

REPUBLICA ARGENTINA



MINISTERIO DE SALUD

Informe para la XXII Reunión Anual del Programa Nacional de Control de la Fiebre Hemorrágica Argentina

Casilda, Pcia. de Santa Fe

28 de Junio de 2007

MINISTERIO DE SALUD
Dr. Gines González García

SECRETARIA DE POLITICAS, REGULACION Y RELACIONES SANITARIAS
Dr. Carlos Soratti

ADMINISTRACION NACIONAL DE LABORATORIOS
E INSTITUTOS DE SALUD
“DR. CARLOS G. MALBRAN”
Dr. Gustavo Ríos

INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES
VIRALES HUMANAS
“DR. JULIO I. MAIZTEGUI”
Dra. Delia Enria

XXII REUNION ANUAL DEL PROGRAMA NACIONAL DE CONTROL DE LA FIEBRE HEMORRAGICA ARGENTINA

El Programa Nacional de control de la FHA y el Ministerio de Salud de la Provincia de Santa Fe, invitan a Ud. a participar de la Reunión Anual a realizarse el día 28 de junio de 2007, en la ciudad de Casilda.

PROGRAMA DE ACTIVIDADES

- 9:30 a 10:00** Apertura
Autoridades nacionales: Ministerio de Salud de la Nación, ANLIS, INEVH
Autoridades provinciales: Ministerio de Salud de la Provincia de Buenos Aires, Ministerio de Salud de la Pcia. de Córdoba, Ministerio de Salud de la Provincia de La Pampa, Ministerio de Salud de la Pcia. de Santa Fe.
Autoridades municipales
- 10:00 a 11:00** Análisis del brote epidémico de 2006 y de los casos registrados en el presente año. Evolución de la incidencia en los últimos años.
Análisis y discusión de los siguientes aspectos del Programa Nacional de Control de la FHA:
- Vigilancia epidemiológica y diagnóstico etiológico
 - Atención médica y bancos de plasma de inmune
 - Diagnóstico clínico precoz. Diagnóstico diferencial.
- Presentación a cargo de: Provincia de Santa Fe: Dr. Nicolás Mocarbel; Pcia. de Buenos Aires: Dr. Jorge Bolpe; Pcia. de Córdoba: Dra. María Frías. Coordinación: Dr. Julio Befani, Dr. Raúl Alvarez.
- 11:00 a 11:15** Pausa
- 11:15 a 11:45** Informe epidemiológico integrado.
Lic. María Rosa Feuillade.
- 11:45 a 12:30** Valor predictivo de la técnica de PCR en el diagnóstico de la Fiebre Hemorrágica Argentina.
Dra. Gladys Calderón.
- 12:30 a 13:30** Pausa
- 13:30 a 14:30** Informe de avance de la vacunación con Candid #1: planificación y aspectos operativos de la vacunación en el marco del Programa Nacional de Inmunizaciones.
Presentación a cargo de los responsables de la vacunación en la Provincia de Santa Fe, Pcia. de Buenos Aires y Pcia. de Córdoba. Coordinación: Dra. Delia Enría.
- 14:30 a 15:00** Discusión de las acciones a realizar durante el período 2007-2008.
Coordinación: Dra. Ana María Briggiler, Dra. María Frías, Dr. Jorge Bolpe, Dr. Nicolás Mocarbel, Dr. Raúl Alvarez.
- 15:00 a 15:30** Conclusiones y cierre.

Lugar de realización: Salón Dorado de la Municipalidad, Casilda.

