

Tesis de Posgrado

Aportes para el control de la fiebre hemorrágica argentina

Videla, Cristina Mónica

1988

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

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

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

Cita tipo APA:

Videla, Cristina Mónica. (1988). Aportes para el control de la fiebre hemorrágica argentina. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2149_Videla.pdf

Cita tipo Chicago:

Videla, Cristina Mónica. "Aportes para el control de la fiebre hemorrágica argentina". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1988.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2149_Videla.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

"APORTES PARA EL CONTROL DE LA FIEBRE HEMORRAGICA ARGENTINA"

Tesis para optar al título de DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

AUTOR: Cristina Videla

- 1988 -

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

APORTES PARA EL CONTROL DE LA FIEBRE HEMORRAGICA ARGENTINA

AUTOR: Lic. Cristina Mónica Videla.

DIRECTOR: Dra Guadalupe Carballa

LUGAR DE TRABAJO: Departamento de Microbiología
Facultad de Medicina, UBA.

Tesis para optar al título de: DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

2.149.

1 9 8 8

A Daniel

A mis padres y hermano

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Guadalupe Carballal por su enseñanza, apoyo, crítica y estímulo constante.

A la Dra. María Cristina Maggese, consejera de estudios.

A Alfredo Vitullo por sus valiosas sugerencias y apoyo.

A todos mis compañeros de la Cátedra de Microbiología y en especial a Adriana Kajón, Beatriz Ebekian, Horacio Salomón y Daniel Rabinovich por su compañerismo y colaboración.

A mis compañeros de laboratorio, por su ayuda.

A la Dra. Vida Hodara y Dra. Ana María Acuña por la cría y provisión de animales.

Al personal de bioterio y cultivo de tejidos por su colaboración.

A la Dra. Mercedes Weissenbacher, titular de la Cátedra de Microbiología donde se realizaron estos estudios.

I N D I C E

1. RESUMEN

2. INTRODUCCION

- 2.1. Características de los Arenavirus.
- 2.2. Arenavirus y sus reservorios.
- 2.3. Fiebre Hemorrágica Argentina: Características de la enfermedad.
- 2.4. Area endémica y epidemiología.
- 2.5. Aislamiento del virus Junín de reservorios naturales y ecología.
- 2.6. Infección experimental con virus Junín en roedores silvestres.
- 2.7. Métodos de control de la enfermedad:
 - 2.7.1. Control de roedores.
 - 2.7.2. Inmunización de la población susceptible. Estado actual del conocimiento sobre vacunas para FHA.

3. OBJETIVOS

- 3.1. Infección experimental con virus Junín de Akodon azarae, Akodon dolores, Akodon molinae y Calomys callidus.
- 3.2. Obtención de un antígeno inactivado de virus Junín con efecto protector.

4. RESULTADOS DE LA INFECCION EXPERIMENTAL CON VIRUS JUNIN EN LOS SIGUIENTES CRICETIDOS:

4.1. Akodon azarae

- 4.1.1. Lactantes por vía intracerebral .
- 4.1.2. Lactantes por vía mucosa.
- 4.1.3. Adultos por distintas vías de inoculación.
- 4.1.4. Conclusiones

4.2. Akodon dolores

- 4.2.1. Lactantes por vía intracerebral.
- 4.2.2. Adultos por distintas vías de inoculación.
- 4.2.3. Conclusiones.

4.3. Akodon molinae

4.3.1. Lactantes por vía intracerebral.

4.3.2. Adultos por distintas vías de inoculación.

4.3.3. Conclusiones.

4.4. Calomys callidus

4.4.1. Lactantes y adultos por vía intracerebral.

4.4.2. Lactantes y adultos por vía mucosa.

4.4.3. Estudio de transmisión horizontal del virus de crías infectadas a sus madres.

4.4.4. Conclusiones.

4.5. Conclusiones

5. RESULTADOS DEL DESARROLLO DE UN ANTIGENO INACTIVADO DE VIRUS JUNIN CON EFECTO PROTECTOR.

5.1. Efecto de la temperatura sobre la infectividad de la cepa XJ-Clon 3.

5.2. Inactivación de la cepa XJ-Clon 3 con formaldehído al 0.1% y 0.05% a 0°C.

5.3. Inactivación de virus Junín con 2 dosis de formaldehído. Concentración por precipitación con polietilenglicol y por ultracentrifugación.

5.3.1. Determinación de infectividad residual.

5.3.2. Antigenicidad para ratón adulto.

5.3.3. Antigenicidad para cobayo.

5.3.4. Estudios de protección en cobayos contra el desafío con la cepa XJ.

5.4. Conclusiones.

6. DISCUSION

7. APENDICE TECNICO

8. BIBLIOGRAFIA

ABREVIATURAS UTILIZADAS

- Acs : anticuerpos
- Aq : antígeno
- FA : formaldehído
- FC : fijación de complemento
- FHA : Fiebre Hemorrágica Argentina
- ic : intracerebral
- IF : inmunofluorescencia
- IFI : inmunofluorescencia indirecta
- im : intramuscular
- in : intranasal
- LCM : Coriomeningitis Linfocitaria
- LT : Linfocitos T
- Neu : neutralizantes
- PEG : Polietilenglicol
- pi : post-infección
- SNC : Sistema Nervioso Central
- VJ : Virus Junín.

1. RESUMEN

Los estudios realizados tuvieron como objetivo aportar datos para contribuir al control de la Fiebre Hemorrágica Argentina.

Con el objeto de determinar si otras especies, además de los principales reservorios son capaces de desarrollar infecciones persistentes, se estudió este aspecto en cuatro cricétidos: Akodon azarae, habitante del área endémica, Akodon dolores, Akodon molinae y Calomys callidus, habitantes de zonas limítrofes.

Se obtuvieron las siguientes conclusiones:

a) C. callidus, tanto lactante como adulto, inoculado por vía intranasal desarrolló una infección persistente evidenciada por la detección de virus en cerebro y/o glándula salival hasta los 2 meses pi.

Asimismo, se pudo observar transmisión horizontal de las crías infectadas a sus madres.

b) A. molinae lactante, inoculado por vía ic, desarrolló una infección persistente evidenciada por la presencia de virus infeccioso en cerebro hasta los 2 meses pi y de antígeno viral hasta los 6 meses pi.

c) A. azarae lactante, inoculado por vía in, presentó virus en SNC hasta los 2 meses pi, en baja concentración ya que sólo pudo ser detectado por cocultivo.

- d) Los adultos, A. azarae, A. dolores y A. molinae desarrollaron una infección asintomática evidenciada por la presencia de Acs.
- e) Nuestros resultados indican que otras especies, aparte de los principales reservorios de VJ, son capaces de desarrollar infección persistente luego de la inoculación experimental. Por lo tanto, sería importante determinar si se encuentran infectados en la naturaleza. Si esto fuera así, el control de los roedores sería extremadamente difícil y además cabría esperar una mayor expansión del área endémica de FHA.

La inmunización de la población susceptible es otra forma de controlar esta enfermedad. Una alternativa es la utilización de un antígeno inactivado. Para ello, se inactivó la cepa XJ-Clon 3 con formaldehído al 0,1% ó 0,05%; se concentró por precipitación con polietilenglicol o por ultracentrifugación y luego de descartar infectividad residual en los antígenos inactivados se ensayó su poder inmunogénico para ratones adultos y cobayos. Asimismo, en este último huésped se determinó protección contra el desafío con la cepa prototipo XJ.

Se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- a) Fue posible inactivar la cepa XJ-Clon 3 de virus Junín con formaldehído sin destruir su capacidad antigénica, ya que la inoculación de antígenos inactivados a ratón adulto y a cobayo indujo en ambos la formación de anticuerpos neutralizantes e inmunc-

fluorescentes.

- b) La inmunización de cobayos con antígenos inactivados a pesar de inducir anticuerpos neutralizantes no protegió contra el desafío con la cepa prototipo XJ.
- c) La ausencia de protección en los cobayos inmunizados frente al desafío con la cepa patógena, señala que otros mecanismos además de la inmunidad humoral, parecen ser indispensables para obtener protección.

2. INTRODUCCION

2.1. Características de los Arenavirus.

Los Arenavirus comprenden dos grandes grupos: a) Los Arenavirus denominados del Viejo Mundo que incluyen al virus de la Coriomeningitis Linfocitaria (LCM) y el Complejo Lassa: virus Lassa, Mobala y Mopeia y los recientemente aislados Ippy y Skukusa (1) y los virus del Nuevo Mundo o "Complejo Tacaribe" que comprenden a los virus Junín (VJ), Machupo, Tacaribe, Amapari, Flexal, Pichinde, Latino, Paraná y Tamiami (2).

Los Arenavirus patógenos para el hombre son: LCM, Lassa, Machupo y Junín.

El primer arenavirus aislado fue el virus LCM, considerado actualmente como prototipo de la familia (3). Se lo describió en 1968, como un virus envuelto de 50-200 nm de diámetro, siendo la característica estructural más llamativa, la presencia de uno o más gránulos densos a los electrones, que luego se demostró que eran ribosomas derivados de la célula huésped.

Posteriormente, en base a similitudes morfológicas y antigénicas se propuso el nombre de Arenavirus para este grupo (4) y en 1970 el Comité Internacional de Taxonomía de Virus estableció la familia Arenaviridae (5).

Los miembros de esta familia son virus esféricos, ovoides o pleomórficos de 50-300 nm de diámetro, poseen una envoltura

proveniente de la célula huésped; su genoma viral consiste en dos segmentos de ARN de cadena simple designados como L (large) y S (small) y presentan además ARN ribosomal 28 S y 18 S de origen celular.

El polipéptido más abundante es el N o NP de la nucleoproteína que constituye el 56-66% del total de las proteínas y está firmemente unido al ARN viral. Se han descrito dos glicoproteínas de membranas designadas GP1 y GP2 para los virus Pichinde, LCM, Machupo y Lassa. Para los virus Tacaribe, Tamiami y Junín sólo se ha identificado una glicoproteína. Se han descrito otros polipéptidos, entre ellos el polipéptido L al que se ha adjudicado función de polimerasa viral.

El ARN S contiene información para la proteína de la nucleocápside (N) y para el precursor de la glicoproteínas de la membrana viral (GPC) y el ARN L codificaría para el polipéptido L (6).

La estructura de la nucleocápside de los Arenavirus en partículas virales intactas no se conoce con exactitud, si bien se ha descrito la morfología del complejo ribonucleoproteico aislado de viriones como una estructura circular constituida por subunidades semejantes a las cuentas de un collar.

Una de las particularidades de los ARN de la familia Arenaviridae es su estrategia de replicación. Se determinó por estudios de clonado y secuenciación del ARN S de Pichinde y LCM, que

ese fragmento posee una doble polaridad o "ambisense" (7). Es decir que la mitad 3' del ARN S (que codifica para el polipéptido N) posee una secuencia complementaria al ARN m de ese polipéptido, o sea funciona como ARN (-) y la mitad 5' (que codifica para el polipéptido GPC), tiene la misma secuencia que el ARN m de dicho polipéptido, es decir funciona como ARN (+).

Entre estos dos genes de distinta polaridad se observa una región intergénica con una secuencia complementaria invertida que daría lugar a una configuración de rulo o "loop".

Asimismo, los extremos 3' y 5' del ARN S presentan secuencias complementarias que darían lugar a moléculas circulares, como las observadas en algunas micrografías electrónicas (6).

El ARN m de la GPC, no se podría sintetizar hasta que exista replicación del ARN viral. Ambas especies de ARN m, el correspondiente al N y el de la GPC, se regularían independientemente ya que utilizarían dos templados distintos (7).

Todos los miembros de la familia Arenaviridae cruzan serológicamente por inmunofluorescencia (IF) pero son antigénicamente distintos entre sí por neutralización e inmunoprecipitación. Así, los virus del Complejo Tacaribe, cruzan entre sí por FC pero sólo débilmente con los arenavirus del Viejo Mundo LCM, Lassa ó Mozambique (8).

A pesar de la distancia antigénica entre el VJ y el virus LCM, ambos virus pueden interactuar, ya que se ha observado la formación

de recombinantes por infecciones mixtas "in vitro" (9) y en la naturaleza se ha aislado LCM de roedores capturados en zona endémica de FHA (10).

Los más cercanos dentro del Complejo Tacaribe son Junín y Tacaribe, ya que cruzan fuertemente por FC y comparten varios epitopes de la nucleocápside (11) como fue demostrado por estudios con Acs monoclonales. Más aún, se observó por inmunoprecipitación, que Junín y Tacaribe compartirían por lo menos un determinante antigénico a nivel de la glicoproteína (12).

2.2. Arenavirus y sus reservorios.

Una de las características destacables de los Arenavirus es su capacidad de infectar en forma persistente a roedores y de esta manera perpetuarse y diseminarse en la naturaleza.

Mims (1975) ha definido una infección persistente como aquella en que el virus se mantiene en el organismo del animal durante períodos prolongados, generalmente toda su vida y ésta es detectable por algún método ya sea como partícula infecciosa y/o como antígeno intracelular (13).

Aunque se conocen más de 1700 especies de roedores agrupados en 34 familias, los Arenavirus persisten sólo en roedores de las familias Cricetidae y Muridae. La única excepción es el virus Tacaribe que sólo se aisló a partir de murciélagos (Ar-

tibeus sp) en la isla Trinidad, y no de roedores (Tabla N°1) (2).

El principal mecanismo para el mantenimiento de la infección en roedores parece ser la transmisión horizontal , dado que habitualmente se aísla virus de fauces y/o de orina. Para el virus LCM, se comprobó transmisión vertical a través de células sexuales. En los Vj y Machupo se observó transmisión vertical postnatal.

La infección experimental con Arenavirus en roedores criados en el laboratorio ha demostrado que existen diversas respuestas a la infección que dependen tanto del virus como del huésped.

Arenavirus del Viejo Mundo

Los dos Arenavirus del Viejo Mundo patógenos para el hombre son los virus LCM y Lassa. El virus LCM produce una enfermedad leve que suele ser inaparente y sólo unos pocos casos han resultado fatales.

El ratón doméstico ó Mus musculus es el reservorio natural, lo que explica la distribución mundial de esta enfermedad. El hamster es sensible a la infección y es también capaz de transmitir el virus al hombre. (14).

El modelo virus LCM-Mus musculus es el mejor conocido. La

Tabla Nº1

ARENAVIRUS Y SUS RESERVORIOS NATURALES

Arenavirus	Aislado de :	País de origen	Habitat
<u>Viejo Mundo:</u>			
LCM*	Mus musculus.	América y Europa	Peridoméstico.
<u>Complejo Lassa:</u>			
Lassa*	Mastomys natalensis	Oeste de Africa	Savana
Moneja	Mastomys natalensis	Sur de Africa	Savana
Mobala	Praomys jacksoni	Africa Central	Savana
Inny	Praomys sp	Africa Central	Savana
<u>Nuevo Mundo ó</u>			
<u>Complejo Tacaribe:</u>			
Junín*	Calomys musculinus	Argentina	Pasturas
	Calomys laucha	Argentina	
	Akodon azarae	Argentina	
Machupo*	Calomys callosus	Bolivia	Pasturas Peridoméstico
Tacaribe	Artibeus lituratus	Trinidad	Bosque
	Artibeus jamaicensis		Periurbano
Amapari	Oryzomys gaeldi	Amapá-Brasil	Bosque Tropical
	Neacomys guianae		" "
Flexal	Oryzomys spp	Brasil	"
Pichinde	Oryzomys albiquularis	Colombia	"
Latino	Calomys callosus	Bolivia	Pasturas
			Peridoméstico
Parana	Oryzomys buccinatus	Paraguay	Bosque Tropical
Tamiami	Sigmodon hispidus	Florida, USA	" "

* Patógenos para el hombre

Datos obtenidos de Howard C. (1986) (2) y Kiley MP et al (1986) (1).

infección neonatal o en el útero resulta en una infección persistente con detección de virus durante toda la vida del animal. Inicialmente, se postuló que la presencia de virus se debía a una falta de respuesta inmune del huésped y se lo consideró el prototipo de tolerancia inmunológica. Sin embargo, posteriormente se demostró que los ratones persistentemente infectados presentaban en la edad adulta una glomerulonefritis tardía con depósitos de inmunocomplejos en glomérulos, lo que indicaba la existencia de una respuesta inmune humoral (15).

Aunque se producen Acs contra las proteínas virales, la respuesta **celular** -LT citotóxicos- se encuentra significativamente disminuida en los animales persistentemente infectados. Este efecto selectivo se postula como una de las razones de la persistencia viral (16). Asimismo, se ha observado acumulación de ácido nucleico viral en órganos de animales persistentemente infectados mediante técnicas de hibridación molecular, lo que sugiere la formación de partículas incompletas o defectivas "in vivo" (17), que también podrían ser una de las causas de la persistencia viral.

Los Mus musculus adultos inoculados con LCM desarrollan una infección aguda, que dependiendo de la dosis, vía de inoculación, características de la cepa viral (neuro o viscerotropa) y de la cepa de ratón, puede resultar en la muerte debido a mecanismos inmunopatológicos de lesión o bien en la curación

con limpieza del virus del organismo (15).

El virus Lassa fue aislado en 1969 de dos médicos misioneros que padecían la enfermedad en Lassa, Nigeria. Posteriormente, se describió la enfermedad en distintos lugares del oeste de Africa.

En 1972, el virus Lassa fue aislado de Mastomys natalensis (Muridae) considerado el principal reservorio, que se distribuye ampliamente en el continente africano.

La Fiebre Lassa es una enfermedad severa con 15-20% de mortalidad y cursa con miocarditis, miositis; neumonitis, encefalopatía, hepatitis y diátesis hemorrágica (18).

Posteriormente, se aislaron otros virus relacionados a Lassa tanto de M. natalensis como de otros roedores en distintas partes del Africa.

Semejante al complejo Tacaribe en los Arenavirus del Nuevo Mundo, existiría un complejo de Arenavirus africanos relacionados antigénicamente entre sí y asociados con distintos reservorios pero con diferente potencial de patogenicidad para el hombre (18), siendo hasta el presente, el virus Lassa el único patógeno demostrado para el ser humano.

La infección experimental con virus Lassa en Mastomys nata-

lensis puede producir tanto en lactantes como adultos una infección persistente asintomática con eliminación de virus a través de saliva y orina y presencia de virus en cerebro, ganglios linfáticos y otros órganos, siendo la respuesta inmune humoral pobre y tardía. En roedores capturados en Sierra Leone se observó que los animales infectados presentaban un reducido tamaño corporal, miocarditis y perivasculitis (19).

Recientes estudios citogenéticos de Mastomys natalensis han determinado que existen tres especies con un número de cromosomas $2n$ igual a 32, 36 y 38 que ocuparían distintos nichos ecológicos. M. natalensis $2n=36$ sería infectado por el virus Mopeia y M. natalensis de $2n=32$ ó $2n=38$ serían infectadas por virus Lassa tanto en la naturaleza como en el laboratorio (18).

Los hábitos peridomésticos de estos roedores, los elevados títulos de virus en orina ($10^3 - 10^5$ DICT₅₀/ml) y la relativa estabilidad del virus Lassa, favorecen la transmisión al hombre. Asimismo, la transmisión de persona a persona es frecuente y de importancia especialmente como fuente de infección intrahospitalaria.

Arenavirus del Nuevo Mundo.

Solamente dos arenavirus han sido aislados en América del Norte, el virus LCM -distribuido universalmente- y el virus Tamiami.

Este último fue aislado en 1970 en la Península de Florida de su único huésped natural, la rata algodonera, Sitomodon hispidus. La infección experimental en animales neonatos resulta en una infección persistente caracterizada por un tropismo viral temprano por el tejido linforeticular, observándose virus y antígeno viral en todo el tejido linfohemopoyético ya a los 16 días pi. Posteriormente, existe diseminación a todos los órganos incluido el SNC. Los animales adultos resultaron poco sensibles a la infección.(20).

Los restantes arenavirus del complejo Tacaribe han sido aislados de roedores de Sud América, siendo patógenos para el hombre el virus Machupo y el VJ, agentes productores de la Fiebre Hemorrágica Boliviana y Argentina, respectivamente. El virus Tacaribe, debido a su estrecha relación antigénica con el VJ y su falta de patogenicidad para el hombre se lo ha propuesto como una vacuna a virus heterólogo contra la FHA.

El virus Machupo se aisló en la naturaleza solamente de Calomys callosus. Este roedor habita zonas de pasturas de la sierra Boliviana y en ausencia de otros roedores peridomésticos, se lo encuentra en jardines y viviendas facilitándose de esta manera el contacto con el hombre.(2)

En la infección experimental de Calomys callosus con virus Machupo se observó que : a) los neonatos desarrollaban una in-

fección inmunotolerante con viremia persistente; b) los animales mayores de 9 días presentan una infección con respuesta dividida ya que la mitad desarrollan una infección persistente inmunotolerante caracterizada por una marcada anemia hemolítica, esplenomegalia, viremia, viruria y ausencia de Acs, fertilidad reducida y una menor vida media y desarrollo corporal (21), mientras que la otra mitad presenta respuesta inmune humoral capaz de la limpieza del virus.

El número de casos de Fiebre Hemorrágica Boliviana, se redujo en 1964 y en la actualidad ya no se registran casos de esta zoonosis. El control se logró mediante el uso de trampas que fue efectivo en reducir el número de roedores peridomésticos, siendo el 98% de los animales capturados C. callosus (22).

2.3. Fiebre Hemorrágica Argentina: Características de la enfermedad.

La Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA) es una enfermedad endemoepidémica que afecta principalmente a trabajadores rurales de una de las zonas agrícola-ganaderas más importantes del país.

Fue descrita por primera vez en 1955 en epidemias de la ciudad de Bragado (Provincia de Buenos Aires) aunque ya existían datos clínicos desde 1943 (23).

En 1958 fue aislado el VJ, agente etiológico de esta enfer-

medad a partir de sangre y órganos de pacientes de FHA, por dos grupos de investigadores dirigidos por el Dr. Parodi (24) y el Dr. Pirotsky (25). En 1959, el VJ pudo ser aislado de roedores silvestres pertenecientes a los géneros Calomys, Akodon y Mus.(26).

La infección con VJ puede producir en el hombre enfermedad clínica, existiendo formas leves, moderadas y graves. En estas últimas el paciente puede fallecer con severas manifestaciones hemorrágicas y/o neurológicas en la segunda semana de enfermedad. La enfermedad clínica se caracteriza por síndrome febril, diátesis hemorrágica, leuco y plaquetopenia y compromiso variable del sistema hemopoyético, del riñón, hígado y sistema nervioso central (SNC). La mortalidad sin tratamiento oscila alrededor de 15-20% (27), aunque actualmente el tratamiento con plasma inmune en los primeros días de la enfermedad ha logrado reducir la mortalidad al 3% (28). Sin embargo, el 8-10% de los casos de FHA tratados con plasma inmune desarrollan un síndrome neurológico tardío, generalmente benigno y pasajero (29), cuya fisiopatología está aún sin dilucidar.

No todas las infecciones con VJ dan lugar a manifestaciones clínicas, ya que se han descrito infecciones subclínicas tanto en áreas endémicas como en el laboratorio. Estas infecciones subclínicas se ponen de manifiesto por la presencia de Acs en ausencia de enfermedad.

En áreas endémicas de las Pcias de Buenos Aires y Córdoba, la prevalencia de infección clínica fue de 7.6 y 9.7%, respectivamente y la de infección subclínica fue mucho menor de 1.9% y de 4.4% (30).

La puerta de entrada del VJ es cutáneo-mucosa: en el campo el virus penetra por escoriaciones de la piel, frecuentes en los trabajadores rurales, ó a través de la mucosa conjuntival bucal o nasal en contacto con aerosoles producidos durante la cosecha. Los roedores infectados son la principal fuente de contagio y la transmisión interhumana es de escasa importancia aunque se han descrito algunos casos de contagio entre parejas. (31).

En el laboratorio, se puede adquirir la infección en forma clínica o subclínica por accidentes en los que el virus entra en contacto con la piel erosionada o las mucosas al manipular materiales infectados (inoculación con aguja, pipeteo o aerosoles) (32).

2.4. Area endémica y epidemiología.

En 1958, cuando aparecieron los primeros casos de FHA, el área afectada por esta enfermedad abarcaba 16.000 km² del noroeste de la Pcia de Buenos Aires. Desde entonces este área se expandió a las Pcias de Córdoba, Santa Fe, y La Pampa, incre-

mentándose su superficie 5 veces desde 1963 hasta 1975 (33). Actualmente, se estima que abarca una superficie de 120.000 km² con una población de más de 1.000.000 de personas (Fig N°1). Se han registrado brotes anuales sin interrupción desde 1958, y se notificaron más de 20.000 casos durante este período de 28 años (34).

La incidencia de la FHA no es igual en los diferentes lugares y esta incidencia varía año a año de acuerdo a las zonas. En general, es alta durante un período de 5 a 10 años en un área nueva y luego declina, aunque se siguen reportando casos en viejas localidades. También se han observado variaciones en la incidencia global de FHA, que fue mayor durante los primeros 15 años desde la aparición de la enfermedad y hubo una significativa disminución en la última década.

La FHA tiene una prevalencia estacional, el mayor número de casos se da durante los meses de Abril, Mayo y Junio. Esto coincide con el aumento de la densidad de reservorios de VJ y con la época de la cosecha del maíz y sorgo, lo que favorece el contacto del trabajador rural con los roedores infectados (34).

2.5. Aislamiento del Virus Junín de reservorios naturales y ecología.

En 1959, Parodi y col., aislaron por primera vez el VJ de

Calomys musculinus, Calomys laucha, Akodon azarae y Mus musculus capturados en zona epidémica de la Pcia. de Buenos Aires (26). Posteriormente, Sabattini y col. en la zona endémica de la Pcia. de Córdoba, recuperaron VJ del 21% de los Calomys y del 10% de los Akodon capturados (35). En un segundo estudio, se aisló VJ del 28% de los C. musculinus, 21% de los Calomys laucha y en menor proporción de A. azarae y Mus musculus (36). Estos porcentajes señalan la importancia de Calomys como reservorio.

El VJ también se ha aislado a partir de roedores de áreas lejanas a la conocida como endémica. En 1959, Ruggiero y col. recuperaron VJ a partir de Mus musculus en al región de Azul (Pcia de Buenos Aires) (37).

