

Evidencia serológica de infección por hantavirus (*Bunyaviridae: Hantavirus*) en roedores del Departamento de Sucre, Colombia

Serological evidence of hanta virus infection (*Bunyaviridae: Hantavirus*) in rodents from the Sucre Department in Colombia

Pedro Blanco, Stiven Arroyo, Homer Corrales, Julia Pérez,
Lercy Álvarez y Anaís Castellar

Grupo Investigaciones Biomédicas. Universidad de Sucre, Sincelejo, Colombia.pblancot@gmail.com

Recibido 01 Julio 2011/Enviado para Modificación 10 Julio 2012/Aceptado 31 Julio 2012

RESUMEN

Objetivo Determinar la frecuencia de anticuerpos específicos a hantavirus en roedores del municipio de San Marcos, departamento de Sucre.

Métodos Se capturaron 144 roedores con trampas Sherman® en áreas urbanas y rurales del municipio de San Marcos, desde diciembre de 2007 hasta julio de 2009. Los anticuerpos Ig G específicos contra el Virus Sin Nombre (VSN) fueron detectados en muestras de plasma mediante ELISA indirecto.

Resultados La seroprevalencia de anticuerpos contra hantavirus fue del 8,3 % (12/144 capturas). Los porcentajes de seropositividad específicos por especie variaron entre 6,8 % (3/44, *Zygodontomys brevicauda*) y 50 % (1/2, *Neacomys spinosus*). No se encontró diferencia estadística en la seroprevalencia con respecto al área de muestreo, sexo y etapa reproductiva ($p > 0,05$); sin embargo, hubo un mayor número de machos adultos seropositivos.

Conclusiones Se evidenció por primera vez seropositividad a hantavirus en roedores de la subfamilia Murinae en Colombia. La detección de anticuerpos contra el virus refuerza la hipótesis que sugiere la circulación de al menos un hantavirus en roedores del norte colombiano.

Palabras Clave: *Hantavirus*, seroprevalencia, roedores, Colombia (*fuentes: DeCS, BIREME*).

ABSTRACT

Objective The main goal of this research was to determine the frequency of hantavirus-specific antibodies in rodents from the municipality of San Marcos in the Sucre department of Colombia.

Methods 144 rodents were captured in San Marcos' urban and rural areas using Sherman traps between December 2007 and July 2009. "Virus sin Nombre" (SNV)-specific antibodies were detected in plasma samples by an indirect ELISA immunoassay.

Results An 8.3 % (12/144) seroprevalence rate was found. Specific seropositivity rates ranged from 6.8 % (3/44, *Zygodontomysbrevicauda*) to 50 % (1/2, *Neacomys spinosus*). No significant differences were found in seroprevalence according to capture area, gender and/or reproductive stage ($p > 0.05$); however, there were more seropositive adult males.

Conclusion This is the first evidence of hanta virus seropositivity in rodents from the Murinae subfamily in Colombia. The presence of SNV antibodies in rodents in San Marcos supported the hypothesis that at least one hantavirus is circulating in rodents from northern Colombia.

Key Words: *Hantavirus*, seroprevalence, rodentia, Colombia (source: MeSH, NLM).

Los hantavirus (género *Hantavirus*, familia Bunyaviridae) son patógenos zoonóticos que tienen a los roedores como reservorios. Son agentes etiológicos de dos síndromes delimitados geográficamente: las Fiebres Hemorrágicas con Síndrome Renal (FHSR) en el viejo mundo y el Síndrome Cardiopulmonar por Hantavirus (SCPH) en América (1). El SCPH fue confirmado por primera vez en 1993, en Estados Unidos, ocasionado por un hantavirus denominado Virus Sin Nombre (VSN) (2). Desde entonces, se han identificado más de 15 nuevos hantavirus causantes de SCPH en Centro y Sur América, asociados a roedores de la subfamilia Sigmodontinae (3). Esto ha despertado preocupación en las comunidades afectadas y el interés de las autoridades de salud pública para estudiar y prevenir esta infección (4).

