

ÁREA **1** **EPIDEMIOLOGÍA**

MÓDULO **1.1** **Vigilancia Epidemiológica**

UNIDAD **1.1.12** **FIEBRE HEMORRÁGICA VENEZOLANA**

1

Epidemiología

2

Programas De Salud

3

Salud Ambiental

INDICE

INTRODUCCIÓN	3
1. FIEBRE HEMORRÁGICA VENEZOLANA Y OTRAS ARENAVIRUSIS	4
1.1 FIEBRES HEMORRÁGICAS POR ARENAVIRUS	4
1.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS ARENAVIRUS	4
1.2.1 CLASIFICACIÓN	4
1.2.2 MORFOLOGÍA Y COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA	5
1.2.3 PROPIEDADES ANTIGÉNICAS	5
1.2.4 EVOLUCIÓN GENOTÍPICA	6
1.2.5 PROPIEDADES BIOLÓGICAS	6
1.2.6 HOSPEDEROS NATURALES DE LOS ARENAVIRUS.	7
1.2.7 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DE LAS FIEBRES HEMORRÁGICAS POR A	8
2. FIEBRE HEMORRÁGICA VENEZOLANA	9
2.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS	9
HEMORRÁGICA VENEZOLANA	10
VENEZOLANA	11
4. EPIDEMIOLOGÍA DE LA FIEBRE HEMORRÁGICA VENEZOLANA	12
5. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA FIEBRE HEMORRÁGICA VENEZOLANA	12
SIGNOS Y SÍNTOMAS INICIALES	12
6. FISIOPATOLOGÍA Y RESPUESTA INMUNE	13
7. DIAGNÓSTICO	14
8. TRATAMIENTO ANTIVIRAL	14
<u>II VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE LA FIEBRE HEMORRAGICA VENEZOLANA</u>	15
1. VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE LA FIEBRE HEMORRAGICA VENEZOLANA	15
1.1 DEFINICIÓN DE CASOS	15
1.1.1 CASO SOSPECHOSO	15
1.1.2 CASO PROBABLE	16
1.1.3 CASO CONFIRMADO	17
1.1.4 CASO CONTACTO DE FIEBRE HEMORRÁGICA VENEZOLANA	17
2. INVESTIGACIÓN EPIDEMIOLÓGICA SISTEMÁTICA DE CASOS DE FHV	18
3. VIGILANCIA DE ROEDORES EN ÁREAS ENDEMO-EPIDÉMICAS	18
3.1 NORMAS DE BIOSEGURIDAD	19
4. MONITOREAR LAS TENDENCIAS DE MORBI-MORTALIDAD DE LA FHV	20
5. DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DIFERENCIAL DE ENFERMEDADES FEBRILES HEMORRÁGICAS PREVALENTES EN EL ÁREA ENDEMO-EPIDÉMICA	20
<u>MANEJO CLÍNICO DEL PACIENTE CON</u>	21
1. MANEJO CLÍNICO EN PACIENTES HOSPITALIZADOS	21
2. PRUEBAS DE LABORATORIO EN EL INGRESO Y EVOLUCIÓN DEL PACIENTE	22
3. CRITERIOS DE EGRESO	22

IV DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO DE LA FIEBRE HEMORRÁGICA VENEZOLANA	23
1. DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO DE LA FIEBRE HEMORRÁGICA VENEZOLANA	23
2. TOMA, CONSERVACIÓN Y ENVÍO DE LAS MUESTRAS	23
2.1 TOMA DE MUESTRAS DE SANGRE PARA DETECCIÓN DEL VIRUS GUANARITO	23
2.2 CONSERVACIÓN Y ENVÍO DE MUESTRAS	24
3. ESQUEMA CRONOLÓGICO DE TOMA Y NÚMERO DE MUESTRAS A COLECTAR	24
4. MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD DURANTE LA TOMA DE MUESTRAS SANGUÍNEAS DE	25
5. TOMA DE MUESTRAS DE VÍSCERAS EN FALLECIDOS	25
6. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE VIRUS GUANARITO	25
6.1 MANTENIMIENTO DE CULTIVO CELULAR	25
6.1.1 PRINCIPIO	25
6.1.2 MATERIALES Y REACTIVOS	26
6.1.3 EQUIPO	26
6.1.4 PROCEDIMIENTO	26
6.1.5 CONTROL DE CALIDAD	27
6.1.6 INTERPRETACIÓN	27
7. DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO DE LA FIEBRE HEMORRÁGICA VENEZOLANA	27
7.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN EN CULTIVOS CELULARES	27
7.1.1 PRINCIPIO	27
7.1.2 MATERIALES Y REACTIVOS:	28
7.1.3 EQUIPOS	28
7.1.4 NORMAS DE BIOSEGURIDAD	28
7.1.5 PROCEDIMIENTO	29
7.1.6 CONTROLES DE CALIDAD INTERNO	29
7.1.7 INTERPRETACIÓN	29
8. REACCIÓN DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA LA IDENTIFICACION DE VIRUS GUANARITO	29
8.1 PRINCIPIO	29
8.2 REACTIVOS	30
8.3 EQUIPOS	30
8.4 MATERIALES	30
8.5 PROCEDIMIENTO	30
8.6 REACCIÓN DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA	31
8.7 INTERPRETACIÓN	31
8.8 CONTROL DE CALIDAD	32
9. DIAGNOSTICO SEROLÓGICO DE VIRUS GUANARITO	32
9.1 PRINCIPIO	32
9.2 NORMAS DE BIOSEGURIDAD	32
9.3 MATERIALES Y REACTIVOS	33
9.4 EQUIPOS	33
9.5 PROCEDIMIENTO	33
9.6 REACCIÓN DE INMUNOFLUORESCENCIA	33
9.7 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS	34

10. TÉCNICA DE ELISA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CLASE IGG PARA EL	34
10.2 MATERIALES Y REACTIVOS	34
10.3 EQUIPOS	35
10.4 NORMAS DE BIOSEGURIDAD	35
10.5 PREPARACIÓN DE ANTÍGENO DE VIRUS GUANARITO Y DE CÉLULAS NORMALES	35
10.6 PROCEDIMIENTO	36
10.7 CÁLCULOS	36
10.8 INTERPRETACIÓN	37
PCR) PARA LA DETECCIÓN GENÓMICA PARCIAL DEL VIRUS GUANARITO.	37
1. EXTRACCIÓN DEL RNA VIRAL	37
2. REACCIÓN RT-PCR	37
12. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA DE LOS PRODUCTOS DE LA REACCIÓN	38
12.1 PRINCIPIO	38
12.2 PROCEDIMIENTO	38
12.3 INTERPRETACIÓN	39
<u>V NORMAS GENERALES Y ESPECIALES DE SEGURIDAD BIOLÓGICA</u>	39
1. NORMAS GENERALES Y ESPECIALES DE SEGURIDAD BIOLÓGICA	39
SALUD	39
ROEDORES	41
INFECCIOSO	42
1.4 NORMAS GENERALES DE SEGURIDAD BIOLÓGICA EN EL LABORATORIO	42
BIOLÓGICO 4	43
<u>GUANARITO</u>	44
1. ACCIONES PARA LA PREVENCIÓN	44
2. MANEJO DE HABITATS	44
3. SANEAMIENTO DE AMBIENTES DOMESTICO Y PERIDOMÉSTICO	45
4. MEDIDAS DE PROTECCIÓN PERSONAL PARA TRABAJADORES DEL MEDIO RURAL	45
5. EDUCACIÓN Y PARTICIPACIÓN COMUNITARIA	46
BIBLIOGRAFÍA	46

INTRODUCCION

A partir de la emergencia de Fiebre Hemorrágica Venezolana, en Guanarito Estado Portuguesa, año 1989, se han producido 3 epidemias y en cada una se ha observado avance de la onda endémica hacia otras áreas geográficas, dejando en cada episodio una gran extensión territorial para la vigilancia epidemiológica de la enfermedad al extenderse hacia otros estados o la hospitalización de pacientes en otras zonas del país, después de adquirir la patología en las áreas endémicas estableciéndose la necesidad de multiplicar el conocimiento adquirido a través de años de investigación, por el nivel regional donde surgió la Fiebre Hemorrágica Venezolana.

Estas consideraciones determinaron la importancia de la elaboración de un documento contentivo de la información que se ha generado a lo largo de 13 años de continuo y arduo trabajo, de un grupo multidisciplinario de personas que con mística ha logrado mantener el desarrollo de la investigación en las diferentes áreas que estructuran el programa (Clínica, Epidemiológica, Laboratorio, Ecológica, y Viroológica) para lo cual se genera esta guía, con el decidido apoyo de la Oficina Sanitaria Panamericana, Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Higiene y La Universidad de los Andes, cristalizando este propósito, con la esperanza que sea útil a todo el personal de salud comprometido en la atención directa de casos de Fiebre Hemorrágica Venezolana, así como también todo lo que fue desarrollando nuestro ejercicio profesional fundamentados en la Vigilancia Epidemiológica o impartiendo educación para la prevención y control de enfermedades que representan graves problemas de salud pública.

1. FIEBRE HEMORRÁGICA VENEZOLANA Y OTRAS ARENAVIROSIS

1.1 FIEBRES HEMORRÁGICAS POR ARENAVIRUS

Fiebre Hemorrágica, es una condición clínica que puede originarse por diferentes causas desde el punto de vista etiológico, conlleva a alteraciones hematológicas que pueden implicar lesiones en los vasos sanguíneos, disminución de plaquetas (trombocitopenia), alteraciones en la coagulación y del funcionalismo hepático.

Diversas etiologías se citan en el origen de estas alteraciones entre ellas podemos mencionar: las infecciones virales, Clamydias, las Riketsias, Espiroquetas, Protozoarios, y Bacterianas, etc; Sin embargo el término Febril Hemorrágica se aplica con mayor frecuencia a ciertas infecciones virales transmitidas por artrópodos.

En Venezuela existen 2 arbovirosis de gran importancia en salud pública y son:

1. Dengue (virus dengue tipos: 1, 2, 3 y 4)
2. Fiebre amarilla.

En Sur América, además del Dengue y la Fiebre Amarilla ha sido muy importante la caracterización de patologías hemorrágicas causadas por arenavirus: (4)

1. Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA) causada por el virus Junín (1958).
2. Fiebre Hemorrágica Boliviana (FHB) causada por el virus Machupo (1963)
3. Fiebre hemorrágica Venezolana (FHV) causada por el virus Guanarito (1990)
4. La Fiebre hemorrágica de Sao Pablo, causada por el virus Sabiá (1993)

1.2 CARACTERÍSTICAS DE LOS ARENAVIRUS

1.2.1 CLASIFICACIÓN

La familia Arenaviridae género arenavirus agrupa a sus miembros en dos complejos, tomando en cuenta la morfología, composición química, relación antigénica y evolución genotípica (3, 6, 23):

1. Arenavirus del Viejo Mundo o complejo Coriomeningitis linfocítica que incluye los siguientes virus: Linfocorionemeningitis (LCM) Lassa y virus relacionados con Lassa.
2. Arenavirus del Nuevo Mundo o complejo Tacaribe, el cual comprende tres grupos; el grupo A que incluye a los virus: Tamiami, Flexal, Paraná, White, Water Arroyo, Pichindè y Pirital. El

grupo B que incluye a los virus: Junin, Machupo, Tacaribe, Amapari, Guanarito y Sabiá y el grupos C que incluye a los virus: Oliveros y Latino.

1.2.2 MORFOLOGÍA Y COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA

Las preparaciones de células Vero infectadas con virus Guanarito observadas al microscopio electrónico demuestran características morfológicas típicas de la familia Arenaviridae tales como: partículas virales redondas, ovaladas o pleomorfas, el diámetro de 50-300 nm, poseen una envoltura de naturaleza lipoproteica de la cual se proyectan espículas de aproximadamente 6 nm de largo de naturaleza proteica, en el core se observan gránulos densos que corresponden a ribosomas que adquiere el virión en la célula hospedadora y le dan apariencia de arena, confiriéndole el nombre de arenavirus a esta familia.

Los arenavirus contienen dos moléculas de ARN lineal, de cadena simple y sentido negativo, el genoma no es infeccioso, la constante de sedimentación de 32S para segmento largo (L) y 23S para el segmento pequeño (S). Además se han encontrado pequeñas moléculas de ARN que probablemente son ribosomas de origen celular (4).

El genoma de los arenavirus tiene una estrategia de codificación genética ambisensa en su segmento S de manera que en un sentido codifica para una glicoproteína precursora y en sentido inverso codifica para la nucleoproteína (NP). La glicoproteína precursora luego es clivada en dos glicoproteínas, G1 y G2 que están en proporciones similares en la envoltura viral, El segmento L para la polimerasa viral (L) (4).

Los arenavirus son fácilmente inactivados por solventes orgánicos como éter, cloroformo; soluciones desinfectantes como beta propiolactona, hipoclorito de sodio y por el desoxicolato de sodio; pueden perder su poder infeccioso al exponerse a pH ácido, al calor y radiación ultravioleta (8).

1.2.3 PROPIEDADES ANTIGÉNICAS

La relación antigénica entre los miembros de la familia se ha establecido por las técnicas de fijación de complemento (FC), inmuno fluorescencia (IF), neutralización (Nt) y ensayo inmunoenzimático (ELISA). El complejo Tacaribe reacciona en forma cruzada potentemente entre sus miembros pero débilmente con los del complejo del Viejo Mundo cuando se usan las técnicas de FC, IF y ELISA; en contraste por Nt no se observa reacciones cruzadas entre ellos usando anticuerpos monoclonales o policlonales (8). Los análisis antigénicos demuestran que del virus Guanarito esta más íntimamente relacionado con los virus: Junín, Tacaribe, Amaparí y Sabia (32).

1.2.4 EVOLUCIÓN GENOTÍPICA

Los análisis moleculares parciales del gen de la proteína N de los arenavirus del Nuevo Mundo, agrupa a los virus de este complejo en tres líneas filogenéticas: A, B y C que indican orígenes ancestrales comunes. La línea A incluye los virus Tamiami (TM), Whitewater (WWA), Flexal (Fx) Parana, Pichindé y Pirital. La línea B incluye los virus

Tacaribe, Amaparí, Guanarito, Junín, Machupo, estos cuatro últimos son patógenos para el hombre y Sabía. La línea C contiene los virus Latino y Oliveros.

A pesar del posible origen ancestral común, el virus Guanarito diverge genéticamente en 15-30% de los otros arenavirus patógenos para el hombre, lo que apoya la hipótesis que cada arenavirus ha evolucionado independientemente en su foco endémico probablemente desde hace mucho tiempo (5, 17).