Weissenbacher y col. (38) recuperaron VJ del cerebro de un A. azarae capturado en la región de Pila (Pcia. de Buenos Aires) ubicada a 280 km del foco endémico de FHA y demostraron Acs IF en dos habitantes del lugar. Estos datos indican que el VJ no estaría restringido al área conocida como endémica y en el futuro podría esperarse la aparición de casos clínicos en nuevas zonas aún no reconocidas como endémicas.

En zona endémica, se ha demostrado también la actividad de otro arenavirus, el virus LCM, que se aisló de Mus musculus capturados cerca de Pergamino (Pcia. de Buenos Aires) y en la Pcia. de Córdoba así como también se detectó infección por este

virus en pacientes con diagnóstico clínico presuntivo de FHA (10).

Los estudios ecológicos de las comunidades de roedores realizados tanto en ambientes naturales como en áreas transformadas por la actividad del hombre han contribuido al esclarecimiento de aspectos epidemiológicos de la FHA así como a la elaboración de propuestas destinadas al control de roedores.

Los roedores más comúnmente capturados en área endémica son: Calomys musculinus, Calomys laucha, Akodon azarae, Dolomys obscurus, Oryzomys niaripes y Mus musculus (39).

Estos roedores se reproducen desde mediados de primavera a principios de otoño. Las menores densidades se registran en primavera y comienzos del verano para luego aumentar exponencialmente a fines de verano y otoño, cayendo en los meses de Julio a Agosto con las heladas y la falta de cobertura vegetal (40).

Se ha observado que el desarrollo de la actividad agrícola o agrícola-ganadera lleva a una uniformidad de los habitats disponibles con una disminución en el número de las especies. Los roedores se distribuyen de acuerdo a sus características en estos ambientes. Así, en áreas de cultivo se podrán encontrar especies que tengan una baja exigencia en cuanto a habitat, gran capacidad de incremento e invasión. En este grupo se encuentran C. musculinus y C. laucha.

En cuanto a ambientes no perturbados, como los bordes del

camino y/o de los cultivos donde se conserva la vegetación autóctona, habitarán especies con una menor capacidad de incremento, que prefieran mayor cobertura vegetal y que sean capaces de competir y defender su habitat. En este último grupo se encuentran A. azarae, B. obscurus y Oryzomys nigripens (41).

De estas especies, las dos primeras dominan etológicamente a C. musculus. Por eso, es que hay menor cantidad de Calomys en los bordes, pues la mayor estabilidad de este habitat hace que sean los procesos de competencia los determinantes de la composición final de las especies de ese ámbito (41).

Estudios de las comunidades de roedores en las zonas de Pergamino y Río Cuarto demostraron que el avance de la agricultura en especial el incremento en la producción del maíz, lleva consigo un incremento de la densidad de Calomys reservorios y la disminución de los sistemas de control de estos, tales como predadores y especies competidoras (42).

2.6. Infección experimental con virus Junín en roedores silvestres.

Los principales estudios de la infección experimental con VJ se ha realizado en Calomys, empleándose tanto cepas salvajes como atenuadas.

a) Infección de Calomys con cepas salvajes.

Sabattini y col. (35,36) estudiaron la respuesta de Calomys

adultos y lactantes a la infección con la cepa salvaje Cba AN 9446, aislada de sangre de C. musculinus capturado en el área endémica. Esta cepa, inoculada por vía ic o in a C. musculinus y C. laucha lactantes, induce una infección persistente y asintomática, con viremia que se mantiene de por vida acompañada de eliminación de virus por saliva y orina.

La infección experimental de Calomys adultos no siempre resulta en una infección persistente. Solamente un bajo porcentaje de estos animales desarrolla una viremia persistente.

Martinez Peralta y col. determinaron que las glándulas salivales constituyen en C. musculinus un importante sitio de replicación de VJ, ya que presentan altos títulos y partículas virales en brotación por microscopía electrónica, todo ello sin alteración histológica (43).

La eliminación de VJ a través de la saliva sugiere la posibilidad de transmisión horizontal como mecanismo de mantenimiento de la infección en la naturaleza. Esta forma de transmisión ha sido demostrada experimentalmente cuando el contacto entre los roedores es estrecho y continuado (35).

Asimismo, se ha observado que puede ocurrir transmisión de la madre a las crías luego del nacimiento (transmisión vertical postnatal), durante la lactancia, probablemente por transferencia de la infección a las crías a través de la saliva y/o leche de la madre(35). No existen aún datos sobre la existencia de

transmisión antenatal (trasplacentaria o por células germinales).

Vitullo y col. observaron que C. musculus lactantes inoculados con Cba AN 9446 por vía in desarrollan una infección persistente sin signos neurológicos de enfermedad, pero presentan una mortalidad del 70% entre los 24-40 días pi, precedida por un retraso en el crecimiento. Los sobrevivientes presentaron una marcada reducción en la eficiencia reproductiva. Este hecho señala que la transmisión vertical por sí sola sería insuficiente como mecanismo de mantenimiento del virus en la naturaleza.(44)

Estos resultados son similares a los observados en la infección de C callosus con virus Machupo, en donde la infección persistente va acompañada de un menor peso corporal y una reducción de la fertilidad. (21)

Por el contrario, cuando se inocularon Cmusculus adultos con esta cepa, se observó el desarrollo de una infección persistente pero sin mortalidad ni alteraciones en la fertilidad (44)

b) Infección de Calomys con cepas atenuadas.

La cepa XJ-Clon 3 de VJ es atenuada para el cobayo pero es neurotrópica y neurovirulenta para distintos huéspedes experimentales como la rata, el ratón y el primate Cebus apella (45). Contrariamente a lo observado con cepas salvajes, la cepa XJ-

Clon 3 es patógena también para el C. musculus lactante y adulto.

Se han observado distintas respuestas a la infección con esta cepa dependiendo de la edad del huésped y de la vía de inoculación. Cuando se inocularon C. musculus con XJ-Clon 3 por vía ip, solamente los animales de 1-10 días fueron sensibles, registrándose una morbilidad del 80% y mortalidad del 50%. En los sobrevivientes, así como en algunos que nunca presentaron signos de enfermedad, se detectó una infección persistente con altos títulos virales en cerebro (46) y ocasionalmente viremias recurrentes hasta los 60 días (47). En estos C. musculus crónicamente infectados se observó meningoencefalitis independientemente de la presencia o no de Acs Neu (48).

El virus recuperado en cerebro o sangre de C. musculus persistentemente infectados fue sólo parcialmente neutralizado por el suero del mismo animal, mientras que este neutralizó en forma completa a la cepa original utilizada para su infección. La recuperación de estas variantes antigénicas de animales crónicamente infectados explicaría porqué la respuesta inmune humoral no fue, por sí sola, capaz de eliminar el virus del organismo (47). (49).

El tratamiento de C. musculus inoculados con XJ-Clon 3 con ciclofosfamida no produjo variaciones importantes en el curso de la infección, demostrando que los Acs no serían importan-

tes en el mecanismo de defensa (50). Por el contrario, en este mismo sistema C. musculinus - XJ-Clon 3 vía ip, se observó que la administración de suero antitimocito durante los primeros días de vida produce un descenso de la mortalidad y un retraso en la fecha de muerte con respecto a los controles sin inmunodeprimir, indicando que la inmunidad celular jugaría un papel en la patología de la infección aguda (51).

Cuando se utilizaron las vías in ó ic, XJ-Clon 3 produjo en C. musculinus lactantes una infección aguda, con elevada morbimortalidad. En los sobrevivientes no se detectó virus en cerebro (por métodos convencionales) presentando Acs Neu en circulación . (Vitullo AD, Comunicación Personal).

Contrariamente a la alta sensibilidad de los C. musculinus lactantes inoculados con XJ-Clon3 por vía ip, los adultos resultaron ser resistentes.

Se observó que el VJ es capaz de replicar en macrófagos peritoneales de animales lactantes tanto "in vivo" como " in vitro", mientras que en los macrófagos de adultos sólo replica "in vitro". Este hecho podría explicar la falta de sensibilidad de los roedores adultos a la infección ip. (52).

Cuando se emplea una vía de infección más cercana a la natural como es la vía in, la cepa XJ-Clon 3 induce en Calomys adultos una mortalidad del 50%, con aislamiento viral positivo y meningoencefalitis, aún en presencia de Acs Neu. En estos

animales no se observa eliminación de virus por fauces y orina (53).

Así también, las hembras adultas en contacto con sus crías infectadas con XJ-Clon 3, son capaces de infectarse presentando Acs circulantes y en un 26% de ellas se detecta una infección persistente con signos neurológicos (54).

c) Infección de otros cricétidos.

Los estudios de infección experimental con VJ de otros cricétidos son escasos y fragmentarios.

A. azarae naturalmente infectado con VJ fue capturado tanto dentro como fuera del área endémica. (35,36,38)

Los animales lactantes inoculados con la cepa Cba AN 9446, por vía ic ó in no presentaron morbimortalidad detectándose viremia transitoria y Acs circulantes.

Los adultos inoculados por vía ip ó ic tampoco presentaron morbimortalidad o infectividad en sangre u órganos y desarrollaron una rápida respuesta inmune humoral. (36)

Otros dos cricétidos estudiados fueron Phyllotis gliseflavus y Bolomys obscurus. La primer especie no es habitante del área endémica y resultó poco sensible a infectarse con VJ. La segunda, habitante del área endémica, fue sensible a la infección con VJ presentando viremia hasta los 30 días pi.(36).

2.7. Métodos de control de la enfermedad.

Los roedores juegan un papel importante en la diseminación de muchas enfermedades infecciosas del hombre y animales domésticos y habitualmente la transmisión de una enfermedad puede reducirse mediante el control de las poblaciones de los roedores reservorios.

Sin embargo, existen otras formas de disminuir estas infecciones. Así, el control de artrópodos vectores, la inmunización de la población susceptible y la provisión de medidas sanitarias y médicas adecuadas, son otros caminos destinados al control de estas enfermedades.

En el caso de la FHA, los esfuerzos se han orientado en distintas líneas de trabajo: reducción de reservorios, reducción de la exposición del hombre al virus, inmunización de la población susceptible y tratamiento precoz de los casos declarados de enfermedad.

La administración temprana de plasma de convalescientes es la única terapia específica para FHA (29), no habiéndose utilizado aún drogas antivirales en estos pacientes. Experimentos recientes con ribavirina en el primate Callithrix jacchus infectado con la cepa XJ demostraron que esta droga aumenta la supervivencia y retarda la fecha de muerte de los animales infectados (55).

2.7.1. Control de roedores.

La consideración de la situación ecológica y epidemiológica es esencial para poder adoptar decisiones en el control de roedores. Por ejemplo, es necesario tener en cuenta la distribución y prevalencia de la infección en poblaciones de roedores, sus hábitos y densidades en las diversas áreas y su sensibilidad a métodos de lucha.

Los métodos habituales para controlar roedores son: control ambiental o cultural mediante la modificación del ambiente; control químico con rodenticidas u otros productos; control biológico mediante agentes biológicos tales como parásitos, predadores u otros patógenos que disminuyan la población de roedores, y la utilización de trampas (56).

En 1964, en San Joaquín, Bolivia se utilizó un programa de erradicación de roedores que logró reducir exitosamente los casos de Fiebre Hemorrágica Boliviana, Se capturaron 3020 roedores de los cuales 2896 fueron C. callosus, lográndose una reducción en el número de casos de Fiebre Hemorrágica Boliviana dos semanas después del comienzo del programa (22).

Para FHA, el control de roedores reservorios es más complejo dado que existe más de una especie reservorio: Calomys musculinus, C. laucha, A. azarae y Mus musculus y con excepción de éste último que posee hábitos peridomésticos, las otras especies tienen hábitos rurales y se encuentran ampliamente distri-

buidos en una vasta región agrícola.

Los estudios de aislamiento en la naturaleza y los de infección experimental señalan a C. musculinus y C. laucha como los reservorios más importantes de VJ. Además, debido a que estas dos especies se encuentran principalmente en las áreas de cultivo, son las más importantes en la transmisión del virus al hombre.

Un método de control propuesto fue, cercar las poblaciones de Calomys, favoreciendo el desarrollo de habitats estables donde se beneficiaría el crecimiento de roedores del género Akodon. Esta hipótesis sería válida si Akodon u otros cricétidos no pasaran a ocupar el papel de Calomys en la cadena epidemiológica de FHA (39).

Más recientemente, basándose en estudios sobre densidad de roedores en relación al tipo de cultivo y manejo agrícola, Busch y col. propusieron el desarrollo de los cultivos de soja en reemplazo de los cultivos de maíz, así como el pastoreo intensivo en los campos antes de la siembra.(57).

Se ha observado una disminución de la incidencia de FHA coincidentemente con la introducción del cultivo de soja en área endémica. Sin embargo, la aparición de FHA en la Pcia de Santa Fé fue coincidente con el aumento del área de cultivo de la soja (34) por lo que estas medidas son aún tema de controversia.

Si bien la incidencia de FHA ha decrecido en la última década, el área afectada por esta enfermedad ha ido en aumento, y por lo tanto la población expuesta es mayor.

Vanella (58) y Kravetz (42) han sugerido una distribución del VJ muy superior al área conocida hasta el momento, basándose en la distribución de los reservorios naturales del virus. Si las condiciones ecológicas facilitan el contacto entre los roedores y el hombre se producirían casos humanos de FHA en zonas no conocidas aún como endémicas.

Tanto los estudios iniciales de Ruggiero (37), y de Parodi (26), como los más recientes de Weissenbacher y col. (38) apoyan esta hipótesis.

Por otra parte, se desconoce si otras especies de cricétidos relacionados a los reservorios principales, C. musculinus y C. laucha, podrían actuar como reservorios del VJ en ausencia de ellos. Si esto fuera así el control de roedores como método de lucha contra la FHA resultaría aún más complejo.

Uno de los objetivos de este estudio fue determinar si A. azarae, A. molinae, A. dolores y C. callidus; cricétidos con una amplia distribución en nuestro país son capaces de infectarse persistentemente con VJ y actuar de alguna manera como reservorios.

El género Akodon sp está compuesto de aproximadamente 20 especies diferentes y se encuentra dentro de la tribu Akodon-

tini (59). El reconocimiento de las especies dentro de este grupo es difícil y su distribución es poco conocida. Una particularidad de este género es la de presentar polimorfismos cromosómicos, es decir que dentro de una misma especie existen variaciones en el número y morfología de sus cromosomas.

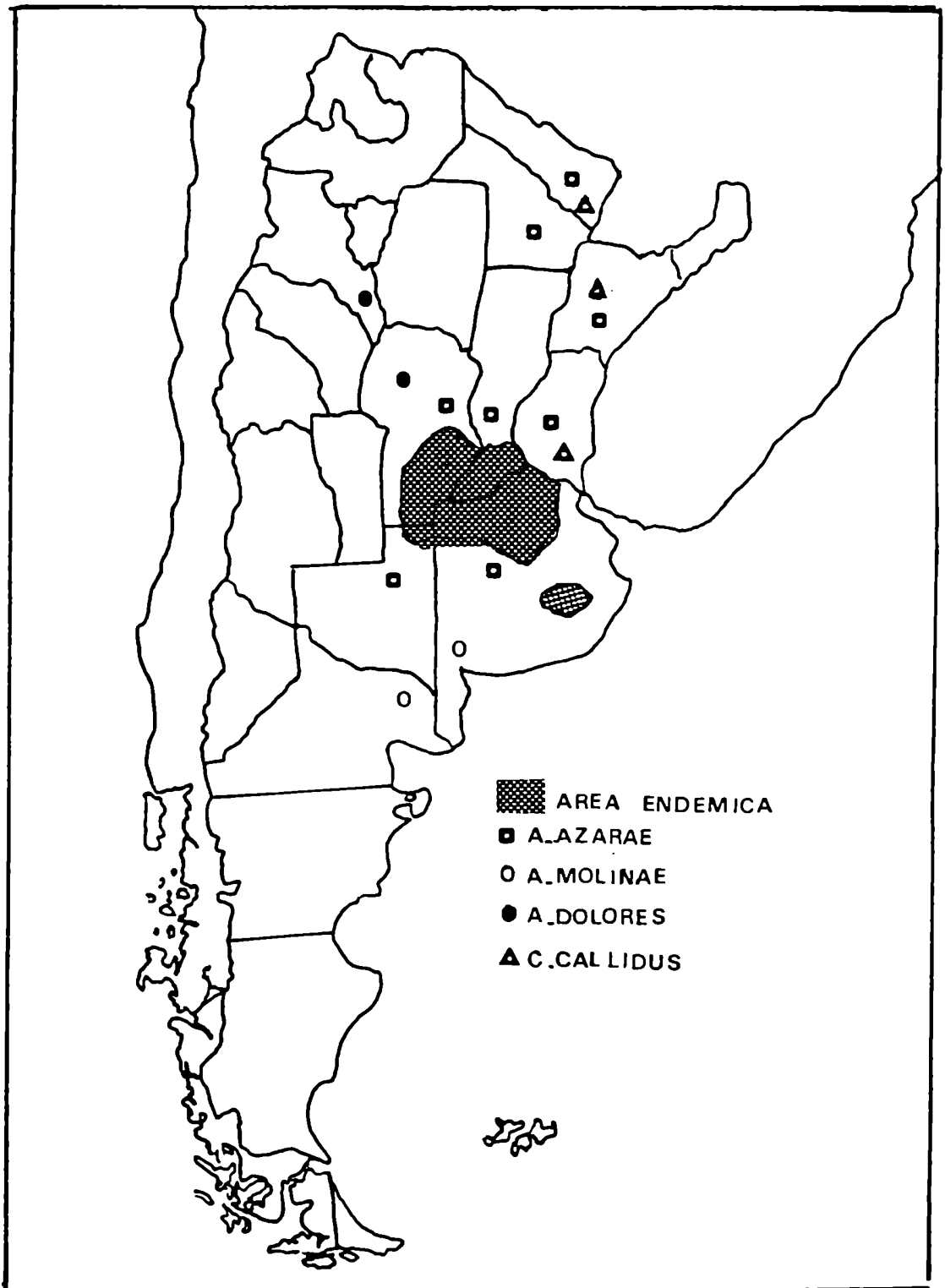
En el caso de A. azarae se observó polimorfismo en el par de cromosomas sexuales, dando lugar a cinco tipos diferentes de hembras (60). En A. molinae se observó polimorfismo en el par N°1, siendo posible encontrar especímenes con número diploide de cromosomas (2n) igual a 42, 43 ó 44. En la naturaleza, el más abundante es 2n=42. A. dolores no sólo presenta polimorfismo del par N°1 sino también del N°3-5, variando su complemento cromosómico de 34 a 40 (61).

A. azarae, presenta una amplia distribución que abarca la Argentina, Brasil y Uruguay. En Argentina se capturó en Corrientes, Entre Ríos, Santa Fe, Córdoba, La Pampa, Buenos Aires, Chaco y Formosa y provincias del noroeste.(62). A. molinae se ha capturado en el sur de la Pcia de Buenos Aires (Laguna de Chasicó) y en Río Negro (Fuerte General Roca). A. dolores se lo encontró en Córdoba (Deán Funes y Laguna Larga) y en Catamarca (La Carrera) (60) y su distribución abarcaría las Sierras de Córdoba (63) (Fig. N°1).

El género Calomys (tribu Phyllotini) ha sido revisado taxonómicamente por distintos autores que han reconocido diferentes

Figura N°1

AREA ENDEMICA DE FHA Y DISTRIBUCION GEOGRAFICA DE AKODON AZARAE,
A.DOLJRES, A. MOLINAE y CALCMYS CALLIDUS.



números de especies en cada caso. En 1962, Hershkovitz realizó una revisión taxonómica de Calomys (Hesperomys), reconociendo la existencia de sólo cuatro especies, agrupando básicamente a las especies grandes bajo el nombre de C. callosus y a las especies pequeñas como C. laucha. (64)

El complejo específico C. callosus reuniría además de ésta a las especies C. venustus y C. fecundus.

Independientemente de la poca variabilidad morfológica externa de estas especies, los estudios citogenéticos han puesto de manifiesto la existencia de diferencias cromosómicas suficientemente importantes que indican aislamiento reproductivo entre las mismas. Este tipo de estudios ha permitido reconocer como especie plena a C. callidus (65) originalmente descrita por Thomas como subespecie de C. venustus.

En 1961, Cabrera estableció su habitat en la Mesopotamia y Pcia. de Santa Fe (63). Recientemente, ha sido capturado en la Pcia. de Chaco, lo que hace suponer que su distribución geográfica puede ser más amplia. (Fig N°1) (42).

Se han establecido colonias de A. azarae (66), A. molinae (67), A. dolores (68) y Calomys callidus (69) y se han estudiado sus parámetros de crecimiento y reproductivos en condiciones normales de bioterio.

2.7.2. Imunización de la población.

En las infecciones virales el mejor método de control ha sido la inmunización de la población susceptible. Clásicamente las vacunas virales pueden realizarse con virus homólogo, ya sea vivo y atenuado o por el contrario con virus inactivado. Otra posibilidad es la utilización de un virus heterólogo es decir antígenicamente relacionado con el virus a prevenir.

Recientemente, se han desarrollado nuevas alternativas tales como vacunas a subunidades virales en forma de péptidos sintéticos o producidos por ingeniería genética en células procariontas o eucariotas. Otros caminos son la utilización de anticuerpos antiidiotipo o la obtención de recombinantes entre un virus no patógeno para el hombre (Ej: Vaccinia) en cuyo genoma se han insertado genes del virus patógeno.

Cualquiera sea el método adoptado, es imprescindible que el antígeno obtenido sea eficaz en su capacidad de inducir protección e inocuo, es decir incapaz de provocar daño al huésped ya sea por mecanismos directos o indirectos.

Los estudios sobre vacunas para FHA han seguido distintas líneas de investigación: vacuna a virus homólogo vivo y atenuado, a virus inactivado, a virus heterólogo (virus Tacaribe) y a subunidades con la glicoproteína GP38 de virus Junín. (70)

Vacunas a virus vivo y atenuado.

Uno de los marcadores de virulencia del VJ más utilizados es el cobayo ya que este huésped reproduce muchos aspectos de la FHA humana. Muchas cepas aisladas de pacientes son letales para cobayo e inducen una enfermedad hemorrágica, tal es el caso de la cepa prototipo XJ. Se han descrito también cepas con moderada (MC_2) o atenuada patogenicidad para cobayo. Existen evidencias que indican que en la naturaleza existirían cepas de VJ con distinto potencial patogénico para el hombre (71).

Se han estudiado tres cepas atenuadas para el cobayo: cepa XJ-Clon 3, XJo y Candid 1.

La cepa XJ-Clon 3 ha sido una de las primeras vacunas ensayadas. Esta cepa fue clonada en células MA111 y la inmunización de cobayos por vía im los protege sólidamente contra el desafío con la cepa prototipo patógena XJ (72).

En este hallazgo se basó un ensayo piloto de inmunización de 636 voluntarios humanos con XJ-Clon 3 en 1969-1971. Los controles clínicos realizados no demostraron alteraciones de importancia, la leuco y plaquetopenia observadas fueron leves y fugaces y se detectó un alto índice de conversión serológica que alcanzó un 90% al cabo de los 3 primeros meses, un 74% al año (73) y se mantuvo hasta los 9 años en algunos casos estudiados (74).

Sin embargo, trabajos posteriores realizados en cobayos demostraron que la cepa XJ-Clon 3 inculada por vía im provoca una mortalidad del 16% (75) elevándose a 75% cuando se emplea la vía ic (76).

Otra cepa atenuada estudiada, derivada de la XJ es la variante atenuada XJo. Esta cepa tiene como ventaja sobre la anterior el hecho de no haber sido clonada en células heteroploides. Se comporta en forma similar a XJ-Clon 3 en los distintos huéspedes experimentales y sustratos celulares ensayados. La inoculación por vía im a cobayos produce una mortalidad del 11% y los sobrevivientes quedan protegidos contra el desafío con la cepa patógena (77). Cuando XJo se inoculara por vía ic se comporta en forma similar a XJ-Clon 3.

Es importante destacar que tanto XJ-Clon 3 como XJo son capaces de producir infecciones transplacentarias (78) y en el caso de XJ-Clon 3 de persistir en el cerebro de cobayos (79) y ratones (80) así como también ser neurovirulenta para el primate Cebus apella por vía ic (81).

Por estas razones y por el hecho de haber sido clonada en la línea heteroploide MA-111, la cepa XJ-Clon 3 se dejó de utilizar, a pesar de los resultados promisorios logrados inicialmente.

Recientemente, una nueva cepa, llamada Candid 1 fue seleccionada como candidata a vacuna por el Dr. Barrera Oro en USAMRIID, USA.

La Candid 1, se obtuvo por clonado de la cepa XJ44 en células fetales de pulmón de mono y es menos virulenta para el cobayo y el ratón lactante que la cepa parental (XJ44). Sin embargo, es capaz de invadir el cerebro del cobayo lactante hasta los 14 días luego de la inoculación periférica (82).

Candid 1 no fue virulenta para monos Rhesus luego de la inoculación por vías combinadas: intratalámica, intraespinal e intramuscular (83). Las lesiones observadas en el SNC tanto en monos Rhesus (84) como de Cebus apella inoculados con Candid 1 fueron significativamente menos severas que las observadas en animales inoculados con cepas patógenas (85).

No se detectó persistencia viral en cobayos inoculados con esta cepa hasta los 19 meses pi, ni en Rhesus estudiados hasta los 7 meses (86).

Estudios de inmunogenicidad realizados en cobayos y Rhesus inoculados con dosis variables de Candid 1 por vía subcutánea indicaron que el 96% de los cobayos y el 90% de los Rhesus presentaban Acs Neu contra el Candid 1 o XJ-Clon 3. Sin embargo, sólo el 34% de los cobayos y el 50% de los monos tenía Acs Neu contra cepas virulentas de VJ. A pesar de esto, 71/76 cobayos y 20/20 de los monos fueron protegidos contra el desafío con cepas virulentas (87).