Colombia, a pesar de limitar con países en los que se han identificado hantavirus en poblaciones de roedores, no ha notificado casos de esta zoonosis (5). Sin embargo, dos estudios reportan un 13,5 % de seropositividad en agricultores de los departamentos de Córdoba y Sucre (San Marcos) y 2,1 % en roedores sigmodontinos (*Oligoryzomys* spp, *Oryzomys* spp y *Zygodontomys* spp) de Córdoba (6,7). El departamento de Sucre presenta condiciones geoclimáticas similares a las de Córdoba y evidencia serológica de infección humana por hantavirus, pero se desconocen las especies de roedores que podrían albergar el virus y estar asociados a su transmisión. El objetivo de esta investigación fue determinar la prevalencia de anticuerpos contra hantavirus en roedores urbanos y rurales del municipio de San Marcos, departamento de Sucre.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio y tamaño de la muestra

Se realizó un estudio descriptivo de tipo transversal. Mediante el software PASS 2002 (8) se estimó capturar 126 individuos, a partir de una población indeterminada de roedores, con una seroprevalencia esperada de 3 %, un nivel de significancia de 99,9 % y un error de 5 %.

Área de estudio

Las capturas de roedores se llevaron a cabo entre diciembre de 2007 y julio de 2009 en zona urbana y rural del municipio de San Marcos (08°40'0" LN y 75°08'0" LO), el cual está ubicado al Sur del departamento de Sucre, Costa Norte Colombiana. La autorización fue otorgada por la agencia de protección ambiental CORPOMOJANA (Resolución N° 072. Fecha: marzo 2, 2007). El área de estudio se escogió debido a la evidencia serológica previa de infección por hantavirus en humanos (6).

Muestreo y procesamiento de roedores

Las capturas se realizaron con 100 trampas de encierro tipo Sherman (8x9x23 cm; Sherman Traps, Inc., Tallahassee, FL) durante 12 noches de trampeo, aplicando los procedimientos estandarizados para el trampeo de pequeños mamíferos para estudios virológicos (9). El éxito de captura fue evaluado por el cálculo de la densidad relativa, estimado como el número total de capturas de todas las especies dividido entre el número de trampas-noche expresado en porcentaje.

Los roedores capturados fueron anestesiados con Isoflurano® y procesados de acuerdo al protocolo de bioseguridad sugerido por el CDC (9). Los parámetros morfométricos, el cráneo y la piel fueron utilizados para la determinación taxonómica mediante claves genéricas para roedores del Nuevo Mundo (10,11).

Detección de anticuerpos específicos contra hantavirus en roedores

La detección de anticuerpos Ig G específicos contra el VSN en el plasma de roedores, se llevó a cabo mediante la técnica de ELISA indirecto descrita previamente (12). El antígeno recombinante de la nucleocápside del VSN y el suero control positivo fueron donados amablemente por el Doctor

Charles H. Calisher de la Universidad del Estado de Colorado.

Cada placa de microtitulación fue sensibilizada con antígeno durante toda la noche a 4 °C. Luego se aplicaron las muestras de plasma y los controles positivo y negativo, seguido por la proteína A/G conjugada a peroxidasa. El sustrato utilizado fue 2.2'-azino-di [3-etil-benzotiazolin sulfonate] (ABTS, Kierkegaard & Perry Laboratories, Inc., Gaithersburg, MD). Se asumió como punto de corte la densidad óptica 0,250; valor calculado por Schountz (12). Se consideraron positivas aquellas muestras que presentaron valores de densidad óptica por encima del punto de corte.

Análisis de la información

Para valorar diferencias entre área de muestreo, sexo y estado reproductivo en cuanto a seroprevalencia, se utilizó la prueba estadística Chi-cuadrado con el programa estadístico EPIDAT 3.0® (13).

RESULTADOS

Fueron capturados 144 roedores en 12 noches de trapeo. Así, de 1200 trampas-noche se obtuvo un éxito de captura del 12 %. Los 144 individuos identificados se distribuyeron en 4 familias, 4 subfamilias y 8 especies. *Mus musculus* (41,6 %) y *Zygodontomys brevicauda* (30,6 %) fueron las especies más representadas; contrario a *Neacomys spinosus* (1,4 %), *Proechimys cayennensis* (1,4 %) y *Heteromys anomalus* (0,7 %) (Tabla 1).