Tema	Pág.
• Programa de actividades	3
• Casos de FHA por Centro de Notificación, año 2006 (Tabla 1)	7
• Casos de FHA según posible lugar de contagio, año 2006 (Tabla 2)	8
• Evolución de los casos notificados con diagnóstico clínico de FHA, año 2006 (Tabla 3).....	9
• Casos de FHA según género y edad, año 2006 (Tabla 4).....	10
• Casos de FHA según posible lugar de contagio, año 2006 (Figura 1).....	11
• Distribución anual de casos notificados con diagnóstico clínico de FHA desde 1990 hasta 2007 (Figura 2).....	12
• Vacunación con Candid #1 contra la Fiebre Hemorrágica Argentina. Programa Nacional de Inmunizaciones, año 2007 (Tabla 5).....	13
• Valor predictivo de la técnica de PCR en el diagnóstico de la Fiebre Hemorrágica Argentina.....	14
• Anexo I: Diagnóstico de infección por virus Junin: instructivo para la toma y envío de muestras	17

CASOS DE FHA POR CENTRO DE NOTIFICACION

AÑO 2006

Centro de Notificación	Total Casos Notificados	Diagnóstico Etiológico ⁽¹⁾					Vacunados
		No Vacunados			Muertos ⁽³⁾	Curados	
		Curados					Negativos
		Confirm.	Negativos	Incomplet ⁽²⁾ Estudiados			
<u>Pcia. Buenos Aires</u>							
Azul	2	0	0	2	0	0	
Bolívar	1	0	0	1	0	0	
Junin	2	0	1	1	0	0	
Mar del Plata	2	0	0	2	0	0	
Pergamino	29	2	19	3	2	3	
San Nicolás	1	0	0	0	1	0	
<u>Pcia. Córdoba</u>							
Río Cuarto	1	0	0	1	0	0	
<u>Pcia. de Santa Fe</u>							
Esperanza	1	0	0	0	1	0	
Rosario	36	9	15	4	5	3	
Santa Fe Capital	1	0	0	0	1	0	
San Lorenzo	1	0	0	0	1	0	
Va. Constitución	2	0	2	0	0	0	
Venado Tuerto	1	0	0	0	1	0	
Total General	80	11	37	14	12	6	

(1) Por conversión serológica y/o aislamiento de virus Junin o PCR.

(2) Ausencia de muestras adecuadas para completar los estudios virológicos.

(3) Se discriminan en Tabla 3.

CASOS DE FHA SEGUN POSIBLE LUGAR DE CONTAGIO

AÑO 2006

Lugar de Contagio	Total Casos Notificados	Notificados menos negativos *	
		Curados	Muertos
<u>Prov. Buenos Aires</u>	16	3	1
Chillar		1	
Arrecifes			1
Batán		1	
Azul		1	
<u>Prov. Córdoba</u>	2	2	0
Río III		1	
Sin determinar		1	
<u>Prov. Entre Ríos</u>	2	0	0
<u>Prov. Santa Fe</u>	56	11	3
Chabas		2	
Cnel. Bogado		1	
Casilda		1	1
Pueblo Esther		1	
Soldini		1	
Rosario		3	
Dto. Rosario		2	2
<u>Sin Determinar Prov.</u>	4	1	1
Total General	80	17	5

* Se considera el total de casos notificados menos los negativos por serología y los casos clínicamente no compatibles, entendiendo que esta cifra es la que mejor refleja el número real de casos.

No se dieron casos en vacunados.

**EVOLUCION DE LOS CASOS NOTIFICADOS CON
DIAGNOSTICO CLINICO DE FHA
AÑO 2006**

CENTRO DE NOTIFICACIÓN	TOTAL CASOS NOTIFICADOS	EVOLUCION	
		CURADOS	MUERTOS
<u>Prov. Buenos Aires</u>			
Azul	2	2	0
Bolívar	1	1	0
Junin	2	2	0
Mar del Plata	2	2	0
Pergamino	29	27	2 ⁽¹⁾
San Nicolás	1	0	1 ⁽²⁾
<u>Prov. Cordoba</u>			
Río Cuarto	1	1	0
<u>Prov. Santa Fe</u>			
Esperanza	1	0	1 ⁽³⁾
Rosario	36	31	5 ⁽⁴⁾
Santa Fe Capital	1	0	1 ⁽⁵⁾
San Lorenzo	1	0	1 ⁽⁶⁾
Va. Constitución	2	2	0
Venado Tuerto	1	0	1 ⁽⁷⁾
TOTAL	80	68	12

