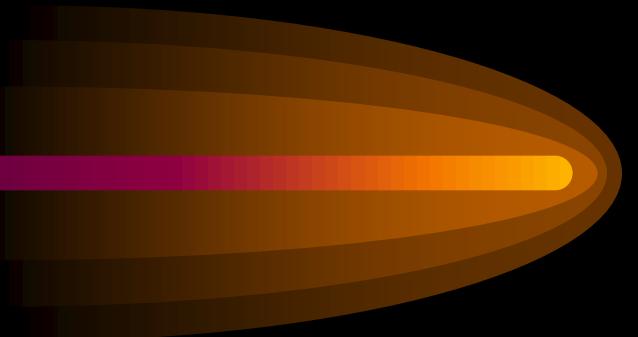


Fiebre hemorrágica argentina



*Prof. Dr. José Raúl Oubiña
Cátedra I de Microbiología, Parasitología e Inmunología
Microbiología II*



- ✓ *En 1943 comienzan a registrarse en el Htal. “Julio de Vedia” de 9 de Julio casos de una extraña gripe con muy alta fiebre asociada a un 60 % de mortalidad en pacientes de áreas rurales aledañas...*
- ✓ *Rodolfo Arribalzaga describe el cuadro clínico completo en 1955...*
- ✓ *“Problema de Salud Pública” en 1958...*



Gripón
o
Mal de los rastrojos
o
Mal de O'Higgins
o
Fiebre hemorrágica argentina



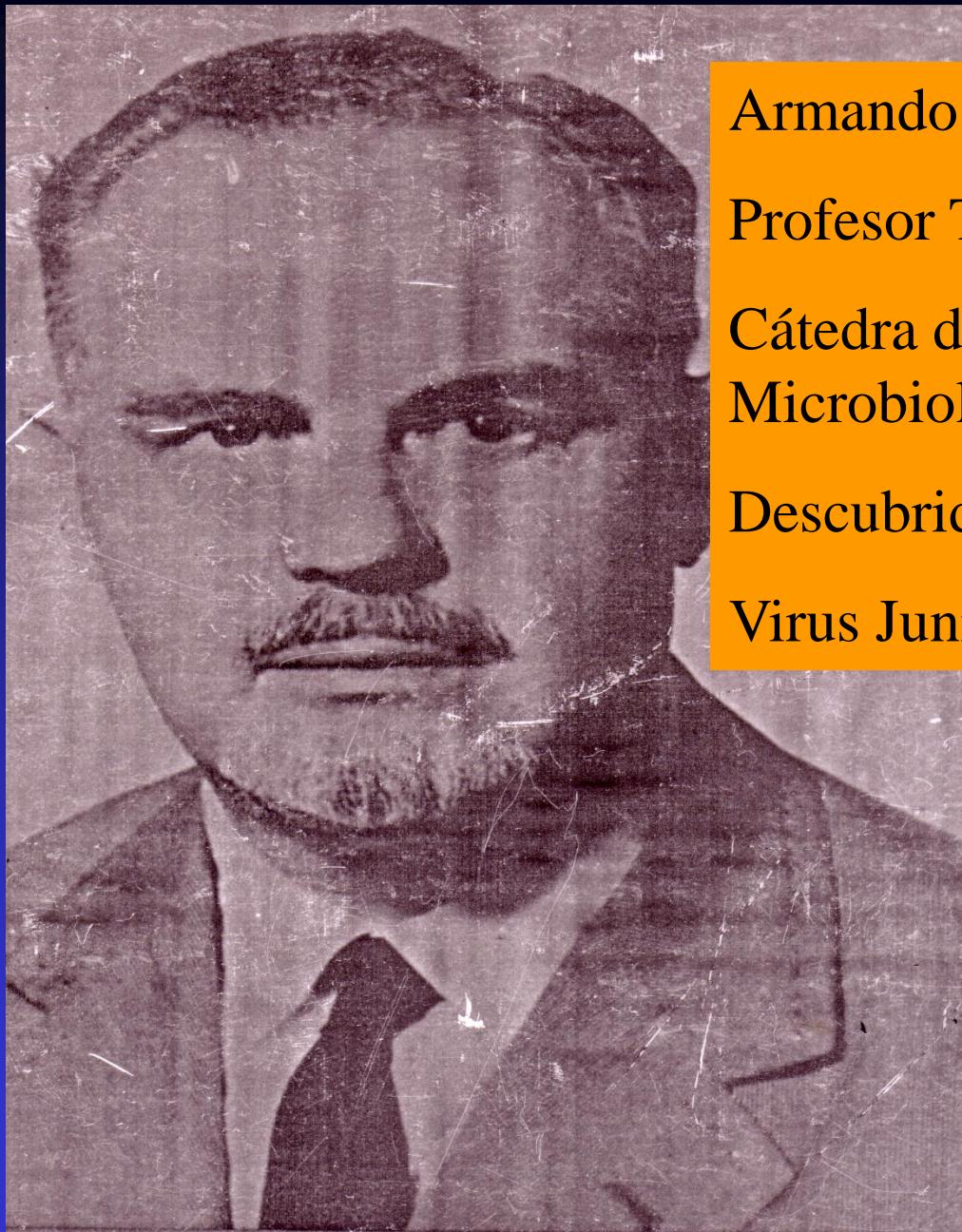
Maizal



Ratón maicero o
Calomys musculinus



Akodon azarae



Armando Parodi

Profesor Titular

Cátedra de
Microbiología

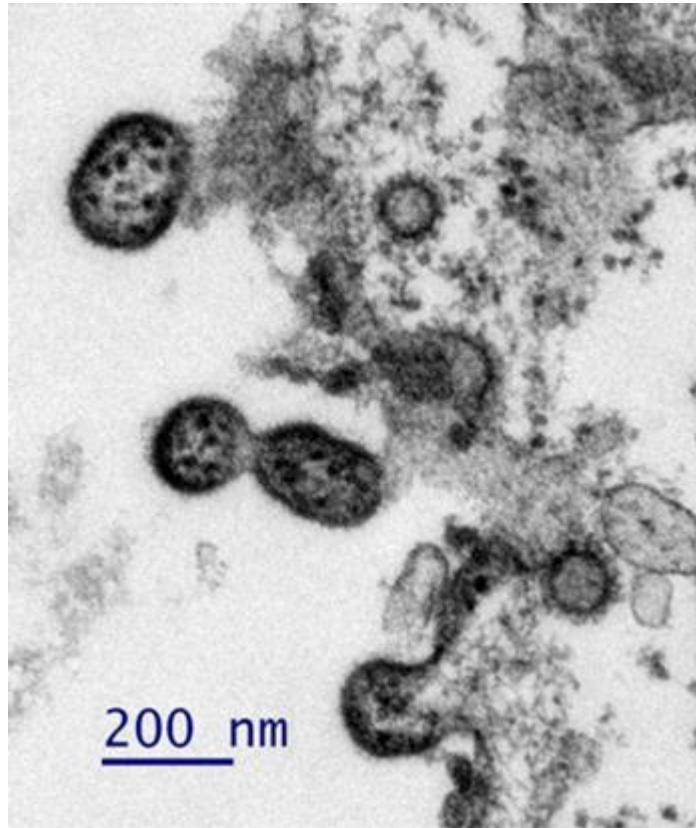
Descubridor del

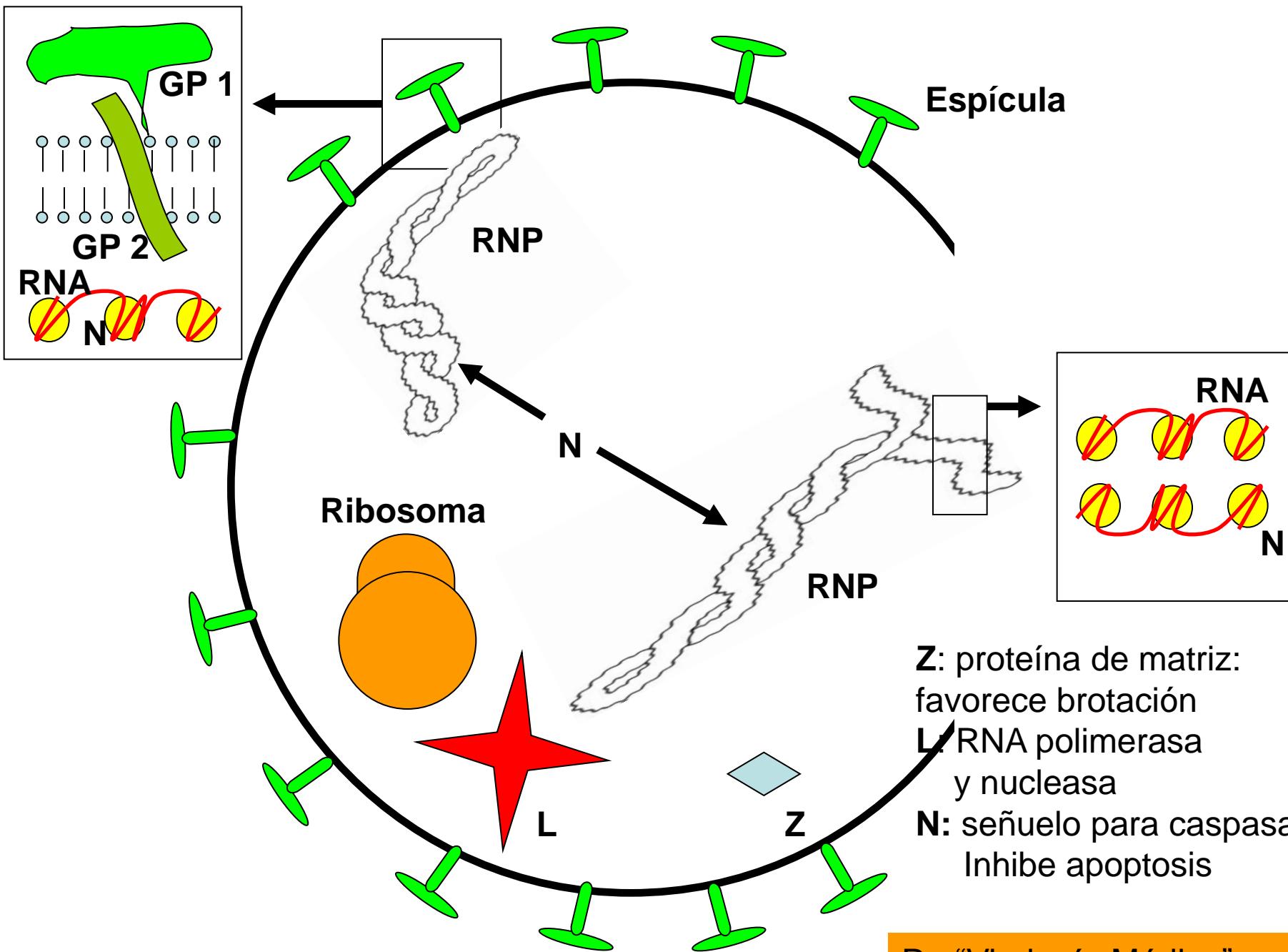
Virus Junín en 1958



Virus Junín

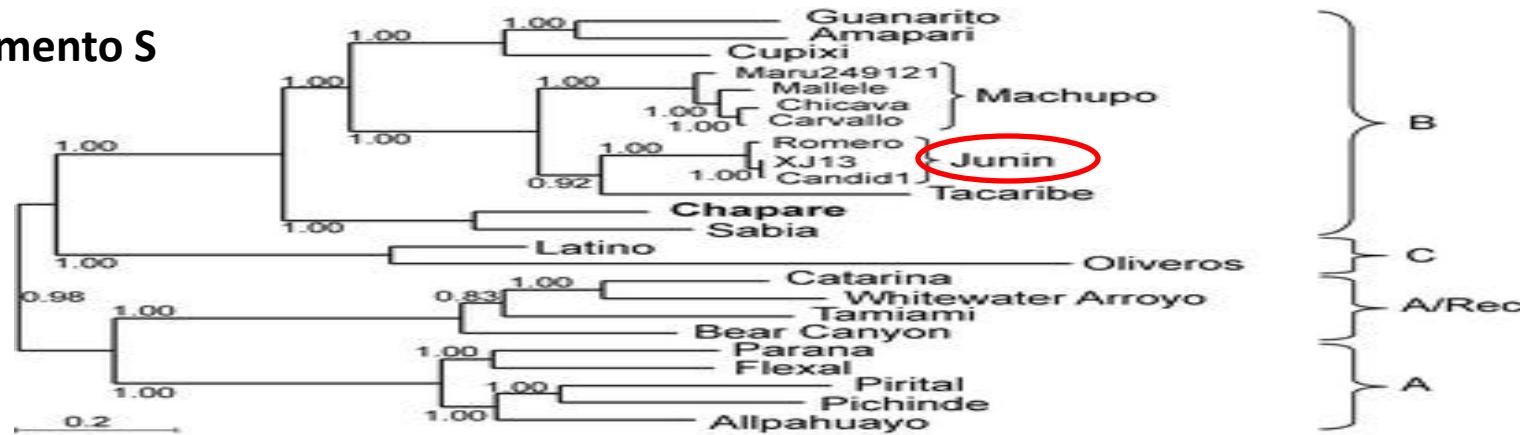
Virus Junín: estructura



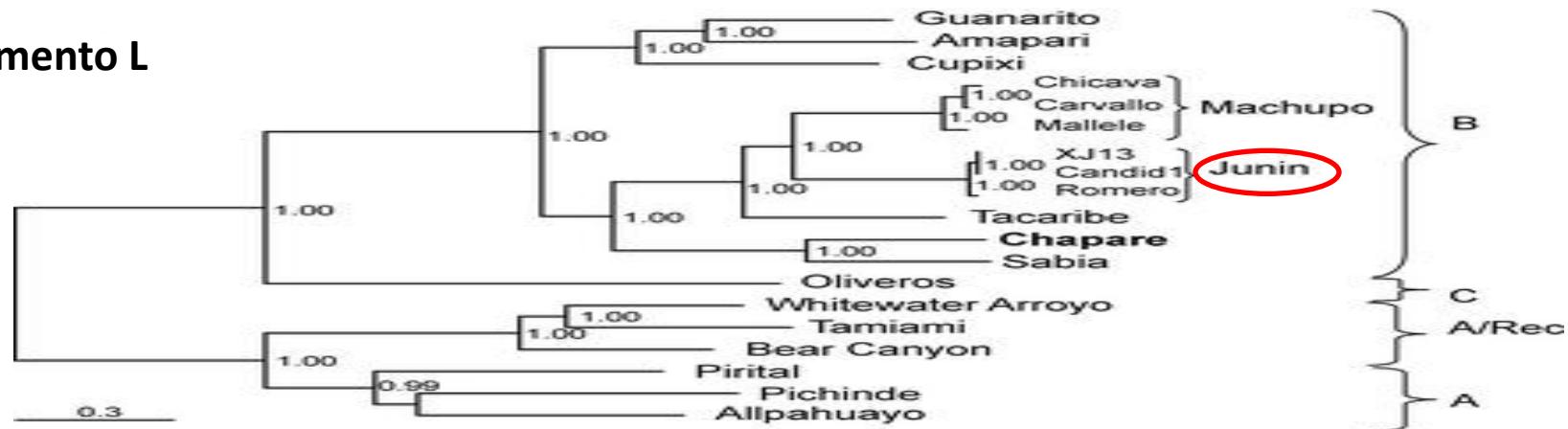


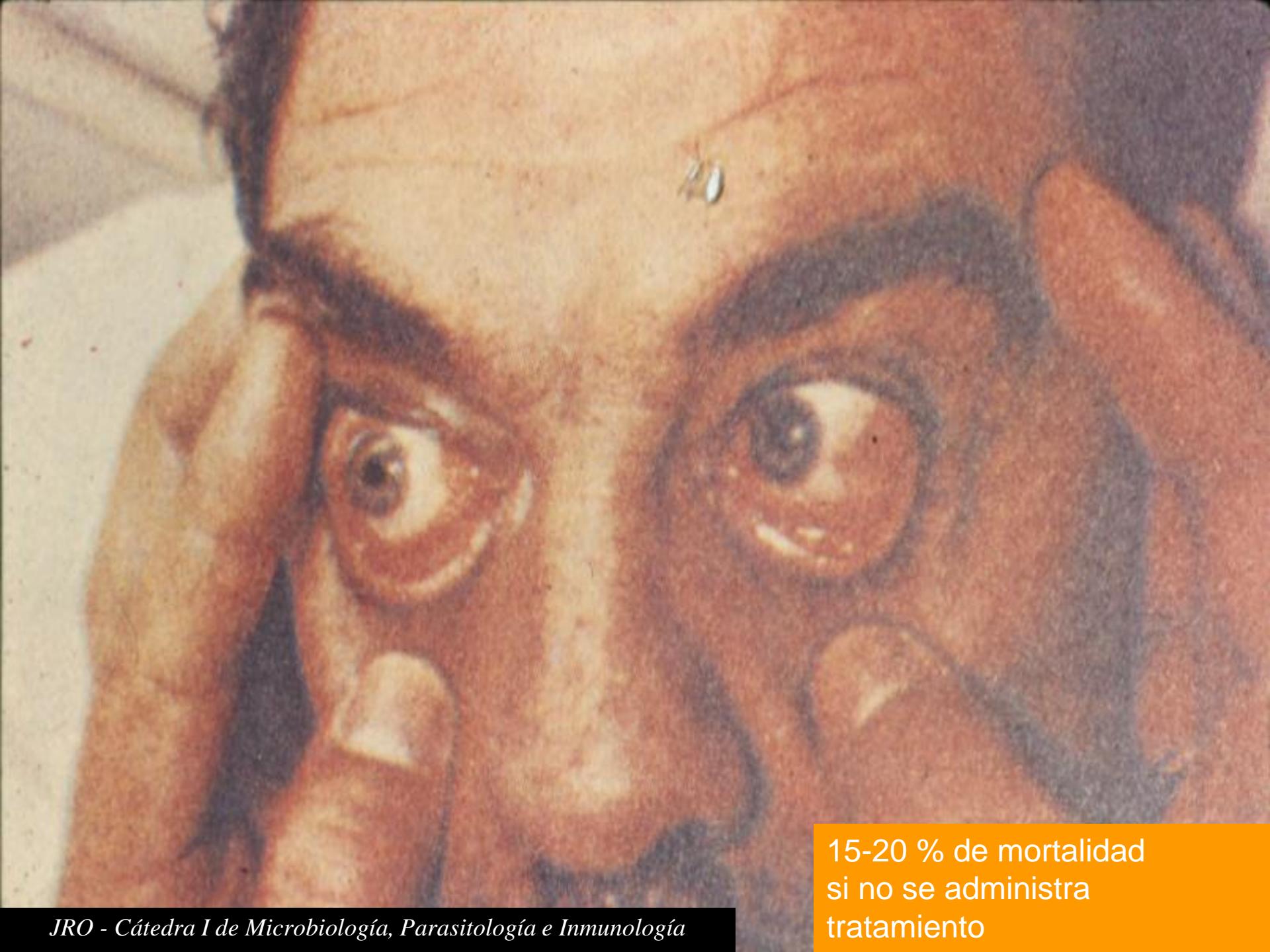
Análisis filogenético del RNA genómico de los arenavirus del Nuevo Mundo

Segmento S



Segmento L





15-20 % de mortalidad
si no se administra
tratamiento





ELEMENTOS DEL DIAGNOSTICO PRECOZ
COINCIDENCIA DE FENOMENOS CLINICOS Y DE LABORATORIO DE RUTINA

C L I N I C A

L A B O R A T O R I O

Primer día

- 1º) **Fiebre**
- 2º) **Sintomas digestivos**
- 3º) **Algias**
- 4º) **Adenomegalia**
- 5º) **Enantema**

Sangre: Leucocitos normales o leucopenia
Orina: Células redondas

Segundo día

- 1º) **Bradicardia**
- 2º) **Hipotensión**
- 3º) **Astenia**
- 4º) **Mareos**
- 5º) **Anorexia**

Sangre: Leucopenia
Orina: Plaquetopenia
Células redondas
Cilindros Hialinos

Tercer día

- 1º) **Oliguria**
- 2º) **Hipotensión**
- 3º) **Petequias**
- 4º) **Temblores**
- 5º) **Obnubilación**

Sangre: Leucopenia ++
Orina: Plaquetopenia ++
Cilindros hialinos, granulosos, etc.