Dado que Candid 1 pasó todos los requisitos preclínicos de la Administración de Drogas y Medicamentos (USA) para el ensayo

en voluntarios humanos, se inocularon 41 voluntarios de ese país. La evaluación clínica preliminar indicó un bajo nivel de efectos colaterales (88). La vía de administración más adecuada fue la intramuscular y se observó conversión serológica en el 97% de los vacunados, aunque los títulos de Acs fueron bajos. En nuestro país, se han obtenido resultados semejantes en los 9 voluntarios vacunados con Candid 1 (89). Así también, se ha demostrado que el 98% de los vacunados presentó estimulación de la respuesta inmune celular medida por transformación de linfocitos (90). Los estudios de esta cepa atenuada de VJ se encuentran en etapas avanzadas y los resultados existentes hasta el momento son muy alentadores.

Sin embargo, las dificultades para descartar la persistencia, la neurovirulencia y aún la reversión de la virulencia de una cepa atenuada de un Arenavirus capaz de persistir en el SNC justifican la búsqueda de caminos alternativos, tales como una vacuna a virus inactivado.

Vacuna a virus Heterólogos:

El virus Tacaribe integra el Complejo Tacaribe y está estrechamente relacionado antigénicamente con el VJ (8). En la Isla Trinidad, país donde se aisló el virus Tacaribe de la naturaleza (a partir de murciélagos) no se observó enfermedad atribuible a este virus ni presencia de anticuerpos en pobladores (91) aun entre los recolectores de murciélagos infectados (92).

El virus Tacaribe, como la mayoría de los arenavirus, es patógeno para el ratón lactante, sin embargo, no lo es para ratones adultos, conejos y el primate Callithrix jacchus.(45)

La inoculación experimental del virus Tacaribe a cobayos y Callithrix jacchus por distintas vías, produce infecciones inaparentes e induce altos títulos de Acs Neu confiriéndole protección duradera frente al desafío con la cepa XJ (93) (94).

En los cobayos infectados en forma inaparente se ha observado ausencia de patogenicidad, de daño tisular y de inducción de mecanismos inmunopatológicos de lesión y no se pudo detectar persistencia viral. (95)

En el marmoset Callithrix jacchus, el virus Tacaribe no es virulento aún cuando es inoculado por vía intratálámica ya que no se observan signos de enfermedad ni de daño histológico en el SNC (96).

Estos datos de falta de patogenicidad para el ser humano y de inocuidad e inmunogenicidad para cobayos y primates alientan la idea de la posible utilización del Virus Tacaribe como vacuna heteróloga contra la FHA.

Vacunas a virus inactivado

Se han ensayado diversos métodos de inactivación de VJ: inactivación fotodinámica con colorantes, luz UV y formaldehído (FA).

La inactivación fotodinámica con rojo neutro indujo protección parcial en cobayos contra el desafío con la cepa patógena, así como también estimuló una respuesta secundaria humoral en dos voluntarios humanos que habían padecido la enfermedad previamente (97).

Por inactivación con azul de metileno, se obtuvo un antígeno que protegió a cobayos contra dosis bajas de la cepa XJ. (98). Con luz ultravioleta, se logró inactivación pero la reactivación detectada hizo que estos estudios fueran discontinuados (99).

El FA es un inactivante aceptado para vacunas de uso humano y se utiliza con éxito en la preparación de vacunas eficaces para diversas enfermedades humanas como la poliomiелitis (Vacuna Salk), la Encefalitis Equina del Este y del Oeste y la hepatitis B, así como numerosas vacunas de uso veterinario.

En la inactivación de VJ con FA se han obtenido resultados contradictorios. Cuando se inactivó la cepa MC2 de VJ con FA al 2% se

obtuvo protección en el 98% de los cobayos contra el desafío con la misma cepa, que es de patogenicidad intermedia para el cobayo (100).

Por el contrario, cuando se inactivó la cepa XJ-Clon 3 con FA en iguales condiciones, no se obtuvo protección de cobayos contra el desafío con la cepa patógena XJ, aunque se logró una débil respuesta inmune humoral (101).

El estudio de inactivación del VJ con FA no ha sido exhaustivo. El VJ se inactiva rápidamente con FA a 37°C. A una concentración de 0.05%, no se recupera virus infeccioso a los 60 min. mientras que con una concentración mayor (0.2%) el tiempo de inactivación se reduce a 30 min. Si bien la inactivación fue efectiva, los antígenos obtenidos no indujeron protección contra el desafío con XJ. Esto puede atribuirse a destrucción de la capacidad antigénica del virus, por el efecto del formol sobre las glicoproteínas de envoltura y/o a la baja masa antigénica utilizada.(101).

Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue determinar si era posible conservar la antigenicidad de XJ-Clon 3 modificando las condiciones de inactivación con FA y de esta manera obtener un antígeno de VJ con capacidad protectora para cobayos.

3. OBJETIVOS

3.1. Infección experimental con virus Junín (VJ) de Akodon azarae, A. dolores, A. molinae y Calomys callidus.

Determinar si otros cricétidos habitantes de zonas endémicas o limítrofes a la misma y diferentes del principal reservorio C.musculus, son capaces de desarrollar infección persistente con VJ. Para ello se estudió la respuesta a la infección experimental con este virus en Akodon azarae, Akodon molinae, Akodon dolores y Calomys callidus.

3.2. Obtención de un antígeno inactivado de VJ con efecto protector.

-Determinar si era posible preservar la antigenicidad del virus luego de la inactivación con formaldehído.

-Determinar si los antígenos inactivados inducían protección en cobayos frente al desafío con una cepa patógena.

4. RESULTADOS DE LA INFECCION EXPERIMENTAL CON VIRUS JUNIN EN
AKODON AZARAE, A. DOLORES, A. MOLINAE Y CALOMYS CALLIDUS.

Dado que A. azarae, A. molinae, A. dolores y Calomys callidus poseen una distribución geográfica que se superpone y sobrepasa el área conocida como endémica de FHA, nos interesó conocer si estos roedores eran capaces de desarrollar infección persistente con VJ.

En este capítulo se describen los resultados obtenidos en la infección experimental con la cepa XJ-Clon 3 de VJ en ejemplares adultos y lactantes de estos cuatro cricétidos.

Se inocularon animales de las cuatro especies de 48-72 hs de vida con 10^3 DICT₅₀ de la cepa XJ-Clon 3 por vía ic ó in y adultos mayores de un mes con 10^4 DICT₅₀ por distintas vías de inoculación.

Como controles se utilizaron 4-8 roedores de la misma edad que se inocularon con cerebro de ratón normal.

En todos los casos se estableció:

- Morbimortalidad
- Virus en órganos en etapas agudas de la infección.
- Persistencia viral en los sobrevivientes.
- Respuesta inmune humoral.

4.1. Akodon azarae

4.1.1. Lactantes por vía intracerebral (Fig. 2)

En el 62% de los animales lactantes inoculados (28/45), se observaron signos de enfermedad entre los 7-25 días pi. Estos signos fueron: temblores, excitación, movimientos reptoides, pérdida del equilibrio, convulsiones y parálisis del tren posterior (Fig. 3). Cinco animales enfermos se sacrificaron para estudios virológicos e inmunohistoquímicos; el resto murió entre los 13 y 25 días pi (fecha promedio de muerte $\bar{X} \pm ES : 16,9 \pm 0,8$ días).

Quince ratones murieron sin presentar enfermedad, en la primera semana pi, probablemente por falta de cuidados maternos.

Los dos únicos animales sobrevivientes en los que no se habían observado signos de enfermedad, se sacrificaron a los 3 meses pi para determinar persistencia viral.

El porcentaje total de mortalidad observado en la infección de A. azarae lactante por vía ic fue del 95% (Fig. 2)

Tanto en animales que murieron espontáneamente como en aquellos que se sacrificaron enfermos se recuperó VJ de cerebro en altos títulos y se detectó antígeno viral en improntas y/o cortes de cerebro por IFI. Se detectaron Acs IF en cuatro sueros estudiados a partir de los 13 días pi (Tabla 2).

Debido a la alta mortalidad, sólo se estudió persistencia en

Figura N°2

INFECCION EXPERIMENTAL DE A. AZARAE LACTANTE CON XJ-CLON 3, VIA IC.

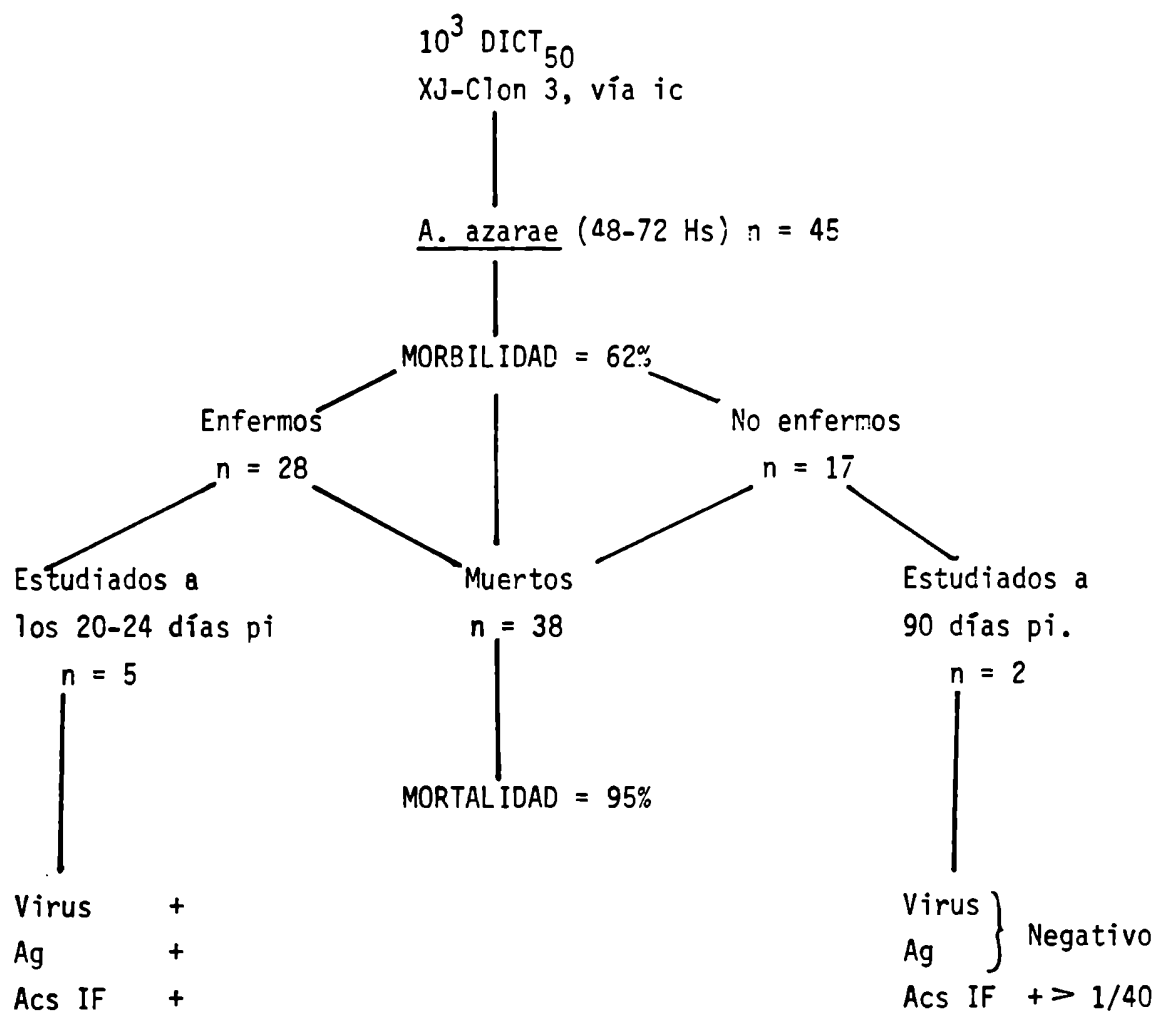


FIGURA 3

A. AZARAE LACTANTE INOCULADO CON XJ-CLON 3 VIA IC.

Se observa la postura característica correspondiente a "spin test" positivo.

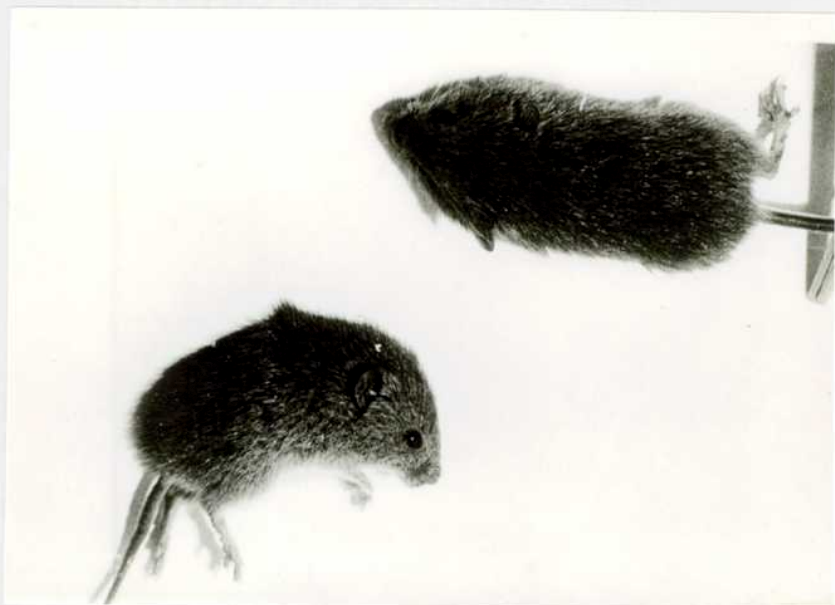


Tabla N°2

DETECCION DE VIRUS, ANTIGENO VIRAL Y ANTICUERPOS EN AKODGN AZARAE
LACTANTE INOCULADO CON XJ-CLON 3, VIA IC.

n	Morbi- lidad	Días pi	SNC		Ac IF
			Virus *	Antígeno **	
2	si	13	10^4	+++	1/2
5	si	20 - 24	$10^3 - 10^6$	+++	1/2
2	no	90	≤ 5	Neg	$> 1/40$
Controles 5	no	20 - 30	≤ 5	Neg	Neg

* : UFP/ml Neg ≤ 5 UFP/ml.

** : IFI en improntas y/o cortes de cerebro.

dos animales sacrificados a los 3 meses pi. En estos no se recuperó virus de sangre, cerebro o "pool" de bazo, hígado y riñón por plaqueo ni se pudo detectar antígeno viral en cortes de SNC. Los sueros de estos animales presentaron Acs IF en títulos $>1/40$.

4.1.2. Lactantes por vía mucosa.(Fig. 4)

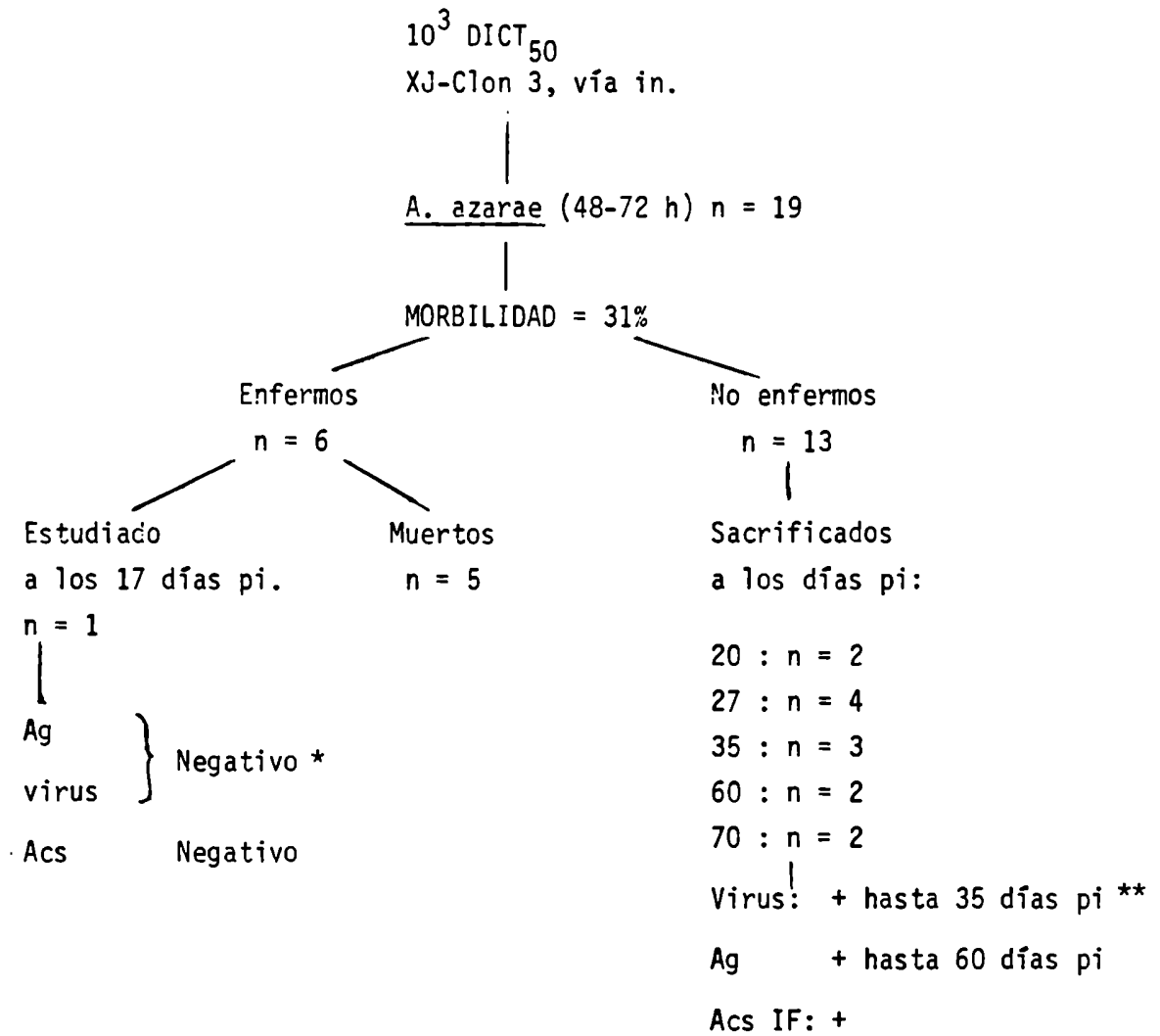
Dado que A. azarae resultó sensible a la infección por vía ic, nos interesó conocer si la infección por una vía natural como la in producía infección persistente.

Se inocularon 19 lactantes por vía in. En 6 crías de la misma camada se observaron signos leves de enfermedad entre los 17-20 días pi, tales como movimientos lentos y lateralización de la marcha. Cinco de estos animales murieron entre los 17-20 días pi y uno fue sacrificado a los 17 días. No se observó enfermedad en el resto de los ratones que fueron sacrificados a los 20, 27, 35, 60 y 70 días pi.

No se recuperó virus de cerebro de los animales sacrificados a los 17, 20 y 27 días pi por aislamiento en ratón lactante, ni se detectó infectividad en hisopados de fauces en 10 animales a los 15 días y en 5 a los 30 días pi, por el mismo método.

Sin embargo, cuando se utilizó el cocultivo, una técnica de aislamiento viral más sensible que la inoculación de ratón lac-

Figura N°4

INFECCION DE AKODON AZARAE LACTANTE CON XJ-CLON 3 VIA INTRANASAL.

* Aislamiento en ratón.

** Co-cultivo.

tante, fue posible rescatar virus de cerebro de los dos animales estudiados a los 27 y de los tres estudiados a los 35 días pi. (Tabla 3). Esto se confirmó al detectar antígenos de VJ por IFI en improntas de cerebro de ratones inoculados con sobrenadantes de los cocultivos.

Los cocultivos correspondientes a los animales sacrificados a los 60 y 70 días pi fueron negativos.

Además, se observó antígeno viral en improntas de cerebro de Akodon a los 20, 27, 35, 60 y 70 días pi, coincidiendo en algunos casos con el aislamiento viral por cocultivo. Asimismo, se detectaron Acs IF en suero a partir de los 20 días pi.

4.1.3. Animales adultos por distintas vías de inoculación.

Se inocularon 35 ejemplares adultos (2 meses de edad) por vía im e ip. (Tabla 4). Ninguno de estos animales presentó mortalidad. Tampoco se recuperó virus de fauces o sangre a los 10, 15 y 30 días. No se detectó infectividad en cerebro ni en "pool" de órganos (bazo, riñón, hígado y pulmón) a los 10, 15, 30 y 70 días pi y tampoco se observaron antígenos virales en las improntas de cerebro (30 y 70 días pi).

Se detectaron Acs IF en sueros (diluídos 1/5) en 2 de 9 anima-

Tabla N°3

DETECCION DE VIRUS, ANTIGENO VIRAL Y ANTICUERPOS EN AKODON AZARAE LACTANTE
INOCULADO CON XJ-CLON 3, VIA INTRANASAL.

Animales inoculados (n)	Morbi- lidad	Estudiado a dias pi.	SNC		Acs IF ^c
			Virus ^a	Antígeno ^b	
5	si	17-20 ^d	NR	NR	NR
1	si	17	Neg*	NR	Neg
2	no	20	Neg*	+(1/2)	+
2	no	27	Neg*	+(1/2)	+
2	no	27	Pos(2/2)**	Neg	+
3	no	35	Pos(3/3)**	+(2/2)	+
2	no	60	Neg(0/2)**	+(1/2)	+
2	no	70	Neg(0/2)**	+(1/2)	+
Controles n = 8	no	15-60	Neg	Neg	Neg

a: aislamiento viral por: * inoculación en ratón lactante: Neg $\leq 2.2 \log_{10} \text{DL}_{50}/\text{ml}$.

** cocultivo de células Vero.

b: IFI en improntas de cerebro. N°de animales positivos / N°estudiados.

c: Sueros diluidos 1/5.

d: Estos 5 Akodon murieron espontáneamente.

NR: No realizado.

les inoculados por vía in, 7 de 9 inoculados por vía im y 5 de 5 por vía ip.

En otro experimento se estudiaron un total de 10 hembras que estuvieron en contacto con crías infectadas por vía in ó ic. En ellas no se observó mortalidad y no se detectaron Acs IF en sus sueros a los 2 meses post-contacto.

Tabla N°4

INFECCION EXPERIMENTAL DE AKODON AZARAE ADULTO CON XJ-CLON 3.

Animales Inoculados	Vía	Morbimortalidad	Aislamiento Viral ^a	Anticuerpos IF ^b
15	in	No	Neg	2/9
15	im	No	Neg	7/9
5	ip	No	Neg	5/5

a: de cerebro, "pool" de bazo, hígado, riñón y pulmón y de sangre y/o fauces en cultivo de células Vero.

b: N°de sueros positivos / N°de sueros estudiados.

Neg: $\leq 1.2 \log_{10}$ DICT₅₀/ml para órganos.

4.1.4. Conclusiones

- a) Los animales lactantes inoculados por vía ic resultaron muy sensibles a la infección presentando una mortalidad del 95%, altos títulos de virus en cerebro en etapa aguda y en los dos únicos sobrevivientes no se detectó infección persistente.
- b) Los lactantes inoculados por vía mucosa presentaron baja mortalidad (28%), infectividad en cerebro detectable por co-cultivo hasta el mes pi, y fue posible detectar una infección prolongada ya que se observó antígeno viral en cerebro de dos animales sacrificados a los dos meses pi.
- c) Los adultos fueron poco sensibles ya que no se observó mortalidad, ni infectividad en órganos, sangre o fauces.
- d) No se observó transmisión horizontal de las crías inoculadas con VJ a las hembras en contacto con las mismas.

4.2. Akodon dolores

4.2.1. Lactantes por vía intracerebral.

En el 70% de los animales inoculados (26/37) se observaron signos de enfermedad entre los 7-35 días pi. Los signos observados fueron: pérdida de equilibrio, pelo erizado, temblores, convulsiones y parálisis del tren posterior. Quince de estos animales murieron, siendo el día promedio de muerte: 21, 5 ± 1.6 . Cinco animales murieron en fechas tempranas (10 días pi) sin enfermar, probablemente por falta de cuidados maternos. La mortalidad registrada fue del 64%.

Se sacrificaron seis animales enfermos para el estudio de la etapa aguda de la infección y 11 sobrevivientes a los 35 (n = 6), 70 (n = 4) y 90 (n = 1) días pi. (Tabla N°5).

Se aisló virus de cerebro en altos títulos (10^2 - 10^5 UFP/ml) de animales sacrificados entre los 17-24 días pi. Estos aislamientos coincidieron con la detección de antígeno viral en improntas y/o cortes de cerebro por IFI. No se rescató virus de sangre, cerebro ni "pool" de bazo, hígado y riñón de animales sobrevivientes sacrificados a los 35 días pi y 70 días pi (por inoculación en ratón lactante).

Se detectó antígeno viral en la impronta de un A. dolores estudiado a los 35 días pi, siendo negativas las improntas del

Tabla N°5

DETECCION DE VIRUS , ANTIGENO VIRAL Y ANTICUERPOS EN AKODON DOLORES LACTANTE
 INOCULADO CON XJ-CLON 3, VIA IC.

Animal (n)	Morbi- lidad	Estudiando a los (días pi)	SNC		Acs IF
			Virus ^a	Antígeno ^b	
1	si	17	10 ^{5*}	+++	> 1/4
5	si	20-24	10 ² -10 ^{5*}	+++	= 1/20
6	si (3/6)	35	Neg ^{**}	+ (1/6)	> 1/40
4	si (2/4)	70	Neg ^{**}	Neg	> 1/40
1	no	90	Neg ^{***}	Neg	> 1/40
Controles: n = 5	no	30-60	Neg	Neg	Neg

a: aislamiento viral en : * cultivo de tejidos (UFP/ml) Neg ≤ 5 UFP/ml

** ratón lactante Neg ≤ 2.2 log₁₀DL₅₀/ml

*** co-cultivo de cerebro

b: IFI en improntas y/o cortes de cerebro.

resto de los animales (Tabla N°5).

Se realizó cocultivo de cerebro de un animal sacrificado a los 90 días pi. No se aisló virus en ninguno de los 4 subcultivos realizados.

