

Prueba de neutralización del virus de la coriomeningitis linfocítica para diferenciar infecciones con dos arenavirus en Argentina

A.M. AMBROSIO*, L. RIERA, M.C. SAAVEDRA, J.J. SOTTOSANTI

Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas Dr. Julio I. Maiztegui (INEVH), Monteagudo 2510, 2700 Pergamino, Pcia. de Buenos Aires, Argentina.

* Correspondencia. FAX: (02477) 33045. E-mail: anaambrosio@hotmail.com

RESUMEN

Desde los comienzos de la década del 70 se conoce que el virus Junín (JUNV) y el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), coexisten en la misma región de Argentina, produciendo infecciones clínicas y subclínicas en humanos. La detección de anticuerpos para LCMV se viene realizando sólo por inmunofluorescencia indirecta (IFI), prueba que resulta en cruces serológicos entre algunos arenavirus. Los anticuerpos IFI no persisten indefinidamente y resultan indetectables durante la fase clínica de fiebre hemorrágica argentina (FHA), por lo que en los casos de infecciones consecutivas por los virus JUNV y LCMV el diagnóstico etiológico por IFI resulta confuso. Para mejorar la resolución del diagnóstico etiológico en estos casos se requieren pruebas de neutralización (NT), que identifican la respuesta inmune tipo-específica generada por los arenavirus. En este trabajo se describe el desarrollo y estandarización de una NT por inhibición del 75% de ufp de la cepa autóctona Cba An 13065 de LCMV en células L. En sueros de individuos encuestados en el área endémica de ambos arenavirus (JUNV y LCMV), y en sueros pareados de pacientes con fiebre hemorrágica argentina, esta NT detectó anticuerpos para LCMV en muestras que habían resultado negativas por inmunofluorescencia, permitiendo distinguir infecciones secuenciales por LCMV y JUNV en pacientes que presentaban seroconversiones concomitantes para ambos agentes. El rango de títulos de anticuerpos NT encontrados para LCMV varió entre 5 y 640. Estos anticuerpos son de aparición posterior a los IFI y perdurarían de por vida. En consecuencia, resulta recomendable la utilización de la sencilla y específica prueba de NT descripta combinada con la IFI a fin de detectar las infecciones recientes y remotas por LCMV y, en los casos de infecciones consecutivas por JUNV y LCMV, estudiar si existen interacciones entre las respuestas serológicas a uno y otro agente.

Palabras claves: virus de la coriomeningitis linfocítica, virus Junín, arenavirus, diagnóstico, serología, infección humana

SUMMARY

Lymphocytic choriomeningitis virus neutralization test to disclose human infections with two arenaviruses in Argentina. The active coexistence of two pathogenic arenaviruses, Junín (JUNV) and lymphocytic choriomeningitis (LCMV), in the same region of Argentina, has been known since the early 70's, and records of clinical and subclinical human infections by one and/or the other agent have been continuously produced for the last 25 years. Anti-LCMV antibody is currently searched only by indirect immunofluorescence, a test that shows cross reactions among a number of arenaviruses yielding, in the cases of LCMV and JUNV consecutive infections, a concomitant seroconversion for both viruses, as an inconclusive diagnostic result. In contrast, neutralization (NT) tests reveal arenavirus antibodies directed to unique epitopes on these virus envelopes, thus allowing to disclose the sequence in the cases of consecutive infections. In this paper, the characteristics of neutralization (NT) test for LCMV in cell cultures are described, as well as its performance in the field diagnosis of LCMV human infections. The native LCMV strain Cba An 13065 was inoculated on L-929 cell (ATCC CCL 1), and procedures were followed to perform a constant virus-variable serum NT test. Final points of sera titrations were expressed as the maximal serum dilution that yielded 75% of pfu inhibition. This NT test was assayed on

paired serum samples of 36 patients with confirmed Argentine hemorrhagic fever (AHF) (a disease caused by JUNV), who had had a known previous contact with LCMV through IFI. The use of this one test led to confusing diagnosis of the disease due to concomitant seroconversion for JUNV and LCMV. By using NT test, it was shown that: some of them were possibly not infected by LCMV, and that 30/36 cases (83,3%) had a pre-existing level of LCMV antibody, with titers in the range of 5 to 640, remaining unchanged 60 days after the clinical AHF. This shows that NT antibodies to LCMV are not influenced by the outcome of the immune response to JUNV, thus confirming the efficiency of NT test as identifier among arenaviruses. To assess the performance of this NT test in individuals having only IFI antibodies to LCMV, 126 serum samples obtained through serological surveillance in a rural area of Argentina, were used. It was found that NT had improved coincidence with IFI as IFI titers increased. Interpretations were based on the pan-arenavirus antibody response obtained by using IFI as the only test. Results presented herein prove that the described NT test is a valuable tool for the detection of LCMV infections, particularly when a previous infection with LCMV has to be demonstrated during the acute phase of Argentine hemorrhagic fever.