PUERTAS DE ENTRADA DEL VIRUS JUNIN

1. Escoriaciones de piel
2. Oral
3. Conjuntival
4. Inhalatoria

CLINICA

1. Formas leves
2. Formas comunes
 - Tífica
 - Tífica vascular
 - Tífica nerviosa
3. Formas graves
 - Hemorrágica
 - Meningoencefalítica
 - Mixta
4. Formas abortivas
5. Formas inaparentes
6. Formas clínicas de la infancia.



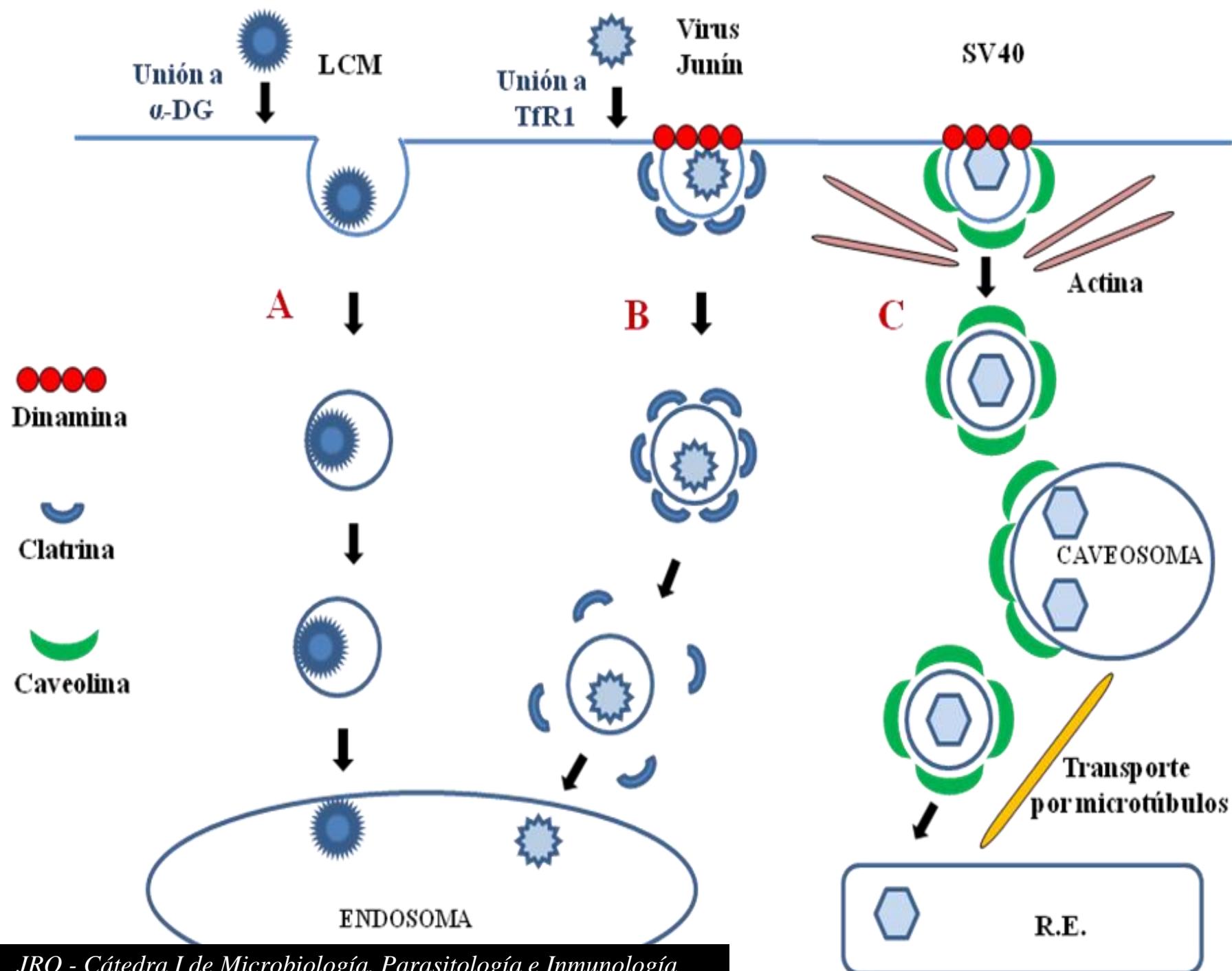
*Replicación inicial en pulmones, y diseminación a tejido hemopoyético, hígado y riñón.
Afectación del RER con expresión de Ag virales.*

Afectación grave de la hematopoyesis (necrosis linfoide).

Hemorragias : por alteración cuantitativa y funcional de plaquetas y alteraciones de la hemostasia (↓ Factor VIII, IX y plasminógeno). Compromiso endotelial: ↑ ICAM y VCAM y mediador vaso activo NO, ↓ factor von Willebrand y liberación de prostaglandina (PGI) y DAF (decoy accelerating factor)

Compromiso neurológico: inmunocomplejos en endotelio capilar .

*↑ TNF- α e IFN - α . ↓ de Linfocitos T CD4+: inmunodepresión transitoria.
Sobreinfecciones bacterianas.*



Tropismo del virus Junín en el humano

- ✓ Células dendríticas
- ✓ Macrófagos
- ✓ LMN de sangre periférica:
 - Monocitos: Sí
 - Linfocitos: No
- ✓ Megacariocitos
- ✓ **Células parenquimatosas:** pulmón,
riñón, hígado, SNC

Junin Virus Infection of Guinea Pigs: Immunohistochemical and Ultrastructural Studies of Hemopoietic Tissue

**G. Carballal, P. M. Cossio, R. P. Laguens,
C. Ponzinibbio, J. R. Oubiña, P. C. Meckert,
A. Rabinovich, and R. M. Arana**

*From the Cátedra de Microbiología, Parasitología,
e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de
Buenos Aires; the Department of Immunology, Centro de
Educación Médica e Investigaciones Clínicas, Buenos Aires;
and the Cátedra de Patología II, Facultad de Medicina,
Universidad de La Plata, La Plata, Argentina*

An association between viral antigens, cytopathic effect (CPE), and viral titers in blood and lymphoid tissues suggests a direct CPE of Junin virus on the lymphopoietic organs of guinea pigs infected with 10^3 50% lethal doses of the XJ prototype strain. After seven days of infection, all lymphoreticular organs had infectivity titers higher than those for blood. Virus was recovered from bone marrow and lymph nodes at day 5 after infection; peak titers were obtained from bone marrow, spleen, and lymph nodes after day 10. Granular specific fluorescence was detected in the cytoplasm of reticular monocytes after day 7; megakaryocytes showed positive fluorescence, but specific staining of other lymphoid cells was not observed. Necrosis of bone marrow, lymph nodes, and spleen was observed after day 9. CPE consisted of overdevelopment of reticuloendoplasmic cisternae of reticulomonocytes and myeloblasts. Typical Junin virus particles were observed. Reticular cells were gradually destroyed, and simultaneous necrosis of surrounding lymphoid cells was observed.

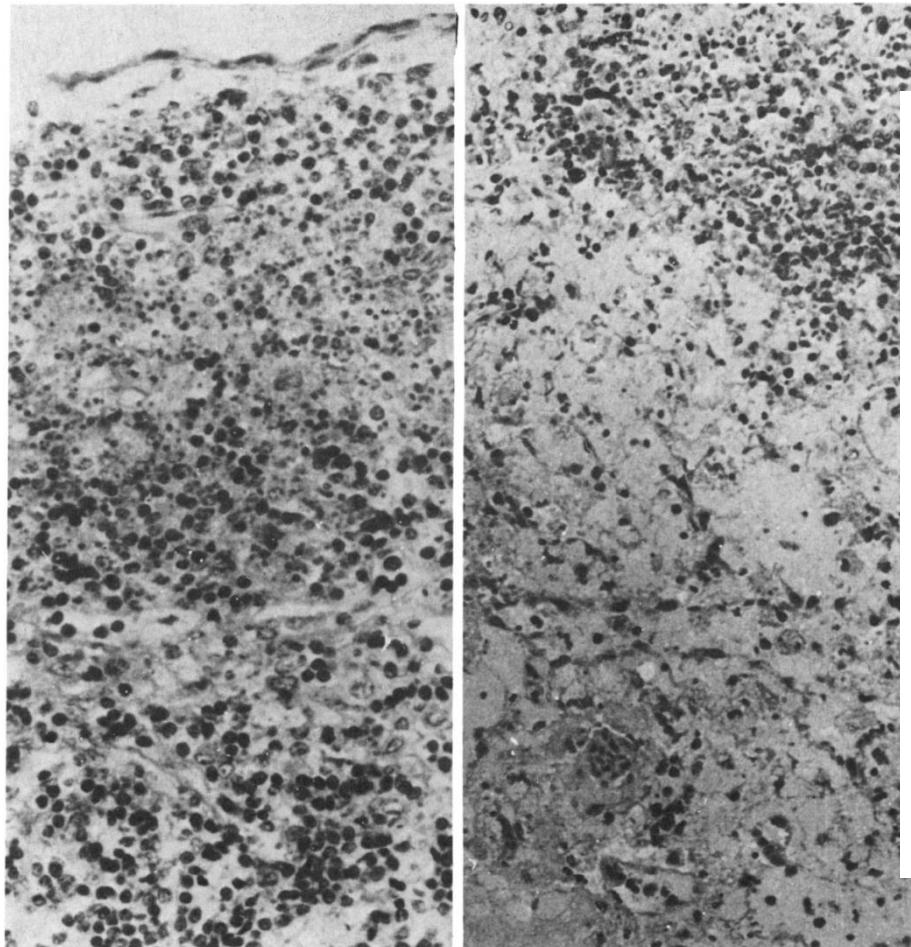


Figure 3. Light micrographs of hemopoietic tissues of guinea pigs infected with the XJ strain of Junin virus. *Left*, lymph node at day 9 after infection showing necrosis of a cortical follicle with numerous nuclear debris ($\times 150$). *Right*, spleen at day 11. The red pulp appears to be composed of sinusoids full of blood, with almost no distinct cells. At the upper-right corner a remnant of a lymph follicle can be observed ($\times 150$).

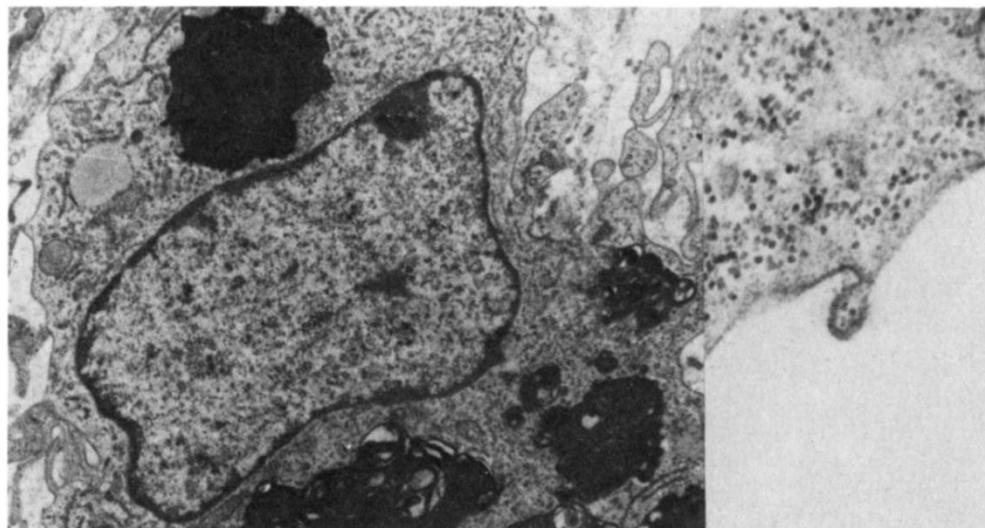
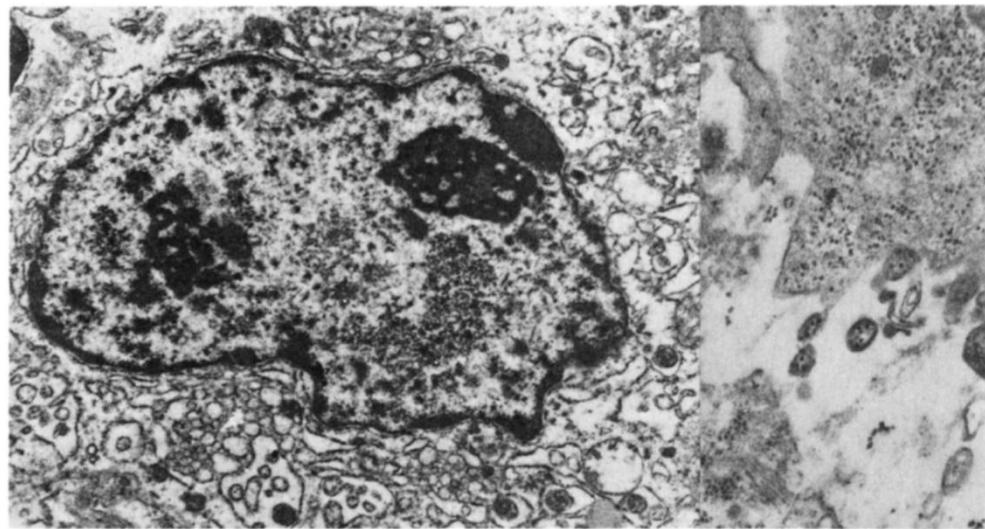


Figure 4. Electron micrographs of bone marrow from guinea pigs infected with the XJ strain of Junin virus. *Upper left*, a reticular cell at day 7 after infection showing characteristic modifications of the rough-surfaced endoplasmic reticulum ($\times 12,000$). *Lower left*, a reticular phagocytic cell at day 13 with secondary lysosomes ($\times 12,000$). *Upper right*, a reticular cell at day 9. Several virions can be seen close to the plasma membrane ($\times 23,000$). *Lower right*, a budding particle at the plasma membrane of a reticular cell ($\times 35,000$).

Una visión global...