- (1) En un caso el resultado de PCR fue positivo. En el caso restante el resultado de PCR fue negativo, siendo su diagnóstico clínico no compatible con FHA.
- (2) El resultado de PCR fue negativo, siendo el diagnóstico clínico compatible con FHA.
- (3) El resultado de PCR fue negativo, siendo el diagnóstico clínico y la epidemiología no compatible con FHA.
- (4) En 2 casos el resultado de PCR fue positivo. En los 3 restantes el resultado de PCR fue negativo, siendo en un caso el diagnóstico final SPH, en otro caso el diagnóstico clínico no era compatible con FHA y en el caso restante no se disponía de información clínica suficiente (clínica dudosa).
- (5) El resultado de PCR fue negativo, siendo el diagnóstico clínico y la epidemiología no compatible con FHA.
- (6) El resultado de PCR fue negativo, siendo su diagnóstico clínico no compatible con FHA.
- (7) El resultado de PCR fue negativo, siendo su diagnóstico clínico no compatible con FHA.

CASOS DE FHA SEGUN GENERO Y EDAD (*)

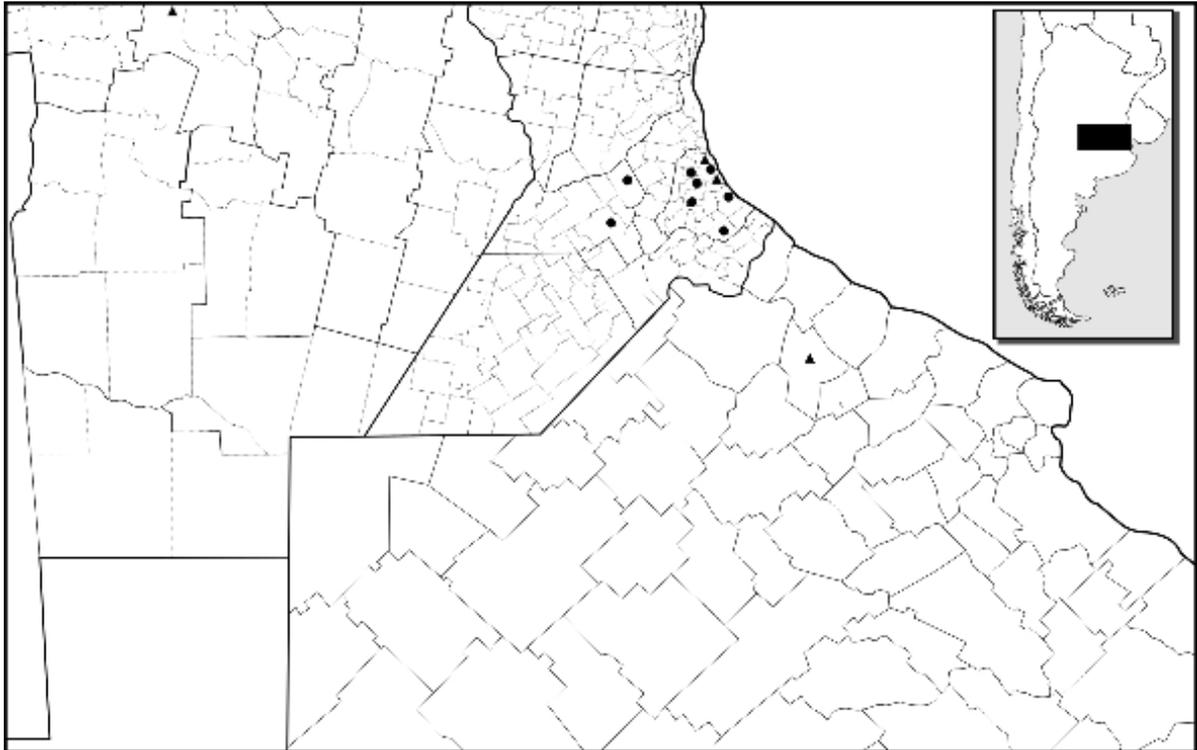
AÑO 2006

EDAD	HOMBRES	MUJERES	TOTAL
Menores de 15	0	1	1
15-24	5	0	5
25-34	4	4	8
35-44	4	0	4
45-54	0	0	0
55-64	1	1	2
Mas de 65	1	1	2
TOTAL	15	7	22

(*) Se considera el total de casos notificados menos los negativos por serología y los casos clínicamente no compatibles.

**CASOS DE FHA SEGÚN
POSIBLE LUGAR DE CONTAGIO**

AÑO 2006



● **Casos confirmados 2006 (14)**

Rosario (2); Casilda (2); Pueblo Esther (1); Chabas (2); Soldini (1); Cnel. Bogado (1).

Sin determinar:

Dto. Rosario (4).

Sin determinar provincia (1).

▲ **Casos sospechosos 2006 (8)**

Arrecifes (1); Río III (1); Rosario (1).

Sin determinar:

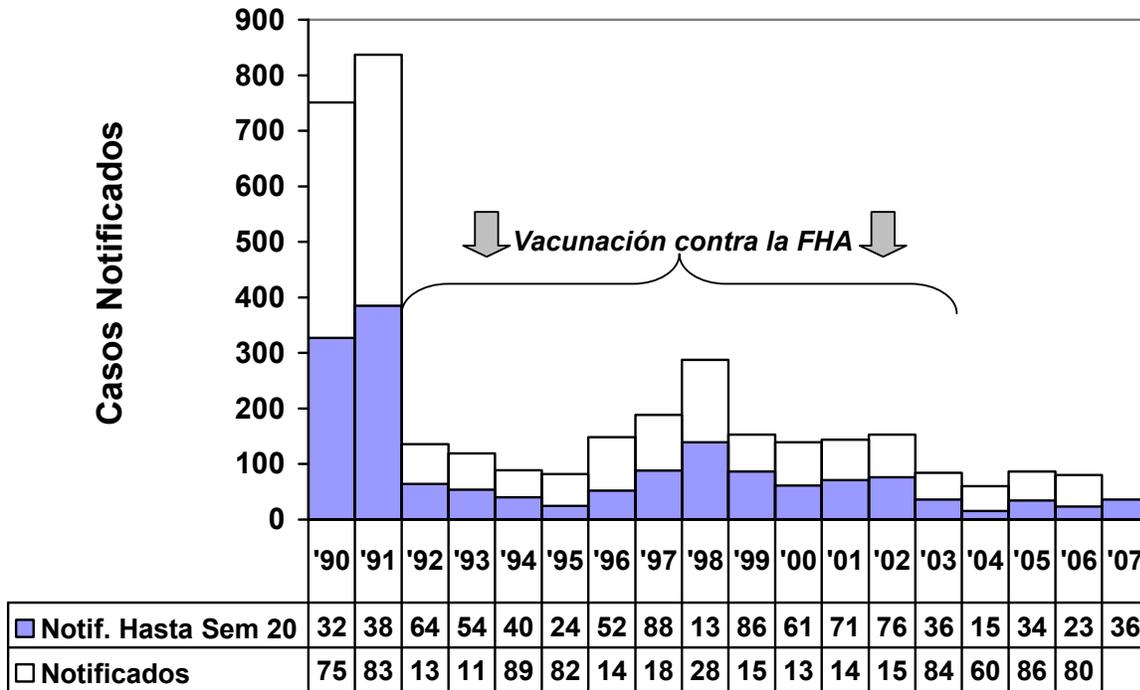
Pcia. de Córdoba (1)

Sin determinar provincia (1).