Se observó una rápida respuesta inmune humoral que permitió detectar Acs IF desde los 17 días pi, alcanzando títulos $> 1/40$ a los 35 días pi.

4.2.2. Adultos por distintas vías de inoculación.

Se inocularon 6 A. dolores mayores de dos meses de edad con 10^4 DICT₅₀, dos por vía ic y 4 por vía ip. No se observó morbimortalidad. Los animales fueron sacrificados a los 40 días pi.

No fue posible recuperar virus de cerebro ni órganos por inoculación en ratón lactante. Se detectaron Acs IF en los dos animales inoculados por vía ic y en dos de los cuatro inoculados por vía ip.

Las hembras en contacto con las crías infectadas, no presentaron morbimortalidad así como tampoco Acs IF en sus sueros.

4.2.3. Conclusiones

- a) A. dolores lactante es sensible a la infección con la cepa XJ-Clon 3 por vía ic, presentando un 64% de mortalidad y altos títulos virales en cerebro en la etapa aguda de la infección.
- b) En los lactantes sobrevivientes a la infección no se detectó infección persistente.
- c) Los adultos son poco sensibles a la cepa XJ-Clon 3.
- d) No se observó transmisión horizontal de las crías inoculadas a las hembras en contacto con las mismas.

4.3. Akodon molinae.

4.3.1. Lactante por vía intracerebral (Figura N° 5)

Doce de los 20 A. molinae inoculados presentaron signos de enfermedad entre los 6-34 días pi; estos consistieron en incoordinación de la marcha, convulsiones y parálisis del tren posterior. Siete de estos animales murieron entre los 10-34 días pi y los cinco restantes fueron sacrificados en distintas fechas y sólo uno de ellos fue sacrificado enfermo (Fig. N° 5).

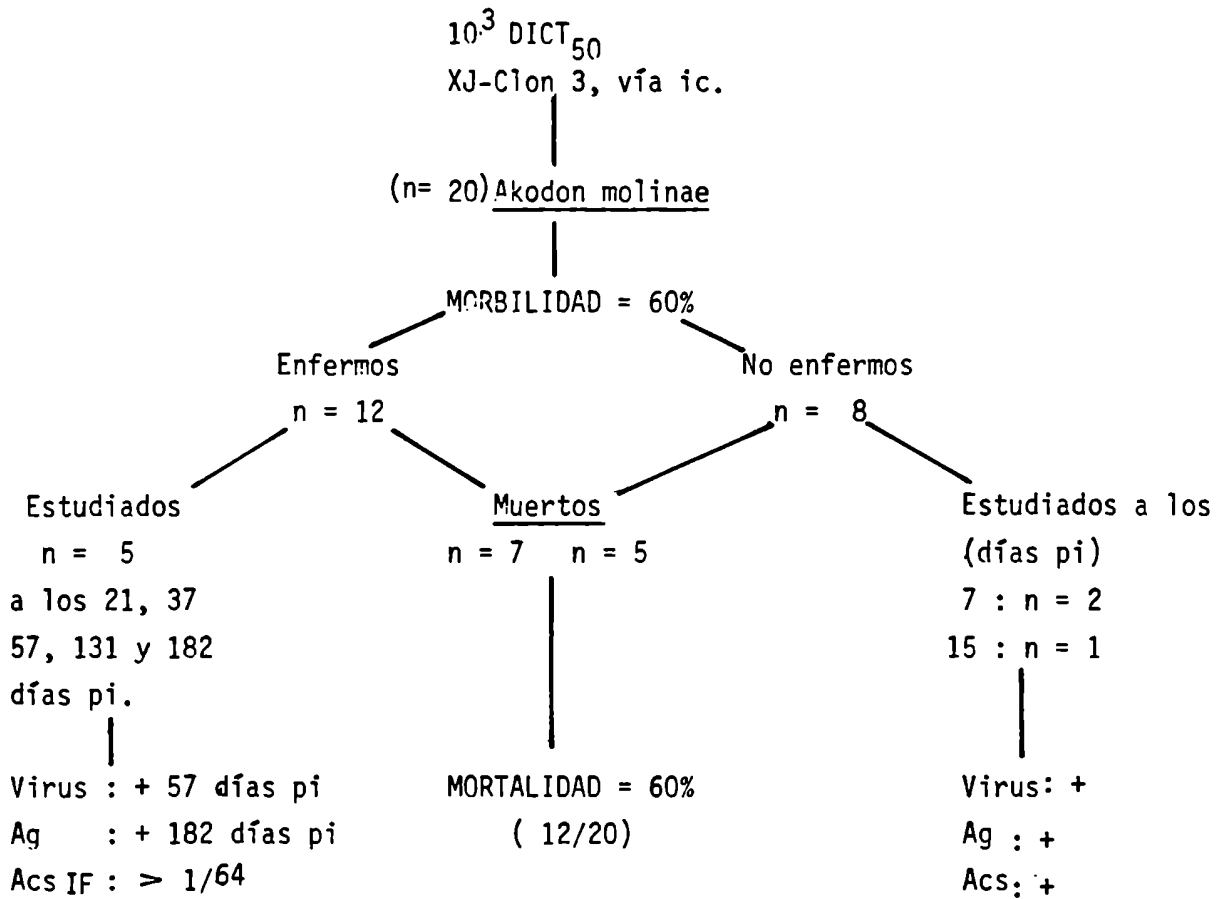
En la primer semana pi cinco roedores murieron sin presentar enfermedad. Dado que se detectó virus en cerebro a los siete días pi, no puede descartarse que estas muertes tempranas se deban a la infección viral.

Si se considera la muerte de los animales con y sin signos de enfermedad la mortalidad total fue del 60%.

Se aisló virus de cerebro a los 7, 15, 21, 37 y 57 días pi, con títulos de 4.5, 5.2, 4.5, 4 y 3.3 \log_{10} DL₅₀/g respectivamente. No se detectó infectividad a los 131 y 182 días pi por inoculación de ratón lactante. Los aislamientos de bazo e hígado fueron negativos y en sangre se detectó virus a los 7 y 15 días pi, en bajo título. Cabe señalar que se aisló virus de cerebro tanto de 1 animal enfermo (21 días pi) como de aquellos que se encontraban aparentemente sanos en el momento del sacri-

Figura N°5

INFECCION EXPERIMENTAL DE A. MOLINAE LACTANTE CON XJ-CLON 3, VIA IC.



ficio (Tabla N°6).

Se detectó antígeno viral en cortes por criostato de cerebro desde los 7 días pi hasta los 182 días, cuando se dió por finalizado el estudio.

A los 7 días pi la inmunofluorescencia se observó en forma focal. La cantidad y extensión de los focos positivos fue en aumento a lo largo del tiempo, alcanzando el máximo entre los 15 y 57 días pi para luego disminuir a los 131 y 182 días pi (Fig. N°6).

El antígeno se observó en forma de gránulos finos en el citoplasma de neuronas corticales e hipocampo así como también en células de epéndimo, plexos coroideos y meninge parietal. Los animales controles fueron negativos.

A partir de los 21 días pi, en las mismas células que presentaban antígeno viral se observaron depósitos de Ig cuando se utilizó la técnica de IF indirecta con fluoresceína para detectar Ag y la directa con rodamina para los depósitos de Ig. La intensidad de los inmunocomplejos fue en aumento para llegar a un máximo a los 131 y 182 días pi coincidiendo con la disminución de antígeno viral y con la no detección de virus infeccioso en cerebro.

Los animales sacrificados en estas dos últimas fechas no presentaban signos de enfermedad a pesar de la masiva presen-

Tabla N°6

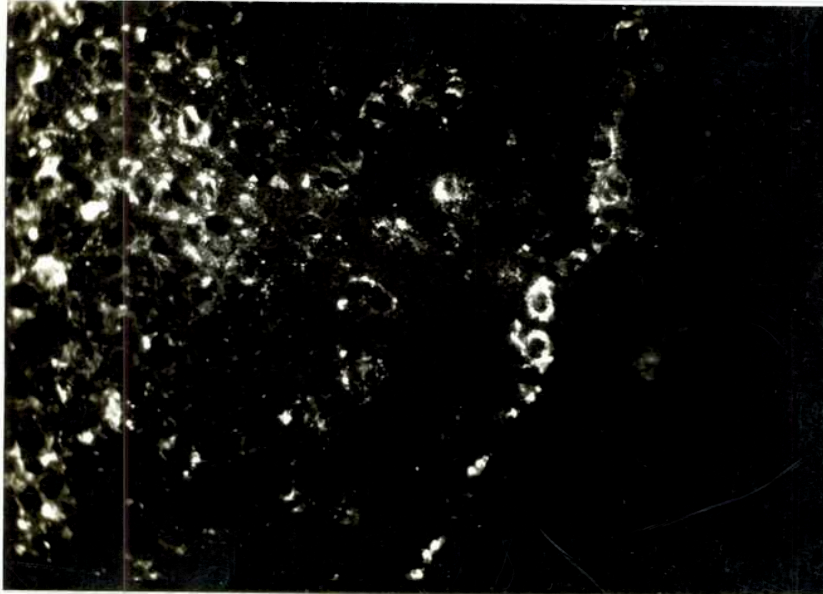
ESTUDIO VIROLOGICO, INMUNOHISTOQUIMICO Y RESPUESTA INMUNE EN AKODON MOLINAE
LACTANTE INOCULADO CON XJ-CLON 3, VIA IC.

Sacrificio (días pi)	Signos neurológicos a la 2ª semana		Virus en ^a cerebro sangre (log ₁₀ ^{DL} ₅₀ /ml)		Estudio IF en SNC ^b		Acs
	Sacrif.				Ag	Ig	IF
7(n=2)	no	no	4.5	2.4	+	Neg	Neg
15	no	no	5.2	2.4	+++	Neg	1/2
21	si	si	4.5	NR	++++	+/-	1/64
37	si	no	4.0	Neg ^a	++++	+	NR
57	si	no	3.3	Neg	+++	+++	>1/64
131	si	no	Neg	Neg	++	++++	>1/64
182	si	no	Neg	NR	+	++++	>1/64
Controles							
7-57 (n=5)	no	no	Neg	Neg	Neg	Neg	Neg

a: Neg \leq 2.2 log₁₀^{DL}₅₀/ml (titulado en ratón lactante); b: la cantidad de Ag ó de depósitos de Ig, se evaluó con la siguiente escala: -: sin Ag; +/- pocas células con Ag (1%); ++: 1-10%; +++: 10-25%; ++++: \geq 25%; NR: No realizado.

FIGURA 6

CORTE DE CEREBRO DE A. MOLINAE LACTANTE INOCULADO CON XJ-CLON 3 VIA IC.



Se observá Ag viral en neuronas a los 37 días pi.

cia de inmunocomplejos a nivel SNC.

Se detectaron Acs IF a partir de los 15 días pi, obteniéndose títulos $> 1/64$ a los 21 días pi.

4.3.2. Adultos por distintas vías de inoculación.

Se inocularon 15 animales, 5 por vía im, 5 por vía in y 5 por vía ip, los animales no presentaron signos de enfermedad ni mortalidad y no se detectó virus en sangre ni en fauces así como tampoco en órganos (bazo, hígado, cerebro, riñón) a los 10, 15, 30 y 70 días pi. No se observó Ag en las improntas de cerebro a los 30 y 70 días pi.

Sólo se detectaron Ac IF en los animales inoculados por vía ip. En los restantes animales no se detectó respuesta inmune humoral.

4.3.3. Conclusiones

1) Akodon molinae lactante.

- a- Es sensible a la infección experimental con la cepa XJ-Clon 3 por vía ic presentando una mortalidad del 60%.
- b- Los animales desarrollan una infección persistente ya que es posible rescatar virus de SNC hasta los dos meses pi y detectar antígeno hasta por lo menos los seis meses.
- c- Coincidentemente con el desarrollo de la respuesta inmune humoral se observan masivos depósitos de Ig en neuronas con Ag viral sin que estos inmunocomplejos provoquen signos clínicos de enfermedad neurológica.

2) A. molinae adulto es poco sensible a la infección experimental con la cepa XJ-Clon 3.

4.4. Calomys callicus (Figura N°7)

4.4.1. Lactantes y adultos por vía intracerebral (Tabla N°7)

Lactantes:

Se detectó un 35% de morbilidad (10/28) a partir de los 11-14 días pi. Los signos observados fueron ataxia, oclusión ocular y lateralización de la marcha. Si bien no se registraron los pesos corporales, los animales infectados presentaron menor tamaño corporal comparado con los animales no infectados.

Los animales enfermos no se recuperaron, ya que murieron o fueron sacrificados con los signos mencionados a los 2 meses pi.

Se registró una mortalidad del 17% entre los 11-21 días pi. Por problemas técnicos, no pudo realizarse el aislamiento del virus en la etapa aguda. En períodos tardíos (2 meses pi) solamente pudo intentarse el aislamiento en cultivo de tejidos (procedimiento menos sensible que plaqueo o inoculación a ratón lactante) recuperándose VJ de cerebro de sólo 1 de 9 animales.

Se detectaron Acs Neu en "pool" de sueros, con índices de neutralización > 2 .

Adultos:

La mitad de los animales inoculados (7/14) presentaron signos

FIGURA 7

CALOMYS CALLIDUS ADULTO.



CALOMYS CALLIDUS CRIAS



Tabla N°7

INFECCION EXPERIMENTAL DE C.CALLIDUS CON XJ-CLON 3 POR VIA IC.

Animales (n)	Morbilidad		Mortalidad	Aislamiento viral en cerebro ^a		Acs ^c
	%	días	días	Etapa aguda	2 meses	
Lactantes 28	35	(11-60)	17 (11-21)	NR	+ (1/9) ^b	+
Adultos 14	50	(12-55)	50 (14-55)	+(3/3)	Neg	+

a: aislamiento en cultivo de tejidos. Neg $\leq 1,2 \log_{10} \text{DICT}_{50}/\text{ml}$

b: N°de positivos/N°de animales estudiados

c: Acs Neu a los 2 meses pi.

+: Indice de neutralización > 2 .

de enfermedad semejantes a los observados en los lactantes: oclusión ocular y lateralización de la marcha a partir de la segunda semana pi.

Tres animales fueron sacrificados enfermos entre los 13 y 17 días pi y cuatro murieron entre los 14-55 días pi. Se aisló virus de fauces de dos animales y de cerebro de los tres animales sacrificados en la etapa aguda de la infección. Los siete sobrevivientes fueron sacrificados a los dos meses pi, no recuperándose virus en cerebro ni en sangre por inoculación en cultivo de tejidos. Se detectaron Acs Neu en "pool" de sueros con índices de neutralización entre 2 y 4.

4.4.2. Lactantes y adultos por vía mucosa.

Lactantes: (Fig. N°8)

Se inocularon 26 C. callidus lactantes de los cuales, 20 presentaron signos de enfermedad a partir de la segunda semana pi. Estos consistieron en ataxia, oclusión total o parcial de los ojos (Fig. N° 9) y lateralización de la marcha (Fig. N°10). Se registró un retraso en el crecimiento que se evidenció por un menor peso corporal comparado con la media de peso normal, esta diferencia resultó significativa a los 20 días pi (Fig. N°11). Los ocho animales que sobrevivieron recuperaron su peso hasta llegar a valores normales a los 2 meses cuando fueron sacrificados (Fig. N°12).

Figura N°8

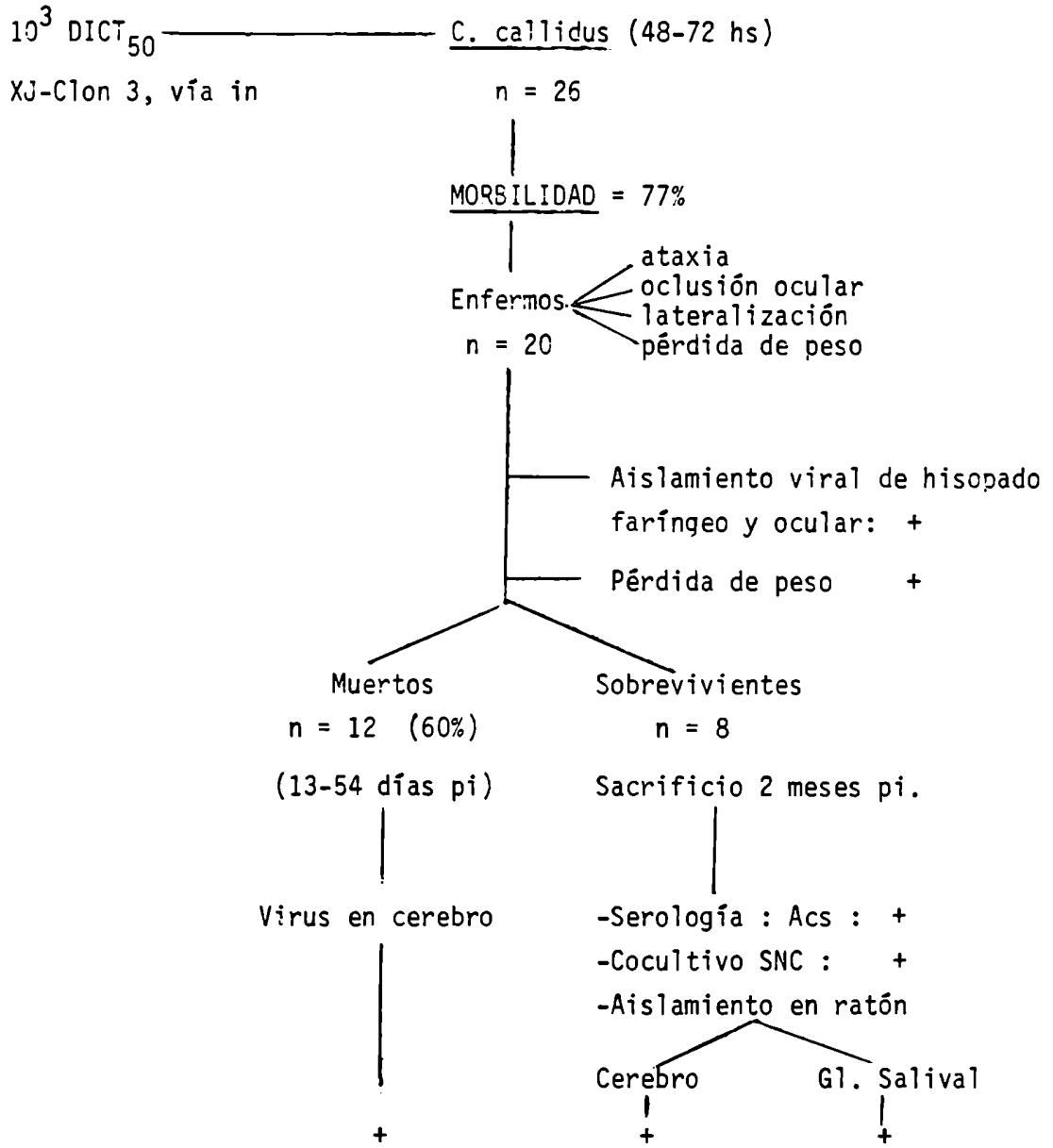
INFECCION EXPERIMENTAL DE CALOMYS CALLIDUS LACTANTE POR VIA IN.

FIGURA 9

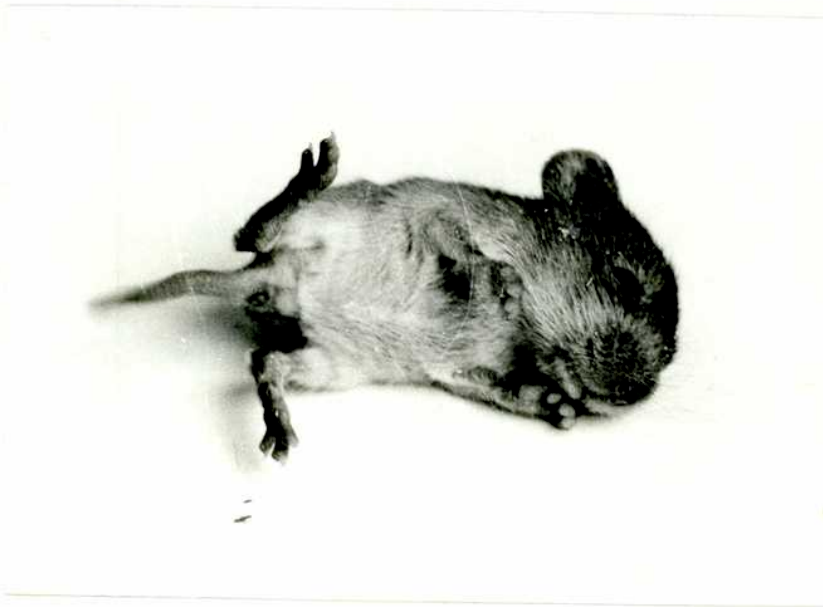
CALOMYS CALLIDUS LACTANTE INOCULADO CON XJ-CLON 3 VIA MUCOSA A LOS 21 DIAS pi.



Se observa oclusión de ambos ojos.

FIGURA 10

CALOMYS CALLIDUS LACTANTE INOCULADO CON XJ-CLON 3 VIA MUCOSA A LOS 21 DIAS pi.



Se observa lateralización de la marcha.

FIGURA 11

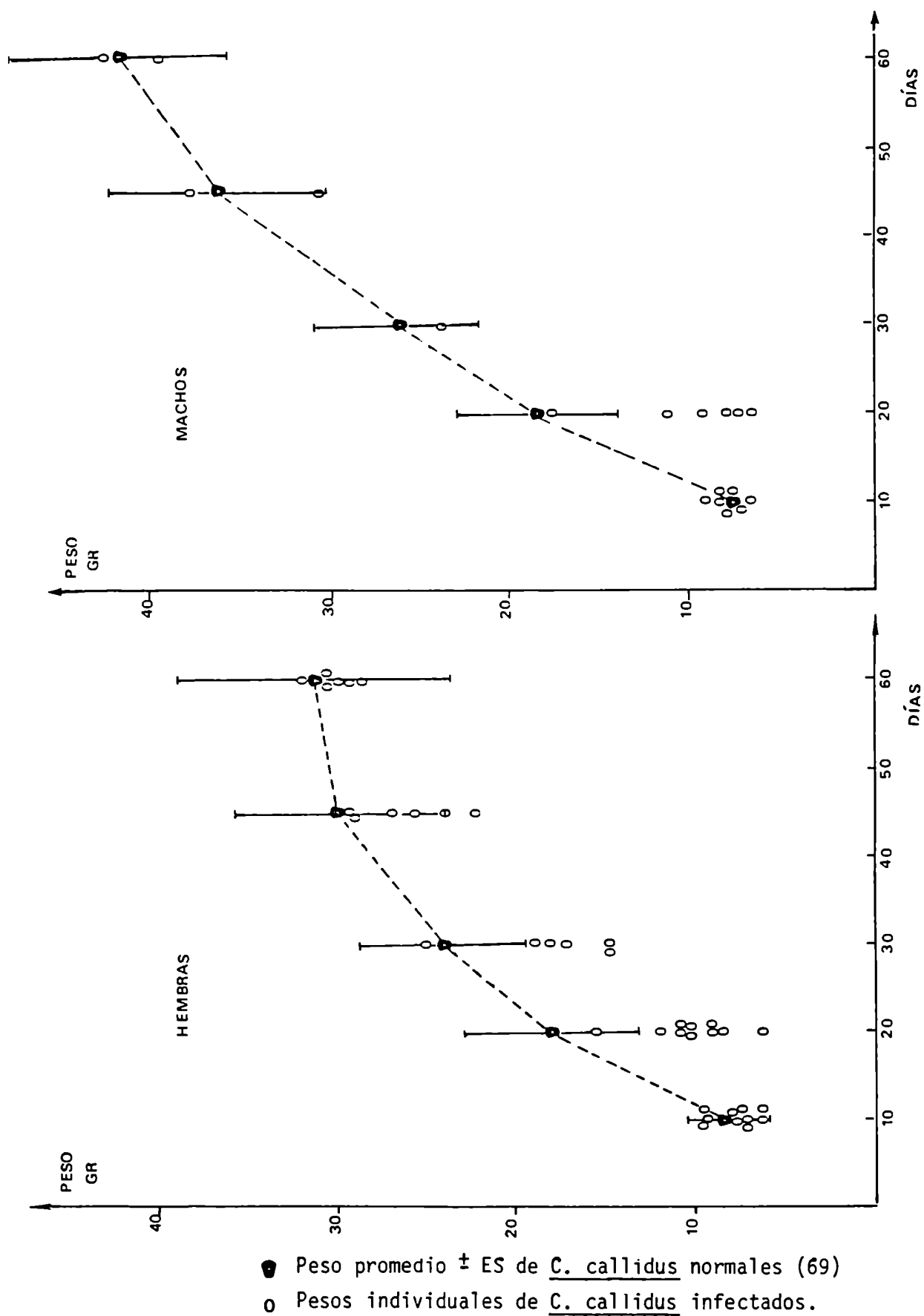
CALOMYS CALLIDUS LACTANTE INOCULADO CON XJ-CLON 3 VIA MUCOSA A LOS 21 DIAS pi.



Se observa un animal infectado con menor peso corporal y un control sin infectar de la misma edad.

Figura N°12

CURVAS DE PESO DE CALOMYS CALLIDUS LACTANTE INOCULADO POR VIA IN



En la primer semana pi, 6 animales murieron sin presentar cuadro clínico probablemente por falta de cuidados maternos. Doce de los 20 animales enfermos (60%) murieron, siendo la fecha promedio de muerte 22.5 ± 11.4 ($\bar{X} \pm ES$). La mortalidad total fue del 69%.

Se aisló virus de hisopado faríngeo a los 10, 20, 30 y 45 días pi, disminuyendo el porcentaje de aislamiento positivos con el tiempo. Asimismo, fue posible recuperar virus de hisopado ocular de 2 de 3 animales que presentaban oclusión ocular y en 4 de 5 roedores se detectó virus en cerebro entre los 15-20 días pi. (Tabla N°8).

Los 8 sobrevivientes fueron sacrificados a los dos meses pi sin signos de enfermedad (Tabla N° 9). Los seis cocultivos de cerebro realizados resultaron positivos. Asimismo, se detectó virus en 5 de 7 cerebros y en 5 de 7 glándulas salivales por aislamiento directo en ratón lactante.

