

Salaün L, Mérien F, Gurianova S, Baranton G, Picardeau M. Application of multilocus variable-number tandem-repeat analysis for molecular typing of the agent of leptospirosis. *J Clin Microbiol.* 2006;44:3954-62.

Szonyi B, Agudelo-Flórez P, Ramírez M, Moreno N, Ko AI. An outbreak of severe leptospirosis in capuchin (*Cebus*) monkeys. *Vet J.* 2011;188:237-9.

Evidencia serológica y genética de la presencia de virus emergentes en roedores urbanos y rurales de Antioquia, Colombia*

Andrés Londoño¹, Víctor H. Quiroz¹, Javier Díaz², Piedad Agudelo³, Margarita Arboleda³, Silvana Levis⁴, Juan D. Rodas¹

¹ Grupo de Investigación en Ciencias Veterinarias, Centauro, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

² Grupo de Inmunovirología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

³ Instituto Colombiano de Medicina Tropical, CES, Sabaneta, Colombia

⁴ Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas, Pergamino, Argentina

Introducción

En las últimas tres décadas se han descubierto más de 20 arenavirus y 15 hantavirus en el continente americano. Vale la pena mencionar que otros hantavirus ya eran conocidos desde hace mucho tiempo en los continentes asiático y europeo, por lo que estos agentes descubiertos más recientemente en Norteamérica, Centroamérica y Suramérica han sido reconocidos como “virus emergentes” (Lee, 1990; Schmaljohn, 2007; OPS, 2009).

Los agentes de estos dos grupos, aunque asociados con diferentes formas clínicas (los arenavirus son causa de fiebres hemorrágicas en Suramérica y, los hantavirus, de un síndrome pulmonar o cardiopulmonar), comparten semejanzas estructurales y biológicas, y son principalmente transmitidos por roedores silvestres y, en ocasiones, por algunos urbanos (Snell, 2003).

Entre el 2004 y 2006, se demostró la presencia de anticuerpos por una prueba serológica (ELISA) contra el virus “sin nombre” (prototipo de los hantavirus en Norteamérica) en sueros humanos y de roedores capturados en el departamento de Córdoba (13,5 % y 2,1 %, respectivamente) (Máttar, 2004; Alemán, 2006). Coincidentemente, en el 2006 se presentó en el Urabá antioqueño un brote de síndrome pulmonar humano que fue inicialmente “confundido” con infección por hantavirus y, posteriormente, diagnosticado como *Rickettsia rickettsii* (Ministerio de la Protección Social, 2006), lo que estimuló nuestra curiosidad por investigar la posibilidad de etiología viral en síndromes hemorrágicos y respiratorios “indiferenciados” detectados en la mencionada zona.

Materiales y métodos

En agosto del 2006 recibimos apoyo de Colciencias para adelantar un proyecto de investigación en el tema (*Search for serological and genetic evidence of emergent and re-emergent agents in humans and urban and rural rodents in Antioquia, Colombia**) y, en el 2007, iniciamos capturas de roedores en las poblaciones de Apartadó, Turbo y Necoclí, utilizando trampas Sherman y Tomahawk con cebo de mantequilla de maní, hojuelas de avena y esencia de vainilla, según las prácticas seguidas por Mills *et al.* (Mills, 1998b).

Simultáneamente, se captaron 221 muestras de suero sanguíneo de humanos con síndromes febriles indiferenciados (negativos para malaria), en fase aguda, presencia de signos clínicos de enfermedad, y en fase convaleciente, dos semanas después de la desaparición de los síntomas, cuando se esperaba encontrar respuesta inmunitaria asociada con la curación de la enfermedad.

Posteriormente, se estandarizaron dos pruebas serológicas (ELISA) para la búsqueda de anticuerpos contra hantavirus en roedores y humanos. La primera fue suministrada por Tony Schountz de *Northern Colorado University* (Estados Unidos) y detecta reactividad contra una proteína recombinante del hantavirus sin

* El presente resumen representa parte del informe técnico final del proyecto aquí mencionado y no ha sido publicado en su totalidad en ningún otro medio visual o escrito. No obstante, algunos de los resultados de esta investigación ya han sido aceptados para publicación en la revista *Vector-borne and zoonotic diseases*, y su resumen puede ser visto en línea de Pubmed (Londoño *et al.*, 2011).

nombre (VSN), principal representante de los hantavirus del Nuevo Mundo en Norteamérica (Schountz, 2007); la segunda prueba fue suministrada por Silvana Levis del Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas de Pergamino, Argentina. Esta prueba ELISA detecta anticuerpos contra el virus Maciel (Mac), como representante de los hantavirus suramericanos (Londoño *et al.*, 2011). Igualmente, contamos con una prueba molecular (RT-PCR anidada) para la detección de secuencias del genoma de hantavirus en muestras de tejidos de animales seropositivos, la cual fue generosamente compartida por Antonio Tenorio del Instituto de Salud Carlos III (España), y permite detectar tanto hantavirus tanto del Viejo como del Nuevo Mundo, los cuales pueden llegar a tener hasta 50 % de divergencia en sus secuencias.