Los estudios filogenéticos del gen de la proteína N de cepas de virus Guanarito aislados en periodos epidémicos y de roedores procedentes de áreas endémicas y no endémicas demuestran que estos virus forman un grupo monofilogenético conformado por al menos 9 genotipos que difieren en más de 9% de secuencias de aminoácidos; estos 9 genotipos están ampliamente distribuidos (30), sin embargo solo los genotipos 6 y 9 se encontraron asociados con los casos de FHV, desafortunadamente no existe información ecológica y/o de la genética de roedores que permitan establecer asociaciones claras (5, 6).

El virus Guanarito coexiste con el virus Pirital compartiendo el mismo ecosistema, sin embargo ambos virus divergen genéticamente en más del 50% y son altamente específicos para la especie de roedor que le sirve de reservorio.

1.2.5 PROPIEDADES BIOLÓGICAS

Los arenavirus se multiplican en una gran variedad de líneas celulares de diferentes orígenes, con producción eficiente de placas en agar utilizando células Vero, y células diploides humanas. Algunos producen efecto citopático (ECP) marcado en líneas celulares continuas por ejemplo: LLCMK2 y Hela y Vero-E6 (11, 12). El virus Guanarito se propaga bien en células Vero-E6, BHK21 and RD, pero produce un ECP mínimo. A los 8-14 días después de la inoculación, las células muestran apariencia granular, algunas se redondean y se separan de la monocapa celular. Sin embargo en el examen de las células infectadas se

Puede observar abundante antígeno viral en el citoplasma celular cuando se utiliza la técnica de IF y antisuero específico para virus Guanarito (32).

Es común la producción de arenavirus defectivos e infecciones persistentes en cultivos celulares, los cuales contienen proteínas citoplasmáticas de origen viral sin que se expresen en la membrana celular. Los cultivos celulares persistentemente infectados pueden producir pequeñas cantidades de virus defectivos y son resistentes a la súper infección por virus homólogos o heterólogos (12)

Dentro de las características biológicas más sobresalientes de los arenavirus es la de utilizar roedores como hospedadores naturales (con excepción del virus Tacaribe que utiliza al murciélago frutero: *Arbeteus literatus*) y más importante aún es el hecho de su alta especificidad por el roedor que selecciona como hospedero; de forma tal que arenavirus se adapta a una o máximo dos especies y a una subespecie de roedores.

También es importante destacar que en sus hospedadores naturales, los arenavirus establecen una infección crónica de por vida, que resulta en viremia persistente con la eliminación del virus en forma continua en las excretas, especialmente en la orina, saliva o heces. A este tipo de infecciones en el hospedador intermediario se le ha denominado “infecciones tolerantes persistentes”.

El mecanismo asociado con este tipo de infección parece ser por la depleción selectiva de los linfocitos T específicos para los virus, ya que en estos animales se observa una ausencia de respuesta de los linfocitos T citotóxicos o de hipersensibilidad retardada contra el arenavirus infectante. (10 y 25).

Los arenavirus pueden o no tener influencia en la especie de roedor que le sirve de reservorio. Estudios experimentales con los virus Junin, Machupo y Guanarito demuestran que afectan adversamente la especie reduciendo la tasa de sobrevivencia, crecimiento y fecundidad de la especie, mientras que los no patógenos tienden a mantener un balance estable con el hospedador. (25)

1.2.6 HOSPEDEROS NATURALES DE LOS ARENAVIRUS.

La alta selectividad por la especie de roedor que sirve de reservorio a cada arenavirus determina en parte la distribución geográfica tan definida. El virus Lassa está distribuido en el oeste de África en: Nigeria, Liberia y Sierra Leona y su reservorio es el roedor *Mastomys natalensis*. El virus de la coriomeningitis linfocítica (LCM), pertenece al complejo Arenavirus del Viejo Mundo, pero su distribución es mundial debido a que su huésped natural es el ratón casero: *Mus musculus*. Los Arenavirus de este complejo más recientemente identificados (Mopeia, Mobola e Ippy) han sido aislados en la República Central Africana, pero su patogenicidad para el hombre aún no se conoce.

De los arenavirus del Nuevo Mundo, el virus Junin, esta distribuido en el noroeste de la provincia de Buenos Aires en donde es dominante su reservorio natural el *Calomys musculinus*. El virus Machupo esta limitado a la provincia de Beni en el noreste de Bolivia, donde el *Calomys callosus* es predominante (10, 14, 21).

1.3 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DE LAS FIEBRES HEMORRÁGICAS POR ARENAVIRUS

Las Fiebres Hemorrágicas por Arenavirus comparten algunas características como se indican a continuación.

La FHA afecta a la población rural, entre 20-49 años de edad, predominantemente agricultores lo que indica que esta actividad es un factor de riesgo determinante de la infección al exponerse a material contaminado con excretas de roedores. La incidencia anual de casos fluctúa entre 100-4000 reportándose entre 1958 a 1987 un total de 21.000 casos. El área endemoepidémica reconocida inicialmente se estimó en 16.000 Km² con 250.000 personas a riesgo; esta área se extendió a 150.000 Km² y la población a riesgo se incrementó a 2 millones. La FHA típicamente es una enfermedad estacional, iniciándose la curva epidémica al finalizar el verano austral, alcanza el pico en otoño y termina al comienzo del invierno, esta distribución está íntimamente relacionada con las labores agrícolas, los hábitos reproductivos y alimenticios del *Calomys musculinus* (7, 26) .

FHB surge de manera esporádica o en brotes epidémicos que afectan a pobladores rurales de la zona septentrional de Bolivia. La epidemia de FHB ocurrió entre 1959 hasta 1962 afectó mas de 500 personas en las poblaciones de San Joaquín, Orobayaya y áreas vecinas; la edad sexo y ocupación de las personas afectadas no fueron factores de riesgo determinantes para adquirir la enfermedad. La curva epidémica comenzó al final del invierno registrándose el mayor número de casos durante el verano (19). En 1964 se realizó un programa de desratización en las zonas afectadas interrumpiéndose casi inmediatamente la epidemia, reportándose el último caso en Noviembre de 1964. Esta epidemia de FHB aparentemente fue un fenómeno no usual que ocurrió probablemente debido a un incremento significativo del roedor hospedero del virus Machupo el *Calomys callosus* que a pesar de que tiene hábitos peridomésticos puede invadir las casas cuando se reduce la competencia territorial establecida por otros roedores (7, 26)

El ultimo brote de FHB reportado ocurrió entre Julio y Agosto del año 1994 en una familia de la localidad de Magdalena con una población de 4.300 habitantes, el brote afectó a 5 de los 7 miembros que constituían la familia y a otros 2 parientes cercanos, 6 de los 7 casos fallecieron, los reportes de laboratorio confirmaron diagnóstico de FHB por aislamiento del virus Machupo (25).

2. FIEBRE HEMORRÁGICA VENEZOLANA

2.1 ANTECEDENTES HISTÓRICOS

A partir de Septiembre de 1989, empezaron a consultar al hospital Dr. Miguel Oraá de Guanare (Edo. Portuguesa), pacientes en su mayoría agricultores procedentes del municipio Guanarito de esta entidad federal, con manifestaciones clínicas caracterizadas por fiebre, postración, cefalea, odinofagia y manifestaciones hemorrágicas diversas (gingivorragias, hematemesis, epistaxis), seguido en muchos casos por manifestaciones neurológicas, los cuales fallecieron en estado catalogado como shock séptico. De las dos primeras víctimas de la afección, se tomaron muestras de autopsia para la investigación etiológica, aislándose un agente viral que para el momento no se pudo identificar.

En Octubre de ese mismo año, se desarrolló por primera vez en Venezuela, una severa epidemia de dengue hemorrágico causado por los virus dengue tipos 1, 2 y 4 con predominio del serotipo 2. Ante la evidencia etiológica de dengue hemorrágico en vastas áreas del país, inicialmente se atribuyeron las muertes ocurridas en el Edo. Portuguesa a esta etiología. Con la declinación de la epidemia de dengue hemorrágico en Abril de 1990, siguieron ingresando casos similares a los antes descritos en el hospital Dr. Miguel Oraá, pero estos pacientes tenían características epidemiológicas muy particulares, entre las que señalan: el grupo etario predominante entre los 14 y los 49 años, sexo masculino de ocupación agricultores y procedentes del municipio Guanarito, lo cual llevó a reiniciar los estudios del agente etiológico en el Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel". Los estudios de laboratorio descartaron agentes infecciosos como: dengue, fiebre amarilla, hepatitis virales, leptospirosis, rickettsiosis, etc.; pero había evidencias del aislamiento viral en cultivos celulares a partir de la sangre y tejidos de las víctimas de la enfermedad. En Febrero de 1991 en Yale Arbovirus Research Unit de la Universidad de Yale EUA se identificó el virus aislado como un nuevo miembro de la familia Arenaviridae Complejo Tacaribe, al que se le dió el nombre de "Virus Guanarito" y a la entidad nosológica resultante como Fiebre Hemorrágica Venezolana (FHV) (28, 35). De acuerdo al clasificador internacional de enfermedades (CIE) la FHV le corresponde CIE 10A86.1

En los años siguientes, los estudios ecológicos, virológicos y en animales de experimentación permitieron identificar al *Zygodontomys brevicauda* como el roedor reservorio natural del virus Guanarito, el cual tiene una amplia distribución geográfica en los llanos centro-occidentales de Venezuela donde la población rural puede ser afectada por la enfermedad. Estos estudios también permitieron la identificación de nuevos agentes virales tales como el virus Pirital

(familia Arenaviridae) y el Caño Delgadito (familia Bunyaviridae, genero Hantavirus) que afectan los roedores de la especie Sigmodon alstoni. Hasta el presente no se han implicado a estos virus como agentes patógenos para el humano (15, 16). Los estudios ecológicos permitieron mejorar el conocimiento sobre la diversidad de especies de roedores existentes y sus habitats naturales en estas regiones (34).

Los estudios epidemiológicos retrospectivos indican que posiblemente el virus Guanarito ha existido en la población de roedores por muchos años, sin embargo antes de 1989 los casos de FHV pueden haber ocurrido en forma esporádica posiblemente debido a la baja concentración de habitantes en el medio rural del municipio Guanarito, estado Portuguesa. La incorporación de nuevas tierras a la actividad agrícola y el incremento de la migración al medio rural produjeron los cambios ecológicos favorables para el aumento de la población de roedores silvestres y como consecuencia se incrementó el riesgo humano para adquirir la infección por patógenos transmitidos por roedores y cambios en el patrón epidemiológico de las enfermedades tales como se ha observado con la FHV.

3. CARACTERÍSTICAS Y DISTRIBUCIÓN DEL ROEDOR RESERVORIO DE LA FIEBRE HEMORRÁGICA VENEZOLANA

El arenavirus Guanarito esta distribuido en los llanos centro-occidentales del país donde es prevalente el Zygodontomys brevicauda (Zb), o ratón de la caña de azúcar (15, 31). Esta especie esta clasificada dentro del orden Rodentia, genero Zygodontomys y puede distinguirse de otras especies por una combinacion de características morfológicas. La variación de caracteres cualitativos revela divergencia de poblaciones y patrones de distribución geográfica. El rango de Distribución del Zb se extiende desde el litoral del pacífico al este de Costa Rica, cruzando Panamá, Colombia, Venezuela y las Guayanas al norte de Brasil. (13)

Los estudios de distribución geográfico del virus Guanarito en Venezuela demuestran que su hospedero natural el Zb esta ampliamente distribuido en los llanos centro-occidentales de Venezuela. El virus Guanarito circula en los estados Portuguesa, Barinas, Guárico, Cojedes y Apure; en los tres primeros estados se han identificado casos confirmados de FHV, considerándole dentro del área endémica de esta enfermedad y los estados Cojedes y Apure representan áreas de riesgo (31, 34). Estas áreas endémicas y de riesgo se muestran el siguiente mapa.

DISTRIBUCIÓN DE AREAS ENDÉMICAS Y DE RIESGO DE LA FIEBRE HEMORRAGICA VENEZOLANA

Otras especies de roedores presentes en la región de los llanos son: *Sigmodon alstoni* (Sa), *Ratus ratus*, *Proechemys guairae*, *Orizomys fulvescens* y *Heteromys anomalus*. Estas especies son susceptibles a la infección por virus Guanarito, pero son hospederos finales, por lo tanto tienen poca importancia en la transmisión del virus al humano (10, 31, 33).

Hábitat Natural del *Zygodontomys brevicauda*

El ZB habita en sabanas, matorrales espinosos, arbustales, pastizales, campos agrícolas y otros tipos de hábitats naturales abiertos, en América Central y del Sur. Pueden encontrarse en elevaciones por debajo de los 100 mts y hasta 1.300 mts de altitud. Tiene hábitos nocturnos estrictamente terrestres y aparentemente omnívoros, se reproducen durante todo el año a pesar de la dramática estacionalidad de las lluvias (13, 34, 36).

El Zb junto con el Sa son las especies de roedores más abundantes en la región de los llanos centro-occidentales, se encuentran asociados con una gran variedad de hábitats, sin embargo ellos son especialmente abundantes en campos de cultivo de maíz, sorgo, algodón y en la maleza que bordea los cultivos. La densidad poblacional de las especies varía entre los tipos de hábitat o las diferentes categorías de cultivo por ejemplo, los cultivos de subsistencia proporcionan el hábitat ideal para ciertas especies de roedores porque con frecuencia ofrecen una amplia variedad de frutas, semillas y están cerca de fuentes de agua. El hábitat a lo largo de carreteras, caminos y bordes de cultivo también son ideales para el refugio de una diversidad de especies, pero en especial para Zb y Sa, mientras que los espacios peridomésticos son dominados por *Ratus ratus* (33, 34, 35).

La densidad poblacional presenta fluctuaciones estacionales típicas con un incremento durante la estación de sequía, alcanzando máximos niveles al final de la estación, luego disminuye durante la estación de lluvia con desaparición casi total. La densidad de población de Zb también presenta fluctuaciones cíclicas significativas alcanzándose una máxima densidad poblacional cada 4-5 años las cuales se correlacionan con los ciclos endémicos y epidémicos de la FHV (23).

4. EPIDEMIOLOGÍA DE LA FIEBRE HEMORRÁGICA VENEZOLANA

La FHV desde emergencia en el año 1989 hasta Diciembre del 2005 se ha registrado 576 casos con 132 defunciones, reflejando una letalidad del 23% en el periodo. Hasta el año 2005 se han producido tres brotes epidémicos con un incremento en el número de casos en cada brote y acortamiento de los periodos inter-epidémicos. La población mayormente afectada es de 15-49 años de edad, sexo masculino y ocupación agricultor.