Tabla 1. Reactividad a hantavirus en suero de roedores capturados en el municipio de San Marcos, Sucre

Familia	Subfamilia	Especie	Individuos seropositivos/Individuos capturados (Seroprevalencia)
Muridae	Murinae	<i>Mus musculus</i>	4/60 (6,7)
		<i>Rattus rattus</i>	3/21 (14,3)
		<i>Zygodontomys brevicauda</i>	3/44 (6,8)
Cricetidae	Sigmodontinae	<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	1/4 (25,0)
		<i>Oryzomys azuerensis</i>	0/10 (0,0)
		<i>Neacomys spinosus</i>	1/2 (50,0)
Echimyidae	Eumysopinae	<i>Proechimys cayennensis</i>	0/2 (0,0)
Heteromyidae	Heteromyinae	<i>Heteromys anomalus</i>	0/1 (0,0)
Total			12/144 (8,3)

La prevalencia de anticuerpos específicos contra hantavirus en el total de roedores capturados fue del 8,3 % (12/144). El 58,3 % de los individuos seropositivos pertenecieron a la subfamilia Murinae (4 *Mus musculus* y 3 *Rattus rattus*) y el 41,7 % a la subfamilia Sigmodontinae (3 *Zygodontomys brevicauda*, 1 *Oligoryzomys fulvescens* y 1 *Neacomys spinosus*). Los porcentajes de seropositividad específicos por especie variaron entre el 6,8 % (3/44) para *Zygodontomys brevicauda* y el 50 % (1/2) para *Neacomys spinosus* (Tabla 1).

Se encontró igual número de individuos seropositivos en las áreas urbana (6/73) y rural (6/71). Las dos especies domésticas capturadas a nivel urbano presentaron anticuerpos contra hantavirus: *Mus musculus* (4/73) y *Rattus rattus* (2/73). En cuanto al área rural, la mayoría de roedores seropositivos fueron sigmodontinos: *Zygodontomys brevicauda* (3/71), *Oligoryzomys fulvescens* (1/71) y *Neacomys spinosus* (1/71), excepto *Rattus rattus* (1/71) (Tabla 2).

Tabla 2. Distribución de roedores seropositivos a hantavirus de acuerdo al área de muestreo, sexo y etapa reproductiva

Especie	Área de muestreo		Sexo		Etapa reproductiva	
	Urbana	Rural	Macho	Hembra	Juvenil	Adulto
<i>Mus musculus</i>	4/59	0/1	3/28	1/32	1/6	3/54
<i>Rattus rattus</i>	2/14	1/7	3/18	0/3	1/13	2/8
<i>Zygodontomys brevicauda</i>	0	3/44	1/29	2/15	1/15	2/29
<i>Oligoryzomys fulvescens</i>	0	1/4	1/3	0/1	0/1	1/3
<i>Oryzomys azuerensis</i>	0	0/10	0/5	0/5	0/7	0/3
<i>Neacomys spinosus</i>	0	1/2	1/2	0/0	0/0	1/2
<i>Proechimys cayennensis</i>	0	0/2	0/1	0/1	0/1	0/1
<i>Heteromys anomalus</i>	0	0/1	0/1	0/0	0/0	0/1
Total	6/73 (8,2)	6/71 (8,5)	9/87 (10,3)	3/57 (5,3)	3/43 (7,0)	9/101 (8,9)

Según el sexo, la seroprevalencia encontrada para roedores macho y hembra fue 10,3 % (9/87) y 5,3 % (3/57), respectivamente (Tabla 2). Aunque las cinco especies seropositivas presentaron individuos machos, únicamente dos hembras de *Mus musculus* y una de *Zygodontomys brevicauda* fueron seropositivas para estos virus.

De acuerdo a la etapa reproductiva, la seroprevalencia fue de 8,9 % (9/101) y 6,9 % (3/43) para los individuos adultos y juveniles, respectivamente (Tabla 2). En los dos grupos el porcentaje de hembras (adultos 22,2 %; juveniles 33,3 %) fue superado ampliamente por los machos (adultos 77,8 %; juveniles 66,7 %).

El análisis de la prueba Chi-cuadrado mostró que la seroprevalencia a hantavirus en roedores de San Marcos no presentó diferencia significativa según el área de muestreo, sexo y etapa reproductiva.

DISCUSIÓN

Estos resultados constituyen el primer aporte encaminado a estudiar la circulación de hantavirus en las comunidades de roedores del departamento de Sucre y el segundo en el Caribe colombiano. Por lo tanto, representan una herramienta valiosa en la necesidad de identificar los reservorios de estos agentes infecciosos y el análisis eco-epidemiológico de la aparición de posibles brotes en el país.