No graficado en el mapa Sur de la Provincia de Bs. As:

Chillar (1); Azul (1); Batán (1).

**DISTRIBUCIÓN ANUAL DE CASOS NOTIFICADOS
CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE FHA
DESDE 1990 HASTA 2007**



**VACUNACIÓN CON CANDID #1 CONTRA
LA FIEBRE HEMORRÁGICA ARGENTINA
PROGRAMA NACIONAL DE INMUNIZACIONES
AÑO 2007**

PROVINCIA	CENTRO DE VACUNACIÓN	TOTAL DOSIS ENTREGADAS	TOTAL DOSIS* APLICADAS
Buenos Aires	3	700	438
Córdoba	6	7.000	6.097
Santa Fe	8	15.330	13.528
TOTAL	17	23.030	20.063

* Datos parciales informados por las áreas de salud provinciales al 24 - 06 - 07

VALOR PREDICTIVO DE LA TÉCNICA DE PCR EN EL DIAGNÓSTICO DE LA FIEBRE HEMORRÁGICA ARGENTINA

Calderón Gladys E., García Jorge B., Levis Silvana C. y Enria D.A.
Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas “Dr. Julio I. Maiztegui”

El diagnóstico serológico de la Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA) se realiza por conversión serológica utilizando usualmente la técnica de enzimo-inmuno ensayo (ELISA). Los anticuerpos específicos aparecen a partir del día 12 desde el inicio de los síntomas en los pacientes no tratados con plasma inmune. Los pacientes que mueren lo hacen en su casi totalidad sin haber desarrollado anticuerpos. En ellos, el diagnóstico se realiza por aislamiento viral y PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Debido a la incorporación de esta nueva metodología diagnóstica, surgió la necesidad de comparar esta técnica con las técnicas virológicas establecidas. Para ello, se procedió a comparar las técnicas de aislamiento viral en cultivo celular y en ratón con la técnica de PCR.

Materiales y Métodos:

Pacientes estudiados: Se seleccionaron 57 pacientes cuya internación había sido realizada en el INEVH durante el período 1999-2003. De ellos, 21 tuvieron resultado negativo para virus JUN y 36 pacientes fueron positivos con seroconversión por ELISA ó NT.

Muestras: se seleccionó la muestra de coágulo, suero y sangre entera de la fase aguda de la enfermedad, previa a la administración de plasma inmune.

Aislamiento en ratón: se inocularon intracerebralmente ratones recién nacidos con la muestra de sangre entera o con suspensión de coágulo. Se observaron durante 28 días, con un pasaje ciego al 7º día posterior a la inoculación. Una muestra fue considerada positiva cuando los animales presentaron síntomas de enfermedad o muerte.

Aislamiento en cultivo celular: se inocularon botellas conteniendo una monocapa de células Vero C 76 con la muestra de sangre, suspensión de coágulo o con suero. Se observaron diariamente durante 11 días a excepción de la muestra de suero que se observó durante 14 días. Las células fueron cosechadas y preparadas para inmunofluorescencia indirecta. Una muestra fue considerada positiva cuando se observó una fluorescencia típica de virus JUN en las células.

PCR: se utilizaron las muestras de coágulo y suero. Las muestras fueron lisadas y se sometieron a extracción del ácido ribonucleico (RNA) por el método de Trizol para la muestra de coágulo y el método Quiagen para el suero. Se procedió a realizar la transcripción reversa del RNA y a dos vueltas de amplificación del ácido desoxirribonucleico (DNA) con iniciadores específicos de virus JUN. Una muestra fue considerada positiva cuando se observaron bandas específicas en la electroforesis de los productos de amplificación.