Se detectó antígeno viral en cuatro improntas de cerebro por IF indirecta (Tabla N°9).

El virus aislado de cerebro tanto en la etapa aguda como a los dos meses pi, se comprobó que era VJ por neutralización con un suero anti-VJ de rata en cultivo de tejidos.

Se detectaron Acs IF y/o neutralizantes en todos los sueros estudiados.

Tabla N°8

AISLAMIENTO VIRAL DE CALOMYS CALLIDUS LACTANTE INOCULADO CON XJ-CLON 3
 VIA IN

Días pi	Aislamiento viral de ^a		
	Hisopado		Cerebro
	Fauces	Ocular	
10	8/10 ^b	NR	2/2
20	9/11	2/3	2/3
30-45	3/9	NR	NR
60	0/3	NR	7/8 ^c

a : En ratón lactante

b : N° positivos / N° de animales estudiados

c : Se realizó por inoculación en ratón lactante y/o cocultivo.

En la Tabla N° 9 se detallan los resultados obtenidos.

TABLA N° 9

PERSISTENCIA DEL VIRUS JUNIN EN CALOMYS CALLIDUS LACTANTE INOCULADO POR VIA IN,
A LOS DOS MESES PI.

Animal N°	Cocultivo de cerebro	Aislamiento viral ^a		Ag en Cerebro (IF)	Acs
		Cerebro (log ₁₀ DL ₅₀ /ml)	Gl. salival		
1	+	2.7	2.7	+	1/20 ^b
2	+	2.7	≤ 2.2	NR	NR
3	+	NR	2.7	+	> 1/80 ^b
4	NR	2.3	≤ 2.2	+	NR
5	+	Neg	NR	NR	> 1/80 ^b
6	NR	Neg	2.3	+	> 1/5 ^c
7	+	3.5	2.3	+	> 1/5 ^c
8	+	2.7	2.3	NR	> 1/5 ^c
Controles (n=2)	Neg	≤ 2.2	≤ 2.2	Neg	Neg

a : En ratón lactante Neg ≤ 2.2 log₁₀DL₅₀/ml.

b : Acs Neu

c : Acs IF.

Adultos

Dos de los siete animales inoculados presentaron oclusión ocular y lateralización de la marcha a los 18 días pi y fueron sacrificados a los 20 y 22 días pi. Se aisló virus de fauces de uno de los animales y de cerebro de ambos por inoculación de ratón lactante. En los animales que no enfermaron no se detectó virus en fauces a los 15 y 30 días pi.

De los 5 sobrevivientes, se aisló virus en 1 de 3 cocultivos de cerebro realizados (Tabla N°10).

Se detectaron Acs Neu, en "pool" de sueros con un índice de Neu > 3.

4.4.3. Estudio de la transmisión horizontal: Transmisión del virus de crías infectadas a sus madres. (Tabla N°11).

Se estudiaron 4 hembras que estuvieron en contacto con las crías infectadas con XJ-Clon 3, 3 de ellas con crías inoculadas por vía in y una con crías inoculadas por vía ic.

Una hembra (en contacto con crías inoculadas por vía in) presentó oclusión ocular a los 2 meses y lateralización de la marcha a los 7 meses pi. Otra hembra (en contacto con crías inoculadas por vía ic) presentó lateralización cuando fue sacrificada a los dos meses pi. (Fig. 13 y Fig. 14).

De ambas fue posible rescatar virus de cerebro por inoculación

Tabla N°10

INFECCION EXPERIMENTAL DE CALOMYS CALLIDUS ADULTO POR VIA INTRANASAL

Animal (n)	Morbilidad	Sacrificados (dias pi)	Virus en		Acs ^a IF
			Cerebro	Fauces	
2	si	19-22	+ 2/2 ^b	+ 1/2 ^b	NR
5	no	60	- 0/2 ^b + 1/3 ^c	- 0/5 ^b	5/5

a : N°de positivos / N° animales estudiados. Sueros diluidos 1/5.

b : Aislamiento en ratón lactante. Neg $\leq 2.2 \log_{10} \text{DL}_{50}/\text{ml}$.

c : Aislamiento por cocultivo.

FIGURA 13

CALOMYS CALLIDUS HEMBRA INFECTADA CON XJ-CLON 3 POR CONTACTO CON SUS CRIAS.



A los 2 meses post-contacto. Se observa oclusión ocular.

FIGURA N°14

CALOMYS CALLIDUS HEMBRA INFECTADA CON XJ-CLON 3 POR CONTACTO CON SUS CRIAS.



A los 7 meses post-contacto. Se observa lateralización de la marcha.

en ratón lactante, y en una de ellas se detectó antígeno viral por IF en impronta de cerebro.

En las hembras restantes no se observaron signos de enfermedad y los aislamientos virales de cerebro resultaron negativos.

Las 4 hembras desarrollaron respuesta inmune humoral medida por Acs IF, lo que demuestra que en todas existió transmisión del virus a partir de las crías infectadas.

Tabla N°11

TRANSMISION HORIZONTAL DE CRIAS INFECTADAS CON XJ-CLON 3 A SUS MADRES.

♀ N°	Morbilidad	Sacrificio (meses pi)	Cerebro		Acs IF ^b
			Virus ^a (log ₁₀ DL ₅₀ /ml)	Antígeno Viral	
1	si	7	> 2.7	+	+
2	no	7	≤ 2.2	Neg	+
3	no	7	≤ 2.2	Neg	+
4	si	2	> 2.7	NR	+

♀ N° 1, 2 y 3 en contacto con crías inoculadas con XJ-Clon 3 vía in.

♀ N° 4 en contacto con crías inoculadas con XJ-Clon 3 vía ic.

a : aislamiento en ratón lactante. Neg ≤ 2.2 log₁₀DL₅₀/ml.

b : Acs IF en sueros diluidos 1/5

4.4.4. Conclusiones

- 1) Calomys callidus tanto lactante como adulto, es sensible a la infección con VJ (XJ-Clon 3) por vía intracerebral aunque la vía mucosa resultó más exitosa.
- 2) Es posible rescatar virus de cerebro en la etapa aguda de la infección.
- 3) Existe eliminación viral por fauces en adultos en la etapa aguda y en lactantes hasta los 45 días pi.
- 4) Tanto los lactantes como adultos sobrevivientes son capaces de establecer una infección prolongada con VJ hasta los 2 meses pi.
- 5) Es posible la transmisión horizontal del virus.
- 6) Por lo tanto, C. callidus podría, teóricamente, insertarse en la cadena natural de transmisión de VJ. Esto señala la necesidad de realizar estudios a campo para determinar si existe infección natural con VJ en este cricétido.

4.5. Conclusiones Generales del Capítulo 4.

- 1) A. azarae, A. dolores, A. molinae y C. callidus son sensibles a la infección con virus Junín, siendo los lactantes los más susceptibles ya que las cuatro especies presentaron mortalidad, infectividad en cerebro y respuesta inmune humoral. Los adultos desarrollaron una infección asintomática evidenciada sólo por la presencia de Acs, con excepción de C. callidus que desarrolló infección persistente.
- 2) A. molinae lactante inoculado por vía ic fue capaz de desarrollar una infección persistente evidenciada por la presencia de virus infeccioso en cerebro hasta los 2 meses pi y de antígeno viral hasta los 6 meses pi.
- 3) A. dolores lactante desarrolló solamente una infección aguda y no pudo detectarse persistencia viral por métodos convencionales de aislamiento, aunque esta no puede descartarse dado que no se realizaron cocultivos.
- 4) A. azarae lactante inoculado por vía in, presentó virus en el SNC hasta los dos meses pi, en baja concentración ya que sólo pudo ser detectado por una técnica muy sensible como el cocultivo.

- 5) C. callidus lactante y adulto inoculado por vía intranasal fue capaz de desarrollar una infección persistente evidenciada por la detección de virus en cerebro y glándula salival hasta los 2 meses pi. Se determinó la eliminación de virus por saliva hasta los 45 días pi. Asimismo, se determinó transmisión horizontal entre crías infectadas y sus madres.

5. RESULTADOS DEL DESARROLLO DE UN ANTIGENO INACTIVADO DE VIRUS JUNIN.

5.1. Efecto de la temperatura sobre la infectividad viral de la cepa XJ-Clon 3.

Se estudió el efecto de la exposición a 0°C y 37°C sobre la infectividad del VJ crecido en células Vero.

Se utilizó un lote de XJ-Clon 3 (título inicial de $10^{7,35}$ UFP/ml) para el estudio a 37°C y otro lote, con idéntico número de pasajes, (título de $10^{6,81}$ UFP/ml) para el estudio a 0°C. Se colocaron 7 ml de la suspensión viral a 0°C (baño de hielo a 4°C) ó a 37°C (baño de agua) durante 48 hs. Se obtuvieron alícuotas (1 ml) a las 1, 3, 6, 9, 12, 24 y 48 hs que se conservaron a -70°C hasta su titulación por plaqueo en células Vero bajo agarosa.

A 0°C, el título se mantuvo invariable durante 9 hs, mientras que a las 24 hs disminuyó 1 log y solamente 0.20 logs más a las 48 hs.

Por el contrario, a 37°C se observó un descenso de 3 logs a las 24 hs con respecto al título inicial (Tabla 12 y Figura 14).

La posterior inactivación de XJ-Clon 3 con FA se realizó a 0°C dado que a esta temperatura se observó una menor inactivación térmica. Para evitar inactivación viral por efecto del pH, éste

Tabla N°12

EFFECTO DE LA TEMPERATURA SOBRE LA INFECTIVIDAD DE VIRUS JUNIN XJ-CLON 3
A pH: 7.2

Tiempo (horas)	Temperatura	
	0°	37°C
	(log ₁₀ UFP/ml)*	
0	6.81	7.35
1	NR	7.40
3	6.82	6.22
6	NR	5.78
9	6.88	5.62
12	NR	5.50
24	5.83	4.40
48	5.62	NR

* Cada muestra fue titulada por duplicado
NR: no realizado.

se mantuvo en el rango de 7.0 - 7.2, ya que es el pH del sustrato (Vero) donde replicó el virus y porque en este rango se mantiene por más tiempo la infectividad (102).

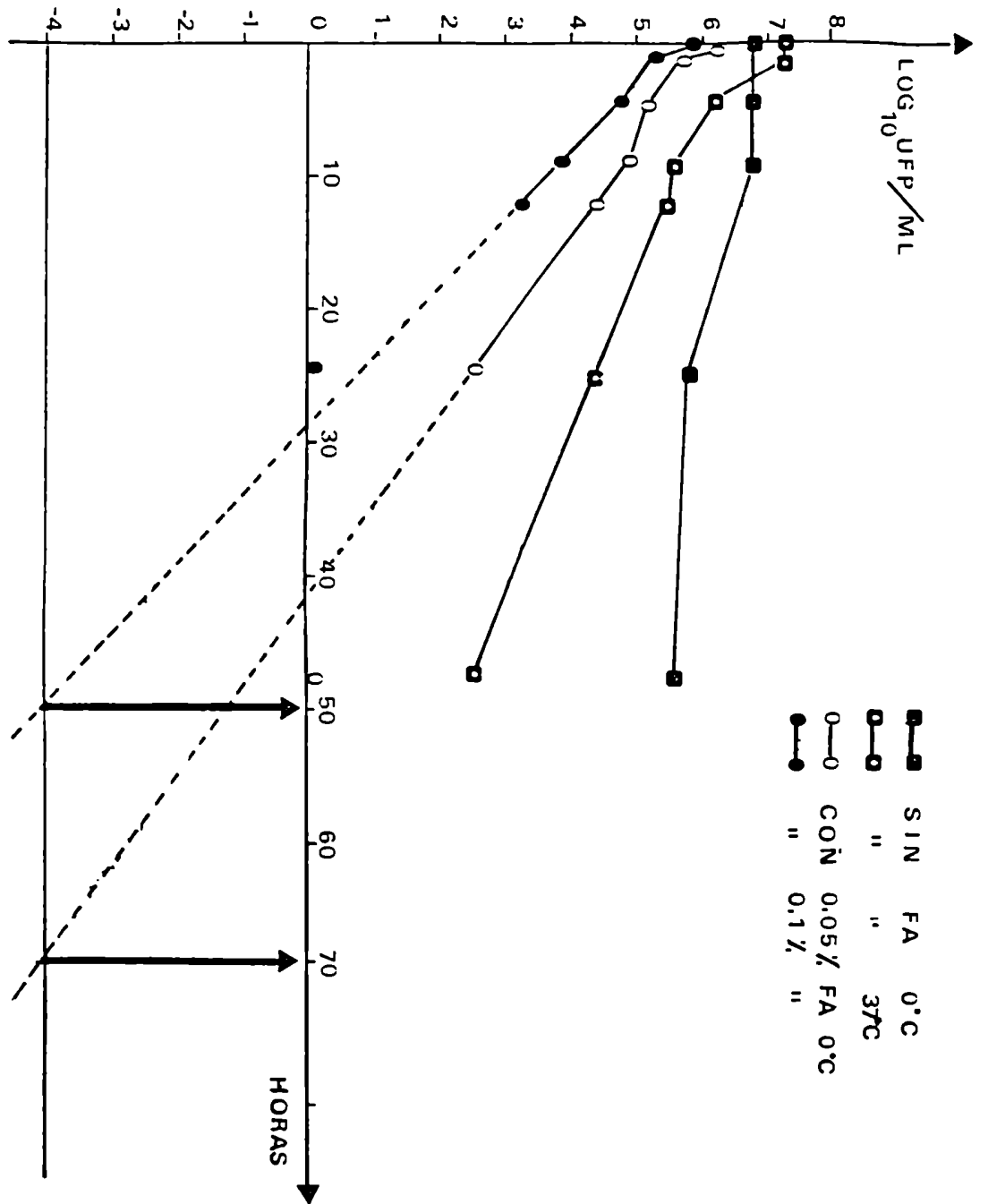
5.2. Inactivación de XJ-Clon 3 con formaldehído al 0.1 y 0.05% a 0°C.

Un lote de XJ-Clon 3 - Vero (título inicial: $10^{6,34}$ UFP/ml) se fraccionó en 2 alícuotas (7 ml) y se inactivó con FA en concentraciones finales de 0.05 ó de 0.1%, respectivamente, incubándose a 0°C con agitación constante durante 48 hs a pH:7 - 7.2.

Se obtuvieron alícuotas a las 0, 1, 4, 9, 12, 24 y 48 hs, a las que previa neutralización del FA con bisulfito de sodio al 35%, se conservaron a -70°C hasta su titulación.

Para ambas concentraciones se observó al tiempo 0 un pequeño descenso del título por el agregado del FA. A las 4 hs de tratamiento se detectó un descenso de 1 log y luego la inactivación se hizo más lenta, no detectándose infectividad a las 24 hs para 0.1% y a las 48 hs para 0.05% de FA. A partir de las 4 hs de tratamiento, la inactivación fue lineal para ambas concentraciones de FA (Figura 15).

Figura N°15



Inactivación de la cepa XJ-Clon 3 con formaldehído a 0°C.

5.3. Obtención de antígenos inactivados de VJ con dos dosis de formaldehído, y concentrados por precipitación con PEG o ultracentrifugación.

Con el objeto de lograr una inactivación segura, para la posterior obtención de Ags inactivados se utilizaron tiempos de tratamiento mayores a los requeridos para la no detección de infectividad por métodos standard de aislamiento (un plus de alrededor de 24 hs).

Para ello, se utilizaron 70 hs de tratamiento para la concentración de 0.05% y 50 hs para 0.1%. De acuerdo a las curvas de inactivación obtenidas, con estos tiempos de tratamiento se obtendrían 10^{-4} UFP/ml o sea una partícula infectiva cada 10 l de suspensión.

Para la obtención de los Ags inactivados se utilizaron lotes de XJ-Clon 3 crecidos en células Vero, con títulos de $10^{6,5}$ UFP/ml.

En la figura 16 y la Tabla 13 se presenta los Ag obtenidos: Ag A inactivado con 0.1% de FA 50 hs; Ag B: inactivado con 0.1% 50 hs y concentrado 10 x precipitación con PEG; Ag C: tratado con FA al 0.1% 50 hs y concentrado por ultracentrifugación y posterior purificación en gradiente de sacarosa; Ag D: inactivado con 0.05% 70 hs y Ag E: igual que el anterior y concentrado por precipitación con PEG.

Para determinar la eficacia de la precipitación con PEG, un lote de XJ-Clon 3 se concentró 30 x con PEG y posteriormente se inactivó con FA al 0.1% 50 hs (Ag F). Se recuperó un 17.5% de la infectivi-

Figura N° 16: ANTIGENOS INACTIVADOS CON FA.

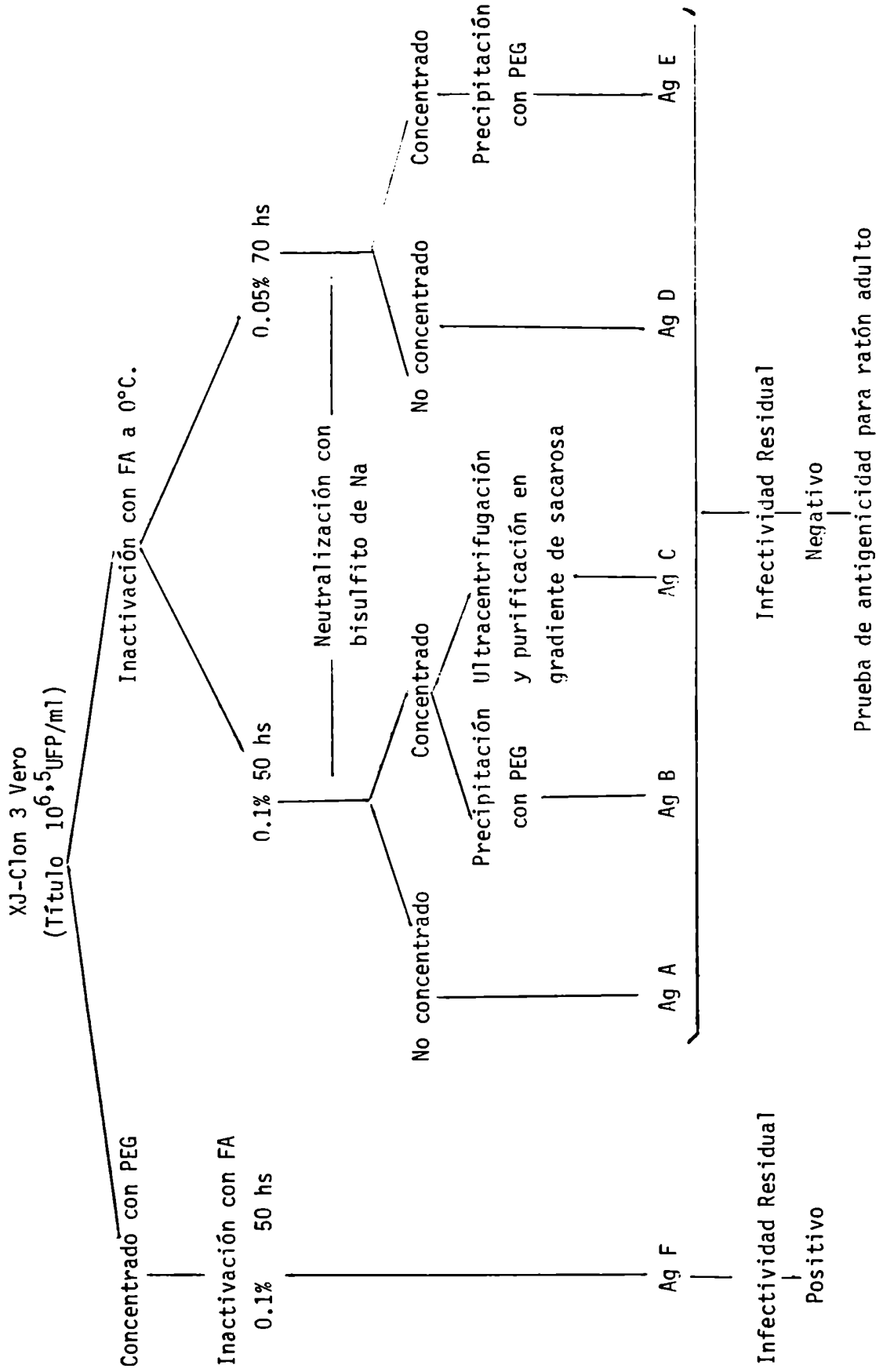


Tabla N°13

INACTIVACION DE VIRUS JUNIN (XJ-CLON 3) CON DOS DOSIS DE FORMALDEHIDO Y
CONCENTRACION POR PRECIPITACION CON PEG O ULTRACENTRIFUGACION

Antígeno	Título Inicial (log ₁₀ UFP /ml)	Formaldehído % hs	Concentración	Concentración Final de Proteínas (mg/ml)
A	6.7	0.1 50	NO	5.6
B			PEG (10x)	NR
C	6.5		Ultracentrifugación y purificación en gra- diente de sacarosa(100x)	1.6
D	6.7	0.05 70	NO	6.0
E			PEG (10x)	NR
F	6.0	0.1 50	Concentración con PEG previa a la inactiva- ción (30 x)	5.4
Control*				3.2

* Sobrenadante de células Vero sin infectar.

NR : no realizado.

dad inicial luego de la precipitación con PEG (Tabla 14).

Las técnicas de concentración con PEG y ultracentrifugación y purificación en gradiente de sacarosa se encuentran detalladas en el apéndice técnico.

Para cada antígeno, se determinó infectividad residual e inmunogenicidad para ratón adulto y cobayo. En este último, se realizaron estudios de protección contra el desafío con la cepa patógena XJ.

5.3.1. Determinación de infectividad residual.

La presencia de virus infectivo en cada uno de los Ags se determinó por:

- a) Inoculación directa: en ratón lactante por vía ic. Se utilizaron dos camadas de diez ratones cada una. Se consideró negativo cuando no se observaron signos neurológicos y/o muerte durante los 21 días de observación.
- b) Pasaje ciego: A los 7 días pi se realizó un pasaje ciego a partir de los ratones inoculados con el Ag inactivado.
- c) Cocultivo de cerebro: a partir de cerebro de 2 ratones inoculados con el pasaje ciego se realizó cocultivo a los 7 días pi.

No se detectó infectividad residual luego de la inactivación con FA al 0.1% 50 hs o al 0.05% 70 hs (Ag A y D) así como tampoco

Tabla N°14

RECUPERACION DE XJ-CLON 3 LUEGO DE LA PRECIPITACION CON PEG.

Fracción	Vol. (ml)	UFP/ml (x 10 ⁵)	UFP Totales	% Recuperación
Virus clarificado	200	5.5	1100	100
Sobrenadante	200	0*	0	0
Precipitado resuspendido	7	27.5	192.5	17.5

* Ausencia de infectividad tanto por inoculación en ratón lactante como por plaqueo bajo agarosa.

en los mismos Ags concentrados por precipitación con PEG o por ultracentrifugación (Ag B, C y E).

Sin embargo, cuando XJ-Clon 3 fue concentrado y posteriormente inactivado con FA (Ag F), se detectó virus residual en el cocultivo del pasaje ciego. El virus aislado se confirmó como VJ mediante neutralización con un inmunosuero específico anti-VJ. Por lo tanto, este Ag no se utilizó para las posteriores pruebas de inmunogenicidad en ratón adulto o cobayo.

5.3.2. Antigenicidad para ratón adulto (Tabla N°15)

Se estudió el poder antigénico de los Ags A, B, C, D, y E por inoculación en ratón adulto. Se utilizaron lotes de 5 ratones que se inocularon con 3 dosis semanales de 0.3 ml por vía ip. Con el mismo esquema de inmunización se inoculó un grupo control de 4 ratones con XJ-Clon 3 sin inactivar (Título: $10^{6,5}$ UFP/ml). A los 10 días de la última dosis se obtuvo sangre por punción reororbital obteniéndose suero para determinar Acs IF y Acs Neu.

Todos los antígenos fueron efectivos en inducir respuesta inmune humoral. Se detectaron Acs IF con títulos de 1/5 a 1/10 y Acs Neu con títulos de 1/20 a 1/40. No se obtuvieron diferencias significativas en los títulos de Acs obtenidos con Ags concentrados y no concentrados.

Los ratones inoculados con XJ-Clon 3 sin inactivar presentaron

Tabla N°15

INMUNOGENICIDAD PARA RATON ADULTO DE ANTIGENOS DE XJ-CLON 3 INACTIVADOS
CON FORMALDEHIDO

Antígenos	Tratamiento		Anticuerpos*	
	% FA	Concentración	Neu	IF
A	0.1	No	1/40	1/10
B	0.1	PEG	1/40	1/10
C		Ultracentri- fugación	1/20	NR
D	0.05	No	1/40	1/5
E	"	PEG	1/40	1/5
XJ-Clon 3 (10 ^{6.5} UFP/ml)	No	No	1/160	> 1/40

* : en "pool" de sueros.

FA : Formaldehído.

títulos de Acs mayores a los obtenidos con los Ags inactivados.

5.3.3. Antigenicidad para cobayos (Tabla N°16)

El cobayo es un huésped experimental que ha sido utilizado tanto como marcador de atenuación de cepas de VJ así como en estudios de fisiopatogenia, ya que es el huésped experimental que mejor reproduce los signos de la FHA humana.

Dado que XJ-Clon 3 inactivada con FA fue inmunogénica para ratón adulto, nos interesó determinar si también lo era para el cobayo y si era capaz de protegerlo contra el desafío con XJ.

Se ensayaron dos antígenos inactivados con FA al 0.1% 50 hs: el Ag A (no concentrado) y el Ag C (concentrado 100 x por ultracentrifugación y purificado en gradiente de sacarosa).

Ag A:(no concentrado)

Se inocularon 5 cobayos con 4 dosis semanales de 1 ml por vía im, sin adyuvante. A los 10 días de la última dosis se obtuvieron muestras de sangre y se determinaron Acs IF y Acs Neu.

En los 5 sueros se detectaron Acs IF con títulos de 1/20 a 1/80 y Acs Neu con títulos de 1/20 a 1/40.

Estos cobayos inmunizados no fueron protegidos contra el desafío con la cepa XJ de VJ (Item 5.3.4.) La falta de protección

Tabla N°16

IMMUNIZACION DE COBAYOS CON ANTIGENOS INACTIVADOS.