El hallazgo de roedores con anticuerpos reactivos a hantavirus en el presente estudio indica que estos agentes infecciosos están presentes en roedores del departamento de Sucre y refuerza la hipótesis que sugiere la circulación de al menos un hantavirus endémico en el norte colombiano, planteada por Alemán (7), a pesar que no se han reportado casos clínicos de la enfermedad en el país hasta la fecha (5).

La seroprevalencia a hantavirus (8,3 %) encontrada en roedores del municipio de San Marcos está dentro del rango de las tasas de seropositividad reportadas en Suramérica (3-12,5 %) (14,15). Así mismo, concuerda con los porcentajes informados en algunas zonas de los Estados Unidos como New York (8,6 %) (16) y Florida (8,2 %) (17). Sin embargo, difiere del único registro serológico previo de roedores en el país (2,1 %) (7).

La notable diferencia en la seroprevalencia general hallada en las poblaciones de roedores de Sucre y Córdoba podría atribuirse al fenómeno de dilución del virus. Este probablemente se presentó en Córdoba por las altas poblaciones de roedores juveniles capturadas durante el muestreo (7) o al fenómeno de concentración focal de roedores seropositivos que pudo presentarse en San Marcos; hipótesis basada en los múltiples roedores con evidencia de anticuerpos capturados en la misma línea de trampeo. La infección focal por hantavirus ha sido documentada por otros autores en Estados Unidos (17) y Argentina (18).

De todos los géneros de roedores positivos en Sucre, únicamente *Oligoryzomys* sp. Fue informado anteriormente como seropositivo en Colombia (7). Sin embargo, todas las especies con evidencia de infección han sido repor-

tadas como seropositivas o incriminadas como reservorios de hantavirus en diferentes países del mundo. *O. fulvescens* como reservorio del Virus Choclo en Panamá (19); *Z. brevicauda* en Venezuela (5); en Bolivia, *N. spinosus* es reservorio del Virus Río Mamoré (20); en Brasil se ha documentado presencia de anticuerpos contra el Virus Seoul en *R. rattus* (21). En 1988 fue aislado el Virus Leakey de *M. musculus* en Estados Unidos, con una tasa de infección de 16,7 %, ampliamente superior a la informada en el presente estudio (6,7 %) (22). Los resultados de esta investigación constituyen la primera evidencia serológica de infección por hantavirus en las especies de roedores murinos *R. rattus* y *M. musculus* en Colombia.

Las diferentes especies de roedores encontradas seropositivas a hantavirus en San Marcos sugieren dos hipótesis: hay más de un hantavirus circulando en la zona, cada uno en su posible reservorio de acuerdo al modelo de coevolución (23) ó existe un hantavirus capaz de infectar a diferentes especies, pasando desde su reservorio natural hasta las otras especies mediante el fenómeno de “esparcimiento” (24).

La transmisión de los hantavirus se considera de alto riesgo para los habitantes rurales por la mayor probabilidad de exposición a los roedores silvestres (4). No obstante, la seroprevalencia encontrada en este estudio no presentó una diferencia estadística con relación a las áreas de captura urbana (8,2 %) y rural (8,5 %). La presencia de roedores urbanos infectados sugiere que alguna de las especies de roedores murinos está actuando como posible reservorio de un hantavirus circulante en el área urbana de San Marcos. El porcentaje de individuos adultos (8,9 %) seropositivos fue mayor que el de los juveniles (6,9 %). Esta tasa de infección está de acuerdo con los porcentajes encontrados en *A. azarae* (25) y *O. longicaudatus* en Argentina (26); y en especies de *Peromyscus* (27). Así mismo, se observó que entre los roedores adultos hay una tendencia hacia un mayor porcentaje de machos seropositivos, resultado similar a otros hallazgos en roedores sigmodontinos (28,17). Se ha sugerido que esto podría explicarse por los encuentros agresivos originados por la mayor naturaleza competitiva de los machos adultos durante la época de apareamiento y la búsqueda de alimentos (29,30). Sin embargo, las pocas evidencias de mordeduras o lesiones en la piel de los animales seropositivos no permitieron evaluar esta hipótesis.