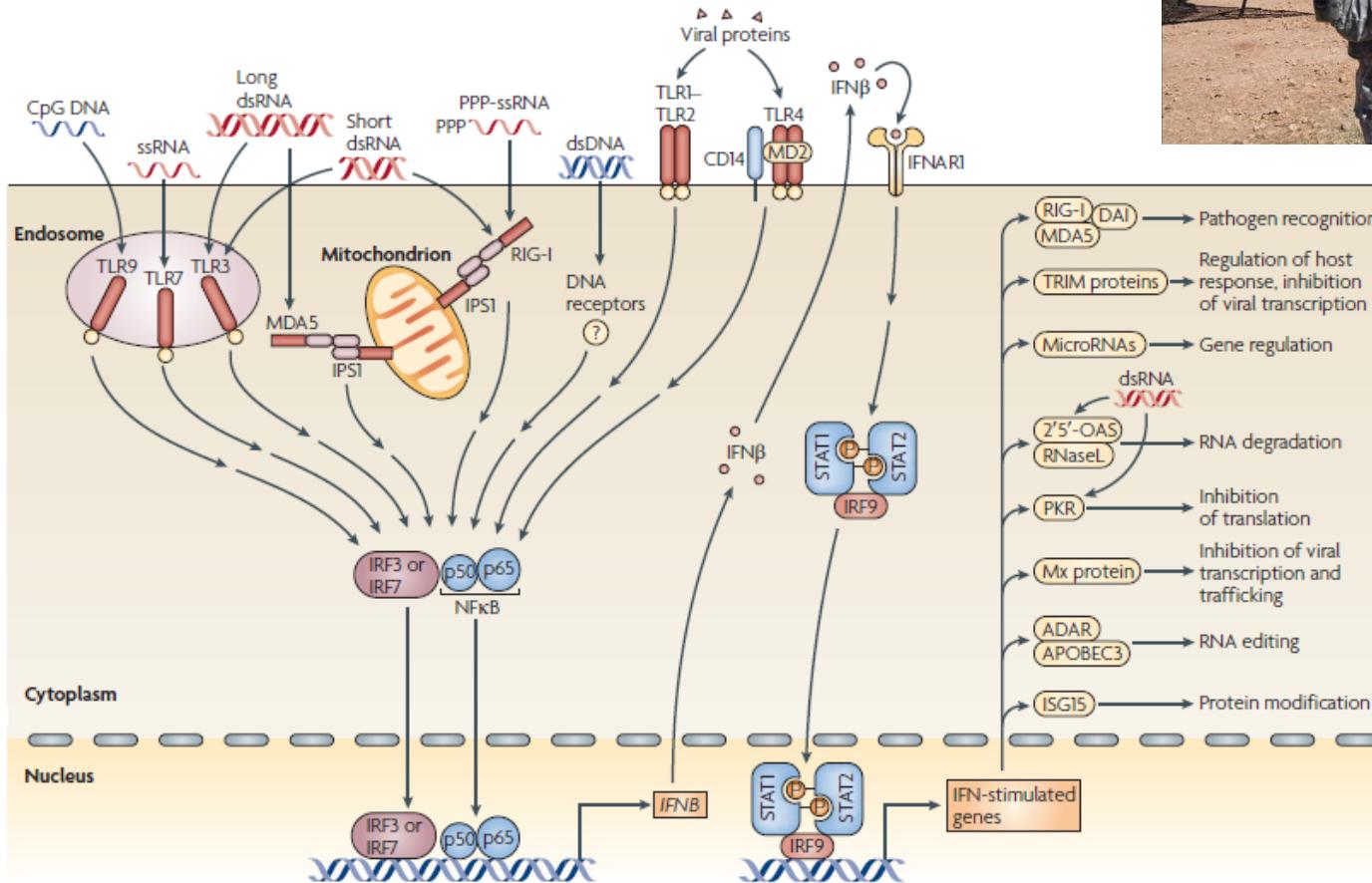
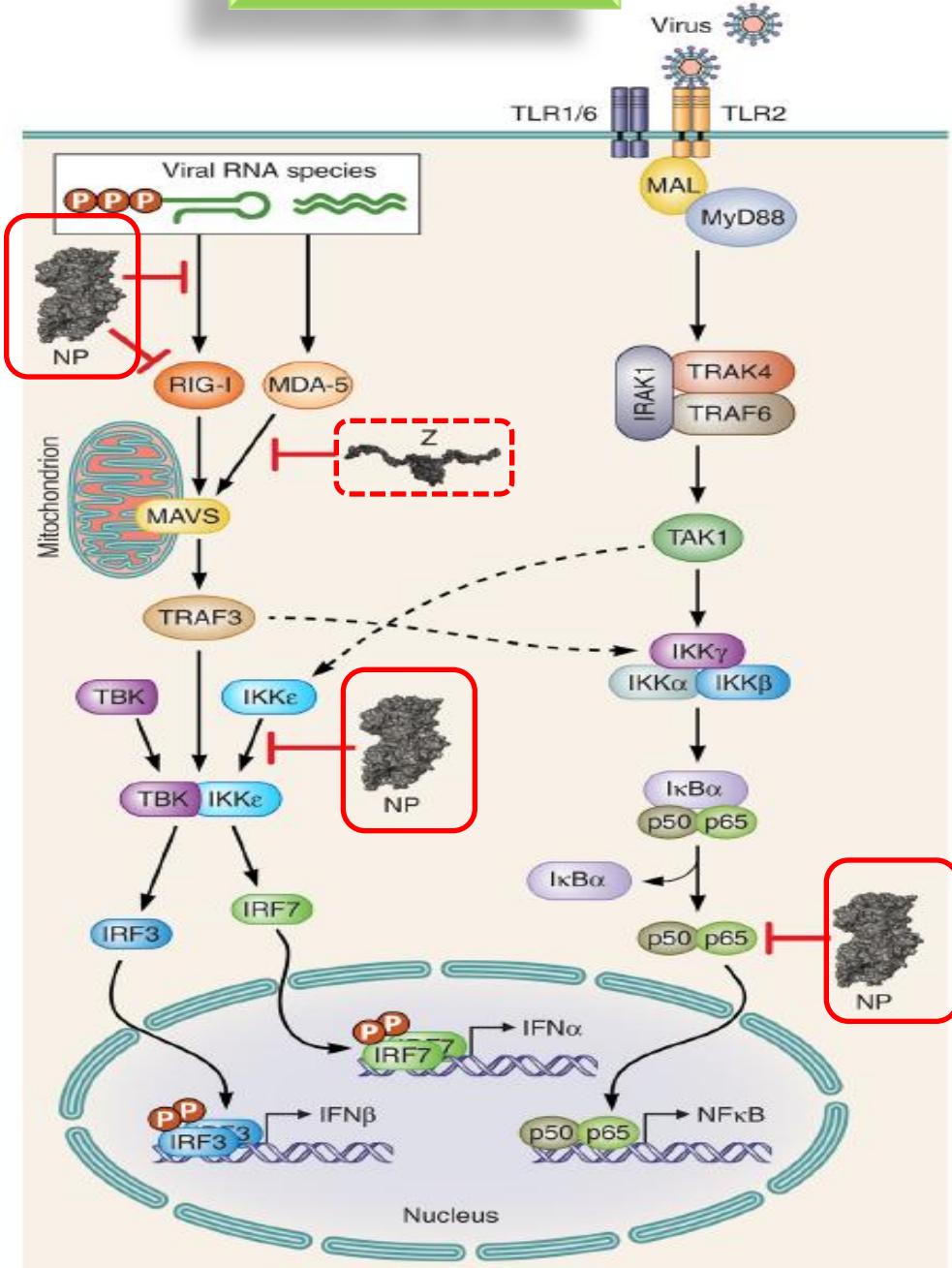
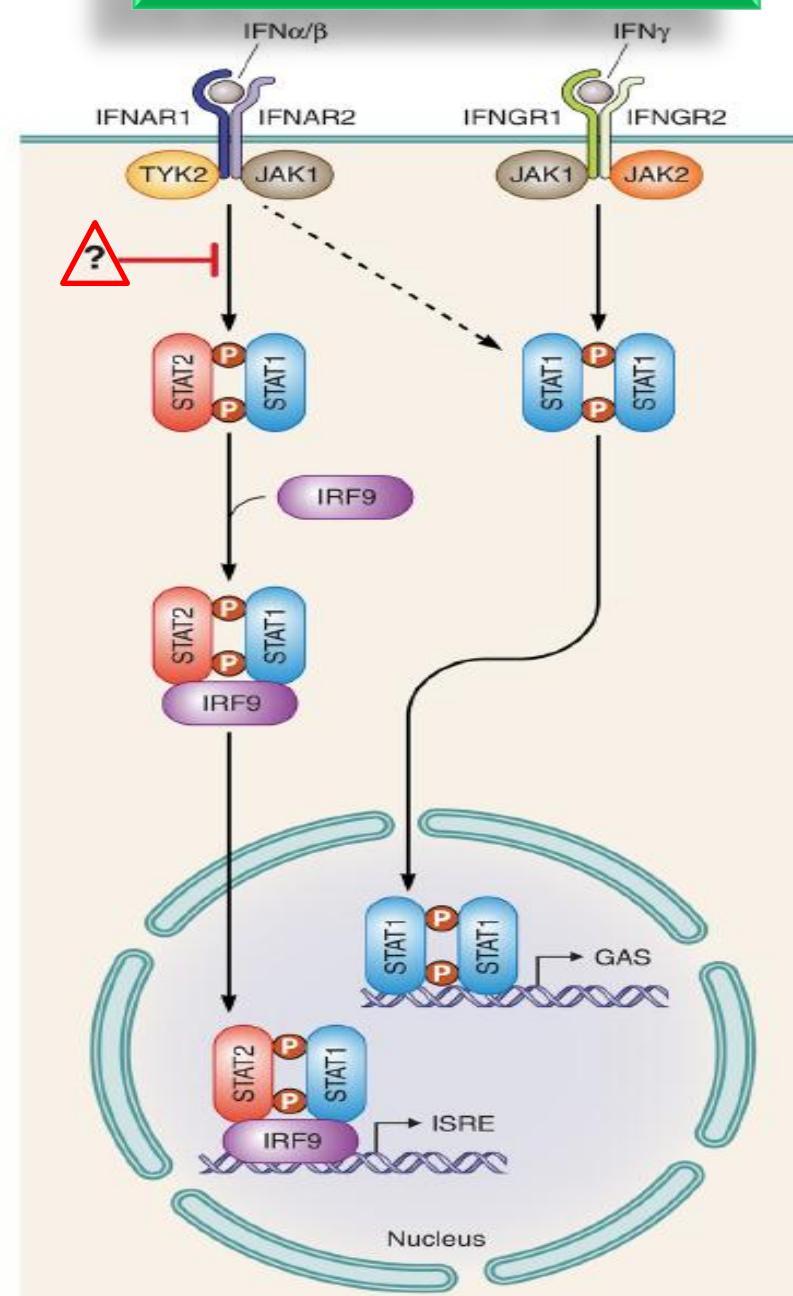


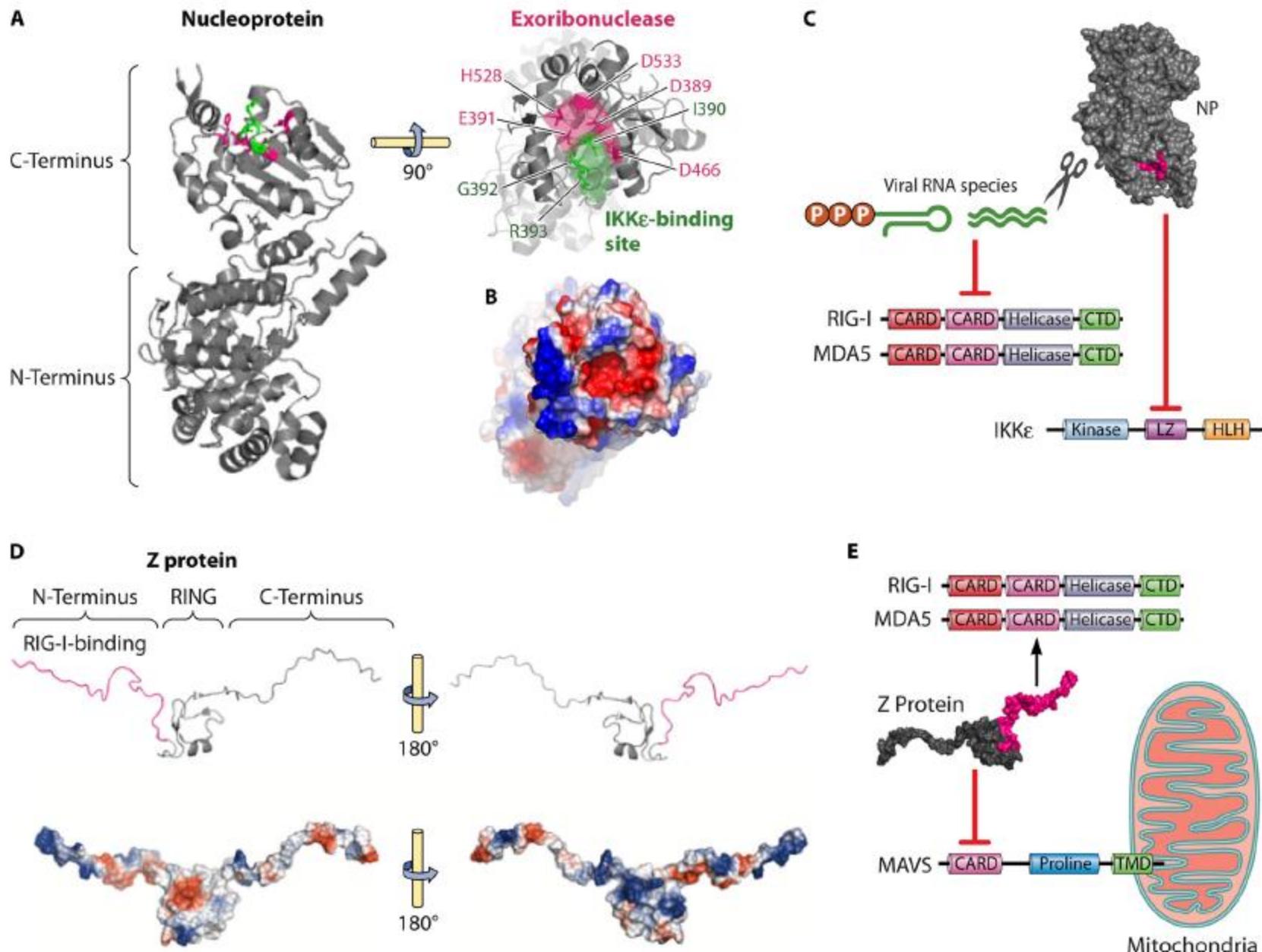
Figure 1 | Activation of the interferon response triggered by the detection of viral pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) and damage-associated molecular patterns (DAMPs).

Inducción de IFN



Vía de señalización del IFN



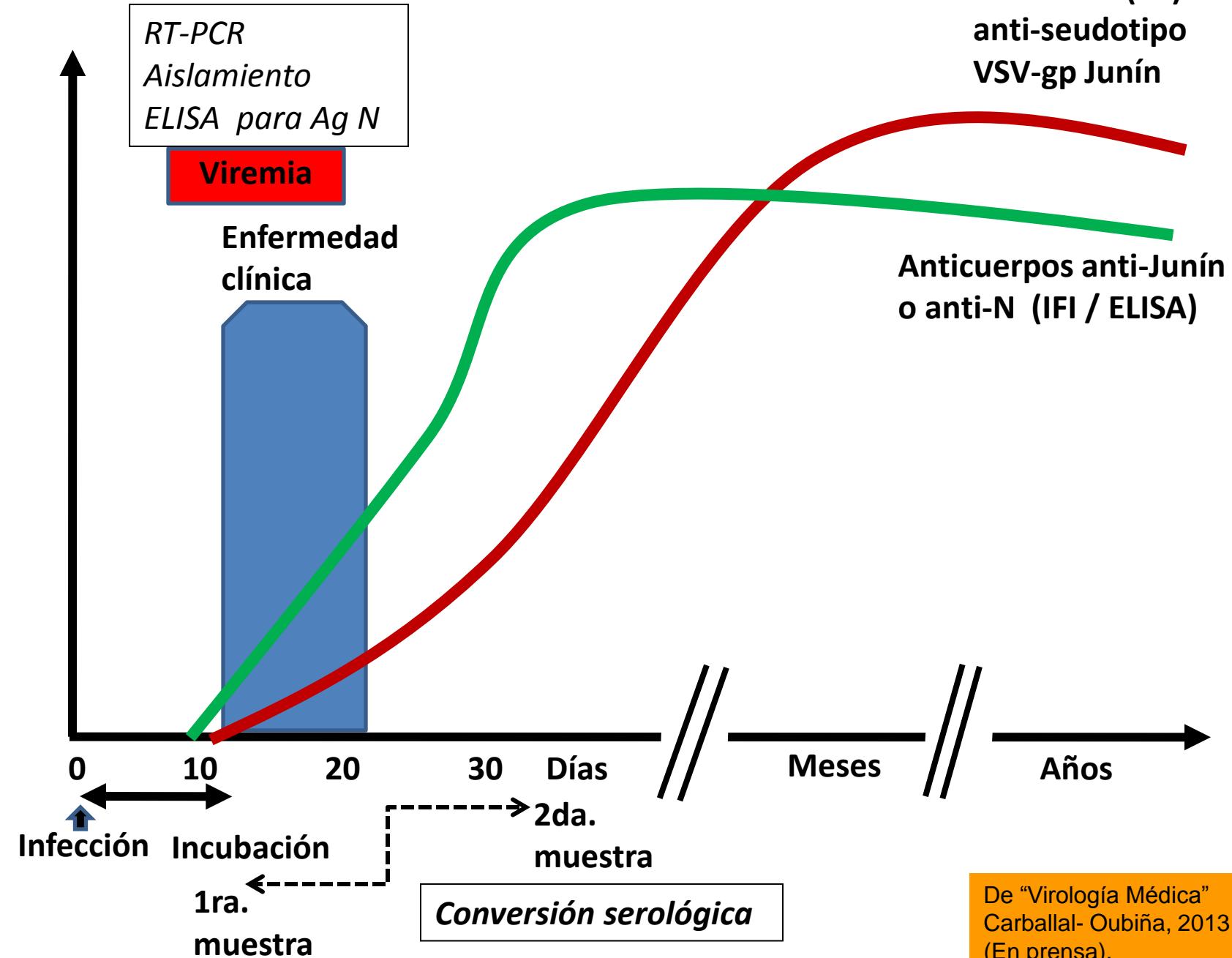




\uparrow IFN alfa
 \uparrow TNF- alfa
 \uparrow IL-6, IL-8 e IL-10

DIAGNOSTICO PRESUNTIVO DE LABORATORIO

1. Plaquetopenia
2. Leucopenia
3. Sedimento urinario patológico



De "Virología Médica"
Carballal- Oubiña, 2013
(En prensa).

DIAGNOSTICO VIROLOGICO

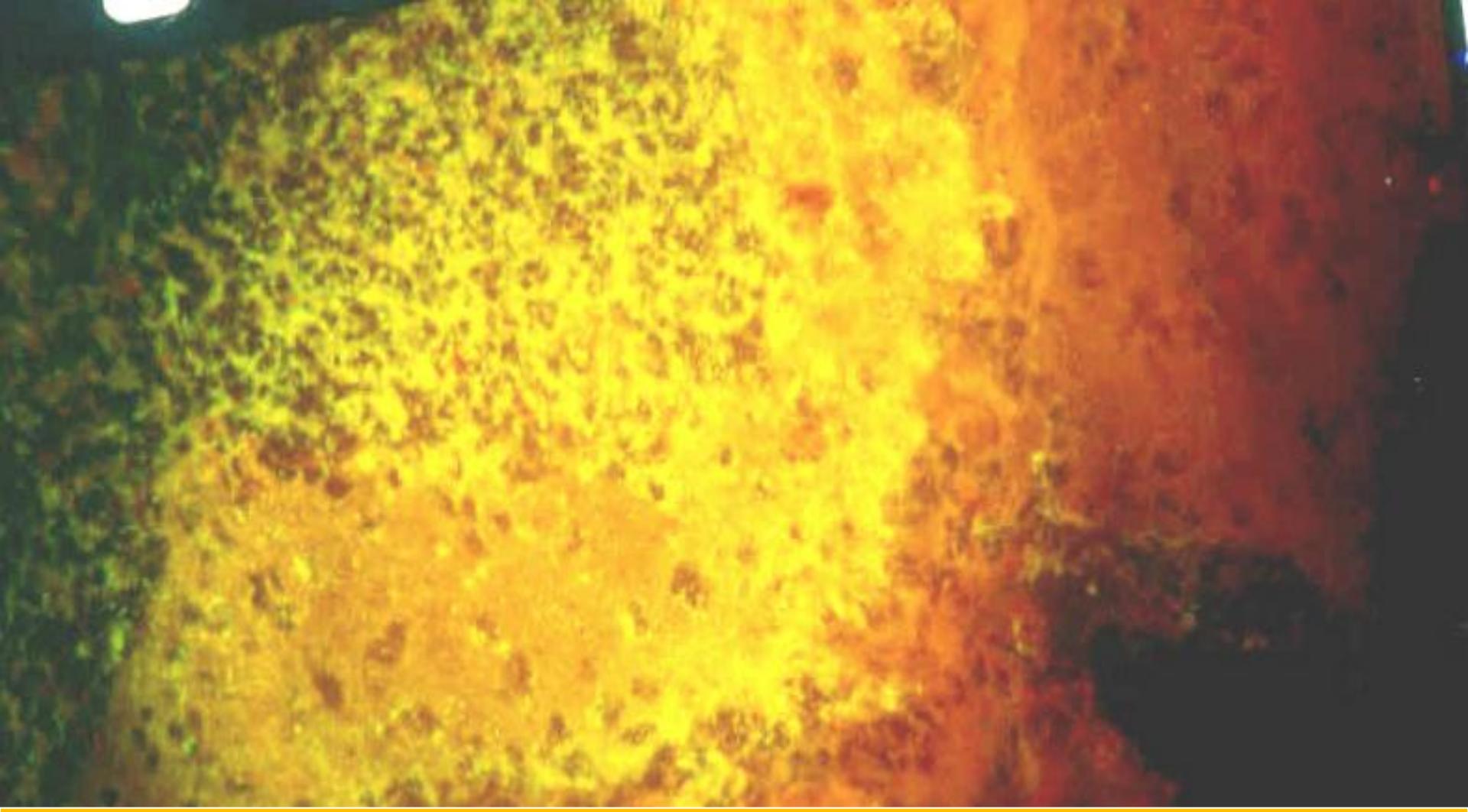
A. Métodos directos

- 
1. Toma de la muestra:
 - sangre
 - bazo e hígado (autopsia)
 2. Aislamiento:
 - cobayo
 - ratón lactante
 - cultivos celulares
 3. Identificación:
 - neutralización
 - fijación de complemento

Actualmente reemplazados por la detección de RNA viral mediante RT-PCR

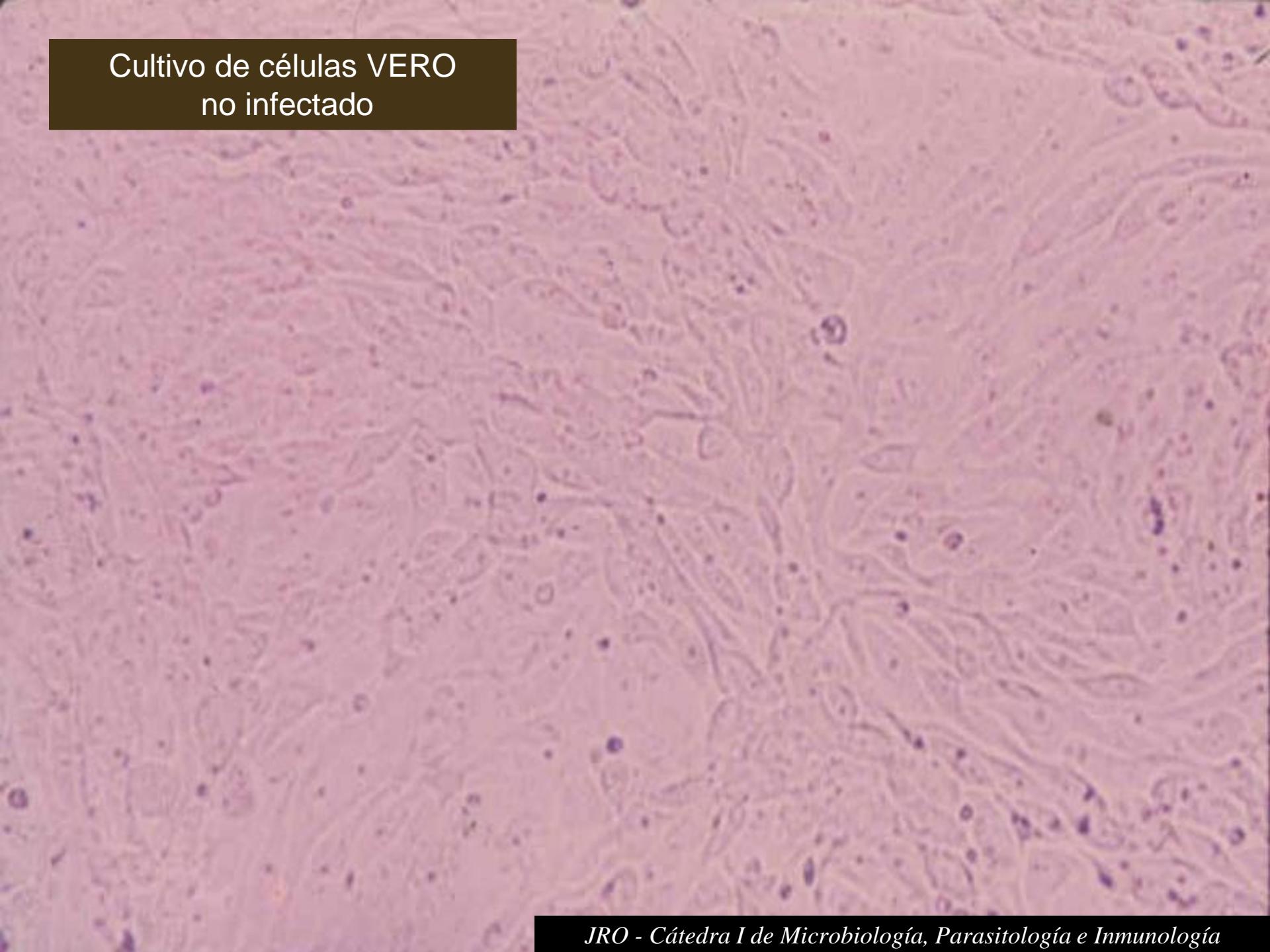






Expresión de antígenos de virus Junín en encéfalo de ratón inmunocompetente.
IFI. Las células teñidas de color “verde manzana” reflejan la expresión de gránulos citoplasmáticos por acumulación de antígenos de nucleocápside viral en el citoplasma.. Coloración de contraste con azul de Evans (se observan estructuras teñidas de rojo).. La yuxtaposición de imágenes obtenidas con fluoresceína y azul de Evans, se observa en color amarillento.