La procedencia de los casos en su totalidad esta relacionada con el área rural, siendo pobladores de esta zona o personas que han incursionado en la misma antes de enfermar. Los municipios del estado Portuguesa con mayor ocurrencia de casos son: Guanarito, Papelón, Guanare, San Genaro de Boconcito y Esteller. En el estado Barinas los municipios más afectados: Rojas, Sosa, Alberto Arvelo y Obispo (18, 31, 36).

Los estudios sobre los mecanismos de transmisión indican que los arenavirus se transmiten al hombre por exposición a las excreciones y secreciones de roedores infectados (orina, heces, saliva o sangre). La infección ocurre por penetración del virus a través de aerosoles de polvo contaminados, mordeduras, excoiaciones u otras soluciones de continuidad de la piel.

5. MANIFESTACIONES CLÍNICAS DE LA FIEBRE HEMORRÁGICA VENEZOLANA

SIGNOS Y SÍNTOMAS INICIALES

La Fiebre Hemorrágica Venezolana tiene un comienzo insidioso, con manifestaciones inespecíficas, pudiéndose distinguir dos (2) fases, una primera fase entre el inicio y el cuarto día de evolución del cuadro en la cual paciente presenta:

- Fiebre
- Malestar general.
- Cefalea.
- Artralgias.
- Mialgias
- Vómito
- Diarrea
- Leucopenia y trombocitopenia con valores cercanos a lo normal (3er día)

Luego en el curso de la enfermedad a partir del cuarto día se pueden agregar al cuadro clínico:

- Petequias
- Equimosis
- Leucopenia y trombocitopenia acentuada
- Gingivorragia y/o epistaxis fundamentalmente.
- Dolor abdominal principalmente en epigastrio y en el hipocondrio derecho, puede haber distensión abdominal.
- Toque del estado neurológico: irritación, agitación, agresividad, y también puede observarse temblor fino en las extremidades superiores.

En los pacientes que cursan con una evolución tórpida hacia la gravedad las manifestaciones clínicas se hacen más severas pudiéndose observar:

- Sangramiento por los sitios de venopunción.
- Tos, taquipnea, tiraje, distres respiratorio o signos de dificultad respiratoria.
- Hemorragias profusas por orificios naturales.
- Hematemesis, melena, metrorragia, convulsiones tónico clónicas generalizadas, estupor, coma y se puede producir el fallecimiento del paciente (2, 18, 22, 28, 33).

6. FISIOPATOLOGÍA Y RESPUESTA INMUNE

Los mecanismos mediante los cuales se produce la enfermedad y su control en el humano, tanto por el virus Guanarito como por los otros arenavirus, son en gran parte desconocidos. Investigaciones realizadas en pacientes con FHA y con Fiebre de Lassa han revelado la patogénesis de la infección por los arenavirus se atribuye al daño directo del virus sobre el sistema sanguíneo. Los estudios clínicos y experimentales demuestran que los arenavirus se multiplican en las células en el tejido linfoide causando viremia prolongada, producen efecto citopático directo en macrófagos y polimorfonucleares, lo que resulta en la activación de factores plasmáticos y alteración de la permeabilidad capilar. Otros mecanismos pueden contribuir a la patogénesis de la enfermedad, por ejemplo en pacientes con FHV y FHA se encuentran altos niveles de interferón, demostrando una correlación entre estos títulos y la evolución de la enfermedad, pero sin establecerse aún el papel que desempeña en el daño tisular (25).

Durante el proceso infeccioso en la FHA se produce una profunda alteración del funcionamiento de las poblaciones de linfocitos B, subpoblaciones CD4 y CD8; estas anomalías desaparecen durante la convalecencia, alrededor de la 5ta semana, periodo durante el cual comienza a detectarse la respuesta inmune humoral específica para estos virus (14). La respuesta inmune humoral en las arenavirosis Sudamericanas tienen las

siguientes características: los anticuerpos FC o los fluorescentes aparecen 3 a 4 semanas después del inicio de la enfermedad mientras que los anticuerpos neutralizantes requieren 2 a 6 meses para alcanzar niveles significativos.

Estudios histopatológicos en pacientes fallecidos por FHA, FHV y Fiebre de Lassa demuestran una vasocongestión generalizada con hemorragias múltiples en la mucosa gastrointestinal, útero, corazón y otros órganos y tejidos. Estudios microscópicos en casos de FHA demuestran necrosis tubular y papilar en riñón, necrosis de hepatocitos y pocas alteraciones en el sistema nervioso central. También se observan alteraciones importantes, la médula ósea con depleción de eritroblastos, extensa necrosis de la pulpa esplénica y en las áreas cortical y paracortical de los ganglios linfáticos (14, 18, 21, 22, 25)

7. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la FHV puede establecerse usando los siguientes criterios: historia epidemiológica, signos y síntomas iniciales y alteraciones hematológicas, considerándose como diagnóstico diferencial otras fiebres hemorrágicas tales como: dengue, fiebre amarilla, hepatitis, leptospirosis, fiebre tifoidea, fiebre hemorrágica con síndrome renal etc.

El diagnóstico etiológico específico de FHV puede realizarse mediante el aislamiento e identificación del virus en cultivos celulares o la amplificación parcial del ARN viral por la técnica de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). El método más utilizado es el aislamiento viral en cultivo de células Vero-E6; el virus Guanarito puede identificarse por Inmunofluorescencia indirecta, (IFI), utilizando líquido ascítico hiperinmune contra el virus. El virus puede aislarse a partir de suero, sangre o tejidos en los casos fatales (32).

El diagnóstico serológico se realiza por la determinación de anticuerpos clase específicas tipo IgG e IgM para el virus Guanarito utilizando la técnica de Inmunofluorescencia indirecta cuantitativa (IFI) o ensayo inmunoenzimático ELISA (32).

La FHV no tiene actualmente un tratamiento específico, siendo necesario establecer un manejo de soporte fundamentado en las características clínicas y las alteraciones hematológicas de la enfermedad tales como: corrección de líquidos y electrolitos, expansores plasmáticos y derivados sanguíneos y otros que el paciente requiera. En la actualidad se diseña un protocolo clínico terapéutico de Ribavirina para demostrar su eficacia en los pacientes con FHV. La

Ribavirina ha tenido actividad antiviral contra el virus Junin y Guanarito in vitro (32, 20). También se ha demostrado efectividad antiviral de esta droga el tratamiento de una infección por virus Sabia.

II

VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE LA FIEBRE HEMORRAGICA VENEZOLANA

1. VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA DE LA FIEBRE HEMORRAGICA VENEZOLANA

La vigilancia epidemiológica es una actividad fundamentada en la recolección de la información, análisis e interpretación que permita el monitoreo de eventos relacionados con la salud pública que constituyen un riesgo a la población de enfermarse y/o morir. La información generada conlleva a la toma de decisiones en función de las medidas de control para minimizar o evitar el riesgo de enfermarse (18).

La vigilancia epidemiológica en la Fiebre Hemorrágica Venezolana se desarrolla en base a los siguientes criterios:

1. Vigilancia clínico-epidemiológica de casos febriles hemorrágicos en áreas endémicas o de riesgo para la detección temprana de casos sospechosos o probables.
2. La investigación epidemiológica sistemática de casos de FHV.
3. Estudio de la dinámica poblacional del Zb en áreas endémico-epidémicas.
4. Monitorear las tendencias de morbi-mortalidad de la FHV intervenir y medir su impacto.
5. Establecer el diagnóstico etiológico de enfermedades febriles hemorrágicas prevalentes en el área endemo-epidémica.

1.1 DEFINICIÓN DE CASOS

1.1.1 CASO SOSPECHOSO

Paciente con cuadro febril indeterminado, residente de un área rural endémica de Fiebre Hemorrágica Venezolana (FHV) (Portuguesa, Barinas y Guárico), de un área de riesgo (Apure y Cojedes) o que la haya visitado en los últimos 21 días.

CONDUCTA A SEGUIR DE ACUERDO AL NIVEL DE ATENCIÓN MÉDICA

a) CONSULTORIO POPULAR

Seguimiento clínico durante 48 horas del inicio de la fiebre, para observar la persistencia de la fiebre y si se agregan síntomas como; malestar general, cefalea, mialgias y artralgias. Referir a la red Hospitalaria.

b) RED HOSPITALARIA

Si el paciente reside en el área urbana se evaluara la condición clínica y de laboratorio diariamente durante una semana a partir del inicio de síntomas.

Si el caso procede del área rural dispersa se procede a hospitalizar hasta completar una semana a partir del inicio de síntomas dependiendo de la evolución del cuadro:

1. Evaluación clínica diaria, en busca de signos y síntomas probables.
2. Exámenes del laboratorio: hematológica completa y recuento plaquetario, cada 24 horas o de acuerdo a criterio médico.
3. Toma de muestra de sangre al ingreso para obtención de suero y coagulo.
4. Llenar formulario epidemiológico para caso sospechoso de FHV (anexo N° 1) Ficha de Investigación epidemiológica para SINDROMES FEBRILES ICTERO HEMORRÁGICOS

1.1.2 CASO PROBABLE

Paciente procedente de un área rural endémica de FHV (Portuguesa, Barinas y Guárico) de un área de riesgo (Apure y Cojedes), o que la haya visitado en los últimos 21 días, con un cuadro febril de comienzo insidioso, que además presente uno o más de los siguientes síntomas: malestar general, cefalea, artralgias, mialgias, dolor abdominal, disfagia, odinofagia, vómitos, diarrea, con o sin alguna manifestación hemorrágica tales como: Gingivorragia, epistaxis, petequias, equimosis, etc., y que al laboratorio presente leucopenia y trombocitopenia, sin causa presumible de infección bacteriana.

CONDUCTA A SEGUIR

1. Hospitalizar al paciente.
2. Registrar la información al ingreso y diariamente en el formulario Clínico-Epidemiológico N° FHV 01 parte A (anexo N° 2) Tomar muestra hemática al ingreso, al 3er día durante la hospitalización y al egreso. Luego a los 30, 60 días de la convalecencia.
3. Manejo de paciente de acuerdo a esquema normado.
4. Llevar a cabo la investigación epidemiológica del caso y registrar la información en el formulario Clínico-Epidemiológico N° FHV 01 parte B. (anexo N° 3)

NOTA: Para el paciente que ingresa al protocolo de Ribavirina, la toma de muestra se registrará de acuerdo al protocolo.

NOTIFICACIÓN OBLIGATORIA

La Fiebre hemorrágica Venezolana es una enfermedad de notificación obligatoria, por lo tanto todo Caso Probable debe ser Notificado de Manera Inmediata al Servicio de Epidemiología hospitalaria, el cual a su vez debe notificar a Epidemiología Distrital, quien a su vez reporta a Epidemiología Regional que luego reporta al Centro de Investigaciones de Virosis Hemorrágicas y Enfermedades Transmisibles (CIVIHET), Guanare Estado Portuguesa y a la Dirección de Vigilancia Epidemiológica del Ministerio de Salud (MS).

Esta información debe reportarse en Telegrama Semanal.

1.1.3 CASO CONFIRMADO

Casos que cumplen con el criterio de caso probable de FHV en el cual se realizó confirmación virológica mediante el aislamiento e identificación del virus Guanarito y/o la amplificación parcial del ARN viral por la técnica de RT-PCR y/o diagnóstico serológico mediante la demostración del incremento cuatro o más veces el nivel de anticuerpos IgG específicos para el virus Guanarito por la técnica de IFI o ELISA.

SE CONSIDERAN TAMBIEN CASOS DE FIEBRE HEMORRÁGICA LOS CASOS PROBABLES CON PERDIDAS DE SEGUIMIENTO POR FALLECIMIENTO O CAMBIO DE RESIDENCIA

1.1.4 CASO CONTACTO DE FIEBRE HEMORRÁGICA VENEZOLANA

Persona que realice actividades laborales comunes o que conviva con un caso confirmado o probable para Fiebre Hemorrágica Venezolana.

CONDUCTA A SEGUIR

1. Vigilancia del caso.
2. Educación Sanitaria.

NOTIFICACIÓN DE CASOS

La notificación de casos probables es de carácter obligatorio, la cual debe hacerse diariamente al Servicio de Epidemiología por vía telefónica o reporte escrito, de acuerdo a lo establecido en el sistema de vigilancia para las enfermedades de notificación obligatoria.

2. INVESTIGACIÓN EPIDEMIOLÓGICA SISTEMÁTICA DE CASOS DE FHV

La investigación de un caso probable de fiebre hemorrágica Venezolana se realiza siguiendo los parámetros de acuerdo a la ficha clínico-epidemiológica que reúne la siguiente información:

- a) Datos demográficos: nombre, edad, sexo y procedencia.
- b) Ocupación y otras actividades laborales.
- c) Hábitos del paciente relacionados con: costumbres de limpieza de herramientas de trabajo, uso de calzado, cambio de ropa al finalizar la jornada, utiliza espacios abiertos en pastizales, suelo para el descanso durante la jornada de trabajo o durante la noche, limpieza de ambientes abandonados.
- d) Salida fuera de su residencia habitual en los últimos 21 días la cual debe revisarse detalladamente y registrarse en el instrumento de trabajo.
- e) Practica reciente de captura y eliminación de roedores.

La Vigilancia de los ambientes domiciliarios y peri domiciliarios debe incluir:

- a) Ubicación de la vivienda y su cercanía a áreas de cultivo, depósitos de granos, cultivos de subsistencia, vegetación herbácea, condiciones higiénicas de la vivienda.
- b) Identificación de nidos, heces u otras evidencias de la presencia de roedores en los diferentes ambientes.
- c) Presencia de animales domésticos en la casa.
- d) Interrogatorio entre las personas que conforman el grupo familiar para la búsqueda de otros febriles, tomar muestra de sangre y llenar el formulario de vigilancia de enfermedades ictero-hemorrágicas, también realizar búsqueda de febriles entre las familias en viviendas cercanas al caso y repetir el procedimiento anterior.

3. VIGILANCIA DE ROEDORES EN ÁREAS ENDEMO-EPIDÉMICAS

Para la vigilancia y control de roedores durante períodos no epidémicos se recomienda la selección de áreas centinela reconocidas como endémicas de FHV y desarrollar las siguientes actividades:

1. Evaluación de ambientes para determinar el nivel de infestación de roedores en el área (excretas, madrigueras, sendas, roeduras etc.)
2. Realizar capturas de roedores por personal técnico, clasificación de especies y toma de muestras de material biológico para estudios virológicos cuando este indicado.
3. Intervención para el saneamiento ambiental básico y la desratización controlada.