Key words: lymphocytic choriomeningitis virus, Junin virus, arenavirus, diagnosis, serology, human infection

El virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), aislado en 1933, es el virus prototipo de la familia *Arenaviridae* y uno de los seis agentes de este grupo patógenos para el hombre. La mayoría de las infecciones humanas por LCMV transcurren de modo inaparente y, en los casos en que se manifiesta como enfermedad, es típicamente una indisposición febril con mialgias, leucopenia y trombocitopenia, con el agregado, en algunos casos de parotiditis, orquitis, artritis o pancreatitis (8, 10). Con cierta frecuencia se presenta una segunda onda de enfermedad febril que afecta al sistema nervioso central (meningitis aséptica de origen inmunopatológico) y raramente evoluciona hacia encefalitis severa (5). La infección prenatal se adquiere por vía trasplacentaria y existe evidencia de que puede ser causa de hidrocefalia y otras alteraciones congénitas (2, 7, 20).

Algunas presentaciones clínicas de LCMV se asemejan a la fiebre hemorrágica argentina (FHA), enfermedad producida por el virus Junín (JUNV), otro de los agentes patógenos para el hombre de la familia *Arenaviridae*. La activa coexistencia, conocida desde comienzos de la década del 70, de ambos arenavirus en la zona endémica de FHA (1, 13), sumada a las semejanzas clínicas y la detección de infecciones por LCMV solamente por inmunofluorescencia, son causas de diagnósticos confusos, situación que se complica con la reciente descripción de nuevos arenavirus en la región cuya patogenicidad para humanos es aún desconocida (3, 12). El diagnóstico etiológico certero de las enfermedades febriles compatibles con infecciones por arenavirus es imperativo por lo anterior y porque, actualmente, es mediante ade-

cuadas baterías de pruebas serológicas que se seleccionan los donantes de plasma de convalecientes para curar la FHA (14) y se vigila el estado inmunitario de la población expuesta a esta patología, para cuya prevención se está utilizando desde 1990 una vacuna efectiva.

El método serológico hasta hoy más inequívoco para discriminar el agente etiológico en las infecciones por arenavirus es la prueba de neutralización (NT) que, al detectar anticuerpos dirigidos contra polipéptidos únicos presentes en la envoltura externa de estos virus (6), combina sensibilidad y alta especificidad para evidenciar la inmunidad tipo-específica generada por los arenavirus. Los anticuerpos neutralizantes (AcNT) en la infección por LCMV son de aparición tardía, con títulos usualmente bajos, y persistirían por prolongados períodos de tiempo (8). Esto determina que el diagnóstico de infecciones recientes por este agente deba realizarse, como efectivamente se hace desde años atrás, mediante pruebas de inmunofluorescencia indirecta (IFI), método que resulta en reacciones cruzadas con JUNV en presencia de altos títulos de anticuerpos (17, 18). La IFI es, en consecuencia, de escasa utilidad para discriminar infecciones sucesivas por LCMV y JUNV o viceversa, como es el caso frecuente en el área endémica de FHA, resultando en confusas seroconversiones concomitantes para ambos agentes.

En este trabajo se presenta una técnica de NT para LCMV desarrollada en nuestro laboratorio, con el objeto de establecer un diagnóstico serológico específico de infecciones clínicas y subclínicas por este virus en humanos.

Se utilizó la línea celular L-929 (ATCC - CCL 7) entre los pasajes 566 y 585.

La cepa autóctona de LCMV denominada Cba An 13065 y aislada en la provincia de Córdoba por Sabattini y col (20) fue el antígeno utilizado en las pruebas de NT. Este consistió en una suspensión al 20% de cerebro de ratón albino lactante, inoculado con $2,5 \times 10^6$ ufp del virus. Como diluyente para las mezclas virus-suero o virus-medio se utilizó EMEM-NEAA (Gibco) con penicilina-estreptomomicina y, a los fines de estabilizar la reacción de neutralización, 10% de una mezcla de sueros humanos obtenidos de individuos sanos (diluyente A). Este mismo diluyente sin el componente suero humano normal se utilizó para obtener las diluciones iniciales del virus (diluyente B).

Se utilizaron muestras de suero de tres orígenes:

a) Voluntarios humanos incluidos en 1988 en las pruebas de eficacia protectora de la vacuna Candid 1 contra la FHA. Por esta razón, la población fue seleccionada en base a criterios que definen el riesgo de contraer FHA: varones de 15 a 65 años de edad que vivieran y/o trabajaran en áreas rurales de 41 comunas del sur de la provincia de Santa Fe (15). De cada voluntario se obtuvo una muestra de suero pre-inoculación. Un total de 7.227 muestras de suero fueron estudiadas mediante pruebas de IFI para detectar anticuerpos para LCMV, encontrándose 172 sueros positivos. En este trabajo se utilizaron 126 sueros positivos para LCMV procedentes de esta encuesta serológica.

b) Pacientes de FHA con evidencias de algún contacto con LCMV ($n = 36$) seleccionados al azar y estudiados para evaluar seroconversiones para LCMV. De cada paciente se usaron muestras pareadas de suero obtenidas en la admisión con diagnóstico presuntivo de FHA, y 60 a 90 días luego del comienzo de los síntomas de la enfermedad. El diagnóstico de FHA en estos individuos se realizó por NT, según la técnica de Webb y col (21).

c) Individuos sanos ($n = 11$) de los que se extrajeron muestras de 200 ml de suero que, luego de un tamizaje negativo para JUNV, LCMV (por IFI), HIV, hepatitis B y C, Chagas, sífilis y brucelosis se reunieron como *pool* para ser utilizado al 10% como suero humano normal.

Para la titulación de virus, células L-929, sembradas en policubetas de seis cavidades, fueron

inoculadas con diluciones logarítmicas de la suspensión de LCMV. Luego de la adsorción del virus durante 1 h a 37 °C en incubador gaseado con 4% de CO₂, se cubrieron las monocapas con una mezcla en partes iguales de agarosa Seakem al 1% en agua, y Medio BME (Sigma) con suero fetal bovino al 6% v/v, L-glutamina (293 µg/ml) y antibióticos (200 U de penicilina y 100 µg de estreptomomicina/ml de medio). Los cultivos infectados fueron incubados durante cuatro días. En el día 4 post-inoculación (pi) se agregó en cada cavidad 0,3 ml de agarosa al 1% en agua, conteniendo 1:30000 de rojo neutro (Gibco). Las ufp fueron contadas luego de un día extra de incubación a 37 °C como se ha indicado.

El método desarrollado para detectar AcNT fue el de virus constante-suero variable. En las pruebas, se diluyó el virus en diluyente B hasta una dilución anterior a aquélla que contuviera aproximadamente 2000 ufp/ml, ésta fue enfrentada a los sueros problemas y control positivo, diluidos factor 2 o 4. La última dilución del virus (que se mezcló con los sueros) así como las diluciones de sueros se realizaron empleando diluyente A. Las mezclas virus-suero y el tubo conteniendo la dilución original de virus, diluido 1:2 en el diluyente B fueron incubadas 1 h a 37 °C. Todas las mezclas virus-suero fueron inoculadas en monocapas de células L-929 y el procedimiento fue continuado como se ha descrito antes para la titulación del virus. Los resultados se expresaron como la más alta dilución de suero que inhibiera el 75% de las ufp contadas en la titulación simultánea del virus.

Las pruebas de IFI para LCMV se realizaron según la técnica de Peters y col (17) para virus Machupo.

La metodología descrita en el presente trabajo permitió la sistemática obtención de ufp por inoculación de la cepa 13065 de LCMV en células L-929. Las placas eran redondeadas, de bordes nítidos y diámetro variable (1-3 mm).

Los resultados obtenidos con las muestras pareadas de sueros procedentes de pacientes con FHA se presentan en el Cuadro 1. El rango de títulos encontrados en IFI (8 a 4096) presentó una dispersión notablemente mayor que el rango de 5 a 640 obtenido para los mismos sueros por NT. Los sueros de los 36 pacientes analizados produjeron diferente respuesta dependiendo del em-

Cuadro 1. Títulos de anticuerpos inmunofluorescentes y neutralizantes contra LCMV obtenidos en muestras pareadas de suero de pacientes con fiebre hemorrágica argentina

Paciente Nº	Agudo		Convaleciente	
	IFI	NT	IFI	NT
1	< 4	5	256	< 5
2	< 4	5	128	5
3	< 4	10	256	10
4	< 4	5	512	5
5	< 4	40	256	40
6	< 4	5	256	5
7	< 4	5	64	< 5
8	< 4	5	4096	5
9	< 4	5	8	< 5
10	< 4	10	2048	10
11	< 4	10	32	10
12	< 4	5	8	10
13	< 4	5	8	5
14	< 4	40	32	10
15	< 4	< 5	64	5
16	< 4	5	1024	5
17	< 4	40	1024	160
18	< 4	10	32	10
19	< 4	< 5	512	10
20	< 4	10	32	40
21	< 4	< 5	8	< 5
22	< 4	40	64	640
23	< 4	< 5	128	< 5
24	< 4	40	256	10
25	< 4	40	8	40
26	< 4	< 5	32	40
27	< 4	< 5	64	< 5
28	128	10	512	10
29	128	10	32	40
30	16	40	256	40
31	8	10	32	10
32	8	10	256	10
33	8	10	64	10
34	8	40	32	160
35	32	10	32	10
36	128	40	2048	40

pleo de IFI o NT al estudiarlos. Esta diferencia se fundó en la distinta capacidad de una y otra técnica en detectar anticuerpos anti-LCMV durante la etapa aguda de FHA: sólo 9/36 (25%) muestras tomadas en el período agudo resultaron positivas por IFI, mientras 30/36 (83%) lo fueron por NT. También se puede observar en el Cuadro 1 que a pacientes como los identificados con los nú-

meros 21, 23 y 27 no se les detectaron anticuerpos NT para LCMV.

El análisis de las seroconversiones evidenciadas por IFI y NT demostró discordancias. Si, aun a riesgo de incorporar algunos casos que sólo muestran el error de las pruebas, se considera seroconversión al incremento de una o más diluciones entre el título de anticuerpos en la muestra de la admisión y la de la convalecencia, se detectaron 34/36 (94,4%) seroconversiones para LCMV por IFI, mientras que sólo el 25% (9/36) seroconvirtió por NT.

La prueba de NT en estudio fue ensayada en su capacidad de distinguir infecciones por diferentes arenavirus como se muestra en el Cuadro 2. Los virus Junín y LCMV fueron enfrentados con sueros homólogos y heterólogos a fin de detectar reacciones cruzadas entre estos dos agentes. Los resultados obtenidos no evidenciaron reacciones cruzadas entre JUNV y LCMV en pruebas de NT.

La aplicación de esta técnica de NT en individuos sanos se presenta en el Cuadro 3. En este grupo de 126 individuos se había demostrado una experiencia previa con el LCMV por resultar positivos para este virus en la prueba de IFI (rango 8-256). Los mismos sueros estudiados por NT resultaron en títulos desde < 4 hasta 40. Un número de ellos resultó negativo, observándose que la concordancia de resultados positivos entre ambas pruebas mejora en la medida que los títulos de IFI se incrementan.

La técnica de NT para la detección de anticuerpos específicos para LCMV, cuyo desarrollo y aplicación se ha presentado en este trabajo,

Cuadro 2. Pruebas de NT homólogas y heterólogas para determinar reacciones cruzadas entre los virus JUNV y LCMV

Suero humano Nº	Virus	
	JUNV	LCMV
Anti JUNV		
1	640	< 5
2	160	< 5
3	1280	< 5
Anti LCMV		
4	< 5	20
5	< 5	20
6	< 5	40

Cuadro 3. Correspondencia de resultados obtenidos por inmunofluorescencia y neutralización en sueros humanos de encuestas

Rango título IFI	Positivos IFI	Positivos NT	% Concordancia
8-16	93	45	48,5
32-64	30	25	83,3
128-256	3	3	100
Total	126	73	57,9

permitirá mejorar el diagnóstico serológico de las enfermedades febriles compatibles con infección por arnavirus, en el área endémica de los virus Junín y LCMV. La utilización de la cepa autóctona Cba An 13065 de LCMV como antígeno involucra menores riesgos en términos de bioseguridad y mayor sencillez de ejecución. Es un ensayo reproducible, sensible y específico, cuya aplicación resulta decisiva para complementar la información que se obtiene mediante la prueba de IFI que, aunque se viene utilizando desde hace años en la búsqueda de anticuerpos para LCMV, tiene varias limitaciones. Agregado a la subjetividad de su lectura, la IFI muestra reacciones cruzadas entre todos los arnavirus que integran el Complejo Tacaribe, así como entre cada uno de éstos y el LCMV. Por otra parte, los títulos bajos resultan de dificultosa reproducibilidad. No obstante lo anterior, la IFI continúa siendo una prueba aceptable para el tamizaje de infecciones por LCMV y por otros arnavirus (16), aunque resulta muy importante se la complemente con ensayos más específicos como la NT, dado que ambas técnicas detectan anticuerpos que difieren tanto en su naturaleza como en su cinética de aparición y persistencia. En efecto, es conocida por diferentes trabajos previos la muy temprana aparición de los anticuerpos IFI en la infección por LCMV, así como su limitada persistencia. Los AcNT por su parte, aparecen tardíamente y persisten probablemente de por vida (9). Por lo anterior, resulta recomendable la utilización de esta NT conjuntamente con IFI, lo que permitirá incorporar en las encuestas las infecciones remotas por LCMV que no son diagnosticables por IFI.

En nuestra experiencia con el diagnóstico de LCMV, la IFI ha resultado una prueba adecuada, coincidiendo con lo reportado por otros autores (9,

11) cuando se trata de infecciones puras y relativamente recientes por este virus. En el área endémica de FHA la coexistencia de varios arnavirus modifica esta conclusión, ya que en los casos de infecciones consecutivas por los arnavirus LCMV y JUNV, la IFI sólo excepcionalmente detecta, durante la fase aguda de la FHA, los Ac anti-LCMV generados en una infección previa, lo que frecuentemente conduce a seroconversiones dobles (muestra de la admisión negativa y muestra de la convalecencia positiva para los dos virus). La aplicación de la NT aquí descrita ha permitido demostrar que en todos esos casos había ocurrido una infección previa por LCMV ya que siempre detectó Ac específicos para este agente en la muestra tomada en la admisión del paciente. Por otra parte, los títulos de anticuerpos para LCMV sólo excepcionalmente se incrementaron al aparecer los anticuerpos anti-JUNV, lo que implica una demostración adicional de que los Ac anti-LCMV detectados por esta prueba no estarían inespecíficamente influidos por los anticuerpos para JUNV.

La detección por IFI de las "dobles seroconversiones" para los virus LCMV y JUNV en estos pacientes es una demostración epidemiológica de algunos hallazgos de otros autores sobre la similitud de las secuencias proteicas de la nucleocápside interna de los arnavirus (4, 12). El sustrato utilizado en las pruebas de IFI son células infectadas, fijadas con acetona, y esto permite detectar predominantemente reacciones citoplásmicas, donde la mayor carga antigénica representa antígenos de nucleocápside. En la convalecencia de la FHA aparecen los Ac IFI para JUNV al mismo tiempo que reaparecen, a títulos similares a aquéllos en una respuesta anamnésica, los Ac anti-LCMV ausentes durante la fase aguda de la FHA. Resulta difícil explicar por qué los Ac anti-LCMV de un paciente agudo de FHA pueden detectarse sólo excepcionalmente por IFI. Es posible que se produzca un fenómeno de "enmascaramiento" de los Ac IFI durante el montaje de la respuesta a JUNV.

Finalmente, la NT aquí descrita es una herramienta serológica de gran utilidad para el estudio de una situación epidemiológica hasta hoy única en el mundo: las infecciones consecutivas por arnavirus en humanos y las eventuales interacciones entre las respuestas inmunes a las mismas.

AGRADECIMIENTOS

A las Sras. Cristina Albani y Patricia Pastore por su colaboración en la realización de pruebas serológicas, a las Sras. María Marzano, Sandra Ninni y Mabel Vigorito por la provisión de cultivos celulares y reactivos, a los Sres. Tito Gallardo y Marcelo Biglieri por la confección de este manuscrito y sus ilustraciones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ambrosio AM, Feuillade MR, Gamboa GS, Maiztegui JI (1994) Prevalence of lymphocytic choriomeningitis virus infection in a human population of Argentina. *Am J. Trop. Med. Hyg.* 50: 381-386.
2. Barton LL, Budd SC, Morfitt WS, Peters CJ, Ksiazek TG, Schindler RF, Yoshino MT (1993) Congenital lymphocytic choriomeningitis virus infection in twins. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 12: 942-946.
3. Bowen MD, Peters JC, Mills JN, Nichol ST (1996) Oliveros Virus: a novel arenavirus from Argentina. *Virology* 217: 362-366.
4. Buchmeier MJ, Lewicki HA, Tomori O, Oldstone MBA (1981) Monoclonal antibodies to lymphocytic choriomeningitis and Pichinde viruses: generation, characterization and cross-reactivity with other arenaviruses. *Virology* 113: 73-85.
5. Hinman AR, Fraser DW, Douglas GR, Bowen ST, Kraus AL, Winkler WG, Rhodes WW (1975) Outbreak of lymphocytic choriomeningitis virus infections in medical center personnel. *Am. J. Epidemiol.* 101: 103-110.
6. Howards CR (1986) Arenaviruses. En: AJ Zuckerman (Ed), *Perspectives in Medical Virology*. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford, p 23-42.
7. Komrower GM, Williams BL, Stones PB (1955) lymphocytic choriomeningitis in the newborn. Probable transplacental infection. *Lancet* 1: 697-698.
8. Lehmann-Grube F (1971) Lymphocytic choriomeningitis virus. En: S Gard, C Hallaue, KF Meyer (Ed), *Virology Monographs* N° 10, Springer-Verlag New York, p. 89-97.
9. Lehmann-Grube F, Kallay M, Ibscher B, Schwartz R (1979) Serologic diagnosis of human infections with lymphocytic choriomeningitis virus: Comparative evaluation of seven methods. *J. Med. Virol.* 4: 125-136.
10. Lewis JM, Utz JP (1961) Orchitis, parotitis and meningo-encephalitis due to lymphocytic choriomeningitis virus. *N. Eng. J. Med.* 265: 776-780.
11. Lewis VJ, Walter PD, Thacker WL, Winkler WE (1975) Comparison of three tests for the serological diagnosis of lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J. Clin. Microbiol.* 2: 193-197.
12. Lozano ME, Posik DM, Albariño CG, Schujman G, Ghiringhelli PD, Calderón G, Sabattini M, Romanowski V (1997) Characterization of arenaviruses using a family-specific primer set for RT-PCR amplification and RFLP analysis. Its potential use for detection of uncharacterized arenaviruses. *Virus Res.* 49: 79-89.
13. Maiztegui JI, Sabattini MS, Barrera Oro JG (1972) Actividad del virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCM) en el área endémica de la fiebre hemorrágica argentina (FHA). I. Estudios serológicos en roedores capturados en la ciudad de Pergamino. *Medicina (Buenos Aires)* 32: 131-137.
14. Maiztegui JI, Fernandez N, Damilano A (1979) Efficacy of immune plasma in treatment of Argentine haemorrhagic fever and association between treatment and late neurological syndrome. *Lancet* ii 8154: 1216-1217.
15. Maiztegui JI, McKee KT, Briggiler AM, Feuillade MR, Gibbs P, Saavedra MC *et al* (1991) Eficacia protectora de la cepa atenuada Candid 1 de virus Junín contra la Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA). *Medicina (Buenos Aires)* 51: 467.
16. Morales MA, Calderón G, García J, Ambrosio A, Polop J, Enria D, Sabattini MS (1998) Estudio serológico retrospectivo de presuntos pacientes de fiebre hemorrágica argentina (fha) frente a nuevos arenavirus. *Medicina (Buenos Aires)* 58: 587.
17. Peters CJ, Webb PA, Johnson KM (1973) Measurement of antibodies to Machupo virus by the indirect fluorescent technique. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 142: 526-531.
18. Rowe WP, Pugh WE, Webb PA, Peters CJ (1970) Serological relationships to the Tacaribe Complex of virus to lymphocytic choriomeningitis virus. *J. Virol.* 5: 289-292.
19. Sabattini MS, Barrera Oro JG, Maiztegui JI, Ferradas B (1974) Actividad del virus de la coriomeningitis linfocítica en el área endémica de la fiebre hemorrágica argentina (FHA). II. Aislamiento a partir de un *Mus musculus campestris* capturado en el sudeste de Córdoba. *Medicina (Buenos Aires)* 34: 313-320.
20. Sheinbergas MM (1975) Antibodies to lymphocytic choriomeningitis virus in children with congenital hydrocephalus. *Acta Virol.* 19: 165-166.
21. Webb P, Johnson K, Mackensie R (1969) The measurement of specific antibodies in Bolivian hemorrhagic fever by neutralization of virus plaques. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 130: 1013-1018.