Cultivo de células VERO no infectado

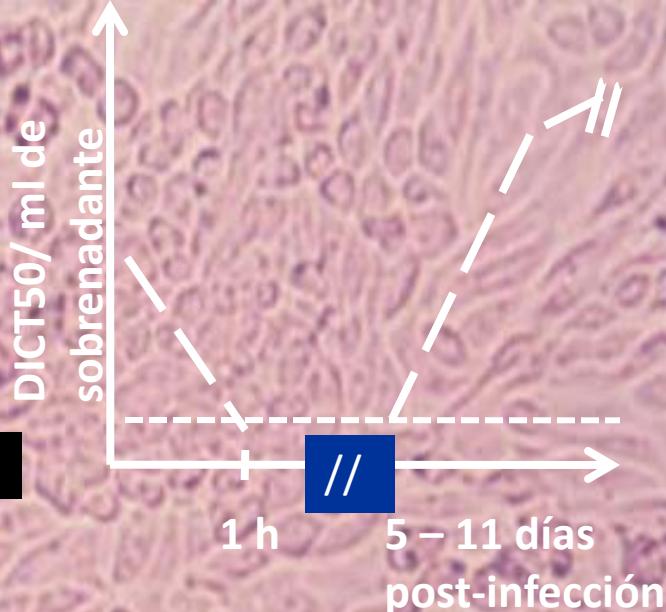


Infección aguda productiva asociada a lisis celular con destrucción de la monocapa

Virus detectable en extractos celulares
y en el sobrenadante.

El título se determina en forma semi-
cuantitativa en DICT₅₀ / ml

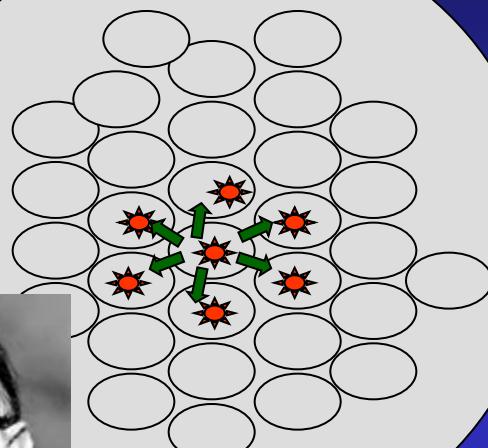
JRO - Cátedra I de Microbiología, Parasitología e Inmunología



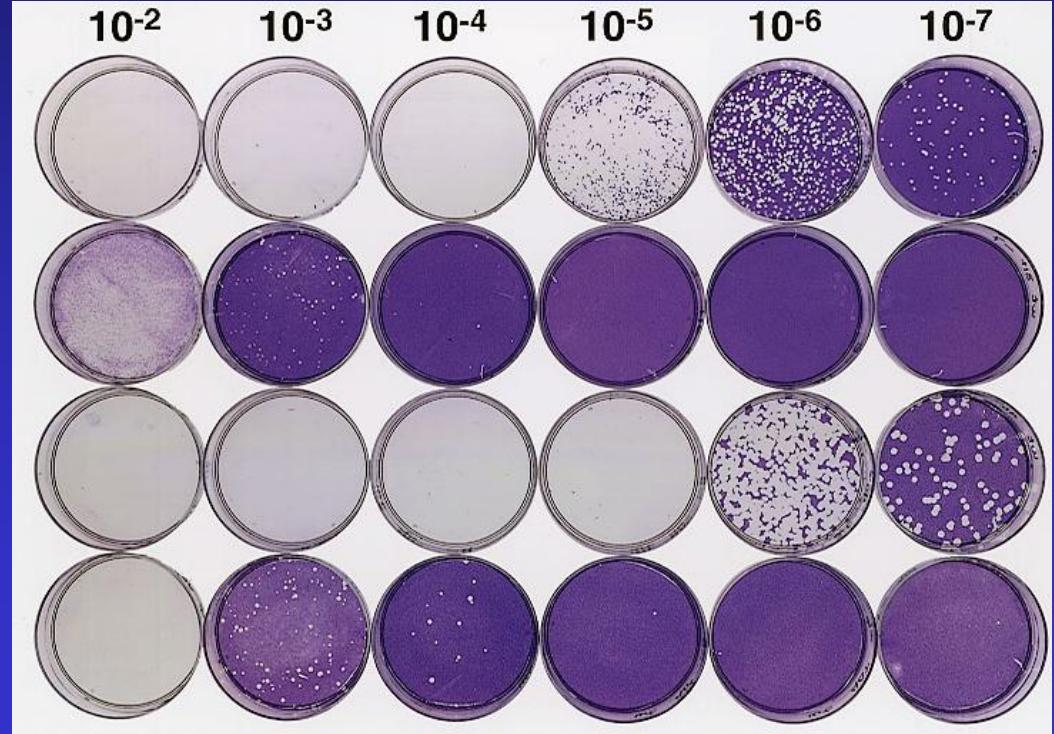
Título de virus Junín
en sobrenadante

Cultivo de células VERO infectado con virus Junín:
la ACP demuestra el aislamiento de un virus
(necesitará identificarse mediante neutralización, IF, etc.)

Cuantificación del título viral mediante plaqueo



Título: UFP/ml



Clones de virus

Dulbecco R, 1952. Premio Nobel de Medicina o Fisiología, 1975.

Cuadro hemorrágico en el cobayo inoculado con la cepa prototipo patógena XJ de virus Junín



Cuantificación del título viral en estudios de patogénesis

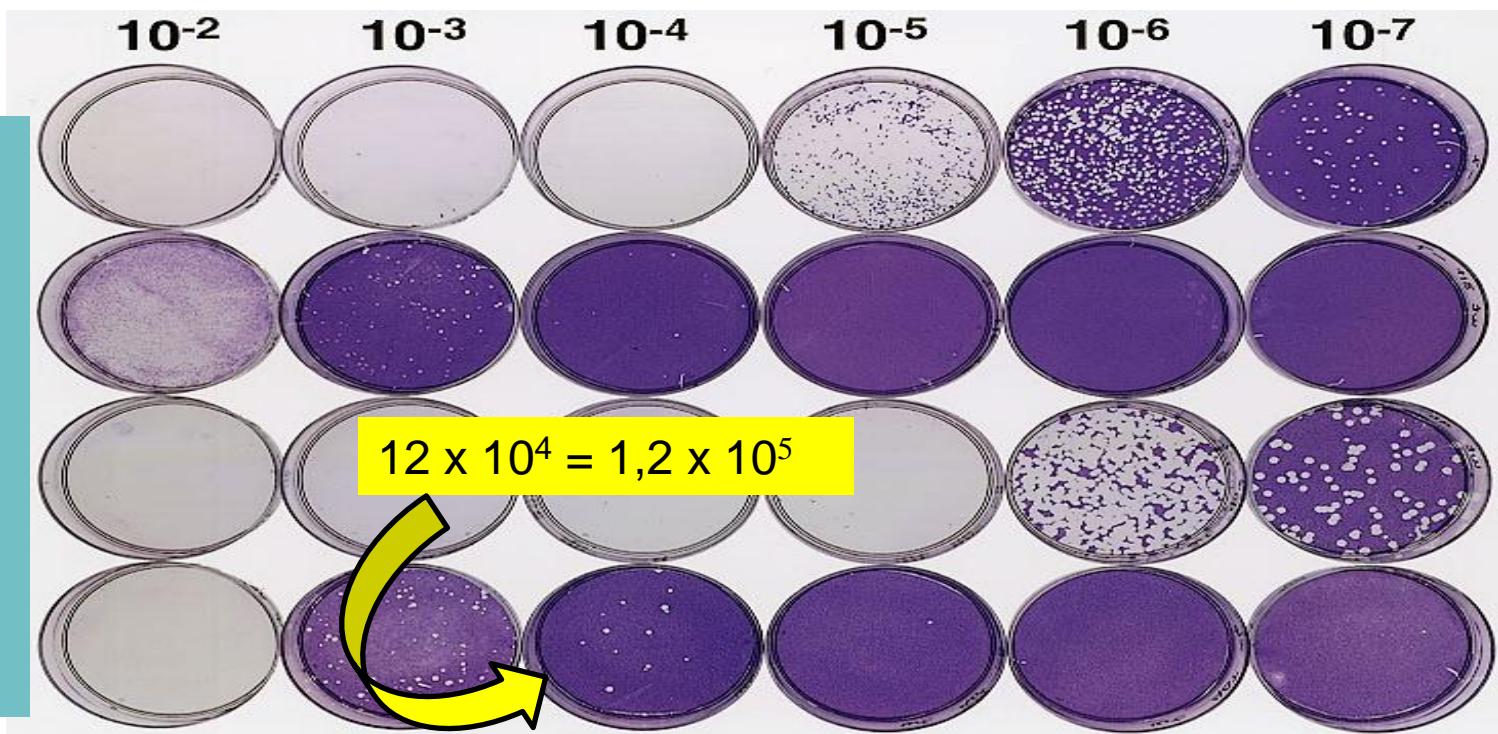
Diluciones decimales de los
homogenatos celulares de órganos de cobayo
infectados con virus Junín

M.Ósea

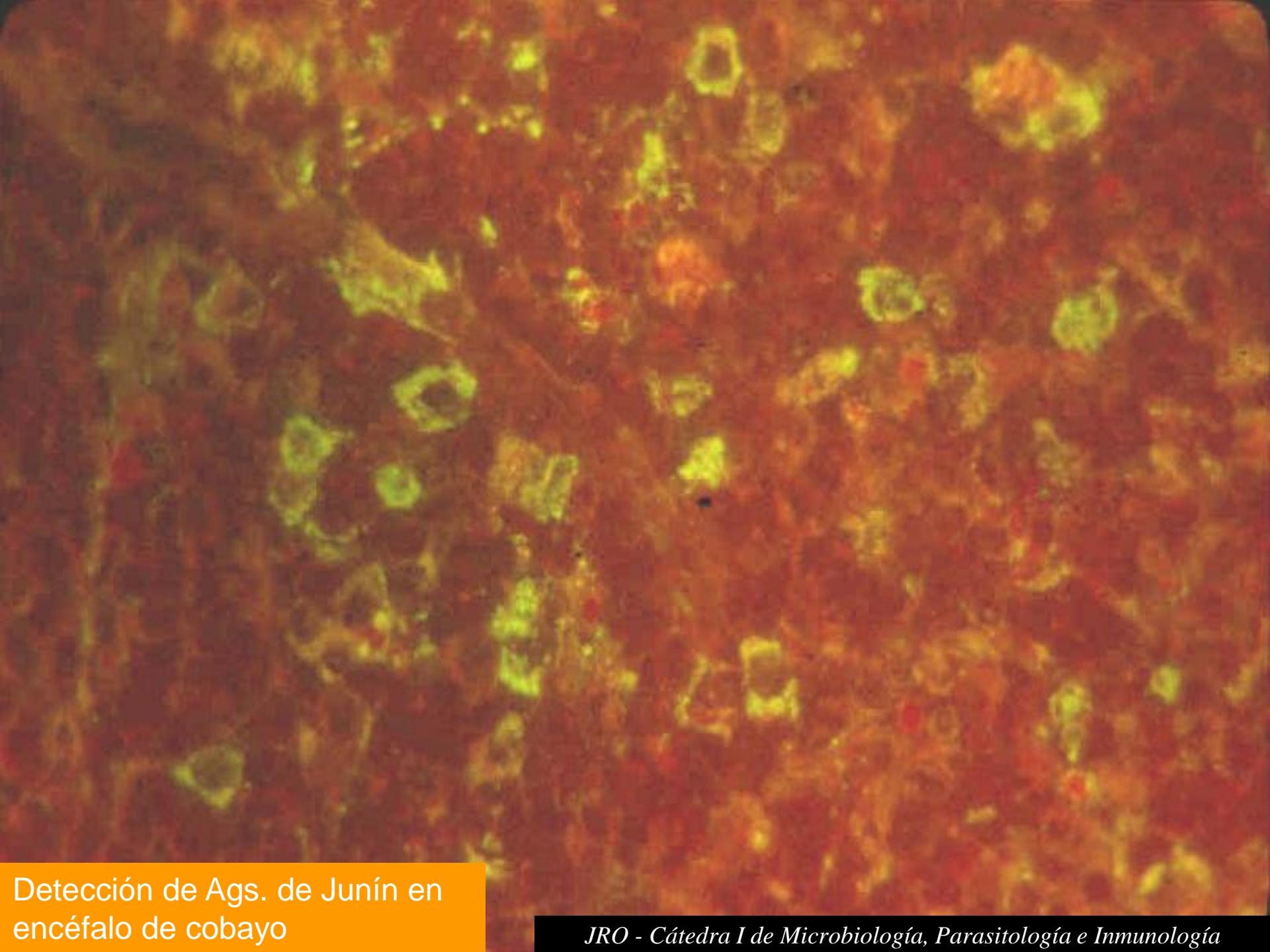
Hígado

Bazo

Pulmón



Título: N° de UFP/ml x factor de dilución de la muestra



Detección de Ags. de Junín en
encéfalo de cobayo

JRO - Cátedra I de Microbiología, Parasitología e Inmunología

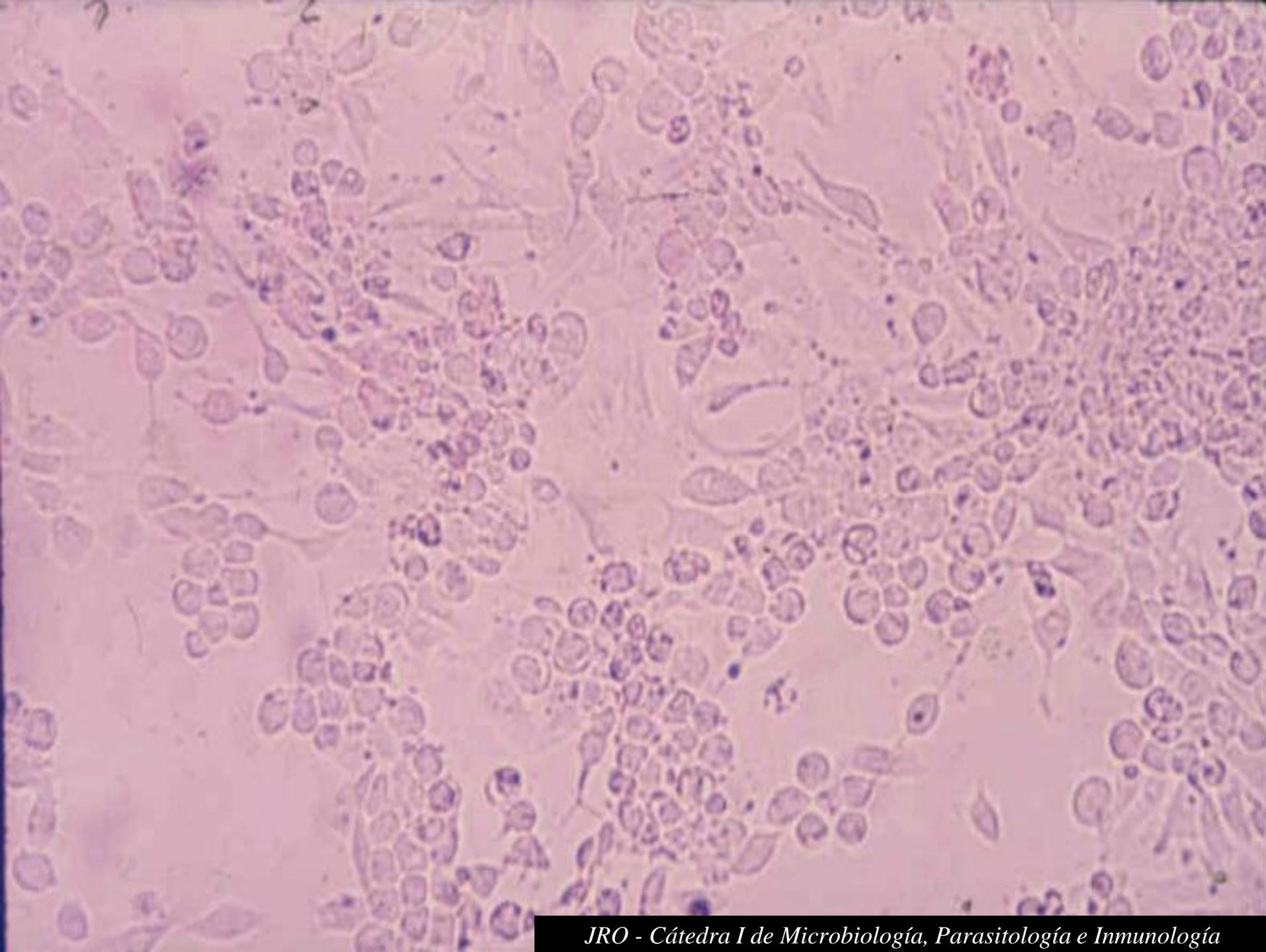
Diagnóstico indirecto

- Detección de anticuerpos mediante:

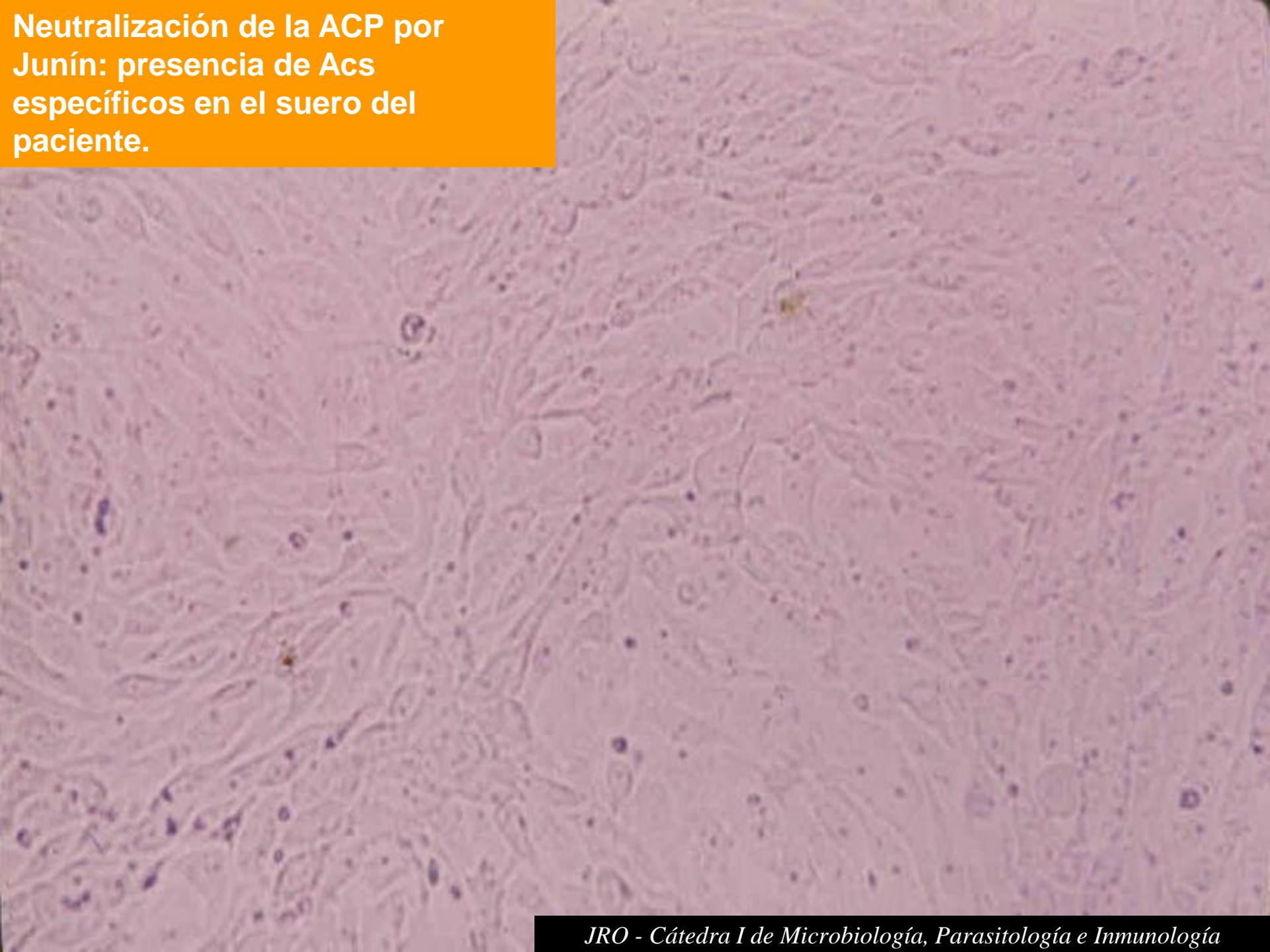
Neutralización

Inmunofluorescencia indirecta

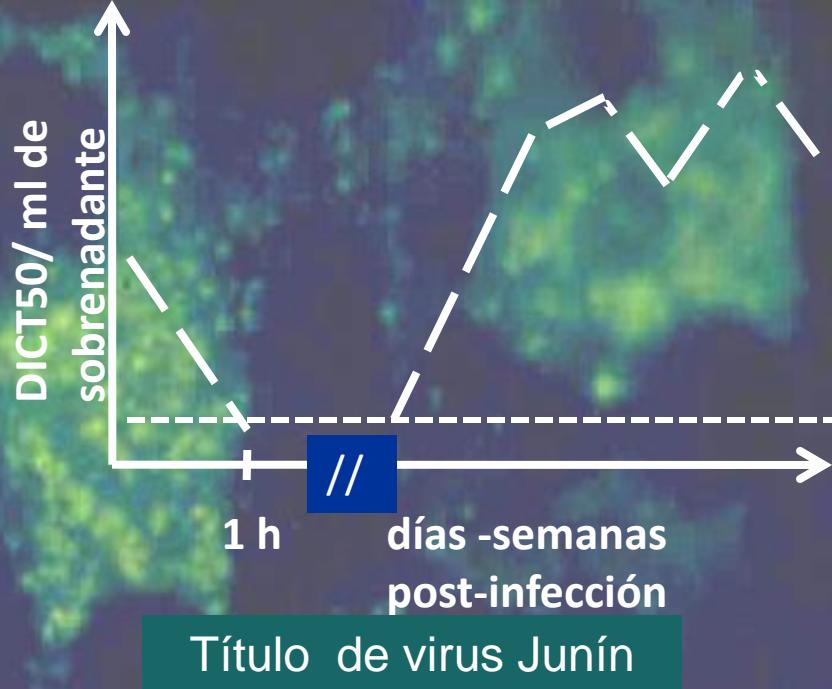
Búsqueda de la conversión serológica



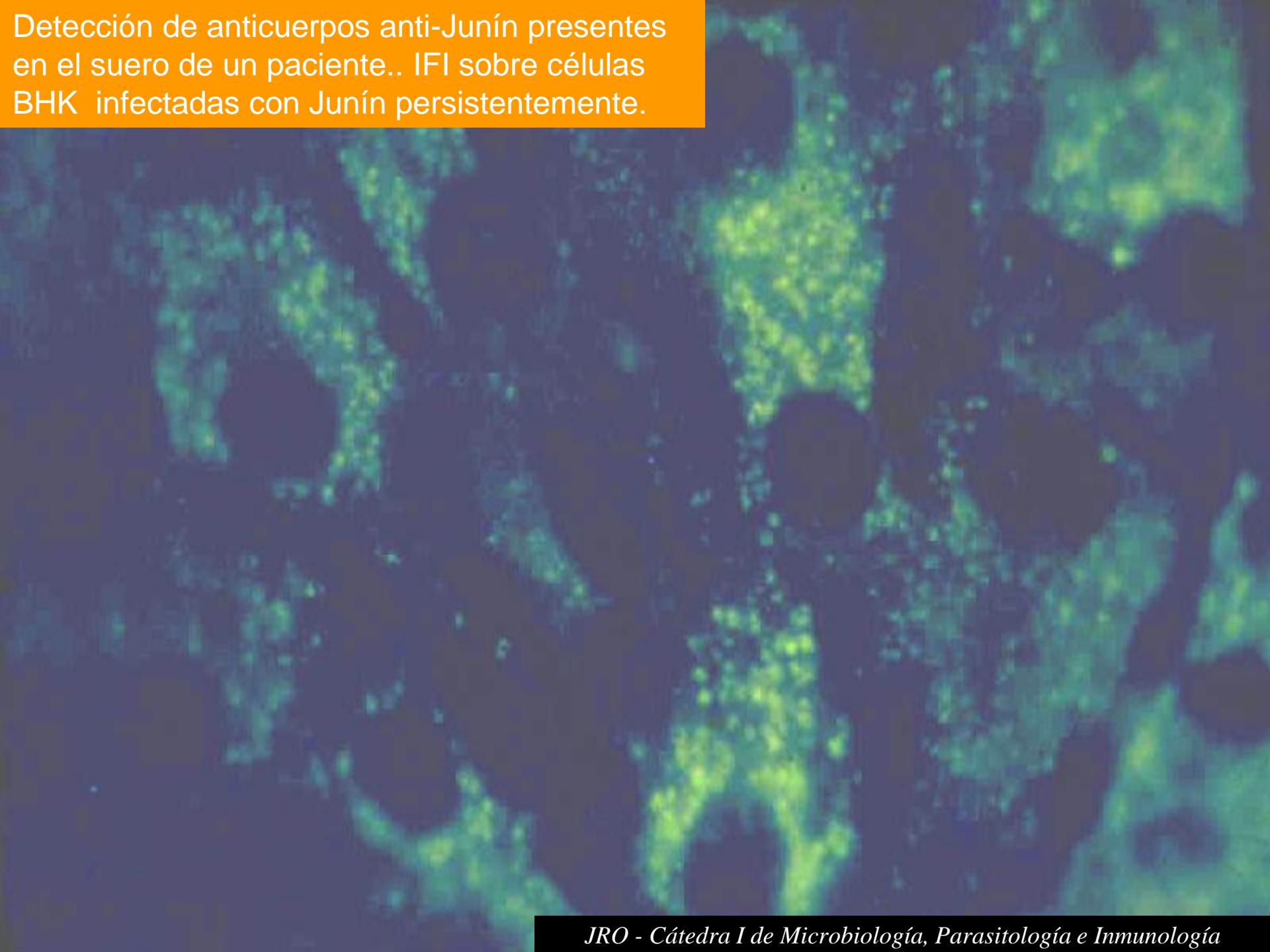
**Neutralización de la ACP por
Junín: presencia de Acs
específicos en el suero del
paciente.**

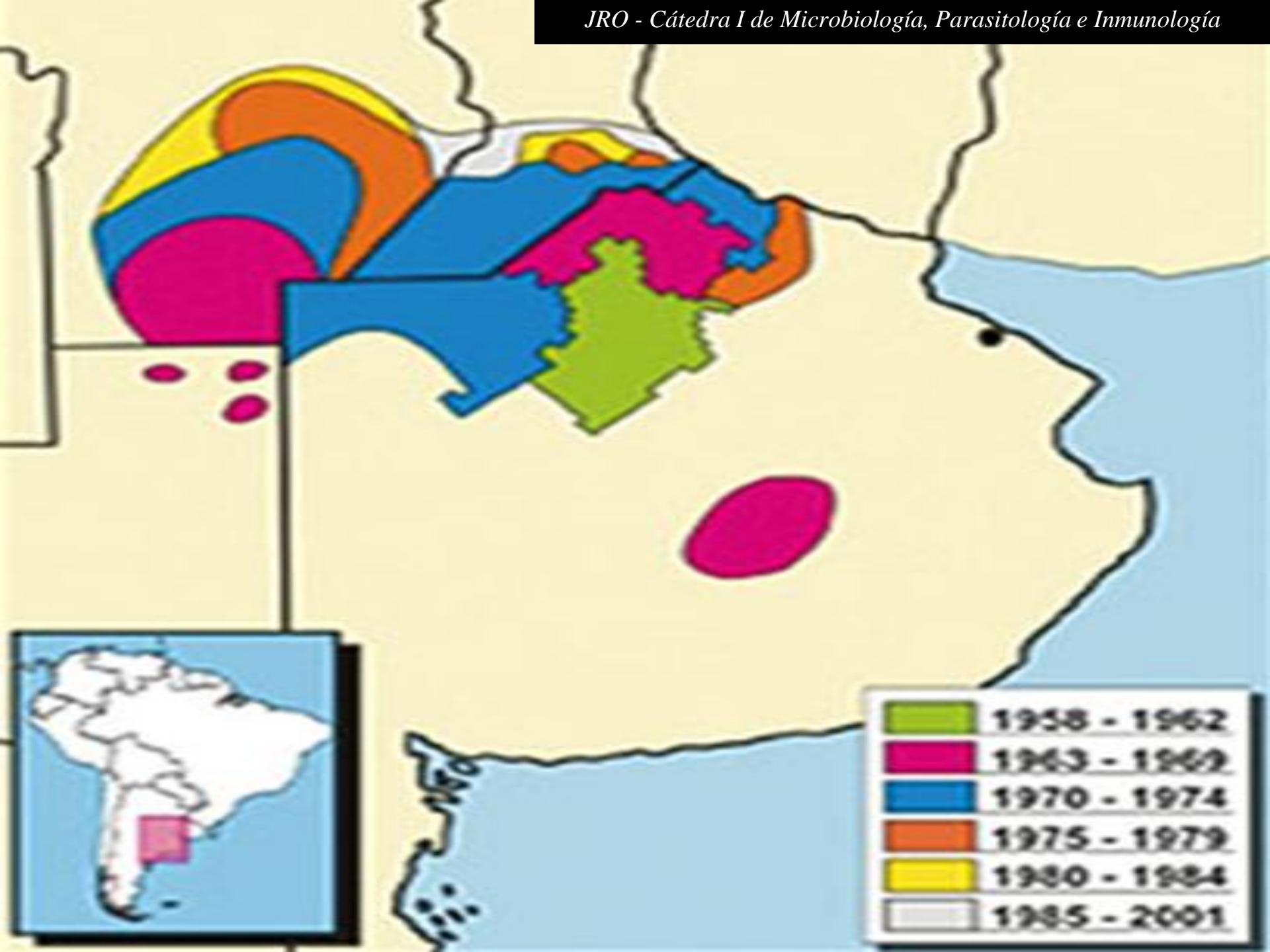


**Desarrollo experimental:
infección persistente productiva de
BHK con virus Junín
sin destrucción de la monocapa**
Virus detectable en extractos celulares
y en el sobrenadante.
Expresión de antígenos estructurales
(principalmente N) del virus Junín



Detección de anticuerpos anti-Junín presentes en el suero de un paciente.. IFI sobre células BHK infectadas con Junín persistentemente.







Cosecha manual del maíz.

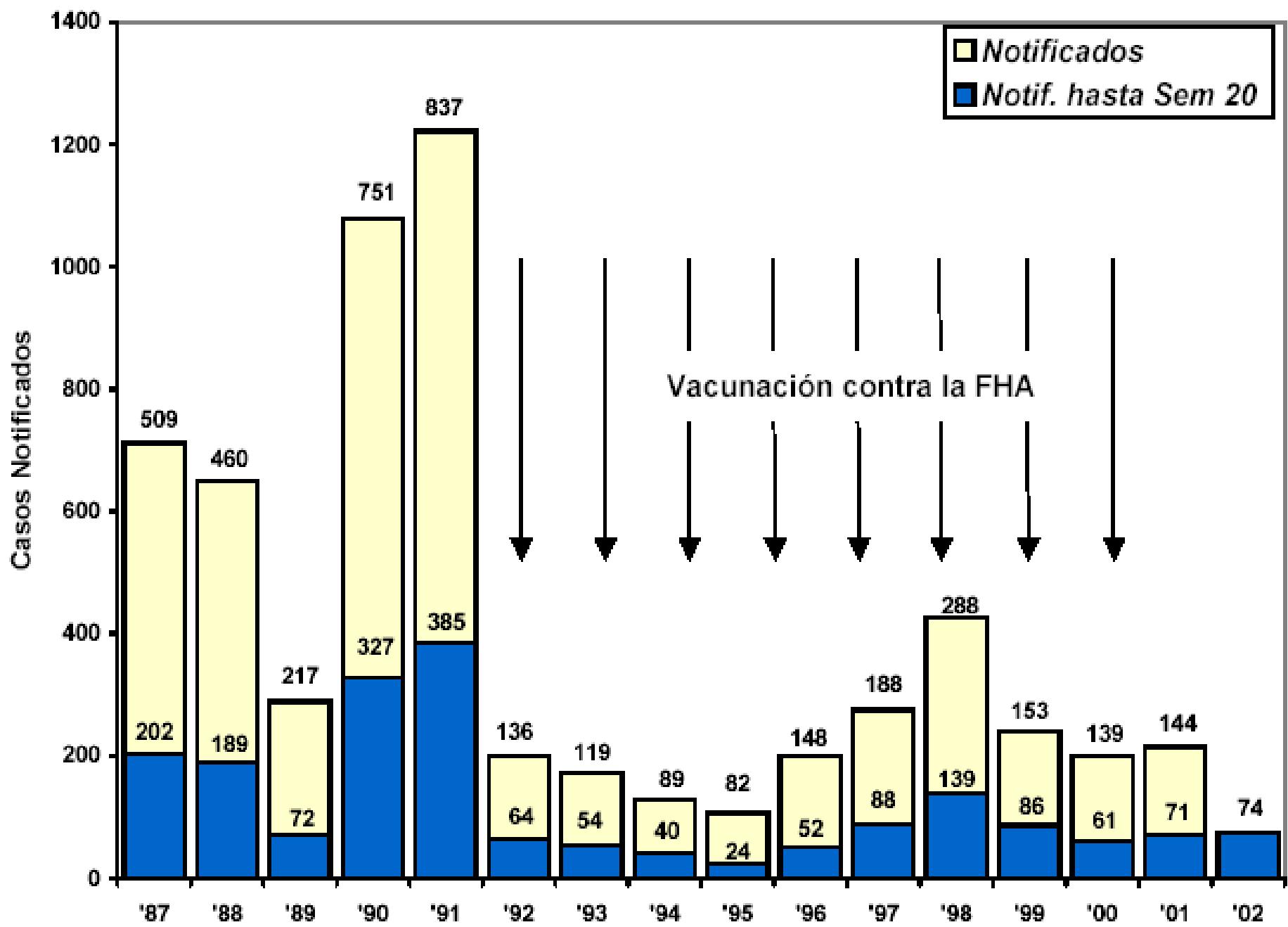
Año 1979

EPIEDEMILOGIA

- A. Área expuesta: 100.000 Km²
Población expuesta: 1.200.000 personas
Casuística anual: 330 casos (año 1979)
Mortalidad: 10 - 20%
- B. Reservorio del virus: 2 cricétidos - *Calomys musculinus*
- *Calomys laucha.*