4. Evaluación del impacto de las medidas de intervención, recordando que serían medidas temporales para no provocar desequilibrio ecológico.

Durante periodos epidémicos se prepara un plan de acción para el control de roedores domiciliarios y peridomiciliarios que incluya la evaluación del grado de infestación previo y después de haber aplicado las medidas de control.

Las actividades de vigilancia se concentran en la colecta y procesamiento de pequeños mamíferos mediante técnicas de remoción, captura, identificación, de especies y registro de datos en el formulario correspondiente. (Anexo 4)

Procedimiento de trampeo y procesamiento de roedores capturados:

1. Para la remoción, el trampeo se lleva a cabo principalmente, en campos de cultivos agrícolas y pecuarios, predominantemente en cultivos anuales
2. Mecanizados (sorgo y maíz), área de pastos (potreros ganaderos), terrenos de agricultura (conucos), sabanas naturales, ambientes peridomésticos, viviendas.
3. En trampeo remoción se colocan las trampas tipo Sherman (75X90X230) y trampas Tomahawk. Las trampas Sherman se colocan a una distancia entre trampas de 10 m y ubicadas a lo largo de los bordes de cultivo o dentro de los mismos, en pasto y sus bordes, sabanas naturales, ambientes peridomésticos; mientras que las Tomahawk se colocan en bosques de galería y dentro de viviendas rurales.
4. Los roedores colectados en muestreos de remoción se sacrifican utilizando cloroformo; a cada individuo se le registran los datos sobre el punto de captura, sexo, condición reproductiva, peso, longitud total, longitud cabeza-cuerpo y longitud de la pata. Dichos datos se registran en el formulario. (Anexo5)
5. La recolección de muestras de sangre se realiza mediante la técnica de sangrado retro-orbital utilizando una pipeta pasteur. La muestra se transfiere a un vial conteniendo una solución buffer fosfato salina. Las muestras son identificadas individualmente y congeladas en termos conteniendo nitrógeno líquido.
6. La información recolectada en los formularios son ingresados a la base de datos de dinámica poblacional para su posterior análisis.

3.1 NORMAS DE BIOSEGURIDAD

Protección personal: los trabajadores del campo deben cumplir las siguientes normas durante la manipulación de roedores y que están especificadas en el capítulo de bioseguridad: uso adecuado de calzado, doble guantes, usar trajes de protección respirador-purificador con filtros HEPA
Protección del ambiente: utilizar material quirúrgico desechable, desinfectar los espacios

de trabajo, equipos o ropas contaminadas. Incinerar cadáveres de animales y desechos de material contaminado.

4. MONITOREAR LAS TENDENCIAS DE MORBI-MORTALIDAD DE LA FHV

Los datos de morbi-mortalidad se recogen a partir de la denuncia de casos de FHV, se realiza el llenado del formulario correspondiente (Anexo 6) que luego se ingresa a la base de datos, esto permite construir y analizar gráficamente las diferentes variables epidemiológicas que caracterizan el análisis, como son: edad sexo, ocupación, procedencia, caracterización clínica etc.

Con esta información se elabora la distribución mensual de la morbilidad, esto permite visualizar si por meses sigue presentándose el patrón observado desde la emergencia de la patología. La tendencia anual permite caracterizar tanto los brotes epidémicos como el comportamiento de la enfermedad en los periodos ínterepidémicos y su proyección futura; así también el análisis del resto de las variables permite inferir si se están produciendo cambios o no en la caracterización conocida de la FHV.

Los cambios en las variables epidemiológicas conducen a la implementación de medidas fundamentadas en la Alerta Epidemiológica orientadas a: incrementar la vigilancia epidemiológica en áreas endémicas o de riesgo, revisar las pautas de conducta a seguir contenidas en el manual. Entrenamiento de personal médico y paramédico. Preparación de planes de trabajo para procesamiento de muestras a nivel de clínico y especializado. Implementación de programas de educación comunitaria orientadas a toma de medidas generales para reducir el riesgo de infección y búsqueda de atención médica temprana.

5. DIAGNÓSTICO ETIOLÓGICO DIFERENCIAL DE ENFERMEDADES FEBRILES HEMORRÁGICAS PREVALENTES EN EL ÁREA ENDEMO-EPIDÉMICA

Las manifestaciones clínicas en pacientes con FHV son similares a otras patologías hemorrágicas de origen viral como dengue hemorrágico y fiebre amarilla, algunas bacterianas como la leptospirosis y parasitarias como la malaria. Por lo tanto el diagnóstico etiológico específico solo puede establecerse a nivel del laboratorio microbiológico.

El diagnóstico etiológico de la FHV puede establecerse usando los siguientes criterios: historia clínico-epidemiológica, considerándose el diagnóstico diferencial con otras fiebres hemorrágicas de acuerdo al siguiente algoritmo basado en la prevalencia de estos patógenos en Venezuela: virus del dengue serotipos 1, 2, 3 y 4 virus de la fiebre amarilla, virus hepatitis B y C, *Leptospira ictero-hemorrágica*, *Plasmodium vivax* y *falciparum* y Hantavirus.

El diagnóstico de los patógenos comúnmente asociados con fiebres hemorrágicas se realiza mediante la detección del agente infeccioso o la respuesta inmunitaria mediada por anticuerpos para el agente sospechoso. Para la detección de los virus Guanarito, dengue y fiebre amarilla se recomienda la toma de suero en la fase aguda de la enfermedad (4 primeros días). Estas son remitidas al Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (INH"RR") para su procesamiento y análisis. Para el diagnóstico etiológico se debe tomar muestras pareadas de suero en la fase aguda y convaleciente de la enfermedad (2-3 semanas después del primer suero). Para la detección de anticuerpos contra el virus Guanarito requiere muestras adicionales a los 30 y 60 días del inicio de síntomas.

En el CIVIHET se realiza diagnóstico diferencial de los siguientes patógenos: Dengue, Guanarito, Leptospirosis, Hepatitis B y C. También debe tomarse gota gruesa para diagnóstico de malaria.

III

MANEJO CLÍNICO DEL PACIENTE CON FIEBRE HEMORRÁGICA VENEZOLANA

1. MANEJO CLÍNICO EN PACIENTES HOSPITALIZADOS

- Hidratación oral si el paciente lo tolera.
- Hidratación parenteral si es necesario, ajustándola según su peso corporal, preferiblemente con soluciones isotónicas al 0,9 % o soluciones de Ringer. Agregar soluciones glucosadas, según la necesidad de cada paciente, sería recomendable evitar el uso de soluciones endovenosas tipo solucel (R), por sus efectos colaterales sobre la función plaquetaria.
- Administración endovenosa (EV.) de concentrado globular en caso de hemoglobina(HB), menor a 9grs%, o de acuerdo a criterio médico
- Administración endovenosa de plasma fresco congelado (10 ml x Kg. de peso corporal), en pacientes con alteración severa del TP, TPT o de acuerdo a criterio médico
- Administración endovenosa de concentrado plaquetario en pacientes con trombocitopenia menor a 50.000 x mm³, 1 unidad x cada 10 Kg. de peso corporal o de acuerdo a criterio médico.
- Administración endovenosa de sangre completa en pacientes con Hb menor 9 gr. % mas trombocitopenia inferior a 50.000 y/o alteraciones severas del TP o TPT o de acuerdo a criterio médico.

- Administración de protectores gastrointestinales vía oral (sufalcrato) 10 cc tres veces al día (TID) media hora antes de cada comida y antes de dormir.

2. PRUEBAS DE LABORATORIO EN EL INGRESO Y EVOLUCIÓN DEL PACIENTE

- Hematología completa (diaria).
- Recuento plaquetario (diaria)
- Tiempo de protrombina y (TP) al ingreso y al haber sangramiento.
- Tiempo de tromboplastina total (TPT) (diaria).
- Transaminasa Glutámico Oxaloacética (TGO) (cada 48 horas)
- Transaminasa Glutámico piruvica (TGP) (cada 48 horas).
- Velocidad de sedimentación globular (VSG) (al ingreso).
- Proteínas totales y fraccionadas (cada 48 horas).
- Uroanálisis (cada 48 horas).
- Glicemia (cada 48 horas).
- Urea y Creatinina (cada 48 horas).
- Bilirrubina total y fraccionada (cada 48 horas).
- Fibrinogeno y Amonio solo al ingreso (cada 48 horas)
- Rx de Tórax (al ingreso).
- Gasometría arterial sobre la base de criterio clínico.
- Eco abdominal de presentarse alteración hepática renal o ascitis.
- Toma de muestras para estudios virológicos y serológicos de acuerdo al siguiente cronograma: al ingreso, 3er día y al egreso (ver capítulo diagnostico)

3. CRITERIOS DE EGRESO

- Hospitalización hasta el decimoquinto día de evolución de la enfermedad.
- Ausencia de manifestaciones clínicas.
- Normalización de parámetros de laboratorio.
- Toma de muestra de suero antes del egreso.

IV

DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO DE LA FIEBRE HEMORRÁGICA VENEZOLANA

1. DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO DE LA FIEBRE HEMORRÁGICA VENEZOLANA

El diagnóstico de la FHV puede establecerse usando los siguientes criterios: historia epidemiológica, signos y síntomas iniciales, alteraciones hematológicas, y la investigación del agente etiológico; considerándose como diagnóstico diferencial otras fiebres hemorrágicas tales como: dengue, fiebre amarilla, hepatitis, leptospirosis, hantavirus, etc. (18, 22, 28).

El diagnóstico virológico específico puede realizarse mediante el aislamiento e identificación del virus Guanarito en cultivos celulares o la amplificación parcial del ARN viral por la técnica de Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR). El método más utilizado es el aislamiento viral en cultivo de células Vero-E6; después de 7 a 10 días de cultivo, el virus puede identificarse por la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), utilizando líquido ascítico hiperinmune contra el virus Guanarito. El virus puede detectarse a partir de suero, sangre o tejidos en los casos fatales (12,18, 28).

El diagnóstico serológico se realiza mediante la demostración de un incremento en el nivel de anticuerpos totales o clase específicos tipo IgG para el virus Guanarito en muestras de suero pareadas recolectadas durante la fase aguda y convaleciente de la enfermedad. Se utilizan las técnicas de inmunofluorescencia indirecta cuantitativa (IFI) y/o el inmunoensayo enzimático ELISA (32, 34), debido a que la respuesta inmune humoral puede ocurrir tardíamente por lo que se recomienda la toma de muestras de sueros con un mes de intervalo durante la fase de convalecencia.

2. TOMA, CONSERVACIÓN Y ENVÍO DE LAS MUESTRAS

2.1 TOMA DE MUESTRAS DE SANGRE PARA DETECCIÓN DEL VIRUS GUANARITO

1. Previa desinfección de la zona elegida para la punción venosa, extraer 10 cc de sangre utilizando vacutainer sin heparina o inyectora estéril desechable.
2. Transferir el contenido de la inyectora en un tubo estéril con tapa de goma estéril. Rotular el tubo con Nombre completo del paciente y asignar el código de registro.

Unidad 1.1.12.- FIEBRE HEMORRÁGICA VENEZOLANA

3. Dejar la muestra a temperatura ambiente durante 20-30 minutos para permitir la retracción del coágulo sanguíneo. Centrifugar a 1,500 rpm durante 10 min.
4. Utilizando una pipeta estéril desechable, transferir el suero a un vial rotulado con el mismo código de registro asignado. De no contar con tubos codificados debe rotularse con: Nombre y Apellido del paciente, Edad y Fecha de toma de muestra.
5. El código de registro debe reseñarse en la ficha clínico-epidemiológica del paciente (anexo N° 4).

2.2 CONSERVACIÓN Y ENVÍO DE MUESTRAS

1. Las muestras deben ser refrigeradas y enviadas inmediatamente al laboratorio regional. Para prevenir cualquier derramamiento accidental de la muestra se recomienda cubrir el vial con papel absorbente, luego colocarlo en una bolsita plástica y sellarla. Posteriormente se coloca en la cava con refrigerante para su transporte hasta el CIVIHET.
2. La referencia de muestras para el Instituto Nacional de Higiene “Rafael Rangel” requiere de su conservación y transporte a temperatura ultra baja (hielo seco o nitrógeno líquido), deben utilizarse viales resistentes a bajas temperaturas (crioviales). Cubrir el vial con papel absorbente, luego colocarlo en una bolsita plástica, sellarla, colocarla en un contenedor de bioseguridad y luego colocar éste en la cava conteniendo suficiente hielo seco para garantizar su buena conservación. Etiquetar el paquete con la siguiente información:
 - a) Nombre, dirección y número telefónico del consignatario.
 - b) Nombre dirección y número telefónico del remitente.
 - c) La frase “Material Clínico para Diagnóstico”

Las muestras de suero para estudio serológico colectadas en el periodo convaleciente pueden conservarse en congelación de < 20 °C o refrigeradas hasta su envío al respectivo destino.

3. ESQUEMA CRONOLÓGICO DE TOMA Y NÚMERO DE MUESTRAS A COLECTAR

En el caso de la FHV se recomienda la recolección de al menos dos muestras de sangre para el diagnóstico etiológico. El tipo de prueba de diagnóstico depende del tiempo transcurrido entre el inicio de los síntomas y la toma de la muestra como se indica en el siguiente esquema:

TIPO DE ESTUDIO	1	3		30	60
Estudio Serológico			Egreso	X	X
Aislamiento viral	X	X	Egreso		
Biología Molecular	X	X			

4. MEDIDAS DE BIOSEGURIDAD DURANTE LA TOMA DE MUESTRAS SANGUÍNEAS DE PACIENTES (38)

1. Protección personal: Use bata, guantes y mascarilla.
2. Protección del paciente: utilice inyectadoras desechables. Desinfectar la zona elegida para la punción venosa.
3. Protección del ambiente: Descarte la inyectadora y aguja en recipientes de bioseguridad. Desinfectar el área de trabajo. Autoclavar o incinerar todo el material de desecho. Use recipientes cerrados para el transporte de la muestra hasta el laboratorio.

5. TOMA DE MUESTRAS DE VÍSCERAS EN FALLECIDOS

En casos de pacientes fallecidos a los que se les realiza autopsias, las muestras deben ser colectadas y manipuladas siguiendo las normas internacionales de Bioseguridad (39) para la realización de autopsias y según se indica en el capítulo de bioseguridad:

1. Tomar pequeños fragmentos de tejidos (pulmón, hígado y bazo) y colocarlos en viales separados para temperaturas ultra bajas. (crioviales)
2. Rotular cada recipiente con el Nombre y Apellido del paciente, Edad y Fecha de toma de la muestra.
3. Conservar las muestras en congelación a $<70^{\circ}\text{C}$ o en su defecto enviarlas con refrigerantes al CIVIHET. Si van a ser enviadas directamente al Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", debe colocarse suficiente hielo seco para garantizar la red de frío y la conservación de la muestra en condiciones de congelación.

6. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE VIRUS GUANARITO

6.1 MANTENIMIENTO DE CULTIVO CELULAR

6.1.1 PRINCIPIO

Los cultivos celulares son ampliamente utilizados para el aislamiento e identificación de una gran variedad de agentes virales. Las líneas celulares son establecidas a partir de diversos tejidos de animales y humanos y replicadas continuamente. Las siguientes líneas celulares pueden ser utilizadas para el aislamiento de arenavirus así como otros agentes virales: Vero, Vero E6, LLC-MK2, RD, BHK-21 y Hela (27).

Las líneas celulares con certificado de sensibilidad y libres de contaminantes conocidos son obtenidas comercialmente, generalmente de la American Type Culture Collection (ATCC). A partir de estos cultivos comerciales se preparan los Bancos Stock y de Trabajo que serán almacenados y/o conservados en nitrógeno líquido hasta su uso posterior, o se replican semanalmente para el uso en el diagnóstico. La sensibilidad de cultivos celulares así como su esterilidad es evaluada como parte del programa de control de calidad del laboratorio.

6.1.2 MATERIALES Y REACTIVOS

Medio D-MEM (Minimal Esencial Medium)

Medio modificado de Eagle's

Solución tripsina-verseno

Suero Fetal Bovino

Solución de bicarbonato de sodio al 7,5%

Solución madre de Penicilina-Estreptomicina

Solución madre de sulfato de Gentamicina

Solución madre de Fungizona

Medio líquido Tioglicolato

Infusión Cerebro Corazón

Medio inclinado Dextrosa-Sabouraud

Frascos de plásticos para crecimiento celular

6.1.3 EQUIPO

Cabina de seguridad biológica con flujo laminar clase II

Microscopio invertido

Estufa a 37°C con 5% CO₂ y 95% de O₂

6.1.4 PROCEDIMIENTO

1. Retirar por aspiración el sobrenadante de la monocapa de cultivo celular.
2. Lavar la monocapa celular con la solución de tripsina-verseno, aspirar el sobrenadante, agregar nuevamente tripsina-verseno.
3. Dependiendo de la línea celular se procede al aspirado en forma inmediata o se la deja reposar por 5 minutos y posteriormente se aspira. Suspender las células del frasco en forma mecánica mediante un pipeteo suave. Agregar medio de cultivo y continuar el pipeteo suave para lograr la dispersión total de las células.
4. Contar las células en el hemocitómetro y se prepara una suspensión celular a una concentración óptima predeterminada para obtener una monocapa celular en 2 a 3 días.

5. La suspensión de células es distribuida en frascos, tubos o placas de cultivo, dependiendo del sistema de trabajo implementado en el laboratorio. Todas las líneas celulares procedentes de mamíferos son incubadas en estufa a 37° C, usando incubador con 5% de CO₂ y 5% de O₂ en caso de recipientes semicerrados.

6.1.5 CONTROL DE CALIDAD

1. Realizar un control cualitativo de cada línea celular durante el replique seriado, para ello se utilizan los siguientes medios: medio líquido tioglicolato, infusión cerebro-corazón y medio inclinado de dextrosa Sabouraud para monitorear, bacterias aeróbicas, anaeróbicas y hongos, respectivamente. Se realiza el análisis para micoplasma cada seis pasajes en cultivos con antibiótico.
2. La sensibilidad de las células debe evaluarse cada 6 pasajes y se recomienda el uso de un máximo de 10 a 15 pasajes continuos a fin de conservar la sensibilidad del diagnóstico.
3. La producción de lotes de células es examinada microscópicamente antes de ser utilizada en los distintos procedimientos diagnósticos.

6.1.6 INTERPRETACIÓN

Cuando se detecte cualquier tipo de contaminante microbiano se procederá a la eliminación del cultivo, previo autoclavado del mismo.

Las líneas celulares son restauradas posteriormente mediante el descongelamiento de las células del Banco de Trabajo.

7. DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO DE LA FIEBRE HEMORRÁGICA VENEZOLANA

7.1 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN EN CULTIVOS CELULARES

7.1.1 PRINCIPIO

El método óptimo para determinar la etiología específica de la FHV requiere del aislamiento del virus Guanarito a partir de una muestra obtenida del paciente en fase aguda de la enfermedad y/o la demostración de un aumento en el título de anticuerpos en una muestra recogida en el período de convalecencia. Una serie de factores dificulta el aislamiento del virus en los pacientes, entre ellas la recolección tardía de las muestras, ya que en muchos casos el virus Guanarito no es detectable después del séptimo día del inicio de los síntomas bien sea porque los niveles de viremia son muy bajos o porque los mismos circulan formando complejos con los

anticuerpos que aún no son detectables. Por esa razón, se recomienda recolectar muestra de sangre para aislamiento viral al inicio de la fase aguda de la enfermedad. El retraso de horas en la recolección del material puede disminuir las probabilidades de aislamiento del virus. Otros factores importantes son: el manejo inapropiado de la muestra, el retraso en el envío del material colectado al laboratorio, etc.

Una variedad de sistemas celulares y ratones lactantes son susceptibles para el aislamiento del virus Guanarito. Sin embargo, la línea celular Vero o Vero-E6 es de las más ampliamente utilizadas. Este arenavirus no produce efecto citopático, por lo que la replicación viral se detecta mediante Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) con antisuero mono específico (32).

7.1.2 MATERIALES Y REACTIVOS:

Cultivo en monocapa de células Vero o Vero E6
Antisuero mono específico de referencia para el virus Guanarito
Antisuero Policlonal y Monoclonales para Flavivirus
Anti IgG de ratón conjugado con isotiocianato de fluoresceína
Solución de diluyente proteico: (PBS) pH 7.2 (0.01 M), SFB y antibiótico.
Medio D-MEM
Medio modificado Eagle's
Solución tripsina-verseno
Suero Fetal Bovino
Solución de bicarbonato de sodio al 7.5%
Solución madre de Penicilina-Estreptomicina
Solución madre de sulfato de Gentamicina
Solución madre de Fungizona

7.1.3 EQUIPOS

Laboratorio de Alta Contención Biológica (BSL/3 ó BSL/4)
Equipo de protección personal recomendado por manual de bioseguridad de la OMS para trabajos en laboratorios de Alta Contención Biológica.
Microscopio invertido
Estufa a 37°C con 5% de CO₂ y 95% de O₂

7.1.4 NORMAS DE BIOSEGURIDAD

Las normas generales junto con las normas especiales de bioseguridad indicadas en el capítulo de bioseguridad deben ser aplicadas al manejar muestras clínicas provenientes de humanos,

roedores y cultivos celulares que potencialmente contengan virus Guanarito u otros agentes altamente patógenos (39).

7.1.5 PROCEDIMIENTO

1. Obtener sueros de pacientes con enfermedad febril aguda; estos pueden ser utilizados sin diluir o diluidos 1:10 y 1:100 utilizando diluyente proteico. Macerar los tejidos procedentes de autopsias y preparar una suspensión al 20%; tratar esta suspensión con solución madre de sulfato de Gentamicina.
2. Inocular 50 ul de la muestra en las monocapas de células Vero-E6 contenidas en tubos o frascos plásticos de 25 cm², e se incubar a 37° C con atmósfera de 5% CO₂ y 95% O₂ durante 10 a 14 días.
3. Debido a que la producción de efectos citopáticos es poco frecuente o en la mayoría de las veces ausente; cosechar los cultivos inoculados y preparar láminas para ser estudiadas por la técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) como se describe más adelante.
4. Reportar inmediatamente los aislados que son identificados como virus Guanarito positivos. Si son confirmados positivamente como flavivirus por IFD, son posteriormente caracterizados por (IFI) mediante el uso de anticuerpos monoclonales específicos para los cuatro serotipos del virus Dengue y/o el virus de Fiebre Amarilla.

7.1.6 CONTROLES DE CALIDAD INTERNO

Control negativo: células Vero E6 sin inocular

Control positivo: inocular periódicamente virus Guanarito previamente valorado, en las células Vero-E6 para evaluar la sensibilidad y especificidad de la línea celular.

7.1.7 INTERPRETACIÓN

Un aislamiento e identificación definitiva de virus Guanarito define la confirmación de un caso sospechoso o probable de FHV. Si se dispone de sueros pareados o de suero de paciente en etapa convaleciente, el aislado viral es probado contra el suero del paciente a fin de verificar la respuesta de anticuerpos al virus aislado.

8. REACCIÓN DE INMUNOFLUORESCENCIA PARA LA IDENTIFICACION DE VIRUS GUANARITO

8.1 PRINCIPIO

La reacción de Inmunofluorescencia (IF) es una herramienta útil que permite la identificación inmunológica específica de los aislados virales. Por otra parte, si se cuenta con virus conocido se puede documentar la presencia de anticuerpos específicos cuando se sospecha su etiología en una enfermedad.

Unidad 1.1.12.- FIEBRE HEMORRÁGICA VENEZOLANA

La reacción de IF Indirecta (IFI) se basa en la incubación del antígeno viral con el antisuero específico y este complejo se hace reaccionar con una inmunoglobulina (IgG) antiespecie conjugada con isotiocianato de fluoresceína. La reacción luego se observa en un microscopio de epi-fluorescencia, el cual debe estar equipado con filtros para luz ultravioleta. (27)

8.2 REACTIVOS

REACCIÓN DE INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

Antisueros específicos no conjugados

Anti-inmunoglobulina (IgG) antiespecie marcada con fluoresceína.

Solución Salina de Fosfato Tamponada: (PBS) pH 7.2 (0.01 M)

Agua Estéril pH 7.0

Glicerina tamponada pH 8.5

Solución de Azul de Evans al 1%

Acetona

8.3 EQUIPOS

Microscopio de epi-iluminación con filtros para luz ultravioleta, con oculares de 10x campo reducido y objetivo seco de 40x. Cabina de seguridad biológica con flujo laminar clase II

8.4 MATERIALES

Láminas portaobjeto de teflón autoclavables de 6, 10 y 12 pozos

Láminas cubreobjeto de vidrio de 24 x 50 mm

8.5 PROCEDIMIENTO

Preparación de láminas

1. Cosechadas las células inoculadas a los 10 y 14 días de incubación, hacer un pase en cultivo y conservar el medio para su almacenamiento en caso de que ocurra un aislamiento positivo.
2. Diluir la suspensión de células cosechadas a fin de obtener cantidad suficiente de células para que puedan adherirse a la lámina.
3. Colocar aproximadamente 10 µl de la suspensión de células a cada pocillo de la lámina y dejar secar a temperatura ambiente.
4. Fijar la lámina con acetona fría por 10 minutos, secar y guardar a -70° C.

8.6 REACCIÓN DE INMUNOFLOURESCENCIA INDIRECTA

1. Diluir el grupo de antisueros policlonales hiperinmunes a la dilución óptima obtenida en la titulación. Agregar 10-12 µl de anticuerpos diluidos en cada pocillo de la lámina incluyendo los controles internos necesarios. Incubar la reacción en una cámara húmeda a 37° C por 30-60 minutos. Posteriormente lavar tres veces con PBS pH 7.2 (0.01 M), por 10 minutos en agitación continua y enjuagar con agua destilada. Dejar secar a temperatura ambiente.
2. Colocar 10-12 µl de la dilución óptima de conjugado anti especie marcado con isotiocianato de fluoresceína. Proceder a la incubación y lavado como se indicó anteriormente.
3. Cubrir la lámina con la solución de montaje, y colocar la laminilla cubreobjeto. Leer las láminas en el microscopio de epi-fluorescencia a 450 nm con filtro de excitación azul. La lectura debe hacerse en un tiempo no mayor a las 24 horas después de haber completado el procedimiento.
4. Una reacción positiva es detectada con una fluorescencia de color verde manzana, a la siguientes escala de valores:

Escala:

- 4+ Células positivas que fluorescen intensamente
- 3+ Células positivas que fluorescen brillantemente
- 2+ Células positivas que fluorescen en un grado menor que el brillante
- 1+ Células con escasa o poca fluorescencia
- +/- Diferentes grados de fluorescencia que pueden o no ser específica
- Células no fluorescentes.

Nota: Sólo si se utiliza una solución de contraste, como el Azul de Evans, las células negativas presentarán un color rojo.

8.7 INTERPRETACIÓN

Deben existir por lo menos 100 células por pocillo para asegurar la precisión de la reacción. Se considera una reacción como positiva, aquella comprendida entre el rango de 2+ a 4+ en la escala de valores de arriba. Aquellas reacciones en donde se observe un patrón de fluorescencia inferior, serán consideradas como negativas.

Nota: Si alguno de los controles no reacciona dentro del rango esperado, la reacción debe ser repetida

8.8 CONTROL DE CALIDAD

Cada nuevo lote de conjugado comercial debe ser titulado antes de su utilización. Para lo cual se eligen tantos anticuerpos antivirales como antígenos homólogos se dispongan en la lámina. Se prepararán diluciones seriadas en base dos, usando PBS pH 7.2 (0.01 M) comenzando por la dilución 1:10 hasta la dilución 1:320.

Control de calidad interno de la prueba:

Controles negativos:

- a. Láminas con células no infectadas son preparadas e incluidas en toda reacción de IFI. Esta lámina permitirá observar la reacción inespecífica entre el anticuerpo y el cultivo de células no infectadas normales utilizadas.
- b. Incluir un suero normal (que sea de la misma especie de la cual proviene la muestra) a fin de que muestre el nivel de fluorescencia no específica entre la especie y las células normales no infectadas utilizadas.

Controles positivos:

- a. Seleccionar una lámina de antígenos homólogos y otra de antígenos no-homólogos para cada antisuero utilizado en la reacción. Esto demostrará que los anticuerpos empleados son específicos para los antígenos, y que no existe ninguna reacción cruzada.

9. DIAGNOSTICO SEROLÓGICO DE VIRUS GUANARITO

9.1 PRINCIPIO

El diagnóstico serológico se realiza por el incremento en el nivel de anticuerpos totales o clase específicas tipo IgG para el virus Guanarito en muestras de suero pareadas recolectadas durante la fase aguda y convaleciente de la enfermedad, utilizando la técnica de inmunofluorescencia indirecta cuantitativa (IFI) y el inmunoensayo enzimático ELISA (32, 34) debido a que la respuesta inmune humoral puede ocurrir tardíamente, se recomienda la toma de muestras de sueros con un mes de intervalo durante la fase de convalecencia.