Cobayo N°	Anticuerpos *			
	Ag A	Neu Ag C	Ag A	IF Ag C
1	1/20	1/16	1/80	Neg
2	1/40	1/8	1/20	Neg
3	1/40	1/8	1/20	NR
4	1/40	1/8	1/40	Neg
5	NR	1/8	1/40	NR
Controles (n = 5)	Neg		Neg	

* : A los 10 días de la última dosis de Ag

Ag A : Inactivado con FA al 0.1%. 4 dosis semanales de 1 ml vía im.

Ag C : Inactivado con FA al 0.1% y concentrado por ultracentrifugación y purificado. 3 dosis semanales de 0.5 ml con adyuvante de Freund, vía subcutánea.

observada podría deberse a un nivel de Acs insuficientes. Por lo tanto, decidimos en un segundo experimento utilizar un Ag concentrado y purificado con el objeto de obtener una mayor respuesta y con ello protección.

Ag C: (concentrado con ultracentrifugación).

Se inocularon 5 cobayos con 3 dosis semanales de 0.5 ml con adyuvante de Freund, por vía subcutánea. Se utilizó un grupo control de 5 animales sin inmunizar. A los 10 días de la última dosis se obtuvieron muestras de sangre para determinar Acs Neu e IF.

Se detectaron Acs Neu en títulos de 1/8 a 1/16 pero no se observaron Acs IF.

Con el objeto de estudiar el poder neutralizante de los Acs inducidos por XJ-Clon 3 inactivada contra la cepa XJ (cepa desafío), se determinó mediante neutralización cruzada el título de Acs Neu contra XJ-Clon 3 y contra XJ en los sueros de los cobayos inmunizados con el Ag C.

Se utilizó la técnica de reducción de placas bajo agarosa. La neutralización se realizó con "pool" de sueros de los 5 cobayos contra 100 UFP de XJ-Clon 3 y contra 100 UFP de XJ.

No se hallaron diferencias significativas entre los dos títulos de Acs contra las dos cepas, contra XJ-Clon 3 fue de 1/24

y contra XJ fue de 1/12.

5.3.4. Estudio de protección de cobayos.

Los cobayos inmunizados con 4 dosis del Ag A, tres dosis del Ag C y los animales controles sin inmunizar se desafiaron con 100 DL₅₀ de la cepa XJ por vía im, a los 12 días de la última dosis.

No se observó protección contra el desafío ya que los animales inmunizados murieron entre los 11-14 días pi, en igual fecha que los controles. En ambos grupos se observó descenso de peso a partir del tercer día post-desafío y todos ellos exhibieron el cuadro hemorrágico típico de la Fiebre Hemorrágica Experimental en la autopsia.

5.4. Conclusiones

- 1) La inactivación de XJ-Clon 3 con FA al 0.1% ó 0.05% a 0°C fue lineal a partir de las 4 hs de tratamiento, no detectándose virus a las 24 hs para la concentración de 0.1% y a las 48 hs para 0.05% de FA.
- 2) Fue posible inactivar XJ-Clon 3 con FA sin destruir su capacidad antigénica, ya que la inoculación de Ag inactivados a ratón adulto y cobayo indujo formación de Acs Neu e IF.
- 3) La inmunización de cobayos con estos Ag inactivados a pesar de inducir la formación de Acs Neu no protegió contra el desafío con XJ.
- 4) La ausencia de protección en cobayos inmunizados frente al desafío con la cepa patógena, señala que otros mecanismos además de la inmunidad humoral, parecen ser indispensables para obtener protección.

6. DISCUSION

Los estudios expuestos en esta tesis tuvieron como objetivo contribuir al control de la FHA. El control de esta enfermedad se puede realizar por dos caminos principales: reducción de roedores reservorios de VJ y la inmunización de la población susceptible.

Para establecer un programa de control de roedores es necesario conocer todas las especies que puedan estar involucradas en el mantenimiento del virus en la naturaleza, su densidad, distribución y características ecológicas. Hasta el presente, se aisló VJ de C.musculus, C. laucha, A. azarae y Mus musculus pero se desconocía si otras especies podrían también desarrollar infecciones persistentes con VJ y de esa forma ser reservorios potenciales del virus.

Para investigar ese área, en este estudio se determinó la respuesta a la infección experimental con VJ de cuatro especies de cricétidos: Akodon azarae, Akodon molinae, Akodon dolores y Calomys callidus.

En el género Akodon, la respuesta a la infección experimental con la cepa XJ-Clon 3 fue heterogénea dependiendo de la edad, vía de inoculación y de la especie. Los animales adultos fueron poco sensibles ya que no se observó morbimortalidad, no se detectó virus en sangre, fauces u órganos y la respuesta inmune humoral va-

rió con la vía de inoculación, siendo en algunos casos negativa.

Por el contrario, los Akodon lactantes demostraron ser sensibles. Cuando se utilizó la vía ic, desarrollaron una infección letal cuya severidad fue mayor para A. azarae, alcanzando casi un 100% de mortalidad; siendo menor para A. molinae y A. dolores.

En los animales sobrevivientes a la infección se detectó infección prolongada en A. molinae y A. azarae. La infección persistente en A. molinae se evidenció por aislamiento de virus de cerebro hasta los dos meses y de antígeno viral hasta los 6 meses pi.

Un hecho destacable fue la presencia de depósitos de Igs coexistiendo con antígeno viral en el cerebro de animales que no presentaban signos clínicos de enfermedad. Los inmunocomplejos se detectaron por IF desde la aparición de la respuesta inmune humoral y la intensidad de los depósitos fue en aumento con el transcurso de la infección.

Dado que nuestro estudio finalizó a los 6 meses desconocemos si la presencia de inmunocomplejos podría ocasionar patología tardía o bien representar la limpieza del virus del SNC.

Por otra parte, Akodon azarae lactante inculado por una vía natural como la mucosa presentó baja morbimortalidad y fue posible detectar una infección prolongada en SNC hasta los dos meses pi, cuando concluyó el estudio.

Cabe señalar que sólo se detectó infectividad, cuando se utilizó una técnica muy sensible como el cocultivo. Esto último su-

giere la presencia de bajos títulos virales o tal vez la acumulación de Ag intracitoplasmático no infeccioso.

Resultados similares se observaron en la infección de la rata algodónera (Sigmodon hispidus) con virus Tamiami. En este modelo, a pesar de no detectarse infectividad se producía una acumulación progresiva de antígeno intracitoplasmático en ausencia de patología. Se sugirió que este "switch" de virus infeccioso a antígeno intracitoplasmático podría ser una de las razones de la ausencia de efecto citopático (20).

Por otra parte, nuestros resultados de infección experimental de A. molinae se asemejan a lo observado para C. musculinus (principal reservorio de VJ) inoculado con XJ-Clon 3 vía ip. En este último caso, los adultos resultaron resistentes mientras que los lactantes presentaron una mortalidad del 50%. Los sobrevivientes desarrollaron una infección persistente en cerebro acompañada de meningoencefalitis (46).

Por el contrario, en A. dolores y A. azarae sobrevivientes a la inoculación ic no se detectó infección persistente, si bien ésta no se puede descartar fehacientemente ya que sólo se utilizaron métodos convencionales de aislamiento viral.

En general, en los estudios de infección experimental con arenavirus en sus reservorios se ha podido correlacionar los hallazgos observados en la naturaleza con los resultados obtenidos en el laboratorio.

Sabattini y col. no observaron infección persistente en A. azarae lactante inoculado con la cepa Cba AN 9446 (aislada de C.musculus). Sin embargo, ésta no puede descartarse, ya que no utilizaron la técnica de cocultivo (36).

Nuestros resultados coinciden en parte, con los hallazgos de A. azarae naturalmente infectado con VJ (tanto dentro como fuera del área endémica).

En el caso de A. azarae se requieren estudios posteriores con cepas de VJ aisladas a partir del mismo huésped para dilucidar este problema.

Otro aspecto importante en el género Akodon es la influencia que podría tener el polimorfismo cromosómico en la infección viral.

Recientemente, se aislaron en Africa arenavirus relacionados al virus Lassa de cricétidos cercanos a M.natalensis (principal reservorio). Se observó que existirían M.natalensis con distintos complementos cromosómicos ($2n = 32, 34$ y 36) y diferente sensibilidad a la infección con virus Lassa (18).

Teniendo en cuenta este antecedente y considerando que Akodon presenta polimorfismo cromosómico, tanto en autosomas (A.molinae y A. dolores) como en cromosomas sexuales (A. azarae), sería importante en futuros estudios a campo y en el laboratorio, determinar en este género la relación entre genotipo y sensibilidad al VJ.

La infección experimental de C. callidus con XJ-Clon 3 demostró que esta especie es sensible a la infección y capaz de desarrollar una infección persistente con eliminación de virus a través de saliva.

Los resultados obtenidos se asemejan a los observados en la infección experimental de C. musculinus tanto con XJ-Clon 3 como con la cepa salvaje Cba AN 9446.

C. callidus lactante inoculado por vía natural (mucosa) presentó una mortalidad del 70% y en los sobrevivientes se detectó virus en cerebro y glándula salival hasta los dos meses pi, no sólo por la técnica de cocultivo sino también por un método menos sensible como es la inoculación en ratón lactante.

Los signos de enfermedad observados fueron similares a los presentados por C. musculinus inoculado con XJ-Clon 3 vía ip, ya que se observó cuadro neurológico y un menor tamaño corporal. Este retraso en el crecimiento en animales infectados también fue observado en C. musculinus inoculado con Cba AN 9446 (44), C. callosus con virus Machupo (21) y en Mus musculus con LCM (103). En este último caso, se determinó que el menor peso corporal se debía a una deficiencia en la hormona del crecimiento y se demostró que la replicación viral era primariamente en células secretoras de esta hormona en glándula pituitaria (103).

Por otra parte, la oclusión ocular observada también se ha descrito en la inoculación de cobayos con VJ vía in (104) y en otros virus tales como en la infección congénita de ratones por Reovirus (105).

Es de destacar que tanto los C. callidus adultos inoculados por vía in como las hembras que se infectaron naturalmente por contacto con sus crías, desarrollaron infecciones persistentes. Este último hallazgo demuestra, además, la existencia de transmisión horizontal ya que crías inoculadas por vía ic como in fueron capaces de transmitir la infección a sus madres probablemente a través de la saliva.

Un hecho similar se observó en el principal reservorio, C. musculus inoculado con XJ-Clon 3 vía ip, donde se observó transmisión horizontal ya que un 26% de las hembras en contacto con sus crías infectadas desarrollaron infección persistente acompañada de meningoencefalitis (54).

Por otra parte, en nuestro estudio se detectó virus en el cerebro de una hembra infectada naturalmente con XJ-Clon 3 a los 7 meses pi. Este hecho, sugiere que la respuesta inmune humoral observada no sería suficiente para la limpieza viral.

En el modelo C. musculus - XJ-Clon 3 se observó la aparición de variantes antigénicas tanto en la etapa aguda como en animales persistentemente infectados. Estas variantes escaparían a la respuesta inmune humoral, lo que podría explicar la persistencia del virus a pesar de la presencia de Acs (47).

Asimismo, la respuesta a la infección de C. callidus con XJ-Clon 3 es semejante a la presentada por C. musculus con Cba Ati 9446 vía in. En este modelo se observó que los lactantes desarrollaron una infección persistente con virus en sangre, fauces y ori-

na. Si bien, no se observaron signos neurológicos de enfermedad se registró una mortalidad del 70% entre los 24-40 días pi, precedida por un retraso en el crecimiento. Los C. musculinus persistentemente infectados presentaron una marcada reducción en la eficiencia reproductiva.

Por el contrario, los C. musculinus adultos desarrollaron una infección persistente pero no presentaron mortalidad ni alteración en su potencial reproductivo (44).

Si bien se ha podido determinar la existencia de transmisión vertical post-natal (35), la importancia de la misma en el mantenimiento del VJ en la población de roedores no se conoce con exactitud.

De acuerdo a los datos ya comentados, debido a la fertilidad reducida de los C. musculinus inoculados al nacimiento, la transmisión horizontal sería fundamental para el mantenimiento del virus en la naturaleza.

No ocurriría lo mismo con los C. musculinus adultos donde la fertilidad no se ve afectada. En este caso, tanto la transmisión vertical como la horizontal podrían contribuir a la permanencia del VJ en la naturaleza (44).

La importancia de la transmisión horizontal se ha demostrado tanto por estudios realizados en la naturaleza(35,36) como de infección experimental (35,36,44).

Las glándulas salivales serían uno de los principales sitios

de replicación viral (43).

En nuestro estudio, sólo en el caso de C. callidus se observó transmisión horizontal del virus de las crías infectadas a sus madres, lo que coincidió con la detección de virus en saliva y glándula salival y con la sensibilidad a la infección de los adultos. La existencia de transmisión horizontal así como su capacidad de desarrollar una infección persistente señalan la potencialidad de esta especie para sostener una infección en la naturaleza.

Por el contrario, en Akodon no se observó infección de las crías a sus madres coincidiendo con la poca sensibilidad a la infección de los adultos.

Esta distinta sensibilidad a la infección relacionada con la edad del huésped se ha observado también en otros modelos de infección con arenavirus. Tal es el caso de C. musculinus y XJ-Clon 3 vía ip (46); la rata algodónera y el virus Tamiami (20); C. callosus y Machupo (21).

Una de las principales características de los arenavirus es su capacidad de producir infecciones persistentes aunque los mecanismos que llevan a la persistencia no se conocen. Probablemente, existan múltiples factores involucrados, ya sean dependientes del virus y/o del huésped.

Para el VJ, se ha observado que la presencia de mutantes Ts y partículas defectivas serían importantes en la instalación

y/o mantenimiento de la persistencia "in vitro". (106).

"In vivo", en C. musculinus infectado persistentemente con XJ-Clon 3 se observó la presencia de variantes antigénicas (47). Más aún, los estudios realizados con ratones atímicos (107) así como en el modelo C. musculinus - XJ-Clon 3 sugieren un papel fundamental de los linfocitos T tanto en la inducción de enfermedad neurológica como en la instalación o mantenimiento de la persistencia, tal vez a través de un defecto funcional y/o cuantitativo. En apoyo a esta hipótesis, se ha demostrado que la infección tímica temprana del ratón neonato inmunocompetente está asociada al establecimiento de una infección persistente (108).

En C. musculinus neonatos inoculados con XJ-Clon 3, la administración de suero antitímico aumenta la supervivencia y evita la aparición de lesiones en SNC (51). Por lo tanto, un defecto en la respuesta T dependiente podría, análogamente, influir en el establecimiento y/o mantenimiento de la infección persistente en poblaciones de roedores.

Nuestros resultados indican que, además de los conocidos reservorios de VJ, otros cricétidos son capaces de infectarse con VJ y desarrollar infecciones persistentes.

Sin embargo, para considerar su papel en el ciclo natural del VJ debe tenerse en cuenta no sólo la capacidad para establecer una infección persistente, sino también los factores ecológi-

cos y etológicos que permitan poner en contacto una población infectada con una susceptible.

Por lo tanto, en futuros estudios de captura en el campo debería tenerse en cuenta a estas especies, en especial C. callidus y A. molinae, y verificar si están o no infectados con VJ en la naturaleza.

Dado que estas especies se encuentran distribuidas en distintos puntos del país, dentro y fuera del área endémica, cabe la posibilidad de que actúen como reservorios alternativos de VJ facilitando la diseminación viral a otras áreas distintas de las ya conocidas, actuando como nexos entre C. musculinus infectados y no infectados o, en ausencia de éstos, convirtiéndose ellos mismos en reservorios de importancia epidemiológica.

Si esta hipótesis es correcta, resultaría casi imposible controlar la FHA mediante métodos de control de roedores, ya que no sería simplemente controlar una o dos especies, sino un conjunto de cricétidos que aunque comparten una serie de características biológicas por derivar de un mismo tronco evolutivo, poseen al mismo tiempo sus particularidades ecológicas y etológicas así como una amplia distribución rural. Por otra parte, cabría esperar, en el futuro, una mayor expansión del área endémica de FHA.

En el caso de la Fiebre Hemorrágica Boliviana, el control de roedores fue efectivo debido a que existe una sola especie reservorio, con hábitos peri-domiciliarios.

Para FHA, la situación es distinta ya que existe más de una especie reservorio y éstas presentan una amplia distribución rural. Los métodos de control propuestos hasta el presente se basan en medidas destinadas a cambios en las prácticas agrícolas. Por lo tanto, si bien el control de los roedores como método de lucha contra la FHA es posible, requiere aún de mayores estudios e involucra medidas muy complejas y costosas. La inmunización de la población susceptible es otra forma de control de esta enfermedad. Una alternativa es la utilización de una vacuna a virus inactivado.

Analizaremos ahora los resultados obtenidos en la preparación de Ags de VJ, inactivados con FA.

En un trabajo previo, observamos que la cepa XJ-Clon 3 crecida en cerebro de ratón lactante e inactivada con Formaldehído (FA) al 0.2% ó 0.05% a 37°C era incapaz de inducir en cobayos Acs Neu ni protección contra el desafío con la cepa XJ (101). Esta ausencia de protección, fue adjudicada a la destrucción de las glicoproteínas de envoltura por acción del FA ó bien a la baja masa antigénica utilizada.

Sin embargo, el FA es un agente inactivante que se ha utilizado ampliamente en la preparación de vacunas virales tanto humanas como de uso veterinario. Dado que los estudios con este inactivante no fueron exhaustivos, en este estudio decidimos modificar las condiciones de inactivación con el objeto de preservar la antigenicidad del virus.

En primer lugar, se utilizó la línea celular Vero como sustra-

to para el crecimiento de XJ-Clon 3. En estos últimos años, las células Vero fueron aceptadas para producción de vacunas para uso humano ya que se demostró ausencia de tumorigenicidad en ratas recién nacidas, de ADN celular y partículas C y análisis cariológicos normales (109). Así, han obtenido licencias para uso humano las vacunas contra la poliomielitis inactivada (vacuna Salk) y la de la rabia producidas en estas células (110).

Por otra parte, utilizamos 0°C para la inactivación con FA, ya que si bien la inactivación con FA es más lenta a esta temperatura que a 37°C, la inactivación térmica es menor.

Las curvas de inactivación con FA al 0.05% ó 0.1% fueron lineales a partir de las 4 hs de tratamiento. Para la preparación de nuestros antígenos utilizamos tiempos mayores a los requeridos para no detectar infectividad. De acuerdo a las rectas obtenidas esto equivaldría a tener alrededor de 10^{-4} UFP/ml. Este es un valor aceptado para la preparación de la vacuna contra la aftosa (111).

No se detectó infectividad residual en los antígenos inactivados, aún luego de la concentración.

Sin embargo, cuando concentramos con PEG un lote viral previamente a la inactivación, detectamos infectividad en cocultivos (luego de dos pasajes por ratón). Esto, probablemente se deba a la formación de agregados de partículas víricas durante la precipitación con PEG quedando algunos viriones protegidos de la acción del inactivante. Por lo tanto, este Ag no se utilizó en los ensayos

de antigenicidad.

Los restantes Ags (A, B, C, D y E) en los que se demostró ausencia de infectividad residual, resultaron inmunogénicos para ratón adulto ya que éstos presentaron Acs IF y Neu.

Los títulos de Acs obtenidos con los Ag concentrados y no concentrados fueron similares y en algunos casos se observaron títulos menores con Ags concentrados (Tabla N°15 y 16). Probablemente, esto se deba a la baja eficiencia de recuperación de los métodos de concentración utilizados. En la concentración con PEG se recuperó un 17% de la infectividad inicial. En la concentración del virus Pichinde con una metodología similar se obtuvo una recuperación mayor a la nuestra (27 al 43%) (112).

La baja recuperación de la infectividad en la concentración con PEG podría deberse a destrucción de la partícula viral y/o a la formación de agregados. La concentración con PEG y sulfato de amonio del virus Sincicial Respiratorio Humano, determinó que la pérdida de infectividad inicial se debía a la agregación de partículas virales y no a la destrucción de las mismas (113).

Por otra parte, no fue posible calcular la eficiencia de la concentración por ultracentrifugación, dado que inactivamos previamente a la concentración. Aunque, en trabajos que utilizaron un método similar se determinó que la recuperación era no menor al 40% (114).

Para los ensayos de inmunogenicidad y protección de cobayos se utilizaron los Ags A y C (XJ-Clon 3 inactivado con FA al 0.1%).

Con ambos Ags se detectaron Acs Neu. Los títulos alcanzados

con el Ag C (concentrado y purificado) fueron menores a los obtenidos con el Ag A sin concentrar. Los títulos relativamente bajos obtenidos con el Ag C probablemente se deban a que durante el proceso de concentración se haya perdido masa antigénica.

De tal manera que con un Ag sin concentrar (Ag A) se obtuvo una mayor respuesta inmune (títulos de 1/40). Sin embargo, tampoco en este caso se observó protección contra el desafío con Vi.

Esta falta de protección podría deberse a distintas causas: a) destrucción del poder antigénico del virus por acción del FA; b) nivel de Acs Neu insuficiente o inadecuada calidad de los Acs producidos; c) falta de inducción de algún otro mecanismo de protección tal como la inmunidad celular.

El hecho de que tanto los ratones adultos como los cobayos presentaran Acs Neu indica que el FA no destruyó la capacidad antigénica de XJ-Clon 3.

La importancia de la inmunidad humoral en la recuperación y protección de la FHA ha sido precisada por estudios realizados tanto en cobayos como en humanos. La administración precoz de suero anti-VJ es capaz de modificar el curso de la enfermedad tanto humana como experimental, disminuyendo la mortalidad. En el tratamiento de la FHA se demostró que las dosis de Acs Neu son importantes para lograr la recuperación de la enfermedad (29).

En nuestro estudio, aunque se alcanzaron títulos de Acs Neu de 1/40 estos pudieron ser insuficientes para frenar la infección.

Otra posibilidad es que los Acs dirigidos contra la cepa XJ-Clon 3

no neutralizaran eficientemente a la cepa desafío XJ. Datos publicados sobre neutralización cruzada entre distintas cepas de VJ indicaron que un suero anti-XJ-Clon3 neutralizaba 15 veces menos a la cepa XJ que a XJ-Clon 3 (12).

Por lo tanto, determinamos la eficiencia de neutralización de los sueros de los cobayos contra la cepa XJ y XJ-Clon 3. Dado que se observó una diferencia de sólo una dilución entre ambos títulos de Acs, este no es el caso de nuestros Acs inactivados.

Asimismo, la capacidad inmunogénica de XJ-Clon 3 (vivo) se determinó en los primeros estudios de inmunización de cobayos. Los animales inoculados con una sola dosis de XJ-Clon 3 (sin inactivar) desarrollaron altos títulos de Acs Neu y se logró protección completa contra el desafío con XJ. En estos estudios se basó la experiencia piloto de inmunización con XJ-Clon 3 en voluntarios humanos (72,73).

Si bien, el papel benéfico de los Acs Neu ha sido comprobado en numerosos estudios, el papel de la inmunidad celular en la protección no está tan claro.

Los estudios de administración de inmunosueros indican que si bien se modifica la infección con XJ, nunca se logra un 100% de protección (115). Las causas de este fenómeno se desconocen.

En el modelo ratón se ha demostrado el papel fundamental de los linfocitos T tanto en la limpieza como en la inducción de encefalitis. Sin embargo, no se sabe con exactitud como actúan en el cobayo y en el humano. Aunque, existen indicios que señalan que la

inmunidad celular cumpliría un importante papel como mecanismo protector.

La nueva cepa atenuada Candid 1, inoculada a cobayos y monos induce Acs Neu en el 96% de los cobayos y el 90% de los Rhesus, contra Candid 1 ó XJ-Clon 3 pero cuando se enfrenta a la cepa patógena desafío, el porcentaje disminuye al 34% de los cobayos y al 50% de los monos. A pesar de eso, la protección lograda fue del 100% (87).

Por otra parte, el virus Tacaribe inoculado a cobayos protege contra el desafío con VJ en presencia de Acs contra Tacaribe y no contra Junín. En otro ejemplo, monos Rhesus inoculados con Candid 1 desarrollaron altos títulos de Acs Neu contra VJ y bajos o nulos contra el virus Machupo. Sin embargo, estos resistieron el desafío con Machupo (116).

En estos estudios de inmunización cruzada, se desconoce si la protección se debe a la inmunidad celular o a una primo-estimulación cruzada que acelera la respuesta humoral antiviral.

Mas aún, en cobayos inoculados con VJ se demostró que los polimorfonucleares cumplirían un rol defensivo en la FH experimental (117). Asimismo, en cobayos inoculados con la cepa atenuada XJ 44 se detectó, además de la respuesta inmune humoral, actividad lítica en suspensiones celulares de bazo a los 6 días pi. Esta actividad se adjudicó a citotoxicidad anticuerpo dependiente (118).

Todos estos datos señalan que la inmunidad celular tendría un papel importante en la protección a la infección con VJ.

En las infecciones con arenavirus del Viejo Mundo el mecanismo inmunológico dominante para la recuperación y protección parece ser la inmunidad celular mediada por linfocitos T (118).

En un estudio realizado con virus Lassa en cobayos, se observó que la estimulación de células citotóxicas sería clave para lograr protección contra el desafío con cepas patógenas (119).

Dado que nosotros no estudiamos la respuesta inmune celular en cobayos inmunizados con los Ag inactivados, desconocemos si la falta de protección observada se debe a que la respuesta celular no fue estimulada, ya sea por una masa antigénica insuficiente o porque el Ag no fue capaz de estimularla.

Nuestros resultados indican que es posible inactivar al VJ con FA y conservar su capacidad antigénica dado que los cobayos inoculados con los Ag inactivados desarrollaron Acs Neu. Sin embargo, no son protegidos contra el desafío con XJ. Esta falta de protección podría deberse a Acs Neu insuficientes y/o a la ausencia de mecanismos de inmunidad celular necesarios para lograr una protección efectiva.

La controversia sobre ventajas y desventajas de las vacunas a virus vivo y atenuado y a virus inactivado ha sido ejemplificado con la vacuna contra la Poliomiélitis.