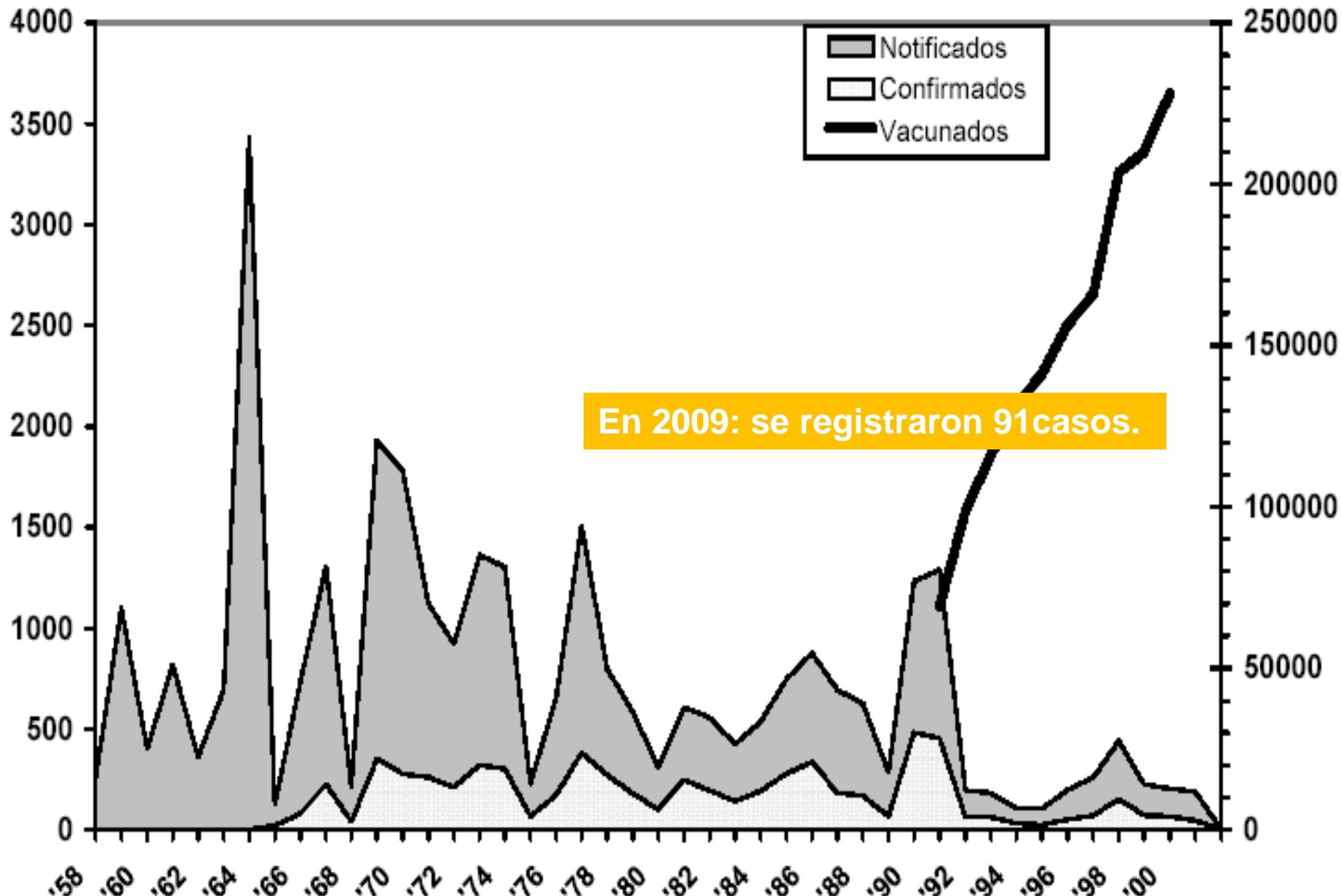
2017:

- ✓ Expuestos:
3 - 5.000.000
- ✓ Casos
confirmados:
4

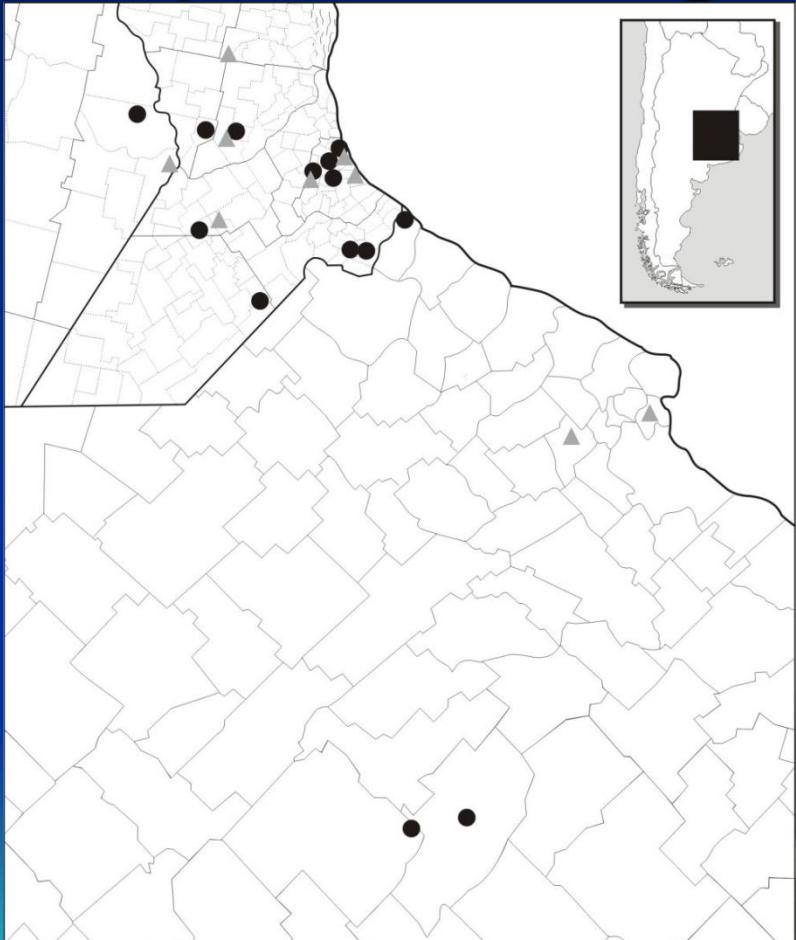


Casos FHA

Nº Vacunados
(acumulado)



Casos de FHA en 2011 según posible lugar de contagio



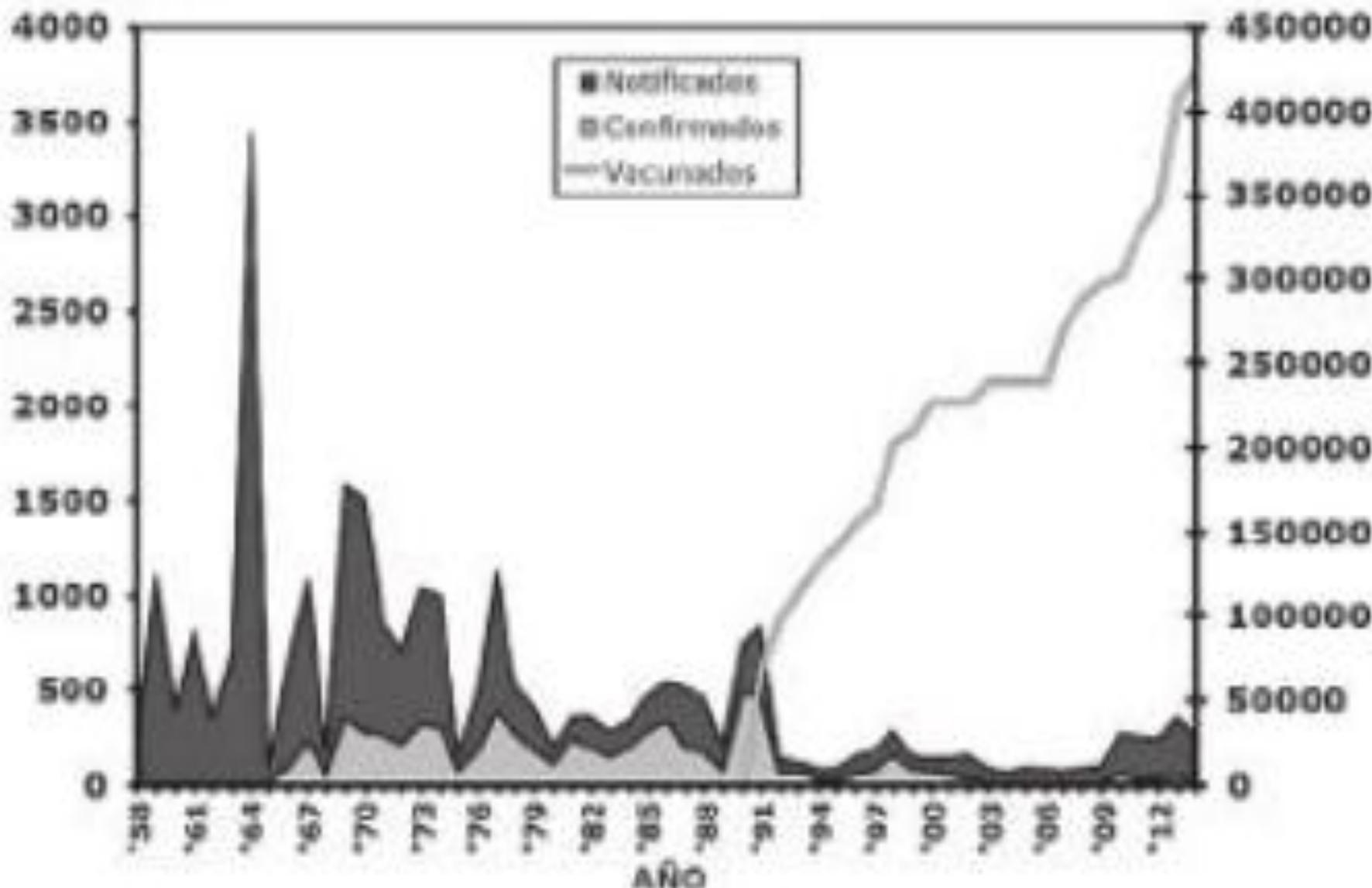
Casos confirmados 2011 (25)

Armstrong (1), Azul (2), Cañada Gómez (1),
Cañada Rica (1), Hinojo (1), J. B. Molina (1),
Los Quirquinchos (1), Marcos Juarez (1),
Pérez (1), Rosario (1), San Nicolás (1),
Soldini (1), Wheelwright (3), Zavalla (1).
Sin determinar: Pdo. Gral. Pueyrredon (1),
Dto. Rosario (2), *Sin determinar provincia* (5).

Casos probables 2011 (25)

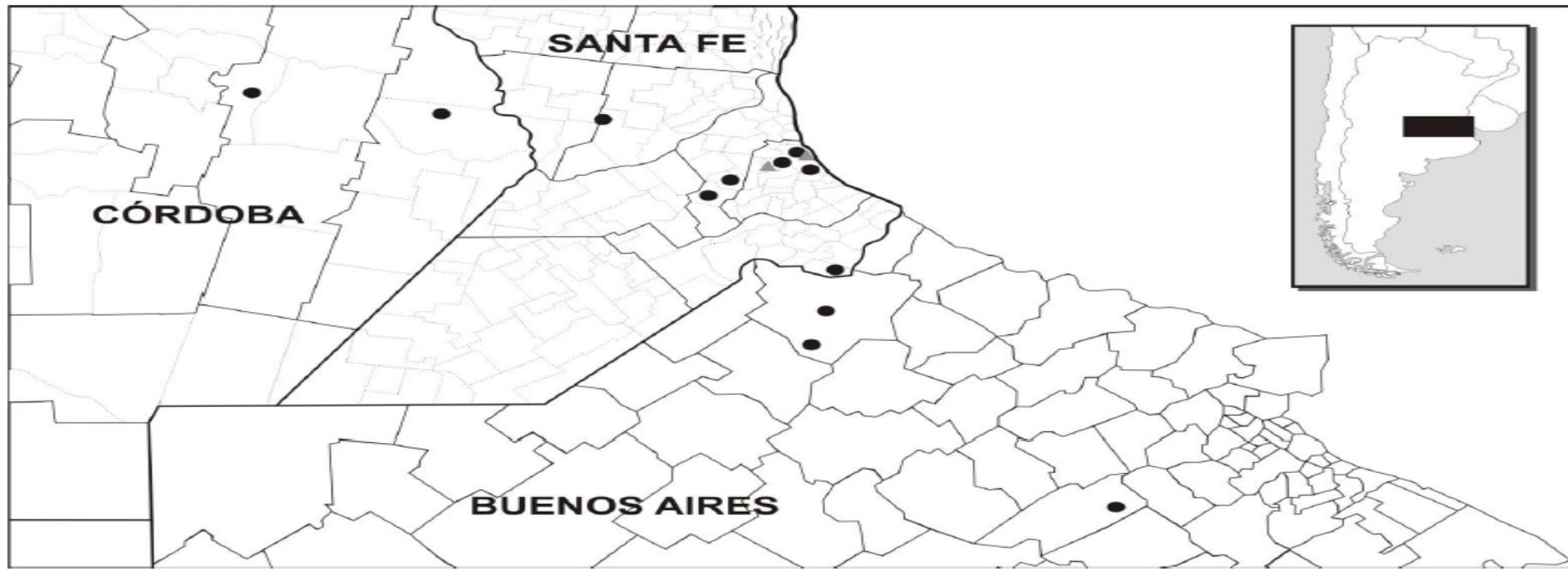
Cañada Gómez (2), Castelar (1), Chabas (1),
Cruz Alta (1), Gral. Lagos (1), Lujan (1),
Rosario (4), San Genaro (1), Zavalla (1).
Sin determinar: Provincia de Buenos Aires (1),
Provincia de Santa Fe (1), Dto. Rosario (1),
Sin determinar provincia (9).

Casos FHA



Fuente: Programa Nacional de control de la Fiebre Hemonrágica Argentina

CASOS DE FHA SEGÚN
POSIBLE LUGAR DE CONTAGIO
AÑO 2014



● Casos confirmados 2014 (21)

Provincia de Buenos Aires: Navarro (1), Ortiz Basualdo (1), Pergamino (1).

Provincia de Córdoba: Ballesteros (1), Leones (1).

Provincia de Santa Fe: Coronel Arnold (1), Fuentes (1), General Gelly (1), Las Parejas (1), Pérez (1), Rosario (5), Villa Gdor. Gálvez (1).

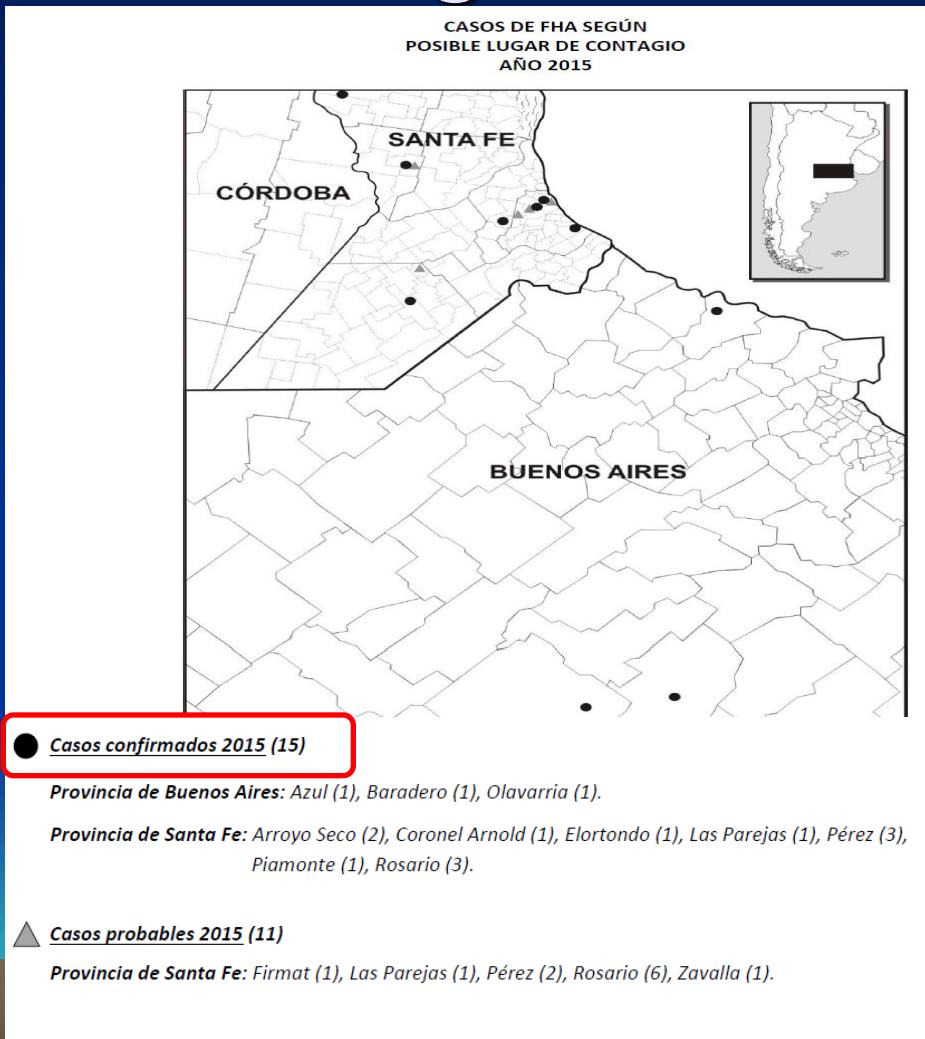
Sin determinar: Pcia. Buenos Aires (1), Pcia. Santa Fe (1), Dto. Rosario (1), Sin determinar provincia (2).

▲ Casos probables 2014 (3)

Provincia de Santa Fe: Pérez (1).

Sin determinar: Pcia. Santa Fe (1), Dto. Rosario (1).

Casos de FHA en 2015 según posible lugar de contagio



FHA: 2012 – 2017

Año	Casos confirmados
2012	21
2013	25
2014	21
2015	15
2016	10
2017	4
(al 30/10/2017: Sem.Epidemiol. 43)	

Fuente: Ministerio de Salud



Dr. Julio Barrera Oro



Dr. Julio I. Maiztegui

Profilaxis activa

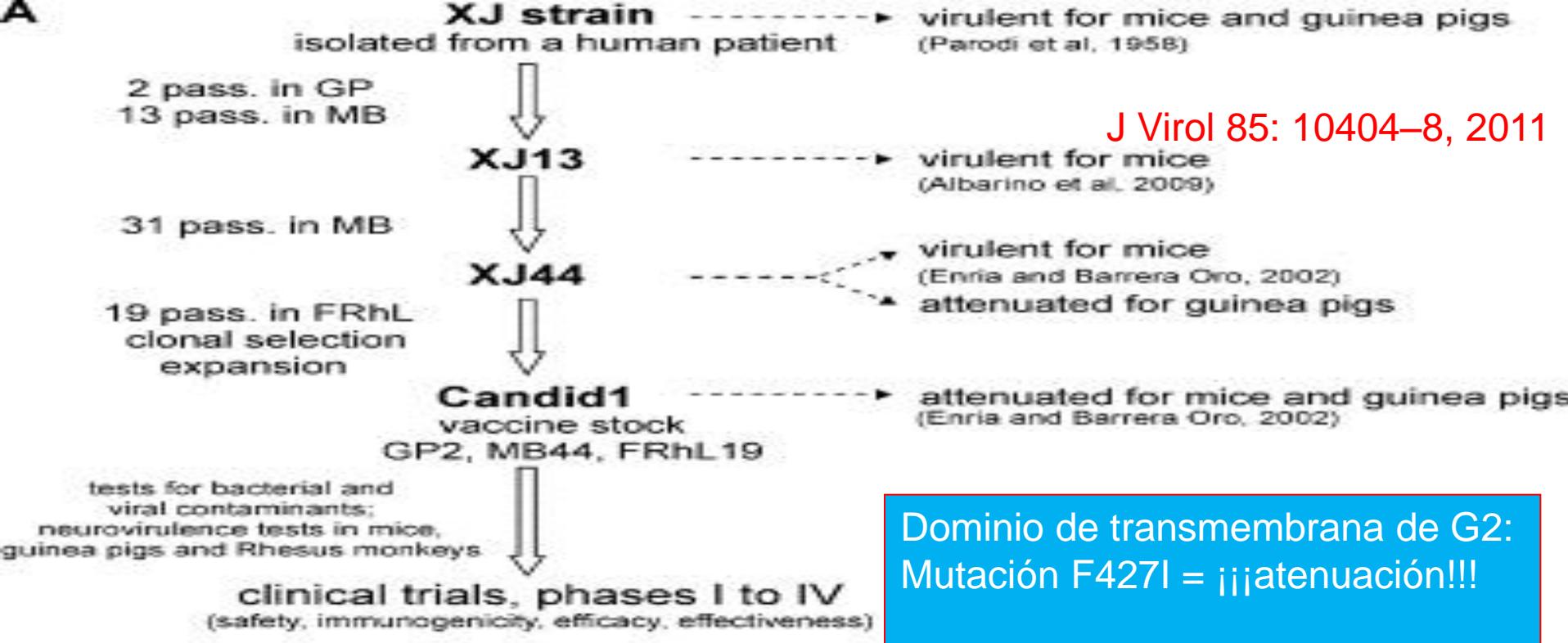
Vacuna atenuada Candid #1
Estudios que la avalan:

Inoculación	Nº de voluntarios	Tuvieron FHA
Vacuna	3255	1
Placebo	3245	22
Eficacia de la vacuna	95,5%	P= 0,0000028

Candid # 1:

39 nt diferentes en el fragmento S respecto a la cepa MC2

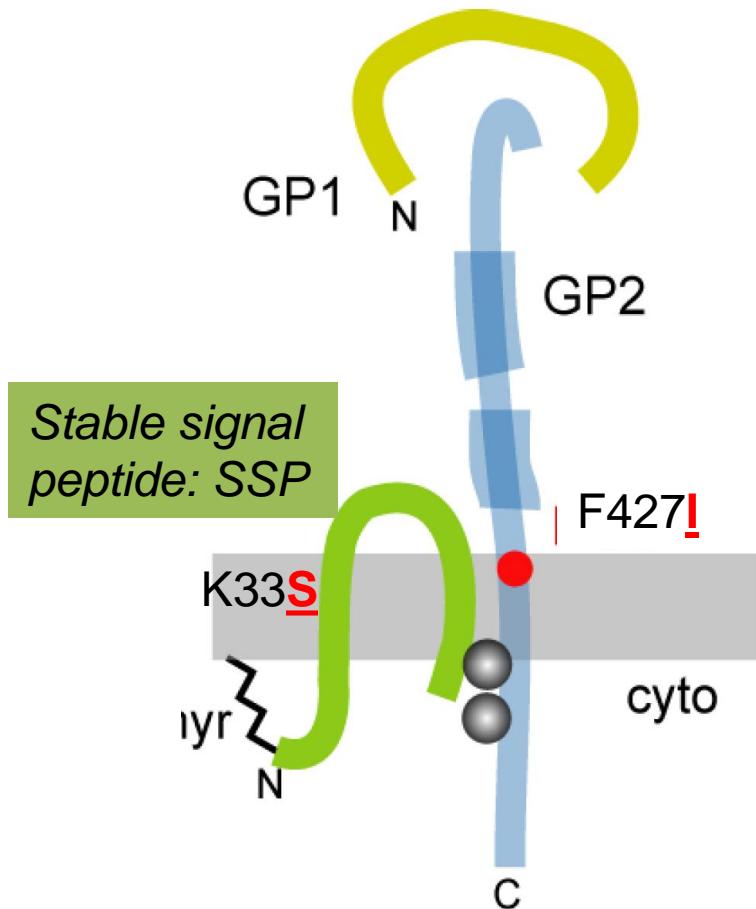
6 aa diferentes en la polimerasa respecto a otras cepas no atenuadas



B

	aa.pos.	XJ13	XJ17	XJ34	XJ39,48	Candid1
GPC	168	T	A	A	A	A
	G1 186	E	E	E	E	G
	206	S	S	S	S	P
	G2 427	F	F	F	F	I
N	446	T	T	S	S	S
	59	R	K	K	K	K
L	76	H	H	H	Y	Y
	415	V	V	V	V	A
	462	D	D	D	N	N
	936	L	L	L	P	P
	1059	K	R	R	R	R
	1156	R	R	R	R	K

Atenuación y estabilidad de la vacuna *Candid #1* de 2da. generación



F427 (Salvaje)+ K33S = No Fusión
F427! (Candid #1)+ K33 = Letal para el virus
F427! (Candid #1)+ K33S = Sí Fusión. Estable



Armando Parodi

Prof. Titular - Cát. de Microbiología

Descubridor del Virus Junín
agente de la FHA- en 1958

Cuadro hemorrágico en el
cobayo inoculado con
virus Junín



Cuadro hemorrágico en el cobayo inoculado con virus Junín



Cobayo infectado con virus Junín,
recibió inmunosuero anti-Junín
y sobrevivió

Para pensar...

¿Por qué el plasma de convaleciente
de FHA
(pero no el plasma normal)
reduce la mortalidad del 20 al 1%?



Gripón
o
Mal de los rastrojos
o
Mal de O'Higgins
o
Fiebre hemorrágica argentina
(FHA)

Tratamiento



Dr. Julio I. Maiztegui

Plasma humano de convaleciente de FHA:

**3500 Unidades terapéuticas (UT) / kg de peso
dentro de los 8 días de enfermedad**

UT: \sum (peso x título de cada unidad) / peso corporal

Complicación: síndrome neurológico tardío



Algunos estudios de patogénesis experimental

- Descubrimiento de la actividad de la RNA polimerasa de los arenavirus
- Infección experimental de Primates:
Cebus apella.
- *Rol de la respuesta inmune en la infección aguda vs la persistente en el modelo murino*

Ribonucleoproteínas (RNP) de Pichindé

200 nm

(b)

100 nm

100 nm

(c)

100 nm

(d)

100 nm

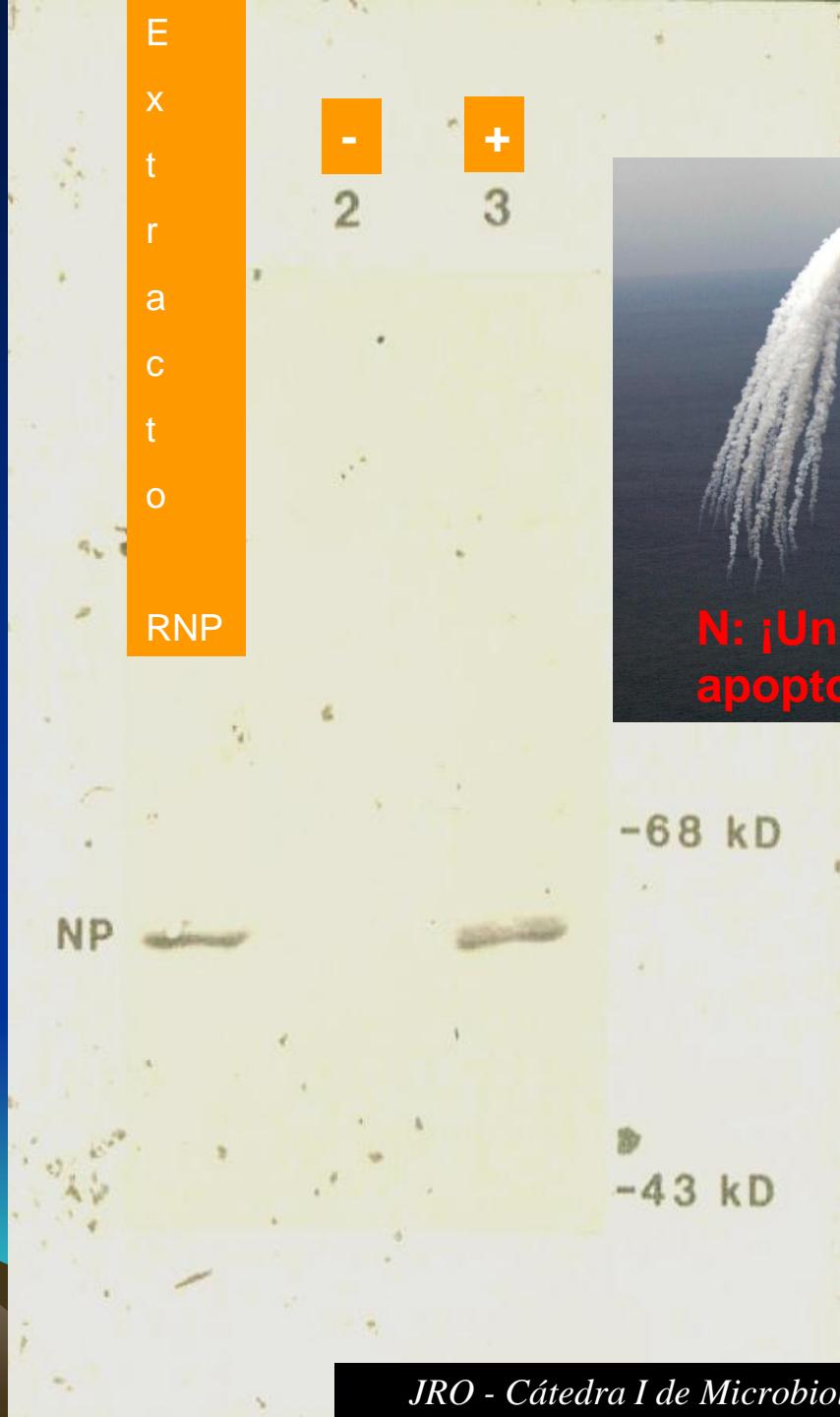
100 nm

Young P- Howard CR, J Gen Virol ,1983

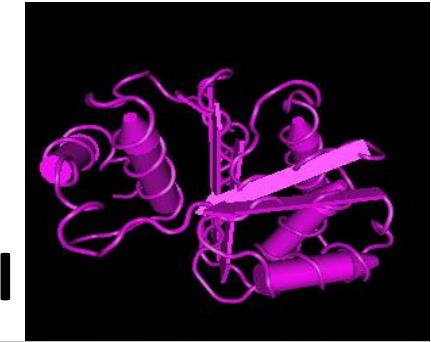
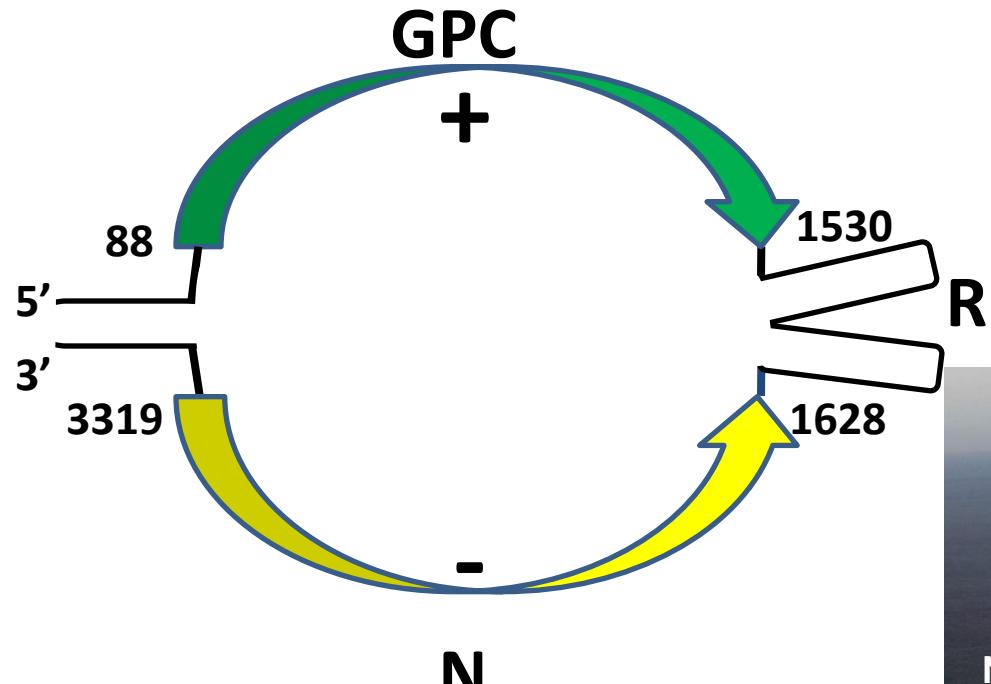
100 nm

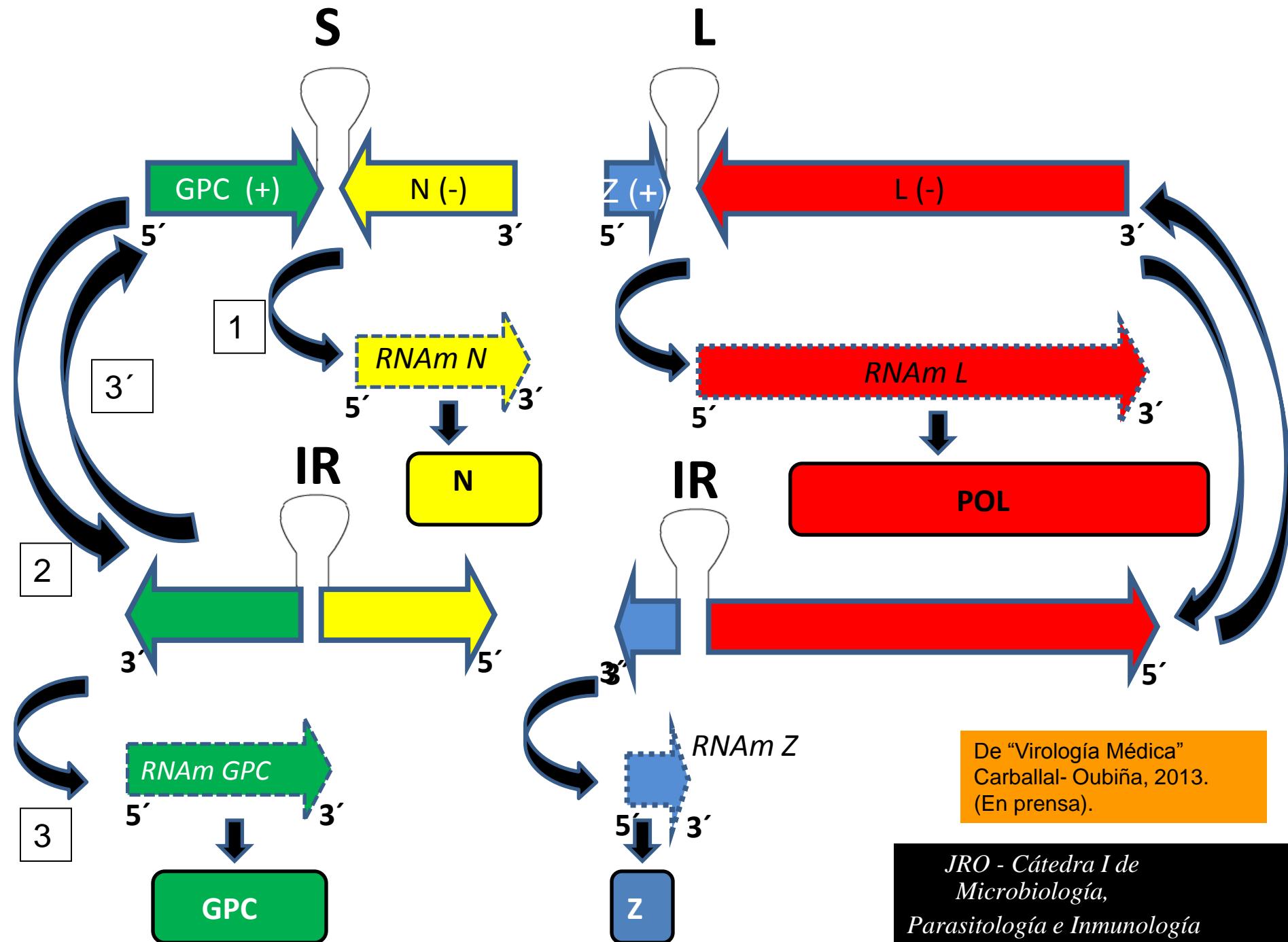
(e)

Western Blot
para la
Nucleoproteína
NP presente en
las RNP para
investigar la
actividad de
RNA polimerasa
viral asociada a
dicha fracción