9.2 NORMAS DE BIOSEGURIDAD

Las normas generales junto con las normas especiales de bioseguridad indicadas en el capítulo de bioseguridad deben ser aplicadas a las muestras y materiales biológicos que

potencialmente contengan virus Guaranito u otros agentes altamente patógenos (39).

9.3 MATERIALES Y REACTIVOS

Phosphate Buffer Saline PBS pH 7.2 (0.01 M)
Agua destilada
Láminas con células infectadas con virus Guaranito
Láminas con células no infectadas
Muestras Suero humano de fase aguda y convaleciente
Conjugado anti IgG humano marcado con fluoresceína
Placas de 96 pozos desechables.

9.4 EQUIPOS

Microscopio de epi-iluminación con filtros para luz ultravioleta, con oculares de 10x campo reducido y objetivo seco de 40x. Cabinas de Seguridad Biológica con flujo laminar clase II

9.5 PROCEDIMIENTO

Preparación de láminas de células Vero E6 infectadas con virus Guaranito:

1. Inocular un cultivo celular en monocapa saludable de células Vero-E6, con el stock de trabajo del virus Guaranito. Las células se cosechan conservando el medio para obtener la "semilla" del virus. El virus Guaranito es inactivado por exposición de la suspensión celular a radiación Gamma 5×10^6 Rads (50,000 Gy).
2. Diluir las células cosechadas con células Vero-E6 no infectada y preparar la suspensión celular con una cantidad suficiente de células que pueda adherirse a la lámina.
3. Colocar aproximadamente 10 μ l de la dilución de células a cada pocillo de la lámina. Dejar secar la lámina por un tiempo de 2 horas. Fijar la lámina con acetona fría por 10 minutos, secar y almacenar a -70° C.

9.6 REACCIÓN DE INMUNOFLUORESCENCIA

1. Inactivar los sueros a 56° C durante 1 hora en baño de maría
2. Preparar las diluciones seriadas de los sueros en PBS pH 7.2 (0.01 M) usando el factor 4 de dilución.
3. Agregar 10 μ l de cada dilución a los pocillos correspondientes en la lámina. Incubar a 37° C en cámara húmeda por 45 minutos.
4. Lavar tres veces con PBS pH 7.2 (0.01 M), por 10 minutos y enjuagar con agua destilada. Seguidamente dejar secar los frotis a temperatura ambiente.

Unidad 1.1.12.- FIEBRE HEMORRÁGICA VENEZOLANA

5. Agregar a cada pocillo 10µl de conjugado anti-IgG humano a la dilución óptima predeterminada. Incubar a 37° C en cámara húmeda por 45 minutos y lavar las láminas como se indicó en el paso anterior.
6. Secar las láminas porta objeto a temperatura ambiente y colocar el medio de montaje. Leer al microscopio de epi-fluorescencia a 450 nm con filtro de excitación azul.

9.7 INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Presencia de reacción fluorescente característica 4+, observada a nivel del citoplasma de las células infectadas, en forma de granitos de arena, o de puntuación intracitoplasmática se considera como un criterio de confirmación diagnóstica de la presencia de anticuerpos para el virus Guanarito.

Cuando al estudiar sueros pareados tomados en las fases aguda y convaleciente, se observa ausencia de anticuerpos específicos para el virus Guanarito en la fase aguda y un incremento en los niveles de anticuerpos en la fase convaleciente de la enfermedad se confirma que el paciente sufrió una infección reciente por virus Guanarito.

En los estudios de seroprevalencia, los valores de anticuerpos para el virus Guanarito \geq a 1:10 en un suero único, serán confirmatorios de posible infección pasada por este virus.

10. TÉCNICA DE ELISA PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CLASE IGG PARA EL VIRUS GUANARITO

10.1 PRINCIPIO

La reacción de ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos clase IgG tiene un principio similar a la técnica de inmunofluorescencia, pero tiene la ventaja de ser menos subjetiva, por lo tanto es una herramienta muy útil y una alternativa para el diagnóstico serológico.

La técnica de ELISA de captura de anticuerpos IgG para el virus Guanarito se realiza en cuatro pasos: el antisuero específico para el virus Guanarito el cual se fija a una superficie sólida usando microplacas de 96 pozos ó tiras de 8 pozos, se añade luego el antígeno viral de Guanarito (previamente inactivado por radiación gamma), seguido por el suero del paciente, se incuba y lava para luego detectar este complejo con una anti inmunoglobulina (IgG) humana conjugada con un marcador enzimático.

10.2 MATERIALES Y REACTIVOS

Solución de Captura: Buffer carbonato/bicarbonato pH 9.6

Solución de lavado: Phosphate Buffer Saline (PBS), 0.05% Tween 20, pH 7.2.

Solución de Bloqueo: PBS con 5% leche descremada, 0.1% Tween-20.

Solución de dilución: PBS con 5% albúmina bovina

Unidad 1.1.12.- FIEBRE HEMORRÁGICA VENEZOLANA

Anticuerpo de captura: fluido ascítico hiperimmune contra virus Guanarito.
Control positivo: sueros humanos con anticuerpos contra virus Guanarito
Controles negativos: sueros humanos sin anticuerpos contra virus Guanarito.
Muestras problema: suero humano de fase aguda y convaleciente.
Antígeno viral: lizado celular de virus Guanarito previamente titulado
Antígeno Normal: lizado de células Vero-E6 normales
Conjugado anti IgG humano marcado con fosfatasa alcalina
Substrato: 3 mg/ml p-nitrophenyl fosfato disodium
Solución stop: 3M NaOH
Placas: Immulon II HB de fondo plano 96 pocillos.
Tips para micropipetas y pipetas multicanales.

10.3 EQUIPOS

Lavador de microplacas
Lector de ELISA
Estufa a 37°C
Micropipetas y pipetas multicanales
Recipientes para reactivos
Papel toalla
Cabina de seguridad biológica con flujo laminar clase II

10.4 NORMAS DE BIOSEGURIDAD

Las normas generales junto con las normas especiales de bioseguridad indicadas en el capítulo de bioseguridad deben ser aplicadas a las muestras y materiales biológicos que potencialmente contengan virus Guanarito u otros agentes altamente patógenos (39).

10.5 PREPARACIÓN DE ANTÍGENO DE VIRUS GUANARITO Y DE CÉLULAS NORMALES

1. Inocular un cultivo en monocapa de células Vero-E6 de con el stock del virus Guanarito e incubar durante 8 días a 37° C.
2. Cosechar las células infectadas, remover el medio de cultivo y lizar las células usando solución borato salino pH 9.0 conteniendo 1% Tritón -X100. Utilizar una monocapa de células no infectadas como control normal.
3. Incubar las células a 37° C por 1 hora. Almacenar el lizado celular a - 70° C hasta su uso. Aunque el tratamiento con detergente (Tritón 100X) usualmente inactiva la infectividad del virus, el antígeno debe considerarse como material infeccioso. El virus Guanarito es inactivado por exposición de la suspensión celular a radiación Gamma 5x10⁶ Rads (50,000 Gy).

10.6 PROCEDIMIENTO

1. Cubrir los pozos de la microplaca con 75µl de una dilución óptima de fluido ascítico hiperinmune contra virus Guanarito diluido en tampón de captura. Se incuba durante toda la noche a 4° C en cámara húmeda.
2. Desechar el contenido de la microplaca y se añade 200 µl de tampón de bloqueo en cada pozo. Incubar a temperatura ambiente por 30 minutos y luego lavar los pocillos 5 veces con tampón de lavado.
3. Añadir 75 µl en los pocillos correspondientes, los antígenos de Guanarito y células normales a la dilución óptima en tampón de dilución, se incuba a 37° C por 1 hora en cámara húmeda. y luego se lavan los pocillos 5 veces con tampón de lavado.
4. Se añaden por duplicado 50 µl de cada suero problema y de los controles internos diluidos en tampón de dilución 1:400 en los pozos correspondientes de la placa. Incubar toda la noche a 4° C en una cámara húmeda luego se procede al lavado de los pozos 5 veces con tampón de lavado.
5. Añadir 50 µl. de anti IgG humana conjugada con fosfatasa alcalina por pozo, la reacción se incubar 1 hora a 37° C en cámara húmeda.
6. Realizar el proceso de lavado secar y agregar 75 µl por pozo de sustrato de la enzima. Inmediatamente cubrir la placa de la luz. Incubar a temperatura ambiente por 30 minutos.
7. Un color amarillo se desarrolla en presencia de anticuerpos. Al finalizar la incubación agregar 35 µl por pozo de solución stop para detener la reacción Dejar la placa a temperatura ambiente por 1 minuto.
8. Leer la placa con lector de ELISA utilizando filtro de 450 nm.

10.7 CÁLCULOS

1. Determine el promedio de los valores de absorbancia del antígeno normal y los sueros control negativo
2. Cálculo de valores P-N
 - a. Calcule el promedio de absorbancia en los pozos conteniendo antígeno Guanarito (P) para cada suero
 - b. Calcule el promedio de absorbancia en los pozos conteniendo antígeno de células normales (N) para cada suero
 - c. Determine la diferencia entre P-N
3. Cálculo del valor de corte (Cutoff)
 - a. Determine el promedio P-N usando los controles positivos y negativos
 - b. Determine la Desviación Standard (DS)
 - c. Multiplique la DS por 3 y súmelo al promedio. Este valor corresponde al valor alto de corte.
 - d. Multiplique la DS por 2 y súmelo al promedio. Este valor corresponde al valor bajo de corte.

10.8 INTERPRETACIÓN

1. Compare cada valor P-N de cada suero problema con el valor de corte.
2. Valores mayores o iguales del valor de corte alto se consideran positivos.
3. Los valores entre los valores de corte bajo y alto son considerados indeterminados
4. Los valores por debajo del valor de corte bajo se consideran negativos.

11. TRASCRIPTIÓN REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR) PARA LA DETECCIÓN GENÓMICA PARCIAL DEL VIRUS GUANARITO.

PRINCIPIO

La RT-PCR genera múltiples copias de un segmento de nucleótidos de una secuencia blanco en el genoma del virus en estudio usando mínimas cantidades de material genético viral para confirmar la presencia del virus en la muestra del paciente o el cultivo celular de laboratorio infectado.

REACTIVOS Y MEDIOS

QIAGEN RNA extraction kit part N° 5204

Titan One tube RT-PCR kit Cat. #1939823 (Roche Diagnostics Corporation)

H₂O DEPC (Diethyl pyrocarbonate)

Primer 1 Primer 2

Positive RNA control (ARN de Guanarito)

Negative RNA control (sobrenadante de cultivo celular)

Negative PCR control

Agarosa

NuSieve agarosa

Buffer 25X TAE

Distilled water

Bromuro de Ethidium

Marcador de peso molecular 100 bps

PROCEDIMIENTO

1. EXTRACCIÓN DEL RNA VIRAL

Extraer el RNA del virus Guanarito a partir de 140 ul del suero agudo del paciente usando el estuche comercial para extracción de RNA (QIAGEN part # 52904). Siguiendo exactamente el protocolo del fabricante. Incluir los controles respectivos al mismo tiempo que las muestras.

2. REACCIÓN RT-PCR

Utilizando el estuche comercial TITAN RT-PCR (Roche Molecular Biochemicals # 1 939 823), producir el ADNc. Utilizar 5µl de RNA viral y 50 pmoles de cada par de primers en un volumen total de la reacción de 50µl.

Unidad 1.1.12.- FIEBRE HEMORRÁGICA VENEZOLANA

Hacer una “mezcla maestra” de acuerdo al número de reacciones, usando las proporciones de los componentes que se indican a continuación:

REACTIVOS VOLUMEN POR REACCION

Agua libre de RNasas	29.4 ul
5X RT-PCR buffer (TITAN Kit)	10.0 ul
dNTP stock [10 mM]	1.0 ul
0.1 M Dithiothreitol (TITAN Kit)	2.5 ul
Primer 1 [50 pmoles]	0.5 ul
Primer 2 [50 pmoles]	0.5 ul
RNasin (40U/ul)	0.1 ul
RT/TAQ mix (TITAN Kit)	1.0 ul

De ser necesario, cubrir la reacción con 50 µl de aceite mineral, luego pasar los tubos al termociclador.

Condiciones de amplificación en el termociclador:

1 ciclo: 45°C por 1 hora, 94°C 2 minutos

40 ciclos: 94 °C 30 segundos, 45 °C 1 minuto, 68 °C 2 minutos, 68°C 7 minutos, 4°C ∞

Secuencia de los primers de esta prueba:

Primer	Tamaño	Secuencia 5´- 3´
Primer 1 (1010C)	17	tciggigaiggitggcc
Primer 2 (1696R)	25	aiatgatgcagtcgaiigigcaca

12. ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA DE LOS PRODUCTOS DE LA REACCIÓN

12.1 PRINCIPIO

La electroforesis es el método estándar que se usa para separar, identificar y purificar macro moléculas de ácidos nucleicos basándose en el tamaño, carga eléctrica y otras propiedades físico-químicas. Este principio parte del hecho de que las partículas de la muestra que están cargadas, migran en un campo eléctrico.

12.2 PROCEDIMIENTO

Después de 40 ciclos de amplificación, una porción de 5 µl del producto es analizado por electroforesis en gel de agarosa al 3.5%.

1. Preparar una mezcla NuSieve: gel de agarosa 3:1
2. Calentar en microondas la solución de agarosa por 2 minutos, luego enfriar la solución a 50°C.
3. Agregar bromuro de ethidium hasta alcanzar una concentración final de 0.5 µg/ml
4. Mezclar y colocar la solución de agarosa dentro de la cámara de electroforesis para formar el gel. Dejar al aire libre hasta que la agarosa polimerice.
5. Correr 5 µl del producto de PCR y dejar que la electroforesis continúe hasta que se alcance la resolución requerida.
6. Verifique la corrida electroforética con un transiluminador de luz UV.

12.3 INTERPRETACIÓN

La presencia de una banda de 686 bps tanto en el control positivo como en la muestra en estudio, evidencia la detección del producto amplificado para el virus Guanarito.

Si existiera presencia de bandas en los respectivos controles negativos, la prueba quedará invalidada.

V

NORMAS GENERALES Y ESPECIALES DE SEGURIDAD BIOLÓGICA

1. NORMAS GENERALES Y ESPECIALES DE SEGURIDAD BIOLÓGICA

De acuerdo a la clasificación internacional de los agentes patógenos por el nivel de riesgo biológico, el virus Guanarito se agrupa dentro del nivel N° 4 que corresponde a patógenos responsables de enfermedades de alta letalidad en el humano (39). Por lo tanto se recomienda la aplicación de normas generales y especiales para la protección biológica de los operadores y del medio ambiente.