Análisis

Se calculó la sensibilidad de los diferentes métodos utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Sensibilidad \%} = \frac{\text{Positivos verdaderos}}{\text{Positivos verdaderos} + \text{Falsos Negativos}} \times 100$$

Se utilizó a la seroconversión por ELISA ó NT como prueba de referencia (patrón de oro).

Se considera como **positivo verdadero** a aquella muestra cuyo resultado es positivo por el método en estudio y que presente una seroconversión al virus Junin por ELISA ó NT.

Se considera como **negativo verdadero** es aquella muestra cuyo resultado es negativo por el método en estudio y que presenta un resultado negativo por ELISA ó NT en la muestra aguda y la muestra de 60 ó más días.

Se considera como **falso negativo** es aquella muestra cuyo resultado es negativo por el método en estudio y positivo por ELISA ó NT.

Se calcularon además los valores predictivos positivos (probabilidad que un resultado positivo en la prueba corresponda a un paciente con FHA) y negativos (probabilidad que un resultado negativo corresponda a un paciente no enfermo de FHA) de la prueba de PCR de coágulo con Trizol.

Resultados

Las 21 muestras de coágulo provenientes de pacientes sin FHA, resultaron negativas por PCR y aislamiento viral.

Las 21 muestras de suero de estos pacientes analizadas por PCR resultaron negativas.

Los resultados de la sensibilidad obtenida para cada uno de los procedimientos utilizados se muestra en la tabla 1.

Tabla 1. Sensibilidad del método de aislamiento viral y de la técnica de PCR para virus Junin.

Muestra	Procedimiento	Positivos/Total (Sensibilidad %)
Sangre entera	Aislamiento Viral en Cultivo Celular	15/32 (47%)
	Aislamiento Viral en Ratón Recién Nacido	18/32 (56%)
Coágulo	Aislamiento Viral en Cultivo Celular	4/36 (11%)
	Aislamiento Viral en Ratón Recién Nacido	11/36 (31%)
	PCR: Método de Extracción RNA:TRIZOL	15/34 (44%)
	PCR: Método de Extracción RNA:Bio 101	14/33 (42%)
Suero	PCR: Método de Extracción RNA: Quiagen	6/32 (19%)

El valor predictivo positivo obtenido para la muestra de coágulo por la técnica de PCR con Trizol, fue de 100 % (15/15 x 100).

El valor predictivo negativo obtenido para la muestra de coágulo por la técnica de PCR con Trizol, fue de 52,5 % (21/40 x 100).

Conclusiones

Los resultados obtenidos muestran que el uso de técnicas moleculares y de aislamiento viral a partir de coágulo y suero no han podido aumentar la sensibilidad del método tradicional, (aislamiento viral a partir de sangre entera) para el diagnóstico de la FHA en la fase aguda de la enfermedad.

Actualmente se está trabajando en la optimización de la técnica de PCR.

Por otra parte, estos resultados ponen en evidencia las dificultades que se enfrentan:

- 1) Para el diagnóstico etiológico rápido de la enfermedad, lo que reafirma que la decisión terapéutica de aplicar plasma inmune debe realizarse sobre bases clínicas dado el valor predictivo negativo obtenido de 52,5 % .
- 2) Para el diagnóstico etiológico de la enfermedad en los pacientes muertos.

Al respecto, la disponibilidad de una buena historia clínica y epidemiológica es imprescindible para el análisis final.

Se considera importante contar con la muestra de sangre entera, extraída en condiciones estériles y su envío dentro de las 48 hs desde su obtención, fundamentalmente para el diagnóstico en pacientes fallecidos y eventualmente en pacientes de difícil obtención de una segunda muestra. Se recomienda tomar esta muestra en todos los pacientes que sufren un agravamiento de su condición clínica.

En el Anexo I se presenta el instructivo para la toma y envío de muestras para el diagnóstico de infección por virus Junin.

