabra 1: 8000.

16.- Incube a 37 por una hora.

17.- Lave de cuatro a seis veces.

18.- Añada el sustrato.

19.- Incube a 37°C por 30 minutos.

Observe el desarrollo de color (la cantidad de color que se desarrolla será proporcional a la cantidad de anticuerpo IgM que se ha unido al antígeno en la fase sólida)

20.- Lea a 410 nm (a 490 nm para la lectura dual)

21.- Recuerde sustraer las D.O. del antígeno normal a las D.O. del antígeno positivo para tener un valor ajustado positivo neto.

22.- Determinar los positivos en base al valor de corte.

V.2.-Determinación de anticuerpos humanos IgG contra Hantavirus por ELISA de captura:

Equipos:

- Gabinete de seguridad (Clase IIABb3)
- Lavador de placas.
- Lector de placas.
- Incubadora de 37°C.
- Congelador de -20°C.
- Congelador de -70°C.

Materiales y Reactivos:

- Pipetas (20, 200, 1000µL).
- Pipetas multicanales de 10 – 50 y de 100 - 500µL
- Puntas de pipetas de 20, 200, 1000µL).
- Placas de ELISA de 96 pocillos, Dinotech cat.No. 001-010-2101 o F8 NUNC Maxisorp o PVC flexible Falcon cat. 3911 fondo en U.

- Guantes desechables.
- Batas.
- Tubos (Titertubes o gradillas de microtubos cat223 – 9390, Biorad)
- Toallas adsorbentes
- PBS 0.01 M pH 7.4
- Diluyente de sueros: Regulador de lavado con 5% de leche descremada, pH 7.4 y timerosal 1:10,000.
- Antígeno recombinante SNV obtenido del CDC.
- Antígeno control obtenido del CDC.

Sueros:

- Positivos: sueros convalecientes
- Negativo: utilice por lo menos 5 – 6 de personas conocidas como negativas para hantavirus.
- Conjugado antihumano: Inmunoglobulina anti-IgG humana en cabra purificada por cromatografía de afinidad conjugada con peroxidasa (Kirkegaard & Perry o mouse anti-human conjugated. Accurate cat. No. JMHO35103).
- Sustrato para peroxidasa ABTS (Kirkegaard and Perry cat. No. 506400 & 506500). Combinados 1:1

V.2.1.-Instrucciones Especiales:

Mantener controlada la temperatura del cuarto, recordando que las determinaciones son enzimáticas.

- 1.- Los sustratos ABTS y soluciones B deben mantenerse a 4°C, los antígenos reconstruidos a -70°C y todos los demás deben almacenarse a -20°C.
- 2.- Utilice de 5 – 6 sueros negativos cada vez que realice la prueba. El promedio y las desviaciones estándar de los valores de la D O. ajustadas de estos sueros se acumulan y usan para calcular un valor igual al promedio mas 3 desviaciones estándar y ello representa el valor de corte (cut off) de la prueba.
- 3.- Las puntas de las pipetas utilizadas en la preparación de las diluciones de sueros deben descartarse en recipientes con hipoclorito de sodio recién preparado.
- 4.- Prediluya los sueros 1:25.
- 5.- Se utilizan volúmenes de 100µL.

6.- Sea conservador(a) al interpretar los ensayos de IgG, valores marginales pueden indicar reacciones cruzadas con otros virus o ruidos en el sistema..

V.2.2.-Procedimiento:

1.- Cubra la mitad de la microplaca (columnas de la A a la D) con el antígeno de hantavirus (1:2000 diluido en PBS) y la otra mitad de la microplaca (de la E a la H) con el antígeno control a la misma dilución. Cubrir con un film plástico. (Esto constituye la aplicación del antígeno en la fase sólida).

2.- Adsorba a 4°C toda la noche.

3.- Lave cuatro a seis veces con el regulador de lavado.

4.- Añadir a todo la microplaca 100µL del diluyente del suero.

5.- A partir de la dilución 1:25 de cada suero (positivo, negativo y desconocido), tomar 33µL y añadirlo a la columna E del microplato con el antígeno control y pasar sucesivamente 33µL hasta la columna H. Descartar los últimos 33µL y cargar nuevamente con la misma punta de pipeta 33µL de la predilución 1:25 para agregar a la columna A y pasar sucesivamente 33µL hasta la D. Descartar los últimos 33µL de la predilución 1:25 para agregar a la columna A y pasar sucesivamente 33µL hasta la columna D (pocillo con el antígeno recombinante). Así tenemos los suero diluidos 1:100, 1:400, 1:1600, 1:6400.

6.- Incubar a 37°C por una hora en cámara húmeda.

7.- Lavar cuatro a seis veces con el regulador de lavado.

8.- Añada 100µL del conjugado anti-humano diluido según las indicaciones de la casa comercial.

9.- Incube a 37°C por una hora en cámara húmeda.

10.- Lava cuatro a seis veces con el regulador de lavado.

11.- Añada 100µL del sustrato diluido 1:1.

12.- Incube a 37°C por 30 minutos en cámara húmeda (observe desarrollo del color, la cantidad de color que se desarrolla será proporcional a la cantidad de IgG que se ha unido al antígeno en la fase sólida).

13.- Lea a 410 nm, (a 490 nm para la lectura dual).

14.- Recuerde sustraer las D.O. del antígeno normal a las D.O. del antígeno recombinante para tener un valor ajustado positivo neto.

15.- Determine los positivos en base al valor de corte (cut off).

VI.-Detección de Hantavirus mediante la Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) y PCR anidada.

La RT-PCR, PCR anidada permite la detección del ARN viral directamente de la muestra clínica, utilizando cebadores genéricos específicos que amplifican un fragmento del gen que codifica para la Nucleocápside.