Se ha observado una correlación positiva entre el aumento en la prevalencia de anticuerpos contra hantavirus en roedores y la aparición de casos humanos (31). Estudios retrospectivos han demostrado que los hantavirus

han circulado en América con anterioridad a la detección de los casos clínicos. Así ocurrió en Chile con el hallazgo por serología de casos de infección por hantavirus antes de la primera epidemia de SCPH en 1995 (32,33). Por lo anterior, la identificación de especies potencialmente portadoras de hantavirus y el hallazgo de nuevas especies seropositivas, aún en ausencia de casos humanos notificados, señalan la existencia de riesgos potenciales para las poblaciones humanas en el departamento de Sucre y requieren la intensificación de medidas de vigilancia epidemiológica y prevención.

La seropositividad a hantavirus en humanos informada por Mattar (6), sumada a nuestros resultados, sugieren que la enfermedad se puede estar presentando en San Marcos, con manifestaciones leves y subclínicas compatibles con síndromes febriles de otras causas, debido a la circulación de un hantavirus menos virulento, como se ha propuesto en otros países de Suramérica (18). Sin embargo, la falta de vigilancia epidemiológica y búsqueda activa de estos patógenos en humanos impiden la confirmación de esta hipótesis ●

Agradecimientos: Al Dr. Charles Calisher por la donación del antígeno y el suero usado como control positivo. Al M. Sc Vladimir Rojas por su asesoría en la determinación taxonómica de roedores. Este trabajo fue financiado por COLCIENCIAS, la Universidad de Sucre, Universidad del Valle y la Gobernación de Sucre.

REFERENCIAS

1. Peters CJ, Simpson GL, Levy H. Spectrum of hantavirus infection: hemorrhagic fever with renal syndrome and hantavirus pulmonary syndrome. *Annu Rev Med.* 1999;50:531-545.
2. Nichol ST, Spiropoulou CF, Morzunov S, Rollin PE, Ksiazek TG, Feldmann H, et al. Genetic identification of a hantavirus associated with an outbreak of acute respiratory illness. *Science.* 1993;262:914-917.
3. Pini N. Hantavirus pulmonary syndrome in Latin America. *Current Opinion Infect Dis.* 2004;17:427-431.
4. Schmaljohn C, Hjelle B. Hantaviruses: a global disease problem. *Emerg Infect Dis.* 1997;3:95-104.
5. Puerta H, Cantillo C, Mills J, Hjelle B, Salazar-Bravo J, Mattar S. Hantavirus del nuevo mundo. Ecología y epidemiología de un virus emergente en Latinoamérica. *Medicina.* 2006;66:343-356.
6. Mattar S, Parra M. Serologic evidence of hantavirus infection in humans, Colombia. *Emerg Infect Dis.* 2004;10:2263-2264.
7. Alemán A, Iguarán H, Puerta H, Cantillo C, Mills JN, Ariz W, et al. Primera evidencia serológica de infección por hantavirus en roedores en Colombia. *Rev Salud Pública (Bogotá).* 2006;8:1-12.
8. Hintz J. 2002. PASS 2002. NCSS, LLC. Kaysville, Utha. [Internet]. Disponible en: <http://www.ncss.com/>. Consultado 15/08/2009;