1.1 NORMAS GENERALES DE SEGURIDAD BIOLÓGICA PARA EL PERSONAL DE SALUD

El personal de salud debe aplicar las normas de seguridad biológica establecidas por la Organización Mundial de la Salud y por la institución de salud donde presta servicio que en forma general son:

- 1) Debe despojarse de reloj, anillos u otro tipo de prendas, usar uniforme, guantes y mascarilla desechables para la atención del paciente, manejo de sus excreciones y de las muestras tomadas para los respectivos estudios de laboratorio.
- 2) Debe lavarse las manos con agua y jabón abundantes inmediatamente después de haber tenido contacto con sangre, saliva, líquido cefalorraquídeo, excreciones, etc. del paciente.
- 3) Utilizar las medidas preventivas para evitar infecciones nosocomiales. Se recomiendan cuartos privados y restricción de las visitas. Individualizar para el enfermo: termómetro, riñonera y desinfectarlo diariamente.
- 4) Utilizar jeringas y agujas desechables para la administración de medicamentos por vía parenteral.
- 5) Depositar en recipientes rígidos los materiales de desecho punzo penetrantes o cortantes; estos recipientes deberán ser debidamente identificados y rotulados como "Material Contaminado"
- 6) Depositar el instrumental quirúrgico contaminado con sangre, secreciones o tejidos etc. en recipientes que contengan solución de hipoclorito de sodio al 1% durante una hora antes de ser lavado con agua abundante y esterilización al seco.
- 7) Depositar los residuos líquidos como sangre entera, líquidos de succión, excreciones y secreciones en recipientes conteniendo solución de hipoclorito de sodio al 1% antes de ser eliminados en sumidero.
- 8) Depositar los desechos sólidos tales como apósitos residuos anatomopatológicos y de laboratorio en bolsas de plástico de alta resistencia y debidamente identificadas como "Material Contaminado" para su incineración o desinfección en autoclave.
- 9) Colocar en bolsas impermeables la ropa del enfermo y rotularla como "Material Contaminado"
- 10) Desinfectar las paredes, pisos, techos, puertas, sillas, mesas etc. contaminadas u otros líquidos provenientes del enfermo, inmediatamente con solución de hipoclorito de sodio al 1% luego se lavaran con abundante agua y jabón.
- 11) Cubrir el colchón y apoyabrazos con funda plástica impermeable.
- 12) Incinerar todo el material desechable.
- 13) Colocar las muestras de sangre, orina, heces etc. en un recipiente con tapa de seguridad para evitar derrames accidentales durante el transporte.
- 14) Recomendar a los familiares del paciente las medidas higiénicas o sanitarias correspondientes.
- 15) Cuidados post-morten:
 - a. El camillero debe usar bata y mascarilla al trasladar el cadáver a la morgue.
 - b. El personal de enfermería debe usar bata, gorro, mascarilla y guantes para practicar los cuidados post-morten.
 - c. Retirar la colchoneta de la camilla que transporta el cadáver y desinfectarla con hipoclorito de sodio al 1%

- d.El ascensor donde se traslada el cadáver no debe detenerse en ningún piso intermedio y debe trasladar solamente el cadáver y al camillero.
- 16) Cuidados durante la autopsia.
- a.El personal debe usar uniformes desechables, doble guantes, y respirador-purificador con filtros HEPA
 - b. Utilizar material quirúrgico desechable y depositar en recipientes rígidos los materiales de desecho punzo penetrantes o cortantes; estos recipientes deberán ser debidamente identificados y rotulados como “Material Contaminado”
 - c. Depositar los desechos sólidos tales como apósitos residuos anatomopatológicos y de laboratorio en bolsas de plástico de alta resistencia y debidamente identificadas como “Material Contaminado” para su incineración o desinfección en autoclave.

1.2 NORMAS DE SEGURIDAD BIOLÓGICA DURANTE LA MANIPULACIÓN DE ROEDORES

Los trabajadores que realizan actividades de control de roedores, captura, clasificación, recolección de muestras de sangre, orina, tejidos o desecación etc. están expuestos a un alto riesgo de infección por virus Guaranito, Hantavirus y otros patógenos. Por lo tanto debe seguir las siguientes precauciones generales:

- 1) La zona de trabajo en el campo debe estar alejada de las viviendas rurales, en espacios abiertos y sombreados.
- 2) La ubicación de las mesas de trabajo y los operadores debe hacerse en el sentido de la dirección del viento.
- 3) Utilizar equipo de protección personal: respirador-purificador con filtros HEPA, uniformes desechables y guantes. Lavarse las manos después de cada faena. No llevarse a la boca fragmentos de maleza. No ingerir alimentos en las áreas de trabajo.
- 4) Anestesiarse en forma apropiada a los animales antes de manipularlos.
- 5) Minimizar la creación de aerosoles.
- 6) Utilizar material quirúrgico desechable o en su defecto desinfectar el material sumergiéndolo en solución de hipoclorito de sodio al 5% antes de ser lavado con agua abundante.
- 7) Desinfectar cuidadosamente todos los espacios de trabajo, equipos o ropas contaminadas.
- 8) Eliminar los cadáveres de animales y desechos de material contaminado mediante incineración en un área preseleccionada dentro del espacio de trabajo.

El personal que realiza las actividades de control o manipulación de roedores debe conocer los riesgos de adquirir infecciones transmitidas por estos vectores y requiere el entrenamiento continuo para minimizar los riesgos de accidente por exposición.

1.3 NORMAS DE SEGURIDAD BIOLÓGICA PARA EL TRANSPORTE DE MATERIAL INFECCIOSO

De acuerdo a las regulaciones de la Organización Mundial de la Salud, se define como material infeccioso la sustancia que contiene un microorganismo viable tal como: bacterias, virus, parásitos u hongos etc. que se sabe o se cree que causa enfermedad en animales o humanos.

Para el transporte seguro de material infeccioso deben observarse las siguientes indicaciones:

1. Los recipientes que contienen las muestras deben ser herméticos y a prueba de fugas de líquido.
2. Si el recipiente es un vial debe ser cerrado herméticamente con tapa de rosca.
3. Empacar en papel absorbente y colocarse en un recipiente secundario de metal o plástico a prueba de fugas.
4. El recipiente secundario se coloca en el recipiente externo (cava) para su envío
5. Etiquetar el paquete con la siguiente información:
 - a. Nombre, dirección y número telefónico del consignatario.
 - b. Nombre dirección y número telefónico del remitente.
 - c. La frase "Material Clínico para Diagnóstico"

1.4 NORMAS GENERALES DE SEGURIDAD BIOLÓGICA EN EL LABORATORIO

1. El acceso al laboratorio debe ser restringido y limitado al personal que trabaja en el área.
2. No está permitido: comer, beber, fumar, almacenar alimentos o aplicarse cosméticos en las áreas de trabajo.
3. Es prohibido pipetear con la boca.
4. Todos los procedimientos deben realizarse en gabinetes de seguridad biológica, minimizando la creación y dispersión de aerosoles.
5. Usar bata y guantes de laboratorio, retirarlos y lavarse las manos después de manipular material infeccioso y/o al salir del laboratorio.
6. Los recipientes que contengan material infeccioso deben abrirse y cerrarse utilizando una torunda impregnada con solución desinfectante.
7. Desinfectar las superficies de trabajo después de manejar o derrame accidental de material infeccioso.
8. Autoclavar o incinerar todo recipiente que contenga o haya estado en contacto con material infeccioso. Los líquidos infecciosos deben ser desechados en recipientes que contengan hipoclorito de sodio al 5%.

9. Reemplazar en lo posible el material de vidrio por material desechable y restringir el uso de material punzante o cortante.

10. El personal debe estar informado y recibir entrenamiento periódico sobre las precauciones para prevenir exposición.

1.5 NORMAS ESPECIALES PARA LA MANIPULACIÓN DE PATÓGENOS DE NIVEL BIOLÓGICO 4

Las normas generales junto con las siguientes normas especiales deben ser aplicadas al manejar muestras clínicas provenientes de humanos o roedores y cultivos virales que potencialmente contengan virus Guaranito u otros agentes altamente patógenos.

El manejo debe realizarse en laboratorios de alta contención biológica (BL3+/BL4).

1. El funcionamiento correcto del sistema de ventilación, gabinetes biológicos y alarmas deben ser evaluados antes de iniciar cada faena de trabajo.
2. El operador debe utilizar mascarar protectoras con sistema HEPA para la filtración de aire.
3. Cambiarse la ropa por uniformes desechables y utilizar dos pares de guantes.
4. Todo el material debe ser desechable, autoclavarse antes de salir del laboratorio para ser luego incinerado.
5. No está permitido interrumpir las actividades iniciadas y minimizar los movimientos en el área de trabajo que produzca perturbación del sistema de aire.
6. Los equipos y recipientes que contengan material de alto riesgo deben ser debidamente identificados.
7. En caso de accidente por derrame de material potencialmente infeccioso debe procederse de la siguiente manera:
 - a. Cubrir el material derramado con suficiente papel absorbente
 - b. Aplicar solución de hipoclorito de sodio y dejar actuar el desinfectante durante 20-30 min.
 - c. Proceder a la recolección y limpieza en forma regular.
 - d. Reportar el accidente al jefe del laboratorio.

MEDIDAS DE PREVENCIÓN PARA REDUCIR EL RIESGO DE INFECCIÓN POR VIRUS GUANARITO

1. ACCIONES PARA LA PREVENCIÓN

Las medidas profilácticas recomendadas en la prevención de las fiebres hemorrágicas por arnavirus tienen como puntos comunes lograr la interrupción de la transmisión del virus desde los roedores a los humanos, de persona a persona, y del material de laboratorio infectado al personal que realiza los estudios.

El control de roedores mediante la eliminación de los mismos, fue una medida efectiva para la disminución de la FHB. Sin embargo esta medida de control con el *Mastomys nataliensis* ha tenido resultados poco efectivos en la fiebre de Lassa, a pesar de que este roedor tiene hábitos domésticos. (El control ecológico del *Calomys musculinus* en Argentina ha sido difícil siendo una alternativa la sustitución de cultivos para controlar la población de este roedor.

En la FHV los estudios realizados indican que el hombre está a riesgo de infección tanto en la casa como en los campos de siembra. El control de roedores silvestres en tan amplias extensiones geográficas agrícolas, no es factible y tampoco aconsejable porque conduciría a un grave desequilibrio ecológico, por lo tanto las recomendaciones van dirigidas especialmente para reducir la probabilidad de que el *Zygodontomys brevicauda* (Zb) incursione en ambientes domésticos y peridomésticos. Debido a que no existen normas específicas para la prevención de esta patología y el control del roedor reservorio del virus Guanarito, las medidas generales de prevención y control pueden agruparse de la siguiente manera:

1. Manejo de hábitats
2. Saneamiento de ambientes doméstico y peridoméstico.
3. Medidas de protección personal
4. Educación y participación comunitaria

2. MANEJO DE HABITATS

De acuerdo a la distribución del Zb, el esfuerzo de control debe concentrarse en la reducción de su hábitat, recomendándose las siguientes medidas:

1. Eliminación sistemática de la vegetación herbácea en los bordes de los cultivos mecanizados.
2. Limpieza periódica de la vegetación aledaña a cercas de potreros.

3. Rotación de los potreros utilizados en ganadería, así como el pastoreo intensivo de los mismos.
4. Promover el control biológico mediante desarrollo de técnicas que favorezcan la permanencia y reproducción de especies depredadoras.

3. SANEAMIENTO DE AMBIENTES DOMESTICO Y PERIDOMÉSTICO

Las medidas deben estar dirigidas a disminuir la densidad poblacional de roedores en el ámbito domiciliario y peri domiciliario. Las prácticas generales para evitar la infestación de las viviendas por roedores son:

1. Utilizar malla de acero o cemento para sellar, aislar o cubrir todos los orificios, que existan en la vivienda, con un diámetro de 0,5 cm o mayor.
2. Instalar protectores metálicos como barrera contra roedores, alrededor de la base de habitaciones de madera, arcilla o adobe, hasta una altura de 30 cm y una profundidad de 15 cm.
3. Colocar 10 cm de grava debajo de la base de las viviendas u otras casas rodantes, para evitar que los roedores hagan túneles.
4. Disminuir las posibilidades de que los roedores hagan madrigueras y cuenten con alimentos, en un radio de 30 metros de la vivienda.
5. Cortar hierbas, arbustos y malezas densas en un radio de 30 metros de la vivienda.
6. Utilizar cimientos altos de cementos en la construcción de cobertizos, establos, anexos o depósitos de leñas.
7. En la medida de lo posible, situar los depósitos de leña a una distancia de 30 metros o más de las casas, y procurar que los leños estén separados unos 30 cm del suelo
8. Almacenar los granos y alimentos para animales en recipientes a prueba de roedores.
9. Cerca de las casas, eliminar los elementos que pudieran atraer a los roedores o almacenar los alimentos y el agua en recipientes a prueba de roedores.
10. No dejar alimento para mascotas en sus platos o bandejas.
11. Colocar la basura y los desperdicios en recipientes a prueba de roedores que estén como mínimo a 30 cm de altura del suelo.
12. Disponer en sitios lejanos la basura, vehículos abandonados, neumáticos desechados u otros artículos que pudieran servir de nido a los roedores.
13. Eliminar la maleza y sitios que posiblemente sirvan de madriguera a los roedores en un radio de 30 metros de la vivienda.

4. MEDIDAS DE PROTECCIÓN PERSONAL PARA TRABAJADORES DEL MEDIO RURAL

La educación sanitaria del trabajador del medio rural en áreas endémicas de FHV debe estar orientada a reconocer el riesgo de infección de patógenos transmitidos por roedores o sus excretas, reducir el contacto durante las faenas en el campo y el hogar, asegurar la búsqueda de atención médica temprana ante la presencia de manifestaciones clínicas de la enfermedad.

Para reducir el riesgo de exposición y contacto con roedores se recomienda tomar las siguientes precauciones:

1. Uso de calzado cerrado, guantes y ropa que cubran la piel.
2. Lavar bien con vinagre los vegetales o hervir las verduras antes de consumirlas.
3. Realizar higiene cuidadosa de las manos y cambiar de ropa cuando se frecuenta lugares infectados con roedores.
4. Evitar llevarse malezas a la boca, acostarse directamente en el suelo o el pasto.
5. Ventilar las habitaciones y galpones que hayan estado cerrados largo tiempo por lo menos una hora antes de entrar.
6. Reducir la formación de aerosoles durante las labores de limpieza.