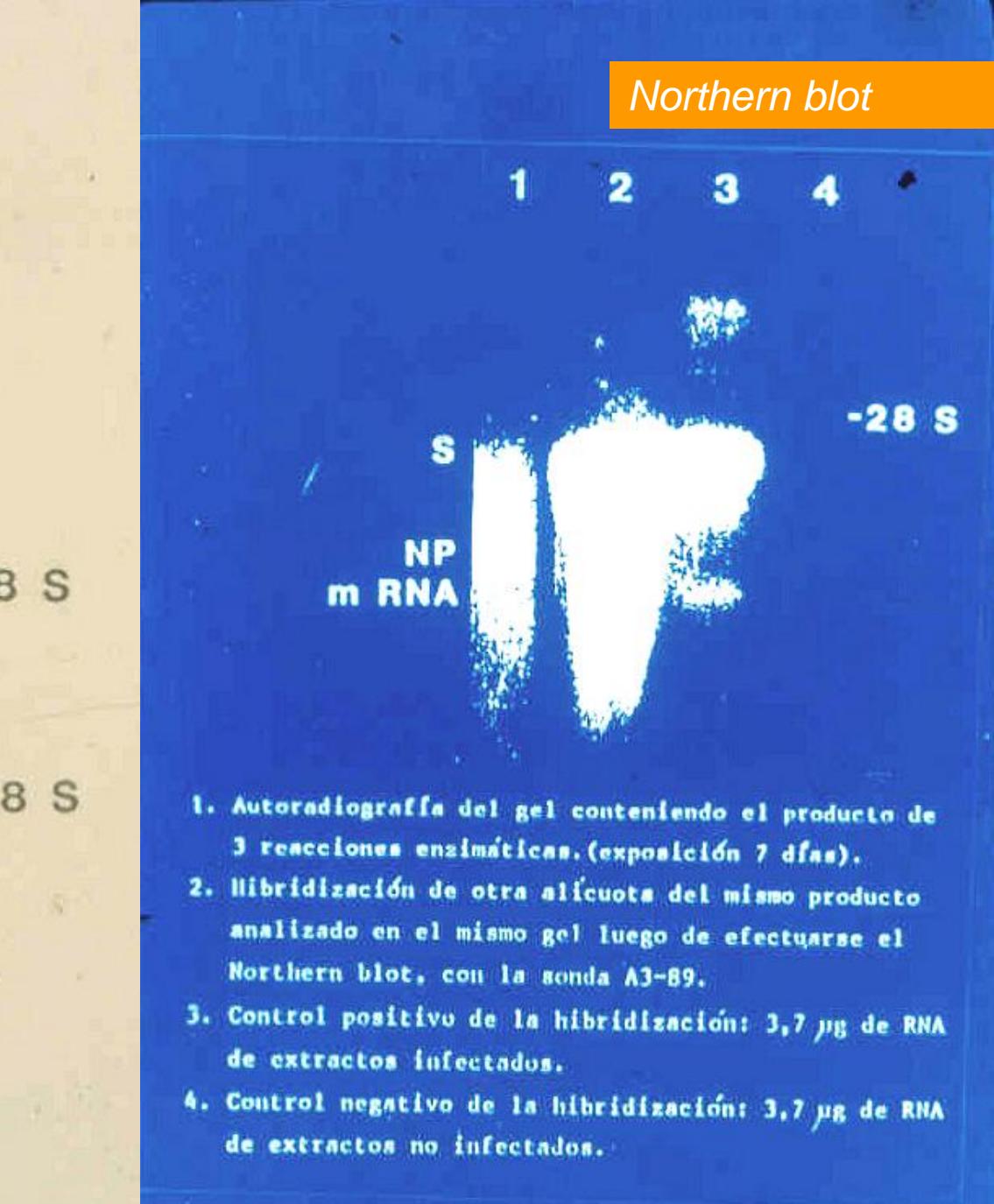


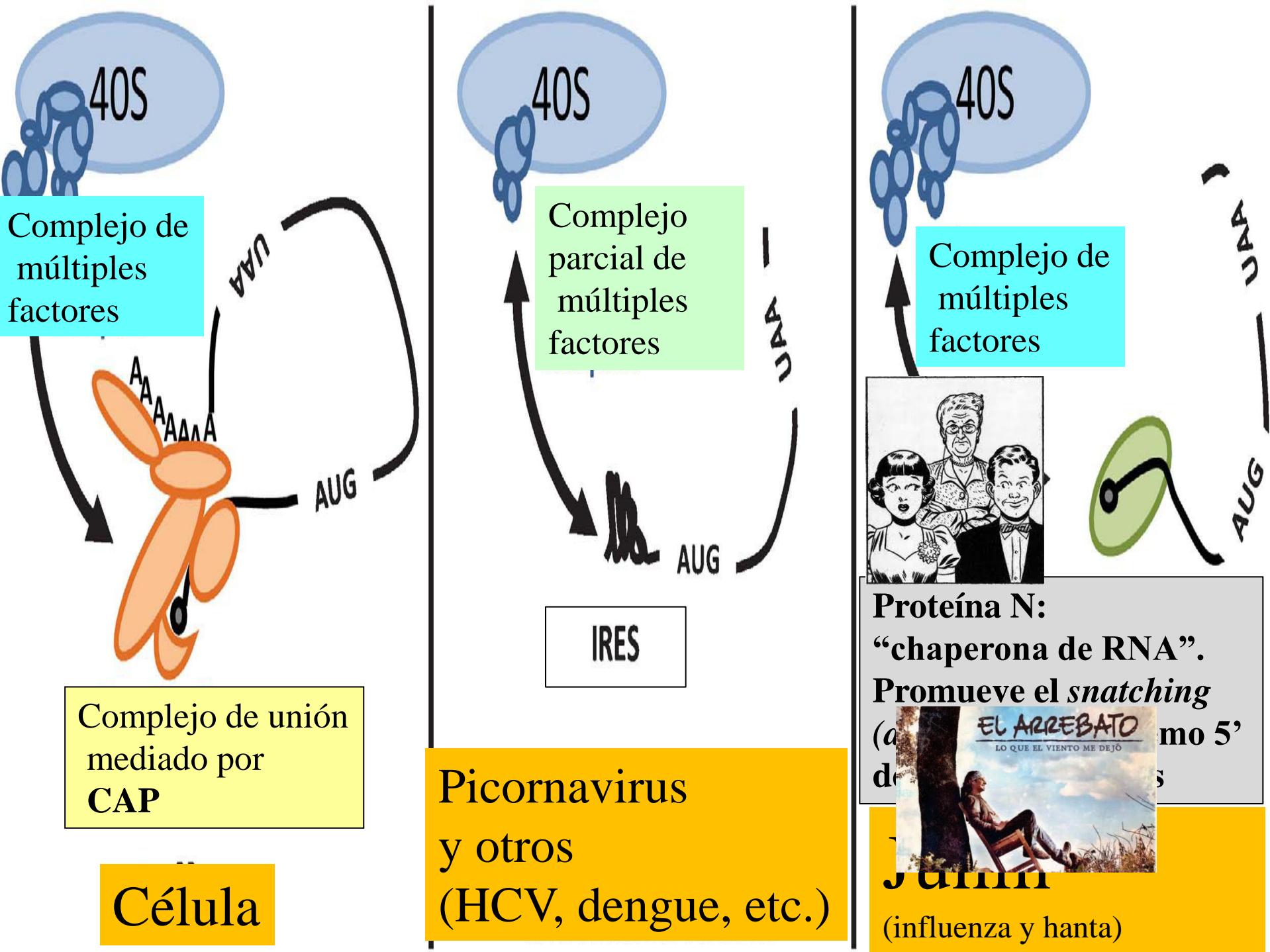
Organización genómica del segmento S del Virus Junín



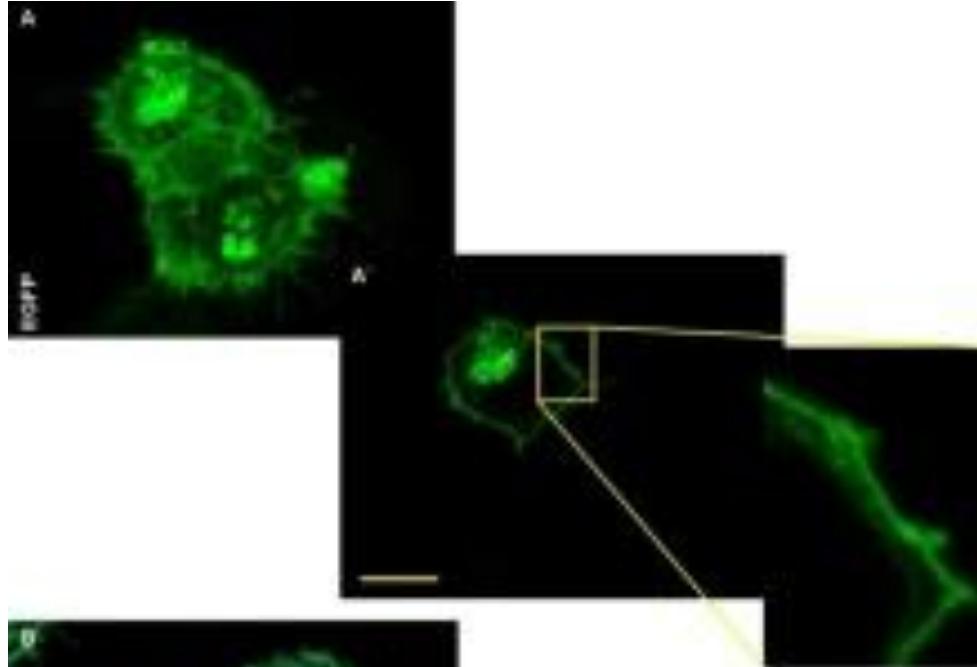
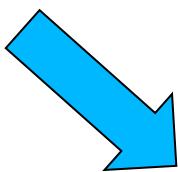


Síntesis de RNA

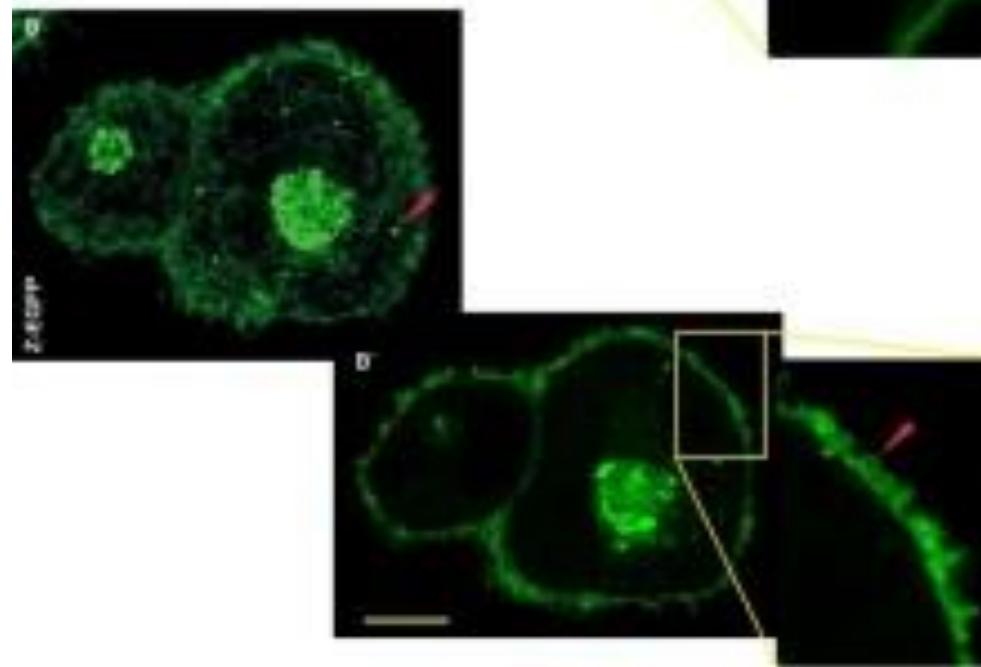




Células T 293



Plásmido con
eGFP sin Z:



Plásmido con
eGFP y Z:
brotación

Parálisis de miembros producida
por el virus Junín
Cuadro neurológico:
¿efecto directo viral directo
o mediado por la respuesta inmune?



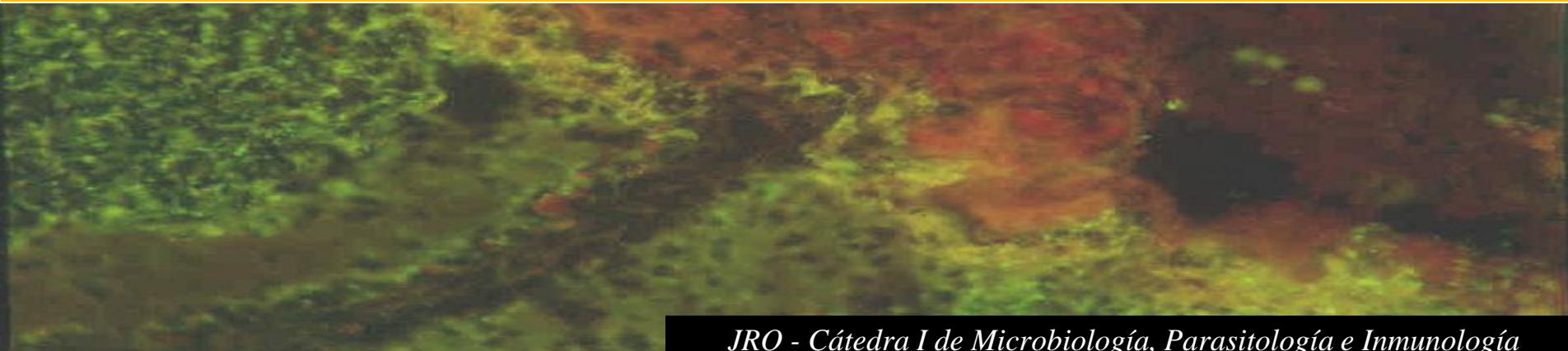
TRANSFERENCIA DE ESPLENOCITOS A BALB ATIMICOS LACTANTES INFECTADOS CON V.J.

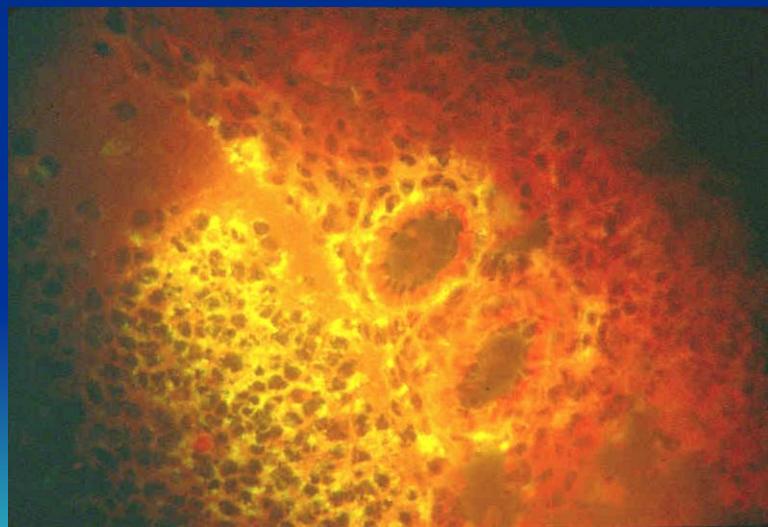
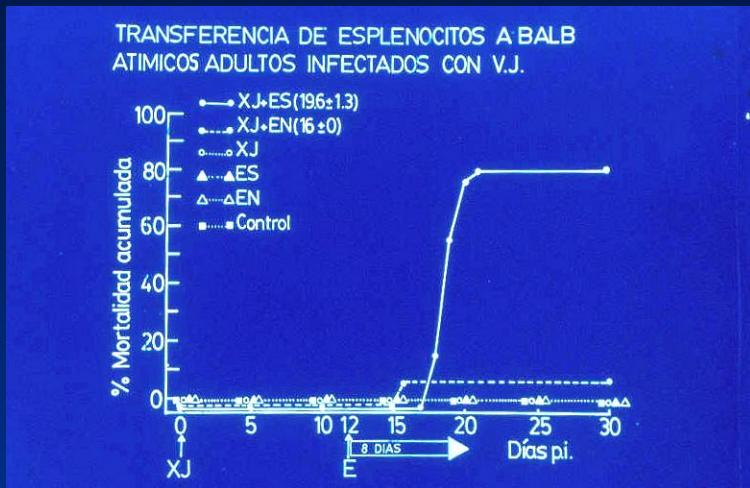


Expresión de antígenos de virus Junín en encéfalo de ratón atílico.

IFI. Las células teñidas de color "verde manzana" reflejan la expresión de gránulos citoplasmáticos por acumulación de antígenos de nucleocápside viral en el citoplasma..

Coloración de contraste con azul de Evans (se observan estructuras teñidas de rojo).. La yuxtaposición de imágenes obtenidas con fluoresceína y azul de Evans, se observa en color amarillento.





Encefalitis murina es T-dependiente
¡NO ES ASÍ EN EL HUMANO!



Callithrix jacchus



✓ **Modelo para FHA**

✓ **Protección cruzada
inducida por
virus Tacaribe**

✓ **Protección conferida por
tratamiento con
anticuerpos anti-Junín**

Mercedes
Weissenbacher



Cebus apella infectado con Junín

Estudios de neurovirulencia con la cepa XJ Clon 3 utilizada inicialmente como vacuna para prevenir la FHA

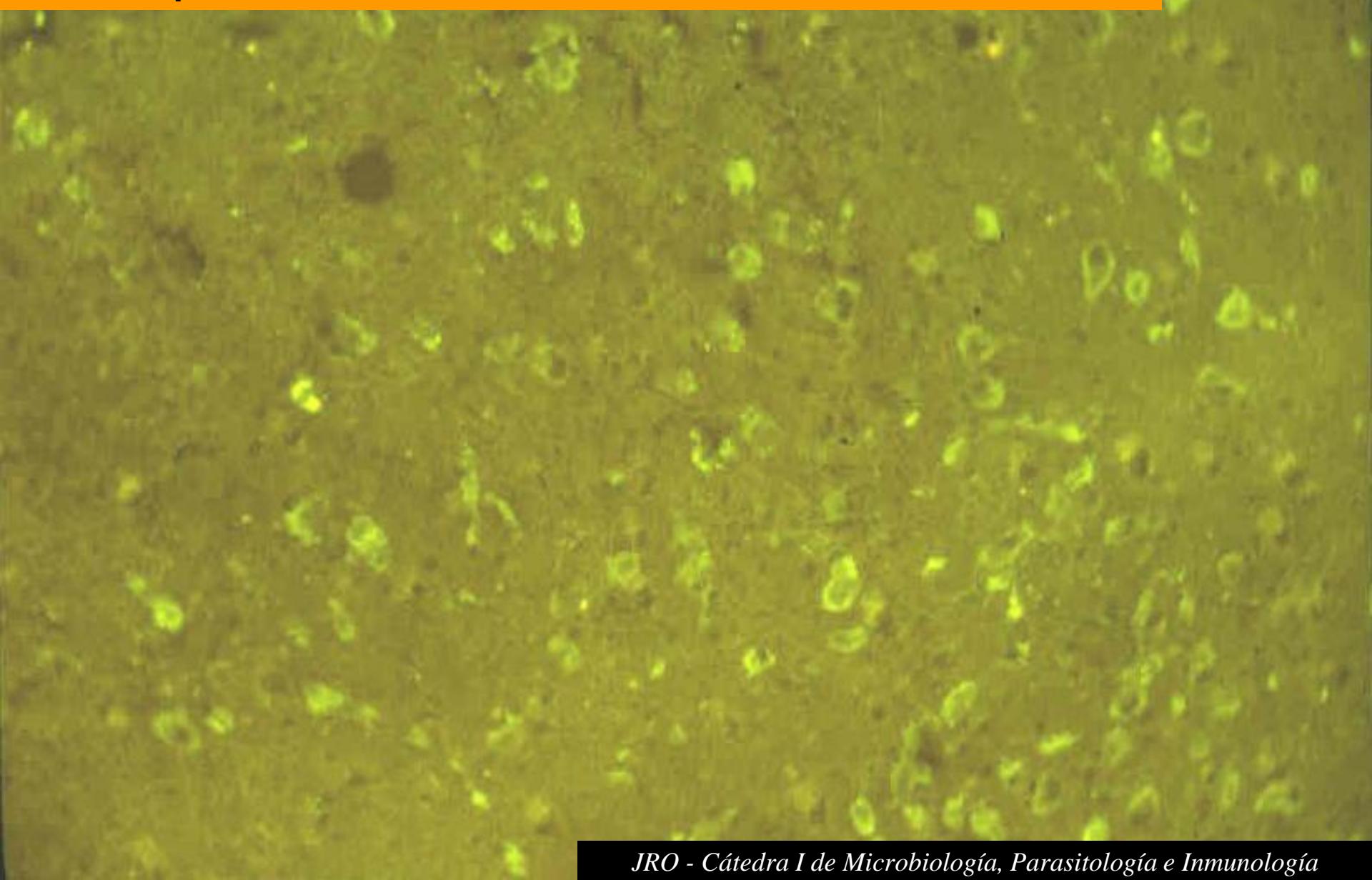




**Miocarditis aguda por la cepa
XJ Clon 3 de Virus Junín en
mono *Cebus***

Expresión de antígenos de la cepa XJ Clon 3 de virus Junín en el encéfalo de un mono *Cebus* al 155º día post-infección.

Infección persistente.

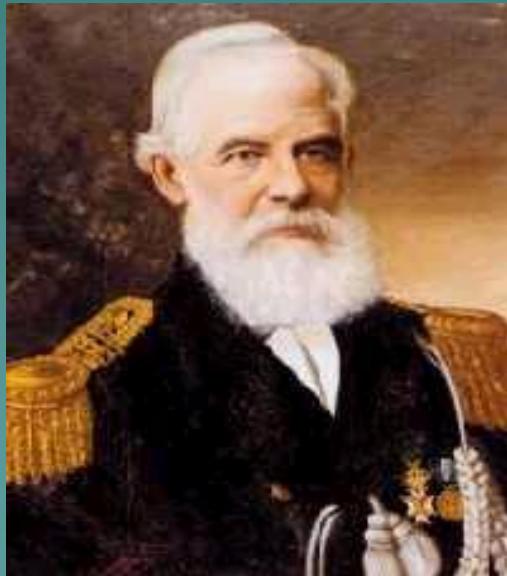


Peter Doherty y Rolf Zinkernagel descubrieron la restricció n genética de la respuesta T mediante brillantes experimentos *in vitro* con el arenavirus LCM. Recibieron el Premio Nobel de Medicina o Fisiología en 1996.



Formar(se) desde la Verdad, en
el Bien, y por amor al prójimo

*Francisco
Xavier
Muñiz*



Carlo Urbani





Commentary

A tribute to Sheik Humarr Khan and all the healthcare workers in West Africa who have sacrificed in the fight against Ebola virus disease: Mae we hush

• Daniel G. Bausch ^{a,b,*}, James Bangura ^c, Robert F. Garry ^b, Augustine Goba ^{a,c}, Donald S. Gammie ^{b,c}, Frederique A. Jacquemyn ^b, Susan L. McLellan ^b, Simbirie Jalloh ^{a,c}, Lina M. Moses ^b, John S. Schieffelin ^a



Fig. 1. Sheik Humarr Khan, Chief Physician of the Lassa Fever Research Program at Kenema Government Hospital in Kenema, Sierra Leone, who died of Ebola virus disease on July 29th, 2014. (Photo courtesy of Pardis Sabeti.)