Resultados

Se capturaron y muestrearon 354 roedores, entre urbanos o periurbanos (124 *Rattus rattus*, 24 *Rattus norvegicus* y 71 *Mus musculus*) y rurales o silvestres (109 *Zygodontomys cherrei*, 22 *Proechimys* sp. y 4 *Heteromys* sp.). La clasificación taxonómica de estos animales se llevó a cabo en el Laboratorio de Mastozoología del Instituto de Biología de la Universidad de Antioquia. La mayoría de los roedores, tanto urbanos como silvestres, fueron capturados en el municipio de Necoclí (107 de 119 y 130 de 135, respectivamente; total, 237 de 354, 67 %), seguido por Turbo (104 de 219 y 5 de 135; total, 109 de 354, 31 %) y Apartadó (8 de 119 y 0 de 135; total, 8 de 354, 2 %).

De todos los animales se recolectaron muestras de sangre y de tejidos (bazo, hígado, pulmón y riñón). Todos los sueros de los animales capturados fueron probados con ELISA del VSN (prueba de hantavirus norteamericanos); de éstos, 14 fueron positivos y todos silvestres (*Zygodontomys cherrei*, pertenecientes a la subfamilia Sigmodontinae), y los datos fueron corroborados con ELISA Mac (prueba de hantavirus suramericanos). A todos los *Zyg* seropositivos para hantavirus, se les extrajo ARN de tejido pulmonar (órgano blanco donde persisten los hantavirus) y el ARN fue probado por RT-PCR anidado. Los resultados de esta prueba mostraron que de los 14 roedores seropositivos, 11 tenían secuencias genéticas del virus, de las cuales, ocho fueron enviadas a secuenciar y se obtuvieron seis productos suficientemente claros para ser utilizados en un análisis filogenético (comparación de secuencias genéticas entre hantavirus de todo el mundo).

Dado que no se presentó discordancia entre las dos pruebas serológicas, se decidió utilizar sólo la prueba ELISA con el Ag Maciel (hantavirus suramericanos), para probar los sueros humanos. Se identificaron dos individuos positivos, uno de ellos procedente de la zona urbana del municipio de Apartadó dedicado a oficios varios, y el segundo, procedente de zona rural del corregimiento de Las Changas en el municipio de Necoclí, y dedicado a la agricultura. No se encontraron secuencias genéticas de hantavirus en pacientes humanos.

Discusión

Los resultados del análisis genético muestran una gran cercanía genética entre los virus detectados en roedores de Colombia y otros previamente reportados en Venezuela y Panamá, en donde se presentaron brotes humanos de síndrome pulmonar por hantavirus, en el año 2000 (península de Azuero) (Vincent, 2000).

Este estudio, además de aportar evidencia serológica, se convierte en el primero en aportar prueba genética de la presencia de hantavirus en el territorio colombiano. Además, se propone a *Z. cherriei* como el posible reservorio del "nuevo" hantavirus colombiano, por ser ésta la única especie de roedores en la que se demostró la circulación del mismo, tanto por pruebas serológicas como moleculares.

Vale la pena mencionar que el roedor seropositivo en nuestro estudio es también el reservorio del hantavirus panameño "Calabazo" (Salazar-Bravo, 2004; Weksler, 2006), el cual, de paso, muestra la más cercana identidad genética con el detectado en Necoclí, lo que lo convertiría en el hantavirus más próximo.

También, vale la pena aclarar que el mayor número de capturas en el municipio de Necoclí se explica porque después de ocho meses de trabajo de campo, éste fue identificado como el único de los tres municipios que ofrecía un buen número de capturas, con diversidad de especies silvestres (uno de los principales intereses de nuestro trabajo) y variados hábitats, razón por la cual se decidió hacer las seis

salidas restantes sólo en esta zona. Asimismo, el mayor número de animales silvestres capturados en esta región, a la postre los únicos “infectados” con el hantavirus detectado, explicaría la mayor cantidad de serologías positivas proveniente de este municipio.