ANEXO I

DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN POR VIRUS JUNÍN (FHA): INSTRUCTIVO PARA LA TOMA Y ENVIO DE MUESTRAS

1. SUERO: Para detección de anticuerpos mediante técnicas de inmunoenzaimoensayo (ELISA) o neutralización.

A. PERIODO AGUDO DE LA ENFERMEDAD.

B. CONVALECENCIA DE LA ENFERMEDAD (60 días): Para determinación de seroconversión.

Volumen: 5 ml.

Condiciones de envío: Enviar las muestras dentro de las 48 hs de obtención, refrigeradas a 4°C.

En caso de que el envío deba ser demorado por más de 48 horas, conservarlas a -20°C.

2. COAGULO: Para determinación de PCR.

Conservar el coágulo que se obtenga una vez separado el suero, y enviar dentro de las 48 hs de obtención, refrigerado a 4°C.

En caso de que el envío deba ser demorado por más de 48 horas, conservarlas a -20°C y remitirlas posteriormente con un trozo de hielo seco o en su defecto refrigeradas a 4°C.

3. SANGRE TOTAL HEPARINIZADA: Para intento de aislamiento viral.

Volumen: 5-10 ml

Condiciones de envío: Enviar las muestras dentro de las 48 hs de obtención, refrigeradas a 4°C.

En caso de que el envío deba ser demorado por más de 48 horas, conservarlas a -70°C y remitirlas posteriormente con un trozo de hielo seco o en su defecto refrigeradas a 4°C. Como la temperatura de -70°C es difícil de obtener, se aconseja enviar la muestra dentro de las 48 hs.

Para 10 ml de sangre: utilizar una gota (aproximadamente 50 µl) de heparina sódica de 5.000 IU/ml.

4. TEJIDO CONGELADO: Para : a) Intento de aislamiento viral, b) PCR.

Condiciones de envío: Enviar las muestras dentro de las 48 hs de obtención, conservadas en hielo seco.

TODAS LAS MUESTRAS DEBEN OBTENERSE EN CONDICIONES ESTÉRILES

Condiciones de envío de muestras:

En recipientes plásticos, herméticamente cerrados, rotulados con los siguientes datos:

- Apellido y Nombres
- Tipo de muestra
- Fecha de obtención
- Acompañar las muestras con ficha epidemiológica correspondiente.

Remitir muestras para su estudio a:

Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas "Dr. Julio I. Maiztegui"

Monteagudo 2510 - (2700) Pergamino - Pcia. Buenos Aires

Tel. (02477) 433044 - 429712 al 14 Fax. (02477) 433045, E-mail: inevh@speedy.com.ar

COLABORARON EN LA REDACCIÓN DE ESTE INFORME

Prov. Buenos Aires

- Dra. D. Enria – INEVH
- Lic. M. R. Feuillade – INEVH
- Dra. A. M. Briggiler – INEVH
- Dra. A. M. Ambrosio – INEVH
- Dra. L. Riera – INEVH
- Dra. C. Saavedra – INEVH
- Dr. J. Garcia – INEVH
- Dra. G. Calderon – INEVH
- Dra. S. Levis – INEVH
- Lic. Z. Sanchez – INEVH
- Dra. E. Crivelli – Hosp. San Jose
- Dr. J. Bolpe – Dto. Zoonosis (Azul)

Prov. Córdoba

- Dra. M. Frias – Epidemiología (Córdoba)
- Sr. F. Forneris – Hosp. Pasteur (Villa María)

Prov. Santa Fe

- Dr. N. Mocarbel – Epidemiología (Rosario)
- Dr. J. Befani – Epidemiología
- Lic. M. E. Ternero – Epidemiología
- Dra. C. López – Epidemiología
- Dr. A. Oliva – Hosp. Provincial
- Dra. Y. Hartman – Hosp. Provincial

**Material editado e impreso en el
Instituto Nacional de Enfermedades
Virales Humanas
"Dr. Julio I. Maiztegui"**

Junio 2007