Equipos:

- Centrífuga
- Gabinete de seguridad clase II
- Termociclador.
- Transiluminador
- Horno microondas

Materiales y Reactivos

- Tubos de 500 μ L
- Micropipetas
- Puntas de micropipeta
- Rotuladores
- Bata
- Guantes desechables.
- Trizol
- Cloroformo
- Isopropanol
- Etanol
- Kit Access System
- Kit Taq Polymerasa
- Agarosa LE
- Tris base
- Acido Bórico
- EDTA
- Glicerol
- Azul de bromofenol

- Bromuro de etidio
- PCR marker VIII

VI.1.-Extracción de ARN utilizando el método del TRIZOL.

- Añadir a 300 µL de muestra clínica (suero) 300 µL de TRIZOL, agitar por vortex 15 seg., dejar reposar 5 min. a temperatura ambiente (TA).
- Añadir 100 µL de Cloroformo, agitar por vortex 15 seg., dejar reposar 3 min. a TA.
- Centrifugar a 15 000 r.p.m., durante 20 min a 4°C.
- Transferir la fase superior aun tubo limpio, añadir 300 µL de Isopropanol, mezclar por inversión, dejar reposar 10 min. a TA.
- Centrifugar en las condiciones descritas anteriormente.
- Eliminar el sobrenadante, lavar el precipitado con 300 µL de Etanol al 75%.
- Centrifugar a 15 000 r.p.m. durante 5 min a 4°C.
- Eliminar el sobrenadante, secar el ARN y resuspender en 20 µL de agua bidestilada estéril.

VI.1.2.-RT/PCR anidada que amplifica un fragmento del gen que codifica para la nucleocapside.

Oligonucleótidos utilizados en la RT/PCR, tamaño del fragmento amplificado 601nt.

SS143C-N TGGA(C/G)CCIGATGAIGTTAACAA
 SS743R-N TCIATCCA(G/A)TC(C/T)TTIACAAA

Oligonucleótidos utilizados en la PCR anidada, tamaño del fragmento amplificado 434 nt.

SS283C-N CCAACAGGGITTGA(A/G)CC(T/A)GATGA
 PPT716R AAICCIATIACICCCAT

TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

- Preparar tubos eppendorf de 500µL con la mezcla de reacción que se muestra a continuación:

Reactivos de la mezcla	Cantidad por tubo
Buffer AMV 5X	10 µL
MgSO ₄ 25mM	6 µL
dNTP 10mM	1 µL
SS143C-N (100 ng)	1 µL
SS743R-N (100 ng)	1 µL
AMV RT 5U	1 µL
Taq Poli 5U	1 µL
H ₂ O	13 µL
	40 µL

- Añadir 10 µL del ARN extraído al tubo con la mezcla de reacción para completar un volumen final de 50 µL.
- Dar un golpe de centrifuga para que se mezcle bien el ARN con la mezcla de reacción.
- Colocar los tubos en el termociclador bajo las siguientes condiciones:

Ciclos	Temperatura	Tiempo(minutos)
RT	42°C	45min
	92°C	2min
PCR x 30 ciclos	94°C	1min
	50°C	1min
	72°C	1min
Final	72°C	7min

PCR anidada.

- Preparar tubos eppendorf de 500µL con la mezcla de reacción que se muestra a continuación:

Reactivos de la mezcla	Cantidad por tubo
Buffer PE 10X	5 µL
Mg Cl ₂ 1.5mM	6 µL
dNTP 200 GM	1 µL
SS283C-N (100 ng)	1 µL
PPT716R (100 ng)	1 µL
Taq Poli 5U	0.25 µL
H ₂ O	28.75 µL
	49 µL

- Añadir 1µl del producto de la primera reacción (ADN) de amplificación al tubo con la mezcla de reacción para completar un volumen final de 50µL
- Dar un golpe de centrifuga para que se mezcle bien el ADN con la mezcla de reacción.
- Colocar los tubos en el termociclador bajo las siguientes condiciones:

Ciclos	Temperatura	Tiempo (minutos)
	94°C	2 min
PCR x 30 ciclos	94°C	1 min
	48°C	1 min
	72°C	1 min
	72°C	7 min
Final	72°C	7 min

Detección del producto amplificado.

- Tomar 8 µL de cada uno de los producto de la segunda reacción de amplificación, así como, del marcador de peso molecular (PCR Maker VIII) y mezclar con 2 µL de tampón de muestra para electroforesis 6X.
- Aplicar en un gel de agarosa al 2% en TBE 1X.
- Realizar la corrida a 90V durante 1hora.
- Exponer el gel a la luz ultravioleta en un transiluminador.
- Realizar la lectura.
- Se consideran positivas aquellas muestras cuyo tamaño de banda sea 434 pb.

Referencias:

- 1.- Hjelle B, Jenison S, Goade D, Green W, Feddersen R ,Scott A. Hantaviruses. Clinical, Microbiologic, and Epidemiologic Aspects. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences.1995; 32(5): 469 – 508.
- 2.- Manual de Procedimientos Diagnóstico de Hantavirus. Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud. Centro de Investigaciones para el Control de Enfermedades. . Departamento de Virología. Ministerio de Salud Pública. Panamá. 2001.
- 3.-MMWR 48(24) 521 – 25.
- 4.- CDC “ All About Hantavirus” Case Information: Hantavirus Pulmonary Syndrome Case Count and Descrip Statistics as of April 2001.
- 5.- CDC “ All About Hantavirus” Case Information: Hantavirus Pulmonary Syndrome Case Count and Descrip Statistics as of January 2003.
- 6.- OPS. 1999. Guia para el Diagnóstico, el tratamiento, la prevención y el control de Hantavirus en las Américas . Cuaderno Técnico No. 47.