Las serologías positivas para hantavirus en casos humanos febriles en este estudio, fueron sólo de 1 % (2 de 220) y no se pudieron relacionar con la presentación clínica actual. Sin embargo, es importante resaltar que uno de los pacientes seropositivos reside en el corregimiento Las Changas de Necoclí, sitio donde se encontraron los roedores positivos. La diferencia en los resultados entre este trabajo y los anteriores puede explicarse en parte por la población objeto de estudio en cada uno; Máttar *et al.* Máttar (2004) utilizaron muestras de 88 personas sanas, todos trabajadores de zonas rurales, mientras que, en el presente estudio, se trató de pacientes febriles negativos para malaria, de los cuales, sólo 36,8 % (81 pacientes) vivía en ambientes rurales y únicamente 16% (13 de 81 pacientes rurales) se dedicaba a la agricultura. Otras razones para las diferencias encontradas pueden estar en el uso de pruebas serológicas diferentes y en las zonas de estudio, las que, aunque vecinas, presentan características ecológicas diferentes.

En los países vecinos, como Venezuela, hay reportes de 1,7 % de serologías positivas en 1.380 personas sanas distribuidas a lo largo del país y prácticamente no se han descrito casos de la enfermedad (Rivas, 2003). Otros estudios muestran la circulación de dos hantavirus dentro de ese país (Caño Delgadito y Maporal), los cuales no se han asociado con sintomatología clínica (Fulhorst, 1997; Milazzo, 2002). En Perú, hay sólo un estudio de hantavirus, denominado HTN-007 y obtenido a partir de muestras de tejido de un roedor silvestre seropositivo de la especie *Oligoryzomys microtis* (Powers, 1999), y hasta la fecha no se cuentan con reportes en Ecuador. Esto podría dar a entender que las infecciones por hantavirus podrían no ser un problema de salud pública tan importante para el norte de Suramérica como lo es para el Cono Sur; también, podría suceder que se esté presentando un subregistro de casos por deficiencias en la vigilancia epidemiológica y deficiencias en técnicas diagnósticas y, finalmente, podría explicarse por el desconocimiento de sus efectos clínicos sobre nuestra población, así como una confusión con otros síndromes similares más comúnmente esperados en nuestro medio (dengue, leptosporosis, rickettsiosis).

Otro panorama se observa en los demás países del sur (Argentina, Uruguay, Paraguay y Chile) y centro de Suramérica (Bolivia), donde se lleva a cabo una vigilancia activa y se tiene bien definida la ecoepidemiología de los reservorios presentes en cada zona y la descripción de nuevos hantavirus, entre los que se encuentran especies patógenas y no patógenas.

A propósito de lo anterior, un caso que podría generar curiosidad en el concierto suramericano es el de Bolivia, donde se maneja un buen registro ecoepidemiológico de este tipo de enfermedades (transmitidas por virus de roedores) (Hjelle, 1996; Padula, 2000; Carroll, 2005), aunque su infraestructura en salud no dista mucho de la de Colombia. La razón para la mejor vigilancia de este tipo de entidades infecciosas se puede encontrar en otros antecedentes históricos, como lo es el brote de fiebre hemorrágica provocado por el arenavirus Machupo, en 1959. Dicho brote se relacionó con el aumento de su reservorio natural, el roedor *Calomys callosus* y, gracias a la colaboración de los *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) de Atlanta, los bolivianos recibieron apoyo científico y se generó un mejor conocimiento sobre el origen de esta clase de enfermedades y se propició la adopción de medidas de control para evitar la diseminación de otros agentes transmitidos por roedores (Johnson, 1965; Mercado, 1975).

Un caso similar a este, lo podríamos encontrar en nuestro vecino país de Panamá, donde una epidemia a finales del siglo XX les instó a buscar apoyo logístico de Estados Unidos y definir tanto los reservorios más probables para el hantavirus causante de dicho brote, como los factores de riesgo comprometidos en el suceso (Vincent, 2000).

Conclusiones

Queda para el futuro hacer una caracterización más completa de este “supuesto” nuevo agente y determinar su distribución geográfica y su capacidad para infectar y producir enfermedad en los humanos. Además, sería importante hacer estudios similares en otras regiones del país (Llanos Orientales, Villavicencio, Sucre, Valle, etc.) y establecer para esto una red de cooperación y trabajo conjunto. Sabemos que algunos

investigadores de estas regiones están adelantando sus propios trabajos, pero aún no conocemos sus resultados y creemos que podrían usar algunos de nuestros recursos técnicos para mejorar el conocimiento de las infecciones por agentes transmitidos por roedores en el contexto nacional.