La vacuna atenuada de la Poliomiélitis (Vacuna Sabin) es muy efectiva en la prevención de la enfermedad, pero su inocuidad ha sido cuestionada ya que se han demostrado casos de polio parálitico.

asociados a vacunación en países donde la Poliomielitis estaba erradicada (120).

Por otra parte, una de las desventajas atribuidas a la vacuna Polio inactivada ha sido su menor potencia comparada con la de la vacuna Sabin. Sin embargo, los recientes avances de la tecnología de cultivo de tejidos así como en los procesos de concentración y purificación han permitido la obtención de vacuna polio inactivada que se administra en una única dosis (121).

Otro aspecto a tener en cuenta es que en algunos casos, Acs que son pobres inductores de Acs Neu son responsables de la inducción de Acs protectores.

Existen ejemplos de Acs inactivados que, a pesar de inducir una buena respuesta inmune humoral, no protegen. Un ejemplo dentro de los virus envueltos es el caso de los paramixovirus. Estos poseen dos glicoproteínas de superficie: la hemoaglutinina-neuroaminidasa (HN) y el componente F. Se observó que la vacuna contra el Sarampión preparado por inactivación con FA o con Tween 80 y éter inducía Acs Neu. Sin embargo, no protegía, a pesar de haberse demostrado previamente la efectividad de la inmunización pasiva. Esta falta de protección se debió a la destrucción de una parte crucial del componente F por efecto del inactivante. Si bien los Acs contra la hemoaglutinina son suficientes para neutralizar el virus, los Acs contra F son necesarios para prevenir el desarrollo de la enfermedad (122). Los vacunados con esta vacuna presentaron una enfermedad atípica que se adjudicó a la sensibilización previa contra

la hemoaglutinina. Así también, se obtuvieron resultados similares con la vacuna inactivada del virus de las paperas.

Con respecto a vacunas inactivadas de arenavirus, se han ensayado Acs concentrados del virus Lassa inactivados con FA o radiación gamma ó UV en cobayos. Sin embargo, a pesar de inducir Acs IF estos no fueron efectivos en inducir Acs Neu ni protección contra el desafío. En otro estudio, empleando Lassa inactivado con radiación gamma junto con Bordetella pertussis como adyuvante, se observó la inducción de Acs contra las principales proteínas estructurales del virus pero no protección (118).

El principal problema que se plantea para la producción de una vacuna inactivada de un arenavirus, es obtener la masa antigénica adecuada ya que los títulos virales obtenidos en cultivo de células son relativamente bajos. Aunque con la nueva tecnología de cultivo de tejidos en microcarriers o en fibra hueca así como métodos de concentración y purificación se podría solucionar este inconveniente. Por otra parte, por ingeniería genética se podría producir grandes cantidades de la glicoproteína de envoltura responsable de la inducción de Acs Neu.

Con respecto al VJ, los estudios de secuenciación y clonado del ARN (123) así como los que se realizan con Acs monoclonales (124) para determinar epitopes de neutralización permitirán en un futuro no muy lejano contar con una vacuna a subunidades o incluso recombinates que contengan los genes del VJ inductores de protec-

ción.

Así también, la utilización de adyuvantes tales como péptidos muramínicos u otros de reciente desarrollo podrían mejorar la inducción de la respuesta inmune tanto humoral como celular.

Se han ensayado también dos arenavirus relacionados con Lassa, virus Mopeia y Mobala, como candidatos a vacunas atenuadas. Estos son atenuados para primates y cobayos y proveen una sólida protección contra el virus Lassa. Sin embargo, se desconoce su patogenicidad para humanos. Es más, el virus Mopeia persiste en bazo de primates por períodos prolongados (118).

Por lo tanto, para la obtención de una vacuna atenuada contra un arenavirus deberán considerarse las características particulares de este grupo de virus en cuanto a su capacidad de desarrollar infecciones persistentes y de invadir el SNC.

Estudios con la cepa XJ-Clon 3 han demostrado que esta cepa atenuada, que en su momento fue utilizada como vacuna en humanos, es neurovirulenta (81) y capaz de causar daño en el miocardio en el primate Cebus apella (125) y producir infecciones transplacentarias y persistencia en cobayo (78) así como efectos mutagénicos (126) para este último huésped.

Es más, se ha demostrado que el VJ puede modificar su tropismo hacia el SNC por pasajes sucesivos en el mismo huésped (127), lo que señala el riesgo de que una cepa atenuada revierta a la virulencia.

Los estudios con la cepa atenuada Candid 1, se encuentran en etapas muy avanzadas y con resultados muy alentadores se ha iniciado la inmunización en voluntarios humanos (89).

Sin embargo, los riesgos que implica una vacuna a virus atenuado justifican que se continúe con la búsqueda de otras alternativas. Estas incluirán, además de los Ags inactivados que hasta el presente no parecen ser muy efectivos, la utilización de péptidos producidos por ingeniería genética, anticuerpos anti-idiotipo o bien de recombinantes. Por otra parte, la protección heteróloga conferida por el virus Tacaribe contra el VJ en cobayos y marmosets en ausencia de neurotropismo y persistencia viral, sugiere que su potencial uso en humanos debería ser considerado (95).

En conclusión, se requieren estudios más profundos, no solo con referencia a la obtención de Ags potentes y seguros sino también sobre los mecanismos de fisiopatogenia y protección en la Fiebre Hemorrágica Humana y Experimental.



DR^A. GUADALUPE CARBALLAL
PROFESORA ADJUNTA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

7. APENDICE TECNICO

7.1. Virus Junín

7.1.1. Cepa XJ-Clon 3: Esta cepa se originó a partir del clonado de la cepa XJ prototipo en células MA 111. Se utilizó un lote con 8 pasajes en cerebro lactante después de su clonado (72).

Su título fue de 1.31×10^8 UFP/ml en células Vero.

7.1.2. Cepa XJ prototipo : Esta cepa fue aislada a partir de sangre y órganos de un paciente de la localidad de Junín en 1958 y fue mantenida por pasajes sucesivos en cerebro de ratón lactante y en cobayo.

Se empleó un lote con los siguientes pasajes: cobayos 2, ratón lactante 13, cobayo 25, ratón 18, células Vero 2. Su título fue de $10^{5,5}$ DL₅₀/ml (ratón) y de $2,3 \times 10^5$ UFP/ml.

7.2. Aislamiento y titulación viral.

7.2.1. Preparación de lotes virales. Cepa XJ-Clon 3 en cerebro de ratón lactante: Se utilizaron ratones Rockland de 48-72 hs de vida que fueron inoculados por vía ic con 10^3 DL₅₀ de XJ-Clon 3. Los animales fueron sacrificados a los 7 días pi, y con sus cerebros se realizó un homogeneizado al 10%.en

solución de Hanks + 3% de suero de ternera + antibióticos el que se centrifugó a 10.000 g 40 min. a 4°C. El sobrenadante se fraccionó y congeló a -70°C hasta su utilización.

Cepa XJ-Clon 3 en cultivo de tejidos: Monocapas de células Vero crecidas en botellas Roux se infectaron con una multiplicidad de infección de 0.1 UFP/ célula. Luego de 2h de adsorción se colocaron 60 ml de Eagle + 5% de suero de ternera + 0.01M de Hapes a pH=7.2.

Se cambió el medio diariamente, previo lavado de la monocapa. A los 4 y 5 días pi se cosechó el sobrenadante, que fue centrifugado a 2000 rpm 30 min. a 4°C para eliminar restos celulares. El lote viral fue fraccionado y conservado a -70°C hasta su utilización. Los títulos alcanzados fueron de $10^{7,3}$ a $10^{6,3}$ UFP/ml.

7.2.2. Procesamiento de las muestras.

Las muestras de órganos se conservaron a -70°C hasta su procesamiento. Se realizaron macerados al 10% con Hank's o Eagle + 3% suero de ternera + 1% antibióticos. Luego se centrifugó a 10.000 g durante 40 min. a 4°C y el sobrenadante fue inoculado puro o en diluciones decimales en ratones Jac-

tantes; o cultivo de células Vero para su titulación por ACP o por placas bajo agarosa.

La sangre fue obtenida con heparina e inoculada con diluciones decimales a partir de la dilución 10^{-1} .

Los hisopados de fauces u oculares se obtuvieron con hisopo y este fue luego colocado en un tubo con 0.5 ml de Eagle + 3% suero de ternera + 2% antibióticos e inoculados en ratón lactante ó cultivo de células.

7.2.3. Titulación en ratón lactante.

Se emplearon ratones cepa Rockland de 48-72 hs provenientes de una colonia mantenida en el Depto. de Microbiología.

Las muestras se inocularon (0.02 ml), por vía ic, a camadas de 9-10 animales. Se registró mortalidad entre los 9 y 21 días pi de aquellos animales que exhibieron signos neurológicos de FHA.

El título se determinó por el método de Reed y Muench (128) en DL_{50}/ml .

Las muestras tuvieron los siguientes límites de detección: para los sobrenadantes diluidos al décimo (10^{-1}) se consideró neg cuando fue $\leq 2,2 \log_{10} DL_{50}/ml$ y para los sin diluir (10^0) fue $\leq 1,7 \log_{10} DL_{50} /ml$.

7.2.4. Titulación en cultivo de células mediante ACP.

Se utilizaron monocapas confluentes de células Vero crecidas en tubo, las que se mantuvieron con medio Eagle + 3% de suero de ternera + antibióticos. Se inocularon 0,2 ml por dilución a cuatro tubos. Se incubó 1 h a 37°C y luego se añadió medio de mantenimiento. Se cambió el medio 2 veces por semana observándose la aparición de ACP durante 14 días.

El título se determinó por el método de Reed y Muench (28).

El valor límite de detección fue de $1,2 \log_{10} \text{DICT}_{50}/\text{ml}$.

7.2.5. Titulación en cultivo de células mediante UFP.

Se utilizaron monocapas de células Vero crecidas en botellas de 25 ml. Se inocularon 0.2 ml de las muestras por duplicado.

Luego de 1 h a 37°C, las monocapas se cubrieron con 8 ml de una mezcla en partes iguales de agarosa (Sigma) al 1% y Mem 2x + 4% de suero de ternera + antibióticos. Las botellas se incubaron invertidas a 37°C y al 6to día las placas se revelaron con una segunda capa de agarosa con rojo neutro al 4%.

Al 7mo día se leyeron las placas. Para facilitar la lectura se consideró la dilución que contenía entre 50-100 plagas.

$$\text{Título} = \frac{\bar{X} \text{ (número de UFP promedio)}}{\text{dilución} \times \text{volumen del inóculo}} = \text{UFP/ml}$$

$$\text{Neg} = \leq 5 \text{ UFP/ml.}$$

7.2.6. Aislamiento por la técnica de cocultivo.

La muestra de órgano se lavó con solución salina de Hank's y se cubrió con antibióticos 1 h a 4°C. Posteriormente se cortó en trozos pequeños. Los microexplantos se resuspendieron en Mem + 5% suero de ternera + antibióticos. Una parte de la suspensión de explantos, se mezcló con dos partes de una suspensión de células Vero (1.5×10^5 células/ml). Se inocularon 5 ml de la mezcla a botellas de 25 ml, por duplicado. Los cocultivos se observaron diariamente y se hicieron 3 repiques. El sobrenadante de cada subcultivo se inoculó en ratón lactante para determinar infectividad y de cada subcultivo se prepararon cubres de tubos Leighton para determinar Ag por IFI (129).

7.3. Animales de experimentación.

7.3.1. Akodon azarae (Fisher, 1829) y Calomys callidus (Thomas, 1916):

Tanto los animales adultos como los lactantes fueron provistos por el bioterio de la Comisión de Energía Atómica (Ezeiza), a cargo del Dr. C. Quintans.

La colonia de Calomys callidus se fundó a partir de dos parejas de ejemplares capturados en el Parque Nacional El Palmar (Pcia de Entre Ríos) (69).

- La colonia de A. azarae provino de 8 ejemplares capturados en Diego Gaynor (Pcia de Buenos Aires) (130).

7.3.2. Akodon molinae (Contreras, 1968) y Akodon dolores (Thomas, 1916): Los animales fueron provistos por el bioterio del Instituto de Biología Celular (IMBICE; La Plata) a cargo del Dr. F. Dulout.

La colonia de A. molinae se fundó a partir de ejemplares capturados en Chasicó (Pcia de Buenos Aires) y posteriormente se incorporaron ejemplares de Sierra de la Ventana (67).

Los ejemplares de A. molinae utilizados en este estudio poseían un complemento cromosómico $2n=42$.

A. dolores derivó de 5 parejas capturadas en Deán Funes (Pcia de Córdoba). Los animales utilizados poseían un complemento cromosómico de $2n=38-40$. (68).

En las cuatro colonias se descartó infección con VJ y LCM en los animales fundadores.

7.3.3. Ratones: Se utilizó la cepa Rockland criada en el bioterio del Depto. de Microbiología, Facultad de Medicina (UNBA). Se emplearon lactantes (48-72 hs) para el aislamiento y titulación viral y adultos (mayores de 1 mes) para los ensayos de inmunogenicidad de los antígenos inactivados.

7.3.4. Cobayos:

Se utilizaron animales de exocria de 300-400 gr.

7.4. Mantenimiento de los animales.

Cricétidos:

Una vez trasladados los animales de las respectivas colonias fueron alojados en cajas metálicas individuales (madre y su camada y adultos) en el bioterio del Depto. de Microbiología (Fac. de Medicina).

Se alimentaron con dieta para ratones (Purina N°1) y agua "ad-libitum." Se mantuvieron con ciclos luz-oscuridad de 14 y 10 hs y con una temperatura de alrededor de 25°C.

Cobayos:

Se ubicaron 3-4 animales por jaula. Se los alimentó con alimento blanceado (Purina N°4), agua "ad-libitum" y verde dos veces por semana.

7.5. Técnicas Serológicas.

7.5.1. Acs Neu: Se determinaron por tres técnicas distintas. En el

texto se especifica cuál se utilizó en cada caso.

- 7.5.1.1. Técnica de Virus constante-suero variable Los sueros inactivados (56°C 30 min.) se diluyeron 1:2 a partir de la dilución 1/5 en medio de mantenimiento. Cada dilución se mezcló en partes iguales con 200 DICT₅₀ de XJ-Clon 3. Se incubó 1h a 37°C y luego se inoculó a monocapas de células Vero crecidas en tubo y se midió infectividad residual por ACP. El título de Acs se expresó como la máxima dilución en donde no se observó ACP.
- 7.5.1.2. Técnica de virus variable-suero constante: Diluciones de 1:5 de suero inactivado se mezclaron con diluciones decimales crecientes de VJ (dilución final del suero 1:10) y se incubaron por 1 h a 37°C. La infectividad residual después de la neutralización se midió por ACP en células Vero. El título de Acs Neu se expresó como índice neutralizante que representa la diferencia entre el título de virus en el control y el título de virus en presencia del suero ensayado. Se considera como positivo cuando este índice es > 2 .
- 7.5.1.3. Técnica de reducción de placas: Se realizaron diluciones 1:2 de los sueros inactivados y se mezclaron en partes

iguales con 200 UFP/0.2 ml de XJ-Clon 3. Luego de 1 h de incubación a 37°C se plaqueó en monocapas de células Vero. El título de Acs se consideró como la dilución de suero que reduce un 50% el número de placas control.(131).

Para las tres técnicas se utilizaron los siguientes controles: Virus + medio; virus + suero normal; y virus + suero anti-VJ de título conocido.

7.5.2. Acs IF: Se utilizó la técnica de IF indirecta sobre células BHK/21 persistentemente infectadas con VJ (132).

Para revelar la reacción se utilizaron anti-Ig totales contra ratón (GIBCO) o contra cobayo (Hyland) marcadas con fluoresceína, según el caso.

Se utilizó como control positivo un inmunosuero anti-VJ preparado en rata o cobayo. La lectura se realizó en un epimicroscopio de fluorescencia Carl Zeitz.

7.6. Técnicas inmunohistoquímicas.

Los trozos de órganos para IF se congelaron inmediatamente en isopentano enfriado en una mezcla de hielo seco en acetona y luego a -70°C o bien directamente en tanque de N₂ líquido, hasta su procesamiento.

Se realizaron cortes de aproximadamente 2μ de espesor con criostato y se fijaron 10 min. en acetona a 4°C .

Para la detección de Ag viral se empleó la técnica de IFI. Los cortes se cubrieron con un suero anti-VJ preparado en rata 30 min. a $t^{\circ}\text{C}$ ambiente. Luego de dos lavados con PBS (pH: 7.2) se tiñeron con suero anti-Ig totales de ratón conjugado con fluoresceína (1/30). Se incubó 30 min. y luego se lavó 2 veces con PBS.

Los preparados fueron montados con una mezcla de glicerol-PBS (1:4).

Para detectar simultáneamente en un mismo corte Ag viral e Igs se utilizó la técnica de doble tinción con fluoresceína-rodamina. La búsqueda de Ag se realizó tal como se describiera previamente, mientras que las Igs se investigaron mediante un suero anti-Igs ratón marcado con rodamina.

La detección de Ag en improntas de cerebro se realizó con la misma técnica que la utilizada para cortes de órganos.

7.7. Inactivación con FA

Se utilizó una solución al 10% de formaldehído al 37% (FA) (Merck) en buffer fosfato. La inactivación se realizó con las concentraciones finales de 0.05 ó 0.1% de FA a 0°C (baño de hielo en la heladera) con agitación constante.

La acción del FA fue neutralizada con bisulfito de Sodio (Merck) al 35% (en esta concentración el bisulfito es equimolecular con el FA al 10%) (134).

7.8. Concentración por precipitación con PEG.

Los lotes virales se concentraron con PEG 6000 (Biochem) 70 g/litro y ClNa 23,2 g/litro. La mezcla se disolvió con agitación constante a t°C ambiente y luego se incubó a 4°C durante 2 hs.

Se centrifugó a 10.000 rpm 1 h. El sobrenadante se descartó y el precipitado se resuspendió en buffer tris-ClNa-EDTA (0.01 M, 0.1 M, 0.001 M) a pH= 7.2 . Se sonicó a 1.5 Amperes 45 seg. (112)

7.9. Concentración por ultracentrifugación y purificación en gradiente de sacarosa.

La concentración y purificación se realizó en el Centro de Virología Animal (CEVAN) bajo la dirección del Dr. José La Torre, de acuerdo a la técnica descrita por Martinez Segovia, ZN et al. (114).

El lote viral se centrifugó a 26.000 rpm en un rotor Ti 70 en una centrífuga Beckman L₄.

El precipitado resuspendido en 1 ml de tampón fosfato-

0. 25 M sacarosa, se sembró sobre un gradiente discontinuo de sacarosa (1.5 ml sacarosa 50% en buffer fosfato + 1.5 ml sacarosa 20%). Se centrifugó a 40.000 rpm durante 3 hs en un rotor SW41. Se extrajo con pipeta Pasteur la banda opalescente (1 ml) formada en la interfase del gradiente.

7.10. Determinación de proteínas

Se utilizó la técnica de Bradford para determinar la concentración de proteínas. (134).

8. BIBLIOGRAFIA

- 1- Kiley MP, Swanepoel R, Mitchell SW, Lange JV, Gonzalez JP, Mc Cormick JB. Serological and biological evidence that Lassa-complex arenaviruses are widely distributed in Africa. Med. Microbiol. Immunol. 175: 161-163, 1986.
- 2- Howard C. "Natural history in Arenaviruses". Elsevier. Anst. New York. Oxford A.J. Zuckerman. In Perspective in Medical Virology. Vol N°1. 1986: 9-22.
- 3- Armstrong C, Lille RD. Experimental lymphocytic choriomeningitis of monkeys and mice produced by a virus encountered in studies of the 1933 St. Louis encephalitis epidemic". Public Health Reports 49: 1010-1027, 1934.
- 4- Pfau CJ, Bergold GH, Casals J, Johnson KM, Murphy FA, Pedersen IR, Rarols WE, Rowe WP, Webb PA, Weissenbacher MC. "Arenaviruses". Intervirology 4: 207, 1974.
- 5- Fenner F. Classification and nomenclature of viruses. Second report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Intervirology 7: 1, 1976.
- 6- Compans RW and Bishop DHL. Biochemistry of Arenaviruses. Current Topics in Microbiology and Immunology. 114: 153-172, 1985.
- 7- Bishop DHL. "Arenaviruses have ambisense S RNA". Med. Microbiol. Immunol. 175: 61-62, 1986.

- 8- Casals J, Buckley SM, Cedeno R. "Antigenic Properties of the arenaviruses". Bull WHO 52: 421-427, 1975.
- 9- Romanowsky V, Baro NI, Remorini PG, Grau O. " Genetic reassortment between Junin and LCM arenaviruses"
VII International Virology Congress, Edmonton , Canada. Abst.:
OP 3.11
- 10- Sabattini MS, Barrera Oro JG, Maiztegui JI, Fernandez D, Contigiani MS., Diaz E. Aislamiento de un arenavirus relacionado con el de la coriomeningitis linfocítica (LCM) a partir de un Mus musculus capturado en zona endémica de FHA. Rev. Asoc. Argent. Microbiol. 2: 182, 1970.
- 11- Howard CR, Lewicki H, Allison L, Salter M, Buchmeier MJ.
Properties and Characterization of monoclonal antibodies to Tacaribe virus. J. Gen. Virol. 66: 1383-1395, 1985.
- 12- Damonte EB, Mersich SE, Candurra RA y Coto CE. Cross reactivity between Junín and Tacaribe viruses as determined by neutralization test and immunoprecipitación. Med. Microbiol. Immunol. 175: 85-88, 1986.
- 13- Mims CA. The meaning of persistent infections in nature.
Bull WHO Vol 52: 747-751, 1975.
- 14- Gregg MB. Recent outbreaks of lymphocytic choriomeningitis in the United States of America. Bull WHO 52: 549-553, 1975.

- 15- Lehman-Grube F, Martinez Peralta L, Bruns M, Kohler J.
"Persistent infection of mice with lymphocytic choriomeningitis virus". *Comprehensive Virology* 18: 43-103, 1983.
- 16- Oldstone MBA. Immunotherapy for virus infection. *Currents Topics in Microbiology and Immunology* 134:211-228, 1987.
- 17- Francis SJ, Singh MK, Oldstone MBA and Southern PJ. Analysis of lymphocytic choriomeningitis virus gene expression in acutely and persistently infected mice.
Med. Microbiol. Immunol. 175: 105-108, 1986.
- 18- Mc Cormick JB. Epidemiology and control of Lassa Fever. In *arenaviruses Biology and Immunotherapy*. MBA Oldstone (eds). *Currents Topics in Microbiology* 134: 69-78, 1987.
- 19- Walter WC, Wulff H, Lange JV, Murphy FA. "Comparative pathology of Lassa virus infection in monkeys, guinea pigs and Mastomys natalensis". *Bull WHO* 52: 523-534, 1985.
- 20- Winn WC, Murphy FA. "Tamiami virus infection in mice and cotton rats". *Bull WHO* 52: 501-506, 1975.
- 21- Webb PA, Justines G, Johnson KM. Infection of wild and laboratory animals with Machupo and Latino viruses. *Bull WHO* 52: 493-501, 1975
- 22- Kuns MC. Epidemiology of Machupo virus infections. II Ecological and control studies of hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 14: 813-816, 1965.

- 23- Arribalzaga RA. Una nueva enfermedad epidémica a germen desconocido. Hipertemia nefrotónica, leucopenia y enantemática. El día médico 27: 1205-1209, 1955.
- 24- Parodi AS, Greenway DJ, Ruggiero HR, Rivero E, Frigerio MJ, Metler NR. "Sobre la etiología del brote epidémico de Junín". El día médico 30: 2300-2302, 1958.
- 25- Pirotsky I. Virosis hemorrágica del noroeste bonaerense. (Endemico-epidémica, febril, enantemática y leucopénica). Orient. Méd. 8: 171, 1958.
- 26- Parodi, AS, de la Barrera JM, Ruggiero R, Greenway DJ, Terga M, Mettler E, Boxaca MC y Frigerio MJ. Los reservorios naturales de la Fiebre Hemorrágica de la Provincia de Buenos Aires. Prensa Médica Argentina 48: 2321-2323, 1959.
- 27- Maiztegui JI. Clinical and epidemiological patterns of AHF. Bull WHO 52: 576, 1975.
- 28- Enría D, Franco SG, Ambrosio A, Vallejos D, Lewis S, Maiztegui J. Currents states of the treatment of Argentine Hemorrhagic Fever. Med. Microbiol. Immunol. 175:173-176, 1986.
- 29- Maiztegui JI, Fernandez NJ, Damilano AJ. Efficacy of immune plasma in treatment of Argentina Hemorrhagic Fever and asociation between treatment and late neurological syndrome. Lancet VIII: 1216-1217, 1979.

- 30- Weissenbacher MC, Sabattini MS, Avila MM, Sangiorgio PM, Sensi MRF de, Contigiani MS, Levis SC, Maiztegui JI. Junín virus activity in two rural populations of the Argentine Hemorrhagic Fever (AHF) Endemic Area".
Journal of Medical Virology 12: 273-280, 1983.
- 31- Briggiler A, Maiztegui JI, Enría D, Feuillade MR. Contagio interhumano e infección clínica con virus Junín en matrimonios residentes en el área endémica de FHA. Medicina (Bs As) 47: 564 (Abs), 1987.
- 32- Weissenbacher MC, Giela ME, Sabattini MS, Maiztegui JI, Coto CE, Frigerio MJ, Cossio PM, Rabinovich A, Barrera Oro JG. Inapparent infections with Junín virus among laboratory workers.
J. infectious Disease 137: 309-313, 1978.
- 33- Maiztegui JI, Sabattini MS. Extensión progresiva del área endémica de Fiebre Hemorrágica Argentina . Medicina (Buenos Aires) 37 Supl 3: 162-166, 1977.
- 34- Maiztegui JI, Feuillade MS, Briggiler A.
Progressive extension of the endemic area and changing incidence of Argentine Hemorrhagic Fever. Med. Microbiol. Immunol. 175: 149-152, 1986.
- 35- Sabattini MS, Gonzalez de Ríos LE, Díaz G, Vega VR. Infección natural y experimental de roedores con virus Junín.

- Medicina (Bs. Aires) 37: 149-161, 1977.
- 36- Sabattini, Contigiani MS. Ecological and Biological factors influencing the maintenance of arenaviruses in nature with special reference to the agent of Argentine Hemorrhagic Fever. International Symposium on Tropical arboviruses and Hemorrhagic Fevers. Academia Brasileira de Ciencias, Rio de Janeiro, 251-262, 1981.
- 37- Ruggiero HR, Parodi AS, Greenway DJ, de la Barrera JM, Yerga M, Mettler N, Boxaca MC. Consideraciones sobre el hallazgo de virus de la Fiebre Hemorrágica epidémica en roedores de zonas epidémicas y no epidémicas de la Pcia. de Buenos Aires. Prensa Médica Argentina 46: 2009, 1959.
- 38- Weissenbacher MC, Callelo MA, Carballal G, Planes N, de la Vega MT, Kravetz F. "Actividad del virus Junín en humanos y roedores de áreas no endémicas de la Pcia. de Buenos Aires". Medicina (Bs. As.) 45: 263-268, 1985.
- 39- Kravetz FO. (1977) "Ecología y control de reservorios". Ciencia e investigación. 33(7-10): 235-242.
- 40- Crespo JA. "Ecología de una comunidad de roedores silvestres en el Partido de Rojas, provincia de Buenos Aires". Rev. Mus. Arg. Cien. Nat. Ecol. 1(3): 79-134, 1966.
- 41- De Villafañe G, Kravetz FO, Donadio O, Persich RE, Kencher L, Torres MP, Fernandez N. "Dinámica de las comunidades de roedores

- en agroecosistemas pampásicos. *Medicina* 37: 128-138, 1977.
- 42- Kravetz FO, Persich RE, Zuleta GA, Calello MA, Weissenbacher MC. Distribution of Junín virus and its reservoirs. A tool for Argentine Hemorrhagic Fever risk. Evaluation in non-endemic areas. *Interciencias* 11: 185, 1986.
- 43- Martínez Peralta LA, Cossio PM, Sabattini MS, Maiztegui JI, Arana RM, Laguens RP. "Ultrastructural, Immunohistochemical and Virological studies in organs of Calomys musculinus infected with Junín virus by natural routes". *Medicina (Buenos Aires)* 39: 213-217, 1979
- 44- Vitullo AD, Hodara VL, Merani MS. " Effect of persistent infection with Junín virus on growth and reproduction of its natural reservoir Calomys musculinus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 37: 663-669, 1987.
- 45- Weissenbacher MC, Damonte EB. "Fiebre Hemorrágica Argentina". *Adel. Microbiol. Enf. Infecc.* 2: 119-143, 1983.
- 46- Lampuri JS, Vidal MC, Coto CE. "Respuesta del Calomys musculinus a la infección experimental con virus Junín". *Medicina (Buenos Aires)* 42: 61-66, 1982.
- 47- Alché L, Coto C. "Antigenic variants of Junín virus isolated from infected Calomys musculinus". *Arch. Virol.* 90: 343-348. 1986.
- 48- Laguens RM, Lampuri JS, Coto CE, Laguens RP. "Patología de la in-

- fección persistente del Calomys musculinus con una cepa atenuada del virus Junín". Medicina (Bs. As.) 42: 273-279, 1982.
- 49- Lampuri JS, Coto CE. Responsabilidad de las variantes serológicas en la infección crónica con virus Junín. Medicina (Buenos Aires) 42: 273-278, 1983.
- 50- Coulombié FC, Coto CE. "Efecto de la ciclofosfamida en el desarrollo de la infección de Calomys musculinus con virus Junín". Medicina (Bs. Aires) 45: 487-488, 1985.
- 51- Coulombié FG, Laguens RM, Coto CE. Administration of antithymocyte serum modified the response of Calomys musculinus to Junín virus infection". Intervirology 25: 56-60, 1986.
- 52- Coulombié FC , Alché LE, Lampuri JS, Coto CE. Role of Calomys musculinus peritoneal macrophages in age-related resistance to Junín virus. J. Med. Virol. 18: 289-298, 1986.
- 53- Laguens RM, Lampuri J, Candurra N, Coto CE, Laguens RP. "Producción de meningoencefalitis en el Calomys musculinus adulto por la infección por vía nasal con la cepa XJ-Clon 3 de virus Junín. III Congreso Argentino de Microbiología. Bs. As., 1982. Resumen 6-176
- 54- Lampuri JS, Laguens RM, Coto CE, Laguens RP. "Estudios sobre la transmisión del virus Junín en Calomys musculinus infectados experimentalmente con al cepa XJ-Clon 3". IV Congreso Argentino de Microbiología, Buenos Aires, Res N°B51, 1985.

- 55- Weissenbacher MC, Calello MA, Merani MS, Mc Cormick JB, Rodriguez M. Therapeutic effect of the antiviral agent ribavirin in Junin virus infection of primates. *J. of Med. Virol.* 20: 261-267, 1986.
- 56- Ecology and Control of rodents of Public Health Importance. Report WHO N°553, 1974.
- 57- Busch M, Kravetz FO, Persich RE, Zuleta GA. Propuestas para un control ecológico de la FHA a través del manejo del habitat". *Medicina (Buenos Aires)* 44: 34, 1984.
- 58- Vanella JM. Epidemiología de la FHA. *Semana Médica* 125: 1502 , 1964.
- 59- Bianchi NO, Reig OA, Molina OJ, Dulout FN, Cytogenetics of the South American Akodon Rodents (Cricetidae). I A. Progress report of Argentinean and Venezuelan forms. *Evolution* 25: 724-736, 1971.
- 60- Lizarralde MS, Bianchi ND, Merani MS. "Cytogenetics of South American Akodon Rodents (Cricetidae)". VII Origin of sex chromosome polymorphism in Akodon azarae". *Cytología* 47: 183-193, 1982.
- 61- Bianchi ND, Merani MS. "Chromosome I polymorphism and viability in Akodon (Rodentia, Cricetidae). *Ecología y Genética de la Especiación animal*. OA Reig Ed. Equinoccio. Universidad Simon Bolivar, Caracas : 211-238, 1980.

- 62- Mammal species of the world. A taxonomic and geographic reference. Ed. Haddock JH, Kinman KE and Koeppl JW, 1982.
- 63- Cabrera A, "Catálogo de los mamíferos de América del Sur". Rev. Mus. "Bernardino Rivadavia", Zool 4: 1-732, 1961.
- 64- Hershkovitz PH. "Evolution of neotropical cricetidae rodents (muridae) with special reference to the Phyllotine group". Fieldiana, Zoológica 46: 1-524, 1962.
- 65- Vitullo A, Kajón AE, Persich R, Zuleta G, Merani MS, Kravetz FC. Caracterización citogenética de tres especies de roedores (Rodentia, Cricetidae) de la República Argentina. Rev. Mus. Arg. "Bernardino Rivadavia", Zool. 13: 481-488, 1984.
- 66- De Villafañe G. "Reproducción y crecimiento de Akodon azarae azarae. Historia Natural 1: 193-204, 1981.
- 67- Merani MS, Lizarralde MS. "Akodon molinae (Rodentia, Cricetidae) a new laboratory animal: breeding, management and reproductive performance". Laboratory Animals 14: 129-131, 1980.
- 68- Merani MS, Vercellini O, Acuña AM, Horgan C, Roldan ERS. "Growth and Reproduction of two species of Akodon and their hybrids". The Journal of Experimental Zoology 228: 527-535, 1983.
- 69- Hodara VL, Kajón AE, Quintans C, Montoro L, Merani MS. Parámetros métricos y reproductivos de Calomys musculinus y C. callidus (Rodentia, Cricetidae). Rev. Mus. Arg. "Bernardino Rivadavia".

- Zool., 47: 453-459, 1984.
- 70- Cresta B, Padula P, Martinez Segovia ZM, Biological Properties of Junin virus protein. I Identification of the immunogenic glucoprotein. Intervirology 13: 284-288, 1980.
- 71- Kenjon RH, Mc Kee KT, Maiztegui JI, Green DE, Peters CJ. Heterogenicity of Junin virus strains. Med. Microbiol. Immunol. 175: 169-172, 1986.
- 72- Guerrero LB de, Weissenbacher MC, Parodi AS. Inmunización con una cepa atenuada de virus Junin. Inmunización de cobayos. Medicina (Buenos Aires) 29: 1-5, 1969.
- 73- Ruggiero HA, Cintora F, Gonzalez Cambaceres C, Maglio F, Milani H, Magnoni C, Astarloa L, Perez Izquierdo F. Inmunización contra la Fiebre Hemorrágica Argentina con una cepa atenuada del virus Junin. Análisis de 636 vacunados. Prensa Médica Argentina 61: 231-240, 1974
- 74- Ruggiero HA, Magnoni C, Guerrero LB de, Milani HA, Perez Izquierdo F, Milani HL, Weber EL. Persistence of antibodies and clinical evaluation in volunteers 7 to 9 years following the vaccination against Argentine Hemorrhagic Fever. J. Med. Virol. 7: 227-232, 1981.
- 75- Avila MM, Samoilovich SR, Weissenbacher MC. "Infección del cobayo con la cepa atenuada del virus Junin XJ-C1₃". Medicina (Buenos Ai-

- res) 39: 597, 1979.
- 76- Boxaca MC, Guerrero LB de, Elsner B, Avagnina A, Gómez MM, López S. "Efecto de la inoculación intracerebral del virus Junín". Medicina (Buenos Aires) 42: 284, 1982.
- 77- Boxaca MC, Guerrero LB de, Weber EL, Malumbres E. "Protección inducida en cobayos por la variante XJO del virus Junín". Medicina (Buenos Aires) 41: 25, 1981
- 78- Boxaca MC, Gómez MM, Malumbres E, Guerrero LB de. "Congenital guinea pig infection with attenuated Junín virus strains". Intervirology 23: 190, 1985.
- 79- Malumbres E, Berría MI, Boxaca MC, Lascano F, Guerrero LB de. "Persistencia del virus Junín en cobayos inoculados por vía intracerebral". III Congreso Argentino de Microbiología, Resumen N°6 183. Buenos Aires, 1982.
- 80- Rabinovich RD, Boxaca MC, Lascano F. "Junín virus persistence in mice". Acta Viroológica 31: 86-90, 1987.
- 81- Carballal G, Oubiña JR, Molina FC, Nagle C, de la Vega MT, Videla C, Elsner B. "Intracerebral infection of Cebus apella with the XJ-Clone 3 strain of Junín virus". Journal of Medical Virology 21: 257-268, 1987.
- 82- Ambrosio AM, Levis S, Maiztegui JI. "Aislamiento de la cepa Candid 1 de virus Junín de cobayos lactantes por cocultivo sobre

- células 'Vero". I Congreso Argentino de Virología. Res. N°80, Bs. As. 1983.
- 83- Lupton HW, Cole F, Moe J, Green D, McKeen K, Donovan J, Kuehne A, French G, Johnson K, Eddy G, Barrera Oro J. "Safety and efficacy of a live attenuated vaccine against Argentine Hemorrhagic Fever". 6th. International Congress of Virology, Sendai, Japan, 1984.
- 84- Barrera Oro JG, McKee A, Kuehne J, Moe O, Green D, Cole F, Lupton H. "Preclinical trials of a live, attenuated Junín virus vaccine in Rhesus macaques". Symposium on vaccines and vaccination. Institute Pasteur, Paris, France, June 1985.
- 85- McKee K, Green O, Mahlandt B, Bagley L; Lyerly W, Peters C, Eddy G. "Infección de monos Cebus con virus Junín". Medicina (Bs. Aires) 45: 144-151, 1985.
- 86- McKee K, Barrera Oro JG, Kuehne A, Spisso J, Mahlandt B. " Immunogenicity and protective efficacy of a live attenuated Argentine Hemorrhagic Fever Vaccine in primates". International Congress for Tropical Medicine and Malaria, Calgary, Alberta, Canada, September 1984 .
- 87- Barrera. Oro JG, McKee AI, Kuehne BC, Mahlandt BC, Cole F, Lupton H. "Vacuna del virus Junín atenuado Candid 1. Inmunogenicidad y eficacia protectora de animales de laboratorio". II Congreso Argentino

de Virología, Córdoba, pag. 58, 1986.

- 88- Mac Donald C, McKee K, Briggiler A, Feinsad F, Manill I, Gibbs P, Peters C, Maiztegui JI, Barrera Oro JG. "Ensayos iniciales en humanos de una vacuna viva atenuada contra FHA (Candid 1). Semio-
logía y Laboratorio clínico". II Congreso Argentino de Virología, Córdoba, pag. 55, 1986.
- 89- Barrera Oro JG, Mac Donald C, Kuehne AI, Mahlandt BC, Spisso J, Meegan IM, Peters CI, Lupton HW. "Ensayos iniciales en humanos de una vacuna viva atenuada contra Fiebre Hemorrágica Argentina (Candid 1)". II Congreso Argentino de Virología, Córdoba, p. 56 , 1986.
- 90- Kenyon RH, Barrera Oro JG, Mac Donald C, Meegan J, Peters CJ. "Lymphocyte transformation assays for Junín virus (AHF). Segunda Conferencia Internacional sobre el impacto de las enfermedades vi-
rales en el desarrollo de países de Latinoamérica y de la región del Caribe. Abst P.E.4, pag. 170, 1988.
- 91- Downs WG, Anderson CR, Spence L, Aitken THG, Greenhal AH. "Tacaribe virus, a new agent isolated from Artibeus bats and mosquitoes in Trinidad, West Indies". Am. J. Trop. Med. Hyg. 12: 640-646, 1963.
- 92- Price JL. Serological evidence of infection of Tacaribe virus and arboviruses in Trinidad bats.

- Am.J. Trop. Med. Hyg. 27: 162,1978.
- 93- Weissenbacher MC, Coto CE, Calello M. "Cross protection between Tacaribe complex viruses. Presence of neutralizing antibodies against Junín virus (AHF) in guinea pigs with Tacaribe virus". Intervirology 6: 42, 1975/76.
- 94- Weissenbacher MC, Coto CE, Calello MA, Rondinone SN, Damonte E, Frigerio MI. "Cross protection in non-human primates against AHF". Infection and Immunity 35: 425, 1982.
- 95- Carballal G, Calello MA, Laguens RP, Weissenbacher MC. Tacaribe virus: A new alternative for Argentine Hemorrhagic Fever vaccine . J. Med. Virol. 23: 257-261, 1987.
- 96- Samoilovich S, Frigerio M, Weissenbacher MC. "Inocuidad e inmunogenicidad del virus Tacaribe en el primate Callithrix jacchus". I Congreso Argentino de Virología, Res N°69, Buenos Aires, 1983.
- 97- Parodi AS, Guerrero LB de, Weissenbacher MC. "Fiebre Hemorrágica Argentina. Vacunación con virus inactivado". Ciencia e Investigación 21: 132, 1965.
- 98- Martinez Segovia Z, Arguelles G, Tokman A. "Capacidad antigénica del virus Junín inactivado mediante oxidación fotodinámica". Medicina (Bs. Aires) 40: 156, 1980.
- 99- D'Aiutolo AC, Lampuri IS, Coto CE. "Reactivación del virus Junín

- inactivado por luz ultravioleta". XXIV Reunión Científica de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica. Medicina (Bs. Aires) 39: 801, 1979.
- 100- Barrera Oro JG, Girola RA, Gutman Frugone L. "Estudios Inmunológicos con virus Junín". I. Inmunidad adquirida por cobayos inoculados con virus inactivado por formol". Medicina (Buenos Aires) 27: 279, 1967.
- 101- Carballal G, Videla C, Oubiña JR, Frigerio M. "Antígenos inactivados de virus Junín: Estudio de su capacidad inmunizante para cobayos". Medicina (Bs. Aires) 45: 153, 1985.
- 102- Parodi AS, Coto CE, Boxaca M, Lajmanovich, Gonzalez S. "Characteristics of Junín virus". Arch. Ges.Virus for sch.19: 393-402, 1966.
- 103- Oldstone MBA, Sinha YA, Blaunt P, Tishon A, Rodriguez M, von Wedel R, Lampert PW. "Virus induced alterations in homeostasis: alterations in differentiated functions of infected cells in vivo. Science 218: 1125-1127, 1982.
- 104- Samoilovich SR, Carballal G, Weissenbacher MC. "Protection against a pathogenic strain of Junín virus by mucosal infection with an attenuated strain". Am. J. Trop.Med. Hyg. 32: 825-828, 1983.
- 105- Hashini A, Carruthers MM, Wolf P and Reiner MA, 1966. Congenital infections with reovirus. J. Exp. Med. , 124: 33-45.

- 106- Candurra NA, Damonte EB. "Influence of cellular functions on the evolution of persistent infections with Junín virus. Archives of Virology 86: 275-282, 1985.
- 107- Weissenbacher MC, Calello MA, Quintans CJ, Panisse H, Woyskowsky NM, Zannoli VH. "Junín virus infection in genetically athymic mice". Intervirology 19: 1-5, 1983.
- 108- Calello MA, Rabinovich RD, Boxaca MC, Weissenbacher MC. "Relationship between Junín virus infection of thymus and the establishment of persistence in rodents". Med. Microbiol. Immunol. 175: 109- 112, 1986.
- 109- Montagnon B, Vincent-Falquet JC, and Fanget B. "Thousand litre scale microcarrier culture of Vero cells for killed Polio virus vaccine: Promising results. Develop. Biol. Standard.55: 37, 1984
- 110- Fournier P, Montagnon B, Vincet-Falquet, Ajjon N, Durcker J, Roumiantzeff M. "A new vaccine produced from rabies virus cultivated on Vero cells". Zagren Institute of Public Health Improvements in Rabies. Post-Exposure Treatment. Vodopija, I., Nicholson, KG., Smerdel, S., Bijok, U. eds., pp.115-121, 1985
- 111- Barteling ST, Woortmeyer R. "Formaldehyde inactivation of food-and-mouth disease virus. Conditions for the preparation of safe vaccines. Archive of Virology 80: 103,1984.

- 112- Ramos BA, Coutney RJ, and Rawls WE. "Structural proteins of Pichinde virus". J. Virol. 10: 661-663, 1972.
- 113- Trépanier P, Payment P, Trudel M. "Concentration of human Respiratory Syncytial Virus using ammonium sulphate, polyethylene glycol of hollow fiber ultrafiltration". J. Virol. Methods 3: 201-211, 1981.
- 114- Martínez Segovia ZM and Di Mitri M1, "Junin virus structural proteins". J. Virol. 21: 579-583, 1977.
- 115- Weissenbacher MC, Guerrero LB de, Parodi AS. "Acción en los inmunoseros en la Fiebre Hemorrágica Argentina". Medicina (Buenos Aires) 2: 53-57, 1968.
- 116- Lupton HW, Jahrling PB, Barrera Oro JG, Peters CJ. Cross protection against Machupo virus with Candid 1 live attenuated Junin virus vaccine". Segunda Conferencia Internacional sobre el Impacto de las Enfermedades virales en el desarrollo de países de Latinoamérica y de la Región del Caribe. Resumen N°P.E. 2
- 117- Gonzalez PH, Ponzinibbio C, Laguens RP. "Effect of Polymorphonuclear Depletion on Experimental Argentine Hemorrhagic Fever in Guinea Pigs". J. Med. Virol. 22: 289-297, 1987.
- 118- Peters CJ, Jahrling PB, Lin CT, Kenyon RH, McKee KT, Barrera Oro JG. "Experimental studies of Arenaviral Hemorrhagic Fever". Current Topics in Microbiol. and Immunol. Ed. Oldstone 7-62, 1987.

- 119- Jahrling PB, Peters CJ. " Serology and virulence diversity among Old-World arenaviruses, and the relevance to vaccine development". *Med. Microbiol. Immunol.* 175: 165-167, 1986.
- 120- Bergouignon FX, Saintarailles J, Roux D, Guillon J, Bonicci JF, Fleury H and Henry P. "Prevention de la Poliomyélite vaccin vivant ou tué? . Réflexions à propos de 2 cas de poliomyélite". *Presse Méd.* 13: 2241, 1984.
- 121- Salk J. "One-dose immunization against paralytic Poliomyelitis using a non-infectious vaccine".
Review of Infect. Dis. : 6, 444, 1984.
- 122- Norrby E. "Immunogenicity of vaccine products and neutralizing antibodies". *Concepts in viral pathogenesis II.* Ed. Notkins AL y Oldstone M. Pag. 346-353.
- 123- Ghiringhelli PD, Rivero RV, Pomas, Manzella EM, Baro NI, Rosas M, Grau O. "Molecular cloning and sequencing of Junin virus SRNA". Segunda Conferencia Internacional sobre el impacto de las enfermedades virales en el desarrollo de los países de Latinoamérica y de la Región del Caribe. Res. N°W 45.
- 124- De Mitri MI, Martinez Segovia ZM. Epitopes characterization of main Junin virus antigens. Segunda Conferencia Internacional sobre el Impacto de las Enfermedades Virales en el desarrollo de los países de Latinoamérica y de la Región del Caribe.

- 125- Oubiña JR, Milei J, Bolomo N, Molinolo A, Carballal G. Experimental Argentine Hemorrhagic Fever: Myocardial involvement in Cebus monkey". J. Med. Primatol. 15: 391-397, 1986.
- 126- Dulout FN, Panisse HE, Carballal G, von Guradze HN, De Luca JC, Oubiña JR, Videla C. "Junin virus-induced chromosomal aberrations in the guinea pigs. Synergism between the attenuated strain XJ-Clon 3 and caffeine". Intervirology 24: 193-198, 1985.
- 127- Oubiña JR, Carballal G. Neurotropism of a high passaged XJ strain of Junin virus". J. Med. Virol. 15: 157-161, 1985.
- 128- Reed LJ, Muench HA. A simple method of estimating fifty per cent end points. Am. J. Trop. Hyg. 27: 493, 1938.
- 129- Berría MI, Barrios HA, Lascano EF, Nota NR. Rescue of Junin virus from adult mice by cocultivation procedures. Com. Biol. 2: 255-265, 1986.
- 130- Aramburú R, Hodara VL, Merani MS. "Parámetros métricos y reproductivos de Akodon azarae (Fisher, 1829) de la provincia de Buenos Aires, en condiciones de Bioterio. I Jornadas Argentinas de Mastozoología. Mendoza 26-28 de Septiembre de 1985.
- 131- Lehmann-Grube F, Kallay M, Ibscher B, Schwartz R. Serologic diagnosis of human infections with Lymphocytic choriomeningitis virus: Comparative evaluation of seven methods.

J. Med. Virol. 4: 125-136, 1979.

132- Carballal G, Cossio PM, Rabinovich A, Oubiña JR, Arana RM.

Description of a BHK/21 cell line persistently infected with Junín virus: Its use in diagnostic procedures.

Intervirology 14: 173-179, 1980.

133- Physical space and Technical Procedures for producing Western Equine Encephalomyelitis Vaccine, Inactivated, 1973.

The Merrel- National laboratories. Division of Richardson-Merrel Inc. Swiftwater, Pennsylvania 18370.

134- Bradford Marion. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principles of protein-binding.

Analytical Biochemistry 72: 248-254, 1976.

INDICE DE TABLAS

- 1: Arenavirus y sus reservorios naturales.
- 2: Detección de virus, antígeno viral y anticuerpos en A. azarae lactante inoculado con XJ-Clon 3, vía ic.
- 3: Detección de virus, antígeno viral y anticuerpos en A.azarae lactante inoculado con XJ-Clon 3, vía intranasal.
- 4: Infección experimental de A. azarae adulto con XJ-Clon 3.
- 5: Detección de virus, antígeno viral y anticuerpos en A.dolores lactante inoculado con XJ-Clon 3, vía ic.
- 6: Estudio virológico, inmunohistoquímico y respuesta inmune en A.molinae lactante inoculado con XJ-Clon 3, vía ic.
- 7: Infección experimental de C. callidus con XJ-Clon 3 por vía ic.
- 8: Aislamiento viral de C. callidus lactante inoculado con XJ-Clon 3, vía in.
- 9: Persistencia del virus Junín en C. callidus lactante inoculado vía in a los 2 meses pi.
- 10: Infección experimental de C. callidus adulto por vía in.
- 11: Transmisión horizontal de crias infectadas con XJ-Clon 3 a sus madres.
- 12: Efecto de la temperatura sobre la infectividad de virus Junin (XJ-Clon 3).
- 13: Inactivación de virus Junín (XJ-Clon 3) con dos dosis de formaldehído y concentración por precipitación con PEG o ultracentrifugación.
- 14: Recuperación de XJ-Clon 3 luego de la precipitación con PEG.

15: Inmunogenicidad para ratón adulto de antígenos de XJ-C10n 3 inactivados con formaldehído.

16: Inmunización de cobayos con antígenos inactivados.

INDICE DE FIGURAS

- 1: Area endémica de FHA y distribución geográfica de Akodon azarae, A. molinae, A. dolores y Calomys callidus.
- 2: Infección experimental de A. azarae lactante con XJ-Clon 3, vía ic a los 21 días pi.
- 3: A. azarae lactante inoculado con XJ-Clon 3 vía ic.
- 4: Infección experimental de A. azarae lactante con XJ-Clon 3, vía in.
- 5: Infección de A. molinae lactante con XJ-Clon 3 vía ic.
- 6: Corte de cerebro de A. molinae lactante inoculado con XJ-Clon 3 vía ic.
- 7: C. callidus adulto y lactante.
- 8: Infección de C. callidus lactante vía in.
- 9: Infección de C. callidus lactante inoculado con XJ-Clon 3 vía mucosa a los 21 días pi. Oclusión ocular.
- 10: Infección de C. callidus lactante inoculado con XJ-Clon 3 vía mucosa a los 21 días pi. Lateralización de la marcha.
- 11: Infección de C. callidus lactante inoculado con XJ-Clon 3 vía mucosa a los 21 días pi. Retraso en el crecimiento.
- 12: Infección experimental de C. callidus lactante via in. Curvas de peso de animales infectados y normales.
- 13: Calomys callidus hembra infectado con XJ-Clon 3 por contacto con sus crías. A los 2 meses post-contacto.
- 14: Calomys callidus hembra infectado con XJ-Clon 3 por contacto con sus crías. A los 7 meses post-contacto.

15: Inactivación de la cepa XJ-Clon 3 con formaldehído a 0°C.

16: Antígenos inactivados con FA.