9. Mills JN, Childs JE, Ksiazek TG, Peters CJ, Velleca W. Methods for trapping and sampling small mammals for virology testing. U.S. Department of Health & Human Services. Public Health Service. Centers for Disease Control and Prevention. Atlanta, Georgia 30333; 1995.
10. Nowak R. Walker's mammals of the world, Fifth Edition. Baltimore and London: The Johns Hopkins University Press; 1991.
11. Emmons L, Feer F. Neotropical rainforest mammals: A field guide. The University of Chicago. Chicago, Illinois, USA; 1997.
12. Schountz T, Calisher CH, Richens TR, Rich AA, Doty JB, Hughes MT, et al. Rapid field immunoassay for detecting antibody of Sin Nombre virus in deer mice. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:1604-1607.
13. Hervada X, Santiago MI, Vázquez E, Castillo C, Loyola E, Silva LC. Epidat 3.0 programa para análisis epidemiológico de datos tabulados. *Rev Esp Salud Pública.* 2004;78:277-280.
14. Chu YK, Owen RD, Gozalez LM, Jonsson CB. The complex ecology of hantavirus in Paraguay. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;69:263-268.
15. Padula P, Figueroa R, Navarrete M, Pizarro E, Cadiz R, Bellomo C, et al. Transmission study of Andes hantavirus infection in wild sigmodontine rodents. *J Virol.* 2004;78:11972-11979.
16. Wilson ML, Tesh RB, Fish D, Gerber MA, Magnarelli LA, Feder HM, Shapiro ED. Evidence of hantavirus infection in rodents and human beings from Connecticut and New York, USA. *Lancet.* 1995;345:738.
17. Glass GE, Livingstone W, Mills JN, Hlady WG, Fine JB, Biggler W, et al. Black Creek Canal virus infection in *Sigmodonhispidus* in southern Florida. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;5:699-703.
18. Pini N, Levis S, Calderón G, Ramirez J, Bravo D, Lozano E, et al. Hantavirus infection in humans and rodents, Northwestern Argentina. *Emerg Infect Dis.* 2003;9:1070-1076.
19. Vincent MJ, Quiroz E, Gracia F, Sanchez AJ, Ksiazek TG, Kitsutani PT, et al. Hantavirus pulmonary syndrome in Panama: identification of novel hantaviruses and their likely reservoirs. *Virology.* 2000;277:14-19.
20. Bi Z, Formenty P, Roth CE. Hantavirus Infection: a review and global update. *J Infect Dev Ctries.* 2008;2:3-23.
21. Lee HW, Baek LJ, Johnson KM. Isolation of Hantaan virus, the etiologic agent of Korean hemorrhagic fever, from wild urban rats. *J Infect Dis.* 1982;146:638-644.
22. Baek LJ, Yanagihara R, Gibbs CJ, Miyazaki M, Gajdusek DC. Leakey Virus: a New Hantavirus Isolated from *Mus musculus* in the United States. *J Gen Virol.* 1988;69:3129-3132.
23. Xiao SY, Leduc JW, Chu YK, Schmaljohn CS. Phylogenetic analyses of virus isolates in the genus Hantavirus, family Bunyaviridae. *Virology.* 1994;198: 205-217.
24. Klingström J, Heyman P, Escutenaire S, Sjölander KB, De Jaegere F, Henttonen H, et al. Rodent host specificity of European hantaviruses: evidence of Puumala virus interspecific spillover. *J Med Virol.* 2002;68:581-588.
25. Suárez OV, Cueto GR, Cavia R, Gómez-Villafañe IE, Bilenca DN, Edelstein A, et al. Prevalence of infection with hantavirus in rodent populations of Central Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003. 98;727-732.
26. Cantoni G, Padula P, Calderón G, Mills J, Herrero E, Sandoval P, et al. Seasonal variations in prevalence of antibody to hantaviruses in rodents from southern Argentina. *Trop Med Int Health.* 2001;6:811-816.
27. Abbott KD, Ksiazek TG, Mills JN. Long-term hantavirus persistence in rodent populations in Central Arizona. *Emerg Infect Dis.* 1999;5:102-112.
28. Mills JN, Ksiazek TG, Ellis BA, Rollin PE, Nichol ST, Yates TL, et al. Patterns of association with host and habitat: antibody reactive with Sin Nombre virus in small mammals in the major biotic communities of the Southwestern United States. *Am J Trop Med Hyg.* 1997;56:273-284.

29. Glass GE, Childs JE, Korch GW, LeDuc JW. Association of intraspecific wounding with hantaviral infection in wild rats (*Rattus norvegicus*). *Epidemiol Infect.* 1988;101:459-472.
30. Calisher CH, Sweeney W, Mills JN, Beaty BJ. Natural history of Sin Nombre virus in western Colorado. *Emerg Infect Dis.* 1999;5:126-134.
31. Mills JN, Childs JE. Ecologic studies of rodent reservoirs: their relevance for human health. *Emerg Infect Dis.* 1998;4:529-538.
31. Baro M, Vergara J, Navarrete M. Hantavirus in Chile: review and cases analysis since 1975. *Rev Med Chil.* 1999;127:1513-1523.
33. Navarrete M, Saldias F, Mancilla R, Zaror L, Ferres M. Evidencia clínico epidemiológica de la existencia de síndrome pulmonar por hantavirus en Valdivia-Chile desde 1993. *Rev Chil Infect.* 2000;17:230-240.