Hasta donde sabemos, estos resultados representan la primera prueba serológica de circulación de hantavirus en roedores del departamento de Antioquia y la primera detección de secuencias genéticas (presumiblemente) de hantavirus en Colombia, y abre las puertas para hacer la caracterización de un hantavirus, posiblemente nuevo, el cual podría utilizarse para preparar reactivos autóctonos para la generación de pruebas serológicas más específicas y sensibles, aumentando así, posiblemente, el número final de humanos serorreactivos tanto en Antioquia como, en un futuro próximo en estudios ecoepidemiológicos y clínicos más amplios, en todo el territorio colombiano.

Referencias

- Alemán A, et al.** Primera evidencia serológica de infección por hantavirus en roedores, en Colombia. *Rev Salud Pública.* 2006;8:1-12.
- Carroll D, et al.** Hantavirus pulmonary syndrome in Central Bolivia: Relationships between reservoir hosts, habitats, and viral genotypes. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;72:42-6.
- Fulhorst CF, et al.** Isolation, characterization and geographic distribution of Caño Delgado virus, a newly discovered South American hantavirus (family *Bunyaviridae*). *Virus Res.* 1997;51:159-71.
- Hjelle B, Torrez-Martínez N, Koster F.** Hantavirus pulmonary syndrome-related virus from Bolivia (letter). *Lancet.* 1996; 347:57.
- Johnson K.** Epidemiology of Machupo virus infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1965;14:816-8.
- Lee HW, et al.** Geographical distribution of hemorrhagic fever with renal syndrome and hantaviruses. *Arch Virol.* 1990; (Suppl.1):5-18.
- Londoño AF, Díaz FJ, Agudelo-Florez P, Levis S, Rodas JD.** Genetic evidence of hantavirus infections in wild rodents from northwestern Colombia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011 Feb 1. Epub ahead of print.
- Mátar S, Parra M.** Serologic evidence of hantavirus infection in humans, Colombia. *Emerg Infect Dis.* 2004;10:2263-4.
- Mercado R.** Rodent control programmes in areas affected by Bolivian haemorrhagic fever. *Bull World Health Organ.* 1975;52:691-6.
- Milazzo ML.** Mappal viral infection in the Syrian golden hamster: A model of hantavirus pulmonary syndrome. *J Infect Dis.* 2002;186:1390-5.
- Mills J, et al.** Métodos para trapeo y muestreo de pequeños mamíferos para estudios virológicos. Atlanta: CDC; 1998.
- Ministerio de la Protección Social, Dirección General de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud.** *Inf Quinc Epidemiol Nac.* 2006;11:177-86.
- Organización Panamericana de la Salud.** Agosto de 2009. Disponible en: [http://www.paho.org/ spanish/AD/DPC/CD/hantavirus-1993-2004.htm](http://www.paho.org/spanish/AD/DPC/CD/hantavirus-1993-2004.htm).
- Padula P, et al.** Genetic diversity, distribution, and serological features of hantavirus infection in five countries in South America. *J Clin Microbiol.* 2000;38:3029-35.
- Powers A, et al.** Isolation and genetic characterization of a Hantavirus (*Bunyaviridae*: Hantavirus) from a rodent, *Oligoryzomys microtis* (Muridae), collected in northeastern Perú. *Am J Trop Med Hyg.* 1999;61:92-8.
- Rivas YJ, et al.** The seroprevalences of anti-hantavirus IgG antibodies among selected Venezuelan populations. *Ann Trop Med Parasitol.* 2003;97:61-7.
- Salazar-Bravo J, et al.** Serosurvey of wild rodents for hantaviruses in Panamá, 2000-2002. *J Wildl Dis.* 2004;40:103-9.
- Schmaljohn C, Nichol S.** *Field's Virology.* Fifth edition. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
- Schountz T, et al.** Rapid field immunoassay for detecting antibody to sin nombre virus in deer mice. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:1604-7.
- Snell N.** Examining unmet need in infectious disease. *Drug Discov Ther.* 2003;8:22-30.
- Vincent M, et al.** Hantavirus pulmonary syndrome in Panamá: Identification of novel Hantaviruses and their likely reservoirs. *Virology.* 2000;277:14-9.
- Weksler M.** Phylogenetic relationships of *Oryzomys* Rodents (Muroidea: Sigmodontinae): Separate and combined analyses of morphological and molecular data. *Bulletin of the American Museum of Natural History.* 2006;296:1-149.