5. EDUCACIÓN Y PARTICIPACIÓN COMUNITARIA

En las localidades declaradas como endémicas o de riesgo de FHV realizar programas educativos recurriéndose a charlas en comunidades, programas radiales, afiches etc. a fin de que las comunidades conozcan los signos y síntomas de la enfermedad, medidas para reducir el riesgo de adquirirla, acciones en caso epidemias, conducta a seguir ante la presencia de un caso sospechoso en función de acudir al establecimiento de salud más cercano para atención médica apropiada.

BIBLIOGRAFÍA

1. Añon MC, Grau O, Martínez Z, y Col. RNA composition of Junin virus. *J Virol* 1976; 18: 833-8.
2. Arias, E Roselli, C. Gamboa, MA. Tirado. Infección por Arenavirus en Venezuela Centro Medico,1999 ; Vol. 44 N°2,
3. Buchmeier M.J. Clegg, J.C. Franze Fernandez M.T., Kalakofsky D., Pete C.J., y Southern P.J Family Arenaviridae. Sixth report of International Committee on Taxonomy of viruses. New York Springe-verlag. 1995: 319-23.
4. Bishop D H: Arenavirus and their replication. In Field B N y Col (eds): Field's Virology. New York, Raven Press, 1990, 1231-43.
5. Bowen MD, Peter CJ., y Stuart N. The phylogeny of new world (Tacaribe Complex) Arenavirus. *Virology*1996;. 129: 285- 90.
6. Bowen Md., Rollin, PE., Ksiasek T.G., Hustad H.L., Bausch D.G., Demby A.H., Nichol St. Genetic divergence among Lassa strains *J. Virol.* 2000: 74: 6992-7004.
7. Busch M, Kravetz F O, Percich R E, y Col. Proposal for an ecological control of Argentine Hemorrhagic Fever by the management of the habitat. *Medicina (Buenos Aires)*1984; 44:34-40.
8. Cassal J., Buckley SM., Cedeno R. Antigenic properties of the arenavirus. *Bull Who*1975; 52:421-27.
9. Charrel R.N., Lemasson J.J., Garbutt M., Khelifa R., De Micco P., Feldmann H. New insights into evolutionary relationships between arenaviruses provided by comparative analysis of small and large segments sequences. *Viol.* 2003, 317: 191-96.
10. Childs JE. y Peter CJ. Ecology and epidemiology of arenaviruses and their hosts. In *The Arenaviridae*. MS. Salvato (Ed) Plenum press. NY. 1993;175-87.
11. Damonte. E B Coto C E. Análisis de factores que condicionan la formación de placas en células Vero infectadas con los virus Junin y Tacaribe. *Rev. Asoc Argent Microbiología*1974; 6:15-22.
12. Damonte. E B, Music S E, Coto C E. Response of cells persistently infected with arenaviruses to superinfeccion with homotypic and heterotypic virus. *Virology* 1983; 129:474-78.
13. Eisenberg, J. *Mammals of the new Tropics* 1989; Vol 1 : 343.
14. Enria D., Feuillade M.R. Argentine hemorrhagic fever (Junin virus-Arenaviridae). A review on clinical, epidemical, ecological, treated and preventive aspects of the disease. In *Travassos da Rosa A.P., Vanconcelos PFC. An overview of arbovirology in Brasil and neighboring countries.* Instituto Evandro Chagas. 1998: 129-228.

15. Fulhorst C., Bowen M., Salas RA., de Manzione N., Duno G., Utrera A., Ksiazek T., Peters CJ., Nichol S., de Miller E., Tovar D., Ramos B., Vásquez C., and Tesh, R. Isolation and Characterization of Pirital virus a newly discovered South American Arenavirus. *Am. J. Trop. Med* 1997; 56(5): 548-53.
16. Fulhorst C, Monroe MC., Salas RA., Duno G., Utrera A., Ksiazek T, et al. Isolation, characterization and geographic distribution of Caño Delgadito virus, a newly discovered South American hantavirus (family Bunyaviridae). *Virus Research* 1997; 51:159-177.
17. Gonzales JP., Sanches A., y Ric o-Hesse R. Molecular phylogeny of Guanarito virus an emerging arenavirus affecting humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1995; 53(1) 1-6..
18. Informes técnicos trimestrales referentes a los avances en la investigación clínica-epidemiológica-virológica-ecológica de la Fiebre Hemorrágica Venezolana. Archivos: Ministerio de Sanidad y Asistencia Social, Organización Panamericana de la Salud y University of Texas Medical Branch. 1992- 1998.
19. Johnson K.M., Weinbenga NG., Mackenzie RB. Virus isolation in human cases of hemorrhagic fever in Bolivia. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1965; 118: 113.
20. Maiztegui J. Fiebre hemorrágica Argentina. In Gorodner (des): *Infectología*, capítulo 11. Argentina, López Libreros Eds, 1989: 111-12.
21. McCormick JB., King YL., Webb PA., Lassa fever: effective therapy with ribavirin. *N. Engl. J. Med.* 1986; 314: 2-26.
22. de Manzione N, Salas RA., Paredes H., Godoy O., Rojas L., Aroz F., Fulhorst C., Ksiazek T., Mills J. Ellis B., Peters CJ. Tesh R. Venezuelan Hemorrhagic Fever: Clinical and Epidemiological studies of 165 Cases, *Clin. Infect. Dis.* 1998; 26:308-13.
23. Murphy FA., Webb, PA., Johnson, KM., Morphological comparison of Machupo with LCM virus. Basis for a new taxonomic group. *J. Virol* 1969; 4: 535-41..
24. Peters CJ., Buchmeier M., Rollin P.E., and Ksiazek T. Arenavirus. In Field B N y Col (eds): *Fields Virology*, New York, , Raven Press, 2003:1521-52.
25. Peter CJ. Viral hemorrhagic fevers. In *Viral pathogenesis*. Neal Nathanson Ed. Lippincott Raven, 1997; 32: 779 -95.
26. Sabattini MS. y Contigiani Ms. Ecological and biological factors influencing the maintenance of arenavirus in nature, with especial reference to the agent of Argentine hemorrhagic fever. *International Symposium of Tropical Arbovirus and hemorrhagic fevers. Brazil* .1986.
27. Schmidt N.J. Lennette E.H eds. *Diagnostic procedures for viral rickettsial and chlamydial infections*. 5th ed. Washington DC. American Public Health Association. 1979.
28. Salas RA., de Manzione N Tesh R. Fiebre Hemorrágica Venezolana: ocho años de Observación. *Acta Científica Venezolana* 1998; (49) Sup1: 46-51..
29. Salas RA., Miller E, Borges R., Tovar D., Vásquez T., Ramos B., Hernández R. Cáceres B., Morón D., Fernández Z, Duno G., Utrera A., de Manzione N, Fulhorst C, Tesh R.. Incidencia de la infección por virus Pirital en roedores de la especie *Sigmodon Alstoni*.

Efectos de la infección sobre la especie. Rev. del Inst. Nac. De Higiene "Rafael Rangel"1998; (29): 25-30.

30. Salas RA., de Manzione N., Tesh, R. Rico-Hesse R., Shope R., Betancurt A., Godoy O., Bruzual R., Pacheco M., Ramos B., Taibo M., Tamayo G, Jaimes E, Vásquez C, Araoz F., Querales J., Venezuelan Hemorrhagic Fever Lancet,1991;(3): 1033..

31. Tesh R., Wilson M., Salas RA., de Manzione N., Tovar D., Zsiasek G., Peter CJ. Field studies on the epidemiology of Venezuelan hemorrhagic fever: implication of the cotton rat *Sigmodon alstoni* as the probable rodent reservoir. Am. J. Trop. Med. Hyg.1993;(49) 2:227 - 35.

32. Tesh R., Jahrling P., Salas RA., and Shope R. Description of Guanarito virus (Arenaviridae: Arenavirus), The Etiologic Agent of Venezuelan Hemorrhagic Fever Am. J. Trop. med Hyg 1994;(50)4: 452- 59..

33. Tesh R.B., Salas R.A., Fulhorst C.F., Manzione N., Duno G., Weaver SC., Utrera A., Paredes H., Ellis B.A., Mills J., Bowen M.D., Ksiasek T.G., Epidemiology of arbovirus in the Americas. In factors in the emergence and control of rodent-borne viral diseases. Saluzzo J.F Dodet B. Eds. Editions Scientifiques et medicales. Elsevier. SAS 1999:213-221.

34. Utrera A., Duno G., Ellis B., Salas RA., Manzione N., Fulhorst F., Tesh R., Mills J. Small mammals in agricultural areas of the western llanos of Venezuela: community structure, habitat associations, and relative densities. J. Mammalogy,2000 ;(81)2: 536-48.

35. Vainrub B. y Salas RA Latin American Hemorrhagic Fever. Inf. Dis Clin. North. Am. 1994;(8)1.

36. Voss R. An introduction to the neotropical Muroid rodent genus *Zygodontomys*. Bull. Am. Museum Nat. History NY1991: 210..

37. Weaver S., Salas RA., de Manzione N., Fulhorst C., Travasos Da Rosa A., Duno G., Utrera A., Mills J., Ksiasek T., Tovar D., Guzmán H., Kang W., and Tesh R., Extreme Genetic Diversity among Pirital virus.(Arenaviridae) Isolates from Western Venezuela Virology2001; 285:110-18.

38. Weaver S., R.S. Salas, N. de Manzione, CH. Fulhorst, G. Duno, A. Utrera, J. Mills, T. Ksiasek, D. Tovar, and R. Tesh. Guanarito virus (Arenaviridae) Isolates from Endemic and Outlying Localities in Venezuela: Sequence Comparisons Among and Within Strains Isolated From Venezuela Hemorrhagic Fever Patients and Rodents. Virology 2000; (266):189-95.

39. WHIO Biosafety Manual, Third edition, 2004.

VIII

COLABORADORES Y PARTICIPANTES

Asesores de las áreas de trabajo y del Documento del Programa de Fiebre Hemorrágica Venezolana:

1. Dra. Nuris de Manzione. Médico Epidemióloga Directora del CIVIHET
2. Dra. Rosa Alba Salas. Médico Viróloga Caribbean Epidemiology Centre (CAREC), Trinidad
3. Dr. Mario Valcárcel. Médico Epidemiólogo, Organización Panamericana de la Salud, (OPS).
4. Dr. Héctor Paredes. Médico de Salud Pública, CIVIHET.
5. Dra. Delia Enrría. Directora Instituto Julio Maiztegui. Pergamino. Argentina.
6. Dra. Ana María Brigiler. Instituto Julio Maiztegui. Pergamino. Argentina.
7. Dra. Silvana Levis. Instituto Julio Maiztegui. Pergamino. Argentina.
8. Dra. Gladys Calderón. Instituto Julio Maiztegui. Pergamino. Argentina
9. Lic. Clovis Vásquez. Instituto Nacional de Higiene "RR"

MESA DE TRABAJO VIGILANCIA EPIDEMIOLOGICA Y LABORATORIO

Listado de participantes en las diferentes mesas de trabajo de revisión de las diferentes áreas de actividades del Programa de Fiebre Hemorrágica Venezolana.

Dr. Douglas Morán

Epidemiólogo Hospital de Guanarito Edo. Portuguesa

Dra. Maryorie Chávez

Jefe De Distrito Sanitario Guanare Edo. Portuguesa

Dra. Maritza Vielma

Vigilancia Epidemiológica. Edo. Portuguesa

Dra. Carlota Pereira

Universidad de los Andes Edo. Mèrida

Lic. Tomás Rebolledo

Distrito Sanitario Guanarito. Edo. Portuguesa

Dr. Jorge Figueredo

Salud Poblacional. Edo. Portuguesa

Dra. Alba Carrillo

Médico Epidemiólogo Estado Barinas

Dr. Clovis Vásquez

Virólogo. Instituto Nacional de Higiene

Dra. Nuris de Manzione

Médico Epidemióloga programa Fiebre Hemorrágica.

Lic. Victor Alarcón
Virólogo. Instituto Nacional de Higiene
Dr. Héctor Paredes
Programa Fiebre Hemorrágica Venezolana
Dra. Mariela Angulo
Epidemióloga Hospital Dr. Miguel Orúa.
Dr. Manuel García
Director General de Epidemiológica. Ministerio de Salud
Dra. Mildred Saez
Directora de Vigilancia Epidemiológica. Ministerio Salud.

MESA DE TRABAJO CLINICO

Dr. Lorenzo Basile
Médico Infectólogo. Hospital Miguel Orúa. Guanare Edo. Portuguesa
Dr. Fabián Rangel
Médico Intensivista. Hospital Miguel Orúa. Guanare. Edo. Portuguesa
Dra. Milena Vergara
Médico Internista Hospital Dr. Miguel Orúa. Guanare Edo. Portuguesa
Dr. William Apostol
Médico Internista Hospital Dr. Arnoldo Gabaldón. Guanarito Edo. Portuguesa.

MESA DE TRABAJO CONTROL DE ROEDORES

Ing. Neida Rodríguez
Salud Ambiental y Contraloría Sanitaria. Ministerio de Salud
Ing. Cinda Martínez
Salud Ambiental y Contraloría Sanitaria. Ministerio de Salud
Dr. Jorge Plaz
Salud Ambiental y Contraloría Sanitaria. Ministerio de Salud
Dra. Giomar de Valenzuela
Salud Ambiental Edo Portuguesa
Técnico Medio. Lisandro Carrasco
Programa Fiebre Hemorrágica.

MESA DE TRABAJO PROTOCOLO DE RIBAVIRINA

Dr. Harum Kasem

Médico Internista del Hospital Dr. Miguel Oraá. Guanare Edo. Portuguesa

Dr. Zaldivar Zúñiga:

Médico Pediatra de Salud Pública, FONACIT. Hospital Dr. Miguel Oraá. Edo. Portuguesa

Dra. Mireya Piñate de Acero

Médico Pediatra Farmacólogo Salud Pública - Instituto Nacional de Higiene

Dr. Leopoldo Landaeta

Médico Farmacólogo. Ministerio de Salud.

Dra. Nuris de Manzione

Médico Epidemiólogo Directora del CIVIHET Guanare Edo, Portuguesa.

Dr. Lorenzo Basile

Infectólogo del Hospital Dr. Miguel Oraá Guanare Edo. Portuguesa.

Dra. Alba Dinorah Méndez

Médico Pediatra Hematólogo. Hospital Dr. Miguel Oraá. Guanare Edo. Portug.

Financiamiento de Consultorías, Reuniones de Trabajo y Elaboración de Documento

Organización Panamericana de la Salud (OPS), Venezuela

Dirección Regional de Salud Portuguesa

Centro de Investigaciones de Virosis Hemorrágicas y Enfermedades Transmisibles (CIVIHET),
Guanare Edo. Portuguesa Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel"