

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL LITORAL
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas



Tesis para la obtención del Grado Académico de
Doctor en Ciencias Biológicas

**“Reemergencia del Dengue en Argentina:
Identificación y análisis de determinantes
viroológicos y epidemiológicos con implicancia en
la vigilancia laboratorial”**

Bqca. María Alejandra Morales

Director de Tesis: Dra. Delia A. Enría
Co-director de Tesis: Dr. Juan Claus

Lugar de realización: Laboratorio de Arbovirus
Dpto. de Diagnóstico Laboratorial y Referencial
Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas
"Dr. Julio I. Maiztegui" (INEVH)- ANLIS
Pergamino, Argentina

-2021-

Publicaciones

G Berberian, R Bologna, MG Pérez, A Mangano, M Costa, S Calligaris, **MA Morales**, C Rugilo, E Ruiz-Burga & C Thorne (2021) Causes of Microcephaly in the Zika Era in Argentina: A Retrospective Study. *Global pediatric health*, 8, 2333794X211040968. <https://doi.org/10.1177/2333794X211040968>

S Leiva, MP Dizanzo, C Fabbri, MB Valdano, V Luppo, S Levis, AL Cavatorta, **MA Morales**, D Gardiol (2021) Application of quantitative immunofluorescence assays to analyze the expression of cell contact proteins during Zika virus infections. *Virus research*, 198544. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2021.198544>

V Chediack, M Blanco, C Balasini, P Juárez, AL González, C Domínguez, D Godoy, S Vélez, P Saúl, E Serra, A De Cristofano, M Lloria, V Sánchez, S Areso, L Aguirre, S Esposto, MJ Eusebio, **MA Morales**, MC García, MC Llerena, M García, M Velásquez, A Palaoro, G Sheehan, C Pereyra, J Videla, M Lares, W Cornistein, A Cremona, J Farina, E Cunto. (2021) Dengue grave. *RATI.*; 38:e707.10102020

HM Pallarés, GC Costa Navarro, SM Villordo, F Merwaiss, L de Borba, MM Gonzalez Lopez Ledesma, A Ojeda DS, Henrion-Lacritick, MA Morales, C Fabri, MC Saleh, AV Gamarnik. (2020) Zika Virus Subgenomic flavivirus RNA Generation Requires Cooperativity between Duplicated RNA Structures That Are Essential for Productive Infection in Human Cells. *J Virol.* Sep; 94(18): e00343-20. Prepublished online 2020 Jun 24. Published online 2020 Aug 31. doi: 10.1128/JVI.00343-20

AL Tellechea, MP Bidondo, V Luppo, A Baricalla, R Liascovich, C Fabbri, **MA Morales**, B Groisman, M Silva, P Masi, A Israilev, M Rocha, M Quaglia, B Escalante, A Villareal, M Antinori, P Barbero. (2020) Embriopatía por virus Zika en Argentina: características clínicas y diagnóstico en recién nacidos. *Revista de la Facultad de Ciencias Médicas de Córdoba* 2020; 77(2): 15-25.

I Veliziotis, ARoman, D Martiny, G Schuldt, M Claus, N Dauby, S Van den Wijngaert, C Martin, R Nasreddine, C Perandonnes, R Mahieu, C Swaan, S Van Praet, D Konopnicki, **MA Morales**, D Malvy, E Stevens, P Dechamps, E Vlieghe, O Vandenberg, S Günther, M Gérard. (2020) Clinical Management of Argentine Hemorrhagic Fever using Ribavirin

and Favipiravir, Belgium, 2020. *Emerg. Infect. Dis.*, 26(7), 1562-1566. <https://doi.org/10.3201/eid2607.200275>.

MB Simari, SE Goñi, VC Luppó, CM Fabbri, MH Argüelles, ME Lozano, **MA Morales**, NG Iglesias (2019) Specific diagnostic method for St. Louis encephalitis virus using a non-structural protein as the antigen. *J Gen Virol.* 2019 Dec 17. doi: 10.1099/jgv.0.001359. PMID: 31846411.

MB Bonica, S Goenaga, ML Martín, M Feroci, V Luppó, E Muttis, C Fabbri, **MA Morales**, D Enria, MV Micieli, S Levis. (2019) Vector competence of *Aedes aegypti* for different strains of Zika virus in Argentina. *PLOS Neglected Tropical Diseases* <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007433>

T Varela, C Giovacchini, P Angeleri, **M Morales**, CFabbri, V Luppó. (2019) Sala de Situación: Elaboración de criterios epidemiológicos para estratificar por departamento el riesgo poblacional de Dengue grave. *Rev Argent Salud Pública* 10 (39): 38-41.

J Cerezo, AM Targovnik, ME Smith, D González Maglio, VC Luppó, **MA Morales**, MV Miranda, J Rodríguez Talou. (2019) Simple production of hydrophobin-fused domain III of dengue envelope protein and induction of neutralizing antibodies against the homotypic serotype of dengue virus. *Biotechnol Lett* <https://doi.org/10.1007/s10529-019-02767-2>. PMID: 31828570

AL Tellechea, V Luppó, **MA Morales**, B Groisman, A Baricalla, CM Fabbri, A Sinchi, A Alonso, C Gonzalez, B Ledesma, P Masi, M Silva, A Israilev, M Rocha, M Quaglia, MP Bidondo, R Liascovich, P Barbero. (2018) Surveillance of microcephaly and selected brain anomalies in Argentina: Relationship with Zika virus and other congenital infections. *Birth Defects Res.* Jul 17; 110 (12):1016-1026.

MA Morales, CM Fabbri, GE Zunino, MM Kowalewski, VC Luppó, DA Enría, SC Levis, GE Calderón. (2017) Detection of the mosquito-borne flaviviruses, West Nile, Dengue, Saint Louis Encephalitis, Ilheus, Bussuquara, and Yellow Fever in free-ranging black howlers (*Alouatta caraya*) of Northeastern Argentina. *PLoS Negl Trop Dis.* Feb 10; 11.

CV Filomatori, JM Carballeda, SM Villordo, S Aguirre, HM Pallarés, AM Maestre, I Sánchez-Vargas, CD Blair, CM Fabbri, **MA Morales**, A Fernandez-Sesma, AV Gamarnik. (2017) Dengue virus genomic variation associated with mosquito adaptation defines the pattern of viral non-coding RNAs and fitness in human cells. *PLoS Pathog.* Mar 6; 13(3).

MA Morales y CM Fabbri. (2016) Estado Actual del diagnóstico de Dengue, Chikungunya, Zika y otros arbovirus en Argentina. Revisión. *Actualizaciones en SIDA E INFECTOLOGÍA*, Buenos Aires, 24 (93): 111-117.

ME Smith , AM Targovnik , J Cerezo, **MA Morales**, MV Miranda, JR Talou. (2016) Integrated process for the purification and immobilization of the envelope protein domain III of dengue virus type 2 expressed in *Rachiplusia* nu larvae and its potential application in a diagnostic assay. *Protein Expr Purif.* Nov 23; 131:76-84.

CM Fabbri, JB García, **MA Morales**, DA Enría, S Levis, RS Lanciotti. (2014). Complete genome sequences and phylogenetic analysis of two West Nile virus strains isolated from equines in Argentina in 2006 could indicate an early introduction of the virus in the Southern Cone. *Vector Borne Zoonotic Dis.* Nov; 14 (11):794-800.

C Biscayart, ME Carrega, S Sagradini, A Gentile, D Stecher, T Orduna, S Bentancourt, SG Jiménez, LP Flynn, GP Arce, MA Uboldi, L Bugna, **MA Morales**, C Digilio, CMFabbri, D Enría, M Diosque, C Vizzotti. (2014) Yellow fever vaccine-associated adverse events following extensive immunization in Argentina. *Vaccine*, Mar 5; 32(11):1266-72.

A Seijo, V Lупpo, **Morales A**, E Gancedo, Y Romer, J Correa, G Poustis, S Giamperetti, CM Fabbri, D Enría. (2014) Tenosynovitis due to Chikungunya virus. *Medicina (B Aires)*; 74(6):476-8.

MA Morales y CM Fabbri. Diagnóstico de las infecciones por el virus de la Fiebre Amarilla (YFV): Experiencia durante la reemergencia de Fiebre Amarilla Selvática en Argentina, 2008-2009. (2014) Capítulo 16, pp157-166, Temas de Zoonosis VI, Asociación Argentina de Zoonosis. Editores Farjat, JB, Enria D, Martino P, Rosenzvit M y Seijo A. Buenos Aires, Argentina.

FA Ramírez, R Cuezco, EB Sarrouf, FA Hilal, G Alcaraz, R Núñez Mrad, **A Morales**, D Enria, CM Fabbri, S Caillou, H Echenique, I Flores, R Calli Flores. (2013) Seroprevalencia de anticuerpos contra Dengue en niños de uno a nueve años luego de una epidemia, Aguilares, Tucumán, 2009. *Rev Argent Salud Pública*, 4 (14): 18-22.

S Goenaga, CM Fabbri, J Climaco R Dueñas, CN Gardenal, GC Rossi, G Calderon, **MA Morales**, JB Garcia, DA Enria, and S Levis. (2012) Isolation of Yellow Fever Virus from Mosquitoes in Misiones Province, Argentina. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 12(11): 986-993.

“Con los pies en la tierra y la mirada en el cielo”

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional del Litoral, a la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, y al equipo de Posgrado por el acompañamiento brindado en este camino académico. Al INEVH “Dr. Julio I. Maiztegui” por el estímulo para la búsqueda de la excelencia y el progreso intelectual al servicio de la sociedad.

Agradezco con especial cariño a mi directora, Dra. Delia Enría, por darme un lugar a su lado, dedicar su tiempo al desarrollo de esta tesis, potenciar el trabajo interdisciplinario y propiciar mi formación y evolución profesional. Al Dr. Juan Claus, por su presencia y asesoramiento constante en cada tramo de esta tesis. A mi maestra, la querida Dra. Marta Sabbattini, por su aliento constante y su confianza, por las tardes revisando tablas y discutiendo resultados en esos años iniciales en los que me contagió su pasión por los arbovirus.

Agradezco a Cintia por todo el apoyo, la lectura crítica, los aportes y el estímulo para que termine esta etapa. A Victoria, por su colaboración en la revisión de este trabajo y tomar la posta de la serología, pero por sobre todo, a las dos, por ser tan buenas amigas, tan buenas compañeras y por aventurarse conmigo a transitar este camino hermoso, lleno de aprendizajes y de desafíos que nos llevó a consolidar un equipo incansable y motivado, donde ha sido una alegría cada día de trabajo y también, la fuerza necesaria para superar las dificultades. A todo el grupo inmenso de colegas de la Red Nacional de Laboratorios de Dengue y Arbovirus por generar juntos una experiencia increíble de colaboración y respeto durante todos estos años.

A mis insuperables compañeros del Laboratorio de Arbovirus (Pablo y Cintia, Noelia, Doraldina y Mariel) por su compromiso, su entusiasmo y colaboración constante para llevar adelante tanto trabajo en todos estos años. Al equipo del Departamento Investigación: Germán, Natalia, José, Stella, Marcelo, Lucas, Malala, Debora, Verónica, Julia, Carina, Patricia, Nelba, Cesar y Silvina, con quienes hemos compartido muchas tareas y desafíos. A Gladys y a Jorge, por brindarme su amistad e integrarme cuando recién llegué a INEVH y desde allí, siempre estar abiertos al trabajo conjunto, con dedicación y tan buena onda. A Carmen, por creer en mí y darme su amistad, además del más grande ejemplo de integridad, honestidad, y seriedad profesional. A Mara, por su apoyo incondicional y su calidez... a todos y a cada uno de mis compañeros de INEVH, porque cada logro es una construcción colectiva y cada uno aporta para que el conjunto funcione.

A mi familia por estar siempre y darme las herramientas para desenvolverme en espacios de crecimiento y realización personal, con el eje puesto en el trabajo y el compromiso. A mi padre, que me dejó volar aunque le doliera soltar. A mi madre, mi gran compañera, siempre alentandome con alegría y dedicación, para que pueda desarrollar mi profesión. A Valentín y Ramiro, mis motores en la vida, mis hijos queridos...gracias por dejarme estar en sus vidas, por bancar a una mamá que disfruta su trabajo y llenarme de sentido y de amor. Gracias a todos lo que confiaron y me permitieron ser.

Dedico este trabajo a mis hijos, mis padres y a mis amigos por acompañarme e impulsarme a construir una mejor persona en cada paso.

Índice

Abreviaturas y símbolos.....	14
Resumen.....	16
Abstract.....	23
INTRODUCCIÓN.....	30
1.Enfermedades emergentes y arbovirus.....	31
1.1.Ciclos de transmisión de arbovirus.....	33
1.2.Arbovirus detectados en Argentina.....	37
2.Familia <i>Flaviviridae</i>.....	38
2.1.Características de los viriones y géneros virales en la familia <i>Flaviviridae</i>	38
2.2.Organización y replicación del genoma en la familia <i>Flaviviridae</i>	39
2.3.Relaciones filogenéticas entre los virus de la familia viral.....	40
3.Género <i>Flavivirus</i>.....	41
3.1.Generalidades y ciclos de transmisión de los flavivirus.....	41
3.2.Antigenicidad en los flavivirus.....	42
3.3.Criterio de demarcación de especies virales y filogenia de los flavivirus.....	42
3.4.Flavivirus de importancia sanitaria en Argentina.....	45
4.Virus Dengue (DENV).....	46
4.1.Estructura y composición del DENV.....	46
4.2.Origen e historia natural del dengue.....	48
4.3.Cuadro clínico del dengue.....	50
4.4.Emergencia y dispersión del dengue en América.....	53
4.5.Situación del dengue en la Argentina.....	57
5.El diagnóstico laboratorial de las infecciones por DENV.....	60
5.1. Métodos directos.....	62
5.2. Métodos indirectos.....	64

OBJETIVO GENERAL	67
OBJETIVOS PARTICULARES	68
CAPÍTULO 1.	69
Evaluación de desempeño de la detección de antígenos NS1 DENV por un método de enzimo-inmunoensayo (ELISA) comercial como una alternativa al diagnóstico molecular en Argentina	
1.Introducción.....	69
2.1.Objetivo general	73
2.2.Objetivos particulares.....	73
3.Materiales y métodos.....	73
3.1. Reactivo comercial para detección del antígeno NS1 DENV.....	73
3.2.Evaluación inicial en el INEVH con panel retrospectivo de muestras de referencia.....	75
3.2.a. Panel de muestras de referencia.....	75
3.2.b.Metodologías de referencia para la confirmación del diagnóstico de dengue.....	76
3.3..Evaluación de sensibilidad y especificidad, índice de concordancia Kappa (K) y valores predictivos positivo y negativo para la detección del antígeno NS1.....	76
3.4.Evaluación prospectiva en terreno del desempeño del reactivo comercial Ag NS1 en diversas provincias argentinas.....	77
3.4.a. Evaluación 2010.....	77
3.4.b.Evaluación 2011.....	78
3.4.c. Evaluación 2013.....	78
3.5. Monitoreo de reactividad cruzada con otros flavivirus que circulan en Argentina.....	79
4.Resultados.....	80
4.1. Evaluación inicial con panel retrospectivo INEVH.....	80
4.2. Evaluación en terreno.....	80
4.2.a. Experiencia en 2010.....	81
4.2.b. Experiencia en 2011.....	82
4.2.c. Experiencia en 2013.....	83
4.3. Resultados de la evaluación de reactividad cruzada en infecciones por otros flavivirus.....	84
5.Análisis y conclusiones parciales.....	84

CAPÍTULO 2.	88
Utilidad de la detección de anticuerpos IgM DENV en la vigilancia laboratorial de la enfermedad en Argentina.	
1.Introducción.....	88
2.Objetivo general.....	91
2.2. Objetivos particulares.....	91
3. Materiales y métodos.....	91
3.a. Evaluación de la persistencia de los anticuerpos IgM en infectados por dengue.....	91
3.a.1. Población Accesible.....	91
3.a.2.Consideraciones éticas.....	92
3.a.3.Fuentes de información.....	92
3.a.3.1. Identificación de participantes.....	92
3.a.3.2.Entrevistas.....	94
3.a.3.3. Toma de muestra de sangre, informe de resultados y derivación de pacientes.....	94
3.a.4.Determinación de anticuerpos IgM por método comercial.....	95
3.a.5.Determinación de IgM por MAC-ELISA “ <i>in house</i> ”(protocolo original)	96
3.a.6.Panel de Muestras.....	99
3.a.7.Modificaciones evaluadas en el protocolo del MAC-ELISA DENV “ <i>in house</i> ”.....	100
3.a.8. Determinación de anticuerpos neutralizantes para DENV y otros flavivirus por PRNT ₉₀	100
3.b. Evaluación de la reactividad cruzada en IgM DENV y otros flavivirus con circulación en Argentina.....	102
3.b.1.MAC-ELISA modificado y estandarizado para procesamiento en paralelo de DENV y otros arbovirus.....	102
3.b.2.Reactividad cruzada en la detección de IgM DENV en casos confirmados de dengue frente a los antígenos de SLEV, WNV, YFV y ZIKV.....	104
3.b.3. Reactividad cruzada para DENV IgM en casos confirmados de infecciones por SLEV...105	
3.b.4. Reactividad cruzada para DENV IgM en casos confirmados de infecciones por ZIK...105	
3.c. Bioseguridad en el procesamiento por laboratorio.....	105
4. Resultados.....	105

4.1.Evaluación de persistencia de IgM DENV en Tucumán, 2009-2010.....	105
4.1.a. Población accesible con criterios de inclusión y determinación seriada de IgM por método comercial.....	105
4.1.b.Optimización de las condiciones del protocolo original del MAC-ELISA DENV.....	109
4.1.c.Valoración de la seropersistencia IgM DENV por el método de referencia.	112
4.2. Resultados de la evaluación de reactividad cruzada de DENV y otros flavivirus con circulación en Argentina por el método de MAC-ELISA desarrollado para arbovirus.....	113
4.2.a. Comparación de la reactividad frente a los antígenos de SLEV, WNV, YFV y ZIKV en pacientes confirmados DENV.....	113
4.2.b. Reactividad cruzada con DENV en casos confirmados de infección por SLEV.....	114
4.2.c. Reactividad cruzada con DENV en pacientes con infección confirmada por ZIKV.....	114
5. Análisis y conclusiones parciales	124

CAPÍTULO 3.....128

Genotipo y Filogenia de cepas de DENV circulantes en Argentina

1.Introducción.....	128
2.1.Objetivo general.....	134
2.2.Objetivos particulares.....	134
3. Materiales y métodos.....	135
3.1.Muestras.....	135
3.2. Extracción del RNA viral.....	136
3.3. Genotipificación rápida mediante análisis de fragmentos amplificados por reacción en cadena de la polimerasa en base a polimorfismo de sitios de restricción (RSS)-PCR.....	136
3.4.Amplificación por RT-PCR convencional.....	138
3.4.1. DENV-1.....	138
3.4.2. DENV-2.....	139
3.4.3. DENV-3.....	139
3.4.4. DENV-4.....	139
3.5. Análisis de los ácidos nucleicos.....	140
3.5.1. Visualización de los productos de amplificación.....	140
3.5.2. Purificación de los ácidos nucleicos.....	140

3.6. Secuenciación genómica.....	141
3.6.1.Purificación de los productos de secuenciación.....	142
3.6.2.Preparación de las muestras para correr.....	143
3.7.Análisis de electroferogramas y ensamblado de secuencias.....	143
3.8. Análisis filogenético.....	144
4. Resultados.....	144
4.1. DENV-1.....	144
4.2. DENV-2.....	157
4.3. DENV-3.....	159
4.3.a. Genotipificación de DENV-3 (2003-2004) por RSS-PCR.....	159
4.3.b. Secuenciación genómica y filogenia de DENV-3 detectado en 2003.....	160
4.3.c. Genotipo y filogenia del DENV-3 detectado en 2012.....	161
4.4. DENV-4.....	164
4.3. Análisis y conclusiones parciales.....	167

CAPÍTULO 4.175

Monitoreo de la actividad de DENV, serotipos 1, 2, 3 Y 4, en donantes de sangre de dos provincias de Argentina (Salta y Córdoba), período 2013-2014.

1.Introducción.....	175
2.Objetivo.....	180
3.Materiales y métodos.....	180
3.1. Ámbito geográfico del estudio	181
3.2. Muestras de donaciones sanguíneas,.....	182
3.3. Algoritmo de metodología diagnóstica.....	182
3.4. Extracción del RNA viral.....	182
3.5. Detección y caracterización de genoma de DENV.....	182
3.6. Cuantificación viral por Unidades Formadoras de Placas.....	183
3.7. Aislamiento viral.....	183
3.8. Detección de anticuerpos específicos.....	183
3.9. Estudio de la sensibilidad analítica de la detección molecular de DENV-1, 2, 3 y 4 en los laboratorios provinciales	183
3.10. Control de calidad en el estudio de muestras de donantes.....	184
4. Resultados.....	184
5. Análisis y conclusiones parciales.....	193

CAPITULO 5.....	198
Investigación de la actividad del DENV en primates no humanos del noreste de Argentina	
1.Introducción.....	198
2.1.Objetivo general.....	200
2.2.Objetivos particulares.....	200
3.Materiales y métodos.....	200
3.1. Sitio de estudio.....	200
3.2. Toma de muestra.....	201
3.3. Consideraciones éticas.....	201
3.4.Pruebas de neutralización por reducción de placas (PRNT)	202
3.4. Detección de genoma viral	202
4. Resultados.....	202
5. Análisis y conclusiones parciales.....	206
DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES.....	210
ANEXOS.....	222
BIBLIOGRAFÍA.....	267

Abreviaturas y Símbolos

A	Adenina
Aa	Aminoácidos
ABTS	sulfonato de azinodietilbenzotiazolina
BSQV	Virus Bussuquara
BPC	Buenas Prácticas Cínicas
BPL	Buenas Prácticas de Laboratorio
C	Cápside
CC	Control de células
CHIKV	Virus Chikungunya
DNA	Ácido desoxirribonucleico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
DENV	Virus dengue
Dpi	Días posteriores al inicio de los síntomas
DO	Densidad óptica
E	Envoltura
ECP	efecto citopatogénico
EITT	Enfermedades infecciosas transmitidas por transfusión
EEUU	Estados Unidos de América
EMEM	Medio esencial mínimo de Eagle Earle
ENV	Envoltura
FC	Fijación de complemento
FIS	Fecha de inicio de los síntomas
Hs	Horas
IF	Inmunofluorescencia
IgG	Inmunoglobulina G
IgM	Inmunoglobulina M
IHA	Inhibición de la hemoaglutinación
IHLV	Virus Ilheus
INDEC	Instituto Nacional de Estadística y Censos de la República Argentina
JE	Encefalitis Japonesa
JEV	Virus de la encefalitis japonesa
Kb	Kilobase
LCR	Líquido cefalorraquídeo
M	Membrana
Mab	Anticuerpos monoclonales
MAYV	Virus Mayaro
MC	Medio de crecimiento
MGB	Minor Groove Binder
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MM	Medio de mantenimiento
MOI	Multiplicidad de infección
NS	No structural

NS1	no estructural 1
Nt	Nucleótidos
Nm	Nanometro
OPS	Organización Panamericana de la Salud
OMS	Organización Mundial de la Salud
OROV	Virus Oropouche
PBS	Buffer Fosfato Salino
PLISA	Plataforma de Información en Salud para las Américas
P+S	penicilina y estreptomycin
pb	pares de bases
prM	precursor de M
PRNT	Neutralización en cultivos celulares por reducción número de placas
PHN	Primates no humanos
RdRp	RNA polimerasa dependiente de RNA
RNA	Ácido ribonucleico
ROCV	Virus Rocío
rpm	revoluciones por minute
RT-PCR	Retro transcripción seguido de reacción en cadena de la polimerasa
<i>n</i> RT-PCR	Retro transcripción seguido de reacción en cadena de la polimerasa modalidad anidada
qRT-PCR	Retro transcripción seguido de reacción en cadena de la polimerasa entiempo real
SFB	Suero fetal bovino
Se	Sensibilidad
Sp	Especificidad
SLEV	Virus de la encefalitis de San Luis
+ssRNA	Genoma RNA monocatenario de polaridad positive
UFP/ml	Unidades formadoras de placa por mililitro
WNV	Virus West Nile
SYV	Fiebre amarilla selvática
YFV	Virus de la fiebre amarilla
ZIKV	Virus Zika
3NC	3' no codificante
μl	Microlitro/s

RESUMEN

RESUMEN

El DENV y otros arbovirus están aumentando el impacto en salud pública a nivel mundial y también en Argentina, debido a su rápida propagación geográfica y aumento de la carga de morbilidad. El número de casos de dengue reportados en la región de las Américas hasta la semana 52 de 2019, con un total de 3.139.335 fue el mayor registrado en la historia de dengue en la región. En Argentina ocurrieron brotes de dengue todos los años desde 1997, excepto en 2001 y 2000. En el 2020 se registró la mayor epidemia de dengue hasta el momento en nuestro país, afectando 18 jurisdicciones incluyendo al NOA, NEA, la región central más densamente poblada y por primera vez, afectando a todas las provincias de Cuyo.

El conjunto de micro y macrofactores determinantes de la transmisión, en el contexto de los determinantes de salud de cada población, generan variaciones en la dinámica de los brotes de la enfermedad y en consecuencia, no pueden generalizarse los conocimientos a todos los lugares. En nuestro país se suma, además, el reconocimiento de la circulación de otros flavivirus: SLEV, WNV, YFV, ZIKV, ILHV, BSQV y esto hace que puedan generarse combinaciones particulares de infecciones virales e inmunidad, afectando el desempeño de las metodologías de diagnóstico e incluso en el corto plazo, aportando un escenario particular para la introducción de vacunas para dengue. El objetivo general de este trabajo de tesis ha sido generar conocimientos relativos a las herramientas diagnósticas para la detección de infecciones por DENV en la Argentina y caracterizar determinantes genéticos y de transmisión viral con impacto sobre la vigilancia laboratorial de las infecciones humanas y otros huéspedes potenciales, de modo de fortalecer las estrategias de control y prevención de la enfermedad desde la perspectiva del laboratorio virológico.

Los programas para la prevención y control del dengue hacen hincapié en la necesidad de un enfoque interprogramático, integrado e intersectorial que permita evaluar y dar continuidad a las acciones con recursos nacionales para reducir la morbilidad, mortalidad y la carga social y económica ocasionada a la salud pública por esta patología. Tal integración debe poder determinar y minimizar los factores de riesgos ambientales y entomológicos, optimizar el uso de los recursos, direccionar acciones y modificar la conducta de las personas y de la comunidad de manera que disminuyan los factores de riesgo de transmisión con medidas coordinadas para la prevención y el control tanto dentro como fuera del sector salud. En este contexto, el laboratorio tiene por objeto detectar tempranamente el aumento de la transmisión, caracterizar los virus circulantes, monitorear la introducción de un nuevo serotipo o genotipo en un lugar determinado, realizar la confirmación de casos graves/atípicos de dengue y el

seguimiento y apoyo a la caracterización de una epidemia. Para la vigilancia integrada no se requiere la confirmación por laboratorio de todos los casos compatibles clínicamente. Sin embargo, es necesario que se estudie un porcentaje de ellos para evaluar la situación epidemiológica en un momento y lugar determinados, con la mayor precisión y oportunidad posible y contribuir a una correcta toma de decisiones. Dado que no existe una única metodología aplicable al diagnóstico y que cada una posee alcances y limitaciones, uno de los objetivos particulares de esta tesis, ha sido la evaluación en nuestro medio, de las principales herramientas propuestas para el diagnóstico de dengue en distintas fases de la enfermedad. Al detectar un caso con clínica compatible es posible que exista diversidad en los días de evolución y este punto es importante porque no existe una metodología que pueda dar respuesta al diagnóstico etiológico en todas las fases de la enfermedad. Para ello, procedimos a evaluar el desempeño de la detección del antígeno NS1 por un método comercial de ELISA como una alternativa a la detección genómica para el estudio de muestras de hasta 6 días de evolución desde el inicio de los síntomas y por otro lado, evaluar la aplicación de la detección de anticuerpos IgM DENV por ELISA como una herramienta de tamizado para la detección de circulación viral activa cuando se cuenta con muestras de pacientes que se presentan un poco más tardíamente a la consulta. Estas dos determinaciones fueron seleccionadas, además, porque podrían resultar aptas para su implementación en laboratorios de mediana complejidad y permitirían aumentar el acceso al diagnóstico en el nivel local.

En relación a la detección del antígeno NS1, inicialmente la evaluación consistió en un primer estudio con un panel de 105 muestras retrospectivas anonimizadas disponibles en nuestro laboratorio, seleccionadas para integrar un panel correctamente caracterizado. Para evaluar la sensibilidad (Se) se incluyeron sueros positivos correspondientes a infecciones por los distintos serotipos de dengue detectadas en Argentina y sueros negativos para evaluar la especificidad (Sp), incluyendo entre otras, muestras de patologías que constituyen diagnóstico diferencial dentro del síndrome febril en el cual se realiza la vigilancia de dengue en nuestro país. La técnica de referencia fue la *n*RT-PCR DENV 1, 2, 3 y 4. Los valores obtenidos mostraron una Se del 94.2 (IC 95% 98.8-84.0) y una Sp del 98.0 (IC 95% 100 - 89.9) con buen desempeño en la detección de los distintos serotipos. Posteriormente, realizamos una evaluación prospectiva en terreno en el período 2010- 2013 luego que se introduce la detección de antígeno NS1 en el algoritmo nacional de diagnóstico de dengue. Los resultados permitieron determinar un nivel de concordancia excelente (índice K entre 0,82 y 0,90) en un total de 2310 muestras procesadas en paralelo para antígeno NS1 y *n*RT- PCR DENV-1, 2, 3, 4. Es interesante destacar que en este período en la Argentina hubo circulación autóctona de DENV-1 (2010), DENV-1 y DENV-2 (2011) y DENV-1, 2 y 4 (2013). La evaluación realizada en terreno

incluyó diferentes provincias argentinas con dengue y a medida en que aumentó la proporción de los serotipos DENV-2 y DENV-4 se pudo evidenciar menor sensibilidad del antígeno NS1 al comparar con infectados por DENV-1, pero dentro de un rango de aceptabilidad. La Se para detectar infecciones por DENV-1 fue del 100% en 2010, 98 % en 2011 y 97.5 en 2013; para DENV-2 fue 89% en 2011 y 83.3% en 2013; para DENV-4 fue del 88,5 % en 2013. La sensibilidad para DENV-3 fue del 91.3% (21/23.100) en la evaluación del 2009 con el panel INEVH, no pudiendo evaluarse en terreno ya este serotipo no tuvo circulación autóctona en el período 2010-2013. La ocurrencia de reacciones cruzadas de la detección del antígeno NS1 en pacientes infectados por otros flavivirus circulantes en el país fue también uno de los aspectos que evaluamos. Se procesaron 58 muestras agudas de infectados por SLEV, YFV (silvestre y vacunados) y ZIKV con resultados negativos, reforzando los excelentes valores de ya obtenidos Sp. Estas evidencias permiten plantear la posibilidad de considerar un resultado positivo de NS1 por ELISA como un criterio de confirmación de la infección por dengue.

Diferentes han sido los datos de detección de respuesta inmune en muestras humanas y animales que surgen de este trabajo de tesis y alertan sobre las limitaciones y la rigurosidad que debe tenerse al interpretar resultados de pruebas de detección de anticuerpos IgM e IgG en infecciones por DENV en muestras humanas y de animales para confirmar infecciones por este agente, particularmente en nuestro país. En este trabajo, hemos evidenciado que los anticuerpos IgM DENV medidos por un reactivo comercial de ELISA tuvieron una seropersistencia media de 228 días (IC95 203-253) en mayores de 15 años luego del seguimiento sistemático realizado mediante 11 muestreos periódicos realizados en 72 casos de dengue confirmados a propósito de un brote por DENV-1 en Tucumán en 2009. Demostramos seropersistencia superior a 18 meses en un 8.3% de los casos estudiados y una tendencia al descenso de los valores de reactividad al aplicar el reactivo comercial y pudo ser corroborada pero en menor extensión por la metodología “*in house*” de referencia para la detección de IgM (1,5 % de positividad por MAC-ELISA vs 12,0 % por UM-ELISA a los 15 meses aproximadamente del inicio de los síntomas). En consecuencia, el hallazgo de una IgM DENV (+) es un marcador de infección reciente y la posibilidad de seropersistencia determina que puede no corresponder a la detección de una infección aguda. Esta tesis, hasta nuestro conocimiento, es el primer trabajo en el orden nacional, que documenta la persistencia de IgM en infectados por dengue y suma evidencia a este aspecto que paulatinamente ha sido abordado por otros investigadores, tanto para infecciones por DENV como para otros flavivirus.

La metodología de MAC-ELISA utilizada en este trabajo fue optimizada en el tiempo de desarrollo de este trabajo de tesis de acuerdo a necesidades que fueron surgiendo en conexión a la detección sucesiva de flavivirus en el país. El protocolo que fuera estandarizado por Martin y cols, 2000 para optimizar el procesamiento en paralelo de una muestra frente a diferentes

antígenos de flavivirus (o incluso de otras familias virales incluidas en la vigilancia de arbovirosis) es el que hemos utilizado para ampliar el conocimiento sobre cruces serológicos en los infectados por dengue en Argentina. En ese sentido, hemos procesado 78 muestras con diagnóstico confirmados por métodos moleculares y/ o por PRNT₉₀ obtenidas a partir de casos confirmados de infecciones por DENV, Flavivirus, SLEV y ZIKV. En el trabajo realizado surgen datos que indican que esta forma de procesamiento puede servir para orientar la identificación del agente infectante logrando la diferenciación de DENV al procesar la muestra en paralelo frente a los antígenos de SLEV, WN, YFV y ZIKV y comparar los correspondientes valores P/N. En los casos de dengue evaluados, la relación de los valores P/N se presenta más elevado en el 100% de las muestras pero mostrando niveles de reactividad también para los otros antígenos (mayor frente al antígeno de SLEV, seguido de YFV, WNV y en menor medida ZIKV). Es relevante notar el alto grado de reactividad de las muestras frente a los diferentes flavivirus evaluados, con valores P/N que superan el valor de corte y que si hubieran sido procesados individualmente, llevarían a interpretaciones erróneas. Los resultados obtenidos además han mostrado la potencialidad de una mayor especificidad de los anticuerpos IgM por MAC-ELISA vs anticuerpos neutralizantes determinados por PRNT₉₀ y estas determinaciones podrían ser de utilidad en el diagnóstico de infecciones secuenciales o secundarias donde la PRNT₉₀ se halla limitada para lograr la identificación del agente.

Otro de los objetivos particulares planteados en esta tesis, ha sido el estudio de la prevalencia de infección para DENV y otros flavivirus en aulladores negros de vida libre en Chaco y Corrientes con el objetivo de investigar la existencia de actividad viral en este ecosistema. La región del NEA posee capacidad demostrada de sostener ciclos selváticos para la fiebre amarilla y plantea la potencialidad de convertirse en nicho ecológico para circulación enzoótica de los DENV en la región. Los primates no humanos pueden actuar como huéspedes importantes en el ciclo natural de los flavivirus y los estudios serológicos pueden conducir a una mejor comprensión de la dinámica de circulación del virus y la susceptibilidad del huésped. Entre julio y agosto de 2010, se realizaron campañas de muestreo en poblaciones de *Alouatta caraya*. Utilizamos pruebas de PRNT₉₀ para analizar 108 muestras de suero en busca de anticuerpos contra DENV (serotipos 1 y 3), WNV, SLEV, YFV, ILHV y BSQV. La detección del genoma de flavivirus se realizó utilizando una RT-PCR genérica en una selección de 51 animales, resultando todos negativos. De los 108 aulladores negros estudiados, el 64.8% (70/108) tenían evidencia de una infección pasada por un flavivirus evidenciada por anticuerpos neutralizantes. Diferenciamos patrones de anticuerpos con reactividad monotípica (13/70, 19%) y heterotípica (27/70, 39%). El 42% restante de los animales con anticuerpos positivos los clasificamos como indeterminado para la identificación del virus. Identificamos anticuerpos neutralizantes específicos contra DENV-1 y DENV-3, también para WNV, SLEV, ILHV y

BSQV y sorprendentemente, la mayor prevalencia de anticuerpos detectada fue contra el WNV con 9 (8,33%) animales con respuesta monotípica para este virus. Se han obtenido también reacciones monotípicas para DENV-3 (0,93%) y DENV-1 (0,93%) en zonas de interfase entre el ambiente silvestre- rural, con títulos bajos pero específicos, ya que las muestras de suero se inactivaron previamente por calor. Es interesante analizar que, además de los animales monotípicos, se encontró positividad para DENV-1 y DENV-3 en los demás animales. Específicamente, detectamos un 48,1% (13/27) de animales con títulos de anticuerpos neutralizantes para DENV-1/ DENV-3 en el grupo que tenían mayor título de anticuerpos para otro flavivirus y en los animales “indeterminados”, el 47% fueron positivos a DENV-1 y el 53% a DENV-3. Estos resultados podrían originarse por reacción cruzada, podrían representar un ingreso viral por contacto con el ambiente humano, o bien, como otros estudios lo plantean, podrían indicar la ocurrencia de DENV silvestre en la región. El establecimiento de un ciclo selvático para DENV dificultaría el control de la patología en América Latina, por lo cual es relevante que este tipo de estudios tengan continuidad en el país y el resto de la región.

El aumento de la transmisión global y la expansión de los cuatro serotipos de DENV se han asociado con incrementos en el número de infecciones anuales, la frecuencia de epidemias y la enfermedad clínica grave. Las manifestaciones clínicas del dengue y su gravedad dependen de varios factores, como la genética del virus y del huésped, así como exposición previa a infecciones heterotípicas por DENV. Cada serotipo de DENV consta de varios genotipos, que representan su gran diversidad genética y la epidemiología molecular puede aplicarse como herramienta para comprender su evolución, dinámica de transmisión o incluso diferencias en respuesta a antivirales o vacunas. En este trabajo de tesis se ha contribuido al conocimiento de las características genotípicas y filogenia viral de cepas de dengue serotipo 1, 2, 3 y 4 asociadas a la ocurrencia de brotes epidémicos en el país, considerando que la identificación de tendencias epidemiológicas moleculares puede contribuir a comprender las razones del resurgimiento del dengue en nuestro país, y a su vez, contribuir al control y manejo de la enfermedad. A tal fin, realizamos la caracterización del genotipo viral por un método de polimorfismos de fragmentos de restricción y/o secuenciación nucleotídica de un fragmento informativo del genoma viral en 150 muestras positivas (87 DENV-1, 2 DENV-2, 45 DENV-3 y 16 DENV-4) correspondientes a casos notificados en Argentina entre 2002 y 2021. Los resultados hallados permitieron evidenciar la circulación del genotipo V para DENV-1, el genotipo asiático americano para el DENV-2, el genotipo III para DENV-3 y el genotipo II para DENV-4, con una fuerte asociación con las variantes de circulación en los países limítrofes, y Latinoamérica. Para el caso del DENV-1, se ha evidenciado la diseminación de linajes dentro del genotipo V, extinción y reemplazo por nuevas variantes en el período 2002-2018 siguiendo la tendencia regional.

En los últimos años de expansión del DENV en la Argentina, ha llamado la atención la ocurrencia de brotes limitados en el tiempo, caracterizados por corte de transmisión en los meses del año de bajas temperaturas en contraste con los países limítrofes al norte que han pasado paulatinamente a un patrón de circulación viral endémico. El interrogante estaba dado sobre la veracidad de los cortes de transmisión o la ocurrencia de niveles bajos de actividad viral que el sistema de vigilancia no llega a detectar. Por otro lado, un aspecto no muy evaluado del dengue es la ocurrencia de infecciones asintomáticas. Durante el período virémico, presente tanto en infecciones sintomáticas (hasta 2 días antes del inicio de la fiebre) como asintomáticas, el DENV puede convertirse en una infección transmitida por derivados sanguíneos. Estas particularidades hacen que el DENV, así como otros flavivirus, puedan presentar un nivel de circulación silenciosa en población sana en áreas de riesgo epidemiológico que puede afectar la seguridad transfusional y/o contribuir a los mecanismos de transmisión y diseminación de estos agentes. A tal fin, en esta tesis, se ha realizado búsqueda activa de RNA de DENV en bancos de sangre de dos provincias de Argentina, Salta y Córdoba, en el período comprendido entre septiembre de 2013 y mayo de 2014. En total se investigó la presencia de genoma viral en 3357 donaciones recolectadas durante 9 meses, resultando negativa la detección en Córdoba. En Salta, durante los primeros 5 meses del 2014, se confirmó la ocurrencia de un nuevo brote de dengue en la región del noreste, en esta ocasión con tasas de infección relativamente más bajas a lo detectado en años anteriores: Salvador Mazza, 26 pacientes cada 10.000 habitantes, Aguaray 12, Orán 31 y Aguas Blancas 22. No obstante la baja incidencia de infección por DENV, la investigación en banco de sangre permitió detectar genoma de DENV-4 en 1 de 1775 (0,056%) muestras de donantes sanos estudiados en el período del estudio. Este porcentaje de positividad aumenta a 0,11% (1/926) si sólo consideramos el número de donantes estudiados en el transcurso del período con circulación autóctona reconocida en el inicio del 2014 (SE 1-19). Se ha detectado una incidencia de genoma de DENV por 10.000 donantes que se encuentra entre 5,6 (considerando 1 en 1775) y 10,8 (considerando 1 en 926). La cepa de DENV detectada en el donante de sangre en nuestro estudio correspondió al serotipo 4 en concordancia con el identificado por el sistema de vigilancia en los casos con sintomatología clínica. Esta cepa de DENV-4 en la que hemos podido caracterizar que corresponde al genotipo II, integra un clado conjuntamente con las cepas detectadas en Argentina en 2010, 2013 y otras de reciente circulación en Brasil. No se detectaron donantes positivos para DENV en momentos interepidémicos en ninguna de las dos provincias. Estos resultados plantean la necesidad de evaluar la infección asintomática del DENV en momentos epidémicos en el país para mitigar riesgo y garantizar la seguridad transfusional, particularmente con la tendencia creciente en la incidencia de la enfermedad en las provincias de norte y centro. Los pacientes sintomáticos de dengue determinan la carga de morbilidad y mortalidad de la enfermedad, pero dado que la

mayoría de las infecciones resultarán en infecciones inaparentes, estas constituyen un reservorio viral no demasiado considerado y evaluado, que además como se ha mostrado, constituye un riesgo para la seguridad transfusional.

La tendencia al aumento de la incidencia, severidad y letalidad por dengue en la región y el correlato de aumento de la intensidad y dispersión de los casos en la Argentina, presentan un panorama complejo hacia el futuro y la necesidad de monitorear las diferentes vías de transmisión particularmente en un escenario epidemiológico donde circulan otros flavivirus. Los resultados obtenidos en esta tesis han profundizado el conocimiento de las características virales e inmunitarias de las poblaciones afectadas por DENV en el país y aportan al fortalecimiento de la vigilancia laboratorial, pilar indispensable para el establecimiento de medidas adecuadas para la prevención y el control de futuras epidemias de dengue en Argentina.

ABSTRACT

DENV and other arboviruses are increasing the impact on public health in Argentina and worldwide, due to their rapid geographic spread and increased burden of the disease. The number of dengue cases reported in the Americas region up to week 52 of 2019, a total of 3, 139,335 was the highest recorded in the history of dengue in the región. Dengue outbreaks have occurred in Argentina every year since 1997, except in 2001 and 2000. In 2020, the largest dengue epidemic was recorded in our country to date, affecting 18 jurisdictions including NOA, NEA, the most densely populated central region and for the first time, affecting all the provinces of Cuyo.

The set of micro and macro determinants of transmission, in the context of the health determinants of each population, generate variations in the dynamics of disease outbreaks and consequently, knowledge cannot be generalized to all places. In our country, there is also the recognition of the circulation of other flaviviruses: SLEV, WNV, YFV, ZIKV, ILHV, BSQV and this means that particular combinations of viral infections and immunity can be generated, affecting the performance of diagnostic methodologies and even in the short term, providing a particular scenario for the introduction of dengue vaccines. The general objective of this thesis work has been to generate knowledge related to diagnostic tools for the detection of DENV infections in Argentina and to characterize genetic and viral transmission determinants with an impact on laboratory surveillance of human infections and other potential hosts, in order to strengthen disease control and prevention strategies from the perspective of the virological laboratory.

Dengue prevention and control programs emphasize the need for an interprogrammatic, integrated and intersectoral approach that allows the evaluation and continuity of actions with national resources to reduce morbidity, mortality and the social and economic burden caused to public health. Such integration must be able to determine and minimize environmental and entomological risk factors, optimize the use of resources, guide actions, modify the behavior of people and engage communities and goberments to reduce transmission risk factors with coordinated measures within as outside the health sector. In this context, the objective of the laboratory is the early detection of increase in transmission, characterize the circulating viruses, monitor the introduction of a new serotype or genotype in a specific place, carry out the confirmation of severe / atypical dengue cases and the follow-up and support for the

characterization of an epidemic. Laboratory confirmation of all clinically compatible cases is not required for integrated surveillance. However, it is necessary to study a percentage of them to assess the epidemiological situation at a given time and place, with the greatest precision and timeliness possible and to contribute to correct decision-making.

Given that there is no single methodology applicable to diagnosis and that each one has scopes and limitations, we set out to evaluate serological diagnostic tools for use in surveillance programs for the early detection of dengue infections, considering the particular epidemiological scenario that involves the circulation of other flaviviruses in our country. When a case with symptoms compatible with dengue is detected, it is possible that there is diversity in the days of evolution at the time of consultation and this point is important because there is no methodology that can respond to the etiological diagnosis in all phases of the disease. These methods could be suitable for implementation in laboratories of medium complexity and would allow increasing access to diagnosis at the local level. To do this, we proceeded to evaluate the performance of the detection of the NS1 antigen by a commercial ELISA method as an alternative to genomic detection for the study of samples of up to 6 days of evolution from the onset of symptoms and, on the other hand, to evaluate the application of the detection of IgM DENV antibodies by ELISA as a screening tool for the detection of active viral circulation when there are patient samples that present a little later to the consultation.

Regarding the detection of the NS1 antigen, initially the evaluation consisted of a first study with a panel of 105 anonymized retrospective samples available in our laboratory that were selected to form a correctly characterized panel. To evaluate the sensitivity (Se), positive sera corresponding to infections by the different dengue serotypes detected in Argentina and negative sera were included to evaluate the specificity (Sp), including, among others, samples of other pathologies that constitute a differential diagnosis within the febrile syndrome in which dengue surveillance is carried out in our country. The reference technique was the *n*RT-PCR DENV 1, 2, 3 and 4. The results obtained showed a Se of 94.2 (95% CI 98.8-84.0) and a Sp of 98.0 (95% CI 100 - 89.9) with good performance in the detection of the different serotypes. Subsequently, a prospective evaluation is carried out in the field in the period 2010-2013. The results we obtained allowed us to determine an excellent level of agreement

(K index values between 0.82 and 0.90) in a total of 2310 samples processed in parallel to compare the detection of the NS1 antigen vs the DENV-1 RT-PCR. 2, 3, 4. It is interesting to note that in this period in Argentina there was autochthonous circulation of DENV-1 (2010), DENV-1 and DENV-2 (2011) and DENV-1, 2 and 4 (2013). The evaluation carried out in the field included different Argentine provinces affected by DENV and as the proportion of DENV-2 and DENV-4 serotypes increased, lower sensitivity of the NS1 antigen could be evidenced when compared with those infected by DENV-1, but within of a range of acceptability. The Se corresponding to DENV-1 infections was 100% in 2010, 98% in 2011 and 97.5 in 2013; for DENV-2 it was 89% in 2011 and 83.3% in 2013 and for DENV-4, Se was 88.5% in 2013. The sensitivity for DENV-3 was 91.3% (21 / 23,100) in the 2009 evaluation with the INEVH panel, and it could not be evaluated in the field since this serotype did not have autochthonous circulation in the 2010-2013 period. The occurrence of cross-reactions in the detection of the NS1 antigen was also evaluated. For this, 58 acute samples with SLEV, YFV (wild and vaccinated) and ZIKV were processed with negative NS1 DENV results, reinforcing the excellent Sp values determined in the evaluation and allow us to consider the possibility of use it as a confirmatory criterion for dengue infection.

However, the data for the detection of immune responses in human and animal samples that arise from this thesis have been different and warn about the limitations and rigor that must be observed when interpreting results of tests for the detection of IgM and IgG antibodies in DENV infection in human and animal samples. In this work, we have shown that IgM DENV antibodies measured by a commercial ELISA reagent had a mean seropersistence of 228 days (IC95 203-253) in patients older than 15 years after systematic follow-up carried out through 11 periodic samplings carried out in 72 cases of Dengue fever confirmed in connection with an outbreak by DENV-1 in Tucumán in 2009. We demonstrated seropersistence greater than 18 months in 8.3% of the cases studied and a downward trend in reactivity values when applying the commercial reagent and it could be corroborated but to a lesser extent by the reference "in house" methodology for the detection of IgM (1.5% positivity by MAC-ELISA vs 12.0% by UM-ELISA at approximately 15 months after the onset of symptoms). Consequently, the finding of an IgM DENV (+) is a marker of recent infection and the possibility of seropersistence determines that it may not correspond to the detection of an acute infection. In the case of having a single patient sample, an IgM (+) result

accompanied by an NS1 (+) would allow to determine that it is indeed an acute case and would strongly guide the specificity of that IgM, if not it was possible to evaluate cross-reactivity with other flaviviruses. This thesis, to our knowledge, is the first national work that documents the persistence of IgM in people infected with dengue and adds evidence to this aspect that has gradually been addressed by other researchers, both for DENV infections and for other flaviviruses. .

The MAC-ELISA methodology used in this work was optimized during the development time of this work according to the needs that arose in connection with the successive detection of flaviviruses in the country. The protocol modified by Martin and cols, 2000 was used to expand the knowledge about serological crosses in people infected with dengue in Argentina. In this sense, we have processed 78 samples with confirmed diagnosis by molecular methods and / or by PRNT₉₀ obtained from confirmed cases of infections by DENV, Flavivirus, SLEV and ZIKV. It has been shown that the detection of IgM serve to guide the identification of the infecting agent, achieving DENV differentiation when processing the sample in parallel against the SLEV, WN, YFV and ZIKV antigens and compare the corresponding P / N values. In the dengue cases evaluated, the ratio of the P / N values is higher in 100% of the samples but showing levels of reactivity also for the other antigens (higher against the SLEV antigen, followed by YFV, WNV and to a lesser extent ZIKV). It is relevant to note the high degree of reactivity of the samples against the different flaviviruses evaluated, with P / N values that exceed the cut-off value and that, if they had been processed individually, would lead to erroneous interpretations. The results obtained have also shown the potential for greater specificity of IgM antibodies by MAC-ELISA vs neutralizing antibodies determined by PRNT₉₀ and these determinations could be useful in the diagnosis of sequential or secondary infections where PRNT₉₀ is limited to achieve the agent identification.

Another of the particular objectives raised in this thesis has been the study of the prevalence of infection for DENV and other flaviviruses in free-living black howlers in Chaco and Corrientes with the aim of investigating the existence of viral activity in this ecosystem. The NEA region has a demonstrated capacity to sustain sylvatic cycles for yellow fever and has the potential to become an ecological niche for the enzootic circulation of DENVs in the region. Non-human primates can act as important hosts in the natural cycle of flaviviruses and serological studies can lead to a better

understanding of the dynamics of virus circulation and host susceptibility. Between July and August 2010, sampling campaigns were carried out to carry out serological and molecular studies in *Alouatta carayas* captured in northeastern Argentina. We used PRNT₉₀ tests to analyze 108 serum samples for antibodies to DENV (serotypes 1 and 3), WNV, SLEV, YFV, ILHV, and BSQV. The detection of the flavivirus genome was carried out using a generic RT-PCR in a selection of 51 animals, all of which were negative. Of the 108 black howlers studied, 64.8% (70/108) had evidence of a past flavivirus infection as evidenced by neutralizing antibodies. Antibody patterns with monotypic reactivity (13/70, 19%) and heterotypic (27/70, 39%) were differentiated. The remaining 42% of the antibody-positive animals were classified as indeterminate for virus identification. We identified specific neutralizing antibodies against DENV-1 and DENV-3, also for WNV, SLEV, ILHV and BSQV and surprisingly, the highest prevalence of antibodies detected was against WNV with 9 (8.33%) animals with monotypic response for this virus. Monotypic reactions have also been obtained for DENV-3 (0.93%) and DENV-1 (0.93%) in interface areas between the wild-rural environment, with low but specific titers, since the serum samples were previously inactivated by heat. These dengue serotypes were selected because they are the ones with confirmation of previous circulation in human cases from the provinces of Misiones, Corrientes and Chaco in the period 2000-2008, prior to this sampling. It is interesting to analyze that, in addition to monotypic animals, positivity for DENV-1 and DENV-3 was found in the other animals. Specifically, we detected 48.1% (13/27) of animals with neutralizing antibody titers for DENV-1 / DENV-3 in those with higher antibody titers for another flavivirus and 47% were positive for DENV-1 and 53% for DENV-3 in the group of serological "indeterminate" animals. These results could be originated by a cross reaction, could represent a viral entry by contact with the human environment, or, as other studies suggest, they could indicate the occurrence of wild DENV in the región. The establishment of a jungle cycle for DENV would make it difficult to control the pathology in Latin America, which is why it is relevant that these types of studies have continuity in the country and the rest of the region.

Increased global transmission and expansion of the four DENV serotypes have been associated with increases in the number of annual infections, the frequency of epidemics, and severe clinical disease. The clinical manifestations of dengue and their severity depend on several factors, such as the genetics of the virus and the host, as well

as previous exposure to heterotypic DENV infections. Each DENV serotype consists of several genotypes, representing its great genetic diversity, and molecular epidemiology can be applied as a tool to understand its evolution, transmission dynamics, or even differences in response to antivirals or vaccines. This thesis has been contributed to the knowledge of the genotypic characteristics and viral phylogeny of dengue serotype 1, 2, 3 and 4 strains associated with the occurrence of epidemic outbreaks in the country. We performed the characterization of the viral genotype by restriction fragment polymorphisms method and / or nucleotide sequencing of an informative fragment of the viral genome in 150 positive samples (87 DENV-1, 2 DENV-2, 45 DENV-3 and 16 DENV-4) in dengue cases reported in Argentina between 2002 and 2021. The results found showed the circulation of genotype V for DENV-1, the Asian American genotype for DENV-2, genotype III for DENV-3 and genotype II for DENV-4, with a strong association with circulating variants in neighboring countries and Latin America. In the case of DENV-1, the dissemination of lineages within genotype V, extinction and replacement by new variants in the period 2002-2018 has been evidenced, following the regional trend.

In the last years of DENV expansion in Argentina, the occurrence of outbreaks limited in time, characterized by cut off of transmission in the months of the year with low temperatures, has drawn attention to the fact that the bordering countries to the north have gradually gone to a endemic circulation pattern for viral circulation. The question was given about the veracity of the transmission cuts or whether there are low levels of viral activity that the surveillance system fails to detect. On the other hand, a not very evaluated aspect of dengue is the occurrence of asymptomatic infections. During the viremic period, present in both symptomatic (up to 2 days before the onset of fever) and asymptomatic infections, DENV can become a blood-borne infection. These particularities mean that DENV, as well as other flaviviruses, can present a level of silent circulation in healthy population in areas of epidemiological risk that can affect transfusion safety and / or contribute to the mechanisms transmission and dissemination of these agents. In this thesis, an active search for DENV RNA was carried out in blood banks in two provinces of Argentina, Salta and Córdoba, between September 2013 and May 2014. In total, viral genome was investigated in 3357 donations collected during 9 months. Genome detection was negative in Córdoba. In Salta, during the first 5 months of 2014, the occurrence of a new dengue outbreak in the northeastern region was

confirmed, this time with relatively lower infection rates than those detected in previous years: Salvador Mazza, 26 patients per 10,000 inhabitants, Aguaray 12, Orán 31 and Aguas Blancas 22. Despite the low incidence of DENV infection, the blood bank investigation allowed the detection of the DENV-4 genome in 1 of 1775 (0.056%) samples from healthy donors studied in the period of the study. This percentage of positivity increases to 0.11% (1/926) if we only consider the number of donors studied during the period with recognized autochthonous circulation at the beginning of 2014 (EW 1-19). An incidence of DENV genome per 10,000 donors has been detected that is between 5.6 (considering 1 in 1775) and 10.8 (considering 1 in 926). The DENV strain detected in the blood donor in our study corresponded to serotype 4 in agreement with that identified by the surveillance system in cases with clinical symptoms. This DENV-4 strain in which we have been able to characterize that it corresponds to genotype II, integrates a clade together with the strains detected in Argentina in 2010, 2013 and others of recent circulation in Brazil. No DENV-positive donors were detected at interepidemic times in either of the two provinces. These results raise the need to evaluate asymptomatic DENV infection at epidemic times in the country to mitigate risk and guarantee transfusion safety, particularly with the increasing trend in the incidence of the disease in the northern and central provinces. Symptomatic dengue patients determine the burden of morbidity and mortality of the disease, but since most infections will result in inapparent infections, these constitute a viral reservoir that is not considered and evaluated too much, which also implies a risk for transfusion safety.

The trend of increasing incidence, severity and lethality due to dengue in the region and the correlate of increasing intensity and dispersion of cases in Argentina, present a complex outlook for the future and the need to monitor the different transmission routes of DENV in our country, an epidemiological scenario with activity of other flavivirus. The results obtained in this thesis contribute to the knowledge of relevant aspects of DENV's activity and strengthen laboratory surveillance, an essential pillar for the establishment of adequate measures for the prevention and control of future dengue epidemics in Argentina.

INTRODUCCIÓN

1. Enfermedades Emergentes y Arbovirus

El concepto de enfermedad infecciosa emergente y reemergente ha tomado importancia a partir de las últimas décadas del siglo pasado y contempla a aquellas infecciones nuevas o que están aumentando rápido en incidencia o rango geográfico. Se enmarca en la denominada transición epidemiológica -entendida como el proceso de cambio de largo plazo en las condiciones de salud de una sociedad determinada, incluyendo cambios en los patrones de enfermedad, incapacidad y muerte y dentro de ésta, en el concepto de mosaico epidemiológico, que si bien destaca el predominio de las enfermedades no transmisibles en las causas de muerte, ubica a las enfermedades transmisibles como importantes causas de enfermedad y consulta, particularmente en contextos sociales de desigualdad en la distribución de los riesgos y los recursos [1]–[3].

El riesgo de aparición de nuevos patógenos humanos ha aumentado en las últimas décadas, particularmente de aquellos que se originan en un reservorio animal. La detección temprana es cada vez más importante debido a la posible rápida propagación e impacto teniendo en cuenta el tamaño cada vez mayor de las poblaciones humanas y animales y sus movimientos en todo el mundo. La naturaleza impredecible de la aparición de estas enfermedades las convierte en un gran desafío. La historia reciente con la pandemia de SARS COV-2 está evidenciando la amenaza global que implican los brotes de enfermedades emergentes, y la necesidad de que todos los sectores involucrados en vigilancia y respuesta frente a enfermedades infecciosas deban estar preparadas para detectar y manejar los desafíos futuros. Es necesario conocer los factores de riesgo generales de aparición y propagación, combinados con datos a nivel local, para desarrollar metodologías basadas en evaluación de riesgo para la detección temprana. Esto implica la implementación del enfoque de “una salud” (*one health*), integrando los sectores de salud humana, animal y ambiental, así como ciencias sociales y bioinformática, entre otros. Los avances técnicos recientes, como la secuenciación metagenómica, ayudarán a la detección rápida de nuevos patógenos en la interfase humano-animal[4].

La aparición de enfermedades infecciosas ha demostrado ser extremadamente difícil de predecir, y se han informado casos humanos de una amplia gama de patógenos emergentes o reemergentes en todo el mundo. Sin embargo, cuando los datos de brotes de enfermedades emergentes en las últimas décadas se combinan, algunas condiciones específicas o factores de riesgo parecen impulsar la aparición de enfermedades[5]. Los principales impulsores generales que se han descrito pueden resumirse como cambios en: la demografía humana con la consecuente demanda creciente de producción de alimentos[6], el uso de la tierra, incluida cambios en la agricultura[7][8], viajes y comercio internacional[8][9] y en el clima[8][10] [11].

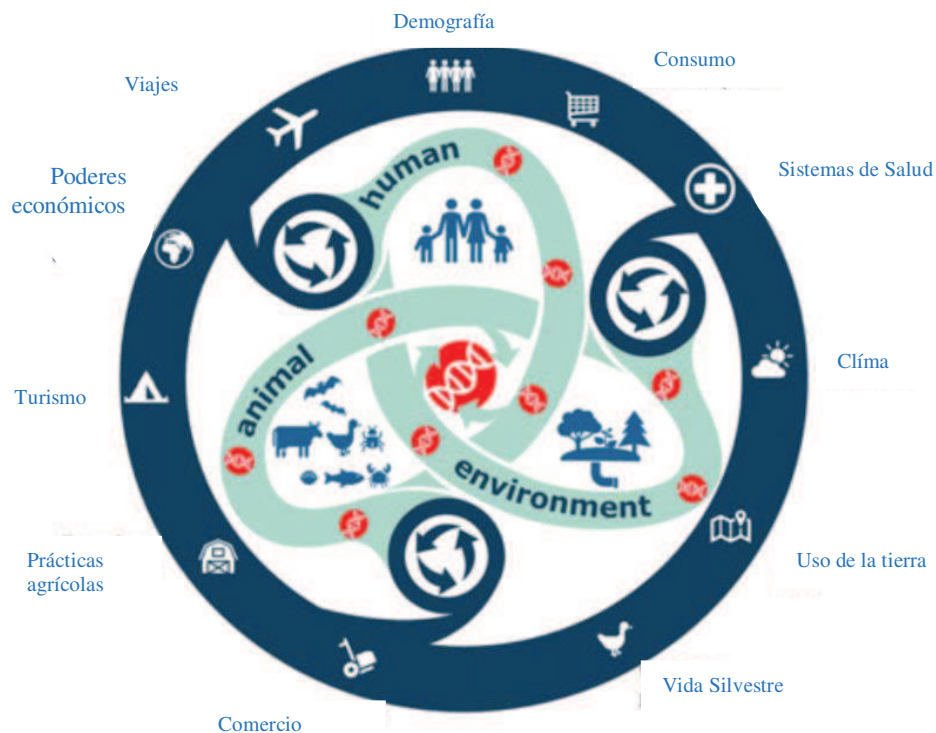


Figura 1. Cambios globales que actúan como impulsores de la aparición y propagación de enfermedades infecciosas en los dominios del concepto de “una salud” (Figura modificada de Sikkema y Koopmans, 2021).

Algunos virus adoptan medios de diseminación muy específicos y dependen de vectores para su transmisión desde el reservorio a un nuevo huésped. El término “arbovirus” proviene del inglés *arthropod-borne*[12] y designa a un grupo de virus transmitidos por artrópodos. Si bien puede parecer que la restricción a un vector particular debe reducir las oportunidades de infección, el hecho de que el virus se transporte en forma directa a un nuevo huésped, otorga al virus grandes posibilidades de éxito en la transmisión, contribuye a una mayor diversidad genética, incrementando la diversidad de la quasispecie viral y por lo tanto incrementando su fitness y chances de adaptación/evolución, lo que explica el alto impacto de estas enfermedades en la salud pública. Dentro de las enfermedades emergentes, las producidas por arbovirus son un problema muy grave a nivel mundial[13][14]. Debido a que su vigilancia y prevención implica también la vigilancia de sus vectores, se hace difícil su control y casi imposible evitar su expansión en regiones tropicales, subtropicales e incluso, templadas[11][15]

Los arbovirus son cientos de virus RNA predominantemente transmitidos por mosquitos y mantenidos en ciclos complejos con huéspedes vertebrados tales como mamíferos o aves. Hasta hace poco, sólo algunos de ellos habían causado enfermedades humanas

clínicamente significativas, sin embargo diversos arbovirus recientemente han aumentado en importancia como patógenos humanos y veterinarios usando una variedad de mecanismos[16].

Los arbovirus incluyen una amplia variedad de taxones de virus RNA, incluidos los alfavirus (género *Alphavirus*, uno de los 2 géneros de la familia *Togaviridae*); flavivirus (género *Flavivirus*, uno de 3 géneros en la familia *Flaviviridae*); bunyavirus (*Bunyaviridae: Bunyavirus*), nairovirus (*Bunyaviridae: Nairoviridae*) y flebovirus (*Bunyaviridae: Phenuiviridae-Phlebovirus*); *Orbivirus* (uno de los 9 géneros de la familia *Reoviridae*); *Vesiculovirus* (uno de los 6 géneros en la familia *Rhabdoviridae*) y *Thogotovirus* (uno de los 4 géneros en la familia *Orthomyxoviridae*)[17]. Estos grupos virales tienen una variedad de genomas de RNA y estrategias de replicación, lo que sugiere que la estrategia de transmisión mediante artrópodos ha surgido muchas veces durante la evolución de los virus RNA. El virus africano de la peste porcina (*Asfarviridae: Asfarvirus*) es el único arbovirus con genoma DNA reconocido hasta el momento [18] y la escasez de arbovirus con DNA sugiere que la mayor plasticidad genética y mayores tasas de mutación exhibidas por virus de RNA[19] les permite acomodar exitosamente un ciclo de replicación alterna entre huéspedes vertebrados e invertebrados, tan dispares filogenéticamente.

1.1. Ciclos de transmisión de los arbovirus.

Estos agentes virales se transmiten biológicamente entre huéspedes vertebrados y vectores hematófagos tales como mosquitos, culicoides y garrapatas [15]. Hablar de un proceso de transmisión biológica implica que los arbovirus se replican en el artrópodo vector antes de la transmisión, a diferencia de lo que sucede en un proceso de transmisión mecánica, donde la infección se transmite a través de partes bucales contaminadas, sin replicación previa en el vector [20]. Se puede producir transmisión biológica vertical involucrando el paso del virus de un vector hembra infectado a los descendientes machos y hembras. La transmisión biológica será denominada horizontal cuando se produzca por la vía venérea, por ejemplo cuando un vector macho infectado infecta directamente a un vector hembra, o por la vía oral, cuando un vector infecta un huésped vertebrado a través de la saliva durante la alimentación de sangre. El último modo de transmisión horizontal es el más común para la mayoría de los arbovirus e involucra la infección del tracto alimentario del vector luego de una ingesta de sangre virémica, seguido de un proceso de diseminación del virus en el vector, replicación del virus en las glándulas salivales, seguidas por la inyección de saliva infecciosa durante una próxima alimentación sanguínea (período de incubación extrínseco). Usualmente los arbovirus producen un efecto escaso o nulo sobre el artrópodo vector, mientras que la infección de los huéspedes vertebrados puede provocar morbimortalidad significativa, sobre todo cuando infectan a

huéspedes accidentales que no se comportan como los reservorios virales habituales. La infección se transmite a los nódulos linfáticos regionales. En estos tejidos, la replicación viral produce una viremia primaria, que causa la infección de los tejidos asociados con el sistema vascular. La reproducción viral en el sistema vascular genera una viremia secundaria de los órganos blanco, tales como el hígado en la fiebre amarilla o el sistema nervioso central (SNC) en un cuadro de encefalitis. El período requerido para que la infección se convierta en enfermedad en el huésped vertebrado se denomina “período de incubación intrínseco” en contraposición al período extrínseco en los vectores[21].

Las enfermedades transmitidas por arbovirus implican una interacción dinámica con los agentes patógenos, huéspedes vertebrados y el ambiente (Figura 2A). Los arbovirus se perpetúan en la naturaleza en ciclos que se establecen entre artrópodos hematófagos que actúan como vectores y huéspedes vertebrados susceptibles (reservorios virales) que pueden ser una fuente de infección para otros artrópodos o sólo sufrir la infección (huéspedes terminales) sin desarrollar niveles de viremia suficientes para continuar la transmisión. Los vectores se pueden infectar mediante la ingesta sanguínea a partir de un huésped virémico, por transmisión transovárica, transmisión venérea y transmisión vertical a los vectores durante la oviposición. El riesgo de transmisión a los vertebrados estará en relación directa con la densidad de la población de los vectores, sus preferencias de alimentación y la eficiencia con que puedan transferir el virus (competencia vectorial), entre otros múltiples factores.

El número de especies de artrópodos potencialmente capaces de transmitir los arbovirus es enorme, pero dos especies de mosquitos (*Aedes aegypti* y *Aedes albopictus*) son los vectores más importantes para los arbovirus que infectan a seres humanos y ocasionan brotes epidémicos en la Región de las Américas. *A. aegypti* es un mosquito primordialmente urbano, peridomiciliario y de interior que constituye el vector principal para los virus dengue (DENV), chikungunya (CHIKV), Zika (ZIKV) y el virus de la fiebre amarilla (YFV). *A. albopictus* es un vector secundario para estos virus patógenos, pero tiene un ámbito geográfico de distribución más extenso que *A. aegypti* y, por lo tanto, puede desempeñar una función importante en la transmisión de los arbovirus en algunas regiones [22][23].

Los ciclos de arbovirus se pueden clasificar en ciclos de mantenimiento y de amplificación, los primeros son los que permiten la permanencia del virus en la naturaleza. En general, se generan en ambientes selváticos o rurales y suelen ser responsables de endemias en ciertas regiones. En determinadas circunstancias se pueden producir la introducción de un huésped accidental (“spillover”) dentro de ese ciclo silvestre, lo cual permite que el virus ingrese por ejemplo, en un ambiente urbano y si encuentra condiciones ecoepidemiológicas favorables, puede dar inicio a un ciclo con diferentes vectores y huéspedes que pueda desencadenar un ciclo de amplificación viral. Algunos pocos arbovirus, tales como el DENV y

CHIKV, actualmente producen extensas epidemias por replicación viral que se sostiene fundamentalmente en ciclos urbanos. No obstante, resulta interesante notar las evidencias de circulación de CHIKV y ZIKV en huéspedes silvestres en América, inclusive en primates no humanos, a pesar de su reciente introducción. Esta situación contrasta con las escasas evidencias disponibles de circulación de DENV en huéspedes no humanos en nuestro continente[24]–[26] y la necesidad de conocer y comprender cuáles son los factores que pudieran facilitar o dificultar el establecimiento de un ciclo enzoótico como ha sucedido con YFV (Figura 2B). El YFV es el ejemplo más antiguo de un arbovirus urbano que se convirtió en silvestre en América del Sur. Actualmente, la enfermedad en la región americana es una zoonosis de primates no humanos que se propaga como una onda a través de los corredores selváticos en Brasil, viajando miles de kilómetros, generando intensas epizootias y eventualmente infectando al hombre. Sin embargo, desde 2016, esta onda zoonótica ha alcanzado un alto nivel de transmisión en áreas pobladas del sudeste de Brasil, produciendo el mayor brote humano en los últimos 60 años. Al igual que con el YFV, los ciclos selváticos podrían ocurrir con el DENV, CHIKV y ZIKV. Para convertirse en selváticos, los arbovirus requieren una conjunción no tan probable de un conjunto de factores pero que pueden darse a lugar inesperadamente. Estos arbovirus podrían comenzar a infectar primates silvestres y ser transmitido por mosquitos *Haemagogus* que habitan en las copas de los árboles. De hecho, es casi imposible controlar estos ciclos de arbovirus ya que es complejo predecir dónde, cuándo o por qué ocurriría un derrame (*spillback*) de arbovirus en animales silvestres. El ciclo de mantenimiento selvático podría impedir la erradicación de un arbovirus y posibilitar su reemergencia en cualquier momento, infectando humanos y produciendo brotes.

La proximidad de los bosques y selvas a los entornos urbanos en algunos países ha llevado a la entrada de arbovirus desde la naturaleza hacia las ciudades en las que generan enfermedades humanas y eso además, retroalimenta el riesgo de nuevos ciclos de mantenimiento enzoóticos. En Brasil, el virus Mayaro (MAYV, Alphavirus) y el virus Oropouche (OROV, Orthobunyavirus) causan brotes en las regiones de Amazonas, Meseta Central y Pantanal. MAYV, un arbovirus de primates transmitido por mosquitos *Haemagogus* que residen en las copas de los árboles, se introdujo en Manaus, una ciudad con 2 millones de habitantes, produciendo decenas de casos de enfermedad febril aguda que tenía un diagnóstico inicial de dengue. Lo mismo ocurrió con OROV, un virus cuyo ciclo de mantenimiento selvático incluye perezosos y primates, y cuyo ciclo urbano involucra a *Culicoides paraensis*. Este virus también ha provocado brotes de enfermedad febril aguda, incluidos algunos casos de meningitis en Ciudad de Manaus. Estos datos son simplemente para resaltar que los arbovirus pueden moverse hacia adelante y hacia atrás desde ciclos selváticos a los entornos urbanos y viceversa[27].

Muchos arbovirus que se han desarrollado y diversificado en los trópicos han producido cepas virulentas e invasivas que han causado brotes importantes en latitudes templadas. La capacidad de estos virus para causar enfermedades humanas depende de factores que van desde la epidemiología a la genética viral[14].

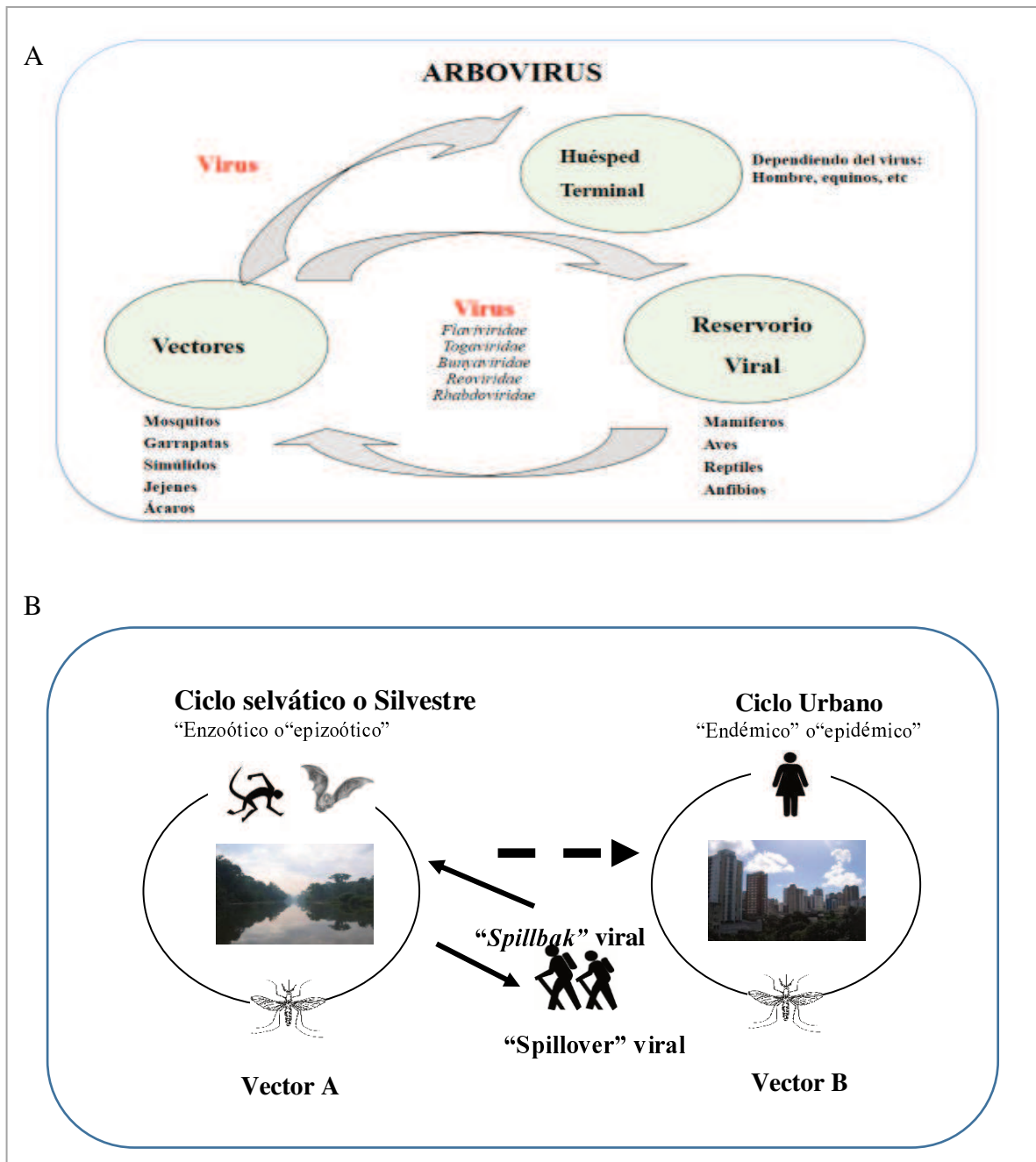


Figura 2. A. Interacciones virus-vector-huésped en la transmisión de arbovirus B. Esquema de los ciclos silvestres y urbanos y sus interacciones en la transmisión de arbovirus

Algunos puntos relevantes que surgen de las últimas experiencias en brotes por arbovirus tienen que ver con el reconocimiento de formas de transmisión no vectorial

especialmente para ZIKV, incluyendo la transplacentaria y la transmisión perinatal[28][29][30], o transfusión de sangre como ha sido evidenciado su impacto en la emergencia del WNV en América, por lactancia y potencialmente, la donación de órganos[31]. Por otro lado, se aisló virus en saliva y muestras de orina, coincidiendo con los hallazgos en infecciones por DENV, WNV y CHIKV. A diferencia de otros arbovirus, la transmisión sexual del ZIKV ha sido documentada y es motivo de especial preocupación durante el embarazo. El virus ha sido aislado en semen y en Argentina hemos hallado evidencias de RNA viral en fluido vaginal [32]

Ante la incidencia creciente de las infecciones por arbovirus es necesario fortalecer la educación y acciones tendientes a disminuir la densidad de los potenciales vectores con especial atención en centros de salud, aplicación de medidas universales de bioseguridad en el tratamiento de los pacientes, buenas prácticas de laboratorio y divulgación a la población de las vías posibles de transmisión viral de modo de mejorar la prevención.

1.2. Arbovirus detectados en Argentina

Diversos arbovirus han sido detectados en Argentina: YFV, encefalitis de San Luis (SLEV), el virus del Nilo Occidental (WNV), Ilheus (ILHV), los cuatro serotipos de DENV (DENV- 1, 2, 3, 4) y el virus Bussuquara (BSQV) (*Flaviviridae*); Aura, virus de las encefalitis equina venezolana (VEEV), del oeste (WEEV), del este (EEEV), virus Una (*Togaviridae*); Cache Valley, Kairi, Las Maloyas, Melao, San Juan, Turlok, Oropuche, Resistencia, Barranqueras, Antequeras y Pará (*Bunyaviridae*); Calchaquí y Cocal (*Rhabdoviridae*). En la mayoría de ellos, sólo se ha detectado actividad enzoótica y otros han sido identificados como los agentes causales de brotes limitados o casos humanos esporádicos[33][34][35][36][37][38]. Actualmente el dengue es el que ha generado la incidencia más significativa en las provincias de la parte subtropical y templado del país, pero la introducción y circulación autóctona en 2016 de CHIKV, de la familia *Togaviridae*; y del ZIKV, de la familia *Flaviviridae*, en el norte de Argentina ha complejizado el escenario epidemiológico[39][40]. La experiencia reciente en América Latina alerta sobre un número inesperado de manifestaciones atípicas y graves, especialmente con ZIKV asociado con microcefalia en mujeres embarazadas infectadas. El reconocimiento de vías no vectoriales para la transmisión de ZIKV plantea además la necesidad de evaluar su dimensión y relevancia en el sostenimiento de la circulación viral vs la transmisión vectorial [29]. Las similitudes clínicas, así como las dificultades de diferenciación con las pruebas de laboratorio actualmente disponibles y accesibles constituyen también un desafío para el sistema de vigilancia y personal de salud.

1. Familia *Flaviviridae*

2.1. Características de los viriones y géneros dentro de la familia *Flaviviridae*

La familia viral *Flaviviridae* está compuesta por 4 géneros: *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* y *Pegivirus*, que incluyen 89 especies. El genoma es RNA monocatenario de sentido positivo (+ ssRNA) de aproximadamente 9.2-11.0 kb, 11.3-13.0 kb, 8.9-10.5 kb y 8.9-11.3 kb respectivamente para los géneros mencionados. Todos los miembros de la familia carecen de una cola poli(A) terminal 3'. Solo el genoma de los miembros del género *Flavivirus* contienen una estructura de casquete de tipo I en el extremo 5', los otros poseen un sitio de entrada ribosómico interno (IRES). Los viriones tienen un diámetro de 40 a 60 nm, de forma esférica con una envoltura lipídica, una sola cápside básica pequeña (C) y dos (*Flavivirus*, *Hepacivirus* y *Pegivirus*) o tres (*Pestivirus*) proteínas de la envoltura asociadas a la membrana. Los pegivirus parecen carecer de un gen completo de la proteína de la nucleocápside. Las proteínas no estructurales contienen patrones de secuencia característicos de una serina proteasa, RNA helicasa y RNA polimerasa dependiente de RNA (RdRP) que están codificadas en ubicaciones similares a lo largo del genoma en todos los géneros. Los lípidos presentes en los viriones se derivan de las membranas de las células hospedadoras y constituyen el 17% del peso total del virión en el caso de los miembros del género *Flavivirus*. Se desconoce el contenido de lípidos de pestivirus, hepacivirus y pegivirus. Los viriones contienen carbohidratos en forma de glicolípidos y glicoproteínas[41].

La mayoría de los miembros del género *Flavivirus*, donde se encuentran incluidos los cuatro serotipos de DENV, son virus transmitidos por artrópodos, con distintos grupos que infectan mosquitos o garrapatas, en que los mamíferos y aves actúan como hospedadores primarios, incluyendo patógenos de impacto en salud pública o de impacto económico. Los pestivirus infectan cerdos y rumiantes y se transmiten por contacto con secreciones infectadas, pudiendo ocasiona infecciones subclínicas o causar enfermedades entéricas, hemorrágicas o debilitantes. Otros pestivirus de patogenicidad desconocida infectan murciélagos y ratas. El género *Hepacivirus* incluye el virus de la hepatitis C, un patógeno humano importante generador de hepatitis crónica, cirrosis y cáncer. Otros hepacivirus pueden infectar caballos, roedores, murciélagos, vacas y primates con patogenicidad desconocida. Los miembros del género *Pegivirus* se asocian con infecciones persistentes de una amplia gama de especies de mamíferos sin asociación con patogenicidad por el momento[41].

2.2. Organización y replicación del genoma de los virus de la familia *Flaviviridae*

El RNA genómico de todos los miembros de la familia tiene una organización similar y es el RNA m viral que se encuentra en las células infectadas (Figura 3). Contiene un único marco de lectura abierto (ORF) largo flanqueado por regiones no codificantes (NCR) terminales 5' y 3' que forman estructuras secundarias específicas necesarias para la replicación y traducción del genoma. Los miembros del género *Flavivirus*, pero no los pestivirus, hepacivirus o pegivirus producen un RNA no codificante único, subgenómico, pequeño (300-500 nt) que se deriva del 3'-NCR del RNA genómico [42] que es esencial para la replicación del virus en las células y modula la patogenicidad en animales. La iniciación de la traducción del RNA genómico depende del casquete para los miembros del género *Flavivirus*, mientras que los elementos IRES están presentes en virus de los otros géneros. Las proteínas virales se sintetizan como parte de una poliproteína que se escinde co y postraduccionalmente mediante proteasas virales y celulares. Las proteínas estructurales están contenidas en la porción N-proximal de esta poliproteína y las proteínas no estructurales en el resto. Estos últimos incluyen una serina proteasa, una RNA helicasa y la RdRP. La replicación del genoma ocurre en el citoplasma en asociación con membranas celulares modificadas a través de la síntesis de intermedios de hebra negativa de longitud del genoma. El ensamblaje de viriones, incluida la adquisición de una envoltura lipídica que contiene glicoproteínas, se produce por gemación a través de las membranas intracelulares. Las partículas virales se transportan en vesículas citoplasmáticas a través de la vía secretora antes de ser liberadas por exocitosis, como se muestra para los miembros del género *Flavivirus* y asumido para miembros de los otros géneros. Además, recientemente se ha demostrado la liberación de RNA infeccioso a través de exosomas [43]

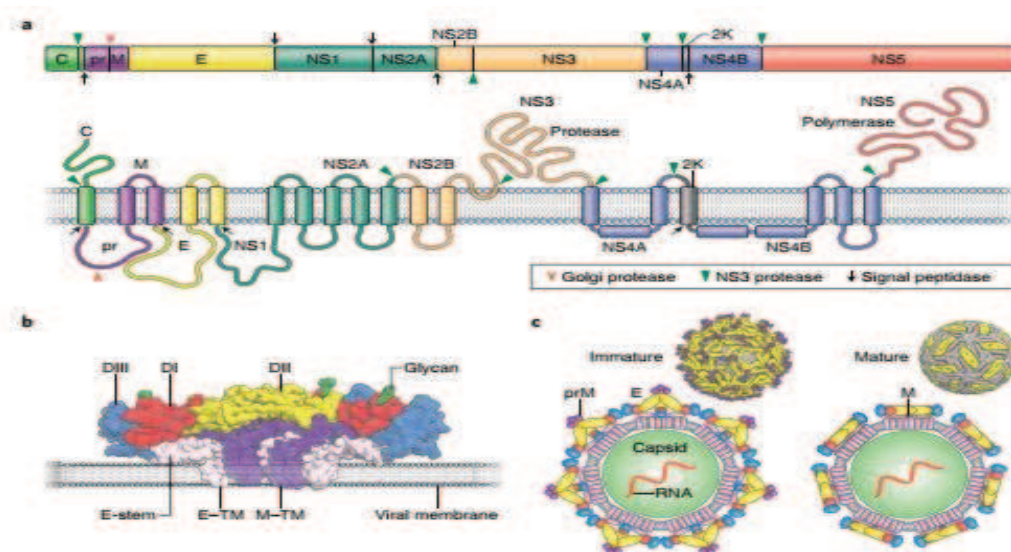


Figura 3. Organización del genoma y partícula viral en el género flavivirus (Figura modificada de Pierson y Diamond, 2020)

2.3. Relaciones filogenéticas entre los virus de la familia viral.

Las relaciones filogenéticas de las secuencias de aminoácidos en un dominio conservado de RdRP muestran la agrupación de miembros de *Flaviviridae* en los cuatro géneros asignados actualmente, aunque existe una relación filogenética más estrecha entre los miembros de los géneros *Hepacivirus* y *Pegivirus* que entre otros (Figura 4). Otra excepción es la posición atípica del virus del murciélago Tamana, que actualmente figura como miembro potencial del género *Flavivirus* pero lo suficientemente distinto como para merecer potencialmente la asignación a un nuevo género, en caso de que se encuentren más virus relacionados en el futuro [41] [44].

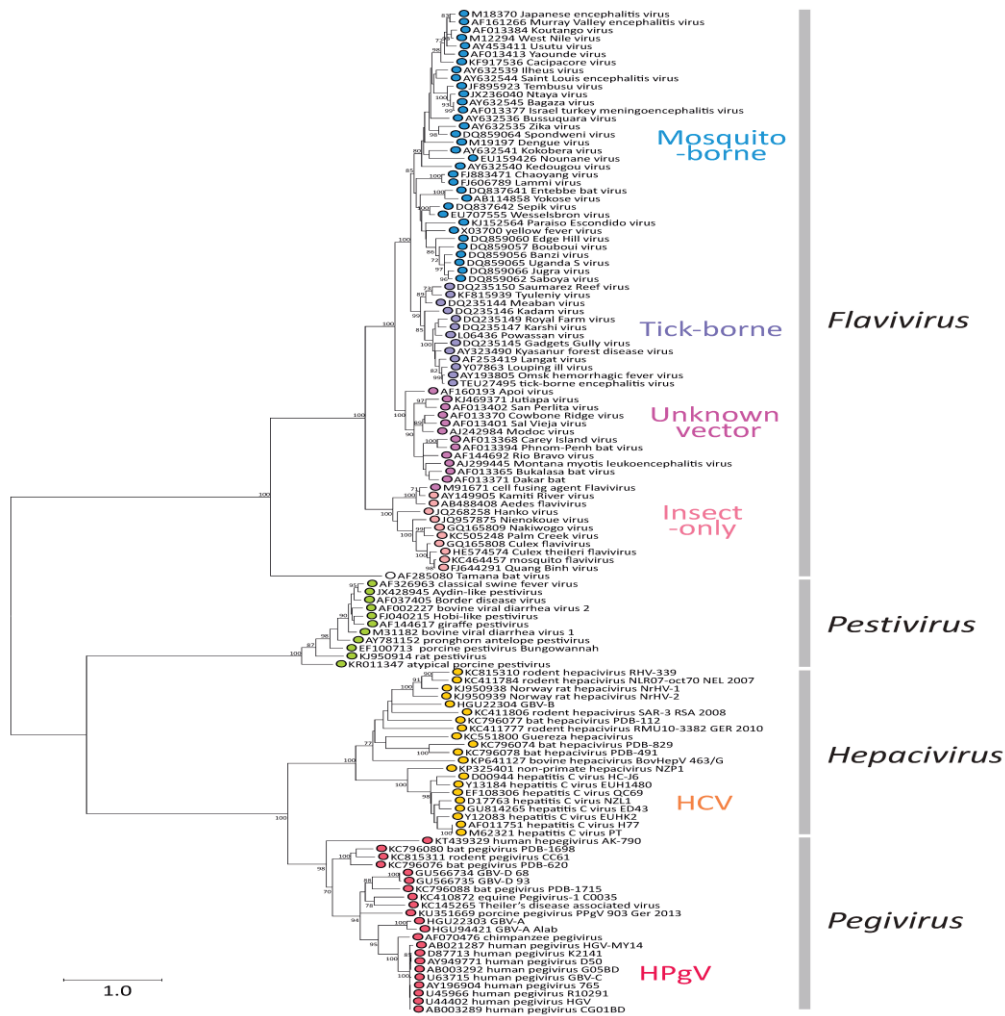


Figura 4. Filogenia de secuencias de aminoácidos conservadas en la RdRP (NS5 o NS5B) de miembros de la familia *Flaviviridae* (Figura modificada de Rico-Hesse y col, 2017)

3. Género *Flavivirus*

3.1. Generalidades y ciclos de transmisión de los flavivirus

Los miembros del género *Flavivirus*, que incluye 53 especies, tienen una distribución mundial, pero las especies individuales están restringidas a áreas endémicas o epidémicas específicas (por ejemplo, YFV en las regiones tropicales y subtropicales de África y América del Sur; DENV en áreas tropicales de Asia, Oceanía, África, Australia y América; virus de la encefalitis japonesa (JEV) en el sudeste asiático; virus de la encefalitis transmitida por garrapatas (TBE) en Europa y el norte de Asia). Pocos flavivirus, no reconocidos previamente, han sido descubiertos en los últimos años; pero sin embargo, ha sido muy importante la emergencia o reemergencia y diseminación de miembros de este género en diversas áreas del mundo. Los factores que influyen en estas situaciones son únicos y diferentes para cada agente[13]

La mayoría de los flavivirus son virus transmitidos por vectores con ciclos de transmisión entre artrópodos hematófagos y huéspedes vertebrados. Aproximadamente el 50% de los flavivirus conocidos son transmitidos por mosquitos, el 28% son transmitidos por garrapatas y el resto se transmite entre roedores o murciélagos sin vectores artrópodos conocidos. Para algunos flavivirus, aún no se ha identificado el ciclo de transmisión. En ciertos casos, los flavivirus se pueden transmitir a los seres humanos a través de productos sanguíneos, trasplante de órganos, leche no pasteurizada o aerosoles. Se sabe que algunos flavivirus transmitidos por garrapatas se transmiten directamente entre garrapatas mediante un proceso conocido como transmisión no virémica. En los vectores artrópodos, los virus también pueden tener transmisión transovárica o vertical (mosquitos, garrapatas) y transestadial (garrapatas).

Los flavivirus pueden infectar una variedad de especies de vertebrados y, en muchos casos, artrópodos. Algunos virus tienen una gama limitada de huéspedes vertebrados (p. ej., solo primates), mientras que otros pueden infectar y replicarse en una amplia variedad de especies (mamíferos, aves, etc.). La ruta habitual de infección de los artrópodos es cuando se alimentan de un huésped vertebrado virémico, pero también se ha descrito la transmisión no virémica entre vectores para los flavivirus transmitidos por garrapatas. Un nuevo grupo de virus no clasificados en el género, incluido el virus del agente de fusión celular, parece que solo infecta a los mosquitos, y ahora se han identificado varios flavivirus de insectos muy distintos genéticamente[45]

Algunos de los flavivirus son agentes zoonóticos, ya que dependen de especies animales para su mantenimiento en la naturaleza. Los humanos suelen ser huéspedes accidentales y terminales que no contribuyen al ciclo de transmisión natural. No obstante, más del 50% de los flavivirus conocidos se han asociado con enfermedades humanas, incluidos muchos patógenos humanos importantes como YFV, DENV, ZIKV, JEV, WNV, SLEV y TBEV. Las

enfermedades inducidas pueden estar asociadas con síntomas del sistema nervioso central (p. ej., meningitis, encefalitis), fiebre, artralgia, erupción cutánea y fiebre hemorrágica. Varios flavivirus son patógenos para animales domésticos o salvajes (pavo, cerdo, caballo, oveja, perro, urogallo, rata almizclera) y causan enfermedades de importancia económica.

3.2. Antigenicidad en los flavivirus.

Todos los flavivirus están relacionados serológicamente, lo que puede demostrarse mediante técnicas de ELISA y/o mediante inhibición de la hemaglutinación utilizando anticuerpos policlonales y monoclonales. Por esta particularidad, los flavivirus fueron inicialmente clasificados mediante diferentes técnicas serológicas[46][46].

A medida que se descubrían y caracterizaban nuevos agentes, este grupo se avisoraba como un taxón importante con una complejidad serológica y ecológica creciente. Los ensayos de neutralización son más discriminatorios y se han utilizado para identificar serocomplejos entre flavivirus más estrechamente relacionados aunque no a nivel de especie. La proteína E de la envoltura es el principal objetivo de los anticuerpos neutralizantes e induce una inmunidad protectora. La proteína E también induce anticuerpos no neutralizantes de reacción cruzada entre flavivirus. Los sitios antigénicos implicados en la neutralización se han mapeado en cada uno de los tres dominios estructurales de la proteína E. Las proteínas prM y NS1 también pueden inducir anticuerpos que protegen a los animales infectados de una infección letal[41].

La técnica de neutralización permitió la clasificación de los flavivirus en 8 complejos antigénicos conteniendo 49 virus. Los DENV integran un complejo separado dentro de esa clasificación. Otros 17 agentes virales reconocidos, incluido YFV, no pudieron ser lo suficientemente relacionados como para integrar ninguno de los 8 complejos diferenciados[47]. Es importante remarcar que las relaciones antigénicas presentes en el género *Flavivirus* se intensifican entre los virus que integran un mismo complejo y generan dificultades en el diagnóstico serológico así como en la tipificación de las cepas virales.

3.3. Criterios para demarcación de especies virales y filogenia del género *Flavivirus*:

Los criterios de demarcación de especies en el género incluyen: datos de secuencia de nucleótidos y aminoácidos deducidos, características antigénicas, asociación geográfica, asociación de vectores, asociación de huéspedes, asociación de enfermedades y características ecológicas. La demarcación de especies considera una combinación de cada uno de los criterios enumerados anteriormente. Si bien la relación entre la secuencia de nucleótidos y las filogenias resultantes son criterios importantes para la demarcación de especies, los otros criterios enumerados pueden ser particularmente útiles en la demarcación de virus con estrecha relación genética [41]

El genoma RNA de 11 kb de los *Flavivirus* codifica la información para 3 proteínas estructurales: proteína de la cápside (C), proteína de la envoltura (E) y el precursor de membrana (PrM); y 7 proteínas no estructurales (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5) [48][49][50]. La glicoproteína E es la hemaglutinina viral, actúan como sitio de unión y fusión viral e induce la producción de anticuerpos neutralizantes, entre otras funciones[51] [52]

El nivel de mutación espontánea es particularmente importante para el caso de los virus RNA ya que estos carecen de la actividad de edición de la polimerasa. Esta situación les otorga a los virus RNA una variabilidad que les permite evolucionar ante presiones selectivas sucesivas. El análisis de las secuencias completas de 11 flavivirus reveló que las secuencias que codifican para las distintas proteínas virales cambian con una velocidad diferente. Las zonas del genoma que codifican las secuencias de las dos proteínas implicadas en el proceso de replicación viral (NS5 y NS3) son más conservadas que el resto, mientras que la región más variable es la de la NS2a. El análisis de secuencias genómicas de los genes de la proteína E, NS5, NS3 o por secuencias del genoma completo de los flavivirus ha permitido realizar una clasificación que incluya a todos los virus actualmente reconocidos en esta familia viral y han permitido estudiar su evolución y diseminación [53][54][54][55]. Tomando los datos filogenéticos junto a las propiedades biológicas de los diferentes flavivirus, se ha hipotetizado que los flavivirus evolucionaron a partir de un ancestro común en África hace unos 10000 años y luego continuaron su evolución en dos grandes grupos: un grupo viral transmitido por garrapatas, del cual más tarde se produjo la evolución de un nuevo grupo de flavivirus, con mosquitos como vectores y otro grupo de virus de los que no se conoce cuál es su vector. El grupo transmitido por mosquitos puede dividirse en dos ramas epidemiológicas distintas: a) los virus neurotrópicos, a menudo asociados con la producción de encefalitis en el hombre o animales, que se relacionan con mosquitos del género *Culex* y cuyos huéspedes vertebrados suelen ser las aves y b) los virus no-neurotrópicos, asociados con mecanismos fisiopatogénicos que pueden llegar a la producción de fiebres hemorrágicas en el hombre, relacionados con mosquitos del género *Aedes* y que emplean primates como huéspedes vertebrado, dentro de los cuales se incluyen a los DENV (figura 5) [55] .

Sin embargo, se ha argumentado que el virus Powassan, flavivirus transmitido por garrapatas, se introdujo en el norte de América en algún momento entre la apertura y el cierre del puente terrestre de Bering que conectaba Asia y América del Norte hace entre 15 000 y

11 000 años, lo que indica un origen aún más antiguo del género *Flavivirus*. Para determinar el origen temporal del género, se realizaron análisis con reloj molecular relajado bayesiano y datación en un conjunto de información disponible con una alta cobertura de la diversidad de flavivirus, basadas en el virus Powassan y el evento biogeográfico del puente terrestre. El resultado del análisis sugirió que el género flavivirus se originó alrededor de 85.000 (64.000-

110.000) a 120.000 (87.000-159.000) años atrás. Esto es significativamente más antiguo de lo estimado anteriormente y se propone la posibilidad de que los humanos modernos hayan entrado en contacto con varios miembros del género *Flavivirus* mucho antes de lo sugerido anteriormente, y que es posible que la propagación de varios flavivirus coincidió con, y fue facilitado por, la migración y expansión de la población de humanos modernos fuera de África[56].

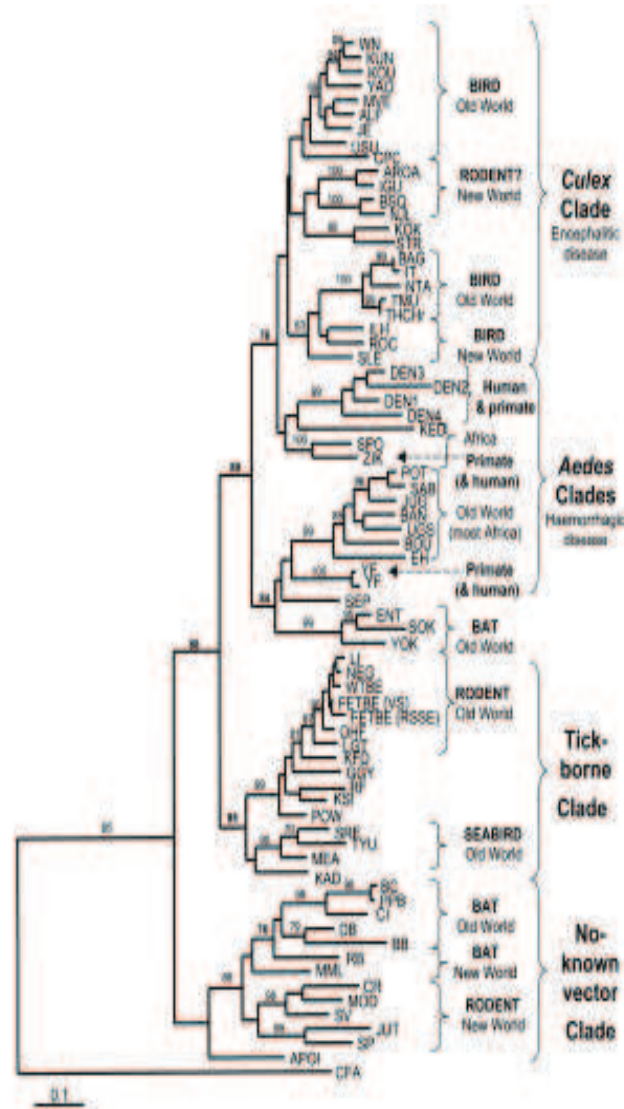


Figura 5. Árbol filogenético del género *Flavivirus* basado en las secuencias del gen NS5 construida usando un modelo de ocho parámetros (GTR, C y PINVAR). Las llaves denotan el clado de vector principal o el clado de hospedador vertebrado principal para los virus que contiene (Figura modificada de Gaunt y col, 2001)

3.4. Flavivirus de importancia sanitaria en Argentina

En Argentina, la circulación de distintos flavivirus ha sido detectada a partir de la década del 60 al realizarse diversos estudios sobre poblaciones de roedores [36]. El SLEV fue originalmente aislado en la Argentina a partir de 3 fuentes diferentes (humanos con síndrome febril indiferenciado, mosquitos y roedores) a lo largo de 3 períodos de tiempo (1963, 1966-1967 y 1978-1984) [33]. Las características ecológicas de SLEV en América del Sur son prácticamente desconocidas, pero en Argentina el ciclo involucra *Culex quinquefasciatus*, *Culex interfor* y *Culex saltanensis* como mosquitos como vectores. [57][58]. Diversos estudios serológicos indican una amplia distribución y endemidad en el centro y norte del país, pero sólo a partir de 2005 se han descrito brotes epidémicos seguidos de la detección de casos esporádicos en diversas provincias. En 2005 se destacan el primer brote urbano de enfermedad neurológica por SLEV en la ciudad de Córdoba con 47 casos humanos confirmados, con una mortalidad del 19 % [36]; el del año 2010 ocurrido en la ciudad de Buenos Aires con 13 pacientes confirmados, y el de 2011 registrado en la capital de la provincia de San Juan con 83 casos notificados y 10 casos confirmados[37]. Durante 2014-2015, SLEV causó un brote humano en Arizona y causó casos humanos aislados en California en 2016 y 2017. Los análisis filogenéticos indican que el SLEV emergente en el oeste de Estados Unidos está relacionado con las cepas epidémicas aisladas durante el brote de SLEV en Córdoba en 2005. Los estudios ecoepidemiológicos sugieren que la aparición de SLEV en Argentina fue causada por la introducción de una cepa más patógena y el aumento de las poblaciones de la paloma *Zenaida auriculata* (huésped amplificador) [57] [58].

La re-emergencia del DENV se detectó en nuestro país en el año 1997 [59]; a partir de dicho momento, se registraron brotes epidémicos que afectaron a gran cantidad de provincias del norte de Argentina, con registro de circulación de los cuatro serotipos reconocidos y desde entonces, en consonancia con lo sucedido en la región de las Américas, se ha convertido en el arbovirus de mayor impacto sanitario en términos de morbilidad[60][61][62].

En el período 2007-2009 se documentó la reemergencia en el país de YFV luego de más de 40 años de silencio, implicando un gran riesgo para la salud pública de Argentina. Dicho virus presenta un ciclo selvático de transmisión en el que intervienen mosquitos de los géneros *Haemagogus* y *Sabethes* y primates no humanos de los géneros *Alouatta*, *Cebus* y *Callithrix*. Durante el verano del año 2007 e inicio del 2009, se registró una epizootia en monos aulladores *A. caraya* y *A. guariba* en las provincias de Corrientes y Misiones y se aisló e identificó YFV en muestras de monos muertos, en 8 casos humanos (uno de ellos fatal) y en mosquitos del género *Sabethes*[64] [65].

El virus WNV tuvo una expansión en todo el continente Americano desde el año 1999, momento en el cual fue detectado por primera vez en los EE. UU [75]. En Argentina, en el año

2006 el virus se aisló a partir de tres caballos muertos con manifestaciones clínicas de encefalitis en las provincias de Entre Ríos y Buenos Aires. Este representó el primer aislamiento del virus WNV en América del Sur [38]. Inmediatamente después se registró la confirmación de laboratorio de casos humanos de encefalitis por virus WNV[65], sin embargo no ha producido hasta el momento un fuerte impacto en la salud pública nacional.

En 2016 se detectó por primera vez en el país el ZIKV, documentándose un brote por éste agente en la provincia de Tucumán y un caso autóctono de sexo sexual en la provincia de Córdoba. Durante el 2017 también se detectaron brotes en 3 provincias del país (Chaco, Salta y Formosa) y el primer caso de síndrome congénito asociado al ZIKV [40][39].

En nuestro laboratorio, hemos realizado estudios en los que obtuvimos evidencias serológicas de la circulación de los flavivirus ILHV y BSQV en diversas provincias argentinas (*Fabbri, comunicación personal*) sin que se hallan identificado casos clínicos asociados. Estos agentes podrían generar repercusión en los resultados de las técnicas de diagnóstico para los virus integrantes de esta familia y podría significar una fuente de variación en la implicancia de las infecciones secuenciales por diferentes flavivirus en la presentación clínica de la enfermedad.

Argentina presenta un escenario epidemiológico particular, con evidencias de circulación de una diversidad de flavivirus y en los últimos años ha habido un incremento en la circulación de los mismos, ya sea tanto por la expansión hacia regiones nuevas, así como también por la introducción de nuevos agentes.

4. Virus Dengue (DENV)

4.1. Estructura y composición del DENV.

La enfermedad dengue es producida por cuatro serotipos virales, designados como dengue 1 (DENV-1), dengue 2 (DENV-2), dengue 3 (DENV-3) y dengue 4 (DENV-4), todos constituyendo una especie viral, DENV (Tenth report of ICTV). Aunque existe una amplia reactividad cruzada entre los 4 serotipos virales, la infección por uno de ellos sólo genera una inmunidad protectora transitoria y por consiguiente, una persona puede llegar a padecer dengue 4 veces en su vida, una vez con cada serotipo[66] [67].

La partícula madura del virus del dengue es esférica con un diámetro de 50 nm que contiene múltiples copias de las tres proteínas estructurales, la membrana derivada del huésped y una sola copia del genoma de RNA de cadena sencilla y sentido positivo. El genoma del virus consta de 10.703 nucleótidos, los cuales se traducen para generar una poliproteína precursora la cual es co- y pos-traduccionalmente procesada por proteasas virales y celulares para producir las proteínas virales que son tres proteínas estructurales (cápside C, el precursor de membrana prM

que dará origen a la proteína M, la proteína de envoltura (E) y siete proteínas no estructurales (NS) [68].

La entrada del genoma del DENV en el citoplasma del huésped es un proceso de varios pasos que comienza con la fusión de la membrana viral con la membrana plasmática del huésped, seguida de la endocitosis del virus en una fusión endógena y entonces dependiente del pH del virus y de las membranas endosomales. El interior de la partícula del virus está formado por RNA en complejos con proteínas de la cápside rodeado por una membrana bicapa lipídica que contiene proteína M y proteína E ancladas externamente y que juntas organizan las interacciones huésped-viral durante la entrada. La proteína E está dispuesta en la superficie de los DENV como 90 monómeros compactos que se colocan planos contra la membrana y facilitan la entrada del virus en las células huésped al unirse a los receptores celulares y mediar en la fusión de las membranas viral y celular. De sus tres dominios (DI-DIII), el DIII de la proteína E es responsable de la unión a los receptores del huésped y se han identificado varias mutaciones en este dominio que afectan la unión del receptor. La bisagra que conecta DI a DII es muy flexible y se utiliza para maniobrar DII en el entorno de pH bajo del endosoma, lo que lleva a la exposición del bucle de fusión DII. Este bucle de fusión luego interactúa con la membrana endosomal para facilitar la fusión del virus con la membrana endosomal y la liberación de RNA viral en la célula huésped. Una vez liberadas de las células infectadas, las nuevas partículas de DENV pueden contener proteína M de superficie procesada y, por lo tanto, ser infecciosas o "maduras", o retener la forma precursora no escindida de la proteína M (prM) en su superficie y, por lo tanto, permanecer en un "forma inmadura". Algunas partículas virales pueden tener una mezcla de proteína M y proteína prM en su superficie y estas partículas pueden ser infecciosas o no [69].

Las proteínas no estructurales (NS) participan en la replicación y el empaquetamiento viral, procesos que están estrechamente relacionados con el retículo endoplásmico (RE) del huésped y la función de la vía secretora. NS1 es una glicoproteína de 46 kDa que existe en tres formas: la forma residente en RE; la forma anclada a la membrana; y la forma secretada. NS1 se sintetiza inicialmente como un monómero soluble y se asocia con la membrana después de la dimerización en la luz del RE. La estructura cristalina de NS1 se ha determinado recientemente y reveló dominios hidrófobos expuestos en el dímero que probablemente median esta asociación de membrana. La NS1 intracelular participa en la replicación temprana del RNA viral y se encuentra en compartimentos vesiculares inducidos por virus que albergan los complejos de replicación viral. La NS1 también se transporta a la superficie celular, donde permanece asociada con la membrana celular o se secreta (sNS1) como una especie hexamérica soluble asociada a lípidos. El sNS1 puede detectarse en la sangre de pacientes infectados desde el primer día de síntomas y circula a niveles en el rango de ng por ml a mg por ml durante la fase

aguda de la infección. Los niveles sanguíneos de sNS1 se correlacionan con el pico de viremia y gravedad de la enfermedad en la infección secundaria por DENV. Varios estudios han sugerido que sNS1 es un mediador clave de la patogénesis del dengue. Por ejemplo, el NS1 recombinante altamente purificado (rNS1) desprovisto de actividad de endotoxina bacteriana activa directamente los macrófagos de ratón y las células mononucleares de sangre periférica humana a través del receptor tipo Toll 4 (TLR4), lo que lleva a la inducción y liberación de citoquinas y quimiocinas pro- inflamatorias. Además, en modelos *in vitro* e *in vivo* de fuga vascular, la exposición a NS1 resultó en la alteración de la integridad de la monocapa de células endoteliales[69].

En la Tabla 1 se describen las características clave de las proteínas NS de DENV.

Tabla 1- Características y funciones de las proteínas no estructurales (NS) del DENV

Proteína	Tamaño (kDa)	Principales características	Principales funciones
NS1	46	Puede estar anclado al retículo endoplásmico, asociado a la membrana o secretado (sNS1)	La NS1 intracelular está involucrada en la replicación temprana del RNA viral. sNS1 activa el sistema inmunológico innato y tiene implicancia en la fuga vascular
NS2A	22	Proteína de membrana integral hidrofóbica	Participa en la replicación del RNA
NS2B	14	Proteína hidrofóbica pequeña	Co-factor para NS3
NS3	69	Proteína multifuncional con varios dominios catalíticos.	Participa en las funciones de nucleósido trifosfatasa y helicasa durante la síntesis de RNA
NS4A	16	Proteína de membrana integral hidrofóbica	Requerido para la formación de vesículas de replicación
NS4B	30	Proteína hidrofóbica pequeña	Suprime la señalización de IFN β e IFN γ
NS5	105	La proteína del virus del dengue más grande y mejor conservada	Participa en la síntesis de RNA, involucrada en el bloqueo del sistema IFN

4.2. Origen e historia natural

El origen de los DENV ha sido objeto de múltiples discusiones. Algunos autores pensaron originariamente en un origen africano, con una posterior distribución alrededor del mundo con el comercio de esclavos. Más recientemente, se ha postulado que estos virus se podrían haber originado en un ciclo selvático involucrando primates inferiores y mosquitos en la península Malaya. Independientemente de su origen geográfico, se considera que muy probablemente han evolucionado como virus de mosquitos antes de adaptarse a primates inferiores y al hombre. Biológicamente, los DENV están altamente adaptados a sus mosquitos vectores y se mantienen por transmisión vertical en especies de mosquitos responsables de

ciclos selváticos, con amplificación periódica en primates inferiores. Estos ciclos silvestres se han documentado en el sudoeste de Asia y África, e involucran a múltiples especies de primates inferiores y a tres subgéneros (*Stegomyia*, *Finlaya* y *Diceromyia*) de especies de mosquitos del género *Aedes*. Aunque estos ciclos todavía existen, su importancia para la salud pública es incierta[70]. En algún momento en el pasado, probablemente con la deforestación y el desarrollo de los asentamientos humanos, los virus se movieron de la selva hacia el medio rural. Las migraciones humanas y el comercio trasladaron los virus a los pueblos y ciudades, donde los virus son mantenidos en ciclos urbanos que involucran a los hombres y a los mosquitos.

Los DENV son transmitidos desde personas virémicas a susceptibles por varios mosquitos del género *Aedes* (Diptera: Culicidae, subgénero *Stegomyia*), siendo el principal vector *Aedes aegypti* [69][71] en entornos urbanos. Un mosquito *Aedes aegypti* puede infectarse al alimentarse de una persona en la fase virémica de la infección. Durante la fase extrínseca del ciclo, los DENV primero infectan las células del intestino medio del mosquito y otros tejidos antes de diseminarse a las glándulas salivales[72]. Un mosquito infectado puede luego transmitir el DENV a varios humanos mientras se alimenta o intenta alimentarse. En los mosquitos, la frecuencia de alimentación está determinada por la necesidad de ingerir sangre para completar su ciclo gonotrófico (tiempo durante el cual los ovarios maduran hasta convertirse en folículos desarrollados completamente[73]. En el caso de la hembra de *A. aegypti* este ciclo incluye por lo general una sola ingesta de sangre, aunque en algunos casos puede alimentarse varias veces dentro del mismo ciclo con el fin de aumentar la dispersión de su prole[74]. Una vez infectado una nueva persona susceptible, la aparición de los síntomas tarda un promedio de 4 a 7 días y que una persona sea capaz de transmitir el DENV a un nuevo mosquito (Figura 6). Tanto los individuos sintomáticos como los asintomáticos pueden transmitir el DENV a los mosquitos[75].

Ae. aegypti se introdujo en las Américas durante el comercio de esclavos en el siglo XVII y se extendió por todo el mundo a medida que se expandía la industria del transporte marítimo. Esta especie vive en íntima asociación con los humanos y se alimenta de ellos, descansa en sus hogares y pone sus huevos en recipientes de agua artificiales. El mosquito hembra promedio vive aproximadamente 1 semana, pero algunas hembras pueden vivir ≥ 2 semanas. Estas especies de mosquitos pican principalmente durante el día y se reproducen dentro y alrededor de las viviendas. Sin embargo, DENV también es transmisible por *Ae albopictus* que alcanza altas densidades en áreas suburbanas, rurales y selváticas / forestales en todas las regiones tropicales / subtropicales y cálidas templadas del mundo[23]

La enfermedad de dengue puede ocurrir de forma endémica o epidémica. El dengue epidémico ocurre más frecuentemente en sitios donde la mayoría de la población es susceptible y los brotes suelen ser explosivos. Las tasas de ataque pueden ser tan altas como del 80 a 90%.

La emergencia o re-emergencia global se ha asociado a diversos factores, tales como el incremento poblacional; la urbanización inadecuada y no planificada; el aumento de los viajes aéreos y las migraciones; el calentamiento global; el deterioro de los sistemas de Salud Pública y la carencia de estrategias eficaces para el control de *Aedes aegypti*, entre otros [76][21][22]

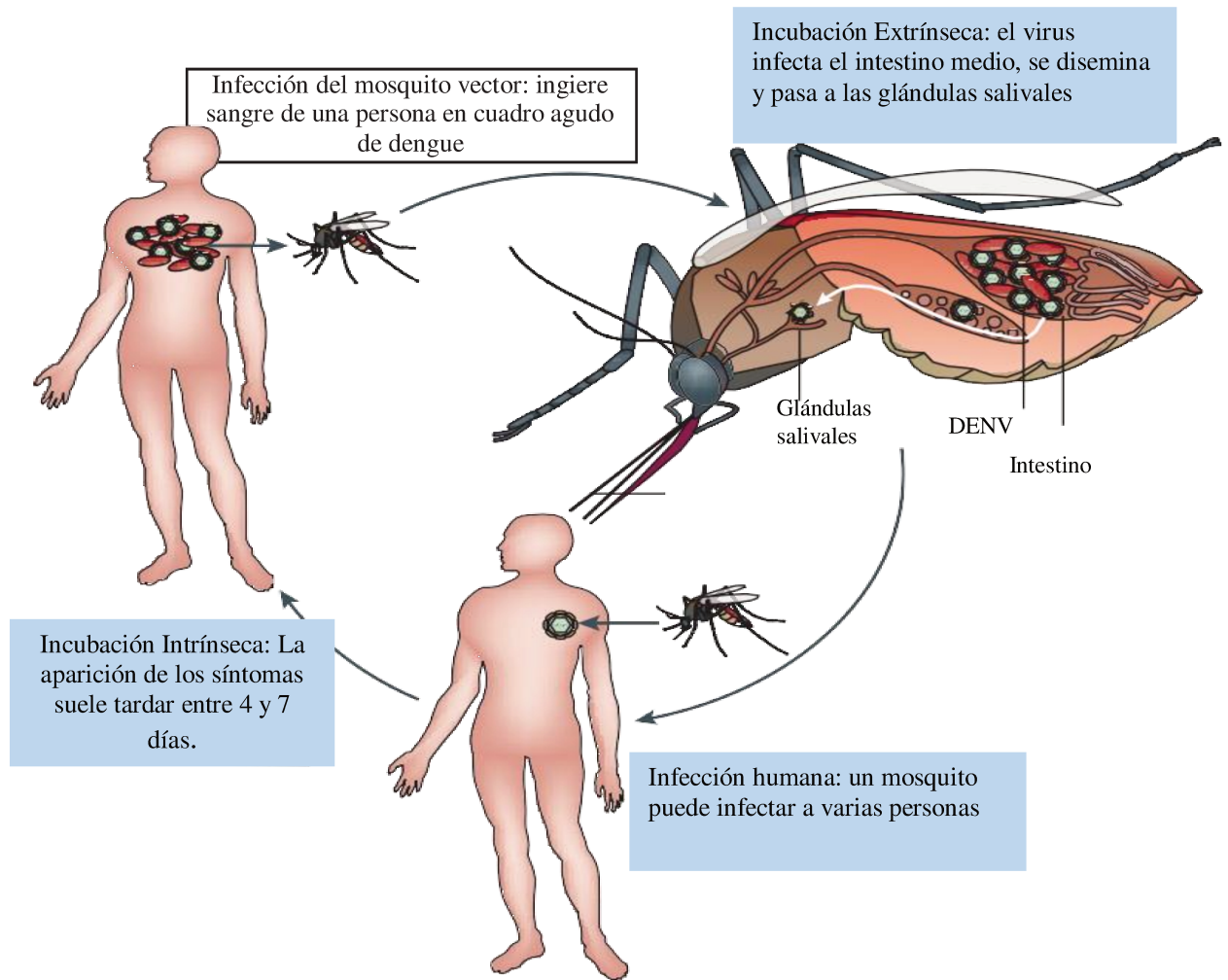


Figura 6. El ciclo urbano del virus del dengue en humanos y mosquitos (Figura modificada de Guzman y col, 2016)

4.3. Cuadro clínico del dengue.

Las manifestaciones clínicas de las infecciones por los DENV, son una representación de la compleja interacción virus-huésped. La mayoría de las infecciones por DENV son asintomáticas o se presentan solamente con síntomas febriles leves e inespecíficos, también puede presentarse como cuadros leves (antes llamados Síndrome de Fiebre por dengue o dengue

clásico) o desencadenar en cuadros graves (antes llamados Fiebre Hemorrágica del dengue y Síndrome de choque del dengue). Las manifestaciones clínicas de las infecciones graves incluyen manifestaciones hemorrágicas, permeabilidad vascular incrementada o síndrome de derrame capilar, y compromiso hepático. También se han notificado manifestaciones clínicas menos frecuentes, tales como miocarditis, falla hepática y afectación neurológica[77][78][79]. La evidencia disponible indica que las formas graves de la enfermedad se observan más frecuentemente con determinadas cepas virales o en infecciones secundarias[69][80]

Las manifestaciones de la enfermedad son complejas, pero su tratamiento es relativamente sencillo, poco costoso y muy eficaz para salvar vidas, siempre que se emprendan intervenciones correctas y oportunas. La clave es reconocer precozmente los signos de alarma en las diferentes fases de la enfermedad para así brindar la atención requerida y prevenir de esta manera la progresión a formas graves de la enfermedad. Los signos de alarma en dengue son: dolor abdominal intenso o dolor a la palpación, vómitos persistentes, acumulación clínica de líquidos, sangrado de mucosas, letargo o irritabilidad, hipotensión postural (lipotimia), hepatomegalia mayor de 2 centímetros y/o aumento progresivo del hematocrito. Ante la duda de diagnóstico clínico entre dengue, chikungunya o Zika, se recomienda que todo paciente (en particular los niños), sea manejado como caso de dengue y se realice un seguimiento diario para detectar signos de alarma de gravedad, especialmente durante la fase crítica de la enfermedad[79].

En la región de las Américas, el dengue representa uno de los principales motivos de consulta médica en las unidades de salud. Se trata de una enfermedad infecciosa sistémica y dinámica que puede cursar de forma asintomática o manifestarse con un espectro clínico amplio, que incluye manifestaciones graves y no graves [77]. Después del período de incubación (de 4 a 10 días), la enfermedad comienza abruptamente y pasa por tres fases: febril, crítica y de recuperación (Figura 7). Una buena atención primaria no solo reduce el número de hospitalizaciones innecesarias, sino que también salva la vida de los pacientes con dengue. La notificación temprana de los casos de dengue atendidos en los niveles primario y secundario es indispensable para detectar los brotes y dar inicio a una respuesta oportuna. Para ello, es importante realizar un diagnóstico diferencial correcto y en ese sentido es relevante el aporte del laboratorio de diagnóstico etiológico[77][81][82].

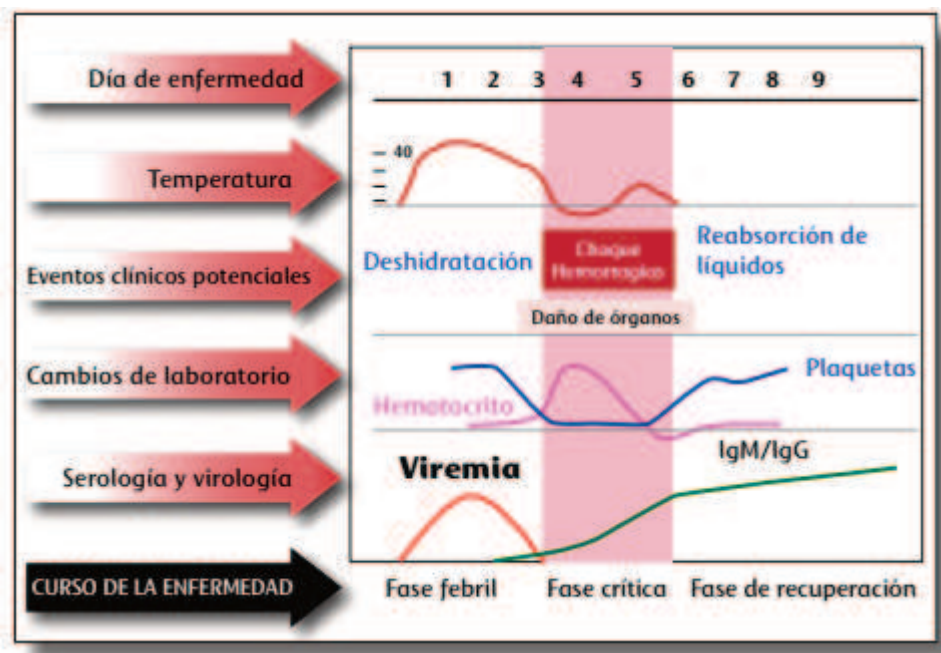


Figura 7. Curso de la enfermedad por DENV (figura modificada de Yip, 1980)

La atención médica de un paciente con un cuadro clínico sospechoso de dengue tiene implicancia para el individuo y también en el nivel comunitario porque puede evidenciar circulación viral y constituirse en una alerta temprana en la detección de un brote epidémico, orientando la implementación de acciones para la prevención y control. Por este motivo, el dengue es una enfermedad incluida en el listado de eventos de declaración/notificación obligatoria en Argentina (ENOs). La persona a cargo de notificar es el miembro del personal médico o de enfermería que atiende el caso al momento del diagnóstico clínico o en su defecto, el laboratorista que recibe un pedido de diagnóstico de dengue. La obligatoriedad de la notificación de los ENOs se establece a través de la Ley Nacional N° 15465. El sistema Nacional de Vigilancia de la Salud (SNVS 2.0) recopila la información sobre los ENOs para ponerla a disposición de quienes deben tomar decisiones de salud pública o tienen a su cargo las acciones de control vectorial en el caso de dengue. Con la notificación se inicia el proceso de vigilancia epidemiológica y se desencadenan las medidas de prevención y control. La detección oportuna y su informe son indispensables para mejorar la eficacia del sistema de alerta y respuesta. El profesional de salud deberá asumir el relleno correcto y oportuno de la ficha de notificación como una contribución esencial al control del dengue y considerarlo parte importante de su trabajo cotidiano. La vigilancia de dengue y otras arbovirosis se realiza de forma integrada, en el marco de la vigilancia de Síndrome Febril Agudo Inespecífico (SFAI), considerando como diagnósticos diferenciales a YFV, SLEV, WNV, ZIKV, CHIKV pero también patologías como hantaviriosis, leptospirosis, fiebre hemorrágica argentina y paludismo,

de acuerdo a la integración de los datos clínicos con el contexto epidemiológico del área y de los antecedentes epidemiológicos del caso.

El SNVS 2.0 integra las notificaciones de dengue realizadas por los médicos y por los laboratorios del nivel local, provincial y nacional, las direcciones de epidemiología, centros de zoonosis y programas de prevención y control a través del Sistema Integrado de Información Sanitaria Argentina (SISA). Esta red virtual se conforma a través de usuarios registrados habilitados en todo el país, tanto del subsector público como privado y de la seguridad social. El sistema permite la integración de la notificación así como el análisis sistemático rápido de la información disponible que es socializada periódicamente en los contenidos del Boletín Integrado de Vigilancia que ofrece el Ministerio de Salud de la Nación en su página web de acceso público.

4.4. Emergencia y dispersión del dengue en América.

Aunque los DENV lograron distribuirse por los trópicos en los siglos XVIII y XIX, durante los siglos XX y XXI, la globalización permitió su propagación más rápida y la introducción de múltiples serotipos virales en áreas permisivas, lo que provocó que la mayoría de las regiones tropicales se volvieran hiperendémicas (es decir, con múltiples serotipos virales co-circulando). Esta rápida propagación comenzó con una pandemia de dengue en el sudeste asiático en la década de 1950 que estuvo asociada con el crecimiento económico y urbano regional después de la Segunda Guerra Mundial. La actividad epidémica se aceleró dramáticamente en las décadas de 1970 y 1980, lo que condujo a una expansión geográfica global de virus y mosquitos vectores, y la consecuente transmisión generalizada de DENV a través de las áreas tropicales y subtropicales. Esta expansión geográfica resultó en una mayor frecuencia y magnitud de epidemias y una mayor frecuencia de enfermedad grave. Los principales impulsores de esta pandemia del siglo XX fueron las tendencias mundiales, como el crecimiento de la población humana, la urbanización, el transporte moderno, el comercio mundial y la ausencia de un control eficaz de los mosquitos en los países endémicos[69]

Según una estimación obtenida por modelización, se producen 390 millones de infecciones por el virus del dengue cada año (intervalo creíble del 95%: 284 a 528 millones), de los que 96 millones (67 a 136 millones) se manifiestan clínicamente (sin distinción del grado de gravedad) [82]. En otro estudio sobre la prevalencia del dengue se calcula que 3900 millones de personas corren riesgo de infección por los virus del dengue. Pese a que existe riesgo de infección en 129 países el 70% de la carga real se encuentra en Asia [83]. El número de casos de dengue notificados a la OMS se ha multiplicado por 8 en las dos últimas décadas, desde 505 430 casos en 2000 a más de 2,4 millones en 2010 y 4,2 millones en 2019. Las muertes notificadas entre el año 2000 y 2015 pasaron de 960 a 4032.

Este alarmante aumento en el número de casos se explica también, en parte, por el cambio en las prácticas en los países de registrar y notificar el dengue a los ministerios de salud y a la OMS. También representa el reconocimiento por parte de los gobiernos de la carga de morbilidad debida al dengue y, por tanto, la pertinencia de notificarla. Por tanto, pese a que la carga mundial total de la enfermedad es incierta, este aumento observado nos acerca a una estimación más precisa del alcance total de la carga.

Los primeros brotes identificados por dengue en las Américas corresponden a la región del Caribe en los años ´60. En 1963 se registró un brote iniciado en Jamaica por serotipo DENV-3. En ese mismo país en 1969, se registró un nuevo brote por DENV-2. Desde ese año el dengue se ha mantenido endémico en la América tropical. En los 70 se registraron brotes en Colombia y Puerto Rico, y en 1977 se identificó por primera vez DENV-1, nuevamente en un brote iniciado en Jamaica. Por último, el DENV-4 se introdujo en los años ´80 en la región americana, Desde entonces el dengue ha incrementado constantemente su impacto en la región y particularmente en las dos últimas décadas, la región ha evidenciado sus condiciones ampliamente favorables para la introducción y propagación de infecciones virales transmitidas por artrópodos, no sólo con el DENV, sino también con el ingreso de CHIKV y ZIKV. El número de casos reportados desde el año 2000 aumentó de una manera sin precedentes, con la circulación de los cuatro serotipos. A partir de este año se han notificado a la OPS/OMS 19,6 millones de casos de dengue, en los que se incluyen más de 800.000 casos graves de dengue y más de 10.000 muertes. Solo entre 2015 y 2016 se reportaron más de 4,8 millones de casos de dengue, de los cuales 17.000 resultaron en casos graves y 2.000 en muertes por dengue. A pesar de la disminución en 23% de la tasa de letalidad de dengue en los últimos seis años (de 0,069% a 0,053%), el riesgo de padecer dengue grave y de que la enfermedad evolucione hasta la muerte sigue planteando un serio problema de salud pública en las Américas.

Entre la semana epidemiológica (SE) 1 y la SE 52 de 2019 en la Región de las Américas se notificaron 3.139.335 casos de dengue (incidencia de 321,58 casos por 100.000 habitantes), incluidas 1.538 defunciones. Del total de casos notificados, 1.367.353 (43,6%) fueron confirmados por criterio de laboratorio y 28.169 (0,9%) fueron clasificados como dengue grave. La tasa de letalidad fue 0,049%. Con relación a la proporción de casos de dengue grave, la cifra (0,9%) ha superado a lo observado en los cuatro años previos, sin embargo, se mantiene por debajo de lo observado entre 2010 y 2014 (variando entre 1,35% y 3,05%)[84].

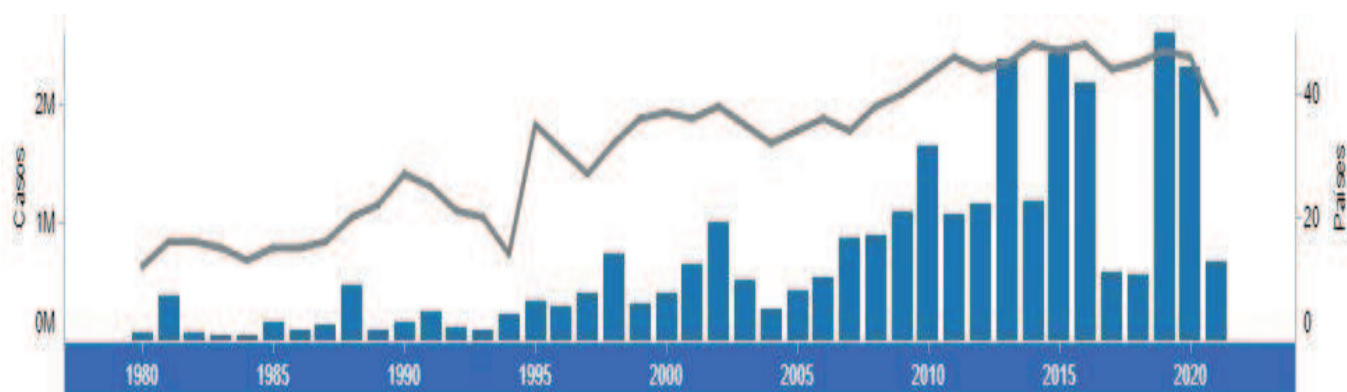


Figura 8. Número de casos de dengue en las Américas, 1980 –2021 (figura modificada de PLISA, OPS/OMS. Datos ingresados a la Plataforma de Información de Salud para las Américas por los Ministerios e Institutos de Salud de los países y territorios de la Región, último acceso el 24/06/2021, <https://www3.paho.org/data/index.php/es/temas/indicadores-dengue.html>)

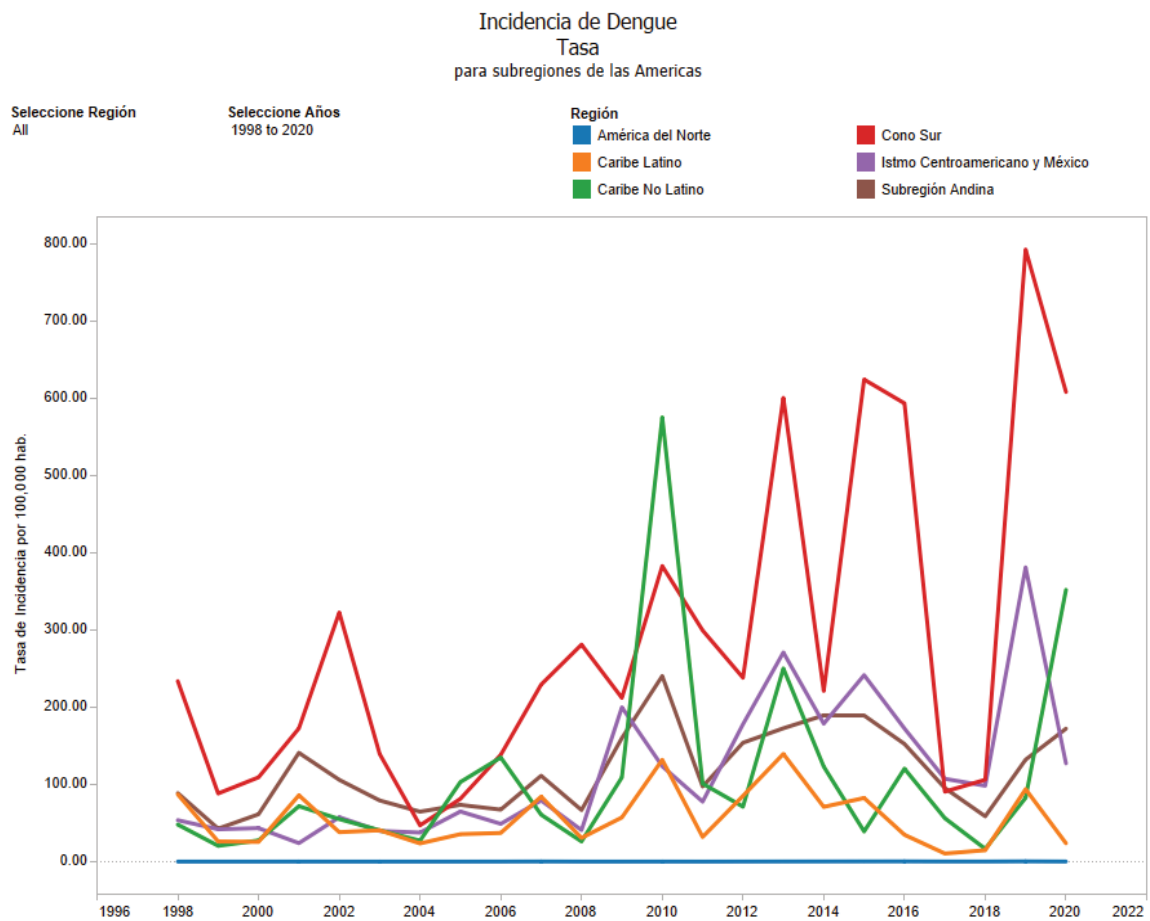
Al comparar el comportamiento de las tasas de incidencia acumulada por subregiones, entre el año 2019 (a la SE 52) y el periodo epidémico anterior (2015-2016, a la SE 52), se observa que, con la excepción de la subregión Andina, en el resto de las subregiones las tasas de incidencia superaron al ciclo epidémico previo (Figura 8). El número de casos reportados hasta la semana 52 de 2019 (3.139.335), fue el mayor registrado en la historia de dengue en las Américas hasta el momento, superando en 30% al número de casos reportados en el año epidémico 2015. Durante el 2019, 34 países y territorios de la Región de las Américas reportaron un incremento de casos a nivel nacional o en algunas áreas del país en comparación con el 2018. Países como Belice, Costa Rica, El Salvador, México, Nicaragua reportaron tres veces más casos que en el año previo. Otros países y territorios como Antigua y Barbuda, Brasil, Guadalupe, Guatemala, Honduras, Jamaica, Martinica y República Dominicana reportaron entre siete a diez veces más casos de dengue[84].

Durante 2020, entre la SE 1 y la SE 47 se notificaron 2.163.354 casos de dengue (incidencia de 221,6 casos por 100.000 habitantes), incluidas 872 defunciones en la Región de las Américas. De esos casos, 963.787 (45%) fueron confirmados por criterio de laboratorio y 5.197(0,2%) fueron clasificados como dengue grave. La tasa de letalidad fue de 0,04% resultando un valor más bajo que los registrados en los últimos 10 años, a pesar de ser un año epidemiológicamente complejo para el dengue por la simultánea transmisión pandémica de la enfermedad por coronavirus (COVID-19)[85].

Entre la SE 1 y la SE 47 de 2020 en el Cono Sur (Argentina, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay), se notificaron 1.661.700 casos de dengue (incidencia de 589,8 casos por 100.000 hab.), incluidas 591 defunciones y la tasa de letalidad fue igual a la de la región. Esta subregión

registró un aumento sostenido del número de casos notificados de dengue entre la SE 1 y la SE 11, que cayó a casi la mitad de los casos semanales notificados desde la SE 12, coincidiendo con el inicio de la pandemia de COVID-19 y las medidas de restricción a la movilidad aplicadas por los países como contención a la pandemia. Desde la SE 17 se registró una disminución sostenida en el número de notificaciones en esta subregión. Aún con el brote registrado en el primer trimestre de 2020, el número de casos acumulados de dengue y la tasa de incidencia acumulada a la SE 47, no alcanza las cifras epidémicas registradas en el 2019 en esta subregión (figura 9)

En el primer semestre de 2021 se han notificado 675.057 casos, con 823 casos de dengue grave y 157 casos fatales en la región de las Américas (datos accesibles en PLISA al 24/06/2021) al mismo tiempo que los casos de COVID 19 han continuado en ascenso en la región.



Fuente: Plataforma de Información en Salud de las Américas (PLISA). Datos reportados por los Ministerios e Institutos de Salud de los países y territorios de la Región.

Figura 9. Tendencia de las tasas de incidencia por subregiones en las Américas, 1998-2021 (Figura modificada de PLISA, OPS/OMS. Disponible en: <https://www3.paho.org/data/index.php/es/temas/indicadores-dengue/dengue-regional/507-reg-dengue-incidence-es.html>, ultimo acceso el 24 de Junio de 2021)

Los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) están presentes en la Región de las Américas, variando los serotipos circulantes en los distintos países y años. En 2020, se detectó la circulación simultánea de todos ellos en Brasil, Colombia y México; mientras que, en Guatemala, Guadalupe, Guayana Francesa, San Martín circulan los serotipos DENV 1, DENV-2 y DENV-3; y en Argentina y Paraguay, los serotipos DENV-1, DENV-2 y DENV-4. En 2021 en el primer semestre se ha reportado circulación de un único serotipo (DENV-1 o DENV-2) en Panamá y algunas islas del Caribe; DENV-1 y DENV-2 en Bolivia, Brasil, Ecuador, Perú, Costa Rica; DENV-1, DENV-2 y DENV-3 en Colombia, Guyana Francesa y Saint Martin; DENV-1, DENV-2 y DENV-4 en Paraguay y Argentina, mientras que los cuatro serotipos fueron detectados en Guatemala y México.

4.5. Situación del dengue en la Argentina

En nuestro país se reportaron casos clínicos de dengue a principios del siglo XX (1905, 1911, 1916) en las provincias de Chaco, Corrientes, Formosa y Misiones. En 1916, ocurrió una epidemia que afectó a la provincia de Entre Ríos, en la que se reportaron 15.000 casos de dengue. No se informó ningún caso de dengue grave. En 1926, hay referencias de una probable epidemia en el Norte del país, con un reporte de un caso en Rosario. Desde entonces, no se notificaron casos autóctonos hasta 1997. En 1997, se detectó por primera vez la reemergencia del DENV-2 en la provincia de Salta, después de 81 años sin notificación[59][86]. A partir de 1998, se han producido brotes todos los años menos 2001 y 2005 (tabla 2) y en general, asociados con epidemias en países limítrofes [60][87][88][89][90].

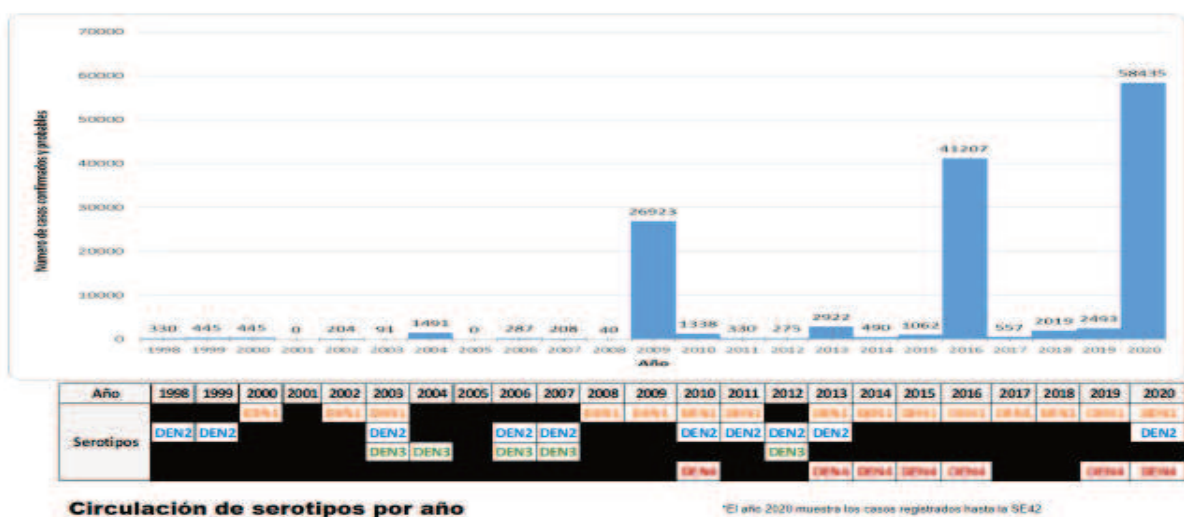


Figura 10. Casos de dengue determinados por laboratorio (confirmados + probables) en Argentina, 1998- 2020 (figura modificada de de Giovachinni y col, 2018)

Tabla 2. Serotipos de DENV circulantes en Argentina desde la reemergencia viral en 1997

AÑO	SEROTIPO	Provincia
1997-1998	DENV-2	Salta
2000-2001	DENV-1	Misiones, Formosa y Jujuy
2002	DENV-1	Salta
2003	DENV-1, DENV-2, DENV-3	Salta y Jujuy
2004	DENV-3	Salta, Jujuy y Formosa
2006	DENV-2, DENV-3	Salta, Misiones
2007	DENV-2, DENV-3	Misiones, Corrientes, Salta
2008	DENV-1	Salta
2009	DENV-1	NOA, NEA, CENTRO: 14 prov.
2010	DENV-1, DENV-2, DENV-4	Salta, Misiones, Chaco, Santiago del Estero, Santa Fé
2011	DENV-1, DENV-2	Santa Fé, Misiones, Chaco, Salta
2012	DENV-2, DENV-3	Salta (DENV-2), CABA (DENV-3)
2013	DENV-1, DENV-2, DENV-4	Salta,CABA, Capital Federal, Córdoba, Chaco, Misiones, Formosa, Catamarca
2014	DENV-1, DENV-4	DENV-4 (Salta), DENV-1 (Córdoba, CABA y Bs. As.)
2015	DENV-1, DENV-4	DENV-4 (Córdoba), DENV-1 (CABA y Bs. As.)
2016	DENV-1, DENV-4	15 jurisdicciones (NOA, NEA; Centro con Córdoba, BA, CABA, Santa Fé) con DENV-1, DENV-4 (Buenos Aires, Salta y Santa Fe)
2017	DENV-1	Buenos Aires, Chaco, Corrientes, Formosa y Santa Fé.
2018	DENV-1	Córdoba, Chaco, Entre Ríos, Formosa, Misiones, Corrientes, Bs. As, CABA y Santiago del Estero
2019	DENV-1, DENV-4	DENV-1 (Buenos Aires, Chaco, Formosa, Jujuy, Misiones, Salta y Santa Fe y CABA) , DENV-4 (CABA, Jujuy, Misiones)
2020	DENV-1, DENV-2, DENV-4	18 provincias: NOA, NEA, Centro (BA; Córdoba, Santa Fé y CABA) y Cuyo (San Juan, Mendoza y San Luis) mayoritario DENV-1 y menor proporción DENV-2 y DENV-4
2021	DENV-1, DENV-2, DENV-4	DENV-1 (Salta, La Rioja, Jujuy, Formosa y Misiones), DENV-2 (CABA, Corrientes, Cordoba) y DENV-4 (Formosa)

En la actualidad, un total de 18 jurisdicciones tuvieron circulación autóctona en algún momento y se han identificado los cuatro serotipos del DENV en diferentes epidemias, con una distribución espacial y temporal heterogénea en el territorio afectado. Los brotes de mayor magnitud ocurrieron en 2009, 2016 y 2020, todos con la particularidad de predominio del serotipo DENV-1 (figura 10). La casuística de dengue en la Argentina ha estado caracterizada por brotes epidémicos que habitualmente muestran un corte de transmisión en los meses del invierno, período inter-epidémico que suele extenderse desde mayo/ junio a octubre/noviembre, en el que prácticamente no se notifican casos sospechosos[91]. Se ha observado repetidamente que los primeros meses del año son los que agrupan la mayor notificación y confirmación de circulación autóctona viral, por tal motivo, en nuestro país, el análisis de la información para la caracterización epidemiológica de dengue y otros arbovirus se realiza por “temporada”, entendiendo por tal un período de 52 semanas desde la SE 31 a la 30 del año siguiente, para considerar en conjunto los meses epidémicos. Podemos observar en la figura 11, el patrón epidemiológico predominante, con brotes epidémicos que tienen un corte de transmisión entre los meses de mayo-junio y la ocurrencia de aparición de nuevos casos en general asociados a reintroducciones virales a expensas de viajeros y los países vecinos.

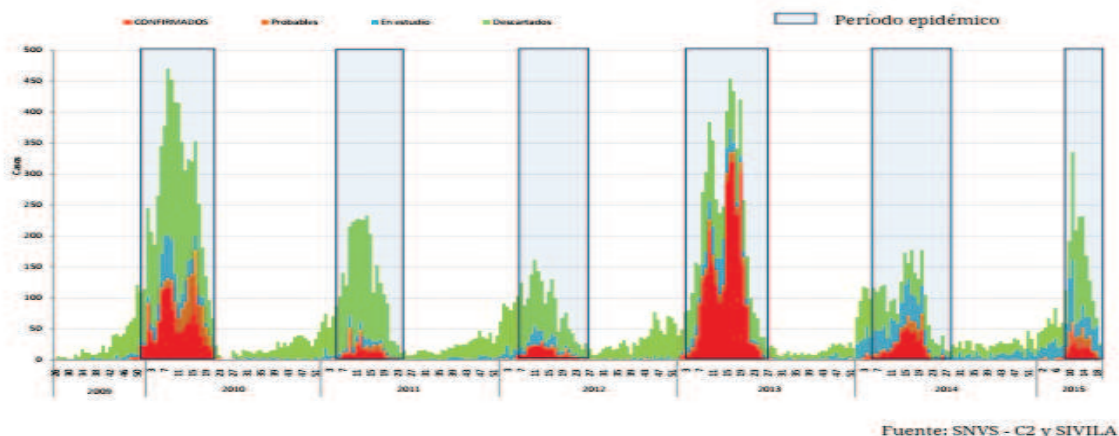


Figura 11. Distribución temporal de casos de dengue notificados al SNVS por SE según su clasificación en 2009, 2010, 2011, 2013, 2014 y 2015. Argentina (figura modificada del Boletín Integrado de Vigilancia N°260- SE 1-2015, Dirección Nacional de Epidemiología, MSN)

En 2020, desde la SE1 a la SE 30, se registraron 59.375 casos confirmados y probables de dengue constituyendo el brote de mayor magnitud de la historia del país y el de mayor extensión geográfica y temporal en relación con años anteriores (figura 12). A nivel país, hasta la SE 25, el mayor aporte de los casos se dio por las regiones de NOA y CENTRO, con 22.000

y 21.000 casos de dengue autóctonos. La región Cuyo por primera vez notifica casos autóctonos: 145 casos hasta la SE25[92], disponible en: <https://bancos.salud.gob.ar/recurso/boletin-integrado-devigilancia-n527-se51-25012021>

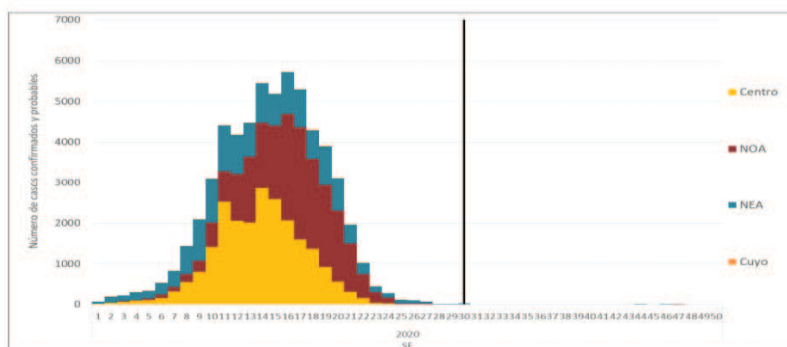


Figura 12. Número de casos confirmados y probables en Argentina para las regiones Centro, NOA, NEA y Cuyo, SE1 a SE50, 2020. (figura modificada del Boletín Integrado de Vigilancia, Edición Semanal, N° 527, SE 51, Año 2020. Disponible en: <https://bancos.salud.gob.ar/recurso/boletin-integrado-devigilancia-n527-se51-25012021>, último acceso 30-08-21)

Entre la SE 31/2020 a SE 17/2021, 23 provincias notificaron casos con sospecha de dengue. La mayor parte de las notificaciones proviene de las regiones NOA y Centro, en tanto, la mayor parte de confirmados se concentra en la región NOA. En total, se han registrado 1790 casos confirmados de dengue, 16 de los cuales tienen antecedentes de viaje entre provincias, y siete casos son importados de otros países.

Argentina se presenta como un escenario altamente favorable para la aparición de formas graves de dengue y/o epidemias de dengue leve en grandes centros urbanos. El dengue a nivel mundial predomina en las zonas tropicales y se conoce en menor profundidad sobre su comportamiento en áreas de clima subtropical o templado. Es interesante el escenario que se plantea en Argentina ya que desde 2009 han comenzado a presentarse brotes de dengue de magnitud creciente en provincias de la región templada. Para lograr el control y la prevención de esta patología con vacunas u otras herramientas, resulta de fundamental importancia conocer la epidemiología de los brotes humanos con todas sus variantes regionales y locales, así como el alcance y las limitaciones de las metodologías de diagnóstico en nuestro medio, de modo de optimizar la vigilancia laboratorial en la detección temprana de circulación viral en las distintas regiones de Argentina.

5. El diagnóstico etiológico de las infecciones por DENV.

Los sistemas de vigilancia de dengue tienen que tener la capacidad de reconocer la circulación temprana de estos virus y/ o diferenciarlo de otros flavivirus o agentes etiológicos

que provocan cuadros clínicos similares y que también pudieran o no tener potencial epidémico, a fin de establecer correctas y oportunas medidas de prevención y control. Por otro lado, un diagnóstico de certeza puede impactar en el manejo del paciente, estudios de patogenia y es relevante en toda investigación académica, así como para el desarrollo de antivirales, vacunas y ensayos clínicos[93].

Para el diagnóstico de las infecciones por DENV se pueden emplear técnicas de diagnóstico directas (diagnóstico virológico) que tratarán de revelar la presencia del agente viral en las muestras o técnicas indirectas (diagnóstico serológico) que intentarán poner de manifiesto la respuesta inmune del huésped (Figura 13)

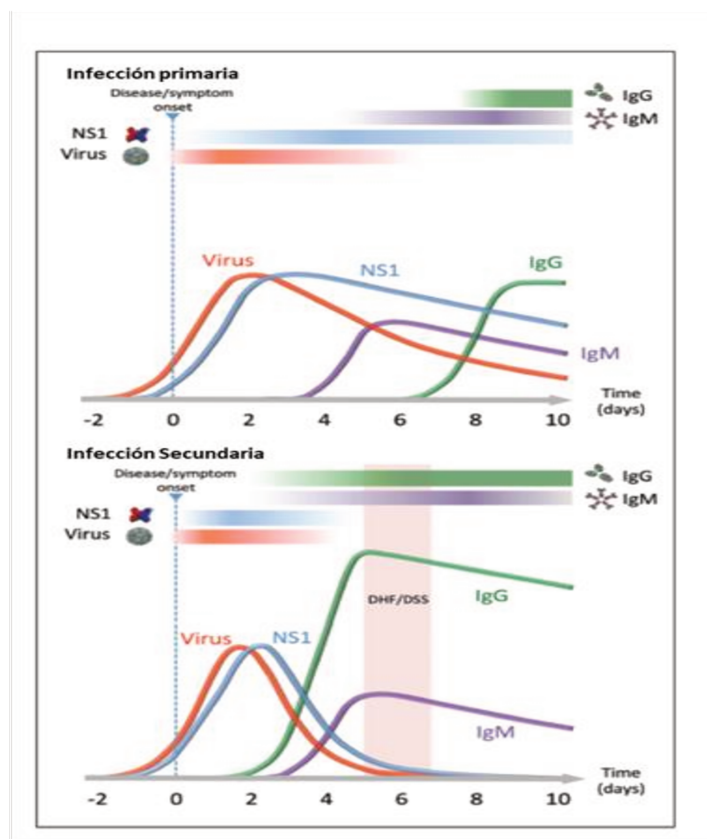


Figura 13. Línea de tiempo para la aparición de biomarcadores de infecciones por dengue: virus, antígeno NS1 y anticuerpos IgM e IgG en el curso de una infección primaria (a) y de una infección secundaria (b). (figura modificada de Muller y col, 2017)

La infección primaria por dengue afecta al individuo sin exposición previa a ningún flavivirus. La infección secundaria se da principalmente en aquellos individuos previamente infectados por alguno de los restantes serotipos, pero también en individuos inmunes a otro flavivirus [78]. La viremia (presencia de virus en sangre), en general, coincide en el tiempo con la aparición de los síntomas; no es detectable en el momento de la caída de la fiebre. La

detección de los anticuerpos IgM a dengue coincide en el tiempo con la desaparición de la viremia y de la fiebre. La infección primaria se caracteriza por niveles detectables de anticuerpos IgM al quinto o sexto día del comienzo de la fiebre; los niveles más altos se encuentran entre los días 14 a 15 y pueden permanecer elevados hasta 30 a 60 días después, y reducirse gradualmente con el tiempo. Los anticuerpos IgG a dengue se elevan después del octavo a noveno día de la fiebre y son detectables de por vida[94][95][96]. En la infección secundaria, se observan niveles muy elevados de anticuerpos IgG a dengue desde los primeros 2 a 3 días de la fiebre. Los niveles de anticuerpos IgM pueden ser menos elevados en infecciones secundarias y a veces no son detectables [97].

5.1. Métodos Directos

Los métodos directos para el diagnóstico del dengue intentarán evidenciar la presencia del virus viable (aislamiento viral), la presencia de genoma viral (métodos moleculares de RT-PCR o q RT- PCR) o la detección de antígenos virales (NS1) y su mayor aplicación se dará en muestras de los primeros días de evolución del cuadro clínico de acuerdo a la cinética de la viremia y de aparición de la respuesta inmune en infecciones por DENV [98][99][100]. En la mayoría de las personas la viremia se extiende por 4-5 días, pero puede durar hasta 12 días[101]. Usualmente, cuando han transcurrido 5 o más días en el curso de la infección el diagnóstico serológico es el adecuado. La viremia puede persistir más tiempo en pacientes con una infección primaria que secundaria, posiblemente debido a una respuesta inmune más gradual.

El aislamiento viral se considera la “prueba de oro” para el diagnóstico de dengue, puesto que, de ser positivo, constituye una prueba específica e inequívoca de la presencia y viabilidad del virus. Uno de los sistemas biológicos más empleados en el aislamiento de DENV ha sido el ratón lactante inoculado por vía intracerebral. También se han utilizado diferentes sistemas celulares de mamíferos entre los que se encuentran las líneas BSC1, VERO, BHK-21 y LLCMK2. La disponibilidad de líneas celulares derivadas de mosquitos (AP-61, C6\36, TRA-284 y C6\36 HT) ha proporcionado una opción más sensible y práctica que las anteriores. Las muestras de suero tomadas de pacientes infectados que experimentan enfermedad febril hasta 5 días después de la aparición de la enfermedad producen los resultados más exitosos. Sin embargo, el aislamiento del virus de pacientes con infección secundaria se hace más difícil por la rápida producción anamnésica de anticuerpos de reacción cruzada y que forman complejos inmunes subneutralizantes con el virus circulante [102][103]. La inoculación intratorácica de mosquitos y la inoculación de larvas de mosquitos son los métodos más sensibles para el aislamiento de este agente, aunque no muy aplicadas por su laboriosidad, requerimiento de infraestructura para insectario y de colonias de mosquitos [103]. Clásicamente, la

inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales ha sido utilizada para identificar los aislamientos virales [104] y más recientemente, también se utiliza la detección específica de genoma viral en los sobrenadantes de los cultivos celulares.

Las pruebas de detección genómica han sido perfeccionadas y actualmente constituyen una herramienta de particular utilidad para la confirmación del diagnóstico de dengue, tanto en la modalidad convencional como en tiempo real[105]. Algunas pruebas moleculares diseñadas para amplificar regiones conservadas entre los serotipos de DENV no permiten diferenciarlos. Si el diseño se basó en las regiones variables entre serotipos, pueden detectar cualquiera de los cuatro serotipos del virus en una reacción relativamente sencilla. Aunque la determinación del serotipo no tiene aplicación médica inmediata hasta el momento, sí tiene importancia epidemiológica, por lo que los laboratorios de salud pública prefieren las pruebas que indican el serotipo.

Para la realización de las metodologías moleculares, el RNA viral se extrae utilizando columnas de sílica (suero, orina y sobrenadante de cultivos celulares) o técnica de TRIZOL (para los tejidos). En los '90 se desarrollaron y se expandieron los métodos de RT-PCR convencionales o de punto final aplicados a la detección de DENV[106]–[108]. En comparación con el aislamiento del virus, la sensibilidad de la detección de genoma viral por RT-PCR varía del 80% al 100% dependiendo de la región del genoma a la que se dirigen los cebadores, el enfoque utilizado para amplificar o detectar los productos de PCR (por ejemplo, RT-PCR de un paso versus RT-PCR de dos pasos), y el método empleado para la subtipificación (por ejemplo, PCR anidada, hibridación de transferencia con sondas de DNA específicas, PCR basada en polimorfismo de fragmentos de restricción, análisis de secuencia, etc). Para evitar resultados falsos positivos debido a una amplificación no específica, es importante apuntar a las regiones del genoma que son específicos del dengue y no se conservan entre flavi- u otros virus relacionados[81]. Actualmente se cuenta con metodologías que amplifican distintas regiones del genoma viral, por ejemplo, un fragmento del gen de la envoltura (E) o un fragmento del gen que codifica para la proteína no estructural NS5. La disponibilidad más reciente de metodologías moleculares con sistema de detección en tiempo real (qRT-PCR) [109]–[112] utilizando sondas de hidrólisis o SYBR Green permitió optimizar los ensayos moleculares con menor manipulación del operador y mayor eficiencia al procesar un mayor número de muestras en menor tiempo con respecto a la técnica convencional (RT-PCR). Una desventaja de la qRT-PCR en relación a la convencional es que puede perderse algo de sensibilidad cuando se usa un formato *multiplex* y no se cuenta con la posibilidad de recuperar y secuenciar el fragmento amplificado.

La Administración de Alimentos y Drogas (FDA) de los Estados Unidos aprobó una prueba qRT-PCR (CDC DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 Real-Time RT-PCR Assay)

que permite detectar en un ensayo los cuatro serotipos del dengue en suero y plasma (con citrato de sodio) obtenidos en los primeros cinco días de la enfermedad que ha sido propuesta como referencia para la región de las Américas. Esa prueba detecta una proporción elevada de casos (más de 90% de los casos con confirmación serológica) y puede realizarse en dos modalidades (singleplex y multiplex), con igual sensibilidad y alta especificidad para los cuatro serotipos del virus[110]. Aunque los métodos moleculares son rápidos y precisos, requieren un laboratorio con equipo especializado, infraestructura para evitar contaminaciones con amplicones y personal capacitado para realizar el análisis y en consecuencia, no siempre son una opción en entornos remotos de escasos recursos donde el dengue es endémico o epidémico.

La detección de la proteína viral NS1 es un objetivo de diagnóstico ideal porque es secretada por las células infectadas, se encuentra en altos niveles circulantes en la sangre de individuos infectados, y se puede detectar a partir de el inicio de los síntomas hasta 9 días o más después del inicio de la enfermedad, al menos en las infecciones primarias. NS1 se puede detectar al mismo tiempo que el RNA viral y antes de la aparición de los anticuerpos IgM en infecciones primarias. La detección de NS1 en muestras de suero utilizando un método ELISA de captura de antígeno fue descrita por primera vez en el año 2000 [113] y luego se desarrollaron formatos comerciales diversos. El desarrollo comercial de la detección de antígeno NS1 como herramienta de diagnóstico ha revolucionado el diagnóstico del dengue ya que ha proporcionado ensayos simples y de baja tecnología con alta sensibilidad y especificidad. Una limitación de la detección de NS1 para los pacientes que experimentan una infección secundaria es el rápido aumento anamnésico de anticuerpos anti NS1 de reacción cruzada durante la fase aguda de la enfermedad [114][115][116].

5.2. Métodos indirectos

Entre las infecciones virales que pueden ser diagnosticados por serología, las infecciones por flavivirus resultan complejas por varias razones. Como se ha mencionado, los pacientes pueden tener infecciones múltiples y/o secuenciales diferenciándose respuestas de anticuerpos tipo primaria o secundaria, con diferentes relaciones IgM / IgG y distinto grado de reactividad cruzada con antígenos homólogos y heterólogos.

Los métodos serológicos han sido ampliamente empleados en el diagnóstico corriente del dengue particularmente cuando la muestra se obtiene luego de tres o cuatro días de síntomas o se trata de muestras subsiguientes a aquellas con resultados negativos en las técnicas directas descritas anteriormente, pero su utilidad ha ido limitándose en la medida que se fue reconociendo la circulación de otros flavivirus y se han incrementado las infecciones de tipo secundario. En general se recomienda el análisis de los anticuerpos IgM a dengue en muestras obtenidas del quinto al sexto día del inicio de la enfermedad o después[97]. Esos métodos sirven

para hacer un tamizado de la infección o indicar que ha habido una infección reciente. Aunque varios estudios han sugerido la utilidad de detectar anticuerpos IgA e IgE del dengue, la detección de anticuerpos IgM es el marcador de infección reciente más frecuentemente utilizado[97][117] [118]. La prueba de ELISA (MAC-ELISA) para la detección de anticuerpos IgM es sencilla y rápida. Requiere de solo una muestra de suero y se utiliza ampliamente en el diagnóstico y la vigilancia serológica del dengue.

La presencia de anticuerpos IgG en el suero puede ser indicativa de infección pasada. Sin embargo, la presencia de altos títulos de anticuerpos IgG en una muestra de suero o la seroconversión o incremento de cuatro o más veces del título de anticuerpos en un suero pareado obtenido de un caso clínicamente sospechoso de dengue indica infección reciente o infección confirmada, respectivamente. Ese criterio podría ser de suma utilidad en los casos de infecciones secundarias que no muestran niveles detectables de anticuerpos IgM[119][120][121]. En las infecciones secundarias la cinética de los anticuerpos IgM es más variable. En general, los anticuerpos IgM aparecen más tardíamente y generalmente precedidos por la aparición de anticuerpos IgG [119]. Los niveles de anticuerpos IgM en más del 50 % de las infecciones declinan hasta ser indetectables dentro de los 30 días según datos de la literatura clásica. En una minoridad de pacientes con infecciones secundarias puede suceder, inclusive, que no se detecte niveles de anticuerpos IgM[97]. Estudios realizados en infecciones por otros flavivirus (YFV y WNV) demuestran que con esos agentes, pueden detectarse niveles de anticuerpos IgM más allá del año de la infección o vacunación[122], [123] . En nuestro país, resultados obtenidos en nuestro laboratorio mostraron la persistencia de anticuerpos IgM de dengue por más de 500 días en un 30% de casos confirmados por laboratorio de la provincia de Salta y Jujuy estudiados durante el 2005.

La presencia de determinantes comunes a los flavivirus dentro de la glicoproteína E viral, genera el alto grado de reactividad cruzada que existe en la mayoría de las técnicas serológicas de diagnóstico. La técnica de neutralización por reducción en el número de placas (PRNT) es una prueba biológica sostenida en gran medida por anticuerpos de tipo IgG y ha sido la metodología serológica más específica entre los serotipos dengue y los flavivirus si bien existe cierto grado de reactividad cruzada que obliga al estudio de confirmación con el empleo de paneles virales[124]. En infecciones primarias experimentales en primates no humanos y en humanos se ha planteado que los anticuerpos neutralizantes son específicos de serotipo y que la especificidad se incrementa en el tiempo. Si bien en las infecciones secundarias o secuenciales entre flavivirus en general se detectan respuestas heterotípicas con mayor cruce serológico que en las infecciones primarias, se plantea que en el tiempo se incrementa la especificidad hacia él o los virus infectantes[125][126].

El ingreso en América de diversos flavivirus con amplia circulación, como por ejemplo el WNV en 1999, la entrada del ZIKV en 2015 y los brotes periódicos de reemergencia de YFV silvestre con el consecuente incremento de la vacunación, son algunos de los datos que muestran las dificultades que actualmente enfrenta el diagnóstico serológico de las infecciones por dengue en la región. Por otro lado, en nuestro país se suma SLEV, ILHV y BSQV que determinan la posibilidad de una variedad mayor de infecciones secuenciales o secundarias y consecuentemente la aparición de distintos patrones de respuesta serológica[33][127][128]. No obstante, dado que el dengue no ha alcanzado niveles de endemidad o hiperendemicidad en Argentina como ha ocurrido en muchos de los países de América, aquellos pacientes que se presentan a la consulta con 4 o más días de evolución, son evaluados por métodos serológicos

El panorama presentado plantea la necesidad de que los laboratoristas que trabajan en el diagnóstico de dengue conozcan los alcances y limitaciones de cada una de las técnicas que se emplean, a fin de realizar una correcta interpretación de los resultados obtenidos. El escenario epidemiológico de Argentina puede contribuir a la caracterización de los distintos patrones de respuesta inmune y favorecer el desarrollo del conocimiento y la utilización de los métodos serológicos para el diagnóstico de las infecciones por dengue y otros flavivirus. La ocurrencia de brotes por SLEV en diversas provincias de nuestro país y el reconocimiento del síndrome congénito por ZIKV ha marcado la importancia de utilizar eficazmente los datos de la serología, ya que son eventos que se presentan con viremia de bajo nivel, corta duración y en forma como en el caso de la microcefalia por ZIKV, detectarse temporalmente alejada del momento de la infección viral.

De acuerdo con el enfoque propuesto en el 2001 para abordar la situación del dengue y ante el incremento sostenido de los casos en la Región, en el 2003 la OPS/OMS aprobó en el año 2003 la resolución CD44.R91, en la que se adoptó un nuevo modelo para la prevención y el control del dengue llamado “estrategia de gestión integrada para la prevención y el control del dengue” (EGI-dengue). La estrategia incluyó cinco componentes básicos para la prevención y el control de la enfermedad: atención al paciente, vigilancia epidemiológica, procedimientos de laboratorio, control integrado de vectores y comunicación social, donde se remarca la necesidad de vinculación y complementariedad de los resultados virológicos en la estrategia. Posteriormente, en el 2007 se aprobó la resolución CSP27.R152, con la que se instaba a los Estados Miembros a fortalecer los mecanismos de implementación y evaluación del EGI-dengue. Sin embargo, debido al avance y la reciente introducción de nuevas enfermedades arbovirales en los países y territorios de las Américas, fue necesario convertir la EGI-Dengue en una herramienta útil con la cual abordar de manera integral otras arbovirosis. En este sentido, la OPS/OMS, en junio de 2016, durante la 158° Sesión del Comité Ejecutivo, se aprobó la

resolución de la Estrategia para la prevención y el control de las enfermedades arbovirales, conocida como la EGI-Arbovirus. Esta resolución insta a los Estados Miembros a fortalecer sus sistemas de vigilancia epidemiológica y entomológica, fortalecer sus capacidades diagnósticas para la detección de arbovirus y elaborar una estrategia dirigida al control integrado de las arbovirosis, tomando en cuenta los componentes claves de la EGI-Dengue.

Desde 1995, en Argentina el componente laboratorio se estructura sobre el accionar de un Centro Nacional de Referencia (INEVH) y una red nacional de laboratorios para el diagnóstico de dengue y otros arbovirus distribuidos en las áreas de mayor riesgo epidemiológico del país. Las provincias efectúan los primeros estudios y posibilitan la rápida implementación de medidas de control ante la aparición de casos compatibles con dengue u otros arbovirus. La red utiliza reactivos que se gestionan y controlan en forma centralizada en INEVH y posee un algoritmo de diagnóstico uniforme. En INEVH realiza la confirmación diagnóstica, corroboración de resultados emitidos en los laboratorios integrantes de la red, lleva adelante los estudios de caracterización viral, produce reactivos biológicos estratégicos y conduce el control de calidad externo en el diagnóstico de dengue.

El conjunto de los distintos factores (humanos, virales, climáticos, vectoriales, sociales, etc) que pueden generar variaciones en la dinámica de los brotes de dengue, determinan que no puedan generalizarse y aplicarse los conocimientos de las experiencias previas o de otros países a todos los lugares, ya que cada situación puede ser única y particular. La circulación en la Argentina de otros flavivirus es un factor adicional que determina la necesidad de un amplio conocimiento sobre particularidades del desempeño de los métodos diagnóstico para dengue en el país y la gama de respuestas inmunes que pueden presentarse en la población. Este conocimiento aportará a la comprensión de la expresión clínica de la infección, dará herramientas para interpretar correctamente la respuesta serológica frente a futuras inmunizaciones con vacunas para dengue, así como de los resultados diagnósticos.

OBJETIVO GENERAL:

Generar conocimientos relativos a las herramientas diagnósticas para la detección de infecciones por DENV en la Argentina y caracterizar determinantes genéticos y de transmisión viral con impacto sobre la vigilancia laboratorial de las infecciones humanas y otros huéspedes potenciales, de modo de fortalecer las estrategias de control y prevención de la enfermedad desde la perspectiva del laboratorio virológico.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Evaluar el desempeño de la detección del antígeno NS1 por un método comercial de ELISA como una alternativa a la detección genómica para el estudio de muestras agudas en el diagnóstico del dengue en la Argentina.
- Evaluar la aplicación de la detección de anticuerpos IgM DENV como una herramienta de tamizado para la detección de circulación viral activa en el país.
- Contribuir al conocimiento de las características genotípicas y filogenia viral de cepas de DENV- 1, 2, 3 y 4 asociadas a la ocurrencia de brotes epidémicos en el país.
- Investigar la presencia de RNA de DENV, en bolsas de sangre de donantes sanos procedentes de Salta y Córdoba, dos áreas geográficas de Argentina con riesgo de circulación viral pero diferentes antecedentes epidemiológicos, para generar información sobre la implicancia en nuestro país de las transfusiones sanguíneas como mecanismo de transmisión del dengue y monitorear potencial circulación viral silenciosa en períodos inter-epidémicos.
- Monitorear la actividad del DENV y otros flavivirus en primates no humanos en dos provincias del noreste de Argentina

CAPÍTULO 1

EVALUACIÓN DE DESEMPEÑO DE LA DETECCIÓN DE ANTÍGENOS NS1 DENV POR UN MÉTODO DE ENZIMO-INMUNOENSAYO (ELISA) COMERCIAL COMO UNA ALTERNATIVA AL DIAGNÓSTICO MOLECULAR EN ARGENTINA.

1. INTRODUCCIÓN

En laboratorios de baja complejidad, la detección de antígenos surge como una herramienta accesible para la respuesta diagnóstica en muestras tempranas en la infección por DENV. Diversos estudios evidenciaron a la proteína NS1 como un antígeno marcador de la replicación viral factible de ser detectado en suero y plasma en la etapa aguda de la enfermedad [114]. Desde el 2000 comenzaron a estandarizarse métodos para detectar este antígeno y evaluar su utilidad diagnóstica[129]–[132], así como su aplicación como marcador de progresión de enfermedad grave[133][134]. No obstante, la falta de disponibilidad de los anticuerpos monoclonales específicos que usa el método, determinó que no se difundiera la implementación de métodos “in house” en los laboratorios nacionales de referencia en la región.

Inicialmente hubo una oferta reducida de este reactivo en el mercado, con lo cual la información inicial sobre el desempeño de estos métodos era auspiciosa pero con evaluaciones acotadas a regiones endémicas o regiones geográficas con otro contexto epidemiológico [135]–[137]. Dos trabajos publicados en 2008, realizados por centros de excelencia en la región americana, arrojaron datos sobre el desempeño de los primeros reactivos comerciales disponibles. CDC Fort Collins evaluó dos reactivos comerciales de ELISA para NS1: la prueba Platelia dengue NS1Ag (Bio-Rad Laboratories, Marnes La Coquette, Francia) y la prueba de ELISA Pan-E dengue (Panbio Diagnostics, Brisbane, Australia) frente a un panel bien caracterizado de 208 sueros positivos para RT-PCR en tiempo real y aislamiento de virus, así como 45 sueros RT-PCR en tiempo real y serológicamente negativos de pacientes con otras enfermedades agudas febriles. La sensibilidad (Se) detectada fue del 64,9% para la prueba de Panbio y 83,2% para la prueba Bio-Rad, con variación entre serotipos, especialmente para serotipo 4 de DENV[115]. En otro trabajo realizado sobre 222 muestras agudas de pacientes procedentes de Guyana Francesa, se informó una Se de 87,4% para el Elisa Platelia dengue NS1 Ag, y una Se del 81,5% para un test rápido inmunocromatográfico (Dengue NS1 Ag STRIP) y 100 % de especificidad (Sp) para ambos, mientras que para el reactivo Pan-E dengue (Panbio) se determinó una Se de 60,4% y Sp del 97,9% con el mismo panel [138]. En la actualidad se dispone en el mercado de mayor diversidad de estuches comerciales en formato de ELISA y tiras inmunocromatográficas para la detección de este antígeno viral [139].

Debe aclararse que los resultados negativos por métodos directos no excluyen la infección por dengue y para ello se requiere la aplicación de pruebas serológicas en muestras obtenidas con más de 5 días de evolución post- inicio de los síntomas (dpi). Se ha planteado la utilidad de complementar la detección de antígenos NS1 y/o detección de genoma con la evaluación de los anticuerpos IgM, mostrando en algunos estudios que la determinación de ambos parámetros en una sola muestra permite arribar al diagnóstico de un mayor número de casos[117][140][141]. En ese sentido, el dosaje del antígeno NS1 podría resultar ventajoso respecto a la detección genómica, dada su posibilidad de ser detectable en un mayor intervalo de tiempo[142], habiendo sido comunicados incluso, resultados positivos hasta 18 días desde el inicio de los síntomas al emplear un sistema específico para serotipo [132]

A partir de la semana epidemiológica (SE) 53 del año 2008 hasta la SE 21 de 2009 se notificaron 26.923 casos de dengue autóctono en el país. El brote de dengue a nivel nacional se inició en el departamento de Orán, en Salta, donde los primeros casos autóctonos se observaron durante la SE 53 de 2008 y se extendió hasta la SE 21. La extensión del brote abarcó 14 jurisdicciones del país, siendo para 10 de ellas, el primer episodio de brote de dengue autóctono registrado. Las regiones NOA, Centro y NEA vieron afectadas a todas las jurisdicciones que las componen, mientras que en Cuyo, sólo La Rioja presentó casos autóctonos. La región Sur sólo notificó casos importados, tanto de países limítrofes como de otras provincias de Argentina. La capacidad de procesamiento de los laboratorios de la red nacional de dengue y arbovirus en 2009 estaba fundamentalmente dada por la detección de anticuerpos IgM en muestras a partir de los 5 días de evolución (28 laboratorios) a partir de un método de ELISA IgM comercial (UMELISA) (figura 14 a) y sólo 4 laboratorios (Hospital Gutierrez en CABA, CEMAR en Santa Fé, Laboratorio de Alta Complejidad en Formosa y el Laboratorio Central en la provincia de Córdoba) contaban con la metodología de RT-PCR convencional para detección de genoma de los cuatro serotipos de dengue. En la figura 13a puede observarse la distribución de muestras agudas (< 5 dpi) que fueron analizadas en cada uno de estos laboratorios durante 2009 (figura 14. b).

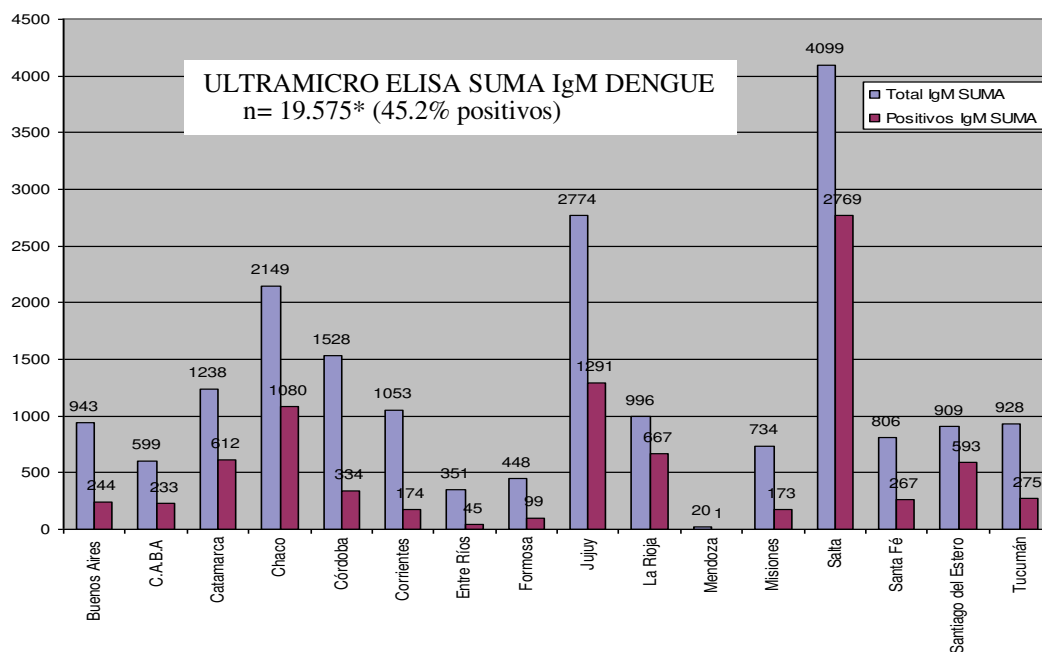
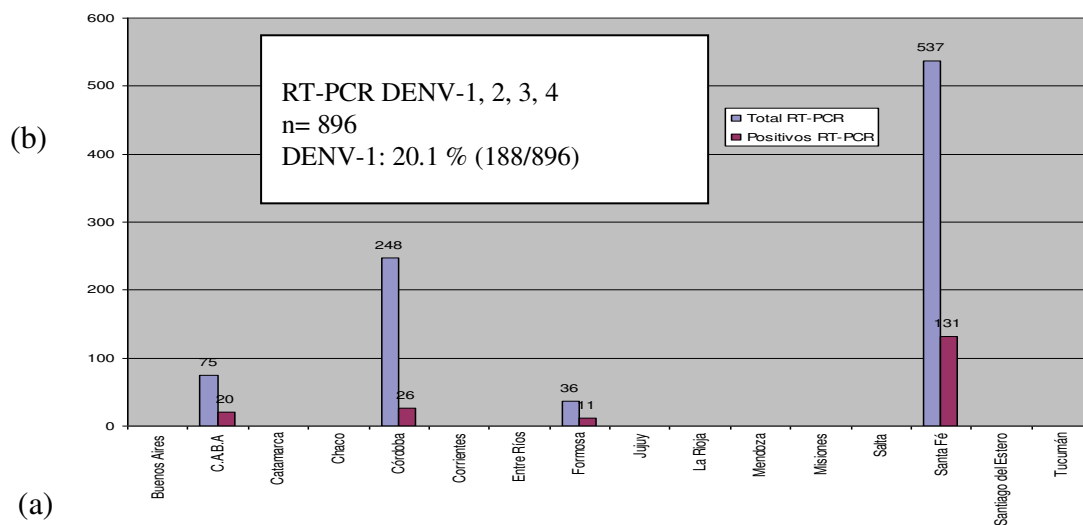
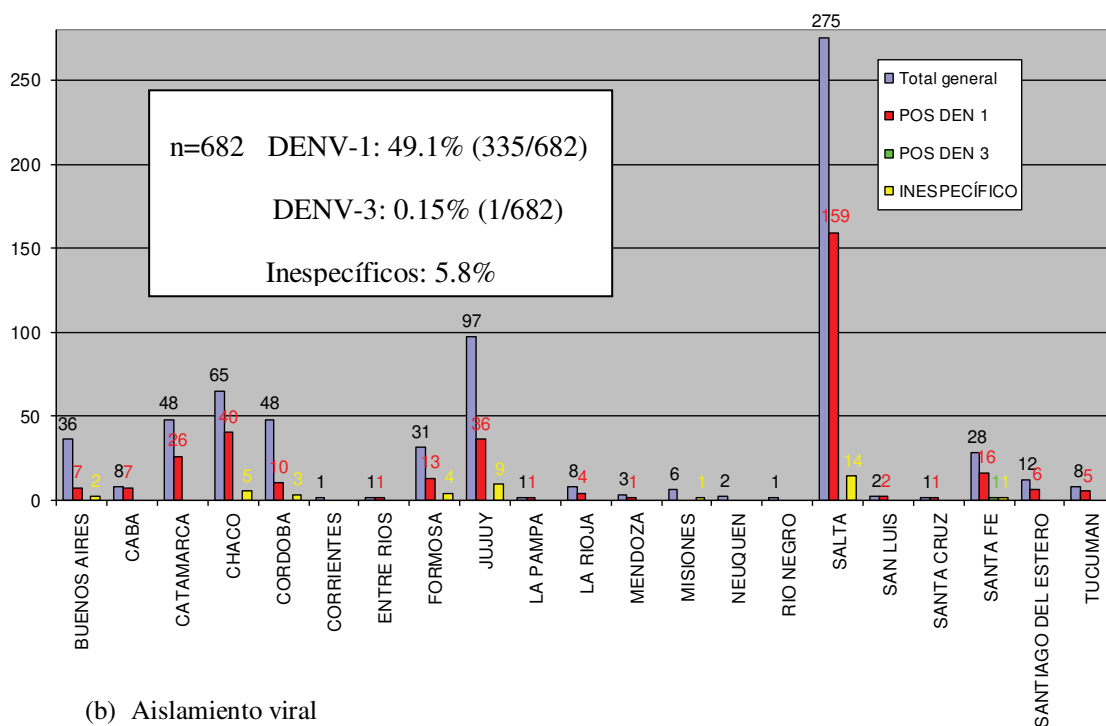


Figura 14. Distribución de las muestras analizadas en laboratorios provinciales durante el período enero-agosto de 2009 (a) por RT-PCR DENV 1, 2, 3, 4 (b) por ELISA IgM comercial (UMELISA). *Datos relevados en 27/28 laboratorios activos de la red nacional de dengue y otros arbovirus

En 2009, en INEVH se estudiaron 682 muestras por *n*RT-PCR DENV 1-4 procedentes de las provincias sin capacidad de procesarlas, a la vez que se controlaron los resultados emitidos en los 4 sitios mencionados (Figura 15a). El serotipo 1 de DENV fue el único detectado en los 335 pacientes positivos con sospecha clínica y pudo detectarse el serotipo 3 únicamente a partir de un paciente con antecedente de viaje al exterior del país. Se realizó intento de aislamiento viral en 326 muestras agudas, con 41,4% de positividad (Figura 15 b)

(a) RT-PCR DENV 1-4



(b) Aislamiento viral

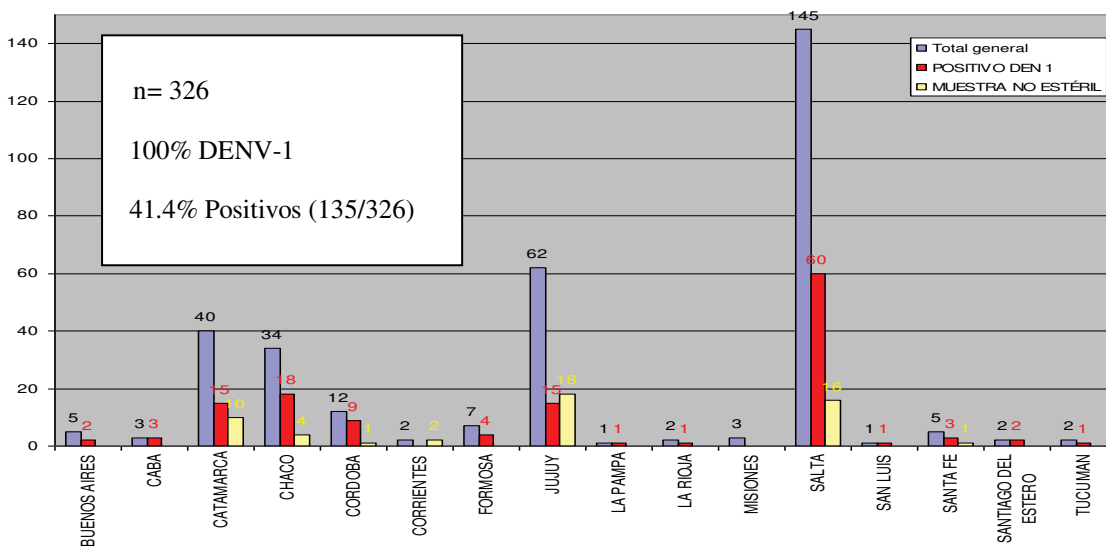


Figura 15. Distribución de las muestras analizadas por RT-PCR (a) y Aislamiento viral en C6736 (b) en INEVH por provincia de procedencia y serotipo durante el período enero-agosto de 2009.

La diseminación geográfica de la casuística de dengue y el aumento de la incidencia en las diferentes provincias determinó la necesidad de explorar la incorporación de una alternativa diagnóstica que permitiera descentralizar el procesamiento de las muestras agudas de menos de 5 dpi a un mayor número de laboratorios en Argentina.

2.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el desempeño de la detección del antígeno NS1 por un método comercial de ELISA como una alternativa a la detección genómica para el estudio de muestras agudas en el diagnóstico del dengue en la Argentina.

2.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos e índice Kappa de una metodología de ELISA NS1 comercial con un panel retrospectivo de muestras de referencia con diagnóstico confirmado de dengue mediante aislamiento viral y *n*RT-PCR 1-4.
- Evaluar prospectivamente el desempeño en terreno de la metodología al aplicarla en muestras de no más de 5 dpi en diferentes provincias y brotes por dengue en comparación con la detección por *n*RT-PCR DENV 1- 4 en el período 2010-2013.
- Monitorear la especificidad de la detección de NS1 dengue en infecciones por otros flavivirus con circulación en Argentina.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivo comercial para detección del antígeno NS1 DENV: se evaluó el reactivo Platelia dengue NS1 Ag test: Laboratorios Bio-Rad, Marnes LaCoquette, Francia. En 2009, este reactivo era el único disponible en el país con registro ANMAT. En la Tabla 3 se presenta un resumen de las principales características del ensayo. El ensayo no determina serotipo ni diferencia entre infecciones primarias y secundarias.

Tabla 3. Características del ensayo comercial empleado para la detección del antígeno NS1-

Productor	Nombre del reactivo	Número de Catálogo	Analito	Se/ Sp (informada por el fabricante)	Tipo de muestra	Vol de muestra (dilución)
Bio- Rad	Platelia NS1 Antigen Assay	72830	antígeno NS1	91/100	Suero/ plasma	50 ul (1:2)

Según la información brindada por el fabricante, Platelia dengue Ag NS1 Ag es un inmunoensayo enzimático en microplaca de formato sándwich de un solo paso para la detección cualitativa o semicuantitativa del antígeno NS1 del virus del dengue en suero o plasma.

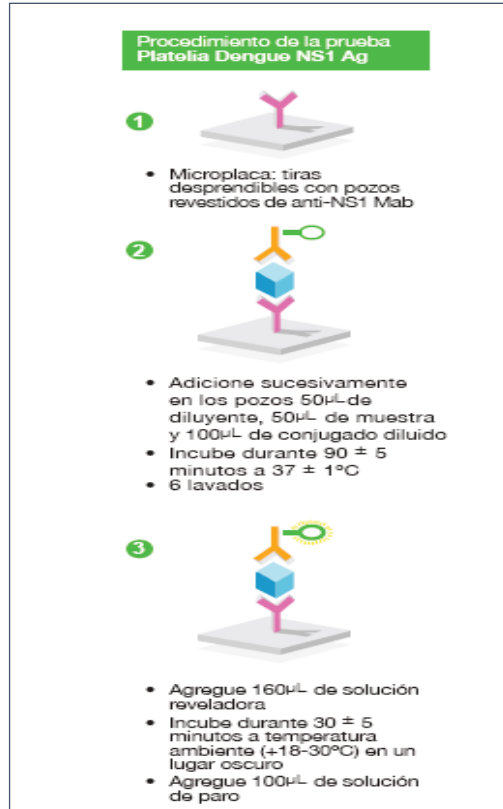


Figura 16. Esquema de los pasos en la detección de antígeno NS1 DENV (Bio- Rad Laboratories)

La prueba usa anticuerpos monoclonales murinos (MAb) para captura y revelado. Las muestras y los controles se incuban directa y simultáneamente con el conjugado durante 90 minutos a 37 ° C dentro de los pocillos de la microplaca sensibilizados con los MAb. Si el antígeno NS1 está presente en la muestra se formará un inmunocomplejo MAb - NS1 - MAb / peroxidasa (Figura 16). Después de un paso de lavado, la presencia de inmunocomplejos se demuestra mediante la distribución en cada pocillo de una solución cromogénica que inicia una reacción de desarrollo de color. Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, la reacción enzimática se detiene mediante la adición de una solución ácida. La lectura de densidad óptica obtenida con un espectrofotómetro ajustado a 450/620 nm es proporcional a la cantidad de antígeno NS1 presente en la muestra. La presencia del antígeno NS1 en una muestra individual se determina comparando el valor de densidad óptica de la muestra en relación a la densidad óptica del calibrador.

En cada placa se debe sembrar un control negativo (identificado como R3 por el fabricante), un control positivo (R5) y un calibrador (R4) en duplicado, todos suministrados por el estuche comercial. Para el cálculo del valor de corte: se obtiene el valor de corte (CO) a partir del valor promedio de las DO de los duplicados del calibrador R4. Para validar la corrida se deben cumplir los siguientes parámetros:

- ✓ CO (Valor promedio de las lecturas de R4): Válido si $CO > 0,2$
- ✓ Relación R3 (DO R3 / CO):..... Relación $R3 < 0,4$
- ✓ Relación R5 (DO R5 / CO):..... Relación $R5 > 1,5$

Para cada muestra (S) estudiada se calcula Relación S (DO S/CO). Interpretación:

- ✓ Relación S $< 0,5$ negativo
- ✓ $0,5 \leq$ Relación S < 1 equívoco
- ✓ Relación S > 1.0 positivo

Todas las pruebas las realizamos inicialmente en el Laboratorio de Arbovirus de INEVH, (Pergamino) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Luego de la evaluación inicial, los profesionales de los laboratorios integrantes de la red nacional fueron capacitados, se gestionaron compras centralizadas para proveer a la red, los lotes provistos pasaron controles de calidad en INEVH previo a su utilización y evaluación conjunta de su desempeño en terreno. A finales de 2009, se implementó el test de ELISA para el Ag NS1 en 35 laboratorios provinciales.

3.2. Evaluación inicial en el INEVH con panel retrospectivo de muestras de referencia

3.2. a. Panel de muestras de referencia: para la evaluación inicial realizada en INEVH se procesó un panel de 105 muestras de sueros anonimizados conservadas a -70°C en la seroteca institucional. Las muestras positivas (52/105, 49,5%) correspondieron a pacientes con diferentes días de evolución (0-4 días,) con resultados confirmados por aislamiento viral en células C6/36 [100] y *n*RT-PCR [107] para los serotipos DENV-1 (25, 48%) , DENV-2 (4; 7,7%) y DENV-3 (23; 44,2 %) correspondientes a casos detectados en diferentes provincias argentinas en el período 2003-2009. Se seleccionaron muestras positivas por las dos metodologías de modo de incluir el patrón de oro y los resultados de la metodología para la que NS1 se propone como una alternativa.

El panel de negativos estuvo integrado por 53 muestras negativas en *n*RT-PCR DEN 1, 2, 3, 4 correspondientes a pacientes con diagnóstico descartado de dengue (5 muestras agudas con *n*RT- PCR o Aislamiento viral e IgM DEN Negativo en 2° muestra , 1 aislamiento viral DENV negativo y PRNT₉₀ YFV positivo, 10 muestras de individuos IgM/PRNT₉₀ DENV 1, 2, 3, 4 negativos de una encuesta en población sana), muestras de pacientes con infecciones por dengue en el pasado (3 sueros de personas sanas IgM negativos / PRNT₉₀ DENV-1 positivos) y

muestras de casos confirmados de otras etiologías virales que producen síndrome febril y que integran el diagnóstico diferencial de dengue (suero de 10 casos confirmados de Fiebre Hemorrágica Argentina (FHA), sueros de 10 pacientes confirmados Hantavirus (HTNV), 7 muestras de vacunados contra el YFV con 5 días post-vacunación, 4 sueros de pacientes con infección aguda por YFV selvática detectados en 2008 en el país y 2 pacientes con infección aguda por SLEV.

3.2.b. Metodologías de referencia para la confirmación del diagnóstico de dengue:

3.2.b.1. Aislamiento viral en línea celular C6/36: La línea celular C6/36 [143] es un clon obtenido de la línea *Aedes albopictus* de Singh (1967), que presenta una alta sensibilidad a los DENV y CHIKV. Algunas cepas de DENV son capaces de producir efecto citopatogénico (ECP) de tipo sincitial en las C6/36 pero este fenómeno no es característico de la línea. Los cultivos se mantuvieron durante un período máximo de 14 días, con monitoreo diario al microscopio para detectar la aparición de ECP para proceder a su cosecha. La identificación viral se realizó por IFI con aplicación de anticuerpos monoclonales para la identificación de los distintos serotipos (ANEXO 1).

3.2.b.2. Extracción de RNA viral: el RNA viral se extrajo de las muestras utilizando el kit QIAamp Viral RNA Mini (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante y se almacenó a -70°C .

3.2.b.3 Reacción en cadena de la polimerasa anidada con transcriptasa inversa del dengue (*nRT-PCR*): se siguió la metodología descrita previamente por Lanciotti y cols, 1992 [107].

3.2.b.4. Detección de IgM DENV: realizada en los laboratorios provinciales mediante el reactivo comercial UMELISA DENV de acuerdo a las instrucciones del fabricante o en INEVH por el método “in house” descrito previamente por Kuno [144]. El protocolo fue estandarizado (ANEXO 4) con el empleo de un mix de antígenos de los cuatro serotipos de DENV producidos en INEVH por el método sacarosa-acetona (ANEXO 3)

3.3. Evaluación de sensibilidad y especificidad, índice de concordancia Kappa (K) y valores predictivos positivo y negativo para la detección de antígeno NS1 dengue: la Se se calculó como la proporción de muestras correctamente identificado positiva (P) en relación al número total de muestras en el panel que fueron positivos por cultivo de tejidos y/o RT-PCR en tiempo real (Verdadero Positivo- VP) $[\text{Se} = \text{P}/\text{VP} \cdot 100]$. Del mismo modo, la especificidad (Sp) se calculó como la proporción de muestras correctamente identificadas como negativas (N) en relación al total de muestras negativas en el panel (Verdadero Negativo- VN) $[\text{Sp} = \text{N}/\text{VN} \cdot 100]$. Se empleó el índice Kappa (K) para determinar la concordancia entre los resultados obtenidos por las metodologías comparadas, considerando excelente concordancia para valores de

$K > 0,8$; buena concordancia con valores de K entre 0,61- 0,80; moderada concordancia 0,60-0,41 y baja concordancia con K menor 0,4. Se calcularon en cada caso los intervalos de confianza del 95% (IC95) mediante el software estadístico MED-CALC (free trial. <http://www.medcal.com>).

El valor predictivo positivo fue definido para cada prueba como la relación entre los resultados positivos verdaderos (VP) y la suma de VP con resultados falsos positivos (FP) [VPP % = $VP / (VP + FP) \cdot 100$]. El valor predictivo negativo fue definido como la relación entre los resultados negativos verdaderos (VN) y la suma de los resultados VN y los resultados negativos falsos (FN) [VPN % = $VN / (VN + FN) \cdot 100$].

3.4. Evaluación prospectiva en terreno del desempeño del reactivo comercial Ag NS1 en diversas provincias de Argentina: Se introdujo NS1 en el algoritmo de trabajo de la red nacional de laboratorios para el procesamiento de muestras hasta 5 días de evolución, considerando un resultado positivo como caso probable de infección por dengue y requiriendo estudios de serotipo en un porcentaje de los mismos de acuerdo a los datos epidemiológicos. En el algoritmo de diagnóstico, un resultado negativo de ELISA Ag NS1 no descarta el resultado, requiriendo corroboración por RT-PCR cuando estuviera disponible localmente (o su derivación a INEVH) y/ o el estudio de una segunda muestra para investigar inicialmente la presencia de anticuerpos IgM. En el marco de trabajo de la red nacional de laboratorios, se realizó un trabajo conjunto para evaluar el desempeño en terreno de la metodología comercial para detectar el antígeno NS1 procesando en paralelo por nRT—PCR DENV-1, 2, 3, 4 [107] en los laboratorios provinciales que participaron del estudio. Cuando se obtuvieron resultados discordantes, se realizó el intento de aislamiento viral en células C6/36 en los casos con volumen de muestra disponible y/o se investigó la presencia de anticuerpos IgM en la misma muestra o en una muestra con más días de evolución cada vez que fuera factible corroborar o descartar esa discordancia entre las técnicas comparadas.

3.4.a) Evaluación 2010: Se estudiaron 376 muestras en paralelo correspondientes a casos notificados en las provincias de Buenos Aires, Santiago del Estero, Córdoba, Salta, Misiones, Santa Fé, Chaco, y Jujuy cuya distribución según procedencia se muestra en la figura 17.

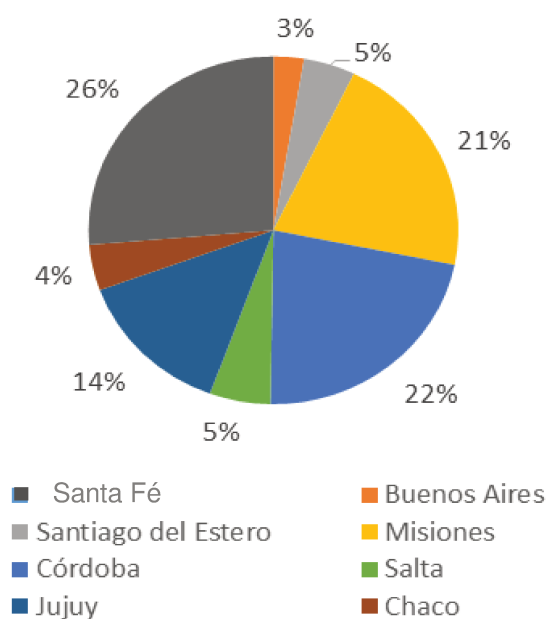


Figura 17. Distribución por provincia de procedencia de las muestras agudas evaluadas en terreno para NS1 y RT- PCR DENV-1, 2, 3, 4 en 2010.

3.4.b) Evaluación 2011: Se estudiaron 372 sueros de pacientes obtenidos en la fase aguda de la enfermedad empleando un reactivo comercial Ag NS1 DEN (Laboratorios Bio-Rad) de acuerdo a las instrucciones del fabricante y por RT-PCR (Lanciotti, 1992) procedentes de la provincia de Santa Fé, Misiones, Salta, Jujuy, Córdoba, Chaco, Buenos Aires y Entre Ríos cuya distribución porcentual se muestra en la figura 18.

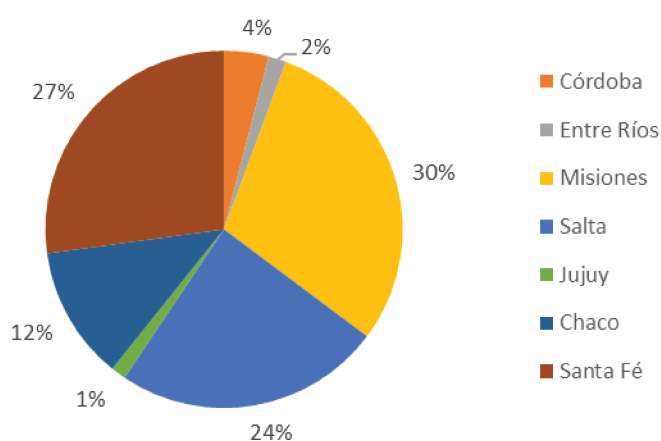


Figura 18. Distribución por provincia de procedencia de las muestras agudas evaluadas en terreno para NS1 y RT- PCR DENV-1, 2, 3, 4 en 2011.

3.4.c) Evaluación 2013: Se estudiaron en paralelo un total de 1441 muestras de suero de pacientes que cumplieron la definición clínica de casos sospechoso de dengue procedentes de las provincias de Buenos Aires, CABA, Córdoba, Formosa, Jujuy, Misiones, Salta y Santa Fé (figura 19).

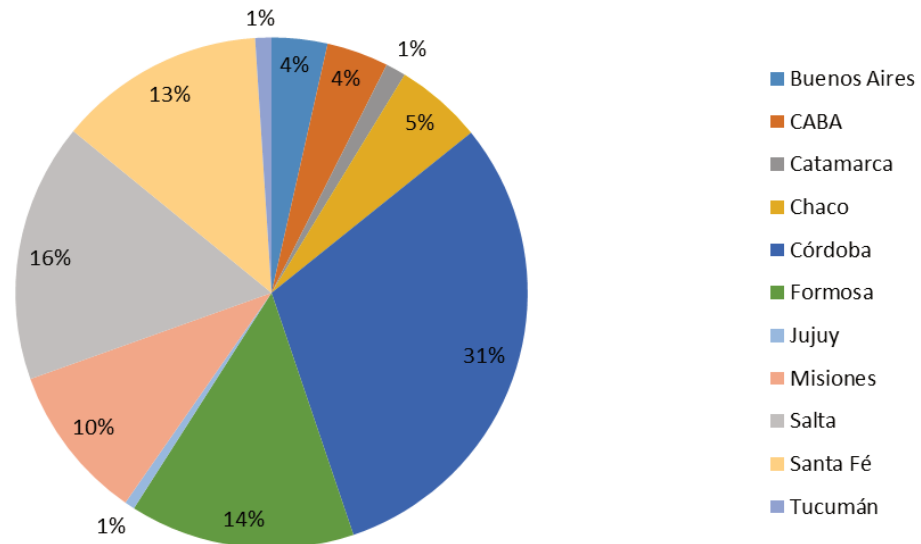


Figura 19. Distribución por provincia de procedencia de las muestras agudas evaluadas en terreno para NS1 y RT-PCR DENV-1, 2, 3, 4 en 2013.

3.5. Monitoreo de reactividad cruzada con otros flavivirus que circulan en Argentina: por ELISA NS1 DENGUE (Platelia, Bio-Rad) fue procesado un panel de referencia anonimizado integrado por 58 muestras de suero de pacientes con infecciones confirmadas por:

- a) Fiebre amarilla: 17 pacientes
 - i. Vacunados con YF 17 D: 13 pacientes (5 días post-vacunación)
 - ii. YF selvática: 4 pacientes (< 5 dpi)
- b) SLE: 32 pacientes.
 - i. 16 muestras de suero de casos confirmados con < 5 dpi
 - ii. 16 muestras de suero de casos confirmados tomadas entre los 5-13 dpi
- d) WN: 1 (< 5 dpi)
- e) ZIK: 8 pacientes (< 11 dpi)

4. RESULTADOS

4.1. Evaluación inicial con panel retrospectivo INEVH: Se determinó un valor de Se del 94.2% (IC95 84,0-98,0) y Sp del 98% (89,9-100) con un Índice K de 0,92 (IC95 0,73-1,1) (Tabla 4). El VPP fue 98% (IC95 87,5- 99,7) y VPN 94,5% (IC95 85,2-98,1).

Tabla 4- Tabla de contingencia 2x2: resultados de ELISA NS1 dengue en relación a panel de referencia INEVH.

Técnicas	Confirmado DENV	Descartado DENV	
ELISA NS1 +	49	1*	50
ELISA NS1 -	3**	52	55
	52	53	105

*Se obtuvo un resultado FP de NS1 en un caso confirmado de FHA (suero de 7 dpi RT-PCR positivo para virus Junin, RT-PCR negativo para DENV-1, 2, 3 y 4, y negativo IgM para DENV, SLEV, WNV y YFV)

**La comparación de resultados por ambas técnicas en los positivos por RT-PCR se muestra en la figura 20. Los 3 resultados FN correspondieron a: 2 sueros con 2 dpi obtenidos en dos pacientes con aislamiento de DENV-3 y un suero de 4 dpi con aislamiento de DENV-2.

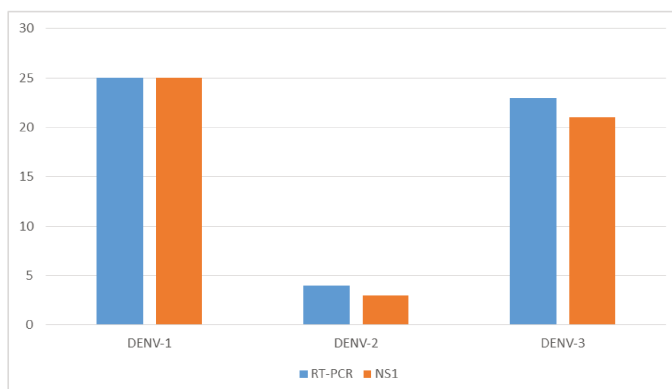


Figura 20. Distribución por serotipo de las muestras RT-PCR positivas de la evaluación en panel inicial y resultados NS1.

4.2 Evaluación en terreno:

4.2.a) Experiencia en 2010:

Se obtuvieron 148 muestras positivas y 227 muestras negativas por RT-PCR D1, 2,3, 4 cuyos resultados de NS1 se muestran en la tabla 5, obteniéndose un Índice K de 0,82 (IC95 0,92-0,72) entre las dos metodologías, con una Se del 100% (IC95 100- 97,5) y Sp del 85% (IC95 89,8- 80,3)

Tabla 5. Comparación resultados ELISA Ag NS1 dengue vs RT- PCR D1, 2,3, 4 en 2010.

Técnicas	RT-PCR +	RT-PCR -	
ELISA NS1 +	148	33*	181
ELISA NS1 -	0	195	195
	148	227	376

*Se detectaron 33 muestras NS1 positivas que no dieron reactividad en la prueba de detección de genoma y al realizar IgM en esos sueros se encontró 90% de positividad.

En las 148 muestras positivas por ambos métodos (39 % (148/ 376), se observó la siguiente distribución por serotipo: 137 (92,6 %) DENV-1; 10 (6,7%) DENV-2, y 1 caso por DENV-4 (0,67%) (Figura 21)

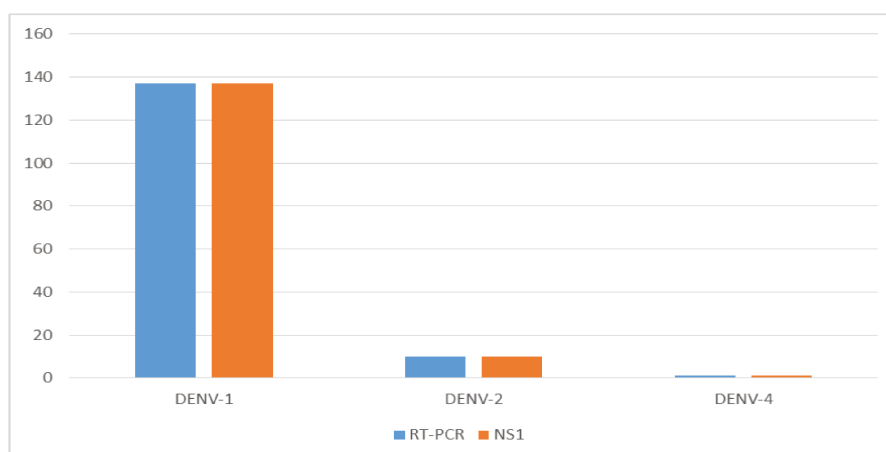


Figura 21. Distribución de resultados NS1 en los distintos serotipos detectados por RT-PCR en 2011.

4.2.b) Experiencia en 2011:

Se detectaron 123 muestras positivas y 249 muestras negativas por RT-PCR D1, 2, 3, 4 cuyos resultados de NS1 se muestran en la tabla 6, obteniéndose un Índice Kappa de concordancia (K) de 0,90 con un una Se general del 93,5% (115/123.100) y Sp del 96,4%

Tabla 6. Comparación resultados ELISA Ag NS1 dengue vs RT- PCR D1, 2, 3, 4 en 2011

Técnicas	RT-PCR +	RT-PCR -	
ELISA NS1 +	115*	9**	124
ELISA NS1 -	8*** (7 DENV-2 y 1 DENV-1)	240	248
	123	249	N: 372

* En las 123 muestras positivas por RT-PCR, la distribución de los serotipos detectados fue: 58 DENV-2 (47,2%, 58/123) y 65 DENV-1 (52,8%, 65/123).

**Se hallaron 8 muestras positivas por RT-PCR y negativas para Ag NS1: 7/ 8 correspondieron al serotipo DENV-2 y 1/8 al serotipo DENV-1. Estos resultados fueron corroborados por aislamiento viral (figura 22). Se estableció una sensibilidad diferente según el serotipo:

- ✓ Sensibilidad DENV-1 = 64/ 65. 100 = 98%
- ✓ Sensibilidad DENV-2 = 51/ 65. 100 = 78%

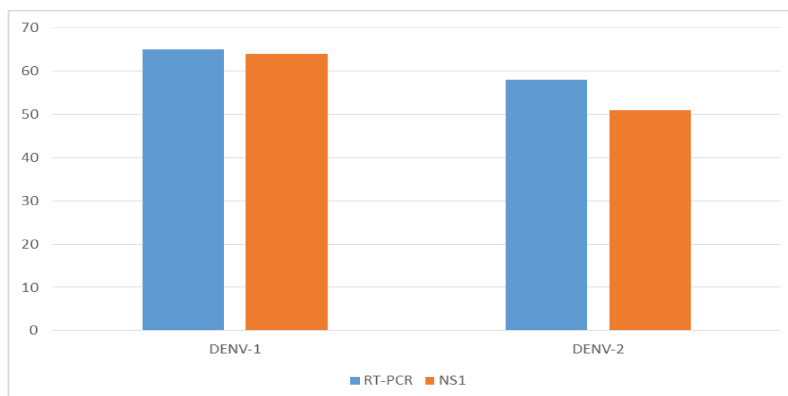


Figura 22. Distribución de resultados NS1 en los distintos serotipos detectados por RT-PCR en 2011.

***Se determinaron 9 muestras negativos por RT-PCR y positivas por AG NS1. Al evaluar IgM dengue en la misma muestra, 7/9 resultaron IgM (+) y los otros dos, fueron IgM positivos en una segunda muestra tomadas con 7 y 11 dpi.

4.2.c) Experiencia en 2013: Se detectaron 624 pacientes RT-PCR positivos y 938 pacientes RT-PCR negativos, con un valor general de Se = 86,3% (IC95 83,4-89,0) y Sp = 96,5 % (IC95 96,0-97,6) y K = 0,84 (IC95 0,79-0,89). La tabla 7 muestra el detalle de los resultados.

Tabla 7. Comparación resultados ELISA Ag NS1 dengue vs RT- PCR D1, 2, 3, 4 en 2013

Técnicas	RT-PCR +	RT-PCR -	
ELISA NS1 +	539	33*	572
ELISA NS1 -	85** (2 DENV-1, 65 DENV-2, 18 DENV-4)	905	990
	548***	938	N: 1562

*El 3,5 % (33/ 938) de las muestras RT-PCR negativo, dieron positivo al antígeno NS1 y de ellas el 46% (15/33) poseían IgM (+) en la misma muestra.

**La técnica de ELISA AG NS1 resultó negativa en 13,6% (85/624) de las muestras positivas por RT-PCR. La distribución de serotipos en las muestras no detectadas por NS1 fue: 76,5 % DENV-2, 21,1% DENV-4 y 2.4 % DENV-1. Se obtienen valores de sensibilidad del orden de 83,3, 88,5 y 97,5% respectivamente para los serotipos mencionados.

***La distribución por serotipo en las muestras RT-PCR positivas y su detección por el antígeno NS1 se muestra en la figura 23.

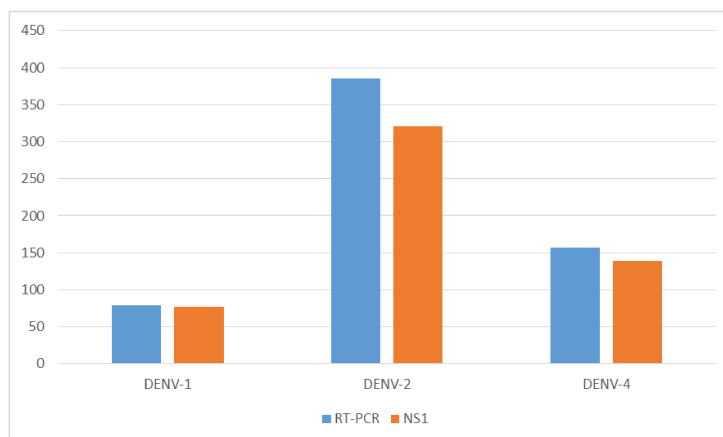


Figura 23. Distribución por serotipo y resultados Ag NS1 dengue en muestras evaluadas en 2013

Los resultados de IgM y/o aislamiento viral en esas muestras no detectadas por NS1 muestran:

- presencia de anticuerpos IgM en la misma muestra o en una con más días de evolución en un 35% (30/85)
- aislamiento viral en 7/11 muestras disponibles para el estudio (6/ 11 para DENV-2, 1/11 DENV-4, 1/11 negativo, 3/11 muestras contaminadas)

Considerando las tres evaluaciones en terreno, se observa una excelente concordancia entre los resultados del ELISA NS1 vs RT-PCR 1, 2, 3, y 4 con valores de K en el rango 0,82-0,90 en las 3 evaluaciones realizadas en terreno en 2010-2013. En la tabla 8 se comparan los valores de Se, Sp y K con sus respectivos IC95 en las distintas epidemias, incluyendo la evaluación inicial en INEVH. En el total de 2415 muestras evaluadas en paralelo por las dos metodologías, se obtuvo un VPP= 92% y un VPN= 94%

Tabla 8. Comparación de los parámetros de desempeño de la metodología comercial ELISA NS1 Ag dengue en las diferentes instancias de evaluación.

Evaluación	N	Se % (IC95)	Sp % (IC95)	K (IC95)
2009	105	94,2 (98,8-84,0)	98,0 (100 – 89,9)	0,92 (1,1- 0,73)
2010	376	100 (100- 97,0)	85,5 (89,8-0,72)	0,82 (0,92-0,72)
2011	372	93,5 (97,1-87,6)	96,4 (98,3-93,2)	0,90 (1,0-0,80)
2013	1562	86.3 (89,0-83,4)	96,5 (97,6-96,0)	0,84 (0,89-0,79)
N total	2415			

4.3. Evaluación de reactividad cruzada con otros flavivirus con circulación en Argentina: el antígeno NS1 fue negativo en el 100 % de los 58 pacientes con infección reciente por SLEV, WNV, ZIKV, YFV silvestre y pacientes recientemente vacunados para YFV

5.CONCLUSIONES

El estudio realizado permitió evaluar el desempeño diagnóstico de un método comercial de Elisa para la detección del antígeno NS1 y su aplicación como una alternativa diagnóstica de los métodos moleculares para fortalecer la respuesta laboratorial en los niveles locales afectados por brotes de dengue en el país. El reactivo comercial contaba con evaluaciones internacionales que lo posicionaban como uno de los de mejor sensibilidad en la detección de casos de dengue y al ser evaluado frente a un panel bien caracterizado de muestras de Argentina y comparado a los resultados de RT-PCR DEN1, 2, 3 y 4, se obtuvo Se: 94.2 (98.8-84.0) y Sp 98.0 (100 - 89.9)

con buena detección de los 4 serotipos incluidos en el panel (DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4). Con estos resultados y la necesidad de proveer herramientas de procesamiento de muestras de menos de 5 días en un mayor número de laboratorios en el país, a finales de 2009, se planteó su incorporación al algoritmo de diagnóstico dando a un resultado positivo, el valor de infección probable siguiendo un criterio conservador hasta tanto se contara con mayor información de su aplicación a nivel nacional.

La evaluación prospectiva realizada en terreno en el período 2010- 2013, determinó un nivel de concordancia excelente (valores del índice K entre 0,83 y 0,90) en un total de 2310 muestras procesadas en paralelo para comparar la detección del antígeno NS1 vs la RT- PCR DENV-1, 2, 3, 4. En este período en la Argentina hubo circulación autóctona de DENV-1 (2010), DENV-1 y DENV-2 (2011) y DENV-1, 2 y 4 (2013) (figura 24). La evaluación realizada en terreno tuvo representatividad de procesamiento en laboratorios de las diferentes provincias argentinas afectadas por circulación de DENV y a medida en que aumentó la proporción de los serotipos DENV-2 y DENV-4 se pudo evidenciar menor sensibilidad del antígeno NS1 al comparar con infectados por DENV-1, pero dentro de un rango de aceptabilidad. La Se determinada en nuestro medio para detectar infecciones por DENV-1 fue del 100% en 2010, 98 % en 2011 y 97.5 en 2013. Para el serotipo DENV-2 fue 89% en 2011 y 83.3% en 2013. Para el serotipo DENV-4, la Se fue 88,5 % en 2013, año en que se lo detectó con circulación autóctona. La sensibilidad para DENV-3 fue del 91.3% (21/23.100) en la evaluación del 2009 con el panel INEVH, no pudiendo evaluarse en terreno ya este serotipo no tuvo circulación autóctona en el período 2010-2013.

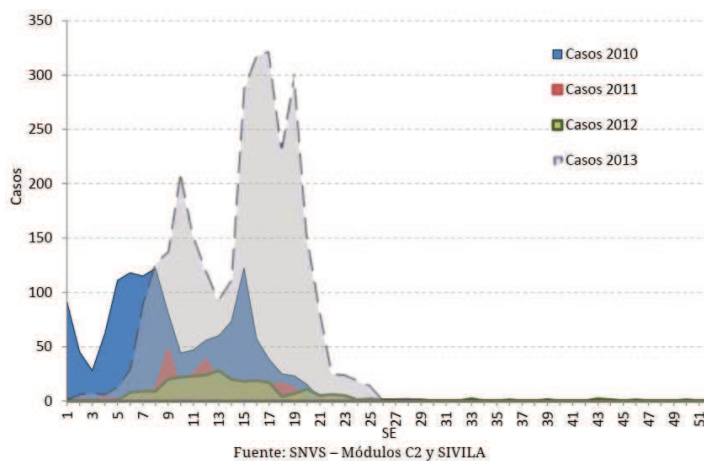


Figura 24. Curvas de casos de dengue por SE en Argentina en el período 2010-2013 (Figura modificada del Boletín integrado de vigilancia N° 199, SE49 MSN, Argentina)

La sensibilidad y especificidad determinada en este trabajo es coincidente con los valores determinados en otros estudios publicados para diversas metodologías de detección del

antígeno NS1. La Se informada puede variar indicando la influencia del serotipo del virus, el tipo de infección (primaria o secundaria), el día de la toma de la muestra, la prueba de oro utilizada en las evaluaciones y la afinidad de los anticuerpos monoclonales utilizados en las pruebas, entre otros aspectos [116]. La calidad de los resultados de estos estuches depende del fabricante, el origen geográfico de las muestras y la composición de los paneles de suero estudiados, así como de la experiencia del personal que realiza el análisis. En general la sensibilidad de los estuches de pruebas de ELISA es más alta que la de las pruebas rápidas [116]. En 2010, se publicaron los resultados del estudio DENCO, un trabajo multicéntrico desarrollado en 4 países del Sudeste Asiático con la participación de Venezuela y Nicaragua en el que se evaluaron dos kits de ELISA comerciales para la detección de NS1 (Pan-E dengue Early ELISA y PlateliaTM dengue NS1 Ag) en comparación con un diagnóstico de referencia en 1385 pacientes. En conjunto, este estudio sugirió que el ensayo NS1 de mejor rendimiento (Platelia) tenía una sensibilidad moderada (mediana 64%, rango 34-76%) y una alta especificidad (100%) para el diagnóstico de dengue. La combinación de detección de NS1 e IgM en muestras recolectadas en los primeros días de fiebre aumentó la sensibilidad diagnóstica general del dengue.

En 2009, paralelamente al trabajo presentado en esta tesis, el INEVH inició su participación en una segunda ronda de un estudio multicéntrico bajo la coordinación del Programa Especial para Investigación y Capacitación en Enfermedades Tropicales (TDR) de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Iniciativa Pediátrica del dengue (PDVI) en el cual, nuestro laboratorio representó a la Argentina, junto a Puerto Rico y Cuba por la región americana. El total de países fue 7, incluyendo otros cuatro del sudeste asiático y el objetivo en esta instancia se centró en la evaluación de reactivos para IgM y antígeno NS1 para diagnóstico de dengue. En 2014, se publicaron los resultados obtenidos en 3 kits comerciales de ELISA (incluyendo Platelia) y 4 tests rápidos, entre otros. Para la evaluación de NS1 se construyó un panel integrado por muestras agudas con RT-PCR y aislamiento viral e IgM negativa, y muestras de casos confirmados con RNA negativo e IgM positiva tomadas en la convalecencia temprana (intentando evaluar extensión del periodo de la detección de NS1). Se incluyeron los 4 serotipos de dengue e infecciones primarias y secundarias. La sensibilidad de los ELISA NS1 en las muestras agudas varió entre 60 a 75% y en esta ocasión el reactivo BioRad Platelia fue el menos sensible con una Se del 60% (IC 95 51–70). Esta sensibilidad varió significativamente en el rango 19 al 31% al aplicar la detección de NS1 a muestras obtenidas entre los 6-14 días de evolución. Del mismo modo, se observó una disminución de la Se al aplicarla la detección de NS1 en infecciones secundarias, con Se entre 42 y 46% vs valores de Se del 60-75% en infecciones primarias. La especificidad de los reactivos evaluados varió del 71 al 81%, hallando falsos positivos en muestras negativas con factor reumatoideo (78% para Panbio y 11% para

BioRad Platelia). Falsos positivos en muestras de Encefalitis de San Luis, Encefalitis Japonesa, WNV y YFV sólo se evidenciaron en el reactivo Panbio (con YFV)[116]. En otro estudio, se han reportado falsos positivos en pacientes con alteraciones hematológicas subyacentes [145]

En un metaanálisis realizado en 2015 sobre la aplicación en población asiática, la sensibilidad de los kits de prueba basados en antígeno NS1 en pacientes con infección primaria fue del 88% (IC 95: 85,8 a 89,9) y en los pacientes con infección secundaria fue del 60,8% (IC95: 57.8 a 63.8). Según los serotipos de DENV, DENV-1 tenía la sensibilidad más alta del 79,5% (IC95:76.6–82.3) y DENV-4 tenía la sensibilidad más baja del 46% (IC95: 36–59.3)[146].

En nuestro estudio no se relacionó el desempeño del reactivo comercial para NS1 con el carácter de infección primaria o secundaria por dengue ya que se buscaba una alternativa a la detección de genoma. Dada la situación particular de Argentina con otros flavivirus, realizamos el monitoreo de reacciones cruzadas tan problemáticas en esta familia viral. Se procesaron 58 muestras agudas obtenidas en infectados por SLEV, YFV silvestre o vacunados y ZIKV en las que no se evidenció reactividad, reforzando los excelentes valores de Sp determinados en las instancias de evaluación realizadas y planteando la posibilidad de pasar a considerar un resultado positivo de NS1 por ELISA como un criterio de confirmación de la infección por dengue.

En general, los ensayos para detección del antígeno NS1 han mostrado utilidad diagnóstica, con un mejor rendimiento en muestras obtenidas los primeros días del cuadro clínico pero detectable, en general, hasta el día 9-13 de evolución e incluso aún en presencia de anticuerpos IgM. En nuestro país, en 2009 se incorporó la detección del antígeno NS1 por método de ELISA comercial en 35 laboratorios provinciales para el procesamiento de muestras agudas de hasta 5 días de evolución como una estrategia para mejorar la capacidad de procesamiento en instituciones que no contaran con infraestructura de biología molecular o quisieran implementarla como un tamizado previo al procesamiento por RT-PCR para determinación de serotipo viral. Por otro lado, considerando las limitaciones del ensayo comercial ELISA NS1 evidenciados en nuestro estudio y otros disponibles en la literatura, se remarcó que pacientes con cuadro clínico compatible con dengue que pudieran tener un resultado negativo para este antígeno, deben ser evaluados con otras metodologías (RT-PCR convencional o en tiempo real o IgM dependiendo de los días de evolución) y/o el estudio de una segunda muestra para serología antes de proceder a descartar el diagnóstico.

CAPITULO 2

UTILIDAD DE LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgM DENGUE EN LA VIGILANCIA LABORATORIAL DE LA ENFERMEDAD EN ARGENTINA.

1.INTRODUCCIÓN:

Los síntomas iniciales del dengue no son específicos, y por lo tanto el diagnóstico definitivo requiere confirmación de laboratorio. Por lo tanto, poder contar con herramientas de diagnóstico de bajo costo y oportunas, particularmente mediante el uso de un solo espécimen, resulta esencial para el cuidado del paciente, vigilancia, investigación y control de brotes[93]

Algunos pacientes buscan atención médica cuando ya han pasado unos días desde el inicio de la fiebre y en ellos, la detección de materiales virales es una tarea desafiante y menos eficiente al avanzar los días de evolución en el cuadro clínico (figura 13). Una alternativa ampliamente utilizada en programas de vigilancia ha sido el diagnóstico por detección de inmunoglobulina IgM anti-DENV por diferentes metodologías, dado que presenta una curva cinética apropiada para el diagnóstico de casos con mayor evolución [147]. En general se recomienda el análisis de los anticuerpos IgM anti DENV en muestras obtenidas a partir del quinto al sexto día del inicio de la enfermedad o después[97].

Para la medición de anticuerpos en infectados por DENV, inicialmente se ha usado la técnica de inhibición de la hemoaglutinación (IHA), que valora tanto IgM como IgG[148] y también, pruebas de Inmunofluorescencia (IF)[149] , que han sido desplazadas paulatinamente por las técnicas de enzimo inmunoensayo (ELISA) fundamentalmente en el formato de captura por su alta sensibilidad, objetividad y practicidad para el procesamiento de un gran número de muestras en un corto plazo de tiempo. Adicionalmente, estos ensayos son relativamente económicos y requieren menos laboriosidad en comparación con el aislamiento viral o la detección de ácido nucleico[99]. Diferentes laboratorios han elaborado procedimientos caseros para pruebas de ELISA de captura de anticuerpos IgM (MAC-ELISA) que utilizan antígenos virales producidos en ratón o cultivos celulares o proteínas virales recombinantes y existe una amplia disponibilidad de metodologías comerciales en diferentes formatos y con diferente desempeño en términos de sensibilidad y especificidad, lo que de alguna manera, provoca también cierta incertidumbre alrededor de las cifras de dengue reportadas por los diferentes países [116][150][151][152] [141][153][83] .

En el curso de una infección primaria con dengue, los anticuerpos IgM son los primeros en aparecer y se desarrollan rápidamente, de manera que hacia el quinto día de la enfermedad el 80% de los casos, tanto primarios como secundarios, tienen niveles de anticuerpos detectables

por 30 a 60 días según la literatura clásica. Los anticuerpos IgG a dengue se elevan después del octavo a noveno día de la fiebre y se mantienen de por vida[154] [94] [155][151]

En las infecciones secundarias la cinética de los anticuerpos IgM es más variable y en general, los anticuerpos IgM aparecen más tardíamente y precedidos por la aparición de anticuerpos IgG. El título de IgG es más alto en infecciones secundarias dado que se produce una rápida respuesta anamnésica por la primoinfección, y, por tanto, la relación IgM: IgG se ha utilizado para distinguir las infecciones primarias de las secundarias en la fase aguda de la enfermedad. Algunos laboratorios y reactivos comerciales utilizan el límite de 1,2-1,4[93] para diferenciar infecciones primarias de secundarias. Un reciente estudio utilizó muestras de sangre seriadas de 105 infecciones primarias y 144 secundarias para determinar el punto de corte óptimo, con una prueba de PRNT como referencia[156]. Encontraron que variar el punto de corte dependiendo del número de días después de la aparición de los síntomas, superó las estrategias de corte estático. Su punto de corte para definir las infecciones primarias utilizando la proporción IgM: IgG de los ELISA “in house” osciló entre 1,8 en el día 2 y 1.0 en el día 7, dando una sensibilidad, especificidad y precisión del 90%, 77% y 84%, respectivamente.

El conocimiento de la cinética de los anticuerpos IgM resulta de relevancia para la interpretación diagnóstica y para su aplicación en programas de vigilancia. Se encuentra mejor caracterizada la aparición de los anticuerpos IgM en las infecciones por dengue pero en menor medida ha sido estudiado el período de tiempo en que perduran en la circulación sanguínea. Cuando se plantea el uso de la detección de estos anticuerpos como marcador temprano de circulación viral, conocer la persistencia de la IgM resulta relevante en las áreas endémicas o en las que año a año se repiten las epidemias. Los estudios realizados en los años 80 y 90 empleando métodos MAC-ELISA “in house” evidenciaron que los anticuerpos IgM anti-DENV persistían durante aproximadamente 2 a 3 meses después del inicio de síntomas [154][157] ; otro estudio en 1997 en el que tomaron muestras de sangre seriadas de niños luego de 6 meses de una infección aguda determinaron resultados de IgM no detectables[158]. Por lo tanto, diversas publicaciones y revisiones plantearon que la IgM anti-DENV solo persistía durante 2–3 meses[105][147] [118][140]. Más recientemente y con otros métodos de ELISA de reciente desarrollo, Prince y cols, de Focus Diagnostics (Cypress, CA, EE. UU) estimaron que los anticuerpos IgM anti-DENV persistían por más tiempo que lo que se informó inicialmente mediante estudios por análisis de regresión - aproximadamente 179 días para pacientes con infección primaria y 139 días para aquellos con Infección secundaria [159]. Estudios realizados en infecciones por otros flavivirus (WNV y YFV) demuestran que con esos agentes, pueden detectarse niveles de anticuerpos IgM más allá del año de la infección o vacunación[123][122]

Por otro lado, sabemos que un porcentaje importante de infecciones por DENV son asintomáticas o subclínicas aunque no se conoce si la persistencia de IgM anti-DENV difiere de

la hallada en personas sintomáticas. Hay estudios previos que investigaron la persistencia de IgM anti-DENV principalmente en niños sintomáticos, pero la persistencia en adultos es menos conocida. El hecho que los anticuerpos IgM perduren en circulación por 60 días o más, sumado a que los IgG pueden detectarse de por vida, tiene implicancia en la diferenciación de una infección aguda o de una infección reciente al estudiar una sola muestra de suero [147][99] [81] [151]. La opción de evaluar pares serológicos para evidenciar una infección aguda por seroconversión de IgM y/o IgG (10 a 15 días de diferencia entre las muestras) cobra relevancia, aunque en la práctica, agrega complejidad, ya que es factible que el paciente no acuda a la toma de la muestra de la convalecencia una vez que ha sanado o no sea factible su localización.

Además de la duración de los anticuerpos IgM en infecciones por dengue es necesario contemplar la existencia de reactividad cruzada en las pruebas serológicas después de infecciones por virus de un mismo género o vacunación contra ellos. Por ejemplo, en un estudio, se determinó que 8 de 19 (42%) sueros recolectados después de aplicada la vacuna contra la fiebre amarilla fueron positivas para IgM anti DENV, a pesar de que ninguno de ellos era positivo antes de la vacunación[160]. De manera similar, la evaluación de kits comerciales para serología de dengue que fueron evaluados luego de la emergencia de Zika en América, mostraron algún nivel de reactividad cruzada con IgM anti ZIKV, incluso cuando la infección concomitante de dengue fue descartada[161][162]. En consecuencia, la detección de anticuerpos anti-DENV en una sola muestra durante la fase aguda podría ser el resultado de una infección pasada con dengue o un flavivirus relacionado. Con el aumento de la circulación de flavivirus, el aumento de vacunación (incluido el dengue en el futuro) o viajes hacia/desde regiones endémicas, la interpretación de la serología de anticuerpos se vuelve cada vez más difícil, particularmente en ausencia de un muestra pareada.

La reactividad cruzada de la inmunoglobulina IgG ha sido bien documentada y se ha planteado que los anticuerpos IgM pueden ser más específicos en infecciones por flavivirus[163][164][165], incluso permitiendo la diferenciación cuando se valora en paralelo para reactividad para varios agentes en pruebas correctamente estandarizadas[153]. La reactividad cruzada, en consecuencia, es más frecuente en infecciones secundarias que en las primarias, por lo tanto, en zonas endémicas para dengue o donde circulan simultáneamente diversos flavivirus, la probabilidad de reactividad cruzada es alta. La selección de agentes a evaluar en reactividad cruzada tendría que basarse en la situación epidemiológica de la zona de residencia, presentación clínica o exposición particular del caso en cuestión (viajero frecuente, transportista, etc). En general, las pruebas de neutralización tienen mayor especificidad que las de detección de anticuerpos IgM o IgG dependiendo del tipo de antígeno que emplean. Aún así, la reactividad cruzada también se ha documentado en las pruebas de neutralización [166][167] y se recomienda realizar pruebas diferenciales con un panel de flavivirus.

La existencia de períodos epidémicos e interepidémicos para la circulación del DENV ha determinado la necesidad de que la vigilancia laboratorial contase con herramientas que permitieran informar con certeza el inicio de actividad viral en una región y que además pudiera confirmar que el virus circulante era DENV y no otros de los flavivirus reconocidos en el país (SLEV o YFV) [127]. El algoritmo que se planteó para Argentina desde 1997, contempló el uso de la detección de IgM como una metodología de alta sensibilidad para la captación de casos y la posterior confirmación por seroconversión de anticuerpos IgG por PRNT con panel de flavivirus. Este planteo riguroso para la vigilancia serológica de dengue en el país, se diferenciaba de los criterios laborales en otros países de la región donde la detección de una IgM era criterio de confirmación, llevando a nuestro entender a la posibilidad de sobreestimación de la casuística por los motivos expuestos.

Evidencias preliminares de persistencia de anticuerpos IgM anti DENV en Argentina:

En los inicios del 2005, luego de una intensa epidemia por DENV-3 en el NOA el año anterior, detectamos varios casos sospechosos, procedentes de esa zona, con niveles de IgM DENV bajos que no seroconvertían en PRNT. Esos datos sugerían una persistencia de los anticuerpos IgM de la temporada anterior. En mayo del 2005 se obtuvieron sueros de 100 personas provenientes de Jujuy y Salta con diagnóstico laboratorial de DENV en el 2004[37]. Se trató de un único muestreo realizado a más de un año de producida la infección viral. Los resultados obtenidos mostraron que un 30% de las personas estudiadas eran positivas por MAC-ELISA IgM para DEN, representando una persistencia de los anticuerpos de 390-490 días luego del inicio de los síntomas. No se encontró asociación estadísticamente significativa con enfermedad, viajes o vacunación anti amarílica posteriores transcurridas en el período de tiempo entre el diagnóstico de la infección por dengue en 2004 y el muestreo realizado en 2005. El 100% de las muestras estudiadas presentaron anticuerpos neutralizantes para virus DENV-3 corroborando el diagnóstico realizado en el transcurso de la epidemia. Estos resultados remarcaron la necesidad de continuar con el estudio del tema en próximos brotes pero planteando un diseño con mayor periodicidad en el seguimiento de la inmunidad de los pacientes y por consiguiente, intentar lograr una evaluación temporal más detallada de la persistencia de los anticuerpos en el tiempo.

Posteriormente, la detección de otros flavivirus en nuestro país, planteó la posibilidad de evaluar el impacto de los cruces serológicos sobre la aplicabilidad de las metodologías serológicas para un diagnóstico de certeza del dengue en Argentina.

2.1. OBJETIVO GENERAL: Evaluar la aplicación de la detección de anticuerpos IgM DENV como una herramienta de tamizado para la detección de circulación viral activa en el país.

2.2. OBJETIVOS PARTICULARES:

2.1.a. Evaluar la persistencia sérica de anticuerpos IgM en casos de dengue notificados (con estudios de laboratorio o determinados por clínica y nexos) durante el primer semestre de 2009 en la ciudad de Tucumán empleando un reactivo comercial (Dengue IgM ultramicro ELISA (Tecnosuma Laboratories) .

2.1.b. Optimizar el protocolo del método de referencia MAC-ELISA “in house” recomendado para la detección de anticuerpos IgM DENV y comparar los resultados obtenidos por la metodología comercial en la medición de persistencia IgM en infectados por dengue en Tucumán, 2009.

2.1.c. Evaluar la reactividad cruzada de la determinación de anticuerpos IgM dengue con otros flavivirus de circulación en Argentina.

3. Materiales y Métodos:

3.a. Evaluación de la persistencia de los anticuerpos IgM en infectados por dengue.

3.a.1. Población accesible: En el transcurso del brote por dengue en 2009, al corroborar circulación autóctona en la provincia de Tucumán, logramos establecer un estudio colaborativo con la Dirección de Epidemiología y el Laboratorio de Virología (referentes para diagnóstico de dengue) de la provincia para medir la duración de los anticuerpos IgM. La provincia de Tucumán forma parte de la región del Noroeste Argentino (NOA) y estuvo altamente expuesta a la expansión del dengue en casi todo su territorio desde la reemergencia de esta patología en la provincia de Salta en 1997, detectándose en principio casos infectados en provincias vecinas en sucesivos años y los primeros casos autóctonos en 2009. La enfermedad afectó a todos los grupos de edad durante los meses de febrero a mayo registrándose el mayor número de casos durante el mes de abril. Prácticamente todos los departamentos de la provincia registraron casos de dengue, siendo los departamentos circundantes a la Capital (Cruz Alta, Tafí Viejo, Yerba Buena) los que registraron el 82 % (211/257) de los casos IgM positivos en mayores de 15 años.

Se planteó un estudio descriptivo de corte transversal en mayores de 15 años que fueron diagnosticados por laboratorio o bien clasificados como caso por nexos epidemiológico y clínica en el transcurso del brote epidémico, residentes en San Miguel de Tucumán o en algunas de las ciudades aledañas tales como Yerba Buena, Banda del Río Salí, Las Talitas o Tafí Viejo, que

constaron con domicilio exacto o número de teléfono en los registros de la Dirección de Epidemiología y que aceptaron participar en el estudio.

Se establecieron los criterios de inclusión y exclusión y se determinó la participación de cada individuo en el estudio mediante la firma de un consentimiento informado.

- **Criterio de inclusión:** Pacientes mayores de 15 años con serología IgM y PRNT positiva para dengue, o con positividad para dengue por nexos epidemiológicos notificados al sistema epidemiológico provincial durante el año 2009 con domicilio en los Departamentos Capital, Yerba Buena, Cruz Alta y Tafí Viejo al momento del inicio del estudio. Fueron incluidos aquellos pacientes que aceptaron participar en el estudio previa firma del consentimiento informado.

- **Criterio de exclusión:**

- Pacientes diagnosticados por nexos epidemiológicos que en la primera toma de muestra de este estudio no presentaron reactividad a IgM y PRNT para DENV.
- Personas con IgM dengue que no aceptaron participar o firmar el informe de consentimiento

3.a.2. Consideraciones éticas: A cada participante, se le explicaron los contenidos y objetivos de la investigación mediante entrevista personal, se les leyó el consentimiento informado, así como los beneficios y los perjuicios de participar en dicho estudio, se garantizó el anonimato y la confidencialidad de los datos obtenidos como así también el derecho a continuar o abandonar el estudio voluntariamente una vez ingresado al mismo. El modelo de autorización fue labrado según la declaración de Helsinki. El protocolo fue aprobado previamente por el comité de bioética de la provincia de Tucumán.

3.a.3. Fuentes de información:

3.a.3.1. Identificación de participantes: se realizó mediante la revisión de los registros de la base de datos de la dirección de epidemiología provincial. El estudio se realizó en cinco diferentes ciudades: San Miguel de Tucumán, Banda del Río Salí, Tafí Viejo, Las Talitas y Yerba Buena, todas ellas pertenecientes al llamado “Gran San Miguel de Tucumán”. Se procedió en primera instancia a la revisión de registros en la base de datos de la Dirección de Epidemiología para identificar a los pacientes cuyas características coincidan con la siguiente definición de caso:

- Todo paciente que haya tenido serología IgM positiva por ELISA comercial (UMELISA – ELEA) en una o más muestras de suero tomadas luego del sexto día de iniciados los síntomas o,
- Todo paciente sin determinación de IgM que hubiera tenido síntomas compatibles con dengue durante la epidemia 2009 y que fuera conviviente de uno con serología IgM reactiva.

En todos los casos, deberán haber permanecido en estas cinco ciudades durante la epidemia de dengue entre los meses de febrero a mayo de 2009. A partir de la revisión de registros, se constituyó una plantilla de datos en programa Excel donde se cargó la información recolectada de casos notificados. Se visitaron todos aquellos casos con domicilio exacto, también se contactó con aquellos pacientes que registraban número telefónico, en ambos casos con el fin de invitarlos a participar del estudio. En la entrevista, ya sea domiciliaria o bien en el Laboratorio de Virología de la provincia, a cada persona que aceptó participar del estudio, previa firma del consentimiento informado, se le aplicó un formulario encuesta personal.

3.a.3.2. Entrevistas: las variables incluidas en la encuesta fueron: datos personales y datos complementarios. El relevamiento de los mismos se realizó en toda oportunidad que se procedió a una extracción de sangre.

- Presencia de comorbilidades: Se refiere a patologías crónicas previamente diagnosticadas y declaradas por el paciente. Toma de muestra de sangre, informe de resultados y derivación de los pacientes en el caso que se detecte anormalidades en los resultados de los estudios realizados.
- Vacunado para fiebre amarilla: Se refiere si el paciente recibió o no vacuna para la fiebre amarilla, con dato de año y lugar de vacunación si la hubiera recibido.

3.a.3.3 Toma de muestra de sangre, informe de resultados y derivación de los pacientes:

Una vez al mes se solicitó a los participantes que se realicen la toma de muestra de sangre en el Laboratorio de Virología de la provincia. En el mismo se realizó serología IgM para dengue por método comercial. En un laboratorio de análisis clínicos de un hospital de referencia de la ciudad de San Miguel de Tucumán se realizaron los estudios hematológicos y de química clínica a los fines de otra investigación. En nuestro laboratorio en INEVH se efectuaron estudios de Neutralización para DENV-1 y de IgM por técnica MAC-ELISA “in house”. Los informes con los resultados de laboratorio fueron entregados personalmente en el Laboratorio de Virología de la provincia o a través de la Dirección de Epidemiología. Las extracciones de sangre con el consiguiente análisis serológico IgM dengue, hematológico y de química clínica se realizaron entre los días 5 y 15 de cada mes hasta obtener una IgM DENV (-) en el laboratorio provincial. Los pacientes que mostraron alteraciones en los parámetros bioquímicos

y/o hematológicos analizados fueron debidamente informados y derivados a consulta médica en un hospital de referencia de la ciudad de San Miguel de Tucumán muñidos de la nota de derivación correspondiente. Las muestras que dieron resultados negativos para IgM en la primera toma, fueron procesadas para la determinación de anticuerpos IgG por PRNT₉₀.

3.a.4. Determinación de anticuerpos IgM por método comercial: los reactivos fueron gestionados y comprados en forma centralizada por Ministerio de Salud de la Nación, con asesoramiento técnico de INEVH, mediante procesos de licitación pública para proveer a toda la red de laboratorios. Previo a la distribución de los mismos, realizamos en nuestro laboratorio un control de calidad de lote empleando un panel integrado por muestras confirmadas de infecciones por dengue con distintos niveles de positividad y muestras negativas de distinta especificidad para garantizar su desempeño dentro de los parámetros solicitados en la compra (Sensibilidad > 90 % y Especificidad > 80 %). Las determinaciones de IgM fueron realizadas de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Resumidamente, el UMELISA DENGUE IgM PLUS es un ensayo inmunoenzimático heterogéneo en su variante captura que emplea las ventajas de la reacción de alta afinidad entre la Estreptavidina y la Biotina y donde se utilizan como fase sólida tiras de ultramicro ELISA (10 microlitros por pocillo) revestidas con anti IgM humana. Las muestras se incuban en los pocillos de las tiras y los anticuerpos en su superficie capturan la IgM presente en el suero. A continuación, previo lavado que elimina los componentes de la muestra no fijados, se añade el antígeno de dengue (mezcla de los 4 serotipos del virus) que se unirá a la IgM específica capturada en el paso anterior. Una vez eliminado el antígeno en exceso, se añaden anticuerpos monoclonales biotinilados específicos al DENV (Anticuerpos Biotinilados), que se unirán al complejo formado sobre la fase sólida. Luego de otro paso de incubación y lavado se aplica el conjugado Estreptavidina / Fosfatasa Alcalina (F.A.), que se unirá al complejo formado anteriormente en caso de reacción positiva. Un nuevo lavado de las tiras eliminará el conjugado en exceso. Por último, se adiciona el sustrato fluorogénico (4-Metilumbeliferil fosfato), que será hidrolizado y la intensidad de la fluorescencia emitida permitirá detectar en la muestra la presencia de anticuerpos IgM específicos al virus del dengue.

Las condiciones mínimas requeridas por el fabricante para asegurar la calidad del ensayo son:

a) Al menos dos de los tres valores del Control Negativo deben presentar una fluorescencia menor que 12 unidades (esquema de siembra sugerido en figura 25).

b) Al menos dos de los tres valores del Control Positivo deben presentar una fluorescencia entre 75 y 180 unidades.

c) $(NN)/(P-NN) \leq 0,16$, donde el significado de NN: Mediana de la fluorescencia de los valores del Control Negativo que se encuentran dentro de los límites de calidad, P: Mediana de

la fluorescencia de los valores del Control Positivo que se encuentran dentro de los límites de calidad.

Si dos de los tres valores del Control Positivo son los que se encuentran dentro de los límites de calidad, entonces P será la mediana de la fluorescencia de los mismos siempre que el coeficiente de dispersión entre ambos sea menor del 20 %. Si el coeficiente de dispersión entre estos valores es mayor del 20 %, entonces P es el menor valor de fluorescencia de los dos controles positivos que se encuentran dentro de los límites de calidad.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83
B	P	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84
C	P	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85
D	N	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86
E	N	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87
F	N	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88
G	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89
H	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90

Figura 25. Esquema de utilización de placa UMELISA DENGUE IgM PLUS propuesto por el fabricante

Las muestras de suero y sangre seca sobre papel de filtro se consideran positivas cuando: $(F_i - NN) / (P - NN) > 0,225$ $F_i =$ Fluorescencia de la muestra.

Las muestras se consideran en el umbral de positividad (BL) cuando sus resultados se encuentran en una zona comprendida entre el nivel de corte y un 15 % por debajo del mismo (“zona gris”). Para definir de una forma rápida el nivel de corte y el límite inferior de la zona gris cuando no se dispone del programa automático, se calcula el valor de fluorescencia correspondiente para cada caso.

$FNC = 0,225 (P - NN) + NN$ $FBL = 0,191 (P - NN) + NN$ Donde: FNC = Valor de fluorescencia correspondiente al nivel de corte. FBL = Valor de fluorescencia correspondiente al límite inferior de la zona gris.

Los reactivos fueron provistos junto a un lavador y lector con software específico de lectura provisto por la empresa comercial, facilitando la obtención de los resultados en el sitio efector.

3.a.5. Determinación de IgM por MAC-ELISA “in house” (protocolo original): es la prueba serológica de referencia recomendada para determinar anticuerpos IgM para flavivirus. Es una prueba relativamente sencilla con un diseño que permite el análisis de un gran número de

muestras de casos sospechosos en una única prueba. En esta prueba, los anticuerpos IgM presentes en el suero a analizar son capturados en forma no específica por un anticuerpo dirigido contra IgM humana que se fija a una fase sólida. Estos anticuerpos capturados son posteriormente enfrentados con el antígeno viral específico (en este caso una mezcla de antígenos de los virus DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4). Finalmente se agrega el conjugado (anticuerpos monoclonal anti flavivirus) y el sustrato para el revelado del resultado. Si los anticuerpos IgM están presentes en el suero problema, el antígeno será captado y se generará una señal que en este caso, es una reacción enzimática de color, lo cual indica un resultado positivo (Figura 26)

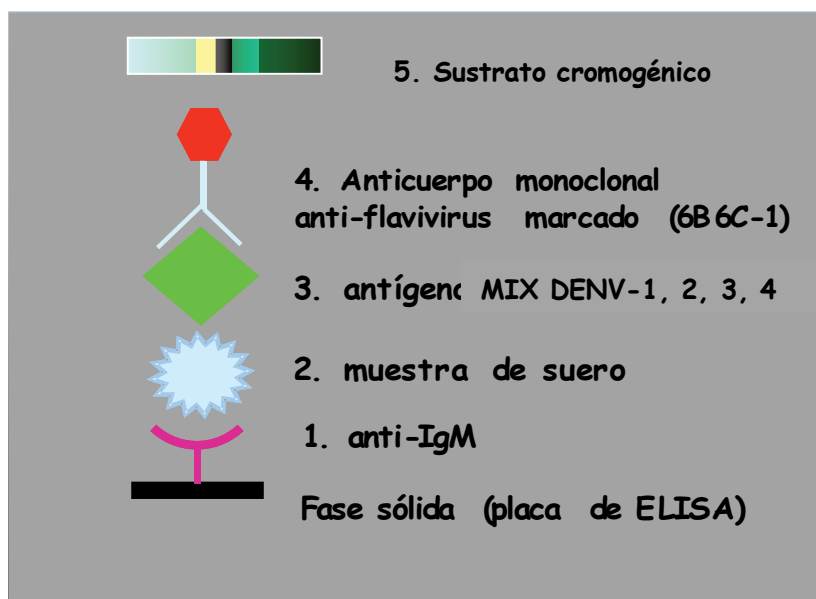


Figura 26. Representación esquemática de una prueba de MAC-ELISA para DENV (protocolo original).

La técnica ELISA de captura para anticuerpos IgM (MAC-ELISA) utilizada en el presente estudio fue realizada de acuerdo al protocolo del Centers for Disease Control and Prevention (CDC, Puerto Rico) originalmente desarrollada por Burke, D.S. y descrita por Kuno y col., 1987, utilizando antígenos de dengue que se producen en el INEVH mediante la metodología sacarosa- acetona a partir de cerebros de ratones lactantes infectados inoculados con cepas de referencia internacional para los cuatro serotipos de DENV.

El desarrollo completo del protocolo de la técnica de MAC-ELISA con el protocolo original se describe en el Anexo 4.1. Brevemente las muestras de suero fueron procesadas en una dilución 1/40 en PBS con 0,5 % de albúmina. Del mismo modo se procedió con el control positivo y negativo utilizado en la prueba. El antígeno utilizado en la prueba fue producido en el

INEVH y su preparación utilizando las cepas dengue-1 HAW, dengue-2 NGC, dengue- 3 H87 y dengue-4 H241 (provistas por el Centers for Disease Control and Prevention (CDC), dengue Branch, San Juan, Puerto Rico) se describe en el Anexo 2. Los antígenos de cada serotipo se producen y prueban por separado, se evalúa la concentración que aporta 4 unidades hemaglutinantes y se arma un mix de los 4 para su empleo en el MAC-ELISA. Como diluyente del antígeno se utilizó suero humano normal (SHN) extraído con acetona (Anexo 4. 2) y la dilución óptima de antígeno y conjugado fue determinada por titulación en box de ambos reactivos y haciendo un balance entre la Densidad óptica (DO) del control positivo >1 y el negativo $< 0,2$ (Anexo 5). El conjugado 6B6C-1 (anticuerpo monoclonal conjugado por los Laboratorios Jackson ImmunoResearch, Inc., West Grove Pa., donado por CDC Fort Collins y distribuido por la OPS) utilizado es un anticuerpo monoclonal dirigido contra la glicoproteína E del SLEV y da reacción cruzada con otros flavivirus como DENV (con los 4 serotipos), YFV y WNV entre otros. Como reactivo revelador de la prueba se utilizó el sustrato ABTS-peroxidasa. El desarrollo de color se continuó a temperatura ambiente hasta que el control positivo alcanzó una DO de al menos 1,00, después de restarle la DO del control negativo, mediante lectura en lector de microplacas de ELISA a una longitud de onda de 405-410 nm.

Un aspecto de la metodología que ha sido observado en la práctica es el procesamiento en 3 días que prolonga el tiempo para la obtención de resultados respecto a un reactivo comercial y la utilización de un suero humano normal extraído con acetona como uno de los componentes en el líquido diluyente de la prueba. La utilización de un suero humano representa una dificultad, ya que no es sencillo obtener cantidad suficiente de un espécimen y además que cumpla la condición de ser negativo para flavivirus. Por otro lado, la complicación adicional de realizar una extracción con acetona, producto que para el laboratorio que lo use implica tramitar una autorización institucional oficial por su toxicidad. Por tal motivo, se realizó la evaluación de diferentes protocolos de incubación y diluentes con un panel de muestras de referencia con el objetivo de evaluar otras condiciones que permitieran optimizar estos aspectos y mantener la sensibilidad de la técnica original.

Se probaron combinaciones de diferentes condiciones de temperaturas, tiempos de incubación y diluentes de prueba y se realizó una evaluación de Sensibilidad (Se), Especificidad (Sp) e Índice Kappa (K) de 3 protocolos modificados de la técnica de MAC-ELISA original previo a la corroboración de los resultados del método comercial usado en Tucumán para evaluar la persistencia de IgM.


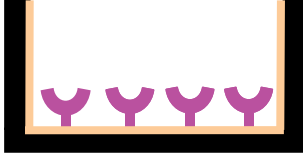
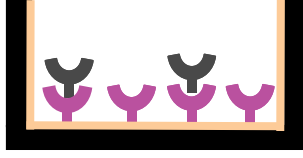
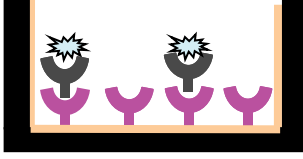
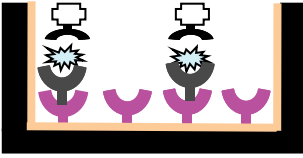
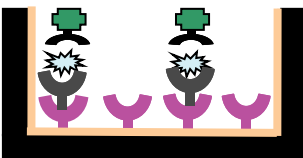
ETAPA	REACTIVO	ESQUEMA	TIEMPO Y TEMPERATURA
1	Sensibilización Fase sólida Anticuerpo anti IgM Humana		24 hs. 4 °C
2	Bloqueo Albúmina Bovina		15' 37 °C
3	Suero Paciente*		1 h 37 °C
4	Mix de Antígenos de Dengue*		24 hs. 4 °C
5	Anticuerpo anti flavivirus 6B6C marcado con peroxidasa*		1 h 37 °C
6	Sustrato ABTS		15' 37 °C y desarrollo de color a temperatura ambiente 30 minutos

Figura 27. Esquema del protocolo de la técnica MAC-ELISA IgM dengue originalmente desarrollada por Kuno y col, 1987 e implementada como método de referencia en INEVH. *Diluentes empleados: Para los sueros: albúmina bovina al 4 % en PBS pH = 7.4, para antígeno y conjugado: suero humano normal extraído con acetona al 20%

3.a.6. Panel de muestras: Se procesaron simultáneamente por 3 protocolos modificados y la técnica de referencia, un panel de 86 sueros provenientes de la vigilancia de dengue, integrado por 44 muestras positivas con rangos de DO entre 0,25 a 2,70 con predominio de muestras de DO bajas y 42 muestras negativas (DO < 0,2).

3.a.7 Modificaciones evaluadas en el protocolo del MAC ELISA DENV “in house”

3.a.7.1. Protocolo acortado a 2 días modificando el tiempo (1 hora) y temperatura de incubación con el antígeno (37 °C) (Modificación Etapa 4- Figura 27)

3.a.7.2. Protocolo que cambia el diluyente de la prueba incorporando leche descremada, con 3 días de duración (Cambio de diluyente y Etapa 2- Figura 27)

Diluyente de sueros, antígenos y conjugados: Leche descremada 0,5% en PBS (pH = 7.4)

3.a.7.3. Protocolo acortado según lo indicado en 1) con leche descremada como diluyente (Cambio de Diluyente y etapas 2 + 4- Figura 27)

En todos los casos el valor de corte de la prueba fue 0,2. Las pruebas se consideraron válidas siempre que el control positivo diera una DO > 1 y los controles negativos una DO <0,2. Se compararon las lecturas de densidades óptimas a los 30, 60 y 100 minutos, siempre que se mantuvieran los criterios de validez de la prueba.

3.a.7.4. Determinación de Sensibilidad, Especificidad y valores de Densidades Ópticas (DO) para los diferentes variaciones evaluadas en el protocolo del MAC-ELISA DENV: Se compararon los valores de DO obtenidos en los diferentes sueros a los 30 minutos luego de la incubación con el sustrato y se evaluó Se, Sp y Kappa en relación a la técnica de referencia calculando los siguientes estadísticos del mismo modo que se describió en el capítulo 1, en el punto 3.3.c.

		Prueba de Referencia (MAC-ELISA protocolo original)	
		Positivo	Negativo
MAC-ELISA modificado	Positivo	a (Verdadero Positivo)	B (Falso Positivo)
	Negativo	c (Falso negativo)	D (Verdadero Negativo)

3.a.8. Determinación de anticuerpos neutralizantes para DENV y otros flavivirus por

PRNT₉₀: La mayoría de los arbovirus son capaces de formar placas de lisis al infectar cultivos de diversas líneas celulares. El objetivo de esta técnica consiste básicamente en la cuantificación de anticuerpos neutralizantes presentes en el suero para lo cual se enfrentan diluciones seriadas de la muestra de suero a estudiar, con una concentración adecuada y constante de virus. Si el suero contiene anticuerpos neutralizantes se inhibirá la acción del virus y la aparición de las unidades formadoras de placas (UFP) esperadas en la prueba[124]. La línea celular Vero C76 es un linaje continuo de células epiteliales de riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*. Esta línea celular se halla disponible en el Banco de células del INEVH y procedentes de la American Type Culture Collection (ATCC CCL 81 <http://www.lgcpromochem-atcc.com>)

y fueron replicadas utilizando medio de crecimiento (MC) conformado por: medio esencial mínimo de Eagle Earle (EMEM) (Gibco) suplementado con 10 % de suero fetal bovino inactivado (SFB), 1% de penicilina y estreptomicina (P+S) (10.000 unidades/ml penicilina- 10 m/ml streptomycin en 0,9% de NaCl) y 1 % de L-Glutamina (200 mM). Dicha línea celular fue utilizada entre los pasajes 32 y 40. Se utilizaron monocapas celulares de 48 horas de edad, sembradas en placas de 12 pocillos (150.000 células /ml) y fueron mantenidas a 37 °C en estufa con ambiente al 4 % de CO₂. A las 48 hs y previo a comenzar a trabajar se observaron los cultivos para constatar que tuvieran aproximadamente un 80 % de confluencia de la monocapa celular y estuviesen libres de contaminación.

La descripción completa de la metodología de PRNT₉₀ se encuentra en el Anexo 7. Brevemente, las muestras de suero fueron procesadas en dos diluciones: 1/10 y 1/20 de manera de realizar un tamizado inicial frente al stock viral de una cepa de referencia del serotipo DENV-1(DENV-1 HAW#1) y así complementar el diagnóstico realizado por IgM. Las diferentes diluciones de suero se enfrentaron con una cantidad fija de virus, aproximadamente 100 UPF. Para esto las semillas virales fueron preparadas y tituladas previamente como se describe en el Anexo 2 y a su vez se realizó una titulación simultánea en cada prueba de PRNT para poder realizar los cálculos del valor de corte de la prueba y determinación del título de anticuerpos neutralizantes en cada muestra de suero. El título de anticuerpos neutralizantes se consideró como la inversa de la máxima dilución que neutraliza el 90% de las partículas virales empleadas en la prueba. En la figura 28 se describe el algoritmo de aplicación e interpretación de resultados de la determinación de IgM y PRNT₉₀ para DENV-1

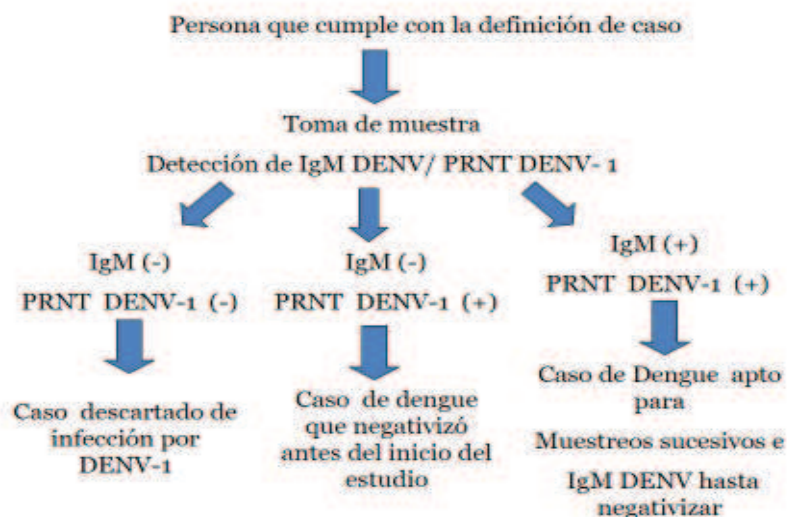


Figura 28. Esquema de trabajo en los distintos pacientes evaluados de acuerdo a los resultados de los test serológicos IgM DENV y PRNT₉₀ para DENV-1.

El mismo protocolo de PRNT fue empleado cuando se realizaron evaluaciones simultáneas del título de anticuerpos neutralizantes para DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, SLEV, YFV, ZIKV y WNV para confirmación diagnóstica por demostración de seroconversión en muestras pareadas. En estos casos, para la interpretación de resultados, se ha considerado que el agente infectante es aquel que presenta un aumento de título en al menos 2 diluciones y su título supera en dos diluciones a los demás flavivirus evaluados, dado en el contexto de un patrón de respuesta inmune primaria (títulos PRNT₉₀ en muestra aguda ≤ 160 , títulos en muestra convaleciente < 1280). Cuando el patrón de respuesta inmune muestra títulos elevados en la primera (títulos en muestra aguda > 160) y segunda muestra (títulos ≥ 1280) se considera un patrón de respuesta típico de infección secundaria[127] y no pueden interpretarse los resultados por la existencia del pecado original y la posibilidad de que los títulos más altos en realidad estén reflejando la primer infección (se clasifica el caso como “confirmado flavivirus”)

3.b. Evaluación de la reactividad cruzada en IgM DENV y otros flavivirus con circulación en Argentina.

3.b.1. MAC-ELISA modificado y estandarizado para procesamiento en paralelo de DENV y otros arbovirus: La necesidad de ampliar la vigilancia de infecciones a otros flavivirus, evaluar en paralelo la presencia de anticuerpos frente a arbovirus de otras familias y medir también reactividad cruzada entre virus de una misma familia, determinó la búsqueda de variantes versátiles de la metodología original para detectar IgM que permitieran el procesamiento simultáneo de varios agentes en el tamizado inicial de una muestra. La consolidación de este tipo de pruebas es especialmente importante para la vigilancia de los virus transmitidos por artrópodos que pertenecen al menos mayoritariamente a 3 familias virales: *Togaviridae*, *Flaviviridae* y *Bunyaviridae* y es promovida por la Organización Panamericana de la Salud para la región de las Américas particularmente con la introducción del CHIKV detectada en 2013 en el Caribe y la introducción un tiempo después del ZIKV. Usando prototipos de virus de cada una de estas familias y un panel de sueros humanos con infección confirmada por distintos arbovirus, Martin y cols, del CDC evaluaron y estandarizaron una nueva versión del protocolo de MAC-ELISA capaz de ser aplicada a las distintas familias virales a vigilar. Determinaron que una dilución 1/400 del suero a evaluar y la medición de la reactividad de las muestras frente a antígenos negativos era lo más apropiado para detectar anticuerpos específicos usando una relación de Positivo/ Negativo ≥ 3 como valor de corte positivo[153].

Entre las modificaciones más destacadas que realiza el protocolo de Martin y cols, se destaca:

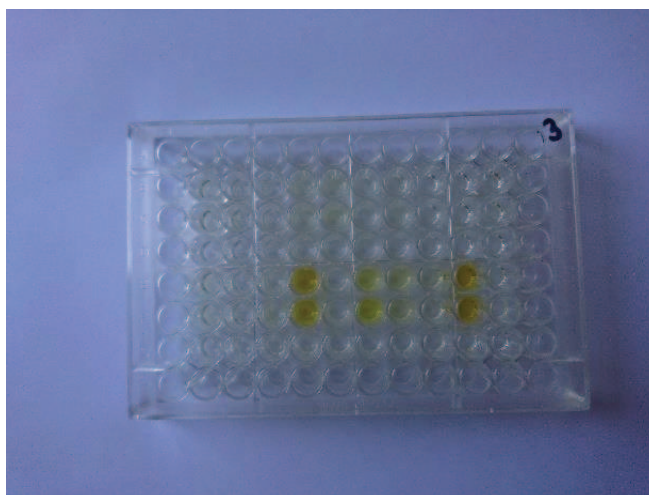
- ✓ Cambio de placas flexibles a placas rígidas de máxima absorción

- ✓ Dilución 1/400 para las muestras de suero a estudiar
- ✓ Comparación de la reactividad de la muestra frente a antígeno viral y antígeno negativo para detectar sueros con reacciones inespecíficas (Figura 29-a. Esquema de placa)
- ✓ El diluyente emplea leche descremada y tween en lugar de SHN extraído con acetona.
- ✓ Uso de TMB como sustrato, la reacción de color se detiene con solución STOP y se procede a la lectura de DO a 450 nm (Figura 29.b)
- ✓ Cambia la fórmula para cálculo de valor de corte e interpretación de resultados.

Otro de los aspectos superadores que plantea la nueva versión del MAC-ELISA es la utilización de los valores P/N como orientadores de la etiología del agente infeccioso dentro de cada familia viral, no obstante que continúa la observación de reactividad cruzada por lo que la determinación de IgM por esta metodología se sostiene como un criterio de infección probable que requiere confirmación. En el ANEXO 6 se describe el protocolo y los criterios para valores de corte e interpretación de resultados.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		M1 Ag +	M2 Ag +	M3 Ag +	M4 Ag +	M5 Ag +	M6 Ag +	M7 Ag +	M8 Ag +	M9 Ag +	M10 Ag +	
C		M1 Ag +	M2 Ag +	M3 Ag +	M4 Ag +	M5 Ag +	M6 Ag +	M7 Ag +	M8 Ag +	M9 Ag +	M10 Ag +	
D		M1 Ag -	M2 Ag -	M3 Ag -	M4 Ag -	M5 Ag -	M6 Ag -	M7 Ag -	M8 Ag -	M9 Ag -	M10 Ag -	
E		M11 Ag +	N1 Ag +	N2 Ag +	P Ag +	M12 Ag +	M13 Ag +	M14 Ag +	M15 Ag +	M16 Ag +	M17 Ag +	
F		M11 Ag +	N1 Ag +	N2 Ag +	P Ag +	M12 Ag +	M13 Ag +	M14 Ag +	M15 Ag +	M16 Ag +	M17 Ag +	
G		M11 Ag -	N1 Ag -	N2 Ag -	P Ag -	M12 Ag -	M13 Ag -	M14 Ag -	M15 Ag -	M16 Ag -	M17 Ag +	
H												

(a)



(b)

Figura 29. a) Esquema de uso de una placa de MAC-ELISA, muestras y controles por duplicado y frente a antígenos positivos y negativos. (b) Fotografía de una placa de MAC-ELISA realizada en el INEVH según protocolo de Martin y col, 2000 con M13 y M16 francamente positivos, además del control positivo en posición E5F5.

Este nuevo protocolo de MAC-ELISA fue utilizado para evaluar la reactividad cruzada de la detección de IgM con otros flavivirus en muestras de casos compatibles con dengue notificados en nuestro país. Se realizó una selección de muestras de suero de pacientes con etiología confirmada por diferentes flavivirus ya sea por detección de genoma viral y/o por seroconversión en neutralización en par serológico. Las muestras fueron procesadas en paralelo frente a los antígenos de DENV, SLEV, WNV, YFV y ZIKV y se han comparado luego los valores de P/N obtenido frente a cada antígeno.

3.b.2. Reactividad cruzada en la detección de IgM DENV en casos confirmados de dengue frente a los antígenos de SLEV, WNV, YFV y ZIKV: Se analizó la positividad en MAC ELISA al procesar en paralelo:

- 26 muestras de suero obtenidas en 2019 a partir de casos de dengue confirmados (10 pacientes con detección de genoma de DENV en muestra aguda y 5 casos confirmados por PRNT₉₀ en par serológico) para los 5 antígenos de flavivirus (DENV, SLEV, WNV, YFV y ZIKV). Se compararon los valores de P/N frente a los antígenos individuales habiendo descartado inespecificidad con antígeno negativo.
- Similar análisis se realizó en 10 muestras de suero obtenidas a partir de 5 pacientes notificados con sospecha de dengue pero cuyos valores de títulos de anticuerpos en la PRNT₉₀ frente a los virus DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4, SLEV, WNV, YFV y ZIKV no permitió diferenciar claramente este agente etiológico quedando clasificados como casos confirmados de

infecciones por “flavivirus”. Los valores de P/N y títulos de PRNT₉₀ se compararon con los obtenidos en los 5 casos con confirmación serológica de la infección por DENV.

3.b.3. Reactividad cruzada para DENV IgM en casos confirmados de infecciones por SLEV: Se compararon los valores de la relación P/N en 20 muestras de suero, LCR y plasmas obtenidas en 7 casos esporádicos de infecciones por este virus detectadas en 2019 en diversas provincias al mismo tiempo que ocurría circulación de dengue en nuestro país y en los que se descartó por serología la infección por DENV.

3.b.4. Reactividad cruzada para DENV IgM en casos confirmados de infecciones por ZIKV: Se analizó la reactividad en IgM en 22 muestras obtenidas a partir de casos con síndrome congénito por ZIKV detectados en 2016.

3.c. Bioseguridad en el procesamiento de laboratorio: El trabajo fue realizado en gabinetes de seguridad biológica clase II, utilizando buenas prácticas de laboratorio de nivel BSL 2. El lavador se dispuso en el interior del gabinete para proteger al operador de la generación de aerosoles. Las pruebas de PRNT₉₀ se realizaron en BSL2 ya que se emplearon virus quiméricos para SLEV y WNV y stock viral de la cepa vacunal para YFV.

4.RESULTADOS

4.1. Evaluación de persistencia de IgM DENV en Tucumán, 2009

4.1.a. Población accesible con criterios de inclusión y determinación seriada de IgM por método comercial: Al analizar los registros epidemiológicos de notificaciones se identificaron 101 casos en el área de estudio con las siguientes características: 67 pacientes con serología IgM en el momento epidémico, siendo 64 (95, 5%) personas mayores de 15 años y por otro lado, adicionalmente, 34 casos con diagnóstico clínico y nexos epidemiológicos sin estudios de laboratorio, haciendo un total de 98 casos de dengue con posibilidades de ingresar en el estudio. Las personas fueron contactadas e invitadas a participar en el estudio, cumpliendo la firma del informe de consentimiento para su incorporación formal.

Los casos en la provincia se detectaron hasta mayo de 2009 y el inicio de evaluación de persistencia de los anticuerpos IgM fue en agosto/septiembre del mismo año. Los resultados de IgM comercial en el primer muestreo se presentan en la Tabla 9.

Tabla 9: Distribución de los resultados de IgM por UMELISA dengue en el primer muestreo

Casos de dengue notificados- Tucumán, 2009	Muestra 1 (8- 9/2009)	Positivos IgM UMELISA / Total procesado (%)
Pacientes con estudio etiológico para DENV	64	32/ 64 (50%)
Casos determinados por clínica y nexos epidemiológico	34	8 / 34 (24%)

Se realizó la determinación de anticuerpos neutralizantes anti DENV-1 en los pacientes con el hallazgo de los siguientes resultados:

- 88,2% de los 34 casos identificados por clínica y nexos tuvieron títulos mayores a 20 con lo que se corrobora en ellos que fue correcta su clasificación como caso de dengue y se descarta el diagnóstico en 11,8 % de los casos cuyos títulos fueron menores a 10 (tabla 10).
- En 63/ 64 pacientes con estudios etiológicos para dengue en la epidemia, el 100% de los pacientes resultaron positivos, con títulos en el tamizado entre 10 (1/63) y mayor a 20, en los restantes 62 casos. Una muestra resultó no estéril, dentro del grupo IgM negativo en muestreo 1.

Tabla 10. Resultados de PRNT₉₀ DENV-1 en los pacientes captados en el transcurso del brote mediante clínica y nexos epidemiológico.

Nº pacientes (%)	Título PRNT ₉₀ DENV-1	Interpretación
4 (11,8)	<10	Infección por DENV-1 descartada
30 (88,2)	>20	Infección por DENV-1 remota

De los 34 casos captados por clínica y nexos, resultaron excluidos 26 al no cumplir con la detección de IgM para dengue en la Muestra 1. En consiguiente, se identificaron 72 personas que cumplían criterio de inclusión en el estudio, el 69 % de ellas del sexo femenino. En este grupo, 64 habían sido estudiados por laboratorio en el transcurso de la epidemia y 8 habían sido confirmados por nexos epidemiológico durante la epidemia 2009 en la provincia. La edad estuvo comprendida entre los 15 y 78 años, con una mediana de edad de 37 años. Del total de pacientes incluidos en el estudio, la IgM resultó positiva en el 56% (40/72) mediante el método UM ELISA en la muestra 1, estimándose, desde el inicio del estudio, un tiempo de

persistencia en promedio de 5.3 meses (3.7 – 6.9). Aquellos pacientes reactivos continuaron en el estudio y se procedió a la extracción de muestra de sangre y posterior análisis serológico una vez por mes.

Los resultados de IgM en las muestras según los meses de persistencia, evaluados en 11 muestreos sucesivos, se indican en la tabla 11 y se presentan gráficamente en la figura 30.

Tabla 11: Resultados según meses de persistencia medidos mediante método comercial. N=72.

Nº de muestreo	̄X meses de persistencia	Total de muestras analizadas	Positivos (% Positivo / n inicial)	Negativos	Abandona el estudio
1	5	72	40 (56)	32	.
2	6	40	23 (32)	15	2
3	8	23	16 (22)	7	.
4	9	16	15 (21)	1	.
5	10	15	13 (18)	2	.
6	12	13	13 (18)	0	.
7	14	13	9 (12)	4	.
8	15	9	9 (12)	0	.
9	16	9	7(10)	2	.
10	18	6	6 (8)	.	.
11	19	5	5 (7)	.	.

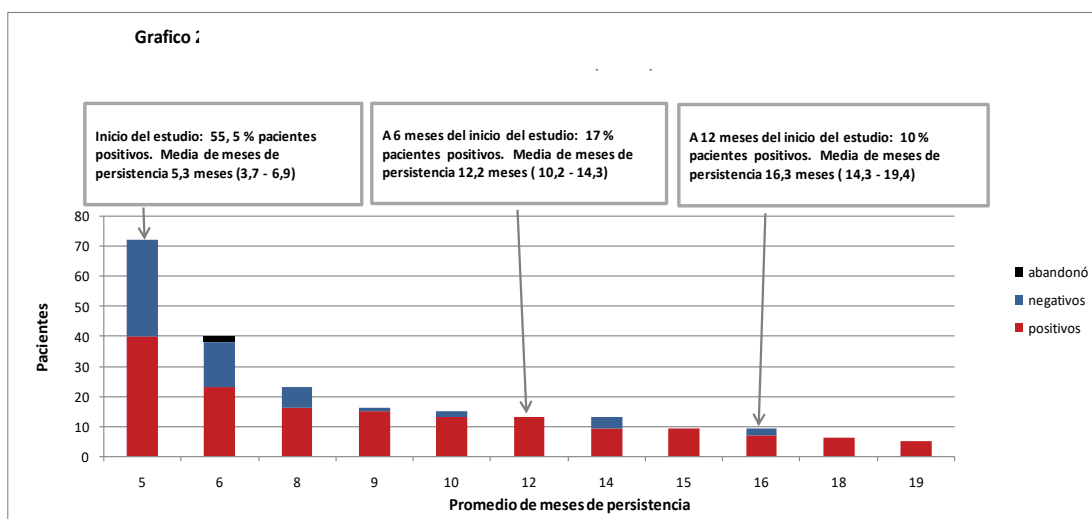


Figura 30. Distribución de los resultados de IgM dengue según promedio de meses de persistencia entre los meses de Agosto de 2009 y noviembre de 2010 (n= 72).

La mediana para los meses de persistencia fue de 6 meses y el promedio fue de 7.6 meses (Figura 31-A). La media aritmética de la persistencia de IgM evaluada por ELISA comercial expresada en días desde el inicio del cuadro clínico fue de 228 días, IC 95 203 – 253.

Luego del sexto muestreo, equivalente en promedio a 12 meses a partir de la fecha de inicio de síntomas (FIS), se detectó que el 18 % (13/72) de los pacientes permanecían positivos para anticuerpos IgM dengue, determinándose de esta manera la existencia de un grupo de pacientes que superaron el año de seropersistencia. En el noveno ciclo de toma de muestras equivalente en promedio a los 16 meses a partir de la FIS permanecieron seropersistentes el 10% (7/72) de los pacientes. Se demostró seropersistencia de IgM superior a 18 meses en 8,3% (6/72) de los casos estudiados y una tendencia al descenso en los valores de reactividad en el resultado de IgM (figuras 31- B y figura 32)

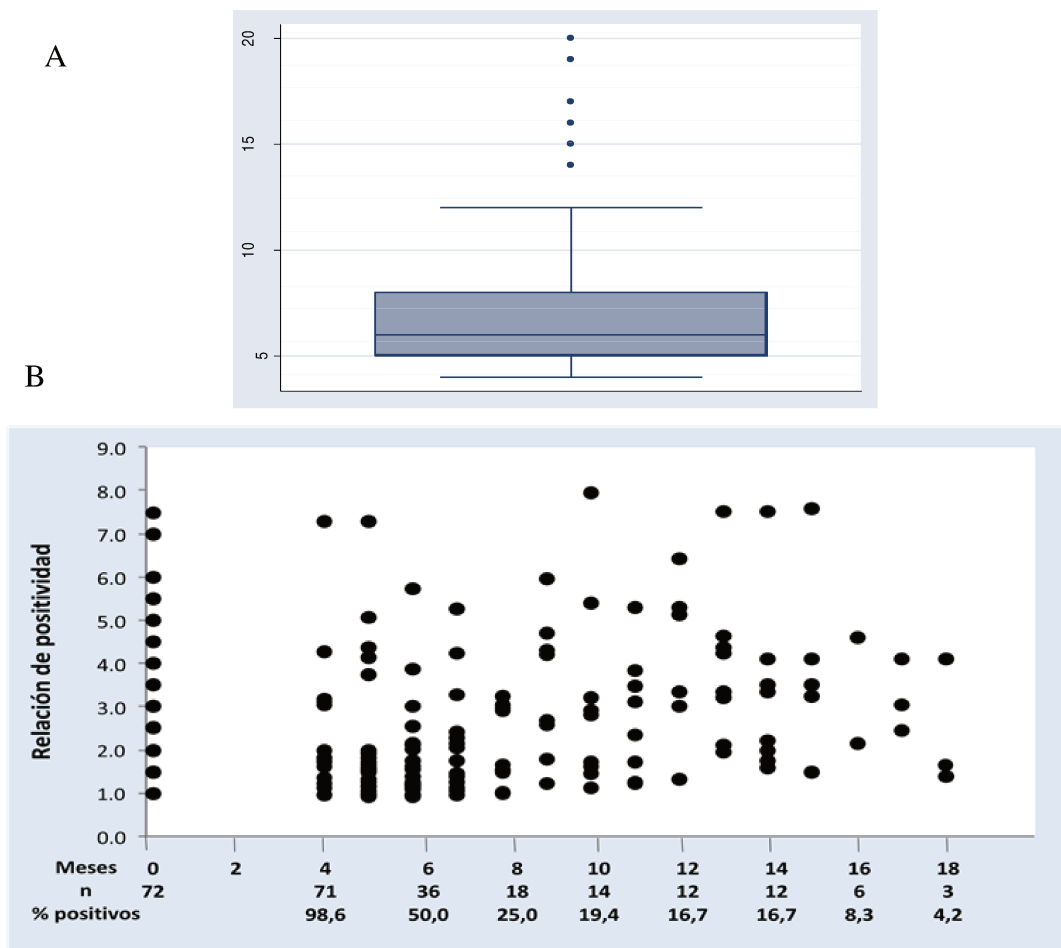


Figura 31. (A) Mediana de la persistencia de IgM (B) Relación de positividad obtenida por UM ELISA para la IgM dengue en los diferentes pacientes en cada muestreo de seguimiento durante el período de estudio.

A pesar que el método UM-ELISA no es un método diseñado para cuantificar resultados, se observó que podría haber una relación inversa entre la Rp y el tiempo. Como puede observarse en la figura 32, la Rp descende a medida que transcurre el tiempo. También puede observarse que la pendiente negativa es mayor en el grupo de pacientes con menos de 12 meses de seropersistencia (grupo 0) y el grupo cuya seropersistencia superó los 12 meses (Grupo 1). Es destacable que además los valores de Rp iniciales son mayores en el grupo de pacientes seropersistentes a más de un año (Grupo 1).

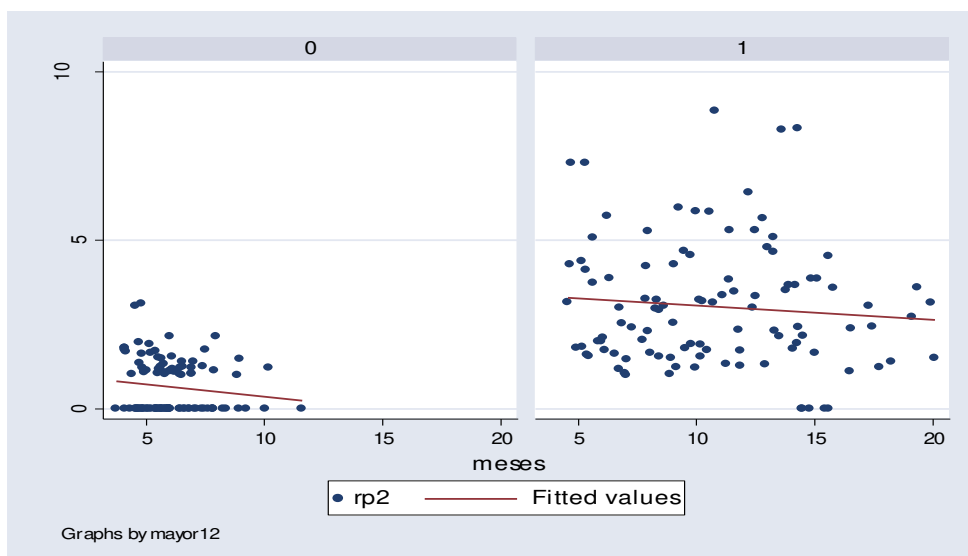


Figura 32. Relación de Rp en función del tiempo según grupo de pacientes: no seropersistente (grupo 0) y seropersistentes IgM dengue (grupo 1)

4.1.b. Optimización de las condiciones del protocolo original del MAC-ELISA DENV: Se compararon los valores de Densidad Óptica (DO) a los 30 minutos para el panel de evaluación y luego de aplicar los valores de corte, se determinaron las muestras positivas y negativas mediante los 3 protocolos y se calcularon los correspondientes valores de Sensibilidad y Especificidad. Los resultados se muestran en la figuras 33.

Los valores de DO obtenidos en los protocolos 1 y 2 fueron comparables, aunque ligeramente inferior a los obtenidos con la técnica de referencia, por lo que se decidió sostener las condiciones iguales para afectar la Se. Los valores obtenidos en el protocolo 3 resultaron inferiores a los de los demás protocolos, requiriendo un mayor tiempo de desarrollo del color para la obtención de una mayor Se (Se-30 mins = 60 %, Se- 60 mins = 74%, datos no incluidos). En la Tabla 12 se presentan la variación de los valores de Se, Sp y K para los 3 protocolos evaluados con cambio de condiciones.

Tabla 12. Valores de Se, Sp y K calculado para cada protocolo a los 30 minutos luego de la incubación del sustrato.

Protocolo	Se (%)	Sp (%)	Índice Kappa
1	91	100	0,91
2	60	100	0,60
3	88	100	0,88

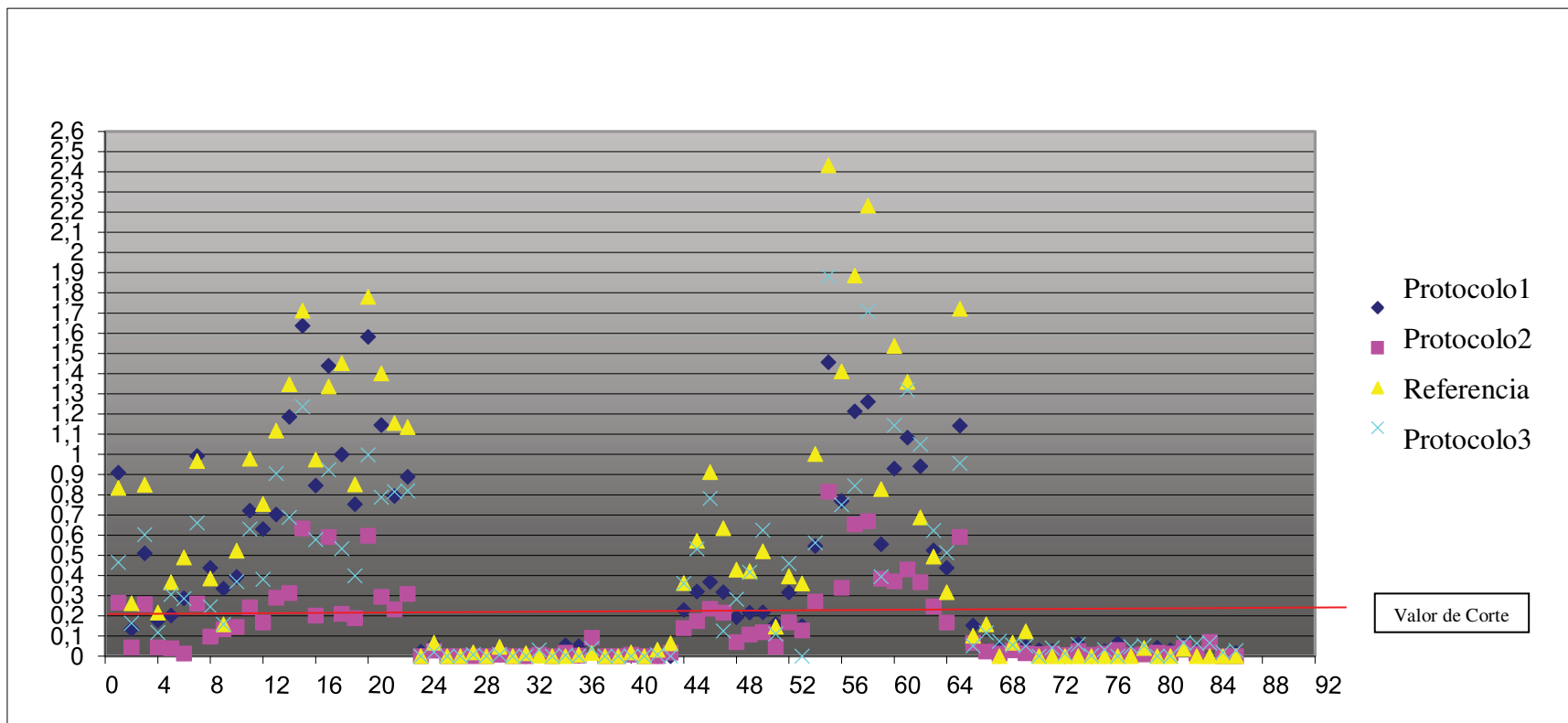


Figura 33. Representación de los valores de densidades ópticas (DO) medida a los 30 minutos a temperatura ambiente luego de la incubación del sustrato

4.1.c. Valoración de la seropersistencia IgM DENV medido por el método de referencia: definido que el protocolo de MAC ELISA original era el de mayor sensibilidad, se mantuvieron esas condiciones y se procedió a procesar las muestras disponibles correspondientes a cada muestreo de evaluación de seropersistencia. Por cuestiones de logística con la convocatoria de los pacientes en los sucesivos muestreos, el planteo del trabajo fue procesar por MAC-ELISA aquellos casos positivos e indeterminados en IgM por el kit comercial y eso no permitió evaluar el desempeño del MAC-ELISA en el grupo de los negativos en cada muestreo (en el primer muestreo se estudiaron 33 negativos por UMELISA, determinando 15% de discordancia con 5 positivos/33). Por otro lado, un pequeño porcentaje de las muestras no pudo ser evaluado por resultar el volumen agotado en el procesamiento por kit comercial en la provincia. En la tabla 13 se muestra la distribución de positividad y los porcentajes de persistencia a lo largo del tiempo del estudio y en la figura 34 se muestra la proporción de resultados positivo/negativo en cada muestreo.

Tabla 13. Resultados según meses de persistencia corroborado por el método de referencia MAC-ELISA.
N=68

Nº de muestreo	Detección de IgM DENV MAC-ELISA				
	× meses de persistencia	Total de muestras analizadas	Positivos	Negativos	% Pacientes c/Persistencia (Positivos / n inicial . 100)
1	5	68	32	36	47,1
2	6	29	14	15	20,6
3	8	18	11	7	16,2
4	9	13	6	7	8,8
5	10	9	3	6	4,4
6	12	12	5	7	7,4
7	14	11	2	9	2,9
8	15	7	1	6	1,5
9	16	2	0	2	0

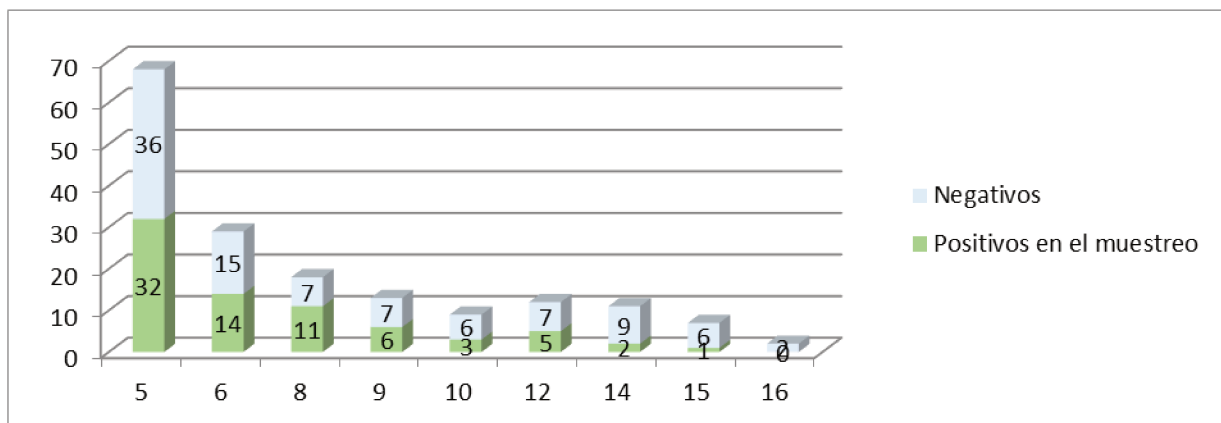


Figura 34. Relación entre pacientes IgM positivos vs negativos medidos por MAC ELISA en función de los meses desde el inicio de la sintomatología

Al comparar los resultados obtenidos por los dos métodos de ELISA, se observa que al inicio del estudio, la positividad IgM fue del 47,1% por MAC-ELISA vs. 55,5% por UM-ELISA; hacia el sexto muestreo, la positividad IgM fue del 7,4% por MAC-ELISA vs. 18% por UM-ELISA y a los 15 meses del inicio, la positividad IgM fue del 1,5% por MAC-ELISA vs. 12,0 % por UM-ELISA

4.2. Reactividad cruzada DENV y otros flavivirus con circulación en Argentina por el método de MAC-ELISA optimizado para arbovirus.

4.2.a. Comparación de la reactividad frente a los antígenos de SLEV, WNV, YFV y ZIKV en pacientes con infección confirmada por DENV: En 26 muestras de suero correspondientes a casos de dengue con IgM frente al antígeno de DENV con niveles P/N (media 19.4, IC 95 17.9-21.9) , se determinaron niveles de positividad para YF en el 96% (24/25, 1 muestra no procesada, media 8.6 e IC95 4.03- 13.2), para WN en el 84% (21/25, media 6.1 e IC95 4.2- 8.8, 1 muestra no procesada, 1 negativo y 3 con valores intermedios), para SLEV en el 96% (24/25, media 11 e IC 95 4.7-17.2, 1 muestra no procesada, 1 muestra negativa) y para ZIKV en el 44% (11/25, media 3.2 e IC 2.1-4.3, 1 muestra no procesada, 7 muestras indeterminadas y 8 negativas). En todos los casos el valor de P/N fue superior frente al antígeno de DENV (Tabla 14 y Figura 35).

En las 8 muestras de los 4 pacientes que fueron clasificados como infección confirmada por flavivirus, se observa que a pesar de la amplia reactividad en la PRNT₉₀, los valores de P/N se mantienen en mayor reactividad P/N para DENV en la IgM (TABLA 15, Figura 36). El paciente 102917 que tiene valor P/N similar frente a DENV y SLEV en el MAC-ELISA, no tiene anticuerpos neutralizantes para SLEV. Todos los pacientes muestran anticuerpos

neutralizantes en alto título para más de un serotipo de DENV y menor reactividad con otro flavivirus.

4.2.b. Reactividad cruzada por DENV en casos confirmados de infección por SLEV: Se compararon los valores de la relación P/N en 20 muestras (18 sueros y 2 LCR) obtenidas en 7 casos esporádicos de infecciones por este virus que se detectaron en 2019 en diversas provincias al mismo tiempo que ocurría circulación de dengue en nuestro país y en los que se descartó la infección por DENV por PRNT₉₀. Los resultados se muestran en la TABLA 16. Los valores para P/N en estos pacientes frente al antígeno de SLEV tuvieron un valor medio de 19.3 con IC95 17.1- 21.6 y frente al antígeno de DENV, la media de P/N fue de 3.8 con IC95 2.8-4.9 (figura 12). En 14/20 (70%) muestras analizadas se observó reactividad > 3 frente al antígeno de dengue, lo que habría llevado a una etiología errónea si no se evaluaban los demás virus de la familia y no se procedía a la confirmación en par serológico. En 1/20 se obtuvo un resultado indeterminado y sólo en 5/20 los resultados fueron negativos en IgM anti DENV. Al procesar en paralelo las muestras frente a ambos antígenos, los valores P/N fueron superiores para SLEV en todos los casos (Figura 37).

La evaluación de anticuerpos neutralizantes permitió demostrar que las reacciones observadas en IgM correspondían a reactividad cruzada, ya que los pacientes sólo tenían anticuerpos en PRNT para SLEV en un perfil de respuesta inmune primaria.

4.2.c. Reactividad cruzada con DENV en pacientes con infección confirmada por ZIKV: Se analizó la reactividad frente al antígeno de dengue en muestras de madres (11) y recién nacido (11) correspondientes a 10 casos de síndrome congénito por ZIKA confirmados entre 2016 y 2017 en Argentina. Se encontró positividad IgM para DENV en 4 / 14 (28.6%) muestras positivas en IgM para ZIKV. Los resultados se muestran en la tabla 17 y se puede visualizar comparación de valores P/N en la figura 38.

Tabla 14. Comparación P/N frente a los antígenos de YF, SLE, WNV y ZIKV en casos confirmados de infecciones por DENV.

ID	Nº de muestra	Fecha Muestra	Días de Evolución	Fecha Inicio Síntomas	P/N DENV	P/N YFV	P/N WNV	P/N SLEV	P/N ZIKV	Clasificación del caso por resultados previos
102809	133554	18/4/2019	4	14/4/2019	24,0	6,3	5,0	8,4	5,4	Caso confirmado DENV- PCR +
	133555	19/4/2019	5		22,7	10,5	5,6	8,6	10,5	
	133556	24/4/2019	10		25,3	6,2	4,8	8,0	4,1	
102733	133428	8/4/2019	9	30/3/2019	19,0	6,4	4,0	7,6	2,2	Caso confirmado DENV- PCR +
	133429	12/4/2019	12		18,0	6,2	4,8	7,6	2,2	
	134209	11/6/2019	19		19,7	NH*	11,4	9,8	NH	
102587	133193	14/3/2019	6	9/3/2019	16,4	3,3	NH	NH	<2	Caso confirmado DENV- PCR +
102606	133224	11/3/2019	5	7/3/2019	21,0	8,5	5,2	10,0	<2	Caso confirmado DENV- PCR +
102606	133225	19/3/2019	13	7/3/2019	23,2	9,8	7,9	13,0	2,5	
103313	134306	20/5/2019	6	15/5/2019	14,2	8,0	4,8	10,0	<2	Caso confirmado DENV- PRNT
	134307	4/6/2019	21	15/5/2019	10,5	7,2	3,4	8,1	<2	
102863	133651	29/4/2019	7	23/4/2019	26,9	9,0	4,8	10,1	3,0	Caso confirmado DENV- PCR +
103131	134024	3/5/2019	6	28/4/2019	11,4	4,6	2,9	6,3	<2	Caso Confirmado DENV-1. PRNT +
	134025	17/5/2019	20		14,1	6,6	3,5	8,9	2,3	
102589	133197	11/3/2019	S/D	S/D	28,6	4,6	2,7	7,9	<2	Caso Confirmado DENV- PCR +
103153	134051	17/5/2019	7	11/5/2019	22,6	10,2	16,9	9,0	5,9	Caso Confirmado DENV- PCR +
103013	133860	17/5/2019	6	12/5/2019	20,3	16,7	8,5	11,9	3,2	Caso Confirmado DENV- PCR +
102416	132942	22/2/2019	9	14/2/2019	27,2	4,5	9,2	6,0	2,7	Confirmado DENV-1 por PRNT +
	133017	1/3/2019	16		18,7	6,0	9,1	7,4	4,4	

ID	N° muestra	Fecha de Muestra	Dias Evol	Fecha Inicio síntomas	P/N DENV	P/N YFV	P/N WNV	P/N SLEV	P/N ZIKV	Clasificación del caso por resultados previos
102720	133410	4/4/2019	7	29/3/2019	17,6	3,9	2,8	5,0	3,3	Confirmado DENV-1 por PRNT +
	133588	22/4/2019	25		23,6	6,7	3,7	12,5	2,7	
102232	132687	28/1/2019	S/D	S/D	7,9	3,2	3,1	5,7	<2	Confirmado DENV- PCR +
102463	133015	1/3/2019	16	14/2/2019	17,1	7,5	10,3	8,4	9,4	Confirmado DENV-1 por PRNT
	133233	20/3/2019	35		26,5	4,8	20,1	10,3	8,5	
102605	133222	9/3/2019	6	4/3/2019	4,7	<2	<2	<2	<2	Caso Confirmado DENV- PCR +
	133223	19/3/2019	16		22,5	6,9	3,4	6,1	2,8	

* NH= No hecho

Tabla 15. Resultados de P/N para cada flavivirus y PRNT₉₀ en par serológico de casos clasificados confirmados DENV/ confirmado flavivirus

ID	N° de muestra	Fecha Muestra	Fecha Inicio Síntomas	Días de Evolución	IgM (P/N)					PRNT ₉₀								Clasificación del caso por resultados previos
					DENV	YFV	WNV	SLEV	ZIKV	YFV	WNV	SLEV	ZIKV	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	
102416	132942	22/2/2019	14/2/2019	9	27,2	4,5	9,2	6,03	2,7	<20	<20	<20	<20	320	20	40	20	CONFIRMADO DENV-1
	133017	1/3/2019		16	18,7	6,0	9,1	7,4	4,4	<40	<40	<40	<40	>1280	80	160	40	
102463	133015	1/3/2019	14/2/2019	16	17,1	7,5	10,3	8,4	9,4	<20	<20	<20	<20	>640	80	160	20	CONFIRMADO DENV SIN SEROTIPO
	133233	20/3/2019		36	26,5	4,8	20,1	10,3	8,5	<40	<40	<40	<40	640	40	80	<40	
103178	134090	28/5/2019	23/5/2019	6	13,4	6,5	4,2	6,5	3,2	20	<20	<20	<20	40	20	20	<20	CONFIRMADO DENV-1
	134209	11/6/2019		19	19,7	NH	11,4	9,8	NH	80	40	40	40	320	80	80	40	
103313	134306	20/5/2019	15/5/2019	6	14,2	8,0	4,8	10,01	<2	40	160	40	20	>640	>640	>640	>640	CONFIRMADO FLAVIVIRUS
	134307	4/6/2019		20	10,5	7,2	3,4	8,1	<2	<40	40	<40	<40	>1280	640	>1280	80	
103114	134000	21/5/2019	5/5/2019	17	23,1	NH	15,1	8,9	NH	320	80	20	<20	>640	>640	>640	320	CONFIRMADO FLAVIVIRUS
	134001	28/5/2019		24	10,4	8,3	6,9	5,2	6,7	320	<40	<40	<40	>1280	>1280	>1280	320	
103131	134024	3/5/2019	28/4/2019	6	11,4	4,6	2,9	6,3	<2	80	<20	<20	<20	160	<20	<20	<20	CONFIRMADO DENV-1
	134025	17/5/2019		20	14,1	6,6	3,5	8,9	2,3	80	<40	<40	<40	640	160	160	80	
102835	133603	25/4/2019	S/D	S/D	19,9	7,6	4,1	10,0	<2	>640	40	<20	<20	>640	>640	>640	20	CONFIRMADO FLAVIVIRUS
	133602	16/4/2019		S/D	20,1	8,3	5,8	13,1	<2	640	<40	<40	<40	>1280	>1280	160	40	
102917	133728	30/4/2019	22/4/2019	9	26,4	22,6	14,5	26,6	9,0	>640	<20	<20	<20	>640	80	80	20	CONFIRMADO FLAVIVIRUS
	134120	20/5/2019		29	22,0	9,7	7,9	14,1	3,7	640	<40	<40	<40	>1280	320	160	80	
102720	133410	4/4/2019	29/3/2019	6	17,6	3,9	2,8	5	3,3	<40	<40	<40	<40	80	<40	<40	<40	CONFIRMADO DENV-1
	133588	22/4/2019		24	23,6	6,7	3,7	12,5	2,7	<20	<20	<20	<20	640	80	80	20	

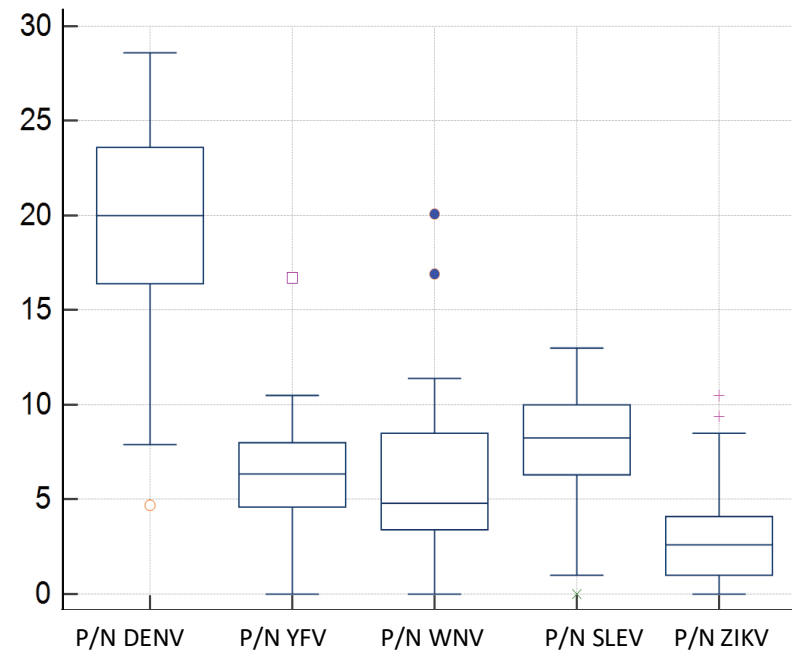


Figura 35. Comparación de valores de valores medios de DO correspondiente a P/N y medida de la dispersión obtenida frente a los antígenos de DENV, YFV, SLEV, WNV y ZIKV en muestras de suero de casos de dengue notificados en 2019.

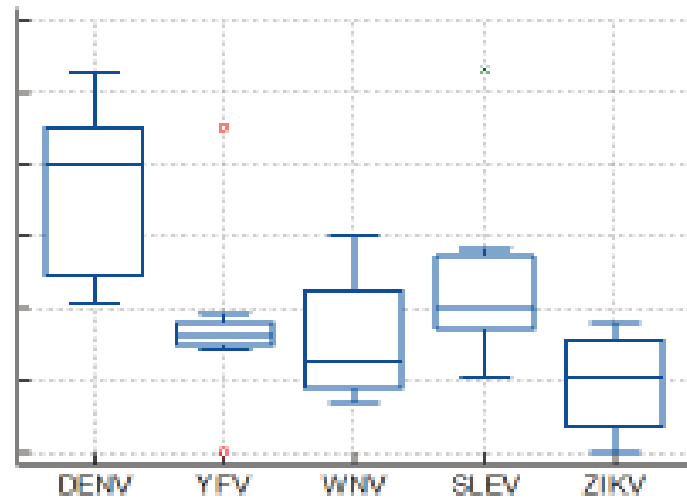


Figura 36. Comparación de valores de valores medios de DO correspondiente a P/N y medida de la dispersión obtenida frente a los antígenos de DENV, YFV, SLEV, WNV y ZIKV de muestras de suero de casos pacientes clasificados como “FLAVIVIRUS” por los resultados PRNT₉₀ en 2019 comparando la reactividad.

TABLA 16. Resultados MAC ELISA y PRNT₉₀ EN CASOS CONFIRMADOS SLEV frente a DENV, SLEV, WNV y ZIKV

ID Paciente	Provincia	Tipo Muestra	Días. Evol.	Resultados MAC ELISA IgM					Título PRNT ₉₀							
				P/N DEN	P/N YFV	P/N WN	P/N SLE	P/N ZIK	YFV	WN	SLE	ZIK	D1	D2	D3	D4
102551	BUENOS AIRES	SUERO	S/D	<2	2,8	5,5	17,9	<2	<20	20	160	<20	<20	<20	<20	<20
		LCR	S/D	3,2	5,0	7,1	20,6	2,6	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH
		SUERO	S/D	<2	2,5	12,4	30,6	<2	<40	<40	160	<40	<40	<40	<40	<40
		PLASMA	S/D	<2	2,6	11,9	30,2	<2	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH
102434	SANTA FE	SUERO	8	3,7	4,7	3,9	16,3	< 2	<20	<20	20	<20	<20	<20	<20	<20
		SUERO	15	5,3	6,7	4,1	16,4	< 2	<40	<40	160	<40	<40	<40	<40	<40
102802	ENTRE RIOS	SUERO	2	5,8	5,4	5,1	21,6	2,3	<20	<20	160	<20	<20	<20	<20	<20
		SUERO	5	7,8	6,2	8,6	20,4	< 2	<40	<40	320	<40	<40	<40	<40	<40
		SUERO	12	7,1	5,3	4,2	16,0	< 2	NH	<20	160	NH	NH	NH	NH	NH
		LCR	1	<2	3,2	5,5	20,6	< 2	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH
102699	ENTRE RIOS	SUERO	19	3,7	3,5	7,0	27,9	< 2	<20	20	80	<20	<20	<20	<20	<20
		SUERO	7	2,9	4,3	3,7	15,7	3,0	<40	<40	80	<40	<40	<40	<40	<40
		SUERO	S/D	< 2	2,7	< 2	15,9	< 2	NH	20	320	NH	NH	NH	NH	NH
102333	SANTIAGO DEL ESTERO	SUERO	8	4,0	4,0	5,0	16,7	< 2	<40	<40	<40	<10	<40	<40	<40	<40
		SUERO	19	8,0	3,5	7,0	17,1	2,8	<10	10	160	<10	<10	<10	<10	<10
102530	SANTA FE	SUERO	S/D	3,7	5,1	5,0	17,3	2,8	<20	<20	320	<20	<20	<20	<20	<20
		SUERO	S/D	5,0	6,0	5,7	15,8	3,6	<40	<40	320	<40	<40	<40	<40	<40
102412	BUENOS AIRES	SUERO	2	3,7	5,0	8,9	17,4	< 2	<20	20	80	<20	<20	<20	<20	<20
		SUERO	14	3,3	4,8	5,9	14,4	2,2	<40	<40	320	<40	<40	<40	<40	<40
		SUERO	2	4,2	4,9	9,8	17,9	4,3	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH

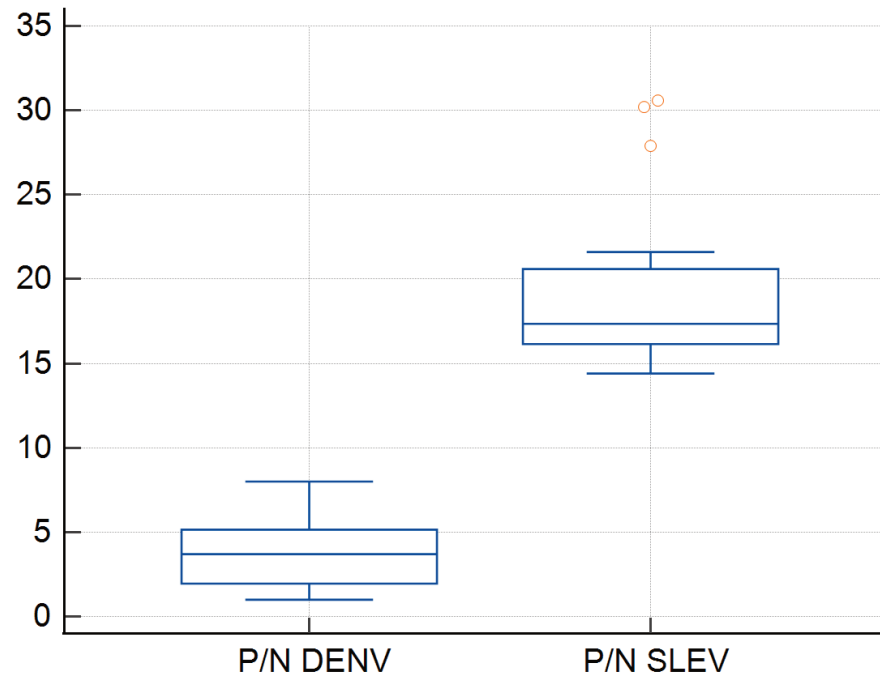


Figura 37. Comparación de valores medio e intervalos de confianza de la DO (P/N) frente a antígeno de SLEV vs DENV en MAC-ELISA SLEV VS DENV en muestras de pacientes CONFIRMADOS infección por SLEV

TABLA 17. Resultados de MAC- ELISA (antígenos ZIKV y DENV) y PRNT₉₀ para ZIKV, DENV- 1, 2, 3, 4, SLEV, WNV, YFV en 10 casos de recién nacido con síndrome congénito por ZIKV y sus madres. (2 hojas)

Caso	ID	Fecha de muestra	P/N MAC-ELISA		Título PRNT ₉₀							
			ZIKV	DENV	ZIKV	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	SLEV	WNV	YFV
1	Suero 1 madre	13/9/2016	5,6	2	>320	>320	80	160	20	40	>80	>80
	Suero 2 madre	S/F 18/11/16	2,2	<2	>80	>80	>80	>80	20	NH	NH	NH
	Suero 1 RN	S/F 18/11/16	5,3	<2	>80	>80	>80	>80	20	NH	NH	NH
2	Suero 1 madre	27/6/2016	11,9	3,9	>160	>160	>160	>160	80	20	20	>80
	Suero RN 1	25/11/2016	6,6	<2	>640	>640	80	80	40	<20	<20	20
3	Suero 1 madre	S/F 20/12/16	6,6	3,5	>640	<20	40	20	<20	40	40	<20
	suero 1 RN	S/F 20/12/16	4,7	3,4	>320	<10	10	10	<10	20	10	<10
4	Quisbert Marisol	s/d	3,3	NH	>640	20	20	<20	<20	20	<20	<20
	Quisbert Angel	s/d	13,3	NH	>640	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20

Caso	ID	Fecha de muestra	P/N MAC-ELISA		Título PRNT ₉₀							
			ZIKV	DENV	ZIKV	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	SLEV	WNV	YFV
5	S2 RN	S/F 22/12/16	2,7	<2	>320	20	10	<10	<10	<10	10	20
6	S1 Madre	05/10/2017	<2	<2	>640	<20	<20	<20	<20	<20	<20	20
	S2 Madre	S/F 10/11/17	<2	<2	>1280	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40
	S1 RN*	05/10/2017	10,7	15,7	2560	320	40	80	<20	<20	<20	40
	S2 RN	S/F 10/11/17	16,9	12,6	1280	80	40	40	<40	<40	<40	<40
7	S1 Madre	5/10/2017	2,8	<2	>640	<20	<20	<20	<20	<20	<20	<20
	S1 RN	5/10/2017	11,5	<2	>640	<20	80	<20	<20	<20	<20	<20
8	S1 madre	13/10/2017	<2	2,7	1280	320	320	80	40	<20	40	80
	S1 RN	13/10/2017	<2	<2	640	40	40	40	<20	<20	<20	<20
9	S1 madre	25/6/2017	9,91	2,9	320	20	20	20	<20	<20	320	<20
	S1 RN	24/10/2017	<2	<2	320	<20	40	<20	<20	20	160	<20
10	S1 madre	s/d	3,5	negativo	320	<20	<20	<20	<20	40	<20	<20
	S1 RN	s/d	3,8	negativo	160	<40	<40	<40	<40	<40	<40	<40

*Los datos clínicos y epidemiológicos sumados al laboratorio virológico determinaron la clasificación de síndrome congénito por ZIKV.

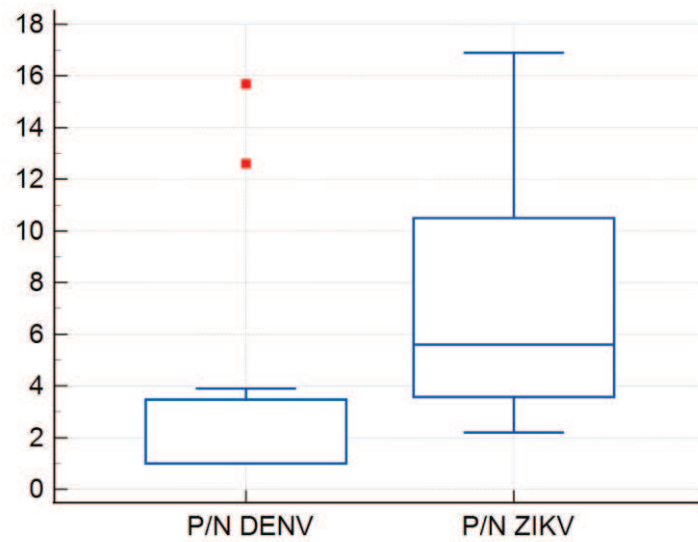


Figura 38. Comparación de los valores P/N ZIKV VS DENV (a) y de los valores medios (b) en los pacientes positivos en ZIKV en el grupo de síndrome congénito por Zika.

5.CONCLUSIONES:

En este capítulo se muestran resultados sobre persistencia de IgM en Argentina en mayores de 15 años en un período superior a lo clásicamente descripto. Este aspecto de la cinética de la IgM DENV tiene implicancia en la aplicación de esta determinación en programas de vigilancia cuando en un lugar se repiten año a año los brotes por este virus. El estudio fue realizado mediante 11 muestreos sucesivos en pacientes clasificados como casos de dengue durante la epidemia de DENV-1 en 2009 en la provincia de Tucumán. Se evidenció un 32% de positividad en IgM por un reactivo comercial de ELISA a los 6 meses, 18% al año y seropersistencia de IgM superior a 18 meses en el 8,3% (6/72), acompañado de una tendencia decreciente de los valores medidos de IgM. La media de positividad de la IgM por el método comercial fue de 228 días luego del inicio de los síntomas, con IC 95 de 203 – 253 días, el valor más bajo fue de 112 días y el más alto de 468 días (análisis realizado con el software MED CALC)

Este estudio muestra resultados compatibles aunque con porcentajes de seropersistencia inferiores a los determinados en el muestreo realizado en NOA luego de un brote por serotipo DENV-3 (30% de las personas eran positivas por MAC-ELISA IgM para DENV, persistencia de 390-490 días) y en trabajos publicados recientemente por otros grupos. En un estudio realizado en adultos con infección por el virus del dengue en Taiwán mediante el uso de 2 reactivos comerciales de ELISA para la medición de anticuerpos IgM, el 71% (31 de 44) tenía anticuerpos IgM contra la proteína de la envoltura detectable a los 6 meses después de la infección aguda, y el 46% (20 de 44) tenía IgM detectable a los 12 meses después del inicio, no encontrando diferencia entre sintomáticos y asintomáticos [168].

En 2009, durante la epidemia de dengue en la Provincia de Tucumán (entre SE 10 y el 21 de Mayo en que se cerró oficialmente el brote) se registraron 2083 casos de los que se confirmaron 409 como dengue autóctono. El total de casos importados fue 99, de los cuales 43 fueron confirmados[169]. En los Departamentos seleccionados para el estudio (Capital, Yerba Buena, Cruz Alta y Tafí Viejo) se registraron 315 casos confirmados, 208 por laboratorio y 107 por nexo epidemiológico. Entre el 17 de febrero y 21 de mayo de 2009, se detectaron 64 pacientes con resultados positivos IgM Dengue en el rango de edades entre 16 y 78 años de edad, siendo mujeres 43 (67.2%) de ellas. Por otro lado, se evaluaron además otros 34 pacientes clasificados casos de dengue por su cuadro clínico y nexo epidemiológico, con edades entre 16 a 76 años de edad y 25 de ellos del sexo femenino. Se realizó contacto telefónico a los voluntarios para participar en el estudio a partir del registro de casos confeccionado durante la epidemia. Se firmó un consentimiento informado y se solicitó que concurrieran una vez al mes para la toma de muestra de sangre en el Laboratorio de Virología

Provincial, donde se realizó inicialmente la detección de IgM por el método comercial Ultramicro ELISA (Tecnosuma Laboratories).

Luego de primera muestra post-brote y la detección de IgM realizada entre agosto-septiembre se descartaron 26 de los confirmados por nexos ya que su IgM DENV era negativa y 4 no tenían anticuerpos neutralizantes, por lo que no cumplían con el criterio de inclusión. Teniendo en cuenta el número de pacientes notificados por nexos, el 88,2% presentó anticuerpos neutralizantes para DENV-1 corroborando desde el laboratorio el diagnóstico realizado en base a la clínica y el nexo epidemiológico, pero sólo 8 (23,5%, 8/ 34) presentaron reactividad IgM al momento de iniciar el estudio. Podemos inferir que en el transcurso del brote de dengue en 2009 en Tucumán se produjo una ligera sobreestimación en la captación por clínica y nexo epidemiológico que podría haber sido en parte por la falta de experiencia en el reconocimiento médico de la patología ya que este fue el primer brote autóctono que atravesó la provincia.

La muestra final para el estudio se constituyó con 72 pacientes (64+8) de entre 15 y 78 años, con una mediana de edad de 37 años. El seguimiento de los participantes en el estudio se efectuó hasta que no se detectó IgM en el Laboratorio provincial. Todos los pacientes participaron hasta que IgM resultó negativa, aunque algunos asistieron a intervalos mayores que un mes. La evaluación de la reactividad en ELISA para detección de anticuerpos IgM evidenció que luego de una epidemia de dengue, el 10% de los pacientes fueron seropersistentes para IgM dengue medido por el método UM- ELISA por un lapso mayor o igual a 12 meses, lo cual sumado a la potencialidad de reacciones cruzadas entre los distintos flavivirus, hace necesaria la implementación de pruebas confirmatorias para el diagnóstico de certeza de dengue ante la aparición de un paciente sospechoso, particularmente, luego de un período interepidémico, cuando ese caso pudiera representar el inicio de un nuevo evento de transmisión viral. Las determinaciones de IgM se realizaron por una metodología comercial de ELISA en el nivel provincial ya que las metodologías comerciales son más sencillas de aplicar en laboratorios de baja complejidad y permiten la obtención de resultados en un corto plazo que posibilitan la orientación en las acciones de prevención y control.

En nuestro laboratorio pudimos corroborar la persistencia de los anticuerpos IgM por la técnica de referencia MAC- ELISA para DENV pero con una sensibilidad menor. Para este fin, dado que el protocolo de esta técnica fue desarrollado para un procesamiento que lleva 3 días de duración y usa un suero humano normal extraído con acetona en el diluyente complejizando aún más su implementación, analicé variantes en tiempos de incubación y composición del diluyente a fin de determinar si se podían realizar otras adaptaciones más prácticas del protocolo. Los resultados obtenidos indicaron la posibilidad de adoptar un protocolo acortado (1) de la técnica de referencia original cuando las circunstancias requieran obtener resultados con gran urgencia, con el conocimiento de que la técnica sufrirá ligeras

disminuciones de la sensibilidad (91% Se). El cambio del diluyente reduce ligeramente el valor de sensibilidad (88% Se) cuando el procedimiento se realiza en 3 días (2), pero baja más aún si además se opta por un protocolo acortado (3) (60%). El MAC-ELISA IgM dengue constituye una herramienta fundamental como técnica de tamizaje en los programas de vigilancia del dengue y dengue hemorrágico y en este trabajo de tesis, se ha evidenciado una vez más, que no deben modificarse los protocolos de trabajo sin su correspondiente evaluación.

La versión del MAC-ELISA DEN que se ha estandarizado posteriormente para evaluar la reactividad de varios flavivirus en simultáneo demuestra que esta determinación puede contribuir a la orientación del agente infectante de acuerdo a los datos obtenidos en la casuística analizada con infectados por dengue, encefalitis de San Luis y síndrome congénito por ZIKV. Este protocolo modificado ha sido una mejora de la metodología que ha sido publicada en el tiempo de desarrollo de esta tesis. Además de otros aspectos mencionados que facilitan su implementación, este nuevo protocolo incluye la evaluación de reactividad inespecífica por el efecto de la matriz en la que se prepara el antígeno viral y resulta importante su incorporación porque al evaluar varios agentes, no todas las cepas y virus utilizados poseen una multiplicación óptima en el mismo sustrato. En los casos de dengue confirmados, la relación de los valores P/N se presenta más elevada en el 100% de las muestras evaluadas, situación que se evidencia procesando en paralelo frente a los distintos antígenos de flavivirus con potencialidad de circulación en una región y por comparación de los valores. Es relevante notar el alto grado de reactividad de las muestras frente a los diferentes flavivirus evaluados, con valores interpretables positivos y que si hubieran sido procesados individualmente, llevarían a interpretaciones erróneas. En el caso de los infectados por DENV, la reactividad fue mayor frente al antígeno de SLEV, seguido de YFV, WNV y ZIKV en menor medida. Resultados similares se evidencian en los casos de SLEV y ZIKV que se han podido evaluar y comparar.

La complementación de resultados de MAC-ELISA IgM y la PRNT₉₀ con panel de flavivirus contribuye a la identificación del agente cuando se trata de patrones de respuesta inmune de infecciones primarias, pero tiene dificultades para definirse en los pacientes con patrón inmune secundario por los niveles elevados de IgG y la exacerbación de la reactividad cruzada. Resultaría interesante continuar profundizando la evaluación de la utilidad de IgM en la orientación del agente infectante en los pacientes que no se pueden definir la etiología por la PRNT₉₀, así como promover la búsqueda de nuevos formatos de ELISA con antígenos recombinante de alta especificidad como una alternativa más sencilla y descentralizable a un mayor número de laboratorios a fin de fortalecer la respuesta laboratorial en el nivel local.

CAPÍTULO 3

GENOTIPO Y FILOGENIA DE CEPAS DE DENV CIRCULANTES EN ARGENTINA

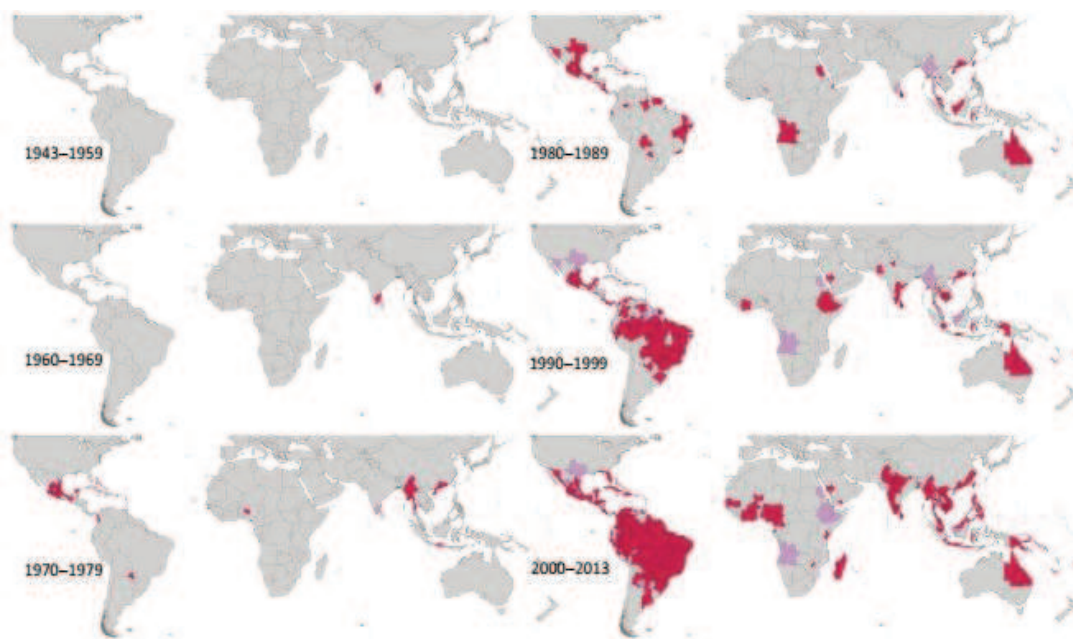
1. INTRODUCCIÓN:

El aumento de la transmisión global y la expansión de los cuatro serotipos de DENV se han asociado con incrementos en el número de infecciones anuales, la frecuencia de epidemias y la enfermedad clínica grave. Las manifestaciones clínicas del dengue y su gravedad dependen de varios factores, como la genética del virus y del huésped, así como exposición previa a infecciones heterotípicas por DENV [170].

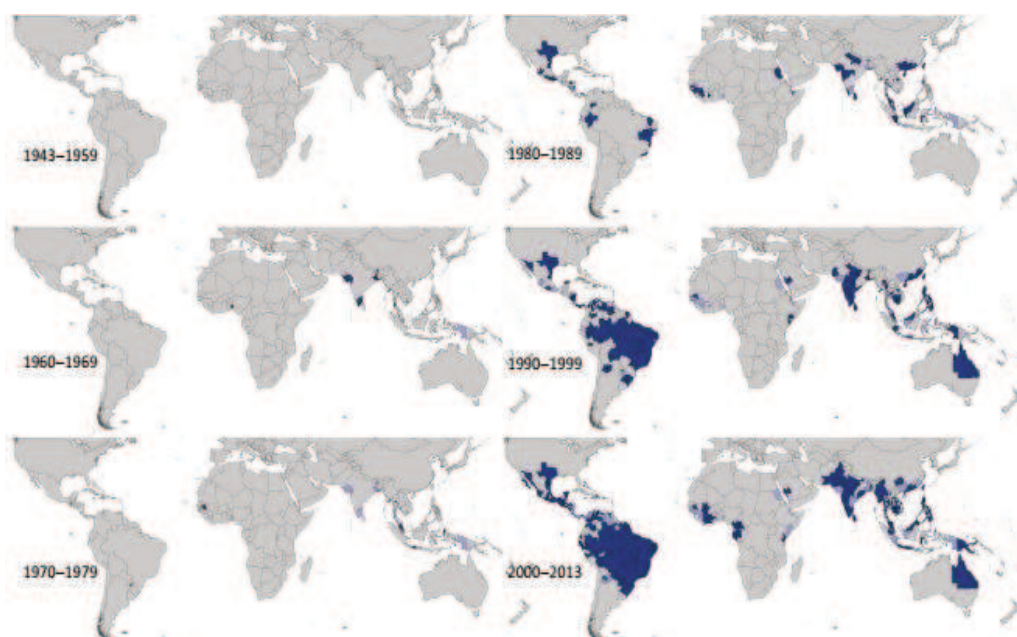
Durante la década de 1980 y principios de la de 1990, la incidencia del dengue en América fue relativamente estable, excepto en Cuba en 1981. Sin embargo, desde la década de 1990, las Américas han experimentado fuertes aumentos en el número de casos de dengue[171]. El serotipo DENV-1 no se notificó en América hasta 1977 cuando fue registrado en Barbados, Cuba, Antillas Francesas, Granada, Paraguay y Puerto Rico. Después de estos primeros sucesos, los informes aumentaron de forma persistente en toda la región durante las próximas décadas, con un registro casi continuo en Brasil, México y Puerto Rico en particular. Varios otros países de la región comenzaron a tener notificación sostenida en las décadas de 1980 y 1990, incluidos Colombia, Costa Rica, Guayana Francesa, Paraguay, Perú y Venezuela. La notificación de DENV-1 alcanzó su punto máximo en 2005-2006, principalmente atribuible a sucesos registrados en las Américas (Figura 39 a)[172]. El DENV2 se informó en las Américas a principios de 1953 en Trinidad y Tobago, pero la presentación continua de notificación en la región no comenzó hasta finales de la década de 1960 y a principios de la década de 1970, sobre todo en Puerto Rico. A partir de allí, cada vez más países latinoamericanos comenzaron a detectar DENV2, con informes continuos en Brasil que, desde 1984 representa la mayoría de informes de este tipo a nivel mundial. En la década de 1990, hubo un aumento del número de casos más graves en las Américas, posiblemente debido al reemplazo del genotipo americano de DENV2 por uno importado y más virulento desde Asia [80] (Figura 39 b) [172]. Los primeros informes en las Américas reportando el serotipo DENV-3 se produjeron en Puerto Rico en 1963, que continuó notificando este serotipo hasta 1978, y luego nuevamente de 1994 a 2008 debido a la introducción de un nuevo genotipo desde Asia [173]. La mayoría de los demás países de las Américas comenzaron a notificar el serotipo 3 a finales de la década de 1980 y principios del 2000 (Figura 39 c) [172]. DENV-4 no se informó en las Américas hasta 1981(Figura 39 d), cuando fue notificado en Brasil, Cuba, Dominica, Puerto Rico y las Islas Vírgenes de los Estados Unidos. Desde esa fecha, ha ocurrido notificación anual en la región, con especial frecuencia en Puerto Rico desde las décadas de 1980 a 1990, Venezuela y

Colombia desde la década de 1990, y Nicaragua, Brasil y Perú desde finales de la década de 1990 hasta mediados de la década de 2000 [172].

a) DENV-1



b) DENV-2



c) DENV-3



d) DENV-4

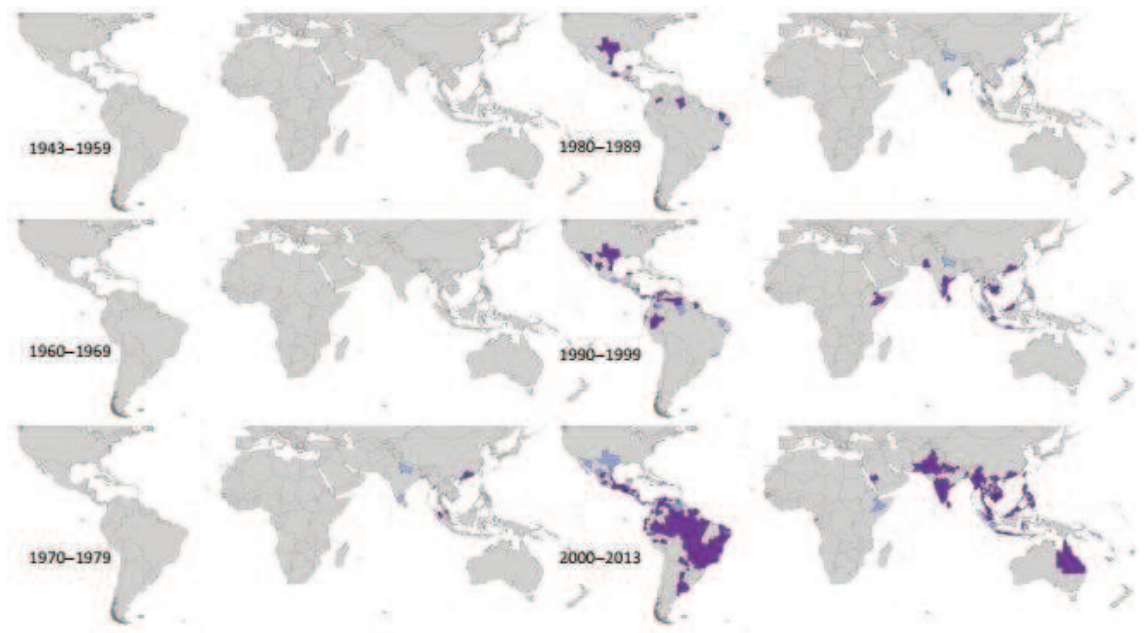


Figura 39. Casos de dengue por serotipo notificados a nivel global desde 1943 (a) DENV-1 (b) DENV-2 (c) DENV-3 y (d) DENV-4 (Figura modificada de Messina y col, 2014)

Cada serotipo de DENV consta de varios genotipos[174] (Figura 40) , que representan su gran diversidad genética y permiten el uso de la epidemiología molecular como herramienta para comprender su evolución, dinámica de transmisión o incluso diferencias en respuesta a antivirales o vacunas [173][26][175][176][177]. Los genotipos fueron planteados inicialmente para DENV-1 y DENV-2 considerando grupos de virus con una diferencia en sus nucleótidos no mayor al 6% en la unión de los genes E/NS1[174] que evolucionan a partir de un ancestro común, pero a medida que surgieron mayores estudios y secuencias, comenzaron a plantearse criterios diferentes. Otros estudios taxonómicos para DENV-2 reportan diversidad entre genotipos e intragenotipos de 7.3% y 2.6%, respectivamente, lo que ha llevado que se plantee la necesidad de una reevaluación de los criterios basados en la distancia. Debido a la falta de una definición formal, los investigadores han utilizado diferentes descripciones de genotipos ad hoc, lo que da como resultado inconsistencias con respecto al conjunto de genotipos y su composición[178]. Se ha determinado una mayor variación genética para DENV-2 seguido de DENV-3, DENV-1 y DENV-4, en ese orden. Datos obtenidos fundamentalmente en base a DENV-2 y DENV-3 sugieren que determinados genotipos poseen mayor virulencia y potencial epidémico. En los últimos años, el aumento de casos de dengue en las Américas se ha asociado, en parte, con la co-circulación de varios serotipos y el surgimiento de nuevos linajes, reemplazo, o co-circulación de diferentes clados en el mismo genotipo[26][179].

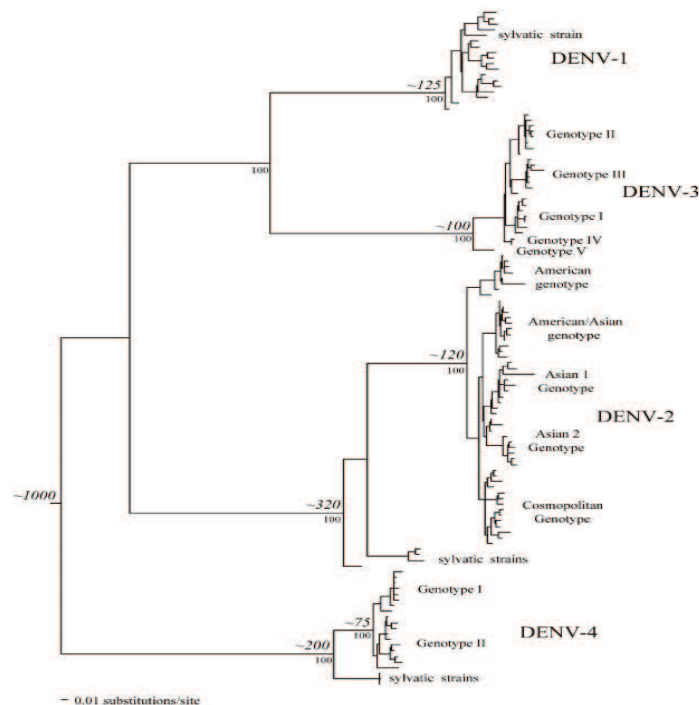


Figura 40. Filogenia de Máxima Verosimilitud de 120 secuencias del gen E (1485 pb) que representan la diversidad genética en el virus del dengue con genotipos y cepas selváticas para los cuatro serotipos de DENV (figura modificada de Holmes y Tweddy, 2003)

En Argentina durante 1997 se evidencia reintroducción del DENV en la provincia de Salta y, en 1998, se detecta el primer brote en la misma provincia por serotipo DENV-2 con 330 casos registrados[59][87]. A partir de ese año y hasta el año 2008, se registraron brotes esporádicos en las provincias del norte del país, especialmente durante los meses de noviembre a mayo y relacionados con la situación epidemiológica de países limítrofes. Hasta 1999 solo Salta registró brotes por este mismo serotipo, y posteriormente, en el año 2000 y relacionado a una intensa epidemia en Paraguay, se detecta DENV-1 en Formosa y Misiones con un total de 445 casos. En los años 2002 y 2003 se registraron brotes de igual o menor magnitud nuevamente en Salta y se identificaron los serotipos DENV-1, DENV-2, marcando el ingreso de DENV-3. El año 2004 se destacó por un brote que afectó Salta, Jujuy y Formosa con un total de 1.491 casos, identificándose el serotipo DENV-3 y la particularidad de que el brote comenzó en noviembre en la provincia de Salta sin haber notificación de casos en Bolivia. Luego de un año sin registro de brotes (2005), desde 2006 y hasta el 2008 se registraron brotes en Salta, Misiones, Formosa y Corrientes de escasa magnitud, predominando los serotipos DENV-2 y DENV-3 (34). En el período 1998 a 2008 se registraron 3.451 casos confirmados de dengue, de los cuales más del 70 % correspondieron a Salta, el 14.7 % fueron importados y el total de provincias afectadas fueron cinco. No se cuenta con reportes de formas graves o fallecidos por dengue para ese período[39].

Posteriormente, entre las semanas epidemiológicas (SE) 53 del 2008 a la 21 del 2009, se registró la primera epidemia de gran magnitud por serotipo DENV- 1. La primera localidad afectada fue Orán en la provincia de Salta y se vinculó al brote registrado en Bolivia desde la SE 48 del 2008 por el mismo serotipo. Resultaron afectadas 15 jurisdicciones (Salta, Jujuy, Catamarca, Tucumán, Santiago del Estero, La Rioja, Formosa, Corrientes, Chaco, Misiones, Entre Ríos, Santa Fe, Córdoba, Buenos Aires y Ciudad Autónoma de Buenos Aires) con 26.923 casos autóctonos, entre los cuales 3 se clasificaron como dengue hemorrágico y se registraron 5 fallecidos (tasa de letalidad de 1,85 casos por 10.000 casos autóctonos confirmados). Además se detectaron 987 casos importados en 16 jurisdicciones. La extensión del brote no fue homogénea espacial ni temporalmente. Los departamentos más afectados fueron Chacabuco e Independencia en Chaco y San Fernando del Valle de Catamarca, en Catamarca, con tasas superiores a 450 casos cada 10.000 habitantes. El brote comenzó por región NOA y en ella persistió mayor tiempo, mientras que la región NEA presentó un ascenso más tardío con un máximo en la SE 16 y una caída más abrupta, aportando más del 50 % de los casos a expensas fundamentalmente de la provincia del Chaco. Centro y Cuyo aportaron en conjunto el 7,6 % de los casos del país, comenzando en la SE 10. Los casos se registraron preponderantemente en las áreas más

pobladas del país y en aquellos departamentos con mayor proporción de hogares con Necesidades Básicas Insatisfechas[39].

En el período siguiente al brote del 2009 y hasta el año 2014, se sucedieron brotes de menor magnitud, en donde las localidades afectadas inicialmente fueron las limítrofes con países endémicos y con identificación de casos autóctonos aislados o brotes de escasa magnitud en diferentes provincias, con mayor participación de las provincias del Centro, e identificación de los cuatro serotipos. El límite del período epidémico osciló entre las SE 22 a 29 en esos años. En el segundo semestre del año 2009, se detectó un brote de dengue por serotipo DENV-1 a partir de la detección de un caso autóctono en la SE 50 en Puerto Iguazú, Misiones; que se extendió a 7 jurisdicciones con un total de 1338 casos para el año 2010. Durante ese año se identificó además la circulación de DENV-2 en el norte y se reportó el primer caso de DENV-4 en la provincia de Santa Fe. Los brotes registrados entre los años 2011 y 2012 comenzaron en la SE 6 y resultaron de menor magnitud. Se registraron un total de 332 y 275 casos para cada año respectivamente con identificación de los serotipos DENV-1, DENV-2 y DENV-3. En el año 2013 se registró un brote con 2.922 casos, con 17 localidades afectadas en 7 provincias que se inició en la SE 4 y en el que predominó el serotipo DENV-2, y se observó cocirculación de dos serotipos en Córdoba capital (DENV-1 y DENV- 4) y Presidencia Roque Sáenz Peña, Chaco (DENV-2 y DENV-4). En el año 2014 se registraron 463 casos autóctonos en 8 localidades de Salta (DENV-4) y la ciudad de Córdoba (DENV-1). En el primer semestre del año del 2015 se confirmó la circulación viral de DENV-4 en Córdoba capital y se registraron áreas con casos confirmados autóctonos en Ciudad de Buenos Aires y provincia de Buenos Aires. Esta distribución se diferenció del patrón habitual en el que los brotes se iniciaban en las provincias del norte[39].

A partir de la semana 44 de 2015 se identificaron brotes en varias localidades de Formosa y, posteriormente en Misiones, por serotipo DENV-1 que se extendieron hasta el primer semestre del 2016 (39). Este constituyó el segundo brote en magnitud registrado en el el país. El brote que había comenzado por el NEA en la primavera de 2015 se extendió hasta la SE 25 de 2016 y resultaron afectadas 15 jurisdicciones con 41.207 casos confirmados⁴ o probables autóctonos (53 % más casos que los registrados en el 2009). Los períodos de mayor incidencia ocurrieron en las SE 4, 8-9 y 14 (el primero a expensas de la región NEA, el segundo y el tercero fundamentalmente por los casos registrados en la región Centro). Se reportaron 10 pacientes fallecidos con dengue (39). También se notificaron 2.681 casos importados, distribuidos en 23 provincias. En este período se estudiaron por laboratorio 45.129 de los 76.734 casos notificados (58.8 %). De los casos estudiadas 20.886 resultaron positivas (46.3 %). El DEN1 correspondió al 99 % de los casos en los que se pudo identificar el serotipo. Se observó un pequeño número de casos correspondientes al serotipo DENV-4 en localidades de Buenos

Aires, Salta y Santa Fe. Los grupos de edad más afectados fueron los mayores de 15 años en la mayor parte de las provincias[39].

Entre el 2017 y 2018 continúa la detección de brotes epidémicos por DENV-1 en Buenos Aires, Chaco, Corrientes, Formosa y Santa Fé (2017)[180] y sumándose Córdoba, Entre Ríos, Misiones, CABA y Santiago del Estero (2018)[181] con un total de 2676 casos confirmados por laboratorio. Estos años marcan que la participación de la región central templada del país en la casuística del dengue no ha sido un evento aislado en epidemias más explosivas. En 2019, se confirman 2943 casos y además de DENV-1, vuelve a detectarse la circulación autóctona del DENV-4 en CABA, Jujuy y Misiones[182]. El 2020, luego de tener en las Américas el mayor registro de notificación de dengue, Argentina atraviesa su epidemia de mayor magnitud y diseminación geográfica, como ya se ha descrito, y parte de ella, se superpone temporalmente con el inicio de la pandemia por COVID-19 incluso con la descripción de coinfecciones[183] [184].

Hasta el momento existe limitada información en relación a los genotipos circulantes en Argentina. En nuestro laboratorio se han caracterizado las cepas circulantes inicialmente en los primeros brotes de NOA y NEA. Las cepas de DENV-2 aisladas en Salta en 1997 y 1998 mostraron una identidad de nucleótidos del 98% al 99% con DENV-2 aislado de Brasil en 1990 y Jamaica en 1983[87]. El análisis filogenético de las cepas de DENV-1 que circularon en nuestro país y Paraguay en el 2000 permitió determinar que correspondían al genotipo americano, altamente relacionadas a otra cepa del mismo genotipo detectada en Paraguay en 1988[89][185][87]. A posterioridad, se han publicado datos de la filogenia viral en cepas obtenidas a partir de viajeros infectados con DENV-3[186] en 2007 o autóctonos por DENV-1 en el área metropolitana de Buenos Aires en el período 1998- 2010 y 2016[187][90].

La identificación de tendencias epidemiológicas moleculares puede contribuir a comprender las razones del resurgimiento del dengue en nuestro país, y a su vez, contribuir al control y manejo de la enfermedad.

2.1. OBJETIVO GENERAL: Contribuir al conocimiento de las características genotípicas y filogenia viral de cepas de dengue serotipo 1, 2, 3 y 4 asociadas a la ocurrencia de brotes epidémicos en el país.

2.2. OBJETIVOS PARTICULARES:

2.2. 1. Aplicar la metodología de amplificación genómica de fragmentos específicos según polimorfismo de restricción (RSS-PCR) para la caracterización del genotipo de DENV-3 como una alternativa a la secuenciación genómica para respuesta rápida en laboratorios de salud pública.

2.2. 2. Obtener secuencias genómicas que codifican para la proteína E (DENV 1, 2, 3 y 4) y parte del gen que codifica para la proteína NS1 (DENV-1) por método Sanger a partir de pacientes infectados por dengue en Argentina en los últimos 20 años.

2.2. 3. Analizar las relaciones filogenéticas de las secuencias obtenidas y examinar aspectos de la epidemiología molecular de las cepas de DENV circulantes en Argentina.

3. MATERIALES Y MÉTODOS:

3.1 Muestras: El número de muestras caracterizadas según serotipos/ fechas se relaciona con la incidencia de la enfermedad en las últimas dos décadas y a la disponibilidad de las muestras en el INEVH, ya que corresponden a muestras que ingresaron a la institución para confirmación del diagnóstico de dengue, determinación de serotipo viral y/ o corroboración de los resultados emitidos en el nivel provincial. Las muestras han sido seleccionadas en forma anonimizadas en base a los resultados de diagnóstico de dengue y este trabajo cuenta con la aprobación del Comité de Etica Institucional. Se ha considerado la inclusión de la mayor diversidad posible en relación a provincias y localidades de procedencia, así como muestras de casos clínicos graves o fatales ya que el predominio es de presentación clínica leve. Fueron estudiadas un total de 150 muestras cuya distribución por serotipo es: 87 DENV-1, 2 DENV-2, 45 DENV-3 y 16 DENV-4.

La distribución del muestreo en los distintos años para los distintos serotipos es la siguiente:

- ✓ DENV-1: Inicialmente se secuenciaron fragmentos cortos de la E en 43 muestras obtenidas entre 2002 y 2010 (5 muestras del 2002, 4 muestras del 2003, 4 muestras del 2008, 24 muestras del 2009, 6 muestras del 2010) y al determinar la similitud entre ellas se hizo una selección para continuar con la secuenciación del gen E completo en 56 muestras obtenidas entre 2002 y 2018 (2 muestras del 2002, 2 muestras del 2003, 2 muestras del 2008, 4 muestras del 2009, 2 muestras del 2010, 3 muestras del 2011, 1 muestras del año 2015, 24 muestras del 2016, 14 muestras del año 2017 y 2 muestras del año 2018). La información detallada se encuentra en la tabla 1 del Anexo 9.
- ✓ DENV-2: se procesaron 2 muestras correspondientes a 2018 y 2019 (tabla 2 Anexo 9)
- ✓ DENV-3: se procesaron 44 muestras de sueros de pacientes del 2003-2004 y 1 muestra del 2012 cuya procedencia se indica en la tabla 3 del Anexo 9.
- ✓ DENV-4: se incluyeron 16 muestras, cuya procedencia geográfica se indica en la tabla 4 del Anexo 9, teniendo la siguiente distribución según los años: 1 muestra del 2010, 3 muestras del 2013, 1 muestra del 2014, 3 muestras del 2016, 3 muestras del 2019, 2 muestras del 2020 y 3 muestras del 2021.

3.2 Extracción de RNA viral: el RNA viral se obtuvo a partir de la extracción de la muestra de suero de los pacientes positivos para genoma de DENV 1-4 determinado mediante RT-PCR[107] y/o qRT-PCR[109][110] en nuestro laboratorio en el mayor porcentaje de los casos, aunque, en un pequeño número de muestras, se realizó la extracción del RNA viral a partir del sobrenadante de cultivos celulares de aislamiento viral realizado en células C6/36 para aumentar la carga viral y poder tener material suficiente para secuenciación. Para la extracción del RNA viral se utilizó el kit QIAmp Viral RNA kit (Qiagen) según las indicaciones del fabricante. Brevemente, se tomaron 140 µl del sobrenadante de cultivos celulares y se le adicionaron 560 µl del buffer de lisis (buffer AVL + *carrier*) a la muestra. Posteriormente se agregaron 560 µl de etanol absoluto de calidad biología molecular. A partir de este paso se comenzó a pasar la mezcla por una columna de sílica, agregando 630 µl cada vez y centrifugando a 8000 rpm por 1 minuto. A continuación se realizaron lavados sucesivos con los reactivos buffer AW1 y buffer AW2, 500 µl de cada uno de manera consecutiva, centrifugando con el primero de ellos 1 minuto a 8000 rpm y con el segundo 3 min a 14000 rpm. En cada centrifugación se descartó el líquido eluido y se reemplazó el tubo colector de la columna por uno nuevo provisto por el kit. Finalmente se realizó la elución con 60 µl de buffer AVE (todos los reactivos y la columna de sílica son provistos por el kit, excepto del Etanol absoluto). El RNA así extraído se conservó a -70 °C hasta su utilización. La extracción de los ácidos nucleicos, así como la preparación de las mezclas de amplificación y la visualización de los productos de amplificación, se llevaron a cabo en espacios separados físicamente para evitar contaminaciones de las mismas.

3.3. Genotipificación rápida mediante análisis de fragmentos amplificados por Reacción en cadena de la polimerasa en base a polimorfismo de sitios de restricción (RSS)-PCR: en este trabajo la metodología RSS-PCR fue aplicada para la caracterización preliminar de las primeras cepas de DENV-3 detectadas en nuestro país durante 2003-2004. Se trata de una PCR en un solo paso, que emplea para cada serotipo, cuatro *primers* dirigidos a secuencias que abarcan sitios de restricción de endonucleasas polimórficas en el gen prM-E-M para el caso del DENV-3 (por una menor variabilidad en relación a los otros serotipos, se usa una región mayor) para retro- transcribir y amplificar el RNA viral (Anexo 8, Tabla 1). Estos productos de RT-PCR generan distintos patrones de bandas electroforéticas para diferentes cepas que se visualizan en geles de agarosa. Para el caso del serotipo 3, se obtienen 3 grupos de bandas que correlacionan con clasificaciones filogenéticas (Figura 41).

En la Tabla 18 se especifican los reactivos y volúmenes utilizados en la reacción RSS-PCR.

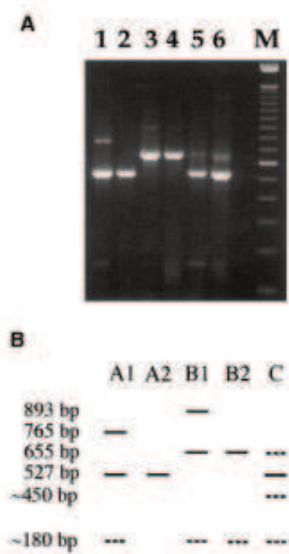


Figura 41. Patrones RSS-PCR de DENV-3 de diferentes orígenes geográficos amplificados mediante los primers RSS5 – RSS8. (A) Electroforesis en gel de agarosa de Productos RSS – PCR. Calle 1, Indonesia 1977 (796); Calle 2, Indonesia 1976 (847); calle 3, Tailandia 1974 (498); calle 4, Tailandia 1984 (500); calle 5, Sri Lanka 1981 (805); calle 6, Nicaragua 1998 (256); Calle 7 Marcador Peso Molecular, (P M), 100 pb escalera (Gibco BRL). (B) Diagrama esquemático que representa los diferentes patrones RSS-PCR. La línea de puntos designa las bandas que se muestran variación de muestra a muestra. Los productos predichos por pares de cebadores son los siguientes: RSS5 – RSS8, 893 pb; RSS5 – RSS8, 765 pb; RSS5 – RSS7, 655 pb; RSS6 – RSS7, 527 pb. (Figura modificada de Harris y col, 1999)

Tabla 18. Mix de reactivos para RSS-PCR DENV-3

Reactivo	Concentración final	Volumen 1 X- ul/ tubo (45 ul mix)
Dengue- TX	10X	5.5
RNAsa freee		30,2
RSS 5	0,5 Um	0,25
RSS 6	0,5 Um	0,25
RSS 7	0,5 Um	0,25
RSS 8	0,5 Um	0,25
DNTPs	20 Mm	1
RT polimerasa	1 U/ ul	0,05
Taq polimerasa	5 U/ ul	0,25
Betaína	4M	5
TMAC	1 M	1.5
DTT	100 mM	2.5
Cl ₂ Mg	25mM	3
Templado		5 ul

Condiciones de amplificación:

42°C 60' + [94°C 30'' + 55°C 1' + 72°C 2'] x 40 + 72°C 5' + 15°C ∞

La visualización del patrón de bandas se realizó en geles de agarosa al 1.5%, utilizando un marcador de peso molecular de 100 pb, según indicaciones del fabricante.

3.4 Amplificación por RT-PCR convencional

Para realizar la secuenciación genómica, se generaron los cDNA utilizados como molde, a partir del RNA extraído descrito en el punto 3.2 y oligonucleótidos específicos para cada uno de los serotipos.

3.4.1. DENV-1: para este serotipo se realizó en una instancia preliminar un estudio explorativo de un fragmento de 650 a 750 nucleótidos amplificando inicialmente la región del genoma que se extiende entre la unión de los genes E y NS1, mediante la utilización de los *primers* 1854F-2616R (Tabla 2, Anexo 8) en 43 muestras del período 2002-2010 para evaluar la variabilidad de las mismas. Esta estrategia fue descrita por Rico-Hesse en el año 1990 ya que esa se considera una región muy informativa para la realización de análisis filogenéticos[188][189][190]. Diversos estudios han mostrado que los árboles filogenéticos obtenidos a partir de pequeños fragmentos genómicos son congruentes con los que se obtienen a partir de las secuencias de genes completos aunque pueden presentarse diferencias menores en la topología, en las ramas finales de los árboles filogenéticos obtenidos. Por tal motivo, inicialmente fue realizada la secuencia del fragmento mencionado para luego de un análisis preliminar, determinar la necesidad de continuar con la secuenciación en aquellas cepas que lo justifiquen.

Los resultados obtenidos mediante esta estrategia mostraron un alto grado de similitud entre las secuencias de cada año. Se seleccionaron 16 muestras de esa instancia inicial basados en estos resultados y se decidió continuar con la secuenciación de gen E completo en 56 muestras como se recomienda para la identificación de los distintos genotipos en la actualidad cuando se utiliza secuenciación parcial [191][192][193] y por lo tanto esta fue la estrategia seguida y mostrada en este estudio. Se realizó un ciclo de amplificación donde se generaron fragmentos de DNA doble hebra mediante la utilización de oligonucleótidos específicos para DENV-1 descritos en Aviles et al, 2003[185], generándose 2 fragmentos solapados de 1300 y 800 pb

aproximadamente con los *primers* 722F-2069R y 1854F-2616R respectivamente (Tabla 2, Anexo 8).

3.4.2. DENV-2: se realizó un ciclo de amplificación donde se generaron fragmentos de DNA doble hebra mediante la utilización de oligonucleótidos específicos para DENV-2 descritos por Santiago et al, 2019, generándose un fragmento de aproximadamente 1480 pb con los *primers* DENV-2 PCR-F y DENV-2 PCR-R (Tabla 3, Anexo 8).

3.4.3. DENV-3: se realizó un ciclo de amplificación donde se generaron fragmentos de DNA doble hebra mediante la utilización de oligonucleótidos específicos para DENV-3 descritos por Lanciotti y cols, 2004 [194] generándose 4 fragmentos solapados entre 600 a 800 pb aproximadamente con los *primers* P722-CP1559, P1262-CP1816, P1685-CP2250 (Tabla 4, Anexo 8).

3.4.4. DENV-4: Se realizó un ciclo de amplificación donde se generaron fragmentos de DNA doble hebra mediante la utilización de oligonucleótidos específicos para DENV-4 descritos por Bennetn y cols, 2003[195], generándose 2 fragmentos solapados de 1300 y 900 pb aproximadamente con los *primers* U486-L1786 y U1568-L2679 respectivamente (Tabla 5, Anexo 8).

En la Tabla 19 se especifican los reactivos y volúmenes utilizados en la reacción RT-PCR para los distintos serotipos

Tabla 19. Reactivos y volúmenes utilizados en la reacción RT-PCR

Reactivos	Volumen/ muestra
H ₂ O	21.8 µl
Buffer (10X)	3.3 µl
MgCl ₂ (50mM)	0,9 µl
dNTP's (mix)	0,6 µl
DTT (0,1M)	1,5 µl
RNAsin	0,05 µl
Primer (100 uM)	2 x 03 µl
Taq (5U/ul) High Fidelity	0,3 µl
RT SSIII	0,1 µl
Mineral Oil	30 µl
Templado	3 µl
Total Reacción	30 µl

Las condiciones de ciclado fueron las siguientes:

50°C 65' + 94°C 2' + [94°C 1' + 50°C 2' + 68°C 3'] x 40 + 68°C 10' + 15°C ∞

3.5. Análisis de los ácidos nucleicos:

3.5.1. Visualización de los productos de amplificación: La visualización de los productos resultantes de la amplificación de la técnica de RT-PCR descrita anteriormente, se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa. Para ello, se prepararon geles de agarosa al 2 %, en buffer tris-acético-EDTA (TAE) 1X, teñidos con Bromuro de etidio al 10% o Sybr green (SyBr Safe- Invitrogen) a una concentración de 0,5 µg/ml. A cada muestra se agregó 1% de colorante de siembra (solución preparada con 0,5 % de azul de bromofenol y 0,5 % de xileno-cianol en glicerol) y luego se sembraron 30 µl del producto de amplificación en cada calle del gel. El marcador de peso molecular empleado fue un patrón de DNA de 100 pb comercial a una concentración de 100 ng/µl, el cual también sirve para estimación de la masa en ng. La electroforesis se desarrolló en una solución de TAE 1X a una intensidad de corriente eléctrica de 80 voltios durante 60 minutos, visualizándose los productos de amplificación bajo luz UV o LED de acuerdo a si se usó Bromuro de etidio o SyBr green respectivamente.

3.5.2. Purificación de los ácidos nucleicos: Los productos de amplificación del DNA detectados en el gel de agarosa y con un tamaño similar al esperado, fueron purificados para su posterior secuenciación. Para la purificación se usó el Kit QIAquick (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, para el procedimiento de purificación, primero se procedió a cortar con un bisturí el área del gel que contenía la banda de DNA del tamaño esperado y transferirla a un tubo tipo *ependorf* de 1,5 ml. La banda cortada se pesó en balanza analítica y para comenzar con la disolución de la agarosa, se agregaron 300 µl de buffer de solubilización (QG) por cada 100 miligramos (mg) de muestra. Luego se incubó a 50°C durante 30 minutos. Posteriormente, se agregaron 100 µl de isopropanol por cada 100 mg de muestra. Todo el volumen resultante se transfirió a una columna de purificación provista por el kit (en 1 o dos pasos consecutivos según el volumen resultante de los pasos anteriores). Se centrifugó a 13.000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente. Tras eliminar el eluido, se lavó la columna con 500 µl de buffer QG y nuevamente se centrifugó a 13000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se descartó el eluido y se adicionaron 750 µl de buffer de lavado (PE), se dejó reposar durante 5 minutos y luego se centrifugó a 13000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente. Se descartó el eluido y la columna se colocó en un tubo tipo *ependorf* de 1,5 ml limpio y se añadieron 30 µl de buffer de elución (EB), se dejó reposar durante 5 minutos.

Posteriormente, se centrifugó 13000 rpm durante 1 minuto a temperatura ambiente para la obtención del purificado.

En base a la masa estimada para cada banda, cuando fue corrido el gel de agarosa y el protocolo utilizado para la reacción de secuenciación, se utilizó el DNA purificado tal como se obtuvo luego de la elución o se colocó en bomba de vacío durante 1 hora aproximadamente para dejar el DNA en estado liofilizado y se rehidrató con buffer EB en volumen adecuado para obtener los ng necesarios en la reacción de secuenciación

3.6. Secuenciación genómica: Ambas hebras de este producto purificado en el punto 3.4.2, fueron secuenciadas directamente utilizando el kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y utilizando los *primers* específicos para cada serotipo descritos en las Tablas 2, 3 y 4 del Anexo 8 para cada serotipo respectivamente. La cantidad de DNA molde utilizado en la reacción de secuenciación se basó en las recomendaciones del inserto del reactivo Big Dye Terminator Cycle Sequencing v3.1 como se señala en la tabla 20. Considerando que los productos de PCR obtenidos tienen longitudes de entre 500 a 2000 pb, se utilizó en todas las reacciones entre 30 a 40 ng de DNA molde.

Tabla 20. Cantidad de DNA molde recomendadas para la reacción de secuenciación.

Molde DNA (Producto PCR)	Cantidad
100-200 bp	1-3 ng
200-500 bp	3-10 ng
500-1000 bp	5-20 ng
1000-2000 bp	10-40 ng
2000 bp	20-50 ng

Las reacciones de secuenciación se llevaron a cabo en termocicladores MyCycler™ (Thermal Cycler, BioRad). En la Tabla 21 se especifican los reactivos y volúmenes utilizados en la reacción secuenciación.

Tabla 21. Reactivos y volúmenes utilizados en la reacción de secuenciación

Reactivo	Volumen por muestra
Agua	1,5 µl
Big Dye Terminator	2 µl
Buffer 5 X	1 µl
Oligonucleótido (10 uM)	0,5 µl
DNA molde	5 µl
<u>Total de la reacción</u>	10 µl

Condiciones de amplificación: un ciclo inicial de desnaturalización a 96°C durante 1 minuto, 25 ciclos de 96°C durante 10 segundos (desnaturalización), 55°C durante 5 segundos (hibridación) y 60°C durante 4 minutos (elongación).

3.6.1. Purificación de los productos de la reacción de secuenciación: luego de la reacción de secuenciación se realizó el *clean up* mediante el método de purificación de Etanol-EDTA. Para éste procedimiento se preparó una solución de EDTA 125 mM a partir de una solución 0,5 M, pH 8 (marca Sigma) y una solución de etano 70% a partir de etanol absoluto (marca Sigma, 200 *proof*). Luego de la reacción de secuenciación como se indicó previamente, se dio un pulso de centrifuga a cada tubo a 13000 rpm. Posteriormente se agregó a cada tubo conteniendo 10 µl de la reacción de secuenciación 2.5 µl de EDTA 125 mM y 60 µl Etanol absoluto (100%) (marca Sigma), se dejó 15 minutos a temperatura ambiente y luego se centrifugó por 20 minutos a 13000 rpm. Se descartó el sobrenadante aspirando con pipeta (sin tocar el lado del fondo donde se encuentra el DNA precipitado) y se realizó un lavado agregando 250 µl de Etanol 70 %. Se centrifugó 10 minutos a 13.000 rpm y se eliminó el sobrenadante ídem al paso anterior por aspiración. Cada tubo se dejó secar al aire 5-10 minutos tapados con papel de aluminio para evitar la degradación de los colorantes fluorescentes por la luz. Si la muestra no se procesó inmediatamente se conservó a -20°C al abrigo de la luz.

3.6.2. Preparación de las muestras para correr: las muestras purificadas como se indica en el punto 3.6.1 se prepararon para correr en el secuenciador automático, resuspendiendo el DNA precipitado en 15 µl de formamida (marca Applied Biosystems). Se mezcló bien con pipeta y se pasaron 12 µl a una placa de 96 pozos (Applied Biosystems) la cual fue llevada posteriormente al secuenciador. Con las muestras cargadas en la placa se llevaron a un termociclador por 2 min a 95 °C para desnaturalizar el DNA, finalizado ese tiempo se colocó

la placa en hielo y se llevó la placa al equipo secuenciador automático ABI PRISM 3100Avant (Applied Biosystems).

3.7. Análisis de electroferogramas y ensamblado de secuencias: para el análisis de las secuencias obtenidas se utilizaron los programas Sequencing Analysis vs 5.1.1, BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>) y Chromas (<https://es.freownloadmanager.org/Windows-PC/Chromas.html>). Para el ensamblado de las secuencias se utilizó el software SeqScape vs 2.5, generándose fragmentos de aproximadamente 1600 pb que corresponden al gen E completo para cada uno de los serotipos

3.8. Análisis filogenético: Las secuencias de nucleótidos obtenidas y ensambladas de cada una de las muestras estudiadas generadas fueron alineadas entre ellas y con otras cepas de cada uno de los serotipos previamente publicadas, obtenidas del GenBank (Anexo 10. Tablas 1 a 4 para los secuencias de los cuatro serotipos respectivamente). Los alineamientos de las secuencias de nucleótidos fueron realizados con BioEdit, utilizando el método de Clustal W (disponible en <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). La genotipificación se realizó utilizando el software Genome Detective, utilizando la herramienta de tipificación de DENV (<https://www.genomedetective.com/app/typingtool/dengue/>)[196][197].

Los análisis y construcción de árboles filogenéticos fueron realizados mediante diferentes métodos: máxima parsimonia, bayesiano, distancia, y máxima verosimilitud. Máxima Parsimonia fue realizada empleando el programa TNT, con 100 repeticiones. Para el método bayesiano Bayesiano se utilizó el software Mrbayes-3.1.2 (F Ronquist and JP Huelsenbeck, 2003), realizando 10.000.000 de iteraciones, frecuencia de muestreo=2000 y descartando el 10 % de las iteraciones iniciales como *burn in* para obtener el árbol consenso. El programa FigTree (disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>) fue usado para obtener la visualización gráfica del árbol filogenético. El programa MEGA6.0 [198] fue utilizado para la implementación del método basado en distancia de Neighbor Joining, utilizando el modelo TN93 +G (el de mayor complejidad que permite utilizar el programa) y análisis de *bootstrap* con la realización de 1000 réplicas. El árbol de máxima verosimilitud fue construido mediante el software IQ-TREE (<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>) con el soporte de ultrafast bootstrap (1000 réplicas). El programa FigTree (disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>) fue usado para obtener la visualización gráfica del árbol filogenético. La selección del modelo de sustitución nucleotídica a emplear para la reconstrucción filogenética fue realizada mediante la Prueba de Cociente de Verosimilitud (Likelihood Ratio Test) y cálculo del Criterio de Informacion de Akaike empleando el

programa Jmodel Test [199] o mediante la aplicación ModelFinder implementada en IQ-TREE [200]

4. RESULTADOS

4.1 DENV-1: Se procesaron 43 muestras en las que se amplificó un fragmento de 508 pb de la región E-NS1 correspondiente a las cepas del 2002-2010 y se seleccionaron 12 muestras de este grupo para continuar en la secuenciación completa de la E. En un total de 56 muestras, con los *primers* indicados en la Tabla 2 del Anexo 7. Se secuenciaron aproximadamente 1600 pb, que incluyen completamente el gen de la proteína E. Como resultado de las reacciones de RT-PCR se obtuvieron las bandas del tamaño esperado. En la figura 42 se observa la fotografía de gel de agarosa con las bandas positivas, las cuales fueron comparadas con el marcador de peso molecular para confirmar que tenían el tamaño esperado. Se estimó la masa de cada banda con el marcador de masa y se cortó del gel para posteriormente proceder a su purificación y proceso de secuenciación. Las bandas cortadas se conservaron a -20 °C hasta su utilización como indica el punto 3.4.2 (Purificación de ácidos nucleicos) y luego de la reacción de secuenciación y *clean up* se cargaron las muestras directamente en el secuenciador Avant 3100 disponible en el INEVH para la realización de la reacción de secuenciación basada en el principio de Sanger.

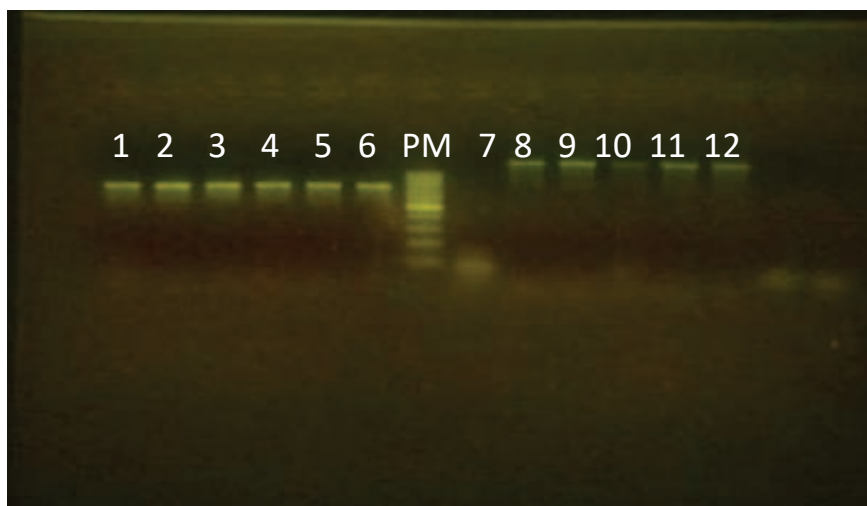


Figura 42. Gel de agarosa con una serie de muestras donde se observan las bandas de 800 pb (calles 1 a 6) y 1300 pb (calles 8 a 12), en el centro se encuentra el marcador de peso molecular (PM) de 100 pb, para muestras de DENV-1.

Se obtuvieron electroferogramas como se muestran en la figura 43 y el ensamblado se llevó a cabo con el programa SeqScape vs 2.5.

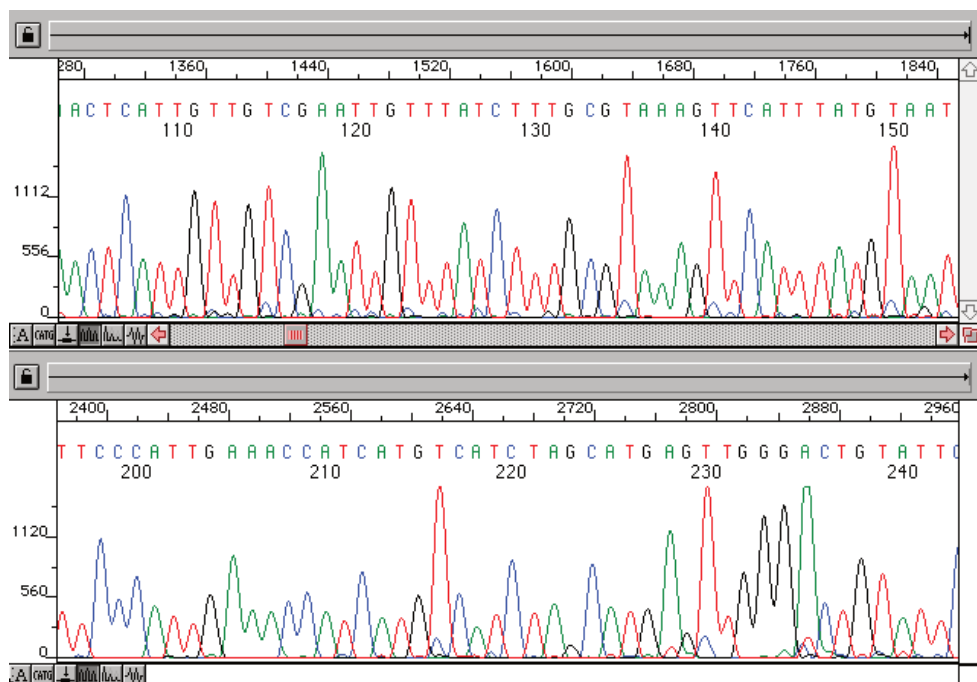


Figura 43. Ejemplos de electroferogramas obtenidos de las reacciones de secuenciación.

El análisis del fragmento de 508 pb E-NS1 correspondiente a las cepas del 2002-2010 permitió realizar una selección de cuáles muestras resultaría ventajoso incluir en la secuenciación de la E completa. Dado que las 34 muestras del 2009-2010 constituían un agrupamiento monofilético (Figura 44), se hizo una reducción y se realizó la secuencia completa de E en 8 muestras de este período (2 del 2008, 4 del 2009 y 2 del 2010) y se sumaron con las secuencias del 2011, 2015, 2016 y 2018 para realizar el análisis de todas las secuencias.

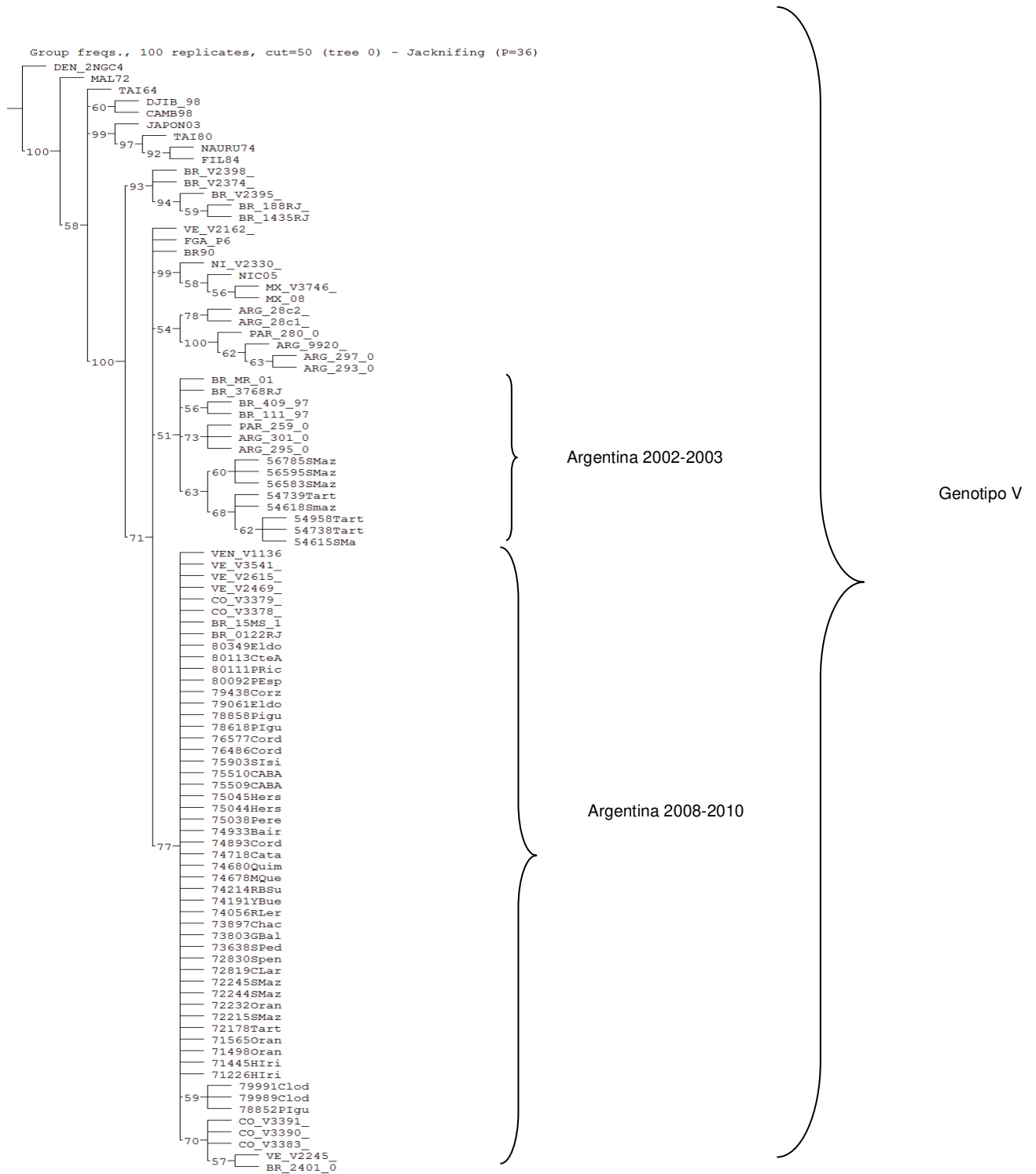


Figura 44- Árbol filogenético obtenido por Máxima Parsimonia con el software TNT (fragmento 508 pb E-NS1). Los valores de soporte de jackknifing se indican en los nodos.

El análisis filogenético se realizó sobre un fragmento de 1315 pb correspondientes al gen E en 50 muestras estudiadas. El análisis inicial mediante el software Genome Detective permitió determinar que todas las muestras estudiadas pertenecen al genotipo V de DENV-1,

como puede observarse en la Figura 45 .en la cual se observan con un punto azul y los nombres de las taxas que corresponden a las secuencias obtenidas en este estudio.

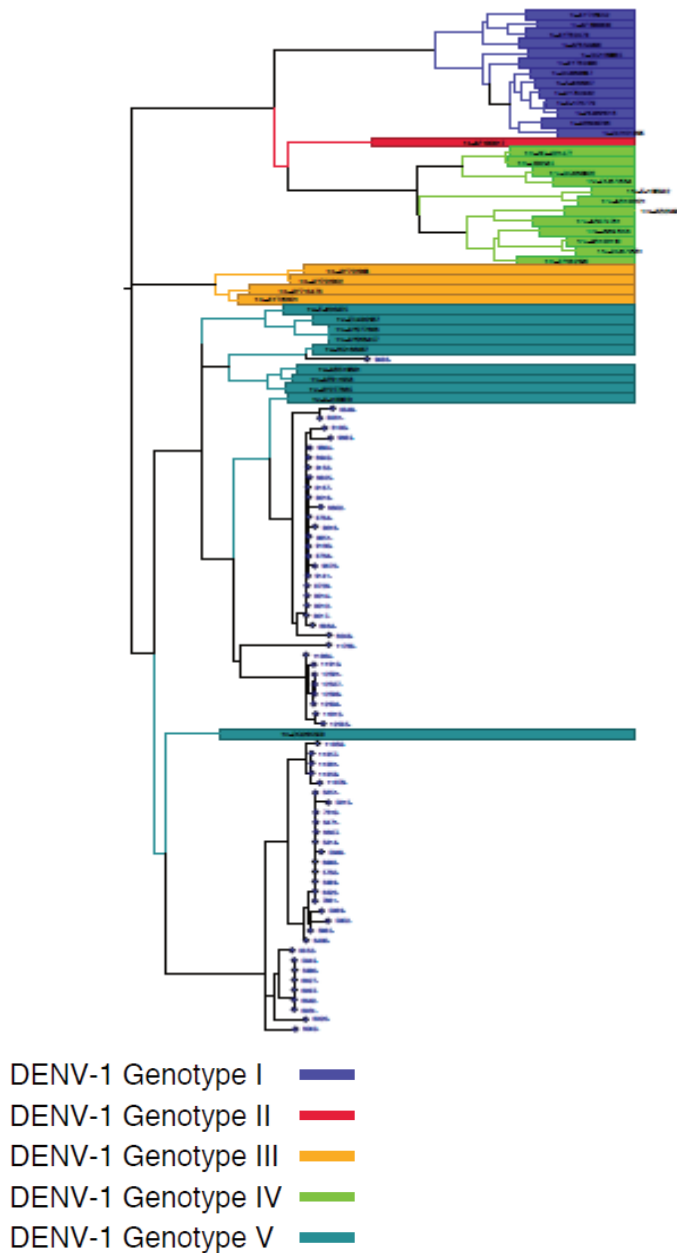


Figura 45. Determinación de genotipo de DENV-1 en las muestras incluídas en el estudio mediante el software Genome detective, dengue Typing tool. Con un punto azul se observan los las muestras que corresponden a las secuencias obtenidas en este estudio.

El dataset utilizado incluyó fundamentalmente secuencias de DENV-1 del genotipo V de circulación en distintas regiones de América (N=245, Tabla 1 Anexo 10) y secuencias de los demas genotipos (I a IV) (N=7 , Tabla 1 Anexo 10).Con este dataset se construyó un árbol por maxima verosimilitud con el programa IQ tree, con el soporte de ultrafast bootstrap (1000

réplicas)[201][202]. El modelo de sustitución nucleotídica utilizado fue el GTR+I+G. Los otros métodos de análisis filogenéticos utilizados mostraron árboles de topología similar, con lo cual solo se mostrarán los resultados obtenidos por el método de máxima verosimilitud. En la figura 46 se muestra el árbol filogenético obtenido por máxima verosimilitud en el cual pueden observarse la separación en dos clados bien diferenciados dentro del genotipo V como describen otros autores [192]. Las muestras de Argentina incluidas en este estudio se ubican en ambos clados (I y II) (Figura 47)

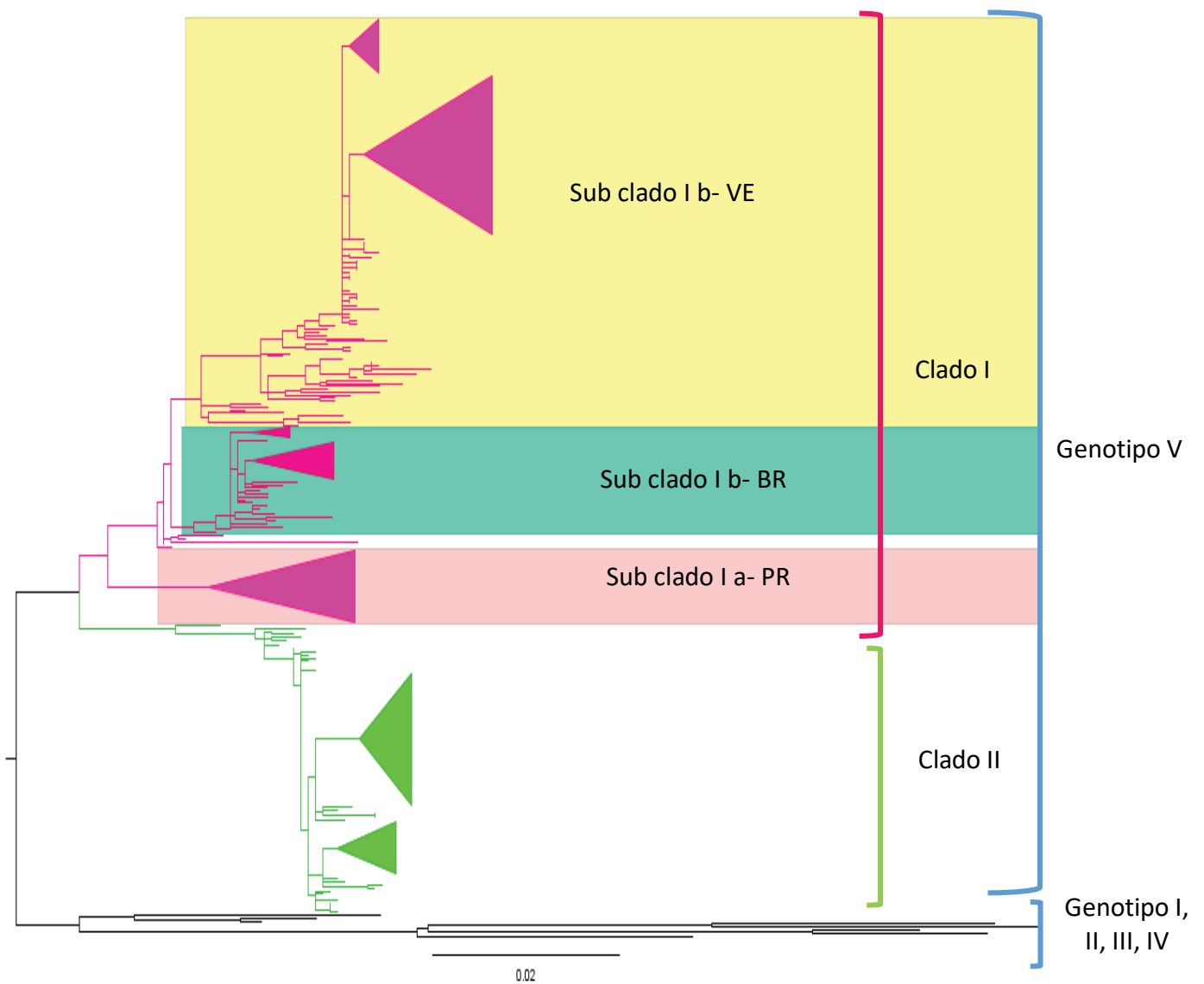


Figura 46- Arbol filogenético de máxima verosimilitud donde puede observarse globalmente la separación de los distintos genotipos (I a V), clados y subclados dentro del Genotipo V.

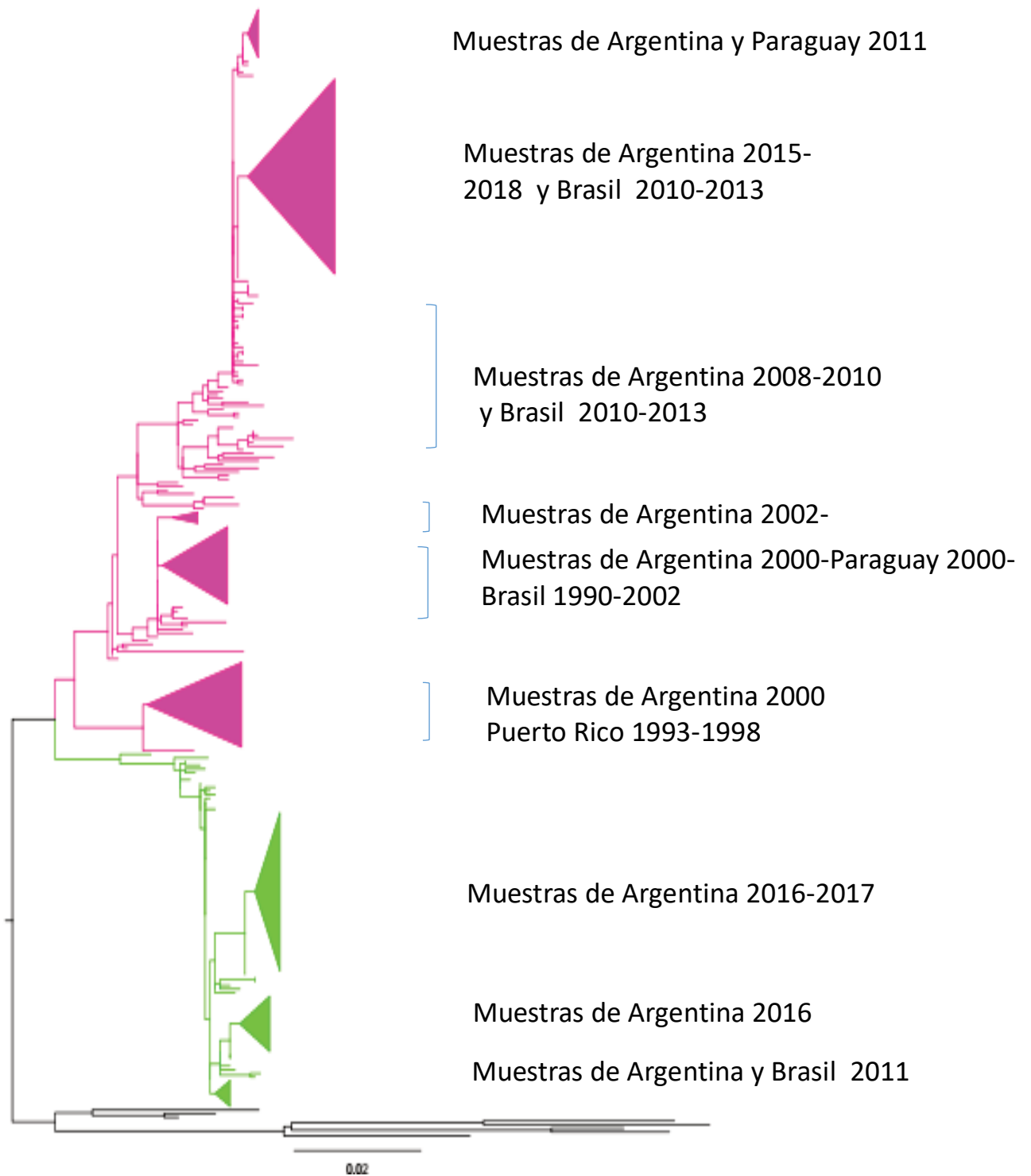
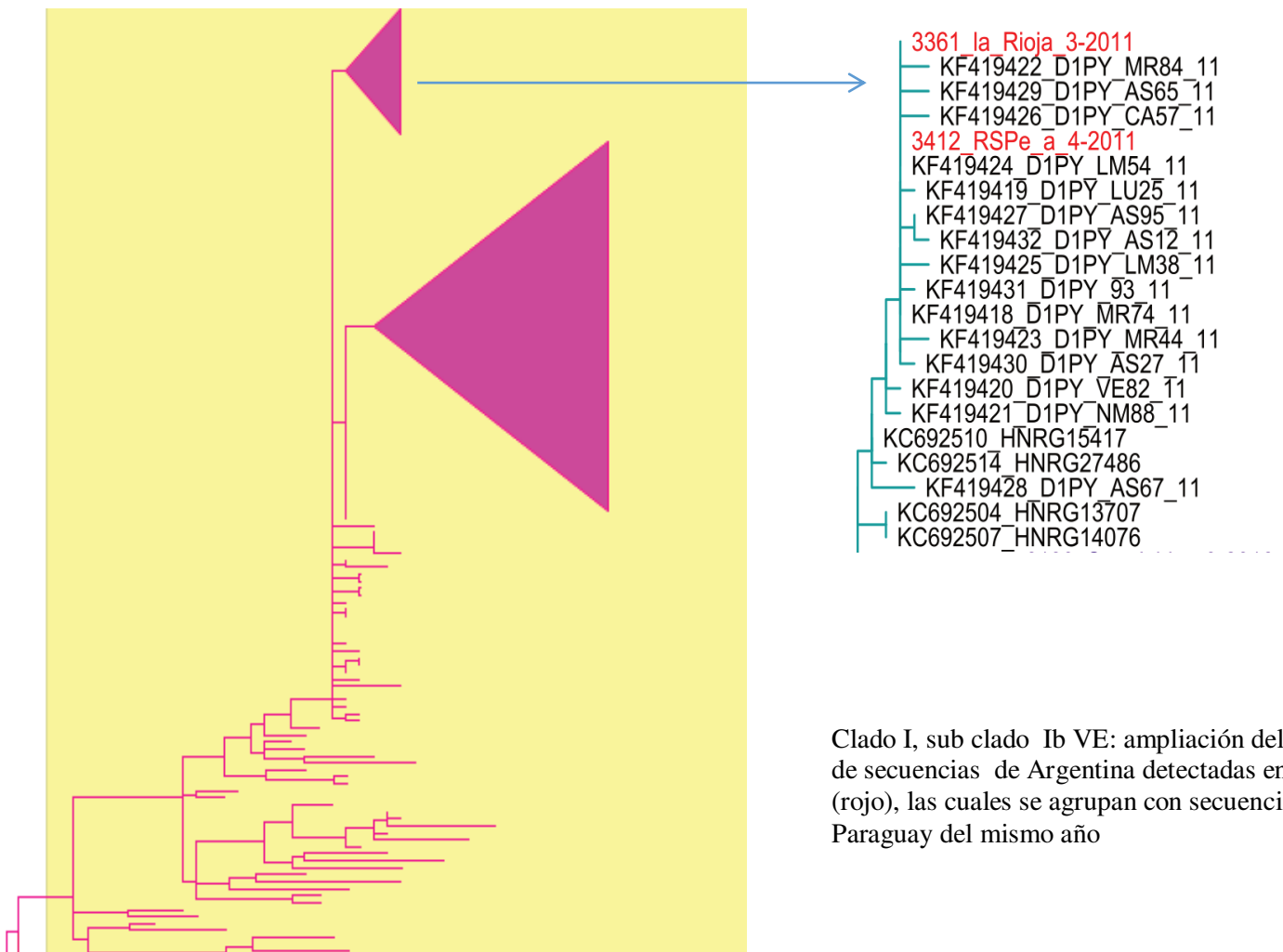


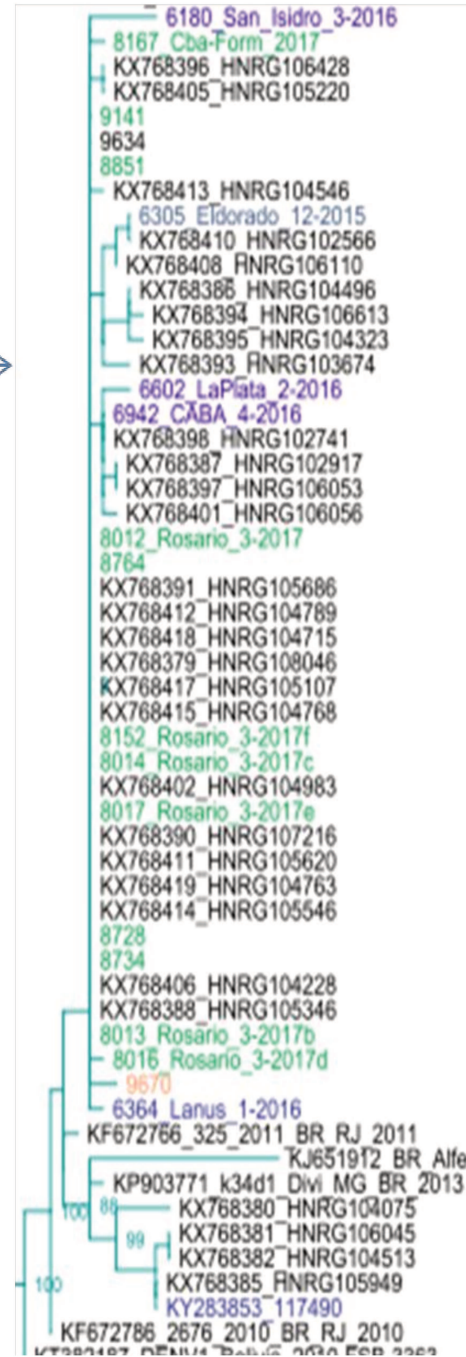
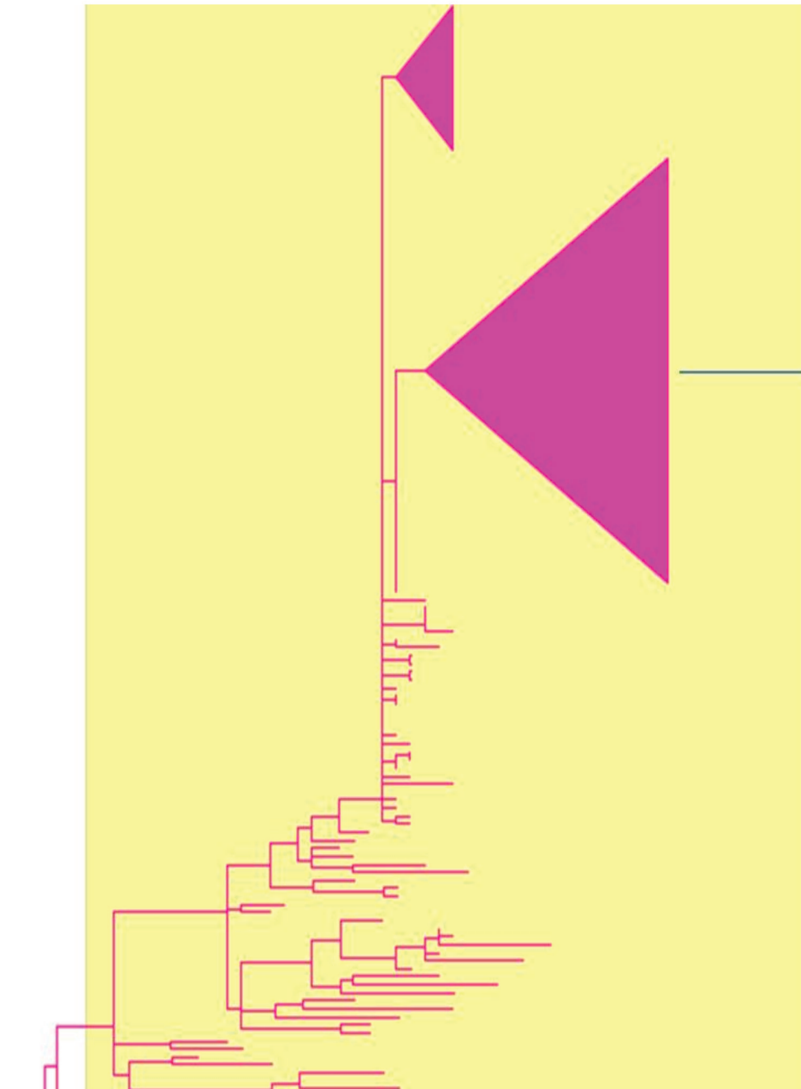
Figura 47. Arbol filogenético de máxima verosimilitud obtenido por IQtree. Se indica la ubicación de las muestras Argentinas incluídas en éste estudio y su relación filogenética más cercanas dentro de las secuencias consideradas en el análisis (Tabla 1 Anexo 9 y Tabla 1 Anexo 10).

En las figuras siguientes (Figura 48 A a F) se amplian las zonas de árbol filogenético obtenido donde se ubican las secuencias argentinas incluídas en este análisis)

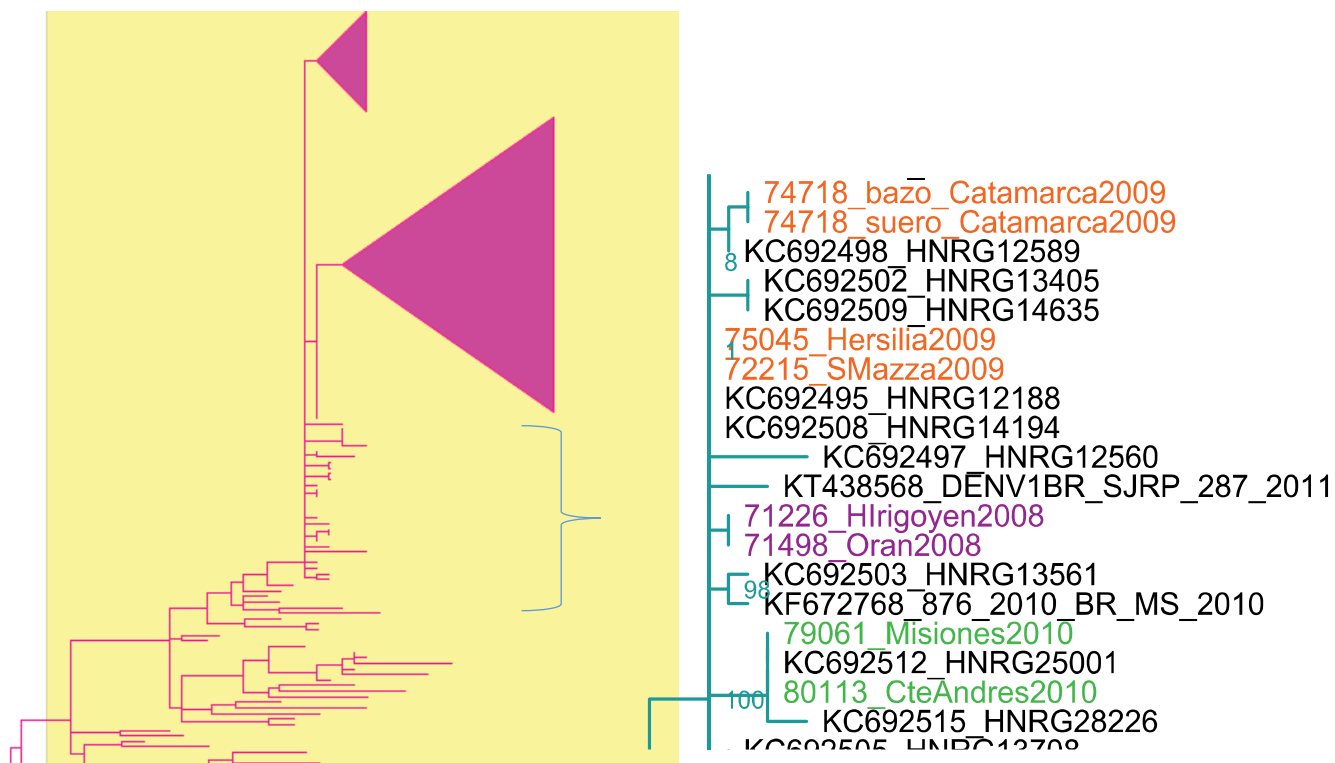
A



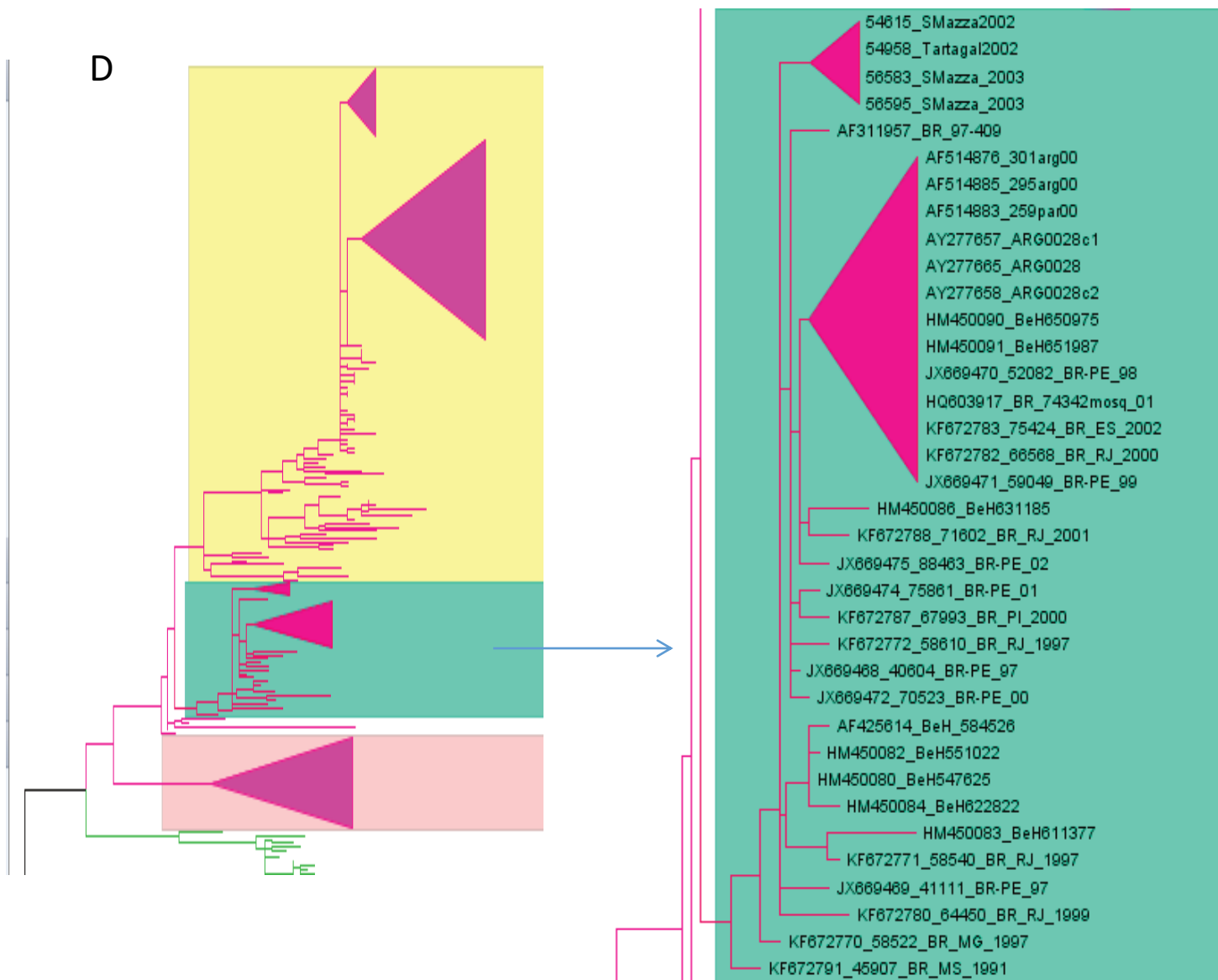
B



Clado I, sub clado Ib VE ampliación del grupo de secuencias de Argentina detectadas entre 2015 (celeste), 2016 (azul), 2017 (verde) y 2018 (rosa), asociadas con secuencias de Brasil que circularon entre los años 2010-2013

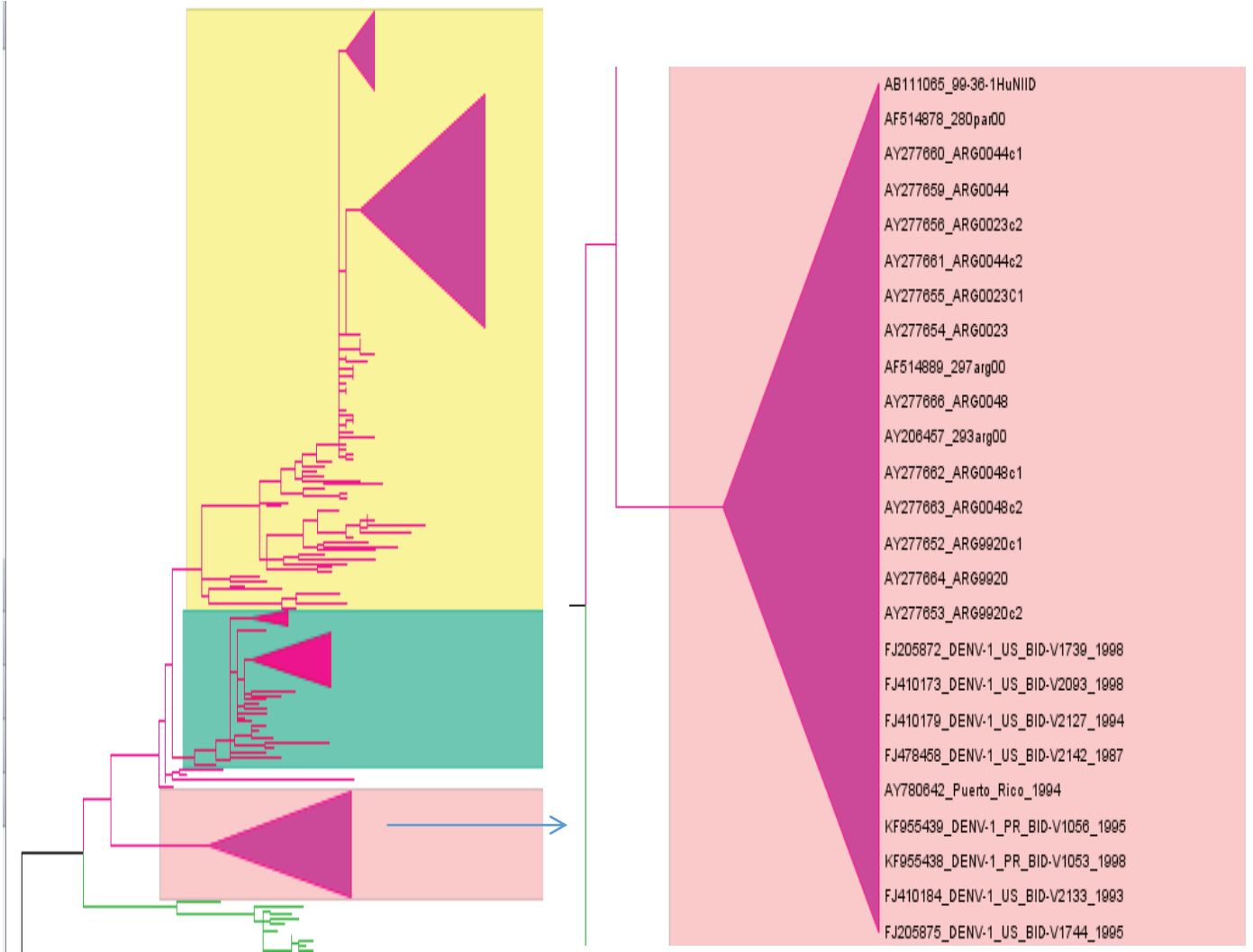


Clado I, Subclado Ib VE ampliación del grupo de secuencias de Argentina detectadas en 2008-2010, las cuales se agrupan con secuencias de Brasil de 2010-2013



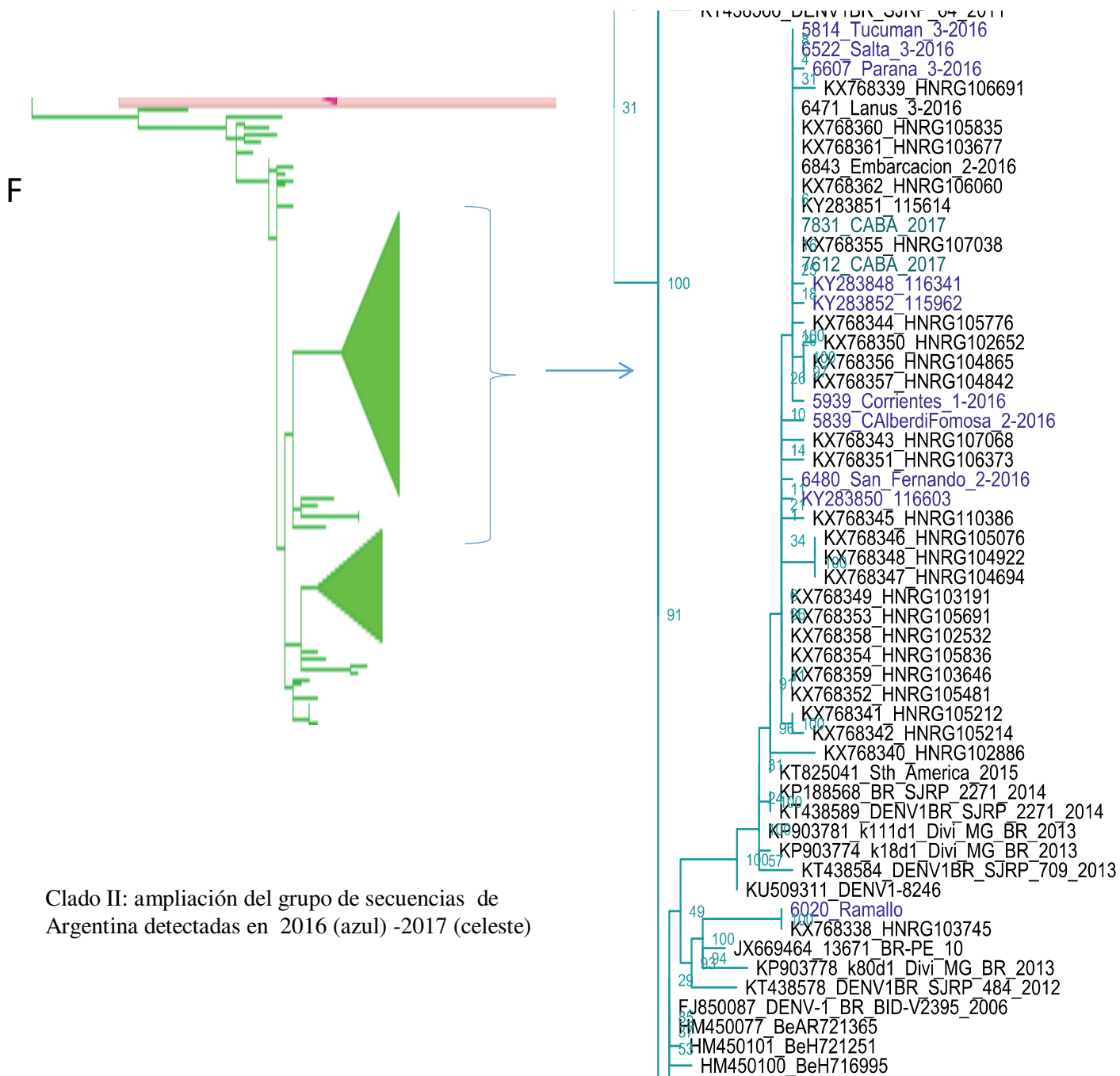
Clado I, sub clado Ib BR ampliación del grupo de secuencias de Argentina detectadas en 2000-2003, las cuales forman un agrupamiento monofilético y un agrupamiento de secuencias de Argentina detectas en el año 2000 asociadas con secuencias de Paraguay del 2000 y de Brasil de 1190-2000.

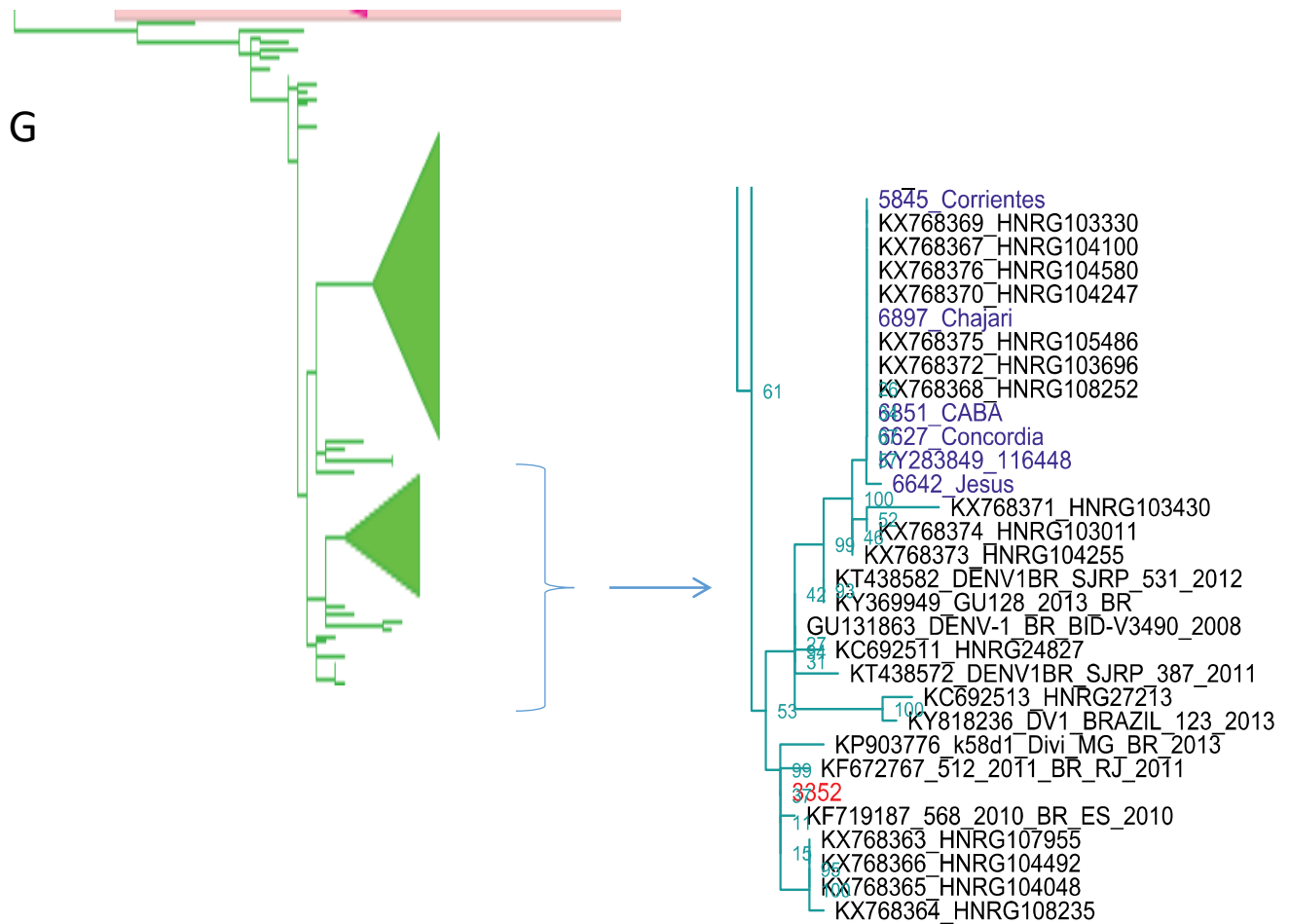
E



Clado I, sub clado Ia PR: ampliación del grupo de secuencias de Argentina detectadas en 2000 asociadas con secuencias de Puerto Rico 1993-1998

Este grupo de secuencias no corresponden a esta tesis, pero se muestra el agrupamiento a los fines de graficar su homogeneidad y no inclusión de alguna de las nuevas secuencias generadas en años posteriores de circulación viral.





Clado II: ampliación del grupo de secuencias de Argentina detectadas en 2011 (rojo) y 2016 (azul)

Figura 48. Arbol filogenético de máxima verosimilitud obtenido por IQtree, donde se detallan las secuencias de Argentina incluídas en éste estudio y su relación filogenética (A a G)

El análisis filogenético de las secuencias de nuestro estudio en el país entre 2002 y 2018, permite las siguientes observaciones:

- Clado I. Subclado Ib VE: se agrupan las secuencias de Argentina del 2008-2009 y 2010 (Figura 47 C) asociadas a secuencias de Brasil de 2010-2013. También incluye secuencias de Argentina del 2015-2016-2017 y 2018 asociadas a secuencias de Brasil de 2010-2013 (Figura 47 B) y otro agrupamiento de

secuencias de Argentina obtenidas en 2011 asociadas a cepas de Paraguay 2011 (Figura 47 A).

- Clado I. Subclado Ib BR: secuencias obtenidas en el brote del 2002 y 2003 de Salta agrupadas con secuencias del brote de Argentina y Paraguay del 2000 asociadas a cepas de Brasil de 1990-2002 (Figura 47 D)
- Clado I. Subclado Ia PR: se agrupan algunas secuencias de Argentina del 2000 asociadas con secuencias de Puerto Rico de 1993-1998 (Figura 47 E).
- Clado II. En este agrupamiento se encuentran una secuencia de 2011 (Figura 47 G) y por otro lado secuencias del 2016 y 2017 de Argentina asociadas con secuencias de Brasil detectadas entre 2010-2013 (Figura 47 F y G).

4.2. DENV-2: El análisis filogenético se realizó sobre un fragmento de 1480 pb, correspondientes al gen E en 2 muestras estudiadas. El análisis inicial mediante el software Genome Detective permitió determinar que ambas muestras pertenecen al genotipo III de DENV-2, como puede observarse en la Figura 49.

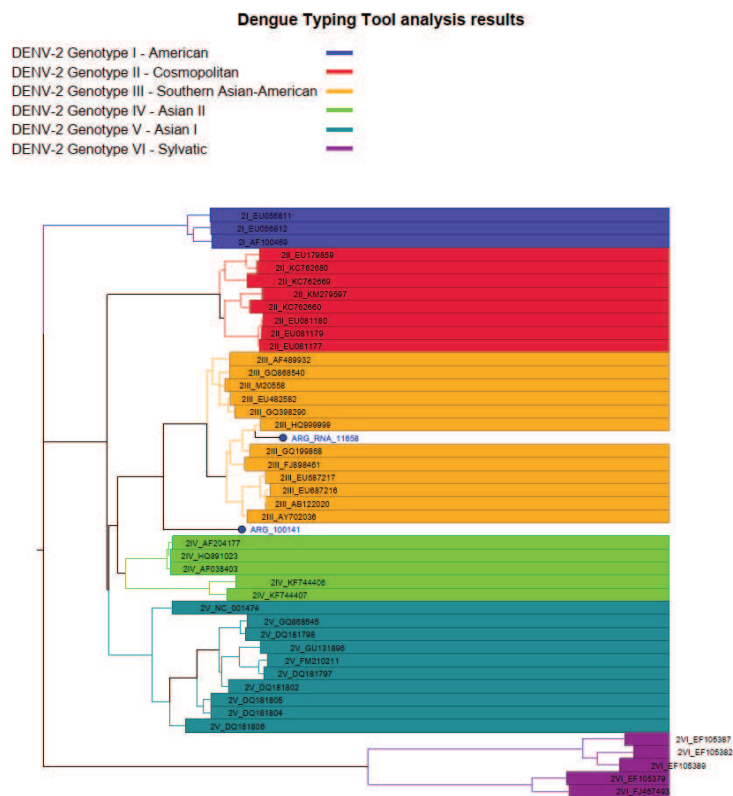


Figura 49. Determinación de genotipo de DENV-2 en las muestras incluídas en el estudio mediante el software Genome detective, dengue Typing tool el punto azul señala las dos muestras que corresponden a las secuencias obtenidas en este estudio

El análisis filogenético se realizó mediante la comparación de las secuencias Argentinas utilizando un dataset que incluyó fundamentalmente secuencias disponible en GenBank, de DENV-2 del genotipo III de circulación en distintas regiones de América (N=463, Tabla 2Anexo 10), Con este dataset se construyó un árbol por máxima verosimilitud con el programa IQ tree, con el soporte de ultrafast bootstrap (1000 réplicas). El modelo de sustitución nucleotídica utilizado fue TIM3+G. Los otros métodos utilizados mostraron árboles de topología similar, con lo cual solo se muestran los resultados obtenidos por el método de máxima verosimilitud. En la figura 50 a se observa el árbol filogenético obtenido por máxima verosimilitud donde se ha ampliado la zona donde se agrupan las dos secuencias de Argentina. Las secuencias de DENV-2 caracterizadas en CABA en 2018 a partir de un viajero y en 2020 en la misma región, en un caso autóctono, ambas correspondieron al genotipo asiático americano, tiene mayor relación filogenética con cepas de México y Guatemala, en un cluster que tiene como secuencia basal a una de Nicaragua detectada en 2007.

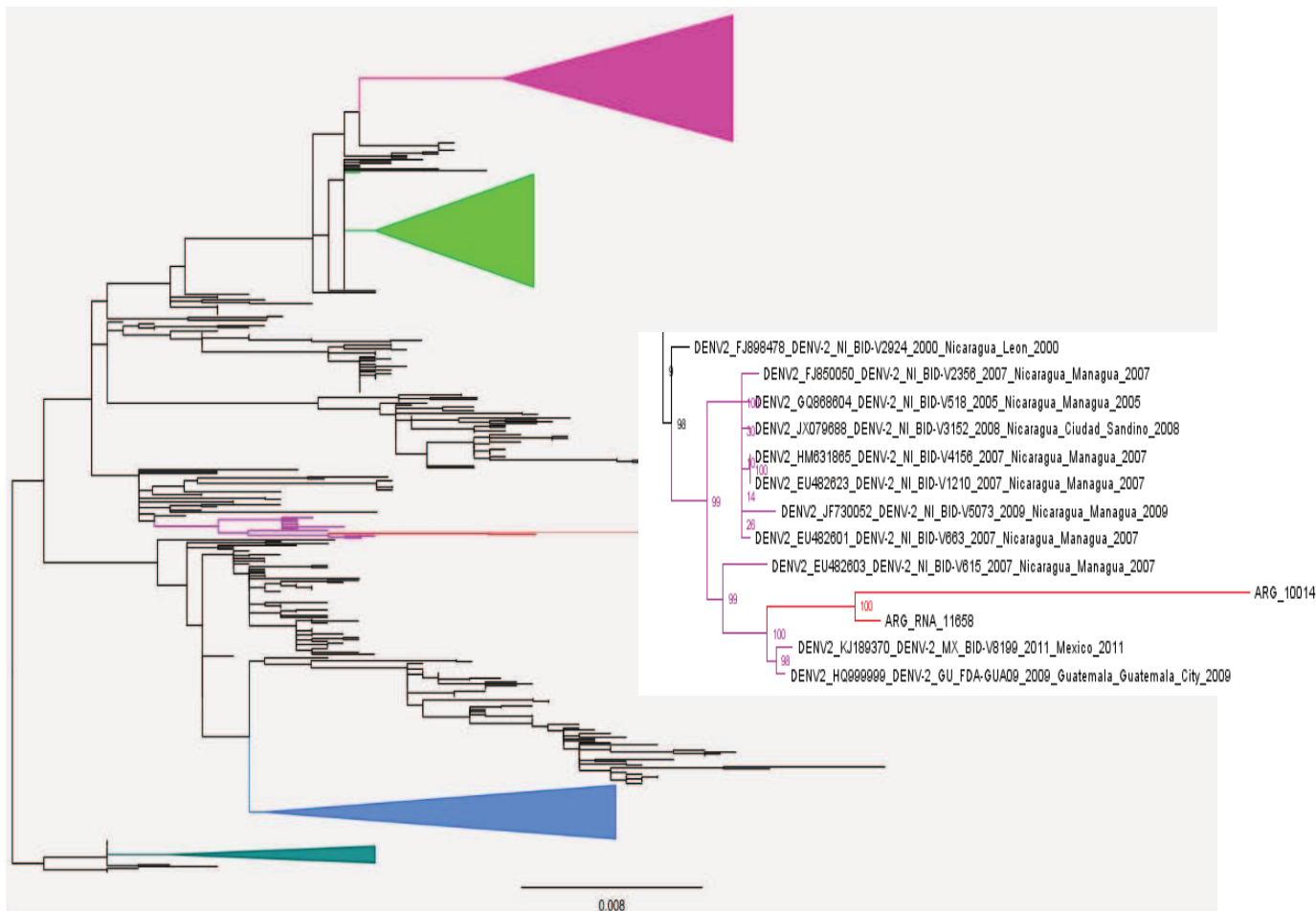


Figura 50. Arbol filogénico obtenido con IQtree, para DENV-2, donde se ve ampliada la zona donde se agrupan las dos secuencias de Argentina incluidas en este estudio (ramas indicadas en color rojo). Se encuentran agrupados los distintos subclados descritos en otras publicaciones para facilitar la visualización del árbol: azul BR1, verde azulado BR2, verde BR3, fucia BR4, triangulo fucia BR4

4.3. DENV-3:

4.3.a. Genotipificación de DENV-3 (2003-2004) por RSS- PCR: se obtuvieron 18 (41%, 18/44) muestras positivas para un único patrón de bandas correspondiente al subtipo C, Genotipo III (Figura 51). Las muestras positivas comprendieron a 2003 y 2004 y corresponden a cepas detectadas en pacientes procedentes de 7 localidades de Salta, una localidad de Jujuy y un caso importado de Salta en Tucumán: 3 de Colonia Santa Rosa (29/3/03, 8/4/03, 14/4/03), 1 de Tartagal (17/3/03), 3 de Embarcación (5/12/03, 9/12/03, 9/12/03), 3 de Pichanal (15/1/04, 21/1/04, 21/1/04), 2 de Orán (22/1/04, 30/1/04), 2 de Yuto (12/2/04, 8/3/04), 1 de Tucumán (18/03/04), 1 de Libertador San Martín (7/02/04) y 1 de Salvador Mazza (23/02/04).

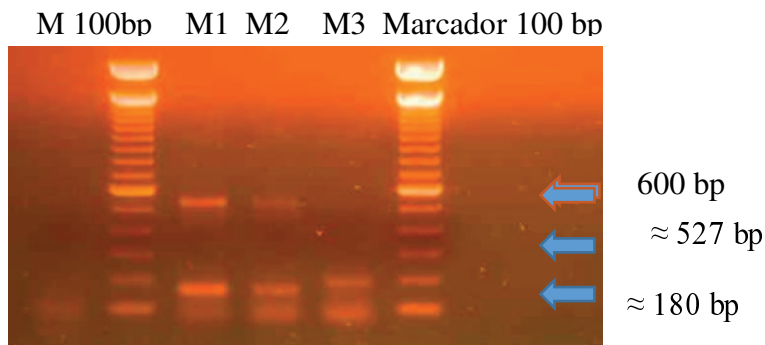


Figura 51. Corrida electroforética de muestras DENV-3 positivas por *n*RT-PCR y analizadas por RSS-PCR.

4.3.a. Secuenciación genómica y filogenia de DENV-3 detectado en 2003:

Para corroborar el genotipo identificado, una de las muestras positivas de genotipo III por RSS-PCR, fue sometida a la secuenciación por Sanger utilizando los *primers* D1-TS3 que amplifican el fragmento genómico que se utilizaba en el diagnóstico durante el período descrito [107]. El análisis mediante el software Genome Detective, “dengue Typing Tool” permitió realizar la genotipificación utilizando dicha secuencia y corroborar el resultado (Figura 52).

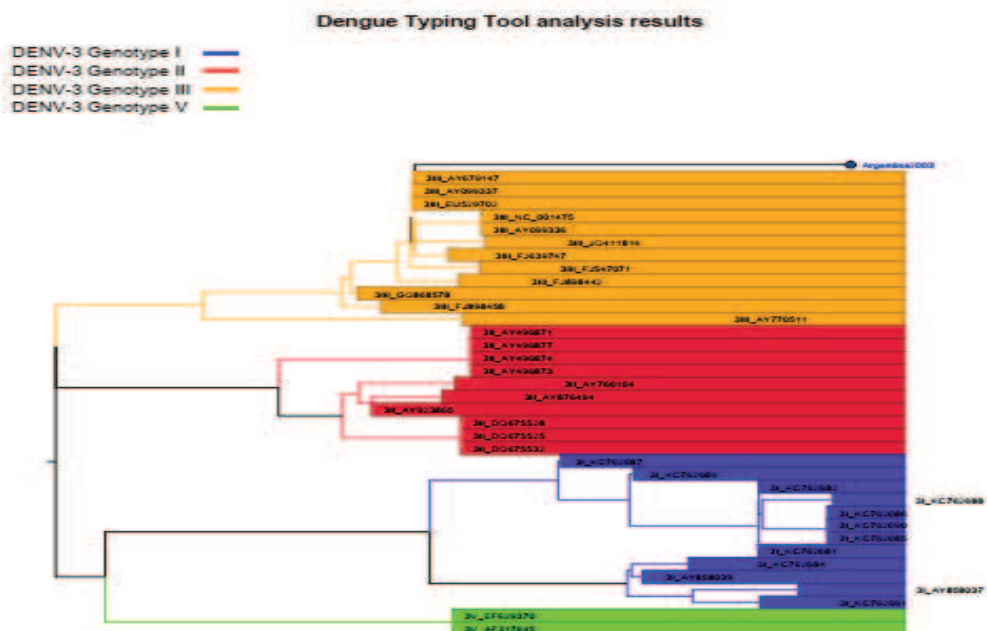


Figura 52. Determinación de genotipo de DENV-3 de una de las muestras caracterizadas por RSS-PCR Subtipo III del 2003 mediante el software Genome detective, dengue Typing toll el punto azul señala la muestra que corresponde a la secuenciasobtenida en este estudio.

4.3.b. Genotipo y filogenia del DENV-3 detectado en 2012: El análisis inicial mediante el software Genome Detective permitió determinar que la muestra de 2012 estudiada pertenecía al genotipo III de DENV-3, como puede observarse en la Figura 53.

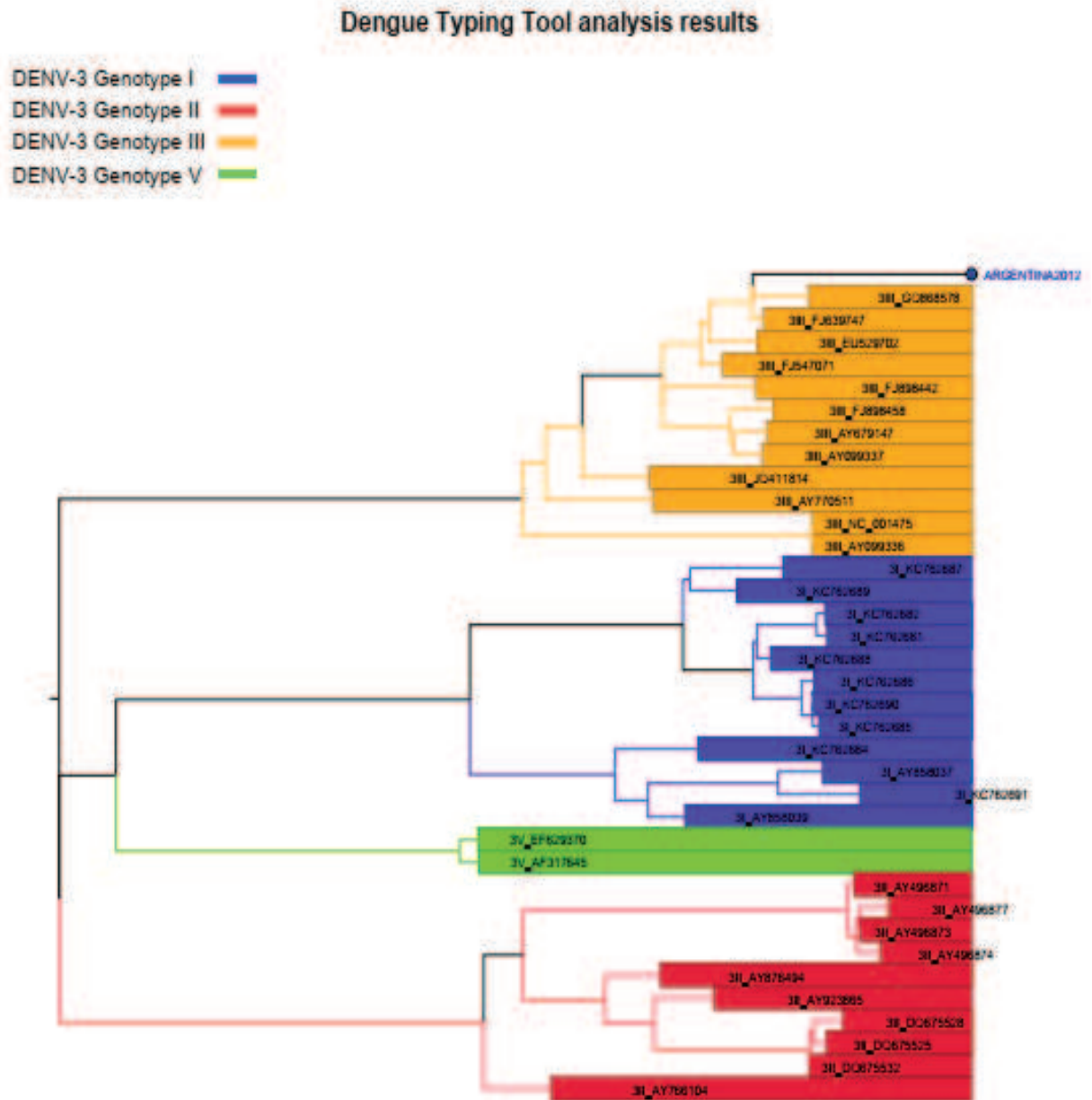


Figura 53- Determinación de genotipo de DENV-3 en la muestra incluida en el estudio mediante el software Genome detective, dengue Typing tool el punto azul señala la muestra que corresponde a la secuencia obtenida en este estudio.

El análisis filogenético se realizó mediante la comparación de secuencias disponible en GenBank, de DENV-3 del genotipo III de circulación en distintas regiones de América (N=463, Tabla 3 Anexo 10), con la secuencia autóctona detectada en Argentina (N= 104 del genotipo

III y N=7 de otros genotipos). Se utilizaron 1480 nt para el análisis[203]. Con este dataset se construyó un árbol por máxima verosimilitud con el programa IQ tree, con el soporte de ultrafast bootstrap (1000 réplicas). El modelo de sustitución nucleotídica utilizado fue TIM2+G. Los otros métodos utilizados mostraron árboles de topología similar, con lo cual solo se muestran los resultados obtenidos por el método de máxima verosimilitud. En la figura 54 se observa el árbol filogenético obtenido, donde se indica la secuencia de DENV-3 caracterizada en CABA en 2012, dentro del cluster indicado en rojo. La secuencia de Argentina se encuentra muy relacionada filogenéticamente con secuencias detectadas en Venezuela durante los años 2006 y 2008.

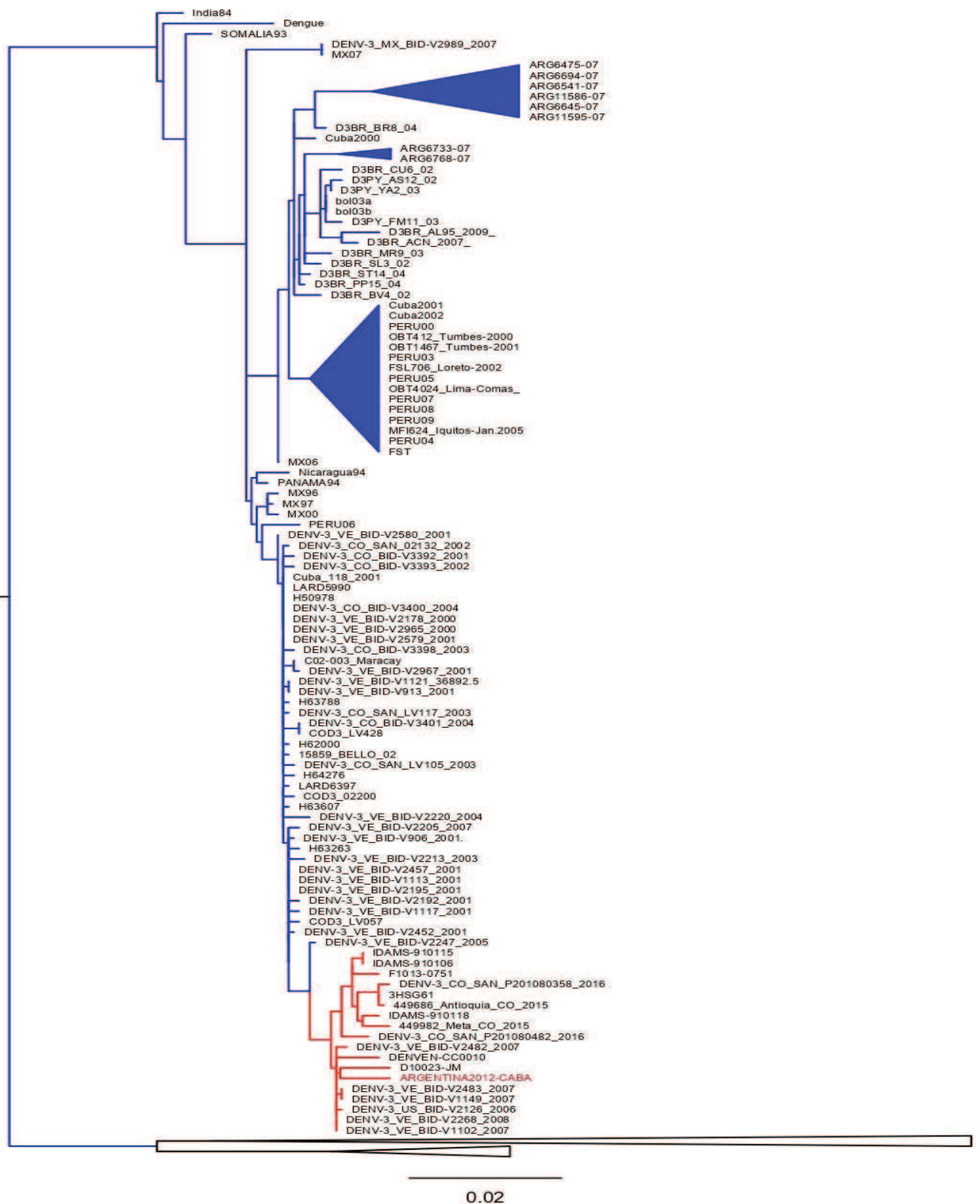


Figura 54. Arbol filogénico obtenido con IQtree, para DENV-3, donde se ve ampliada la zona donde se agrupa la secuencia de Argentina incluida en este estudio. Los dibujos de color indican distintos agrupamientos, en la parte superior se puede ver las secuencias de Argentina detectadas en viajes durante el año 2007, fundamentalmente asociadas con cepas de Brasil. En azul se indica el Genotipo III y colapsados el resto de los genotipos incluidos en el análisis.

4.4. DENV-4:

Se realizó la caracterización del genotipo de cepas virales de DENV-4 autóctonas circulantes en Argentina. La emergencia de este serotipo en Argentina fue detectada en 2010, con la comprobación de circulación del DENV-4 en Rosario, Santa Fé, determinándose que pertenecía al genotipo II. El análisis inicial mediante el software Genome permitió determinar que todas las muestras estudiadas entre 2013 a 2021 pertenecen al genotipo II de DENV-4, como puede observarse en la Figura 55.

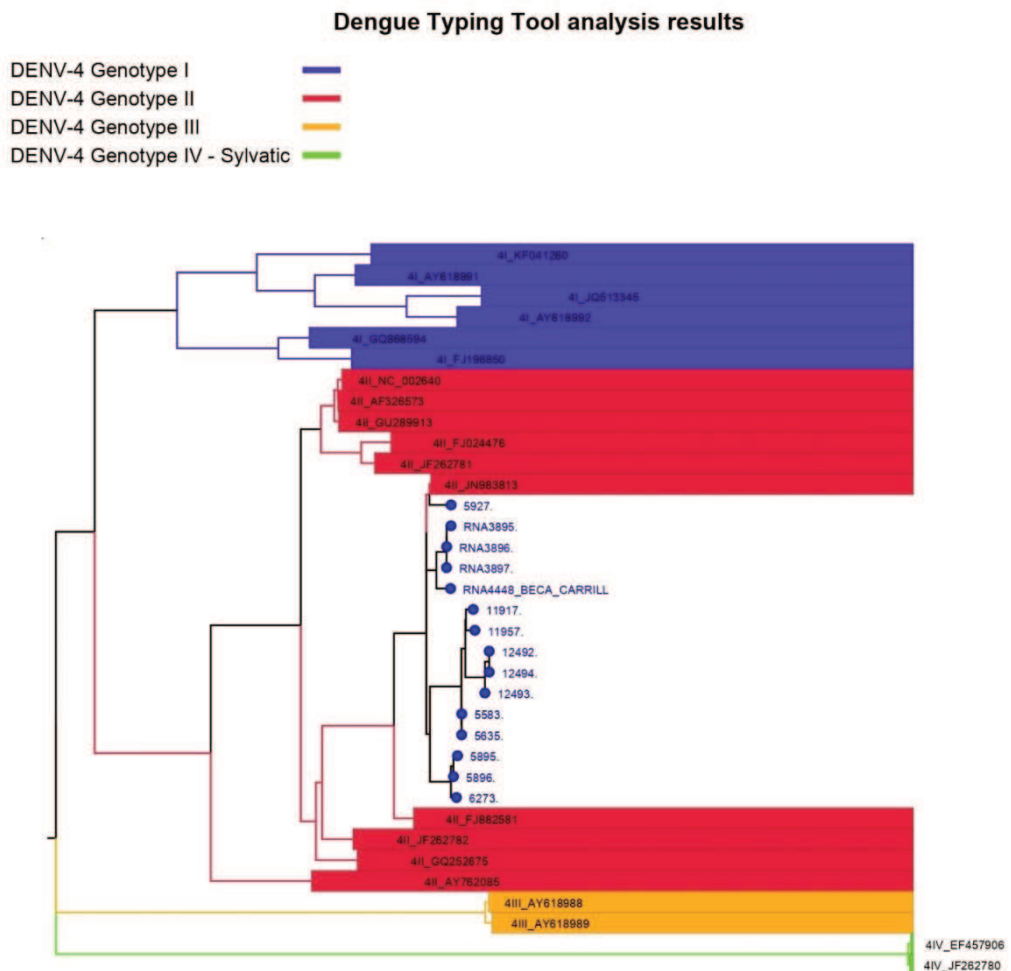


Figura 55. Determinación de genotipo de DENV-4 en 15 muestras de Argentina detectadas entre 2013-2021 e incluidas en este estudio mediante el software Genome detective, dengue Typing tool Las muestras Argentina se indican con un punto azul.

Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias de cepas de virus DENV-4 de diferentes genotipos y áreas geográficas disponibles en el GenBank (Tabla 4 Anexo 10) (N= 90 del genotipo II y N=8 de otros genotipos). El análisis filogenético se realizó en un

fragmento de 1635 nt mediante los métodos Neighbor Joining, análisis Bayesiano y máxima verosimilitud. Los resultados del análisis filogenético obtenido por todos los métodos muestran una topología similar, y se muestran en la Figura 56 el árbol obtenido por Maxima verosimilitud, utilizando el modelo evolutivo TIM+I+G. En el año 2010 se introdujo en Brasil el genotipo I, pero hasta la actualidad no han ocurrido nuevas detecciones de dicho genotipo en el continente Americano y tampoco se ha evidenciado su circulación en Argentina. El análisis filogenético realizado en las cepas de DENV-4 que circularon en Argentina desde su introducción en el año 2013 constituye un agrupamiento monofilético (figura 56). En el árbol pueden observarse las asociaciones filogenéticas de las secuencias de los años 2013 a 2016 de Argentina (nombres de las secuencias indicados en celeste y verde respectivamente) con cepas de Brasil de 2012 y 2013 y las del 2019-2021 (nombres de las secuencias indicados en rosa) asociadas con cepas de Paraguay de 2018.

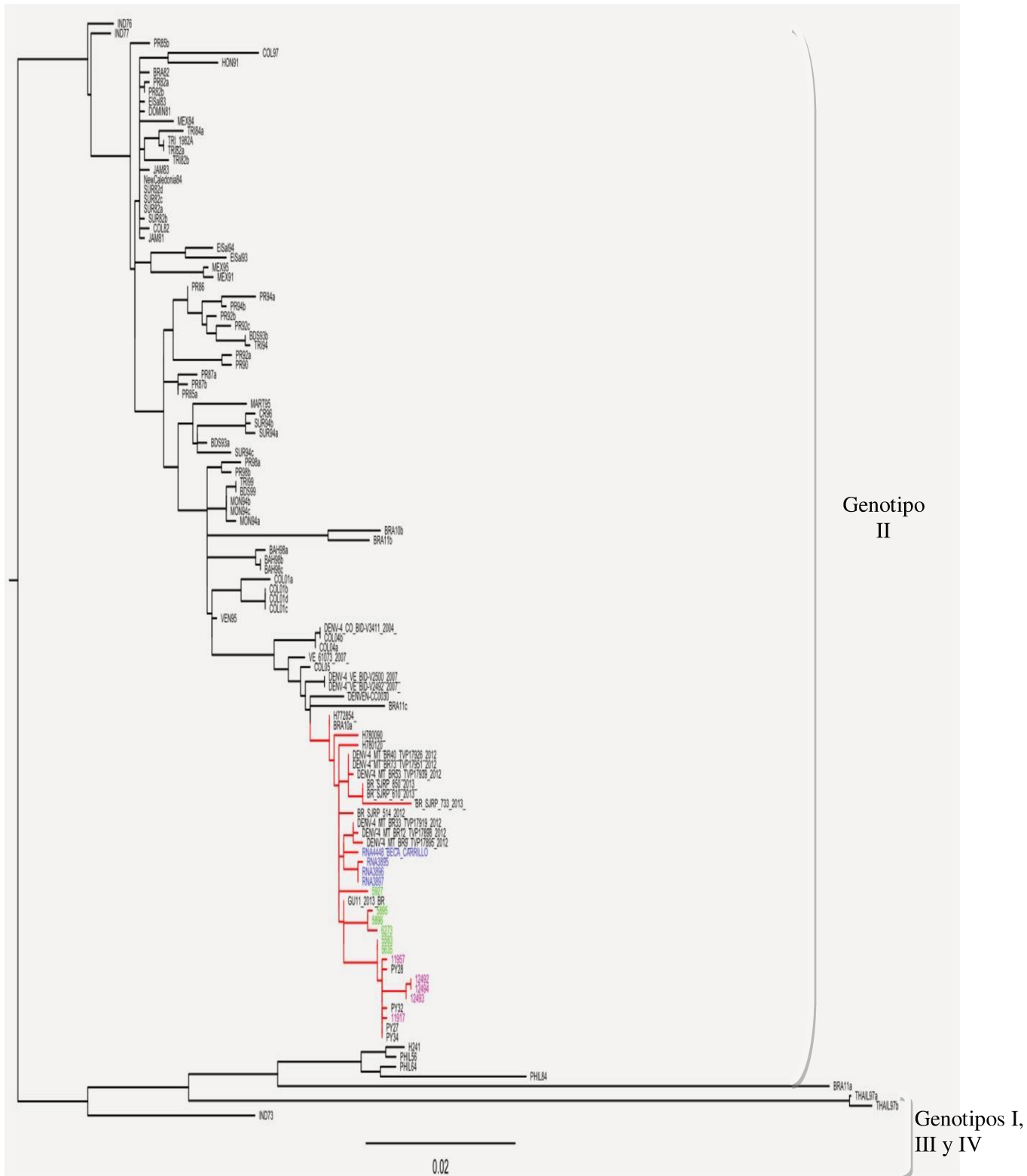


Figura 56. Arbol filogénico obtenido con IQtree, para DENV-4, donde se ve en rojo marcado el cluster que incluye las secuencias de Argentina incluida en este estudio detectadas entre 2013-2021. Las muestras correspondientes a los años 2013 a 2016, se indican en azul y verde respectivamente y en rosa se muestran las detectadas en 2019-2021.

5.CONCLUSIONES

Desde la reemergencia del dengue en la Argentina, el trabajo sostenido de la red nacional de laboratorios de dengue y otros arbovirus, junto a nuestro laboratorio en INEVH, ha permitido la confirmación de la circulación de DENV-1 en 2000, 2002, 2003, 2008-2011, 2013-2021; DENV-2 en 1998, 1999, 2003, 2006, 2007, 2010, 2011, 2012, 2013, 2020, 2021; DENV-3 en 2003, 2004, 2006, 2007, 2012 y DENV-4: 2010, 2013-2016 y 2019-2021. En este capítulo se ha presentado la caracterización del genotipo de una selección de cepas de los 4 serotipos de DENV detectadas en Argentina. Se aplicaron satisfactoriamente dos metodologías diferentes: genotipado rápido mediante la aplicación de una reacción de PCR con *primers* diseñados para amplificar y producir patrones de bandas en base a polimorfismo de enzimas de restricción y por otro lado, la metodología de amplificación, secuenciación nucleotídica Sanger y filogenia viral de fragmentos genómicos informativos para el genotipo viral (secuenciación parcial). En ambos casos, los estudios se realizaron a partir de muestras de RNA viral extraídos de muestras clínicas correspondientes a casos humanos confirmados de infecciones por dengue (fundamentalmente se ha trabajado con muestras de suero y en algunos casos fatales, a partir de muestras de tejidos) o RNA viral extraído de un pasaje único en C6/6 realizado para aumentar el material genómico.

La secuencia codificante de la proteína E del DENV fue seleccionada fundamentalmente como el objetivo para la amplificación y secuenciación considerando que la longitud de esta secuencia, aproximadamente 1485 pb, contiene regiones conservadas que permiten diferenciar DENV de otros flavivirus y la variabilidad suficiente para diferenciar entre serotipos, genotipos y/o linajes [175][204]; por tanto, es un fragmento de genoma preferido históricamente para la genotipificación. En consecuencia, al buscar información en GenBank, hay más secuencias de codificación E disponibles que para cualquier otro gen y es factible acceder a un muestreo de secuencias más amplio la realización de análisis filogenético. Diversos estudios han mostrado que las reconstrucciones de árboles filogenéticos de DENV en base a secuencias de la proteína E representan topologías de árbol similares a las basadas en secuencias completas por lo que la secuenciación parcial de este gen facilita la genotipificación a un costo y esfuerzo significativamente reducidos [175][205][206][207]. Sin embargo, actualmente debemos considerar que se ha incrementado la disponibilidad de equipos y métodos más accesibles para la obtención de secuencias genómicas completas y es posible que en el corto plazo, la secuenciación de próxima generación se convierta en una práctica rutinaria. Estudios recientes con secuencias completas han evaluado la señal filogenética de los diferentes genes DENV y los resultados indican que solo determinadas partes del genoma DENV son adecuadas para clasificar secuencias a nivel de genotipo y subgenotipo con alta confianza. Otras regiones genéticas alternativas a la E, tales como NS1, NS3 y NS5 exhiben

mayor soporte filogenético y será importante profundizar incluso si la combinación de análisis de estas regiones pudiera ser la herramienta para reclasificar y proponer un nuevo modelo de clasificación más adecuado para evidenciar la diversidad genética en DENV[178].

El trabajo que se presenta en esta tesis para determinar genotipo en las cepas de dengue ha sido un proceso de implementación y fortalecimiento de una línea nueva de trabajo en el INEVH iniciado a partir de la disponibilidad de equipamiento en el año 2005 y ha contribuido a la generación de capacidades para dar respuesta a los requerimientos de salud pública e investigación. En los últimos años, el avance tecnológico y el conocimiento generado en esta área ha permitido un importante desarrollo de las herramientas para filogenia, filodinamia y análisis evolutivo de patógenos y epidemias. Los resultados panorámicos de genotipado y filogenia obtenidos en este trabajo constituyen una piedra basal para avanzar en una caracterización genética más profunda de las cepas circulantes en el país.

-DENV-1: Las primeras grandes epidemias de DENV-1 en las Américas ocurrieron en Jamaica y Cuba en 1977 y desde entonces, el DENV-1 ha estado circulando continuamente en las Américas, lo que ha provocado varias oleadas de epidemias de dengue leve/ dengue grave en la región. El genotipo V del DENV-1 ha sido el más prevalente que ha circulado en las Américas durante los últimos 40 años. Se ha sugerido la existencia de linajes dentro de los genotipos del virus DENV-1, integrados por cepas relacionadas geográfica y temporalmente, para explicar la topología que surge de la filogenia viral. El estudio filogenético de las cepas de DENV-1 aisladas en el 2000 en Misiones, Formosa, Jujuy y Paraguay demostró la circulación simultánea de cepas del genotipo V correspondientes a dos agrupamientos diferentes[185]. A medida que este serotipo se expandió en América y se avanzó en los estudios genotípicos en la región, diversos autores han planteado en los últimos años el reconocimiento de un mayor número de linajes dentro de este genotipo [26][208] [193]. En este capítulo se presenta la caracterización del genotipo de 87 secuencias de DENV-1 detectadas en Argentina entre 2002 y 2018. Inicialmente se realizó la amplificación en un único round RT-PCR de un fragmento de 466 nt comprendidos entre las posiciones nucleotídicas 2094 y 2539, empleando los *primers* específicos DIF y DIR respectivamente, siguiendo la metodología descrita por Avilez *et al* (2002) en 43 muestras del período 2002 al 2010 y luego de seleccionar las secuencias más representativas de ese primer grupo, el estudio avanzó con la secuenciación de la E completa en 56 muestras obtenidas desde 2002 al 2018. El análisis de filogenia evidencia que en el período del estudio las secuencias correspondieron al genotipo V y se han observado algunos agrupamientos dentro del genotipo que sugieren la extinción y el posterior ingreso de diferentes linajes a partir de los países de la región.

En un estudio reciente se ha investigado el patrón espacio-temporal de aparición y diseminación de los linajes DENV-1 en el continente. Se realizó el análisis filogenético de 836 secuencias de del gen E del genotipo V aisladas de 46 países diferentes alrededor del mundo durante 50 años (1962 a 2014). Observaron que la diversidad genética del genotipo V de DENV-1 en las Américas resultó de dos introducciones independientes de este genotipo desde la India. La primera cepa del genotipo V probablemente se introdujo en las Antillas Menores alrededor de principios de la década de 1970 y esta región del Caribe se convirtió en el origen de varios linajes DENV-1 que se extendieron en las Américas durante las décadas de 1970 y 1980. La mayoría de esos linajes parecen extinguirse durante la década de 1990, excepto uno que persistió en Venezuela y luego se extendió a otros países de América, dominando las epidemias de DENV-1 en la región desde principios de la década de 2000 en adelante. La segunda cepa del genotipo V de origen indio también se introdujo muy probablemente en las Antillas Menores alrededor de principios de la década de 1980. Este linaje permaneció casi sin ser detectado durante casi 15 años, hasta que se introdujo en el norte de Brasil a mediados de la década de 1990 y luego se extendió a otras regiones del país. Diferentes regiones geográficas han desempeñado un papel en el mantenimiento y la difusión del genotipo V de DENV-1 en las Américas a lo largo del tiempo.

Los linajes del genotipo V de DENV-1 se han originado, diseminado y extinguido en las Américas con dinámicas muy diferentes y el fenómeno de reemplazo de linajes en los sucesivos brotes epidémicos de DENV-1 fue una característica común en la mayoría de los países[209] . Los autores describen 2 clados: uno compuesto principalmente por secuencias de origen asiático y el otro compuesto, denominado cosmopolita, integrado por secuencias de Asia, África y las Américas. Dentro del clado cosmopolita, las secuencias americanas se distribuyeron en dos linajes principales: clado I con el 91.5% (n = 628) de las secuencias americanas muestreadas entre 1977 y 2014; y el clado II que incluyó el 8.5% (n = 58) de las secuencias americanas muestreadas entre 1985 y 2013. En el clado I del clado cosmopolita se describen 3 sub-clados: suclado I-PR (restringido a Puerto Rico pero con algunas detecciones en Paraguay, Argentina y Perú), el subclado I-BR (habría ingresado al sudeste de Brasil en los 80' para diseminarse en el país y detectarse en Paraguay y Argentina en los 2000') y el subclado I-VE.

El subclado I-VE probablemente surgió en Venezuela a finales de la década de 1980 y representa el linaje viral más exitosamente diseminado en el continente americano. Se propone que este subclado continúa circulando en Venezuela hasta el período de muestreo más reciente (2007-2008) y desde Venezuela migra a Argentina, el norte de Brasil y Nicaragua a mediados de la década de 2000, y también a los EE. UU. a finales de la década de 2000. Durante la década de 2000, el subclado I-VE se extendió desde Nicaragua a otros países de Centroamérica, México y Estados Unidos, estableciendo el linaje centro / norteamericano previamente reconocido.

Aproximadamente a fines de la década de 2000, se propone que el subclado I-VE también se diseminó desde Argentina a la región noreste de Brasil.

Por otro lado, en el clado II Cosmopolita se encuentran variantes que habrían ingresado por las Antillas Menores en los 80' y luego habría ingresado en el norte de Brasil en el 1996 para rápidamente diseminarse hacia nordeste y sudeste del país. A mediados de los 2000, se habría diseminado hacia el centro y sur hacia Argentina.

El análisis filogenético de las secuencias de nuestro estudio en el país entre 2002 y 2018, permite las siguientes observaciones:

- Clado I. Subclado Br: secuencias obtenidas en el brote del 2002 y 2003 de Salta agrupadas con secuencias del brote de Argentina y Paraguay del 2000 asociadas a cepas de Brasil de 1990-2002
- Clado I. Subclado Ve: se agrupan secuencias de Argentina del 2008-2009 y 2010 asociadas a secuencias de Brasil de 2010-2013. También incluye secuencias de Argentina del 2015 y 2018 asociadas a secuencias de Brasil de 2010-2013 y otro agrupamiento de secuencias de Argentina obtenidas en 2011 asociadas a cepas de Paraguay 2011.
- Clado II. En este agrupamiento se encuentran las secuencias de 2011 relacionadas entre sí, y por otro lado secuencias del 2016 y 2017 de Argentina.

Esto estaría reflejando que la extinción de uno de los linajes observados en el brote del 2000 descrito por Aviles y col. que, en nuestra filogenia, agrupa dentro del subclado Pr y no volvió a detectarse. Sin embargo, el otro linaje descrito en el 2000 volvió a detectarse luego en 2002 en otra región de Argentina, en este caso en el NOA y representan la variante que circuló también en el 2003 para luego extinguirse. No se detecta el DENV-1 por 5 años en el país hasta el 2008 a expensas de un brote que se inicia en la zona limítrofe con Bolivia. Las secuencias de DENV-1 del 2008-2009-2010 se relacionan entre sí y agrupan con el Clado I-Subclado VE, representando el ingreso al país de otra variante del genotipo V en Argentina. Dentro de este mismo clado se encuentran secuencias de 2011 y un agrupamiento importante de secuencias de 2015-2016-2017 y 2018. Por otro lado, hay otras secuencias de 2011, 2016 y 2017 que agrupan en el subclado II, revelando que durante esas epidemias, el genotipo V circulante tenía una mayor variabilidad genética mostrando dos linajes diferentes. Estos hallazgos son coincidentes con lo evidenciado en la caracterización del DENV-1 de casos importados y autóctonos detectados en 2016[90], pero en nuestro trabajo se evidencia que esta diversificación de los linajes circulantes ya se observaba en el brote de 2011.

-DENV-2: este serotipo incluye seis genotipos, entre los cuales el cosmopolita es el genotipo es el más expandido [80][210]. El genotipo asiático / americano (AS/AM) del virus del DENV-2

ha estado evolucionando en las Américas durante los últimos 37 años, dando lugar a varias oleadas de epidemias de dengue y al surgimiento de diferentes linajes virales en la región. Un estudio que evaluó un total de 582 secuencias de genes E del Genotipo AS / AM del DENV-2 caracterizadas entre 1983 a 2012 en 29 países de América, reveló que la diversidad genética de este genotipo que circula en las Américas resultó principalmente de un solo evento, puede organizarse en al menos cuatro linajes principales (I a IV) que surgieron en la región del Caribe a principios de la década de 1980 y luego se extendieron y extinguieron con diferente dinámica. Los linajes I y II dominan las epidemias en la región del Caribe durante la década de 1980 y principios de la de 1990, el linaje III se convierte en el DENV-2 predominante en el Caribe y América del Sur durante el 1990, mientras que el linaje IV domina las epidemias en América del Sur y Central durante la década de 2000. Surinam y Guyana parecen representar importantes puntos de entrada para DENV-2 desde las Antillas Menores a América del Sur, mientras que Venezuela, Brasil y Nicaragua fueron señalados como los principales ejes secundarios de difusión a otros países del continente[211].

Este genotipo del DENV-2 ingresó en Brasil a través del estado de Río de Janeiro alrededor de 1990, y desde entonces se ha probado y evolucionando, dando lugar a varias epidemias de dengue en todo el país que causaron un importante problema de salud pública [212]. De particular interés ha sido la epidemia de 2008 en Brasil por este serotipo, cuyo mayor impacto se evidenció en el estado de Río de Janeiro, con un alto número de casos graves y tasa de mortalidad, en comparación con brotes anteriores. El análisis filogenético de la cepa epidémica de 2008 reveló que el brote fue causado por un nuevo linaje viral del genotipo AS/AM, que fue señalado como responsable de la gravedad del brote también. Un escenario similar se repitió en Estado de Rio de Janeiro para 2019. Las secuencias de 2019 revelan que pertenecen al mismo linaje que causó el brote de 2008, sin embargo, es filogenéticamente distante de cualquier cepa brasileña identificada antes. De hecho, parecía tener su origen en Puerto Rico alrededor de 2002 y haberse introducido en el estado a fines de 2018. Teniendo en cuenta que no se reportó ningún caso de DENV-2 durante la última década en el estado (lo que representa toda una generación de niños susceptibles), resultó notorio el bajo número de hospitalizaciones.

Las secuencias de DENV-2 caracterizadas en CABA en 2018 (viajero) y en 2020 (caso autóctono) correspondieron ambas al genotipo AS/AM y se encuentran además, muy relacionadas entre sí. Este es el mismo genotipo caracterizado cuando se evaluaron las secuencias de las cepas de DENV-2 causantes de la emergencia del dengue en la Argentina[87] y hasta el momento no hay otros estudios que hayan informado la detección de otro genotipo en el país. Las secuencias de 2018 y 2020 agrupan con secuencias de Guatemala y México, y también de Nicaragua, lo cual podría estar indicando que en la zona central de Argentina, el

impacto del turismo hacia el Caribe pudiera haber conectado y posibilitado la expansión en nuestro país. DENV-2 ha sido detectado con frecuencia en distintas provincias argentinas pero en un período donde ha sido DENV-1 el predominante, por lo que el acumulo de susceptibles es importante. Desde 2019 se observa un incremento en la notificación de este serotipo, acompañando la tendencia ascendente de su incidencia en la región. En 2020, se notificaron 24 muertes por dengue en Argentina, pero el serotipo identificado ha sido DENV-1.

DENV-3: Lanciotti y col. identificaron cuatro subtipos geográficamente distintos o genotipos para el DENV-3[203], posteriormente se reconoció un nuevo genotipo, V, con circulación en Brasil y Colombia asociado a cepas asiáticas[213][191] y también el genotipo I asociado a casos graves de dengue en Brasil en 2004[214]. En los 80' y los 90', el serotipo 3 del virus del dengue (DENV-3) provocó epidemias inesperadas de fiebre hemorrágica del dengue (dengue hemorrágico) en Sri Lanka, África oriental y América latina. Las secuencias del virus causante de esas epidemias geográficamente distantes se relacionaron estrechamente y pertenecen a DENV-3, genotipo III, que se originó en el subcontinente indio. La aparición de dengue hemorrágico en Sri Lanka en 1989 se correlacionó con la aparición allí de un nuevo subtipo de DENV-3 variante III. Esta variante probablemente se extendió desde el subcontinente indio a África en la década de 1980 y de África a América a mediados de la década de 1990. El serotipo DENV-3, subtipo III fue detectado por primera vez en el continente Americano en 1994 (Nicaragua y Panama) y el virus se dispersó posteriormente hacia América Latina, asociándose con la aparición de formas graves. La primera circulación de DENV-3 en Argentina se dio en la región del NOA en 2003, en simultáneo con DENV-1 y DENV-2, al detectarlo en un grupo de casos relacionados con viajes a Bolivia durante el primer semestre del año. Luego hubo un silencio epidemiológico durante los meses de mayo a septiembre y en octubre de 2003, se detectó el inicio un brote desde el lado argentino a expensas únicamente de DENV-3 que afectó a Salta y Jujuy con un número elevado de casos de acuerdo al registro de las primeras epidemias. El genotipo en ambas temporadas fue el III, no obstante no se informaron casos graves. La metodología RSS-PCR permitió determinar el genotipo III para el DENV-3 y posibilitó alertar al sistema y dar una respuesta de Salud Pública sin el requerimiento de secuenciación. Particularmente el patrón de bandas de RSS-PCR para el DENV-3 era un patrón sencillo de caracterizar y pudo implementarse e interpretarse muy fácilmente, no obstante la simplicidad de la técnica, la información es limitada y no permite otros análisis. El serotipo 3 no se detectó nuevamente hasta 2006 y 2007, donde se reconoció el genotipo III en casos importados en CABA, [215] (asociado a secuencias de brotes en Paraguay, Bolivia y Brasil), luego otro silencio epidemiológico y circulación autóctona nuevamente en 2012, restringida a la zona de Capital Federal. El análisis de la secuencia de DENV-3 obtenida de un

paciente de CABA en 2012 y que no había viajado, agrupó dentro del mismo genotipo III asociada a secuencias del virus obtenidas en Venezuela, pero en un agrupamiento diferente de secuencias caracterizadas del 2007 obtenidas de viajeros en CABA.

DENV-4: El genotipo II de DENV-4 ha estado circulando en las Américas desde su introducción en el Caribe en los 80 desde el Sudeste Asiático. Se han descrito 2 subclados dentro del genotipo II originalmente integrado por cepas con una subdivisión temporal, ya que el subclado I contenía las secuencias de Latinoamérica y la mayoría de las secuencias asiáticas antes del año 2000, mientras que el subclado 2 incluía secuencias asiáticas obtenidas después del 2000 y otras más antiguas (Indonesia 1973 y China 1978)[216]

Durante el inicio del 2010, se confirmó circulación del DENV-4 en la ciudad de Rosario (Santa Fé). El virus fue aislado a partir del suero de una mujer sin antecedentes de viajes recientes. La investigación epidemiológica identificó una mujer sin síntomas clínicos pero con anticuerpos IgM e IgG específicos para dengue, con una historia de viaje reciente a Colombia, cuya vivienda era cercana al sitio laboral del caso índice. La caracterización del genotipo permitió ubicarlo dentro del genotipo II de DENV-4. Este hallazgo constituyó la primera detección del DENV-4 en Argentina y advirtió sobre el riesgo de expansión geográfica de un nuevo serotipo en nuestro país y el Cono Sur. Después de una ausencia de 2 años, en el año 2013 se identificaron por técnicas moleculares 11 cepas de virus DENV-4 en 4 provincias del país. Se estudiaron 8 muestras, obteniéndose amplicones en 3 de ellas (2 procedentes de Salta y una de Córdoba). En el año 2014 se detectó nuevamente circulación autóctona de este serotipo en la provincia de Salta. Las secuencias del DENV-4 de 2013 y 2014 se relacionan entre sí, y se asocian a cepas de Brasil del 2012. Las secuencias del 2016 son más cercanas a cepas de Brasil de 2013 y las que corresponden a 2020 y 2021 agrupan con secuencias de Paraguay del 2018, con un origen vinculado a Brasil[217].

En conclusión, el resurgimiento del dengue en nuestro país ha seguido una evolución muy vinculada a la expansión de los distintos serotipos en el continente y con un cierto retraso dada la localización más austral dentro del Cono Sur. La conjunción de diversos factores han contribuido a esta tendencia: la propagación de diferentes serotipos de DENV a partir entre países limítrofes impacta notablemente sobre las regiones de NOA y NEA, el flujo migratorio permanente de viajeros virémicos hacia el Caribe y Latinoamérica se ha asociado con introducciones virales particularmente en brotes que se han iniciado en las provincias centrales (CABA; Buenos Aires, Santa Fé) y un aumento en la infestación de vectores favorecido por condiciones climáticas, ambientales y sociales, junto a las estrategias de control vectorial que han resultado insuficientes.

Los DENV parecen aprovechar diversos mecanismos para generar diversidad genética a través de la variabilidad genética y el movimiento (principalmente humano) del huésped, así como explotar la creciente densidad de huéspedes humanos y urbanización en grandes centros poblados. La vigilancia epidemiológica y laboratorial continua que incluya la secuenciación en tiempo real de las cepas virales que circulan permitirá fortalecer la detección de nuevos linajes de DENV en Argentina y brindará información para mejorar la comprensión sobre los patrones regionales de difusión de DENV. El establecimiento o la demostración de una situación de endemidad podrían representar un cambio en el corto-mediano plazo en la epidemiología de este virus en el país y la secuenciación genómica puede aportar para caracterizar o descartar este evento. Por otro lado, teniendo en cuenta que un porcentaje de la población se encuentra con inmunidad para alguno de los serotipos circulantes pero que contamos con gran cantidad de susceptibles, ampliar el conocimiento de las características genéticas de las cepas circulantes en nuestro país permitiría alertar al sistema sanitario frente a aquellas que pudieran tener asociación con cuadros clínicos graves y/o un mayor potencial epidémico.

CAPITULO 4

MONITOREO DE LA ACTIVIDAD DE DENV, SEROTIPOS 1, 2, 3 Y 4, EN DONANTES DE SANGRE DE DOS PROVINCIAS ARGENTINAS (SALTA Y CÓRDOBA), PERÍODO 2013-2014.

1-INTRODUCCIÓN

Las infecciones por arbovirus pueden ser asintomáticas en la mayoría de los casos o resultar en enfermedades de gravedad variable. Si bien los cuatro serotipos de DENV se asocian a la posibilidad de generar cuadros de fiebres hemorrágicas como expresión más grave de las infecciones, la mayoría de ellas son asintomáticas o se presentan solamente con síntomas leves o inespecíficos. El período de incubación de la enfermedad es generalmente de 5 a 7 días, con un rango de 3 a 14 días. En general, en aquellas personas que desarrollan síntomas, el dengue se presenta como una enfermedad febril de no más de 5 a 7 días de duración, en la cual el inicio de la fiebre suele coincidir con el pico de la viremia y los niveles de viremia se ha evidenciado que pueden variar de acuerdo al serotipo infectante, estado inmune previo y/o presentación clínica (Figura 57). Durante el período virémico, presente tanto en infecciones sintomáticas (hasta 2 días antes del inicio de la fiebre) y asintomáticas, el DENV puede convertirse en una infección transmitida por la sangre[218]. Estas particularidades hacen que el DENV, así como otros flavivirus, puedan presentar un nivel de circulación silenciosa evidenciable por detección de genoma y/o aislamiento viral en población sana en áreas de riesgo epidemiológico que puede afectar la seguridad transfusional y/o contribuir a los mecanismos de transmisión y diseminación de estos agentes. Si bien el dengue es una enfermedad conocida y estudiada desde mucho tiempo atrás, recién hacia el 2008- 2009 se ha remarcado la necesidad de incluir a este patógeno como prioritario en riesgo transfusional, particularmente en países endémicos [219][220].

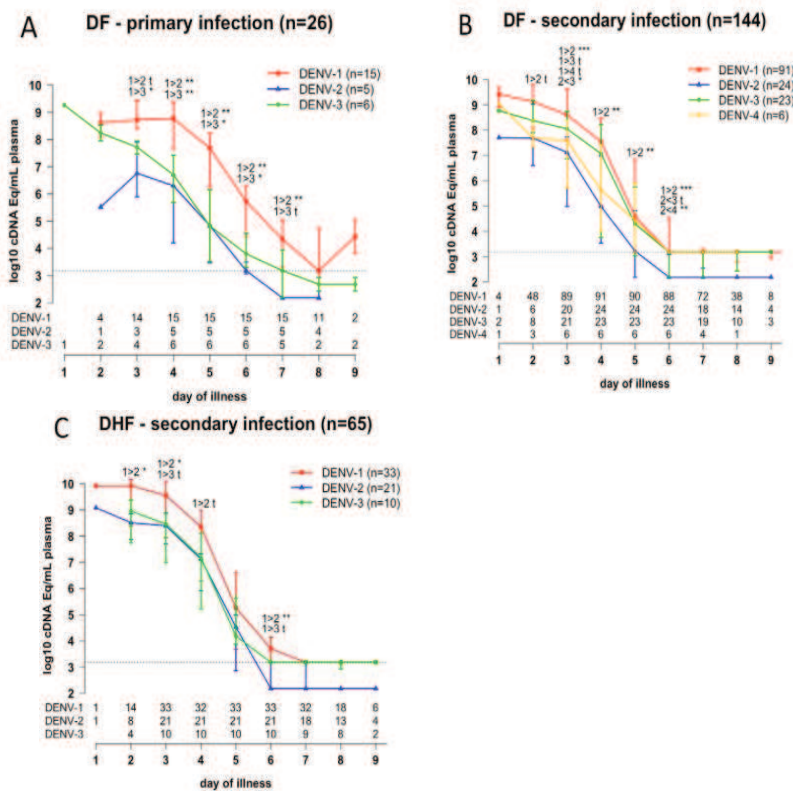


Figura 57. Magnitud de la viremia en DENV de acuerdo a serotipo, días de evolución clínica y en casos leves con (a) 26 infecciones primarias (b) 144 infecciones secundarias y (c) 64 casos graves clasificados originalmente como FHD con infecciones secundarias. Viremia expresada como cDNA copias/ ml en muestras seriadas de plasma (figura modificada de Tricour y col, 2011)

Dado que las personas que se infectan con DENV desarrollan anticuerpos que pueden durar por décadas o de por vida, las infecciones inaparentes por dengue en población general se han detectado habitualmente de forma retrospectiva al realizar encuestas de prevalencia mediante técnicas serológicas [221][222] [223] [88]. Los usos de la detección del genoma o el aislamiento de virus han permitido la detección prospectiva de infecciones inaparentes en estudios de conglomerados diseñados para detectar infecciones naturales en la comunidad. En 2012 se publicaron los resultados de un estudio clínico prospectivo desarrollado en el sudeste asiático y América Latina, de pacientes infectados por dengue confirmados virológicamente que asistían al hospital y miembros de sus hogares para identificar la relación entre casos sintomáticos y asintomáticos. Entre 215 sujetos con dengue febril, 177 aceptaron la investigación domiciliar y estimaron que la proporción de miembros del hogar infectados con dengue es de alrededor del 45%. En el momento de la visita domiciliar, casi tres cuartas partes (29/39) presentaban una infección por dengue inaparente. La proporción de infecciones por dengue inaparentes fue mayor en el sudeste asiático que en América Latina. Estos hallazgos

contribuyeron a evidenciar la complejidad de la enfermedad del dengue en humanos y la necesidad de fortalecer los esfuerzos de investigación multidisciplinarios para mejorar nuestra comprensión de la transmisión del virus y las respuestas del huésped al virus del dengue en varias poblaciones humanas[135].

El nivel de viremia DENV es uno de los más importantes determinantes de la transmisión humana a los mosquitos[212][224], y la duración de la infección es un parámetro crucial que determina la dinámica epidemiológica del patógeno. En las infecciones sintomáticas por DENV, los estudios experimentales clásicos mostraron que el DENV era infeccioso a partir de dos días antes y cinco días después del inicio de la enfermedad[225]. La duración del período de transmisibilidad, estimado a través del éxito de la transmisión a mosquitos o aislamiento viral, se encontró que oscilaba entre 1-7 días con una media de 4-5 días y con mayor duración en infecciones primarias que secundarias [226]. Estudios más recientes que utilizan la detección molecular del virus ha revelado una duración similar de infección, con un rango que dura hasta seis días después del inicio de fiebre y con alguna variación según el serotipo, gravedad de la enfermedad e infecciones primarias o secundarias[226]. En infecciones experimentales con cepas selváticas de DENV en primates no humanos, la duración de la viremia osciló entre tres y cinco días, dependiendo del serotipo de dengue y esto podría tener relevancia en instancias futuras para el establecimiento de focos enzoóticos, sobre todo luego de la implementación de planes de vacunación [227].

Los pacientes sintomáticos de dengue determinan la carga de morbilidad y mortalidad de la enfermedad, pero dado que la mayoría de las infecciones resultarán en infecciones inaparentes, estas constituyen un reservorio viral no demasiado considerado y evaluado. Un estudio reciente desarrollado en Bangkok, ha comparado la magnitud y la cinética de la viremia en infecciones sintomáticas y asintomáticas, encontrando gran variabilidad en los individuos asintomáticos y una diferencia significativa en el nivel de viremia respecto de los casos sintomáticos. A pesar de una viremia más baja, la tasa de disminución más lenta en las infecciones asintomáticas podría conducir a la prolongación de su período infeccioso[75].

La seguridad de los productos sanguíneos depende, primordialmente, de la calidad de los donantes de sangre, además del cumplimiento estricto de los requerimientos técnicos en todas las etapas que se ejecutan durante los estudios de control tendientes a detectar agentes infecciosos presentes en la sangre, y los procedimientos para la producción de componentes y hemoderivados. La inactivación de posibles agentes infecciosos es también objeto de consideración. Finalmente, otro elemento fundamental de la seguridad transfusional es el uso adecuado de los componentes sanguíneos, lo que implica una correcta indicación y elección del componente a transfundir en cada paciente. La epidemia de sida postransfusional de principios de la década de los ochenta transformó radicalmente la práctica de la transfusión sanguínea. Las

enormes consecuencias sanitarias, políticas y judiciales de la epidemia, junto con la percepción de que tanto los bancos de sangre como las autoridades sanitarias no habían actuado con la diligencia debida, contribuyeron a disminuir la tolerancia del público frente a los riesgos asociados a la transfusión. Habitualmente los bancos de sangre valoran la calidad de sus donantes mediante un sistema multibarrera que trata de minimizar el riesgo de enfermedades infecciosas transmitidas por transfusión (EITT). La metodología se basa en educación e información del donante sobre los factores que son causa de exclusión de la donación y que se fundamentan en criterios epidemiológicos. Luego se realiza una pequeña entrevista destinada a poner de manifiesto cualquiera de esos factores o cualquier antecedente (p. ej., hepatitis) que pudiera descalificar la donación o que representase un peligro para el donante (p. ej., cardiopatía coronaria). Finalmente, todas las donaciones de sangre son analizadas por métodos muy sensibles, los que incluyen técnicas genómicas para descartar la presencia de agentes infecciosos transmisibles por transfusión. La eficacia de este sistema de defensa ha sido enorme y tanto el HIV- SIDA como el virus de la hepatitis B y C prácticamente han desaparecido como EITT. No obstante, la transfusión sigue entrañando el riesgo potencial de transmisión de infecciones emergentes para las que todavía no se hayan desarrollado o no se han implementado pruebas de tamizaje aplicables a las donaciones de sangre. Los ejemplos más recientes de EITT emergentes son el WNV, que se detectó como EITT por primera vez en Estados Unidos en el año 2002, o CHIKV, que casi anuló el sistema de hemoterapia de las Islas Reunión durante los años 2005 y 2006, reemergió en el nordeste de Italia un año después y luego se confirmó su introducción en el continente americano[220].

La transmisión de persona a persona del WNV a través de la transfusión sanguínea o trasplante de órganos fue detectado en el 2002 cuando se describieron 23 casos de encefalitis en los que el virus WN fue transmitido por transfusión [31]. A partir de ese año se abrió un nuevo paradigma para los responsables de la seguridad transfusional en EE.UU. Ese evento marcó la importancia de considerar los riesgos de transfusión que pueden derivar de agentes virales que causan viremias breves, usualmente asintomáticas, pero con el potencial de generar brotes explosivos o estacionales de alta incidencia. En EE.UU. la estrategia de tamizaje utilizada en los centros de donación de sangre es mediante la realización de técnicas de biología molecular, lo que permite trabajar con mini pools de muestras de sangre, por razones logísticas y de costo-beneficio, aunque en épocas de mayor incidencia se utilizan algoritmos de estudio de muestras individuales. El estudio de donantes de sangre, ejemplo de población sana, ha resultado exitosa para la detección de cepas de WNV en otros países [228]. En cuanto a la importancia del dengue por vía transfusional, se han descrito casos en Singapur, Hong Kong y Puerto Rico ([229] [230] ; [220] y se han detectado donantes virémicos en varios países[231][232][233]. La imposibilidad de diferenciar entre la infección vía el vector y la

adquirida por vía transfusional en regiones endémicas, determina que probablemente el número de estos eventos esté siendo subestimado. Además se debe tener en cuenta que gran parte de los receptores de unidades de sangre potencialmente infectada, presentan inmunidad al agente viral y esa podría ser una de las explicaciones del bajo impacto clínico reconocido para una infección viral tan común en áreas endémicas de dengue. Además, el riesgo de transmisión por transfusión puede depender del nivel de viremia, que se ha demostrado que se correlaciona con la gravedad de la enfermedad. [94]. Se había hipotetizado que la viremia sería menor y de duración más corta en personas asintomáticas que en personas sintomáticas [233]. Estudios recientes demostraron, efectivamente, un nivel de viremia menor, pero con una mayor duración temporal que se mantiene en niveles infectantes[75] evidenciando la necesidad de considerar el rol de los asintomáticos al evaluar dinámicas de transmisión. El riesgo de dengue asociado a transfusiones variará mucho de un país a otro, según el patrón epidemiológico del dengue y el nivel de inmunidad de la población[218]. En países donde el dengue es principalmente una enfermedad infantil, el riesgo de dengue transmitido por transfusiones de sangre será menor debido a la falta de superposición de poblaciones infectadas y donantes de sangre. Sin embargo, el riesgo de transmisión nosocomial por pinchazos de agujas y otras exposiciones a sangre existiría en todas las áreas con dengue.

La circulación expandida de los cuatro serotipos de DENV y otros flavivirus en Argentina en diversas provincias en los últimos años alerta sobre la posibilidad de que la seguridad transfusional en Argentina se encuentre en riesgo por presencia de estos agentes virales en productos hemoderivados. Nuestra población podría encontrarse expuesta al riesgo de que individuos en fase de viremia donen sangre y constituyan una fuente de virus que contribuya a la diseminación de las patologías por estos agentes virales, inclusive pudiendo ocasionar enfermedad y/o muerte en los receptores.

2. OBJETIVO: Detectar la presencia de RNA de DENV*, en bolsas de sangre de donantes asintomáticos procedentes de Salta y Córdoba, dos áreas geográficas de Argentina con riesgo de circulación viral pero diferentes antecedentes epidemiológicos, para generar información sobre la implicancia en nuestro país de las transfusiones sanguíneas como mecanismo de transmisión del dengue y monitorear potencial circulación viral silenciosa en períodos inter-epidémicos.

*En ambas provincias, también se investigó la presencia de genoma de SLEV y WNV, datos que no se adjuntan a los fines de este trabajo de tesis.

3. MATERIALES Y MÉTODOS:

3.1 Ámbito geográfico del estudio:

La investigación fue desarrollada en tres bancos de sangre, 2 de ellos localizados en provincia de Salta (Orán y Tartagal) y otro localizado en la capital de Córdoba. Ambas provincias constituyen regiones de Argentina que presentan antecedentes de circulación de DENV en diversos períodos.

Salta es la provincia en la que se detectó la reemergencia del DENV-2 en 1997 después de 81 años sin notificación de casos en Argentina. Desde entonces, la provincia ha tenido brotes por otros serotipos, por ejemplo DENV-3 en 2004; DENV-2 en 2006; DENV-4 en 2013 (circulación de un único serotipo), circulación simultánea de DENV-1, DENV-2 y DENV-3 en 2003 o circulación de dos serotipos, por ejemplo, DENV-2 y DENV-3 en 2007 [234][39]. La ciudad de Tartagal está situada en el noreste de la provincia de Salta, en el Departamento General José de San Martín, del cual es cabecera. Por su población y su importancia económica, es la tercera ciudad de la provincia, con 56.308 habitantes (INDEC, 2001). San Ramón de la Nueva Orán se ubica en el Departamento de Orán, con 138.838 habitantes (INDEC, 2010) y límite norte con otros departamentos provinciales y la República de Bolivia. Desde la introducción del dengue en la provincia de Salta, los brotes se sucedieron prácticamente en forma anual en los distintos departamentos, siendo Orán y Tartagal, dos de las localidades frecuentemente afectadas. La sospecha de endemidad en esa región podría constituir un cambio en la epidemiología del dengue en el país, que sigue la tendencia observada en toda Latinoamérica y presenta a nuestro país como un escenario altamente favorable para la aparición de dengue grave y/o epidemias de dengue en grandes centros urbanos. La cercanía geográfica con Bolivia y Paraguay, el clima tropical húmedo, sumado al intenso intercambio de personas a nivel de la frontera, son factores de riesgo epidemiológico determinante para la zona.

La provincia de Córdoba, con un total de 3.304.825 habitantes y 1.330.023 de ellos concentrados en la Capital (INDEC, 2010), está ubicada en la llanura pampeana, en la zona centro del país y posee un clima templado subtropical húmedo con invierno seco. Es importante destacar que durante el 2005 se confirmó en esta provincia el primer brote epidémico de SLEV en humanos en la Argentina. Entre los meses de enero y mayo se notificaron 75 casos humanos con sintomatología neurológica compatible con el virus SLE, confirmándose el diagnóstico por laboratorio en 47 de ellos. Los casos de enfermedad neurológica se presentaron sobre todo en el área metropolitana. Ocho casos fueron de localidades adyacentes (Colón, Río Segundo y San Javier), ubicados entre los 30 y 180 km de la capital. Desde el 2005 ha continuado la detección de casos humanos esporádicos por este virus en la provincia de Córdoba y constituye un diagnóstico diferencial de relevancia para el dengue en esta provincia. Durante el 2009 la

provincia experimentó por primera vez un brote por DENV-1, en el 2013 se detectaron nuevamente casos autóctonos con evidencias de circulación simultánea de este mismo serotipo y el serotipo DENV-4, evidenciando la existencia de condiciones favorables para sostener ciclos de enfermedades de transmisión vectorial al momento de la realización de este estudio. [169]

3.2. Muestras de donaciones sanguíneas: se procedió al estudio de muestras de suero obtenidas de donantes de sangre que concurrieron al Banco Central de Sangre en Córdoba Capital y a los bancos de sangre de los hospitales “San Vicente de Paul” en Orán y “Pte. Juan D. Perón” de la ciudad de Tartagal, ambas localidades del norte de la provincia de Salta. Se planteó un estudio de tipo exploratorio, prospectivo y anónimo no vinculante. Las muestras fueron alicuotadas y anonimizadas con el empleo de códigos de barras en el lugar de obtención, de manera de garantizar la privacidad y confidencialidad de los datos de los individuos de los cuales provienen, registrándose únicamente la fecha de obtención de la muestra y la localidad de procedencia. Por tal motivo no se realizó la obtención de consentimiento informado. El trabajo se realizó acorde a las consideraciones de las Buenas Prácticas Clínicas (BPC) y Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) y contó con la aprobación del Comité de Bioética del INEVH. De acuerdo con los antecedentes epidemiológicos, los cuatro serotipos de DENV (DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4) fueron estudiados en Salta como en Córdoba. Se decidió incorporar el estudio de DENV en los donantes de Córdoba dado que la provincia tuvo un brote epidémico en el comienzo de 2013 (DENV-1, DENV-4) y no podía descartarse el mantenimiento de un bajo nivel de circulación viral no detectado por el sistema de vigilancia epidemiológico o una nueva introducción, una vez superadas las bajas temperaturas del invierno. Para el cálculo de la muestra mínima a estudiar se partió de una prevalencia general de 1% considerando estudios previos para DENV o WNV realizados en bancos de sangre de otros países [233][232]. Se estimó una precisión absoluta específica de 0,5 puntos porcentuales con un nivel de confianza del 95%. La muestra mínima a estudiar en cada provincia se estimó en 1584 muestras [235]. Los criterios de inclusión y exclusión que se consideraron en el estudio son los que indica la Ley Nacional de Sangre, N° 22990, que establece el régimen normativo con alcance general para todo el territorio de la República Argentina tendiente a regular las actividades relacionadas con la sangre humana, sus componentes, derivados y subproductos. Las muestras de suero fueron obtenidas y procesadas en forma estéril, y conservadas a -86° C. Se obtuvieron 2 alícuotas destinadas a la realización de los estudios moleculares, virológicos y serológicos. Se obtuvo una tercera alícuota adicional de reserva y contraprueba en caso de que fuera necesario.

3.3 Algoritmo de la metodología diagnóstica: Las muestras extraídas fueron estudiadas formando previamente grupos o *pools* integrados por tres muestras en forma equitativa. En cada provincia se realizó inicialmente un tamizado de los grupos para la detección de genoma viral de los flavivirus en estudio. Frente a la aparición de un resultado positivo en un *pool* o grupo, el mismo fue abierto para identificar la o las muestras positivas, procesándose las muestras individuales por la misma metodología. Dos de las alícuotas de muestras de cada donante fueron enviadas al INEVH para corroborar los resultados y completar los estudios. En las muestras positivas se realizó titulación viral por plaqueo bajo capa de agarosa, aislamiento viral y detección de anticuerpos IgM e IgG, secuenciación nucleotídica y estudios filogenéticos de las cepas virales para su caracterización genética. El 10 % de las muestras con resultados negativos también fueron estudiadas en el INEVH como un control de calidad y análisis de desempeño de las metodologías de diagnóstico empleadas.

3.4. Extracción del RNA viral: Se realizaron *pools* de tres muestras de suero tomadas a los donantes previo a la extracción del RNA viral. Cada *pool* se generó mezclando 50 ul de cada muestra siguiendo el orden secuencial de extracción. La extracción del RNA viral se realizó mediante columnas de sílica (QIAamp viral RNA mini Kit –QIAGEN) en los *pools* realizados, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Brevemente, se tomaron 140 µl de cada *pool* y se le adicionaron 560 ul del buffer de lisis (buffer AVL + carrier) a la muestra. Posteriormente se agregaron 560 ul de etanol absoluto de calidad biología molecular. A partir de este paso se comenzó a pasar la mezcla por una columna de sílica, agregando 630 ul cada vez y centrifugando a 8000 rpm por 1 minuto. A continuación se realizaron lavados sucesivos con los reactivos buffer AW1 y buffer AW2, 500 ul de cada uno de manera consecutiva, centrifugando con el primero de ellos 1 minuto a 8000 rpm y con el segundo 3 min a 14000 rpm. En cada centrifugación se descartó el líquido eluido y se reemplazó el tubo colector de la columna por uno nuevo provisto por el kit. Finalmente se realizó la elución con 60 ul de buffer AVE (todos los reactivos y la columna de sílica son provistos por el kit, excepto del Etanol absoluto). El RNA así extraído se conservó a -70 °C hasta su utilización.

3.5 Detección y caracterización de genoma DENV: De acuerdo a la disponibilidad de equipamiento, los *pools* en Córdoba fueron inicialmente procesadas por qRT-PCR empleando sondas y *primers* específicos para los cuatro serotipos DENV [109]. En el laboratorio de Salta los *pools* fueron inicialmente procesados por nRT-PCR para DENV-1, 2, 3 y 4 [107]. Se realizó corroboración de la identificación viral y estudios de genotipo mediante secuenciación nucleotídica en secuenciador AVANT 3100 por el método de los di-deoxinucleótidos-terminales. Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos fueron comparadas con otras cepas

representantes de distintos genotipos obtenidas del GenBank, cepas aisladas en Argentina y en distintas partes del mundo. El análisis filogenético de las secuencias de nucleótidos fue realizado con el programa BioEdit utilizando el método de Clustal W y se evaluaron las relaciones filogenéticas por los métodos de Neighbour Joining y Análisis Bayesiano utilizando los programas MEGA5 y Mr. Bayes [236][237]

3.6 Cuantificación viral por determinación de Unidades Formadoras de Placas: Para cuantificación del nivel de viremia en la bolsa de sangre se realizó la titulación viral en muestra de suero del donante en placas de 12 pocillos empleando la línea celular VERO C76 y coloración con colorante viral rojo neutro, valorando diluciones seriadas de suero desde 10^{-1} a 10^{-7} por triplicado. Los resultados se expresaron como unidades formadoras de placas por mililitro de suero (UFP/ml) según se describe en el Anexo 2.

3.7 Aislamiento viral:

Se realizó intento de aislamiento viral a partir de muestra de suero en células C6/36 HT siguiendo metodologías previamente descripta en el Anexo 1.[100]. Se realizó observación microscópica diaria para la detección de efecto citopatogénico (ECP) y se realizó identificación viral por qRT-PCR, *n*RT-PCR y secuenciación nucleotídica.

3.8 Detección de anticuerpos específicos: La detección de inmunoglobulina (Ig) M anti DENV se realizó en muestra de suero mediante la técnica de ELISA de captura (MAC-ELISA) siguiendo la metodología que se describe en el Anexo 6[153]. Se emplearon antígenos producidos mediante la técnica sacarosa acetona en cerebro de ratones lactantes producidas en el INEVH empleando cepas de referencia. La presencia de anticuerpos neutralizantes fue evaluada en placas de 12 pocillos conteniendo cultivos de la línea celular VERO C76 por reducción del 90% de unidades formadoras de placas bajo capa de agarosa y tinción con el colorante vital rojo neutro, empleando stocks virales de título conocido de los DENV-1, 2, 3, 4, SLEV y WNV para evaluación de cruces serológicos. Las cepas de referencia empleadas fueron: DENV-1 Hawaii, DENV-2 New Guinea, DENV-3 H87, DENV-4 H241, la cepa vacunal 17D (YEL) de YFV y los virus quiméricos ChimeriVax TM WN y ChimeriVax TM SLE [238][239].

3.9 Estudio de la sensibilidad analítica de la detección molecular de DENV-1, 2, 3 y 4 en los laboratorios provinciales: se construyeron paneles para evaluar la identificación de los distintos serotipos y medir la sensibilidad analítica de las metodologías de *n*NRT-PCR y qRT-PCR en INEVH y en los laboratorios de Salta y Córdoba. El panel estuvo integrado por 22 muestras: 3 muestras negativas y 19 muestras correspondientes a diluciones de stocks virales de los cuatro serotipos de DENV (cepas y títulos de las respectivas semillas virales: DENV-1 Hawaii, $1 \cdot 10^5$ UFP/ml ; DENV-2 New Guinea, $9.5 \cdot 10^5$ UFP/ml; DENV-3 H87, $1 \cdot 10^5$ UFP/ml;

DENV-4 H2417, 10^5 UFP/ml) en un rango de diluciones 10^{-1} a 10^{-7} , conteniendo entre 10^{-4} a 10^3 UFP en los 140 μ l usados para la extracción del RNA viral. En el INEVH se realizó el primer paso de la extracción del RNA viral (lisado). Estos materiales fueron enviados a los laboratorios provinciales, donde se finalizó el proceso de extracción del RNA viral hasta el paso de elución. El volumen eluido fue almacenado a -86°C hasta su procesamiento por las técnicas moleculares de punto final y en tiempo real para los cuatro serotipos de DENV.

3.10 Control de calidad en el estudio de las muestras de donantes: Las muestras positivas fueron estudiadas en el INEVH por todas las metodologías diagnósticas disponibles: detección de genoma por técnica de punto final y en tiempo real, aislamiento viral, detección de antígeno NS1 dengue, detección de anticuerpos IgM y neutralizantes con evaluación de reactividad cruzada entre flavivirus. El 10% de las muestras negativas fueron chequeadas para controlar los resultados obtenidos en el nivel provincial. Entre las muestras procedentes de la provincia de Córdoba se chequearon 54 grupos al azar por la metodología de *n*RT-PCR para DENV seleccionando diferentes fechas de extracción y localidades de procedencia. En relación con las muestras procedentes de la provincia de Salta se chequearon 56 grupos al azar empleando la metodología de qRT-PCR para DENV, también seleccionando diferentes meses y localidades. Se utilizó el protocolo para DENV desarrollado por CDC y aprobado por FDA, que presenta la ventaja de ser una metodología multiplex que permite en una única reacción chequear los cuatro serotipos de DENV con mayor sensibilidad que la metodología desarrollada por Johnson y col, 2005[109].

4. RESULTADOS

Durante la primera fase del proyecto se establecieron y coordinaron procedimientos operativos estandarizados para los procesos a desarrollarse en los distintos centros que participaron del estudio. Se consensaron los procedimientos estandarizados para la obtención de las alícuotas de suero que se tomaron a los donantes de sangre, y se determinaron las pautas para el registro, fraccionamiento, anonimización, conservación y logística para derivación de las muestras desde el lugar de la obtención hasta los laboratorios provinciales que realizaron los primeros estudios. Del mismo modo se coordinaron las actividades de control de calidad y derivación de muestras al INEVH para evaluación del desempeño de las metodologías empleadas y caracterización de muestras que resultaron positivas en el estudio.

En la tabla 22 se muestran los resultados obtenidos al evaluar la sensibilidad analítica de las técnicas moleculares empleadas en INEVH y en los laboratorios provinciales. Por otro lado, el panel empleado demostró la correcta identificación de los distintos serotipos de DENV en el

100% de las muestras, en los dos laboratorios provinciales que efectuaron el estudio de las muestras de donantes de sangre.

Tabla 22. Resultados de sensibilidad analítica obtenidos en los paneles para la detección de genoma de DENV 1, 2, 3, 4 en INEVH, Salta y Córdoba.

Virus	INEVH Pergamino		Salta		Córdoba	
	nRT-PCR*	qRT-PCR*	nRT-PCR*	qRT-PCR*	nRT-PCR*	qRT-PCR*
DENV-1	3	0,0 1	14	1.4	14	1.4
DENV-2	0,5	0,1	133	0,133	13.3	0,133
DENV-3	0,3	0,01	14	1.4	0,14	0,14
DENV-4	0,25	1	98	9.8	9.8	9.8

* UFP/140 ul

A partir del mes de septiembre, período en que comienzan a ser más favorables las condiciones ambientales para la transmisión de enfermedades de transmisión vectoriales en nuestro país, se inició la toma de alícuotas de suero para investigación de presencia de genoma los 4 serotipos de DENV en los donantes de sangre. En un período de 9 meses (septiembre de 2013 a mayo de 2014) se estudiaron un total de 3357 donantes de sangre que concurrieron a los 3 bancos de sangre participantes del estudio. La distribución por provincia fue la siguiente: 1602 (48%, 1602/3357) muestras de suero de donantes que concurrieron al Banco Central de Sangre ubicado en la ciudad de Córdoba y 1755 (52%, 1755/3357) muestras de suero de donantes que concurrieron a los bancos de sangre de los hospitales públicos localizados en Orán (57%, 1002/1755) y Tartagal (43%, 753/1755) de la provincia de Salta para la realización de serología pre-transfusional. En los gráficos 58 y 59 se muestra la distribución por localidades de los donantes estudiados en las provincias de Salta y Córdoba, respectivamente. En la provincia de Córdoba se estudiaron donantes procedentes mayoritariamente de 5 localidades. En la provincia de Salta, los donantes en su mayoría procedieron de 9 localidades, cuyos nombres se detallan en la figura 59. Se observa en cada provincia un predominio de procedencia de los donantes que corresponde a la localización de los bancos de sangre que participaron del estudio: Córdoba Capital (73%), Tartagal (31%) y Orán (31%). Se agrupó bajo la denominación “otros” a aquellas localidades de procedencia representadas con un porcentaje menor al 3%. En la provincia de Salta el grupo “otros” incluyó a: Los Blancos, Los Toldos, Aguas Blancas, Bermejo, Campichuelo, Libertador Gral. San Martín, Rivadavia Banda Sur, Rosario de la Frontera, Tabacal, Río Blanco y Yacuiba). En la provincia de Córdoba, en el agrupamiento “otros” se encuentran donantes procedentes de Alta Gracia, Bel Ville, Dean Funes, Jesus María, La Carlota, Marcos Juarez, Río Tercero, Río Cuarto, Santa Rosa de Calamuchita, Villa Dolores

y Villa María. En la figura 60 se muestra la ubicación geográfica de las localidades de procedencia de los donantes incluidos en este estudio.

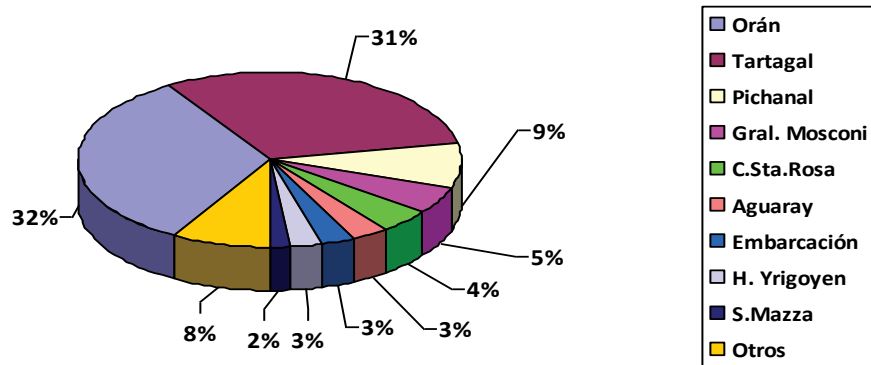


Figura 58- Distribución porcentual de los donantes estudiados en la provincia de Salta, por localidad de procedencia.



Figura 59- Distribución porcentual de los donantes estudiados en la provincia de Córdoba, por localidad de procedencia.

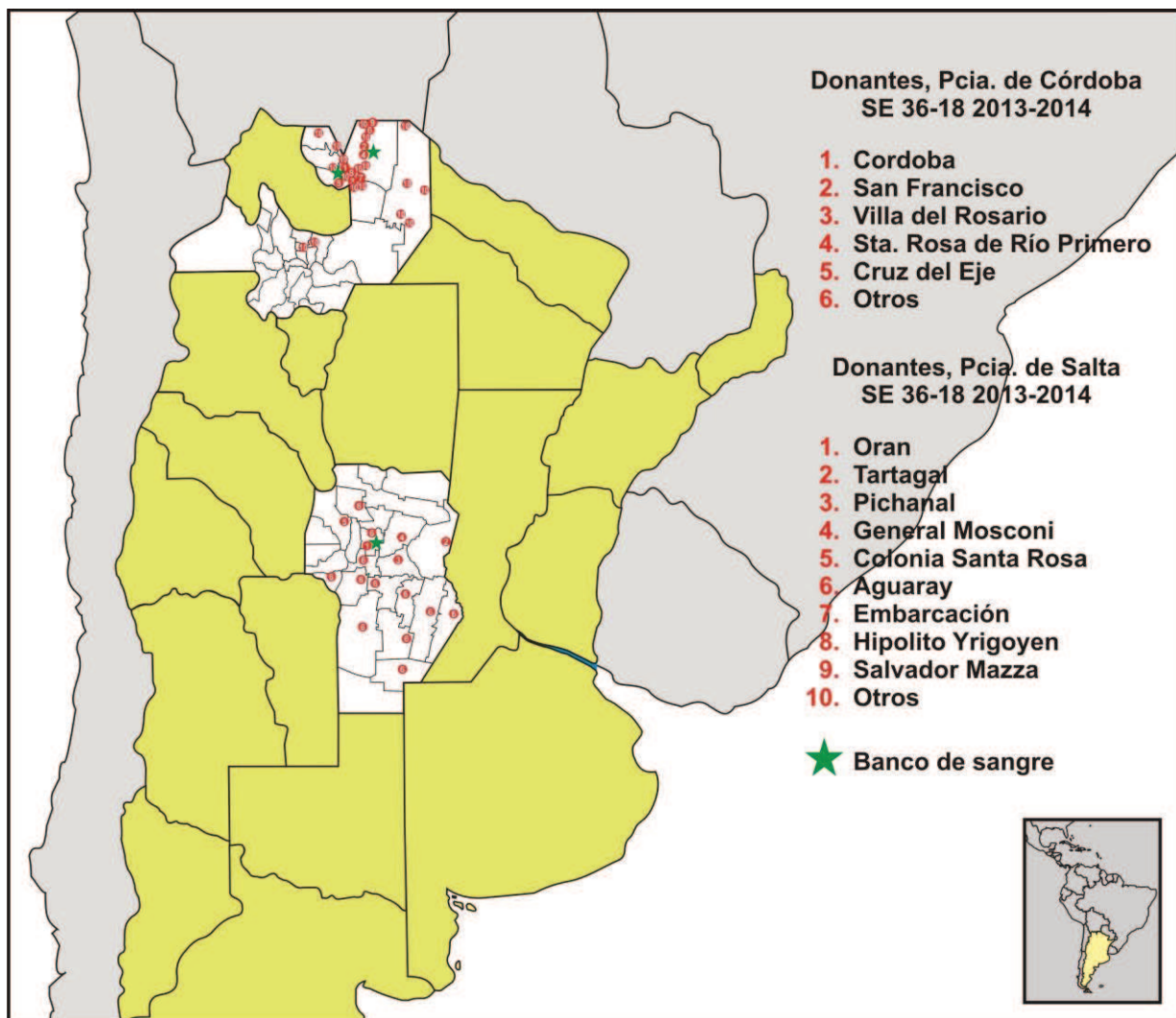


Figura 60, Ubicación geográfica de las localidades de procedencia de los donantes estudiados en las provincias de Salta y Córdoba

En Argentina, entre las SE1 a SE19 de 2014, fue confirmada la circulación de DENV en 5 localidades de Salta y en la ciudad capital de la provincia de Córdoba. No se registró actividad de DENV en el período Septiembre-Diciembre de 2013 incluidos en este estudio. Las primeras localidades en brote en 2014 correspondieron a Salta y fueron notificadas en la SE9, con 5 localidades con circulación viral comprobada hasta la SE20: Aguaray, Aguas Blancas, Embarcación, Salvador Mazza y San Ramón de la Nueva Orán. El serotipo identificado fue DENV-4. En el período SE 1-19, se notificaron 813 casos sospechosos de dengue en la provincia de Salta, con 26 casos confirmados (25 autóctonos y 1 caso con antecedente de viaje reciente) y 251 casos probables determinados por laboratorio. El estudio de donantes de sangre incluyó personas procedentes de varias de las localidades afectadas por brotes de dengue durante el 2014. En las Figuras 61, 62, 63 y 64 se muestra la distribución semanal de los casos de dengue sospechosos y los casos positivos de dengue notificados en el sistema nacional de

vigilancia (SIVILA en el período de estudio), conjuntamente con los donantes de sangre en los que se evaluó la presencia de genoma de DENV en el período comprendido entre las SE1-18 para las localidades de Aguaray, Orán, Tartagal y Salvador Mazza, respectivamente.

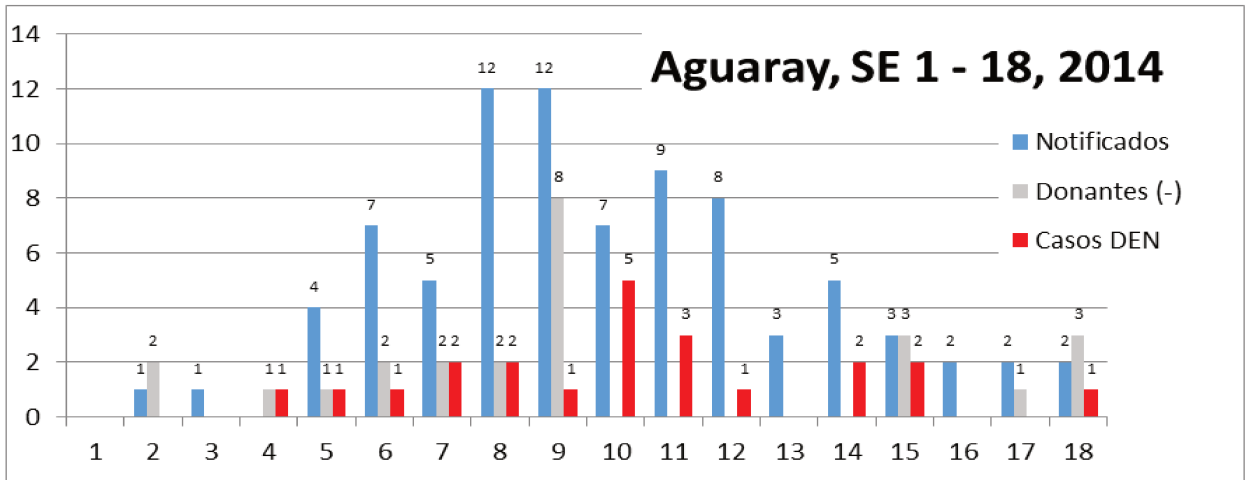


Figura 61. Distribución semanal de los donantes de sangre estudiados para genoma de DENV en Aguaray. En el mismo gráfico se representa la evolución de la detección de los casos sospechosos y positivos de dengue notificados en SIVILA, SE1-18, 2014

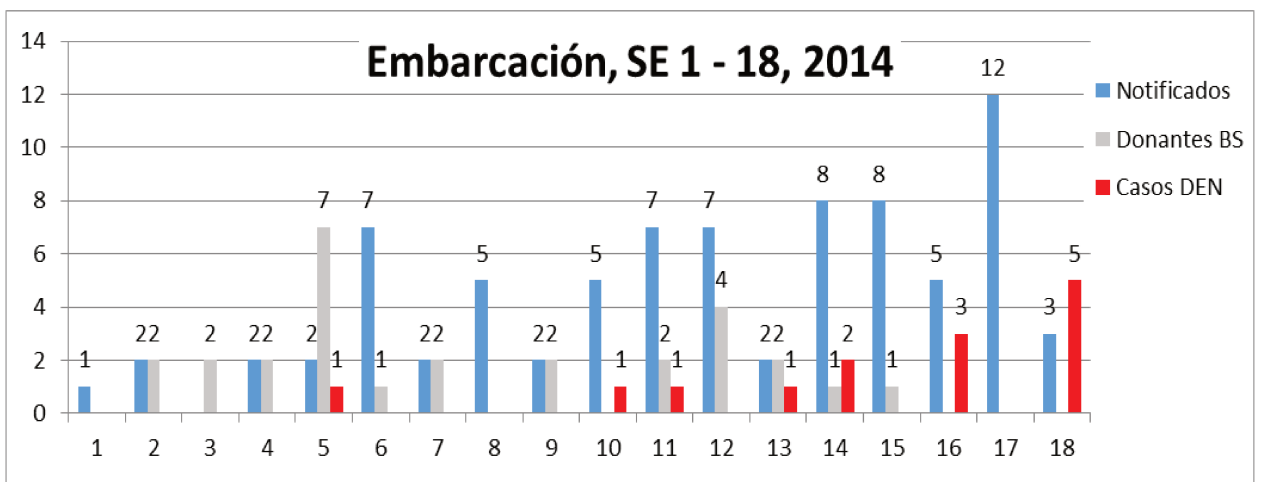


Figura 62. Distribución semanal de los donantes de sangre estudiados para genoma de DENV en Embarcación. En el mismo gráfico se representa la evolución de la detección de los casos sospechosos y positivos de dengue notificados en SIVILA, SE1-18, 2014

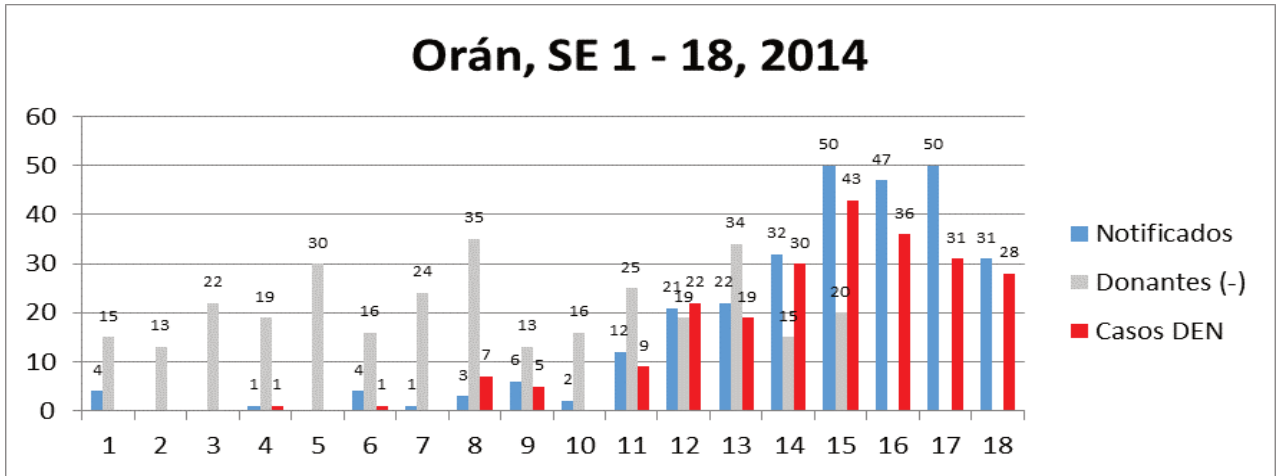


Figura 63: Distribución semanal de los donantes de sangre estudiados para genoma de DENV en Orán. En el mismo gráfico se representa la evolución de la detección de los casos sospechosos y positivos de dengue notificados en SIVILA, SE1-18, 2014

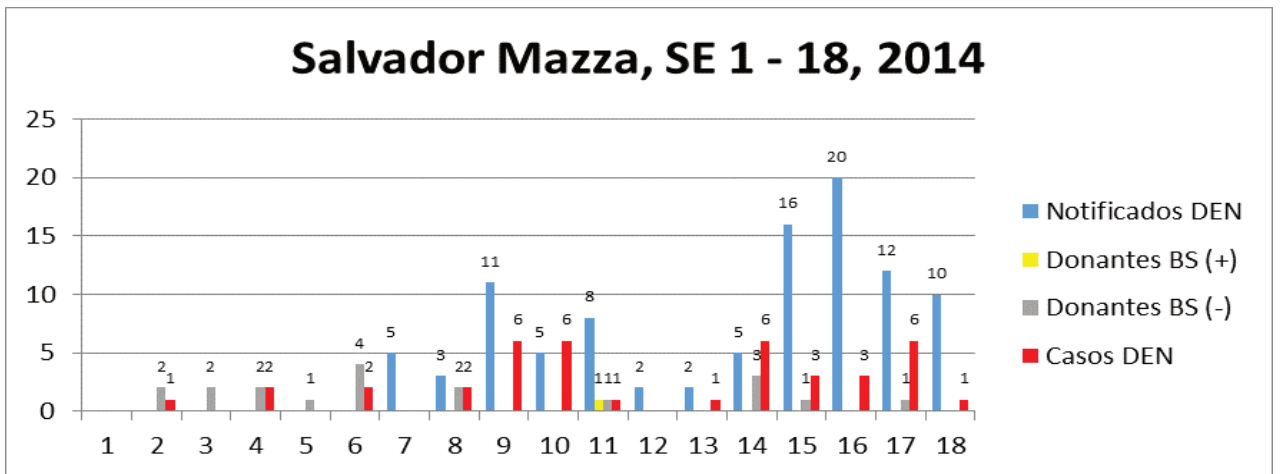


Figura 64. Distribución semanal de los donantes de sangre estudiados para genoma de DENV en Salvador Mazza. En el mismo gráfico se representa la evolución de la detección de los casos sospechosos y positivos de dengue notificados en SIVILA, SE1-18, 2014

Entre los meses de Enero y Mayo de 2014 (SE 1-18), se estudiaron en Salta un total de 926 donantes. Se detectó un pool positivo para genoma de DENV- 4 inicialmente por la metodología de *n*RT-PCR, lo que determinó un porcentaje de positividad de 0,11 % (1/ 926) para genoma de DENV en los donantes estudiados durante el período en que se reconoció brote

de dengue en la provincia. El *pool* o grupo se había conformado con muestras de tres donantes tomados en Tartagal. Se corroboró la detección del mismo serotipo en una de las 3 muestras integrantes del *pool* al estudiarlas en forma individual. La muestra fue tomada a un donante en la SE 11 y correspondió a una persona que no presentó ninguna manifestación clínica al momento de la donación, procedente de Salvador Mazza. Se realizó la corroboración en el INEVH de positividad en el grupo y la muestra individual por qRT-PCR, así como la correspondencia del serotipo identificado. Se obtuvieron resultados positivos para la detección del antígeno NS1 por método de ELISA y detección de anticuerpos positivos frente a la mezcla de antígenos de los serotipos de DENV realizado por MAC-ELISA, resultando negativo para SLEV, WNV y YFV. La determinación de anticuerpos neutralizantes para los cuatro serotipos de DENV, SLEV y WNV resultó negativa, obteniéndose un título de 40 para el YFV que podría relacionarse con vacunación antiamarílica. La titulación de unidades formadoras de placas (UFP) realizada en células VERO C76 reveló la presencia de $5 \cdot 10^3$ UFP/ml en la muestra de suero del donante.

Se procedió al aislamiento viral en células C6/36 sin observación de aparición de ECP al día 14 posterior a la inoculación y se corroboró la detección del serotipo en el sobrenadante del cultivo celular por qRT-PCR. Se realizó la caracterización del genotipo de DENV-4 por análisis de la secuencia nucleotídica. Se realizó secuenciación genómica de un fragmento de 2000 pb, amplificándose el gen completo que codifica para la proteína de la envoltura (E) y un fragmento del gen que codifica para la proteína precursora de la membrana (prM). Las secuencias obtenidas se compararon con las secuencias de cepas aisladas en Argentina durante los años 2010 y 2013 y con otras cepas de DENV-4 de diferentes genotipos y áreas geográficas disponibles en el GenBank. En el anexo 1 de este capítulo se muestra el detalle de las cepas empleadas para la construcción de los árboles filogenéticos. El análisis filogenético se realizó en un fragmento de 978 pb mediante los métodos Neighbor Joining y análisis Bayesiano con los programas MEGA 5 y Mr. Bayes, respectivamente. Los resultados del análisis filogenético obtenido por ambos métodos muestran una topología similar. En la Figura 66 se muestra el árbol filogenético obtenido por análisis bayesiano. La cepa detectada en la localidad de Salvador Mazza agrupa con cepas correspondientes al genotipo II de DENV-4, el cual ha circulado mayoritariamente en América luego de su introducción al continente en el año 1981. En el año 2010 se introdujo en Brasil el genotipo I, pero hasta la actualidad no han ocurrido nuevas detecciones de dicho genotipo en el continente Americano. El análisis filogenético realizado en las cepas de DENV-4 que circularon en Argentina desde su introducción en el año 2010 constituye un agrupamiento monofilético. La cepa detectada en el donante procedente de Salta está dentro de un clado formado por las cepas detectadas en Argentina en distintos períodos de tiempo y ubicación geográfica y con cepas de reciente circulación en Brasil. La comparación de

la composición de nucleótidos entre las cepa del 2014 y las del 2010 y 2013, permitió determinar porcentajes de identidad que se encuentran entre un 98.8 % con la cepa del 2010 y 99.7% con las cepas del 2013. La comparación de la composición de aminoácidos entre las cepa del 2014 y las del 2010 y 2013, permitió determinar porcentajes de identidad que se encuentran entre un 98.7 % con la cepa del 2010 y 99.6% con las cepas del 2013. Se observa el cambio de un aminoácido Serina presente en las cepas del 2013 por una Leucina en la cepa del 2014.

En la SE14 se confirmó la circulación viral autóctona de DENV en la ciudad de Córdoba, con el primer caso detectado en la SE12 y un total de 134 casos sospechosos de dengue notificados hasta la SE19. Solamente fueron confirmados 4 casos por laboratorio, en 2 de los mismos el serotipo identificado fue DENV-1. El estudio de los donantes de sangre demostró resultados negativos para la presencia de genoma de DENV 1, 2, 3 y 4 en todos los donantes evaluados en este trabajo. Durante el 2014, hasta la SE18, se estudiaron 927 donantes en la provincia de Córdoba, con 723 (78%) procedentes de la ciudad capital en la que se confirmó la circulación autóctona de DENV. La figura 65 muestra la distribución semanal de los casos de dengue sospechosos y los casos positivos de dengue notificados en el sistema nacional de vigilancia para la ciudad de Córdoba, conjuntamente con los donantes de sangre en los que se investigó la presencia de genoma de en los primeros meses del 2014

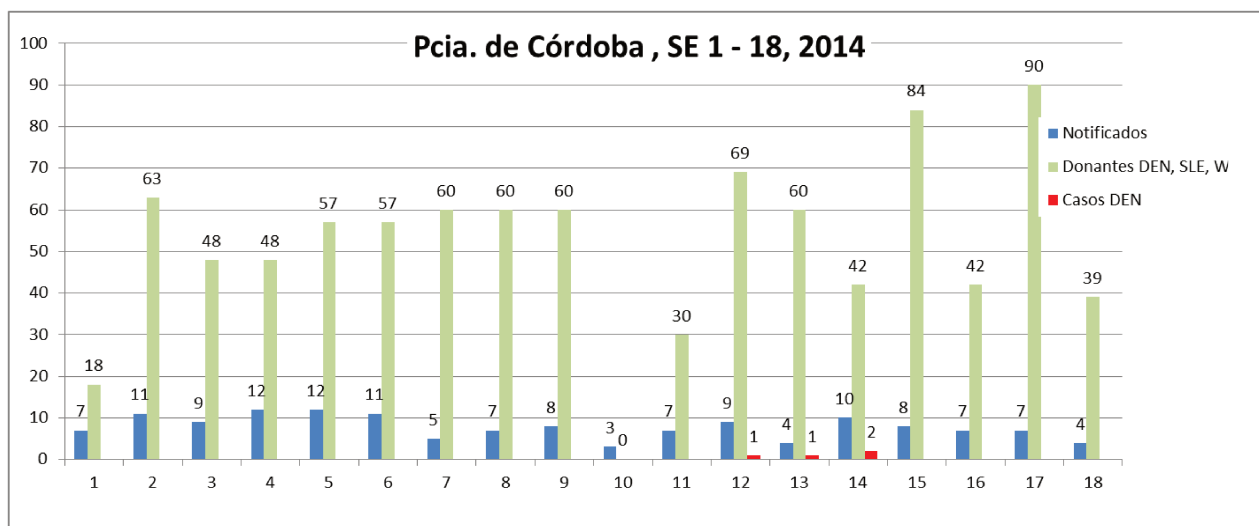


Figura 65. Distribución semanal de los donantes de sangre estudiados para genoma de DENV en la provincia de Córdoba En el mismo gráfico se representa la evolución de la detección de los casos sospechosos y positivos de dengue notificados en SIVILA, SE1-18, 2014

El estudio del 10% de las muestras negativas fue corroborado mediante procesamiento en el INEVH. Las 168 muestras que conformaron los 56 *pooles* negativos evaluados de la provincia de Salta fueron tamizadas por la RT-PCR de punto final y controladas por la metodología en tiempo real. Se trabajó de manera inversa para realizar el control de calidad a

los resultados emitidos por Córdoba, procesando por RT-PCR convencional en INEVH para corroborar los resultados obtenidos en las 162 muestras que integraban los 54 grupos evaluados. En ambos casos, muestra positiva y en las negativas, no se observaron diferencias en el desempeño de las dos metodologías moleculares empleadas para la detección de genoma de DENV.

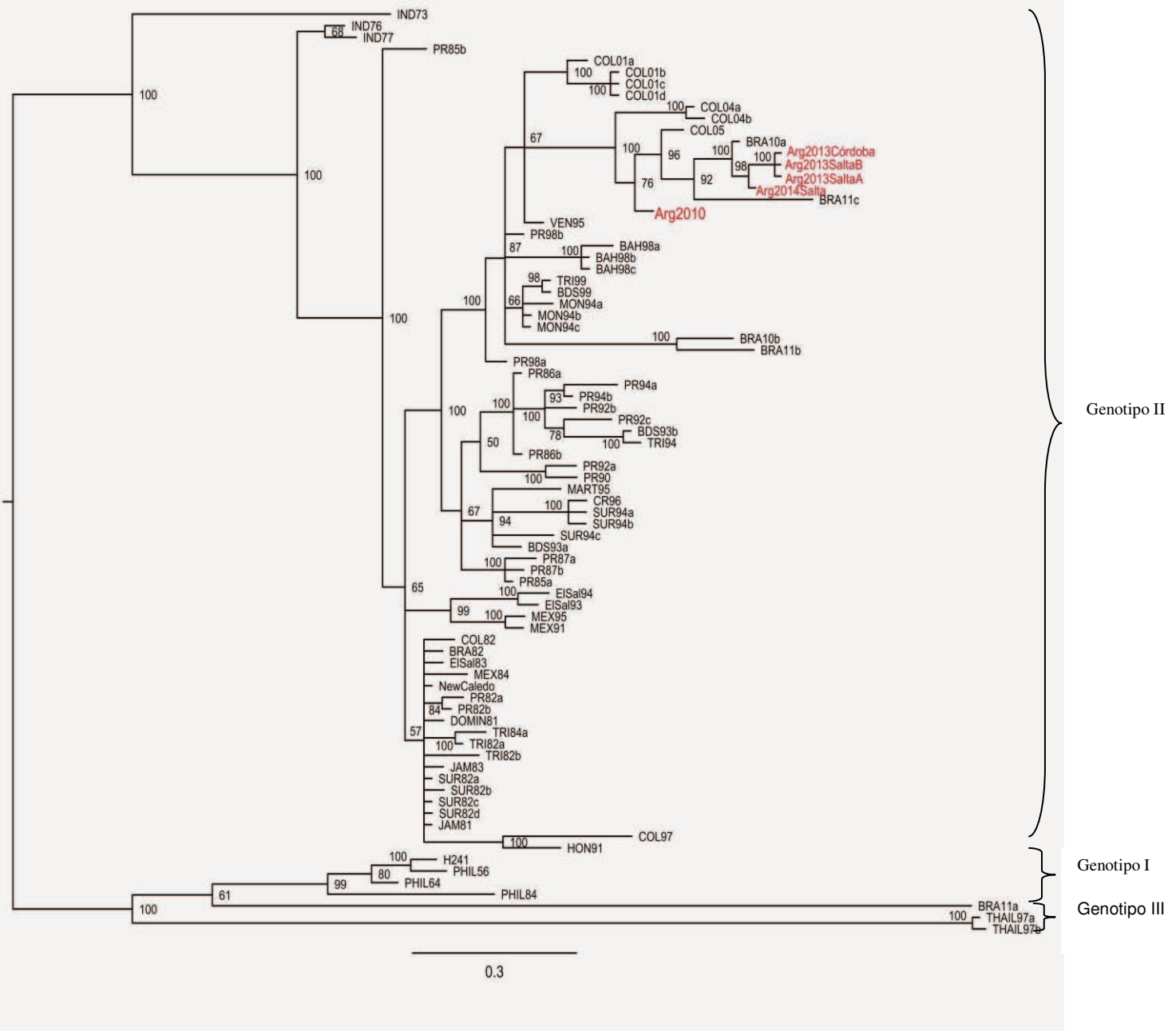


Figura 66. Árbol filogenético obtenido por Análisis Bayesiano con el software Mr. Bayes de un fragmento de 978 nt que codifica para las proteínas E y prM de la cepa de DENV-4 detectada en donante de sangre. Los valores de probabilidad posterior se indican en los nodos.

5.CONCLUSIONES:

El trabajo realizado de búsqueda activa de RNA de DENV en bancos de sangre de dos provincias de Argentina en un período en el cual se produjo circulación de DENV en las dos provincias, permitió detectar un 0,11% (1/926) de los donante asintomático en fase aguda de infección por DENV-4 considerando el período con circulación autóctona entre la SE 1-9 del 2014 en la provincia de Salta. Este resultado plantea la necesidad de evaluar la infección asintomática del DENV para mitigar riesgo y garantizar la seguridad transfusional en momentos epidémicos en el país, particularmente con la tendencia creciente en incidencia de la enfermedad en las provincias de norte y centro.

Se debe considerar que una alta proporción de las personas (53- 87%) que se infectan con DENV no desarrollan sintomatología. La viremia en los casos sintomáticos suele anteceder en el tiempo a la aparición de los síntomas llegando a niveles de viremia variable de 10^3 - 10^7 UFP/ ml (chequear bien), dependiendo del estado inmune previo, del serotipo infectante y la presentación clínica (cómo algunos de los factores más evaluados)[240][241][94]. Estudios realizados en convivientes asintomáticos de casos de dengue, han mostrado niveles de viremia inferiores pero una cinética variable que puede presentarse con mayor duración con una persistencia de hasta 1-2 semanas después de la detección del caso índice en el hogar[75].

Tres cuartas partes de los 390 millones de infecciones por el virus del dengue (DENV) estimadas cada año son clínicamente inaparentes. Las personas con infecciones inaparentes por el virus del dengue generalmente se han considerado huéspedes terminales para la transmisión por no alcanzar niveles de viremia lo suficientemente altos como para infectar a los mosquitos[242]. Sin embargo, a pesar de su nivel promedio más bajo de viremia, las personas asintomáticas, o en los días previos a la aparición de los síntomas, pueden ser infecciosas para los mosquitos como se ha evidenciado en estudios de infectividad realizados en personas naturalmente infectadas en período virémico. Además, a un nivel dado de viremia, las personas infectadas con DENV sin síntomas detectables pueden estar expuestas a más mosquitos a través de sus rutinas diarias ininterrumpidas que las personas enfermas y se ha demostrado que tienen el potencial de contribuir significativamente más a la transmisión del virus a los mosquitos de lo que se reconocía anteriormente[224].

La introducción del WNV en América y el impacto de la transmisión por la vía transfusional puso un foco de atención en el riesgo y el rol de esta ruta de transmisión para flavivirus emergentes. En el 2002 en EE.UU se describieron 23 casos de encefalitis en los que WNV fue transmitido por transfusión. A partir de ese año se abrió un nuevo paradigma para los responsables de la seguridad transfusional en ese país. Se implementó una estrategia de tamizaje para WNV en los centros de donación de sangre mediante técnicas de biología

molecular analizando las muestras en forma de *pools* de muestras de sangre, por razones logísticas y de costo-beneficio. En épocas de mayor incidencia se utilizan algoritmos de estudio de muestras individuales. Hasta el presente, no hay información sobre transmisión del SLEV por transfusiones; sin embargo, en base a su relación filogenética y similar epidemiología con WNV, se considera que este agente es potencialmente transmisible por transfusiones de sangre. En cuanto a la importancia del dengue por vía transfusional, se han descrito casos en diversos países (Singapur[243][244], Hong Kong [230], Brasil [245], Puerto Rico [232][246]), otros estudios también han detectado donantes virémicos[232][230][241][247] y han aumentado los trabajos que evalúan riesgo y potenciales acciones para mitigación[248][219][249]. La imposibilidad de diferenciar entre la infección vía el vector y la adquirida por vía transfusional en regiones endémicas, determina que probablemente el número de estos eventos esté siendo subestimado. Además se debe tener en cuenta que gran parte de los receptores de unidades de sangre potencialmente infectada, presentan inmunidad al agente viral.

La tasa de infección asintomática por DENV en donantes de sangre se ha determinado retrospectivamente en Puerto Rico y en varios otros países donde el dengue es endémico mediante diagnósticos moleculares[232]. Se ha demostrado que las tasas de infección varían con la incidencia de la enfermedad en la comunidad, incluida la variación estacional del dengue. En Puerto Rico, casi 1 de cada 1000 donaciones de sangre fueron positivas para el ácido nucleico del DENV durante la temporada de dengue de 2005[250], frente a 1 en 600 positivas durante el brote de 2007 (CDC y Cruz Roja Americana, datos no publicados). La prevalencia del ácido nucleico del DENV en las donaciones de sangre en Puerto Rico en 2005 fue similar a la estimada para el WNV en áreas que experimentaron brotes en los Estados Unidos en 2002 antes de que se implementara la detección universal[233].

Las provincias de Salta y Córdoba constituyen dos regiones de Argentina que presentan antecedentes de circulación de diversos flavivirus y poseen condiciones ambientales y epidemiológicas que posibilitarían la circulación de los virus que se propuso monitorear en bancos de sangre. Salta es la provincia argentina en la que se detectó la reemergencia del DENV-2 en 1997 después de 81 años sin notificación. La selección de los bancos de sangre localizados en Orán y Tartagal para realizar la investigación en esta provincia se debió a los antecedentes de circulación de DENV en años anteriores. La ciudad de Tartagal está situada en el noreste de la provincia de Salta, en el Departamento General José de San Martín, del cual es cabecera. Por su población y su importancia económica, es la tercera ciudad de la provincia, con 56.308 habitantes (INDEC, 2001). San Ramón de la Nueva Orán se ubica en el Departamento de Orán, con 138.838 habitantes (INDEC, 2010) y límite norte con otros departamentos provinciales y la República de Bolivia. El DENV-4 es el serotipo más recientemente introducido, con circulación autóctona detectada por primera vez en el inicio de 2013 en la zona

norte de la provincia. La sospecha de endemicidad en esa región constituye un cambio en la epidemiología del DENV en el país, que sigue la tendencia observada en toda Latinoamérica y presenta a nuestro país como un escenario altamente favorable para la aparición de dengue grave y/o epidemias de dengue en grandes centros urbanos. Salta es una de las provincias con mayor circulación de DENV desde la reemergencia de la patología en el país y al estar ubicada en la zona norte subtropical del país, limítrofe con Bolivia y Paraguay con intenso movimiento de personas a través de la frontera y características climáticas favorables para el vector presenta condiciones para sostener ciclos virales todo el año. La vigilancia de genoma de DENV en donantes de sangre podría ser una estrategia que contribuya a evidenciar la ocurrencia de un nivel bajo de transmisión viral que la vigilancia clínico epidemiológica pudiera no detectar.

Durante los primeros 5 meses del 2014, se confirmó la ocurrencia de un nuevo brote de dengue en la región del noreste salteño, en esta ocasión con tasas de infección relativamente más bajas a lo detectado en años anteriores: Salvador Mazza, 26 pacientes cada 10.000 habitantes, Aguaray 12, Orán 31 y Aguas Blancas 22. No obstante la baja incidencia de infección por DENV, la investigación en banco de sangre permitió detectar genoma de DENV-4 en 1 de 1775 (0,056%) muestras de donantes sanos estudiados en el período 9/2013 a 5/2014. Este porcentaje de positividad aumenta a 0,11% (1/926) si sólo consideramos el número de donantes estudiados en el transcurso del período con circulación autóctona reconocida en el inicio del 2014 (SE 1-19). La incidencia de RNA de DENV (por 10.000 donaciones) medida en algunos estudios realizados en otros países en momentos epidémicos fue 7 en Puerto Rico en el 2006, 30 en Honduras durante 2004-2005, 6 en cercanías de San Pablo, Brasil durante el 2003 y 0 en algunas localidades de Australia en 2003[232]. En nuestro estudio se ha detectado una incidencia de genoma de DENV por 10.000 donantes que se encuentra entre 5,6 (considerando 1 en 1775) y 10,8 (considerando 1 en 926). La cepa de DENV detectada en el donante de sangre en nuestro estudio correspondió al serotipo 4 en concordancia con el identificado por el sistema de vigilancia en los casos con sintomatología clínica. Esta cepa de DENV-4, genotipo II, integra un clado conjuntamente con las cepas detectadas en Argentina en 2010, 2013 y otras de reciente circulación en Brasil.

La provincia de Córdoba, con una población total de 3.304.825 habitantes, de los cuales 1.33,023 se concentran en la Capital (INDEC, 2010), está ubicada en la llanura pampeana, en la zona centro del país y posee un clima templado subtropical húmedo con invierno seco. Durante los primeros meses del 2013 se han confirmado casos autóctonos con evidencias de circulación simultánea de los serotipos DENV-1 y DENV-4, evidenciando la existencia de condiciones favorables para sostener ciclos de enfermedades de transmisión vectorial.

El estudio en el banco de sangre de la provincia de Córdoba resultó negativo para genoma de DENV en los 1602 donantes de sangre evaluados. Este valor puede relacionarse con la escasa circulación de DENV en la provincia en el período de estudio.

En nuestro estudio se ha empleado una metodología de trabajo en grupos de muestras similar a la adoptada en EE. UU, aunque se planteó el procesamiento con grupos armados con menor número de muestras para no disminuir la sensibilidad analítica y priorizar la posibilidad de captar donantes que pudieran presentarse con niveles de viremia de baja intensidad. Para garantizar el procesamiento uniforme y la comparabilidad de los resultados obtenidos en los 3 laboratorios que formaron parte de este estudio multicéntrico, se trabajó empleando procedimientos estandarizados y se procesaron paneles con cepas virales de referencia y títulos conocidos para evaluar el desempeño de las técnicas y su nivel de detección en cada centro interviniente.

Para este estudio se seleccionaron las técnicas moleculares disponibles en los laboratorios de referencia de dengue de las provincias participantes del estudio, con el objetivo de emplear herramientas de alta sensibilidad. La comparación de la sensibilidad analítica de las técnicas implementadas en los laboratorios provinciales resultó inferior pero se mantuvo en niveles aceptables para el tamizado considerando los niveles medio de viremia en casos asintomáticos y estudios similares realizados con otros métodos moleculares[75]. Es interesante notar que la cuantificación de nivel de detección se hizo en base a la valoración de unidades formadoras de placas en cultivos celulares presentes en los 140 ul utilizados para la extracción viral, lo que requiere partículas virales viables. En la literatura es frecuente que se cuantifique el virus en copias genómicas/ ml, que no necesariamente refleja la viabilidad viral. Por otro lado, en el algoritmo de diagnóstico de dengue de nuestro país se introdujo en el 2010 el uso de la metodología de ELISA NS1 para el procesamiento de muestras agudas tempranas como una alternativa al diagnóstico molecular. Bajo la consideración que un ELISA podría ser implementado fácilmente en la infraestructura de tamizado de los bancos de sangre, podría aplicarse la detección de NS1? Estudios retrospectivos realizados en Puerto Rico sobre alícuotas conservadas de donaciones tamizadas con resultado negativo por ELISA NS1 (Platelia Bio-Rad), mostraron un 20% de positividad en la detección del RNA viral y evidenciaron limitaciones de NS1-Ag ELISA para la evaluación de donaciones, incluso identificando un destinatario con un síndrome clínico compatible con dengue grave transfundido con una bolsa NS1-Ag negativo/RNA positivo[251].

Este estudio remarca la importancia de considerar los riesgos de transfusión que pueden derivar de agentes virales que causan viremias breves, usualmente asintomáticas, pero con el potencial de generar brotes explosivos o estacionales de alta incidencia y constituye el primer trabajo con información local sobre la transmisión de DENV en bancos de sangre de dos

provincias argentinas con diferente situación epidemiológica. En consecuencia, la información surgida de este estudio permitirá revisar las estrategias actuales de manejo de bolsas de sangre en áreas que atraviesan brotes o circulación de flavivirus en Argentina. Diferentes metodologías: inactivación de patógenos, incorporación de técnicas de tamizaje de genoma viral o limitación en el uso de hemoderivados obtenidos en regiones endémicas y/o epidémicas son algunas de las estrategias que podrían ser consideradas para prevenir la transmisión de flavivirus por vía transfusional en el país.

CAPITULO 5

INVESTIGACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL DENV EN PRIMATES NO HUMANOS DEL NORESTE DE ARGENTINA

1. INTRODUCCIÓN:

Las enfermedades emergentes y reemergentes son una de las principales amenazas para la salud pública mundial. El 60% de estas enfermedades son zoonosis (enfermedades compartidas entre humanos y animales vertebrados) y la mayoría se originó en la vida silvestre [252]. La creciente incidencia de estas enfermedades está relacionada con los intensos cambios ecológicos que se producen a escala local, regional y mundial. Como ya se ha mencionado, el ingreso del WNV y el ZIKV en el Nuevo Mundo, o la aparición del virus de la encefalitis japonesa (JEV) en Australia son algunos ejemplos destacados de emergencias recientes de flavivirus zoonóticos [253] [254][255] [256]. El potencial de los flavivirus para causar enfermedades en los seres humanos es significativo, pero además, también lo es el potencial de inducir pérdidas en el ganado o animales silvestres de importancia económica y ecológica.

Los virus del dengue han surgido desde los reservorios enzoóticos de primates no humanos hacia los humanos, lo que ha dado lugar a un ciclo de transmisión endémico urbano. En África y el sudeste de Asia, los virus se han mantenido en un ciclo selvático, probablemente involucrando primates no humanos como reservorios. Estos ciclos no han sido reconocidos en América del Sur, pero estudios serológicos han sugerido un posible ciclo secundario de amplificación que involucra a mamíferos distintos de los primates no humanos. La cuestión de si los mamíferos mantienen el DENV en ciclos enzoóticos y pueden desempeñar un papel en su resurgimiento en las poblaciones humanas sigue sin respuesta [257][24].

Es factible que los serotipos DENV-1, 2, 3 o 4 puedan infectar a animales salvajes y producir transferencia de los ciclos de mantenimiento urbano hacia el ambiente selvático o silvestre en América del Sur como ha ocurrido con el YFV en el pasado? Similar podría ser el interrogante para los arbovirus ZIKV o CHIKV que recientemente han hecho emergencia en el continente. Todos estos virus son transmitidos por los mosquitos antropofílicos *Aedes aegypti*, causan epidemias en la región, son originarios del Viejo Mundo y fueron introducidos en las Américas produciendo grandes brotes. YFV, ZIKV y CHIKV se encontraron inicialmente en primates africanos, siendo transmitido por mosquitos que habitan en las copas de los árboles. Los DENV 1-4 eran originalmente virus de primates del sudeste asiático que también fueron transmitidos originalmente por estos mosquitos. El YFV es el más antiguo ejemplo de un arbovirus urbano que se convirtió en silvestre en América del Sur. Actualmente, la fiebre amarilla es una zoonosis de primates no humanos que se mueve como una ola a través de las áreas selváticas, viajando miles de kilómetros, matando a muchos animales y eventualmente

infectando al hombre. Sin embargo, desde 2016, esta ola zoonótica ha alcanzado un alto nivel de transmisión en áreas pobladas del sureste de Brasil, produciendo el mayor brote humano en los últimos 60 años (referencia de Cintia). Al igual que con el YFV, los ciclos selváticos pueden ocurrir con el DENV, el CHIKV y el ZIKV. Para pasar a ciclos enzoóticos desde los ciclos urbanos, los arbovirus requieren una conjunción no tan frecuente de factores que pueden surgir en algún lugar inesperadamente o impredecible. Estos arbovirus podrían comenzar a infectar primates silvestres y ser transmitidos por mosquitos *Haemagogus* que habitan en las copas de los árboles. En San Pablo (Brasil), se han encontrado *Aedes albopictus* infectados con DENV-3 y sabemos que este es un mosquito que puede encontrarse en los patios traseros de las casas humanas pero también tiene una ductibilidad mayor en relación a los ambientes que los *Aedes aegypti* y gran facilidad de propagarse en entornos rurales, semi-rurales y silvestres, constituyendo un vector que podría actuar de puente entre diferentes habitats. Por otro lado, en el Estado de Bahía, se encontró infección por DENV-1 en una hembra de *Haemagogus leucocelaenus*, alertando sobre la potencialidad de un ciclo selvático[258]

Es casi imposible monitorear y/o controlar estos ciclos de arbovirus ya que es imposible saber dónde, cuándo o por qué ocurriría la expansión de los arbovirus en animales silvestres. Tal vez, la vigilancia viroentomológica en interfaces ambientales en momentos de brotes de dengue sea uno de los puntos para fortalecer e intentar generar herramientas de alerta. La conformación de ciclos de mantenimiento selvático/silvestres podría impedir la erradicación de un arbovirus. Además, un arbovirus en un ciclo selvático podría reaparecer en cualquier momento, infectando humanos y produciendo brotes, siendo este un escenario muy relevante pensando en los próximos pasos que permitan incorporar una vacuna para el dengue u otros arbovirus en la región[27]. Investigar y monitorear la circulación del dengue en ambientes silvestres es crucial para prevenir la ocurrencia de un ciclo urbano como consecuencia de un derrame del ciclo selvático.

Los virus y los brotes de enfermedades virales juegan un papel ecológico cada vez más reconocido en las poblaciones de animales salvajes. Se ha informado que al menos 27 virus infectan tanto a humanos como a primates salvajes y la mayoría de ellos están clasificados como amenazas emergentes para las poblaciones humanas[259][260]. La rápida expansión de las actividades humanas en los habitats de los primates ha resultado en un mayor potencial de intercambio de patógenos, creando desafíos para la conservación de la biodiversidad y la salud mundial. El papel de muchas especies silvestres como reservorios de patógenos virales transmitidos por artrópodos es poco conocido. La detección de anticuerpos específicos de virus en una especie de vida silvestre podría indicar un huésped reservorio o una especie que podría servir como centinela de la actividad del virus en la naturaleza.

Debido al impacto de reemergencia de fiebre amarilla selvática (SYF) ocurridas en Argentina entre 2007-2009 en las provincias de Misiones y Corrientes, hubo especial preocupación por el estado del aullador negro, que es la especie de mono más afectada por las epizootias en Argentina. Realizamos pruebas serológicas y moleculares para detectar la circulación de flavivirus en aulladores negros de vida libre en el noreste de Argentina en 2010.

2. 1.OBJETIVO GENERAL: Monitorear la actividad del DENV y otros flavivirus en primates no humanos en dos provincias del noreste de Argentina

2. 2. OBJETIVOS PARTICULARES:

2.2.1. Establecer la seroprevalencia para los serotipos DENV-1 y DENV-2 en *Alouatta caraya* de Corrientes y Chaco durante 2010.

2.2.2. Investigar la presencia de genoma viral de los cuatro serotipos de DENV y otros flavivirus en animales sin anticuerpos detectables para estos agentes.

3. MATERIALES Y MÉTODOS:

3.1 Sitios de estudio. El estudio se realizó en julio-agosto de 2010 en San Cayetano (SC), provincia de Corrientes (27 ° 34 'S, 58 ° 41' W); Isla del Cerrito (IC) (27 ° 17'S, 58 ° 37'W) e Isla Brasilera (IB), provincia del Chaco (27 ° 20 'S, 58 ° 40' W) en el noreste de Argentina (Fig 67). San Cayetano es una sabana con bosque semi-caducifolio fragmentado y degradado. Los fragmentos de bosque han sido modificados por la deforestación, la introducción de ganado, la reutilización de la tierra para plantaciones y la quema de árboles, lo que permite que humanos y monos vivan en estrecha asociación[261]. La Isla del Cerrito e Isla Brasilera se encuentran en la confluencia de los ríos Paraguay y Paraná y se caracterizan por un bosque inundado continuo. Los sitios se clasificaron siguiendo dos criterios: áreas donde el hábitat de los primates se superpone a las poblaciones humanas y las actividades agrícolas y áreas silvestres donde el contacto humano es infrecuente.



Fig 67. Sitios de estudio en las provincias de Chaco y Corrientes, noreste de Argentina.

3.2 Toma de muestras: Los aulladores negros capturados se inmovilizaron con clorhidrato de metomidina combinado con clorhidrato de ketamina, administrado mediante un dardo impulsado por aire comprimido. Para mantener la temperatura corporal en condiciones óptimas, los animales se cubrieron con mantas y se calentaron con botellas de agua tibia durante todo el procedimiento. De 109 aulladores negros capturados, se obtuvieron 108 muestras de sangre. La distribución por provincias fue de 51 (51.5%) capturas en el Chaco y 58 (48.5%) en Corrientes. Se registraron el sexo, el peso y las medidas [40]. De los animales estudiados, 43 (39.8%) eran hembras y 65 (60,2%) machos; el 85% eran adultos y el resto inmaduros. Las muestras de sangre se obtuvieron por punción de la vena femoral. Después de la evaluación de su estado post toma de muestra, cada animal fue trasladado al sitio exacto de captura y observado hasta que se reintrodujo en el hábitat. Las muestras de sangre se centrifugaron durante al menos 10 min a 2000 g para la separación del suero y se almacenaron en nitrógeno líquido en el campo. En el laboratorio, las muestras se congelaron a -80°C hasta que se analizaron.

3.3. Consideraciones éticas: Esta investigación cumplió con el Código de Buenas Prácticas de Primatología de Campo (International Primatological Society), los lineamientos para el tratamiento ético de primates (protocolo IACUC 09267) y las leyes de Argentina (a través de la Dirección de Recursos Naturales, Provincia de Corrientes y Dirección de Fauna , Provincia de Chaco), más aprobación del Comité de Ética para la Investigación Biomédica del INEVH. Las técnicas de captura e identificación de animales fueron diseñadas para ser menos invasivas para preservar el bienestar de los animales y aliviar estrés potencial.

3.4. Pruebas de neutralización por reducción de placa (PRNT₉₀). Las muestras de suero se inactivaron por calor a 56 ° C durante 30 min. Se incubaron diluciones seriadas dobles de 1:10 a 1: 2560 de cada muestra con aproximadamente 100 unidades formadoras de placa (UFP) de WNV (cepa ChimeriVax TM WNV), SLEV (cepa ChimeriVax TM SLEV), DENV-1 (cepa Hawaii), DENV-3 (cepa H87), YFV (cepa vacunal 17D-YEL), ILHV (Original) y BSQV[124]. Se utilizó rojo neutro de colorante vital al 5% para la visualización de la placa (Anexo 7). Se contaron las placas y se calcularon los títulos y se expresaron como el recíproco de la dilución de suero produciendo una reducción $\geq 90\%$ en PFU en células Vero (PRNT₉₀). Los títulos ≥ 10 se consideraron positivos. Los patrones monotípicos o heterotípicos se diferenciaron según el animal fuera positivo a uno o varios flavivirus, respectivamente. En los patrones heterotípicos, la interpretación de los datos de PRNT fue la siguiente: los animales con un título de anticuerpos neutralizantes (PRNT₉₀) \geq cuatro veces que los otros títulos de flavivirus, se consideraron positivos para el agente en cuestión. Los animales con títulos de anticuerpos neutralizantes contra múltiples virus, sin una diferencia de cuatro veces en el título, se consideraron positivos frente a flavivirus sin la identificación de un virus específico y etiquetado como flavivirus "indeterminado".

3.5. Detección del genoma viral: El estudio molecular se realizó en sueros de 27 animales que fueron negativos para anticuerpos PRNT₉₀ para todos los flavivirus de nuestro panel y 24 animales que no tenían anticuerpos para YFV. Se extrajo RNA viral de 140 ul de suero usando el kit de extracción de RNA viral QIAamp (Qiagen, Inc., Valencia, California, EE. UU.). Para identificar genoma de flavivirus se usó una PCR genérica anidada con transcripción inversa (RT). Este procedimiento se utilizó para amplificar un fragmento específico de 143 pb del gen NS5[262]. Los productos amplificados se visualizaron mediante tinción con bromuro de etidio después de la electroforesis en un gel de agarosa de alta resolución al 2.0%.

4. RESULTADOS

De los 108 aulladores negros estudiados, el 64.8% (70/108) tenían evidencia de una infección pasada por un flavivirus. Se diferenciaron patrones monotípicos (13/70, 19%) y heterotípicos (27/70, 39%). El 42% restante de los animales con anticuerpos positivos se clasificó como indeterminado para la identificación del virus.

Identificamos anticuerpos neutralizantes específicos contra DENV-1 y DENV-3, también para WNV, SLEV, ILHV y BSQV. Las prevalencias de anticuerpos fueron 22,2% (24/108 con 9 respuestas monotípicas) para WNV, 10,2% (11/108) para SLEV, 1,85% (2/108, 100% monotípico) para DENV (1/108 DENV-3 y 1 / 108 DENV-1), 0,93% (1/108, monotípico) para ILHV y 0,93% (1/108, monotípico) para BSQV. La distribución de los títulos de PRNT₉₀ se muestra en la Tabla 23 (patrón monotípico) y la Tabla 24 (patrón heterotípico). No hubo

diferencias estadísticamente significativas en las prevalencias de infección para cada flavivirus entre sexos o entre sitios de estudio o clases de hábitat. Cuando se analizó la distribución de anticuerpos por edad, se observó una diferencia estadística solo para la prevalencia de anticuerpos del WNV en adultos aulladores negros ($p = 0,0075$).

En 30 de 70 animales (43%) los resultados no fueron concluyentes debido a la existencia de títulos de anticuerpos neutralizantes contra múltiples virus sin diferencias cuádruples; aquellos se consideraron positivos para un flavivirus indeterminado (Tabla 25). Observamos diferente reactividad entre estos: 73% (22/30) para WNV, 61% (18/30) para SLEV, 61% (18/30) para ILHV, 53% DENV-3 (16/30), 47% (14/30) para DENV-1, 33% (10/30) para BSQV y 7% (2/30) para YFV.

Para los estudios moleculares, seleccionamos muestras de suero de 51 animales. Todos los animales analizados por PCR anidada (RT) fueron negativos para el genoma del flavivirus.

Tabla 23. Distribución de los títulos PRNT₉₀ hallados para los 7 flavivirus en los 13 aulladores con patrón immune monotípico.

Identificación Animal	Título PRNT ₉₀							Interpretación
	DENV-1	DENV-3	SLEV	WNV	YFV	ILHV	BSQV	
PA07001	<10	<10	<10	80	<10	<10	<10	WNV
PA07007	<10	<10	<10	80	<10	<10	<10	WNV
PA07008	<10	<10	<10	80	<10	<10	<10	WNV
PA07021	<10	20	<10	<10	<10	<10	<10	DENV-3
PA07036	<10	<10	<10	40	<10	<10	<10	WNV
PA07075	80	<10	<10	<10	<10	<10	<10	DENV-1
PA07079	<10	<10	<10	40	<10	<10	<10	WNV
PA07082	<10	<10	<10	40	<10	<10	<10	WNV
PA07083	<10	<10	<10	160	<10	<10	<10	WNV
PA07092	<10	<10	<10	40	<10	<10	<10	WNV
PA07099	<10	<10	<10	<10	<10	<10	20	BSQV
PA07103	<10	<10	<10	<10	<10	20	<10	ILHV
PA07108	<10	<10	<10	20	<10	<10	<10	WNV

Tabla 24- Distribución de los títulos de PRNT₉₀ para los 7 flavivirus en los 27 *Alouatta caraya* con patrón immune heterotípico.

Identificación Animal	TITULO PRNT ₉₀							Interpretación
	DENV-1	DENV-3	SLEV	WNV	YFV	ILHV	BSQV	
PA07019	10	10	<u>160</u>	20	<10	10	<10	SLEV
PA07030	<10	40	<10	<u>320</u>	<10	10	40	WNV
PA07035	<10	<10	<u>40</u>	10	<10	<10	<10	SLEV
PA07039	<10	<10	80	<u>320</u>	<10	10	<10	WNV
PA07040	<10	<10	<10	<u>80</u>	<10	20	10	WNV
PA07043	20	<10	<u>640</u>	10	<10	<10	<10	SLEV
PA07052	80	40	<u>320</u>	80	<20	20	10	SLEV
PA07073	<10	<10	10	<u>40</u>	<10	<10	<10	WNV
PA07076	80	10	<u>320</u>	80	<10	10	10	SLEV
PA07077	40	10	<u>160</u>	20	<10	<10	<10	SLEV
PA07078	10	20	<u>80</u>	<10	<10	<10	<10	SLEV
PA07084	10	10	10	<u>320</u>	<10	10	10	WNV
PA07085	<10	<10	10	<u>40</u>	<10	10	10	WNV
PA07088	<10	<10	10	<u>40</u>	<10	<10	<10	WNV
PA07091	10	20	<u>>1280</u>	20	<10	<10	<10	SLEV
PA07100	<10	<10	40	<u>160</u>	10	<10	<10	WNV
PA07102	<10	<10	<10	<u>80</u>	<10	20	<10	WNV
PA07104	20	20	<u>640</u>	160	20	40	20	SLEV
PA07105	<10	<10	10	<u>40</u>	<10	<10	<10	WNV
PA07109	<10	<10	10	<u>40</u>	<10	<10	<10	WNV
PA07112	10	20	40	<u>>1280</u>	<10	>20	10	WNV
PA07113	20	10	20	<u>320</u>	<10	10	10	WNV
PA07117	10	10	<u>80</u>	10	<10	<10	<10	SLEV
PA07118	<10	10	<u>40</u>	10	<10	<10	<10	SLEV
PA07121	10	10	<10	<u>40</u>	<10	<10	<10	WNV
PA07016	<10	<10	<10	<u>160</u>	<20	20	<10	WNV
PA07049	<10	<10	<u>40</u>	<10	<10	10	<10	SLEV

Tabla 25- Distribución de los títulos PRNT₉₀ para los 7 flavivirus en los 30 animales positivos para varios agentes sin diferencias en 4 o más diluciones entre los títulos de anticuerpos (flavivirus indeterminado)

Identificación animal	Título PRNT ₉₀							Indeterminado para
	DENV-1	DENV-3	SLEV	WNV	YFV	ILHV	BSQV	
PA07011	<10	<10	10	<10	<10	<10	<10	SLEV **
PA07014	<10	<10	640	640	<10	<10	<10	SLEV, WNV
PA07017	<10	<10	<10	<10	<10	10	<10	ILHV **
PA07018	<10	<10	<10	20	<10	40	<10	WNV,ILHV
PA07027	<10	10	<10	<10	<10	<10	<10	DENV-3 **
PA07037	<10	10	<10	10	<10	<10	<10	DENV-3 ,WNV
PA07038	<10	10	<10	10	<10	20	20	DENV-3,WNV, ILHV, BSQ
PA07042	<10	<10	<10	10	<10	<10	<10	WNV **
PA07045	<20	<20	160	80	<20	<10	<10	SLEV, WNV
PA07050	20	<10	<10	<10	<10	10	<10	DENV-1,ILHV
PA07054	40	40	<20	<20	<20	<10	<10	DENV-1, DENV-3
PA07055	40	20	<20	<20	<20	<10	<10	DENV-1, DENV-3
PA07072	80	40	1280	1280	20*	80	10	SLEV,WNV, DENV-1,DENV-3,ILHV,BSQV, YFV
PA07074	40	<10	80	40	<10	10	<10	DENV-1, SLEV,WNV,ILHV
PA07080	10	20	160	640	<10	320	20	DENV-1,DENV-3,SLEV,WNV, ILHV, BSQV
PA07081	<10	20	160	320	<10	10	80	DENV-3,SLEV, WNV, ILHV, BSQV
PA07086	10	10	320	640	<10	10	40	DENV-1,DENV-3,SLEV,WNV,ILHV, BSQV
PA07094	10	10	320	320	<10	20	20	DENV-1,DENV-3,SLEV, WNV, ILHV, BSQV
PA07095	<10	<10	10	40	<10	20	10	WNV,SLEV, ILHV, BSQV
PA07097	<10	20	20	40	<10	10	<10	DENV-3, SLEV, WNV, ILHV
PA07101	40	20	<10	20	<10	10	<10	DENV-1,DENV-3 ,WNV, ILHV
PA07106	20	10	40	40	<10	20	10	DENV-1,DENV-3, SLEV,WNV,ILHV,BSQV
PA07107	10	10	80	40	<10	20	10	DENV-1, DENV-3, SLEV,WNV, ILHV, BSQV
PA07110	10	<10	80	40	10*	40	40	DENV-1, SLEV,WNV, ILHV, BSQV, YFV
PA07111	<10	<10	40	40	<10	10	<10	SLEV, WNV, ILHV
PA07114	<10	<10	<10	10	<10	<10	<10	WNV **
PA07115	10	20	40	<10	<10	10	<10	DENV-1, DENV-3, SLEV, ILHV
PA07116	<10	<10	<10	10	<10	<10	<10	WNV **
PA07119	<10	<10	20	10	<10	<10	<10	SLEV, WNV
PA07120	10	10	<10	<10	<10	<10	<10	DENV-1, DENV-3

5.CONCLUSIONES:

En este capítulo, se muestra la prevalencia de infección para DENV y otros flavivirus en aulladores negros de vida libre en dos provincias del NE para monitorear la ocurrencia de ciclos silvestres por estos virus en Argentina. La metodología PRNT₉₀ utilizada para identificar anticuerpos específicos en muestras de suero de primates no humanos obtenidas durante 2010, indicó una prevalencia variable para uno o más de seis de los siete flavivirus probados, incluidos los dos serotipos de DENV evaluados (DENV-1, DENV-3, WNV, SLEV, ILHV y BSQV). No se detectó una respuesta inmune específica al YFV y no se evidenció genoma viral en la selección de animales estudiados.

Encontramos diferentes patrones inmunes en los animales positivos: 19% monotípicos, 39% heterotípicos y 43% clasificados como indeterminados para la identificación viral según el criterio de interpretación empleado. Incluimos 6 animales en el último grupo que solo tenían un título de 10 para WNV (3), SLEV (1), DENV-3 (1) e ILHV (1); no pudimos utilizar el criterio de diferencia de 4 títulos, porque la dilución más baja estudiada fue 1:10. Cuando los individuos sin exposición previa a un flavivirus se infectan con uno de estos agentes, se demuestra una respuesta monotípica al virus infectante en pruebas serológicas, como PRNT, y el agente etiológico puede identificarse con precisión. La interpretación de los patrones heterotípicos es compleja y la diferencia de 4 veces en los títulos podría ser un criterio limitado para distinguir la infección más reciente. La respuesta de anticuerpos en animales infectados experimentalmente de forma secuencial ilustra la dificultad de un diagnóstico serológico de infección por WNV en animales (o seres humanos) con inmunidad preexistente a flavivirus [263]. Las infecciones secuenciales con otros flavivirus provocan fuertes respuestas anamnésicas de reacción cruzada, que pueden conferir inmunidad, especialmente dentro de los miembros del mismo serogrupo [125]. Por ejemplo, las infecciones secuenciales SLEV-WNV o WNV-SLEV presentarían diferentes patrones inmunitarios que dificultarían la diferenciación serológica de cada una [263]. Las respuestas serológicas monotípicas fueron las más confiables ya que estas muestras reaccionaron con uno solo de los 7 virus empleados en las pruebas. La selección de los virus que integran el panel en la PRNT₉₀ es de vital importancia. Futuros estudios de este tipo en Argentina tendrían que incluir ZIKV, ya que se introdujo en América recientemente y se lo ha detectado en el país a partir del 2016.

Los resultados mostraron reacciones monotípicas para DENV-3 (0,93%) y DENV-1 (0,93%). Los títulos obtenidos, en estos casos, fueron bajos, pero específicos ya que las muestras de suero se inactivaron previamente por calor. Estos serotipos de dengue fueron seleccionados porque son los que tuvieron confirmación de circulación previa en casos humanos de las provincias de Misiones, Corrientes y Chaco en el período 2000-2008, previo a este muestreo. Es interesante analizar que, además de los animales monotípicos, el 47% de los

restantes animales fueron positivos a DENV-1 y el 53% a DENV-3 en el grupo de los etiquetados como indeterminados. Por otro lado, si consideramos además el grupo de los animales con patrón heterotípico con títulos superior 4 títulos para otro flavivirus, se suma un 48,1 % (13 /27) con títulos de anticuerpos neutralizantes para DENV-1/ DENV-3 en un rango comprendido entre 10 y 80. Estos resultados podrían originarse por reacción cruzada, podrían representar un ingreso viral por contacto con el ambiente humano, o bien, como otros estudios lo plantean, podrían indicar la ocurrencia de DENV silvestre en las región y la infección por este agente sería mayor a la evidenciada en los animales con respuesta homotípica [48, 49, 50]. En este sentido, al no detectarse genoma y no estar caracterizado el agente viral, no es factible dilucidar el origen de la inmunidad. Otros estudios en Brasil, realizados en la Mata Atlántica de Bahía, evidenciaron anticuerpos para DENV-1, DENV-2 y YFV en *Leontopithecus chrysomelas* y *Sapajus xanthosternos*, y anticuerpos para DENV-3 en perezosos (*Bradypus torquatus*) [264] en regiones cercanas a trabajo agrícola que podría indicar la fuente viral. Por otro lado, en estudios de vigilancia entomoviroológica, se ha evidenciado DENV-1 en *Haemogogus leucocelaenus*, mosquito habitual de ambiente selvático [258]. Por lo tanto, a pesar de que no ha evidenciado claramente, es posible que los ciclos selváticos de DENV puedan ocurrir en América del Sur, aunque se requieren más estudios para probar tal hipótesis. Clásicamente, se han utilizado tres estrategias para identificar los reservorios de vertebrados para los arbovirus: (1) el aislamiento del virus a partir del potencial reservorio, (2) prevalencia de anticuerpos relativamente alta en la especie animal capturada en el terreno y (3) demostración de viremia (de mayor título y duración del virus) en animales en condiciones de laboratorio[20] y las mismas han sido demostradas en los ciclos selváticos de DENV reconocidos en Asia y África[265].

Se han identificado treinta y cuatro grupos de aulladores negros en el área de estudio, en unas 3.000 ha, varios de estos grupos han estado bajo estudio de comportamiento desde 2000 [43, 44] en bosques no perturbados y en bosques fragmentados por actividades humanas. Estas regiones proporcionan condiciones favorables para la aparición de brotes o para el mantenimiento enzoótico de enfermedades transmitidas por artrópodos.

Los brotes de fiebre amarilla ocurrieron cerca de esta región entre noviembre de 2007 y octubre de 2008, también en 2009 y afectaron gravemente a las poblaciones de dos especies de monos aulladores: el aullador pardo (*Alouatta guariba clamitans*) y el aullador negro [266][267]. Aquí nos enfocamos en la prevalencia de infección en aulladores negros, con aquellos flavivirus de reconocida circulación en Argentina (DENV, YFV, SLEV y WNV). Incluimos ILHV y BSQV a fin de investigar su presencia en la vida silvestre y porque una correcta interpretación a las reacciones requiere un panel de flavivirus que contemple al menos los agentes de circulación reconocida en la región.

La PRNT₉₀ es una de las pruebas más específicas disponibles que se utiliza a menudo para definir varios serocomplejos de flavivirus más estrechamente relacionados. Para aumentar la especificidad, seleccionamos un umbral del 90% en la reducción de placas por neutralización. El análisis de los resultados serológicos requiere una evaluación cuidadosa, especialmente cuando, incluso, puede darse la co-circulación de múltiples flavivirus, como en Argentina.

Sorpresivamente, la prevalencia de anticuerpos contra el WNV fue la más alta entre los flavivirus evaluados a pesar que este agente no ha causado alto impacto en salud pública en el país. La prevalencia monotípica para WNV fue del 8, 33% (9/108) evidenciando actividad viral en un nuevo huésped en Argentina. Encontramos aulladores negros positivos para el WNV en todos los sitios de muestreo, lo que demuestra una distribución generalizada en la región de estudio. Se detectaron animales con títulos de anticuerpos contra el WNV en el grupo con patrón heterotípico y en 22 aulladores negros en el grupo clasificado como flavivirus indeterminado, aumentando así la prevalencia total. Por consideraciones de conservación, evitamos capturar individuos inmaduros o hembras preñadas, por lo tanto, la mayor prevalencia en adultos puede reflejar este sesgo de captura.

Este estudio aporta datos serológicos de DENV y evidencia la circulación de DENV-1, DENV-3, WNV, SLEV, ILHV y BSQV en poblaciones de primates silvestres no humanos de las provincias de Corrientes y Chaco, Argentina. Es la primera detección de anticuerpos específicos del WNV en aulladores negros de Argentina y el primer informe en primates no humanos en libertad de América Latina. Además, nuestros resultados muestran que la población de primates evaluadas no habría tenido exposición a YFV ya que no se detectaron anticuerpos neutralizantes específicos para este virus. La recurrencia de la circulación de YFV u otros patógenos podría ser perjudicial para la existencia de la población de aulladores que ya se encuentra en situación de vulnerabilidad, en términos de conservación de la especie, en la zona de estudio. Se necesita un mejor monitoreo de estos agentes para evaluar el riesgo para la vida silvestre y la salud humana en la región.

En Argentina se detectó la presencia de *Aedes albopictus*, la primera vez a principios de 1998, en dos localidades del noreste de Misiones, cerca de la frontera brasileña [268] y se ha constatado su dispersión en la provincia recientemente [269]. En 2019, incluso, se ha documentado su expansión hacia el sur, en Corrientes, en fragmentos de bosque donde viven grupos de aulladores y donde se reportaron epizootias por YFV durante 2009 [270]. Además, estos sitios se ubicaron en localidades con amplia interface silvestre-humano-doméstico. Sabemos que *Aedes albopictus* circula en áreas urbanas, periurbanas y rurales y puede alimentarse de una gama relativamente amplia de especies hospedadoras de vertebrados [271]. Si bien posee alto grado de antropofilia, esta particularidad lo ubica en la posibilidad de actuar

de puente entre ambientes diversos y evidencia condiciones favorables para mantener o potenciar redes de transmisión para DENV y otros arbovirus en la zona.

El establecimiento de un ciclo selvático para DENV, como ha sucedido con YFV en las Américas, dificultaría el control de la patología en América Latina. Los focos enzoóticos pueden proporcionar entornos selectivos donde se desarrollen nuevas cepas de arbovirus con aumento (o disminución) de virulencia para las personas e incluso cepas que pudieran escapar de la inmunidad generada por vacunas diseñadas contra las cepas urbanas circulantes. La detección de anticuerpos específicos para DENV en aulladores negros en el norte de Argentina subraya la importancia de continuar la vigilancia de estos flavivirus en poblaciones de primates no humanos y continuar los esfuerzos para monitorear ciclos selváticos para DENV en América-.

DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

En los últimos años, la región de las Américas ha demostrado tener condiciones muy favorables para la introducción y propagación de infecciones virales transmitidas por artrópodos. El número de casos de dengue reportados desde el año 2000 aumentó de una manera sin precedentes, con la circulación de los cuatro serotipos y la mayoría de los países pasando de una endemicidad leve a un estado de hiperendemicidad. El número de casos de dengue reportados hasta la semana 52 de 2019 (3.139.335), fue el mayor registrado en la historia de dengue en la región, superando en 30% al número de casos reportados en el 2015, el mayor año epidémico anterior [272]. En Argentina ocurrieron brotes de dengue todos los años desde 1997, excepto en 2001 y 2005 y en 2020 se registró la mayor circulación viral autóctona de dengue hasta el momento, afectando 18 jurisdicciones incluyendo nuevamente la región central más densamente poblada y por primera vez, afectando a todas las provincias de Cuyo. En 2020 se notificaron 104.063 casos con sospecha de arbovirosis en el país, el mayor número registrado de los últimos 5 años, concentradas fundamentalmente entre las semanas 1 y 28, con el mayor número entre las SE7 y 22. Del total de estas notificaciones, 100.541 correspondieron a casos con sospecha de dengue y las restantes 3.522 notificaciones correspondieron a casos con sospechas de ZIKV, SLEV, CHIKV, WNV y YFV [183].

La EGI dengue, abordaje propuesto por la OPS como el modelo metodológico multidisciplinario para prevenir y organizar la respuesta ante situaciones de brotes, epidemias y en períodos interepidémicos, tiene como objetivo fortalecer los programas nacionales con vistas a reducir la morbilidad, la mortalidad y la carga social y económica por esta enfermedad[273]. En 2007 se redactó la EGI Mercosur y la EGI Argentina y en ambos casos, el INEVH y nuestro equipo de trabajo ha tenido la responsabilidad de representar al componente laboratorio. La EGI-dengue plantea la necesidad de una vigilancia integrada, en la que la vigilancia clínico-epidemiológica con apoyo del laboratorio, unida a la vigilancia entomológica y ambiental, tiene una función primordial. Tal integración debe poder determinar los factores de riesgos ambientales y entomológicos para elaborar planes que reviertan o minimicen esos riesgos. A su vez, debe poder detectar tempranamente la transmisión del dengue y favorecer una respuesta rápida y eficaz[79].

En esta tesis se ha realizado el abordaje de nudos críticos en las metodologías de diagnóstico de dengue y se han analizado aspectos particulares del escenario epidemiológico de nuestro país, considerando la expansión del dengue a las regiones subtropicales y templadas de norte y centro del país, así como la circulación comprobada de otros virus de la familia viral (SLEV, YFV, ZIKV, WNV, ILHV y BSQV) en entornos humanos y/o silvestres.

La vigilancia por laboratorio tiene por objeto detectar tempranamente el aumento de la transmisión, caracterizar los virus circulantes, monitorear la introducción de un nuevo serotipo o genotipo en un lugar determinado, la confirmación de casos graves/atípicos de dengue y el seguimiento y apoyo a la caracterización de una epidemia. Para la vigilancia integrada no se requiere la confirmación por laboratorio de todos los casos compatibles clínicamente. Sin embargo, es necesario que se estudie un porcentaje de ellos para evaluar la situación epidemiológica en un momento y lugar determinados, con la mayor precisión y oportunidad posible y contribuir a una correcta toma de decisiones en salud pública [79]

Cuando se detecta un caso con clínica compatible con dengue es posible que exista diversidad en los días de evolución al momento de realizar la consulta y este punto es importante porque no existe una metodología que pueda dar respuesta al diagnóstico etiológico en todas las fases de la enfermedad. En los primeros días, habitualmente en forma coincidente con la fase febril, se utilizan los métodos directos para la realización del diagnóstico etiológico. La detección del genoma viral por *n*RT-PCR o *q*RT-PCR ha pasado a ser una de las herramientas diagnósticas de mayor especificidad, sensibilidad y celeridad para la obtención de resultados. No obstante, estas metodologías no resultan accesibles en todos los niveles de complejidad, particularmente en localidades pequeñas y sitios de atención que no poseen la infraestructura, equipamiento y recurso humano capacitado.

Por otro lado, el DENV es un virus RNA monocatenario envuelto y por esta condición, suele ser más inestable y muy susceptible a las condiciones de conservación, así como a la degradación por ribonucleasas omnipresentes, afectando las chances de detección por biología molecular y/o del aislamiento viral. En ese sentido, en esta tesis, se ha evidenciado la utilidad y desempeño de una metodología comercial para la detección del antígeno NS1 de dengue como una herramienta alternativa que posibilite mayor acceso a un diagnóstico oportuno y de calidad.

Diversos trabajos han evidenciado que el antígeno NS1 del DENV está presente en la fase aguda del dengue con un pico en la detección hacia el día 3 luego del inicio de los síntomas, seguido de una rápida disminución a través de la fase de convalecencia (> 5dpi) [133]. Con este fundamento, se planteó la incorporación de esta determinación en el algoritmo de diagnóstico de la red laboratorial para dengue y otros arbovirus en el 2009. Los datos que surgen de la evaluación prospectiva realizada en terreno en el período 2010- 2013 en el marco de esta tesis, permitió mostrar valores de Se: 94.2 (98.8-84.0) y Sp 98.0 (100 - 89.9), con concordancia excelente (valores del índice K entre 0,83 y 0,90) en un total de 2310 muestras procesadas en paralelo por ELISA NS1 Platelia vs RT- PCR DENV-1, 2, 3, 4. Es interesante contextualizar que durante ese período en la Argentina hubo circulación autóctona de DENV-1

(2010), DENV-1 y DENV-2 (2011) y DENV-1, 2 y 4 (2013). La evaluación realizada en terreno tuvo representatividad de procesamiento en laboratorios de las diferentes provincias argentinas afectadas por circulación de DENV y a medida en que aumentó la proporción de los serotipos DENV-2 y DENV-4 se pudo evidenciar menor sensibilidad del antígeno NS1 al comparar con infectados por DENV-1, pero dentro de un rango de aceptabilidad. La Se determinada en nuestro medio para detectar infecciones por DENV-1 fue del 100% en 2010, 98 % en 2011 y 97.5 en 2013. Para el serotipo DENV-2 fue 89% en 2011 y 83.3% en 2013. Para el serotipo DENV-4, la Se fue 88.5 % en 2013, año dentro del período incluido en este estudio en el que se lo detectó con circulación autóctona. La sensibilidad para DENV-3 fue del 91.3% (21/23.100) en la evaluación del 2009 con el panel INEVH. En nuestro trabajo, hallamos muestras ELISA NS1 positivos y *n*RT-PCR negativos, en los que, frecuentemente, se corroboró la presencia de IgM en la misma muestra o en una muestra con más días de evolución, indicando que no se trataba de falsos positivos. Trabajos previos, en estudios longitudinales de pacientes con dengue, han demostrado que el antígeno NS1 permanece positivo durante un tiempo mayor que el RNA viral, probablemente porque la proteína NS1 posee una vida media más larga [274][142][138]. Este aspecto puede representar incluso una ventaja para el diagnóstico en los primeros días de la infección, dado que es el paciente quien identifica y comunica el inicio de los síntomas y podemos tener ahí cierta imprecisión que resulte en el análisis de muestras con más tiempo de evolución a la reconocida.

Por otro lado, Platelia NS1 DENV fue negativo al estudiar muestras de suero de 32 pacientes confirmados de infección con SLEV y estos datos representan un aporte al conocimiento de la reactividad cruzada del reactivo con este flavivirus. SLEV posee notificación en EE.UU en general en regiones en las que no suele haber superposición con DENV y es muy escaso el reconocimiento de este agente en otros países de Latinoamérica, por lo cual este aspecto se encuentra poco evaluado[58]. Tampoco se ha observado reactividad cruzada en las restantes 25 muestras correspondientes a infecciones por YFV (4 pacientes), vacunados para fiebre amarilla (13 vacunados recientes), ZIKV (8 pacientes) y un caso de WNV. Un estudio realizado en 2015 en Guyana Francesa, con el mismo reactivo comercial de ELISA para NS1, tampoco encontró reactividad cruzada sobre muestras de suero agudas de 65 pacientes confirmados de ZIKV. Esta información sobre la reactividad con ZIKV también resulta de relevancia ya que la mayoría de las evaluaciones de desempeño de los test de NS1 fueron realizadas con anterioridad a la reemergencia e introducción de ZIKV en la región americana. Existen muy pocos registros en la literatura que hagan referencia a reactividad cruzada de NS1 con otros flavivirus [275], si bien se han comunicado algunos resultados falsos positivos, mayoritariamente han sido para el formato de tests rápidos, al aplicarlo sobre

muestras de pacientes con factor reumatoideo [116], pacientes con alteraciones hematológicas [145][276], hantavirus [116] y recientemente, en algunos casos con COVID-19 [276]. Considerando que el VPP promedio en el período evaluado ha sido del 92% y la experiencia positiva de aplicación de esta herramienta en la red nacional de laboratorios, indicarían que están dadas las condiciones para cambiar la interpretación de “probable” a “confirmado” en el algoritmo nacional cuando la misma sea realizada por metodologías de enzimoimmunoensayo. La combinación de un resultado NS1 e IgM daría aún más fuerza al criterio, se plantearía como una complementariedad y daría la posibilidad de confirmar casos en los que la detección de genoma pudiera resultar negativa, ya sea por cuestiones de “*clearance*” del RNA en suero o por condiciones deficientes de conservación de la muestra.

En este trabajo, hemos evidenciado que los anticuerpos IgM DENV medidos por un reactivo comercial de ELISA tuvieron una seropersistencia de 228 (IC95 203-253) días en mayores de 15 años luego del inicio de los síntomas en un brote por DENV-1 en Tucumán. Esta seropersistencia pudo ser corroborada por la metodología “*in house*” de referencia para la detección de IgM. En consecuencia, el hallazgo de IgM DENV (+) es un marcador de infección reciente y puede no corresponder a la detección de una infección aguda. En el caso de contar con una única muestra del paciente, un resultado de IgM (+) acompañado de un NS1 (+) permitiría determinar que efectivamente se trata de un caso agudo y orientaría fuertemente a la especificidad de esa IgM, si es que no fuera posible evaluar reactividad cruzada con otros flavivirus. Esta tesis, hasta nuestro conocimiento, es el primer trabajo en el orden nacional, que documenta la persistencia de IgM en infectados por dengue y suma evidencia a este aspecto que paulatinamente ha sido abordado por otros investigadores, tanto para infecciones por DENV como para otros flavivirus[123][277][278][168].

En esta tesis hemos evaluado la utilidad de una versión del MAC-ELISA DEN estandarizado para medir la reactividad en simultáneo frente a los antígenos de flavivirus reconocidos en Argentina mediante el análisis de una muestra de suero del paciente y en una única dilución[153]. Se ha evidenciado que esta determinación puede ser de gran utilidad en la identificación del agente infectante logrando la diferenciación de DENV al procesar en paralelo frente a los antígenos de SLEV, WN, YFV y ZIKV y comparar los correspondientes valores P/N. En los casos de dengue confirmados que fueron evaluados en nuestro estudio, la relación de los valores P/N se presenta más elevado en el 100% de las muestras. Es relevante notar el alto grado de reactividad de las muestras frente a los diferentes flavivirus evaluados, con valores P/N superando el valor de corte y que si hubieran sido procesados individualmente, llevarían a interpretaciones erróneas. En el caso de los infectados por DENV, la reactividad fue mayor frente al antígeno de SLEV, seguido de YFV, WNV y en menor medida ZIKV. Los valores de P/N frente al antígeno homólogo en pacientes confirmados con dengue, resultaron

aproximadamente 6 veces superiores que los obtenidos frente a ZIKV, 3 veces superiores que frente a WNV, 2 veces superior con YFV y en menor proporción, 1.5 más alto frente a DENV vs SLEV. En el análisis similar realizado sobre par serológico de 4 pacientes clasificados como infecciones por flavivirus por los resultados de PRNT₉₀, el valor P/N frente al antígeno de DENV siguió aproximadamente la relación observada en los pacientes en los que DENV había sido confirmado, indicando la necesidad de continuar estudiando este aspecto en un mayor número de casos y validar si esta estrategia pudiera aplicarse de rutina para la orientación diagnóstica en infecciones secuenciales o secundarias que sólo tienen datos serológicos.

Resultados similares se evidenciaron en los casos de SLEV y ZIKV estudiados con el antígeno de DENV y los otros flavivirus incluidos en el estudio. En las 20 muestras correspondientes a etiología por SLEV se observó que P/N frente al antígeno homólogo resultó aproximadamente 5 veces superior a los valores P/N frente al antígeno de DENV, mostrando una mayor diferenciación en relación a casos de DENV al analizar reactividad con SLEV y por lo tanto, mayor capacidad para diferenciar el agente etiológico en ese sentido. Al ingresar WNV en América y superponerse en EEUU con las regiones afectadas por SLEV, otros autores han mostrado la utilidad de este protocolo incluso para la diferenciación de infecciones por agentes dentro del complejo de la Encefalitis Japonesa con un panel de muestras de casos confirmados por WNV, SLEV y JEV. Mostraron en su trabajo que los valores P / N obtenidos con el antígeno WN resultaban aproximadamente de tres a cinco veces superiores a los P / N obtenidos con el antígeno de SLEV. Esta comparación en muestras de LCR humano infectadas con el virus WN reveló que los P /N eran aún mayores (aproximadamente cinco veces) con el antígeno del virus WN que con SLEV[279]. Otros estudios que evalúan la especificidad de la neutralización en infectados por ZIKV con exposición previa a DENV, han mostrado una mayor especificidad de los IgM luego de la eliminación de IgG. Todos estos datos plantean que esta mayor especificidad en IgM podría potenciarse para optimizar el diagnóstico de las infecciones humanas por dengue y en ese sentido, el desarrollo de pruebas de ELISA con antígenos recombinantes diseñados para diferentes proteínas virales podría ser también una alternativa a explorar. En este sentido, existen resultados alentadores sobre la aplicación de antígenos recombinantes del dominio III de la E para DENV[282][283] o de la proteína NS5 para la identificación de infecciones por WNV y SLEV en áreas donde circulan otros flavivirus [284][285].

La persistencia de los anticuerpos IgM y la reactividad cruzada son dos aspectos que determinan la necesidad de pruebas confirmatorias en par de muestras del período agudo-convaleciente para arribar al diagnóstico por los métodos serológicos y en ese sentido, la PRNT₉₀ ha sido de mucha utilidad, particularmente en infecciones primarias. La ocurrencia de infecciones múltiples por distintos serotipos de DENV o combinaciones con otros agentes de

esta familia, con la exacerbación de los niveles de IgG y reacción cruzada, constituye una limitación para la confirmación etiológica de cuadros agudos, pero también tienen impacto sobre los estudios de prevalencia o cuando se necesita confirmar una infección ocurrida en el pasado (por ejemplo, en el síndrome congénito por ZIKV). Recientemente, hubo diversas experiencias en otros países con la introducción de una vacuna tetravalente para dengue, pero debido a la eficacia diferencial y los problemas de seguridad en individuos seronegativos, se planteó su uso restringido a personas con evidencia serológica de infección previa y a grupos de edad con mayor riesgo de enfermedad grave, generalmente entre los 9 y los 45 años[284]. Evidenciar en forma confiable una infección remota por DENV plantea un grado de dificultad que no debe subestimarse, tanto en muestras humanas como en animales. En el estudio realizado en primates no humanos en las provincias de Corrientes y Chaco, al evaluar el perfil de anticuerpos neutralizantes por PRNT₉₀ frente a DENV-1, DENV-3, SLEV, ZIKV, WNV, BSQV e ILHV se pudieron observar diferentes patrones inmunes: 19% monotípicos, 39% heterotípicos y 43% clasificados como indeterminados para la identificación viral según el criterio de interpretación empleado. En estudios de seroprevalencia, un patrón homotípico es el que permite identificar con mayor confianza el flavivirus causante de la infección. Cuando un espécimen presenta reactividad frente a más de un agente, surge incertidumbre al determinar si esa reactividad ha sido generada por epítopes comunes o por la ocurrencia efectiva de múltiples infecciones. Estudios experimentales en modelo equino y aviar dan cuenta de que no es tan frecuente el cruce serológico en las infecciones múltiples homólogas o heterólogas por flavivirus, con lo cual el criterio de identificar sólo como agente etiológico al que causa un mayor título, puede ocasionar una subestimación de la historia de exposición a flavivirus cuando se estudia una única muestra[280] [281]. Los datos serológicos en muestras humanas y animales que surgen de este trabajo de tesis alertan sobre las limitaciones y la rigurosidad que debe tenerse al interpretar resultados de pruebas de anticuerpo IgM e IgG en infecciones por DENV, particularmente si se hacen con reactivos para un único agente de esta familia viral. Esta situación se complejizará aún más cuando se avance en la disponibilidad de vacunas para DENV y además, se sume el requerimiento de diferenciación de potenciales efectos adversos post-vacunales vs la ocurrencia de infecciones silvestres.

La circulación de DENV se reconoció por laboratorio por primera vez en Argentina en 1997. Sin embargo, hasta la fecha se disponía de información parcial sobre la caracterización genética y la epidemiología molecular de las cepas del virus del dengue en Argentina. En este trabajo realizamos la caracterización del genotipo viral en 150 muestras positivas (87 DENV-1, 2 DENV-2, 45 DENV-3 y 16 DENV-4) en casos de dengue notificados en Argentina entre 2002 y 2021. Se determinó el genotipo para establecer la diversidad genética de las cepas circulantes y para intentar inferir su origen y asociaciones con cepas reconocidas en

otras regiones. Se ha identificado el genotipo asiático americano del DENV-2 en un viajero en 2018 y durante un brote autóctono en CABA en 2020, asociado a secuencias de Nicaragua, México y Guatemala. Por otro lado, mediante el método RSS-PCR se caracterizó el genotipo III del DENV-3 que ingresó en Argentina en 2003 y causó un brote en 2004. Posteriormente, por secuenciación, se caracterizó el mismo genotipo de DENV-3 en un brote autóctono en CABA en 2012 y dicha secuencia se asoció a cepas de Venezuela del 2007 y 2008. El serotipo DENV-1 ha generado el mayor impacto en la casuística del país y este estudio ha evidenciado la permanencia del genotipo V desde 2001 a 2018 con la extinción y aparición de nuevas variantes de los clados I y II: extinción del subclado Ia- PR detectado en 2000-2001; detección del subclado Ib-BR en 2002-2003 en NOA y posterior extinción; ingreso de una nueva variante, el subclado 1b-VE, causando los brotes de 2008, 2009 y 2010; ingreso en 2011 de variantes nuevas de este genotipo en el clado II y subclado 1b-VE, y a posterioridad el reconocimiento de brotes por DENV-1 en 2016 y 2017 con co-circulación de dos subclados diferentes (subclado Ib-VE y clado II). El DENV-4 fue detectado en 2010 a expensas del genotipo II asociado epidemiológicamente a Colombia y genéticamente con cepas circulantes en Colombia y Venezuela. Luego de varios años sin detección de DENV-4, vuelve a reconocerse el mismo genotipo en las secuencias recuperadas en 2013-2016, y 2020-2021 asociadas a cepas circulantes en Paraguay y Brasil. Se observa una mayor asociación de los virus circulantes con los países vecinos del Cono Sur y Bolivia cuando los brotes se han iniciado en las áreas limítrofes, mientras que los brotes que se han originado en provincias centrales parecen tener mayor influencia de los demás países de Latinoamérica. El monitoreo de la diversidad de genotipos de virus es crucial para comprender la aparición y propagación de brotes, aspectos que son vitales para desarrollar estrategias de prevención y tratamiento efectivas. Para un diagnóstico etiológico eficiente también es importante el monitoreo molecular de las cepas circulantes y asegurar que las herramientas moleculares que se están aplicando tienen la capacidad de detectar las variantes vigentes o proceder a adaptar los protocolos.

El patrón epidémico sostenido para el dengue en Argentina ha generado cierto interrogante sobre la posibilidad de que un nivel bajo de transmisión perdure en los meses de junio –noviembre y que el sistema de vigilancia no tuviera la suficiente sensibilidad para captarlo. Otro de los aspectos abordados en este trabajo, ha sido la investigación de la implicancia de las donaciones de sangre como una vía de transmisión de los DENV en dos provincias con diferentes antecedentes epidemiológicos. Esta investigación ha sido usada también como una estrategia para intensificar la vigilancia sobre la circulación viral en población asintomática y en un período sin notificación de casos. Entre los meses de septiembre de 2013 y mayo de 2014, se analizó la presencia de genoma viral en muestras de suero de 3357 donantes de sangre (52% Salta, 48 % Córdoba). En la provincia de Salta se detectó genoma de

virus DENV-4 en el suero de un donante asintomático procedente de la ciudad de Salvador Mazza, obteniéndose un 0,11 % de positividad para genoma de DENV considerando las donaciones estudiadas durante el transcurso del período con circulación autóctona reconocida por el sistema nacional de vigilancia (SE1-19 de 2014: 813 casos sospechosos de dengue). La cepa detectada en la localidad de Salvador Mazza agrupó con cepas correspondientes al genotipo II de DENV-4, el cual había circulado mayoritariamente en América luego de su introducción al continente en el año 1981. No se detectó genoma de los virus DENV en las muestras estudiadas procedentes de la provincia de Córdoba, si bien el sistema de vigilancia determinó actividad viral de baja magnitud entre las SE12-14 de 2014. Se obtuvieron evidencias locales, similares a las informadas por estudios en otros países, que alertan sobre el riesgo potencial de transmisión de dengue por hemoderivados principalmente en momentos epidémicos y no se detectó circulación viral en el período inter-epidémico estudiado.

Los cuatro serotipos de DENV se mantienen en dos ciclos de transmisión distintos: uno silvestre o selvático y otro urbano, con el hombre como reservorio[26]. El ciclo selvático es ecológica y evolutivamente distinto del ciclo de transmisión humano, tiene lugar en los entornos selváticos del sudeste asiático y África occidental en focos bien documentados en Malasia peninsular y el este de Senegal, respectivamente. Los análisis filogenéticos recientes han ampliado el rango espacio-temporal en el que se sabe que circulan DENV selváticos en África Occidental. En este ciclo, la transmisión está mediada por *Aedes spp.* y los primates no humanos parecen ser los únicos huéspedes amplificadores y reservorios[26]. No obstante, los DENV, ZIKV, CHIKV se han adaptado completamente a los ciclos urbanos y ya no requieren NHP, mosquitos forestales y un ciclo selvático para su mantenimiento. Sin embargo, los ciclos selváticos podrían tener importantes implicancias para las infecciones humanas. Ellos pueden actuar como refugio para los arbovirus y permitir la reemergencia una vez que las epidemias humanas han pasado y la inmunidad colectiva ha disminuido. Más aún, pueden proporcionar entornos selectivos donde pueden desarrollarse cepas de arbovirus con aumento (o disminución) de virulencia para las personas. Además, estas nuevas cepas podrían superar la inmunidad desarrollada en respuesta a las vacunas diseñadas para las cepas urbanas existentes[287]. Recientemente, otros autores han planteado que se está subestimando la transmisión del dengue de primates no humanos en los ciclos de los bosques tropicales (incluyendo a Sudamérica) y luego de investigar los cambios geográficos a gran escala en el riesgo de transmisión de dengue desde finales del siglo XX han planteado y tenido en cuenta el papel potencial que desempeñan la biogeografía de primates y los vectores silvestres en el aumento del riesgo de transmisión de enfermedades en el próximo período. Estos modelos sugieren que es probable que la transmisión del dengue se extienda a regiones donde actualmente no hay o hay muy pocos informes de ocurrencia [288].

En Argentina, la región del NEA y su capacidad demostrada de sostener ciclos selváticos para la fiebre amarilla[63][64] plantean la potencialidad de convertirse en nicho ecológico para circulación enzoótica de los DENV en la región. En esta tesis se ha estudiado la prevalencia de infección para DENV y otros flavivirus en aulladores negros de vida libre en Chaco y Corrientes para monitorear esta potencialidad de actividad viral en este ecosistema. Se han encontrado reacciones monotípicas para DENV-3 (0, 93%) y DENV-1 (0,93%) en zonas de interfase ambiente silvestre- rural. Los títulos obtenidos, en estos casos, fueron bajos, pero específicos ya que las muestras de suero se inactivaron previamente por calor. Estos serotipos de dengue fueron seleccionados porque son los que tuvieron confirmación de circulación previa en casos humanos de las provincias de Misiones, Corrientes y Chaco en el período 2000-2008, previo a este muestreo. Es interesante analizar que, además de los animales monotípicos, el 47% de los restantes animales fueron positivos a DENV-1 y el 53% a DENV-3 en el grupo de los etiquetados como indeterminados. El establecimiento de un ciclo selvático para DENV dificultaría el control de la patología en América Latina, por lo cual es relevante que este tipo de estudios tengan continuidad en el país.

El dengue y otras arbovirosis están aumentando las preocupaciones de salud pública a nivel mundial debido a su rápida propagación geográfica y aumento de la carga de morbilidad. El conocimiento de la distribución de los vectores, *Ae. aegypti* y *Ae. albopictus* permanece incompleto y se complica por una expansión continua impulsada por el aumento del comercio y los viajes a nivel mundial[23][269][270]. La distribución geográfica de *Aedes aegypti* en América del Sur se ha expandido durante las últimas décadas. Recientemente se han presentados dos nuevos registros de distribución que extienden su límite sur hacia localidades con condiciones ambientales más extremas. San Antonio Oeste, en Argentina, constituye el hallazgo más austral del continente (40°44'S), mientras que Tandil es la localidad infestada con la temperatura media anual más fría de nuestro país (14,17°C). Un modelo de distribución para *Ae. aegypti* predijo a esas dos ciudades como positivas y sugiere varias otras localidades con condiciones adecuadas para la proliferación de vectores, más allá de sus límites de distribución actuales. Estos hallazgos muestran la versatilidad del principal vector del dengue y la capacidad de adaptación a climas templados o con menores temperaturas[287], con el correspondiente impacto para la transmisión del dengue a futuro en Argentina.

Los datos y el conocimiento generado a partir de este trabajo de tesis fueron comunicados oportunamente a los actores del sistema de salud, contribuyeron a la estructuración del algoritmo de laboratorio propuesto desde el nivel central, fortalecieron la respuesta diagnóstica y aportaron a la consolidación del componente laboratorio en la EGI Argentina. Recientemente, como resultado de la integración de los resultados del laboratorio y la información epidemiológica, realizamos una estratificación del riesgo de dengue grave por

departamento con base en la información disponible para el período 1998-2018 [91]. El serotipo DENV-1 resultó predominante (95.3%), seguido del serotipo DENV-2 (3.6%), DENV-4 (0,8%) y por último DENV-3 (0,3%). En los últimos 5 años se registró circulación de DENV-1, DENV-4 y casos aislados de DENV-2. En los últimos 5 años de este período se concentró el 51% de los casos confirmados autóctonos (37.025/72.951) con una incidencia de 108 casos cada 100 mil habitantes (tomando en cuenta exclusivamente la población de los departamentos afectados en el período de los últimos 5 años). En los menores de 15 años la incidencia fue de 1.2 casos cada 1000 menores de 15 años en todo el período y de 0,9 casos cada 1000 menores de 15 años en los últimos 5 años, sin embargo, el porcentaje de casos de menores de 15 años presentó un incremento en los últimos 5 años. Resultaron afectados un total de 221 departamentos de 15 jurisdicciones en todo el período, 189 de los cuales registraron casos en los últimos 5 años, entre estos departamentos se observó una amplia dispersión de la incidencia acumulada. Se elaboraron 5 criterios de estratificación de riesgo: registro de casos autóctonos en al menos 2 de los 5 cinco últimos años, registro de 2 o más serotipos causantes del 10% o más de los casos cada uno, incidencia acumulada mayor a 500 casos por 100 mil habitantes, incidencia acumulada mayor a 5 casos por mil menores de 15 años y registro de casos graves o fallecidos. Se obtuvieron 60 departamentos a nivel país con 1 criterio, 19 con 2, 8 con 3, 4 con 4, 1 con 5 y 129 no cumplieron criterios. Solo 13 departamentos sumaron 3 criterios o más, resultado del predominio de DENV-1, la baja incidencia en menores de 15 años y el bajo número de casos graves y fatales. En este escenario complejo, la estratificación del riesgo poblacional realizada para la emergencia de formas graves de dengue basado en criterios epidemiológicos y base virológica, apunta a disponer de una herramienta de evaluación dinámica de los escenarios con el objetivo de orientar la planificación adecuada de medidas de prevención y asistenciales mediante un uso eficiente y efectivo de los recursos [91].

La tendencia al aumento de la incidencia, severidad y letalidad por dengue en la región y el correlato de aumento de la intensidad y dispersión de los casos en la Argentina, presentan un panorama complejo hacia el futuro, con crecientes porciones de la población expuestas a reinfecciones y el consecuente riesgo de aumentar el número de formas graves y fatales. En ese contexto, se requiere continuar los esfuerzos para el desarrollo de pruebas para el diagnóstico clínico temprano del individuo y que aporten al pronóstico para dar soporte al seguimiento clínico; el desarrollo de pruebas serológicas capaces de diferenciar dengue de otras infecciones por flavivirus e incluso para determinar el serotipo de dengue; establecer protocolos fáciles, económicos, aplicables a campo para caracterización y carga viral genómica; así como protocolos que simplifiquen la manipulación y transporte de muestras.

Específicamente, valorar la información disponible y continuar fortaleciendo la vigilancia laboratorial es indispensable para el establecimiento de las medidas más adecuadas para la prevención y el control de epidemias por DENV en Argentina.

ANEXOS

ANEXO 1

Aislamiento viral de DENV en la línea celular C6/36 HT e identificación por IFI

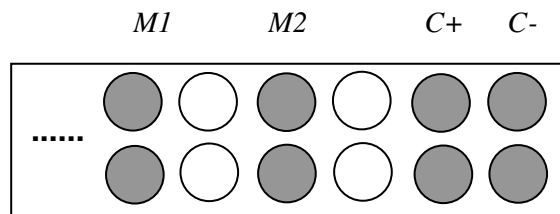
El método óptimo para determinar la etiología específica de una infección por arbovirus requiere el aislamiento del virus a partir de una muestra, de origen humano o animal, obtenido en fase aguda de la enfermedad en un huésped susceptible, en este caso, una línea celular derivada de mosquitos. Ciertos arbovirus producen una viremia de magnitud tal que los mismos pueden ser aislados de la muestra de suero aproximadamente entre el día 0 y 5 después del inicio de síntomas. Muchos arbovirus causantes de encefalitis pueden ser recuperados del líquido cefalorraquídeo (LCR) y del cerebro. Los aislamientos virales pueden ser realizados además a partir de muestras de biopsia o autopsia de órganos de pacientes o animales. También se puede intentar el aislamiento por esta metodología a partir de diversos artrópodos vectores de los agentes infecciosos.

BIOSEGURIDAD: El procedimiento fue realizado bajo condiciones de bioseguridad de laboratorio de nivel 2 y con el uso de elementos de protección personal, dado que ya se tenía conocimiento de que se trataba de muestras positivas para DENV.

1. Se sembraron células de la línea C6/36HT en botellas T25 y se incubaron en estufa de 34°C (para las C6/36) con 48 horas de anticipación al día de la inoculación, de tal manera que se forme la monocapa celular y el cultivo se encuentre en crecimiento exponencial.
2. El día de la inoculación se rotularon las botellas T25 y se preparó medio de mantenimiento (2% SFB) de acuerdo a las muestras a inocular. El fungizone se agregó en aquellos casos que no se confíe en las condiciones en que llegaron las muestras o se sospeche de contaminación micótica. Se tiene que observar al microscopio invertido un 80 % de cobertura de la monocapa celular. Se usó una botella de células sin inóculo para control negativo.
3. Se retiró el medio de cultivo y se le agregó 1 ml de medio de mantenimiento.
4. Se inocularon 30 ul de suero a cada botella o en el caso de suspensión de órganos o artrópodos, se agregan entre 200 y 350 ul del sobrenadante de la suspensión.
5. Se incubó por el lapso de 1 hora agitando las botellas cada 15 mins.
6. Se agregaron 7 ml de medio de mantenimiento.
7. Se incubaron las botellas por un lapso de 14 días.

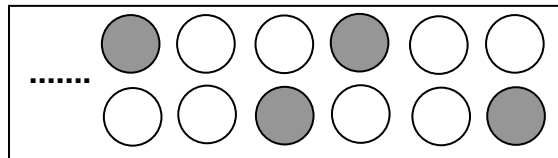
8. Al 7° día se le cambió el medio de mantenimiento. Se retira el medio anterior, y se le agrega 8 ml de medio fresco (2% SFB).
9. Se observaron al microscopio diariamente, tratando de observar la aparición de efecto citopático, en caso de sueros u órganos positivos y al constatar efecto citopático, dependiendo de su intensidad, se procedió a la cosecha de sobrenadante (detección genómica) y/o células (portas para inmunofluorescencia para DENV).
10. Cosecha de células para Inmunofluorescencia indirecta (IFI) para identificación de DENV e indirecta con anticuerpos monoclonales para determinación de serotipo de DENV. Se retiró el sobrenadante dejando sólo una pequeña cantidad de medio líquido y con una micropipeta con punta estéril se pipeteó varias veces para despegar las células de la botella. Luego se procedió a sembrar en el portaobjetos siguiendo el esquema que se grafica según el objetivo de la IFI y luego de que se secase, se procedió a fijar con Acetona en frío (5 mins)

Se realizó la preparación previa de los portas para inmunofluorescencia: se lavaron con detergente de Bernard y se enjuagaron varias veces con agua destilada y bidestilada. Se dejaron secar y se sumergieron en alcohol al 70% unos minutos y luego se dejaron secar evitando el contacto con las manos.



Esquema de siembra para IFI tamizado

M1 +Mab DENV-1 M1+ Mab DENV-2



M1+ Mab DENV-3 M1 +Mab DENV-4

Esquema de siembra para IFI para uso de Mabs DEN-1, 2, 3, 4

11. Procedimiento para la Inmunofluorescencia indirecta para tamizado de DENV:
 - Dejar secar los portas en el flujo laminar. (10-15 min).

- Poner 10 ul en cada well de suero o mix de suero de convaleciente de DENV en la dilución de trabajo chequeada previamente.
- Incubar 1/2 hora a 37°C.
- Lavar con 3 veces con PBS de ph 7.4, 5 minutos cada lavado.
- Secar en el flujo laminar.
- Agregar 10 ul del conjugado anti humano marcado con fluoresceína
- Incubar ½ hora a 37°C.
- Realizar 3 lavadoS con PBS 5 minutos cada lavado
- Poner el cubre objeto con buffer glicerol- veronal
- Leer al microscopio de fluorescencia.

12. Procedimiento para Inmunofluorescencia indirecta para identificación de serotipo DENV-1, 2, 3, 4.

- Secar 10-15 min. en flujo laminar los portas a estudiar y los controles, cada uno con células infectadas con DEN 1, 2, 3 y 4 respectivamente.
- Poner los Ac. Monoclonales específicos de cada serotipo en dilución de trabajo (Los anticuerpos monoclonales recibidos desde Atlanta son hidratados con 0,5 ml. de agua bidestilada estéril y luego alicuotados en viales con 50 ul que se conservan a –70°C. A cada vial puro se le agregan 450 ul de PBS para obtener la dilución de trabajo 1/10)
 - Control negativo: cada anticuerpo monoclonal deberá dar negativo en los portas correspondientes a los demás serotipos virales.
 - Control positivo: Cada anticuerpo monoclonal deberá dar positivo con el porta correspondiente al serotipo homólogo.
- Incubar 1/2 hora a 37°C.
- Lavar con PBS 2 veces, primero sumergir y tirar al PBS, luego lavar 10 min. con agitación. El último lavado se puede hacer sumergido en agua destilada (o no).
- Secar en el flujo laminar.
- Agregar el conjugado (1/75) Fluorescente goat anti-mouse en PBS (la dilución del conjugado se puede guardar a –70°C hasta 2 semanas).
- Incubar ½ hora a 37°C.
- Lavar con PBS 10 min. 1 vez.
- Poner el cubre objeto con glicerol. Leer al microscopio de fluorescencia.

ANEXO 2

1. PREPARACION DE SEMILLAS VIRALES PARA USO EN PRUEBAS DE NEUTRALIZACIÓN Y OBTENCIÓN DE ANTÍGENOS VIRALES PARA MAC-ELISA.

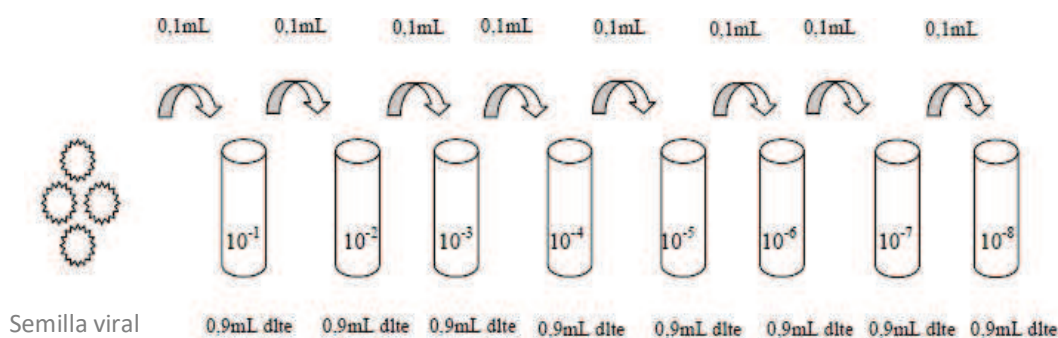
Todas las semillas virales fueron producidas en el Laboratorio del INEVH, utilizando buenas prácticas de laboratorio. Las semillas de los virus quiméricos WNV, SLEV y YFV fueron producidas en línea celular Vero C176, ZIKV en células BHK y las semillas de los DENV (4 serotipos) fueron producidas en cultivos de células de la línea C6/36 HT. Brevemente, las células fueron cultivadas con medio de crecimiento correspondiente (MC- Vero o MC-C6/36): MC-Vero EMEM (Gibco), 10 % de SFB inactivado (PAA Laboratories GmbH), 1% de P+S (10.000 unidades/ml penicilina- 10 m/ml estreptomicina en 0,9% de NaCl, Marca Sigma, USA) y 1 % de L-Glutamina (200 mM ICN-Biomecals INC. Ohio, USA); MC-C6/36 EMEM (Gibco) con 1g/litro de NaHCO₃, 10 % de SFB inactivado (PAA Laboratories GmbH), 1% de P+S (10.000 unidades/ml penicilina- 10 m/ml estreptomicina en 0,9% de NaCl, Marca Sigma, USA) y 1 % de L-Glutamina (200 mM ICN-Biomecals INC. Ohio, USA). El crecimiento celular se realizó en una estufa a 37°C con atmósfera de CO₂ al 4% para la línea celular Vero y BHK y 34 °C y en un ambiente sin atmósfera de CO₂ para la línea celular C6/36. Para llevar a cabo la infección se utilizaron cultivos al 80% de confluencia de la monocapa celular en frascos de 50 cm² de superficie (T75). Cuando los cultivos de 48 hs de edad mostraban aproximadamente un 80 % de confluencia de la monocapa celular fueron inoculados con las cepas correspondientes a un índice de multiplicidad de infección (MOI) de 0,1. Para la inoculación propiamente dicha: primeramente se descartó el MC de cada botella T75 y se añadió 1 ml de la dilución correspondiente de cada una de las cepas con medio de cultivo, pero en este caso el mismo contenía 2% de SFB (denominado medio de mantenimiento: MM). Como control negativo, una botella T75 fue inoculada con 1 ml de MM. El inóculo se dejó adsorber durante 1 hora (a 37 o 34 °C según la línea celular) con agitación cada 15 minutos, y una vez transcurrido este tiempo, se añadieron 15 ml de MM. Las células se incubaron en estufa a 37°C con CO₂ al 4% o 34 °C en ausencia de CO₂, observándose diariamente al microscopio para la detección de ECP, el cual se observó entre el 4to y 5to día post inoculación. En este momento se transfirieron los sobrenadantes de cada botella a un tubo de centrifuga de 50 ml con tapa el cual se centrifugó a 10.000 rpm a 4°C. Se retiró el sobrenadante pasándolo a un tubo nuevo y se agregó SFB para llevarlo al 20%. Luego de mezclar por vortex, se alicuotó, rotuló con el nombre y fecha correspondiente a cada semilla viral cosechada y se conservó a -86°C hasta su uso.

2. TITULACIÓN DE SEMILLAS VIRALES

Nota: antes de iniciar el trabajo, se debe constatar que los cultivos celulares estén en condiciones óptimas para trabajar (sin contaminación y con el grado de confluencia esperado de la monocapa)

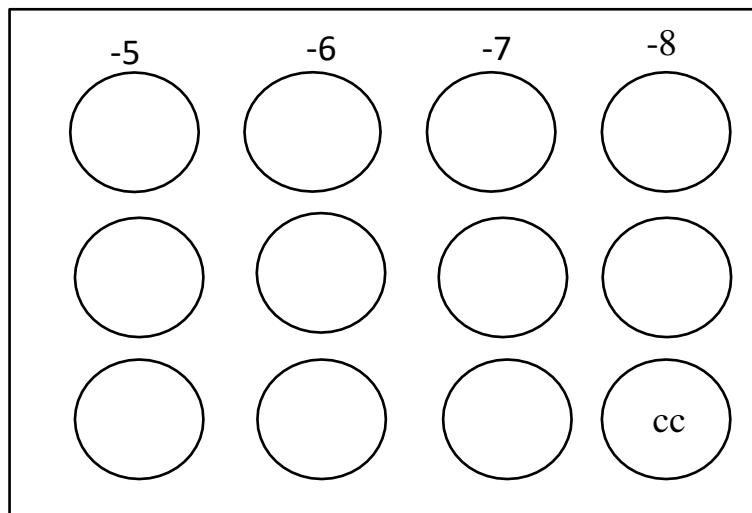
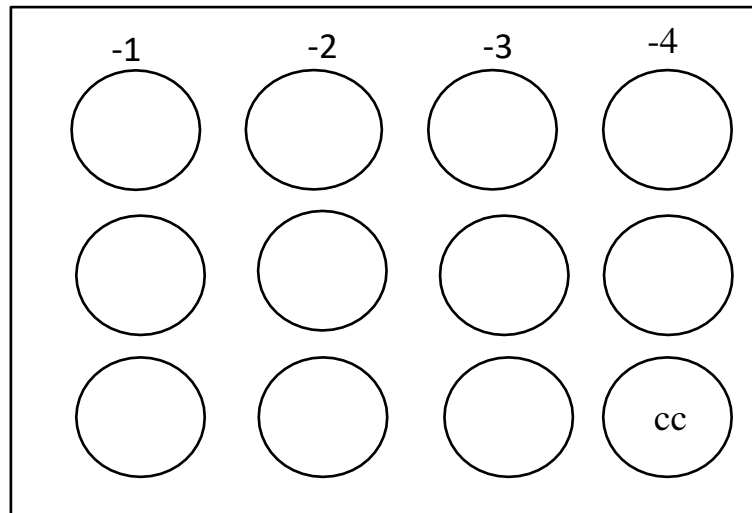
1. Preparar un grupo de tubos estériles con sus respectivos tapones, marcados dependiendo del título viral sospechado, desde 10^{-1} hasta 10^{-8}
2. Pipetear 0,9 ml. del diluyente de prueba en cada uno de los tubos. Mantener en hielo.
3. Transferir 0,1 ml (100 μ l) de la semilla viral al primer tubo con diluyente marcado como 10^{-1}
4. Mezclar vigorosamente con el vortex.
5. Transferir 0,1 ml (100 μ l) de la dilución de virus 10^{-1} al siguiente tubo (10^{-2}) y así sucesivamente

Diluyente de la prueba: Eagle Earle (EMEM) (Gibco) suplementado con 2 % de suero fetal bovino inactivado (SFB) (PAA Laboratories GmbH), 1% de penicilina y estreptomicina (P+S) (10.000 unidades/ml penicilina- 10 m/ml streptomicina en 0,9% de NaCl, Marca Sigma, USA).



Esquema de trabajo para la titulación de la semilla viral

6. Numerar las placas de cultivos celulares de acuerdo al esquema de trabajo planteado en la prueba. Un pocillo se reservará para control de células (CC). Descartar el medio de las mismas en una bandeja plástica y/o de acero inoxidable.



7. Inocular las placas de 12 pozos con 100 μ l de las diluciones preparadas. El orden de inoculación será comenzando desde la mayor dilución de la semilla viral. Envolver la placa en papel aluminio.
8. Incubar las placas a 37°C durante 60 minutos en ambiente de CO₂ para la adsorción del virus. Agitarlas placas suavemente cada 15 minutos.
9. Preparar el primer *overlay*. Proceder como se detalla en el punto 7 del Anexo 9.
10. Dejar solidificar e incubar a 37°C en ambiente de 4% de CO₂ durante 4 días para SLEV y WNV, y 5 días para los virus DENV-1 a 4 y YFV
11. Preparar segundo *overlay*. Proceder como se detalla ítem 9 del Anexo 9. Incubar las placas 24 hs a 37°C en ambiente de CO₂ y realizar el recuento de placas de lisis.
12. Cálculo del título de la semilla viral: Contar el número de UFP de virus en cada dilución de la titulación de la semilla viral en las dos últimas diluciones donde se pueda realizar un recuento

aceptable. Sacar promedio por dilución. Por ejemplo, si en la dilución 10^{-3} se obtuvo un promedio de 20 UFP y en la dilución 10^{-4} se obtuvo un promedio de 2 UFP

-Dilución 10^{-3} 100 ul ___ 20 UFP
 1000 ul...X= 200 UFP en dilución 10^{-3}

Título 1: $2 \cdot 10^5$ UFP/ml

-Dilución 10^{-4} 100 ul _____ 2 UFP
 1000 ul-----X = 20 UFP en dilución 10^{-4}

Título 2: $2 \cdot 10^5$ UFP/ml

Promedio UFP semilla viral (título 1 y 2): $\frac{2 \cdot 10^5 \text{ UFP/ml} + 2 \cdot 10^5 \text{ UFP/ml}}{2} = 2 \cdot 10^5 \text{ UFP/ml}$

ANEXO 3

PREPARACIÓN DE ANTIGENOS VIRALES PARA LA TÉCNICA DE MAC-ELISA

Bioseguridad: considerando el riesgo de manipulación de tejidos o cultivos con alta carga viral, los antígenos fueron producidos en el laboratorio de nivel 3 del NEVH (BSL 3). El trabajo fue realizado en gabinetes de seguridad biológica clase II, utilizando buenas prácticas de laboratorio.

1. Producción de antígenos de DENV-1, 2, 3, 4, SLEV y YFV en cerebro de ratón por método sacarosa-acetona: los antígenos se obtienen a partir de cerebros de ratones lactantes para evitar la presencia de un mayor contenido lipídico. Para evitar reacciones no específicas y anti complementariedad se emplea una extracción con solvente lipídico a partir de cerebro de ratones lactantes inoculados con semillas virales.

Se extrajeron los cerebros de los animales, previamente inoculados e infectados vía intracerebral. Se procedió a pesarlos y con los mismos se realizó un homogenato con mortero. Posteriormente se agregaron 4 ml de solución de sacarosa por cada gramo de material y se continuó con la homogenización. Todo el procedimiento se realizó sobre baño de hielo. La suspensión se cargó en una jeringa con aguja y luego se vertió en forma de lluvia sobre acetona fría cuyo volumen fue 20 veces el volumen de la suspensión, contenida en un erlenmeyer con tapa a rosca. Se procedió a agitar enérgicamente y se colocó en un baño de hielo durante 5 minutos como mínimo. Sin centrifugar, se decantó suavemente por inversión la acetona y se volvió a agregar inmediatamente una segunda porción de acetona fría en volumen igual al anterior. Posteriormente, se empleó una varilla de vidrio para ayudar a disgregar completamente el precipitado y se agitó enérgicamente antes de dejarlo en baño de hielo por 1 hora. Transcurrido el tiempo y sin centrifugar se decantó la acetona suavemente, nuevamente por inversión. La acetona se descartó sobre una solución de hipoclorito de sodio descontaminante. El precipitado, se secó en bomba de vacío, inclinado en un ángulo de 45 ° durante una hora, siempre en baño de hielo. La rehidratación se hace con solución fisiológica en volumen doble al peso inicial de cerebro manteniendo el recipiente en el ángulo de 45 ° y en baño de hielo. Se lo dejó toda la noche a 4° en la heladera. Al día siguiente se centrifugó por 30 minutos a 3000 rpm y a 4° C. El sobrenadante obtenido (antígeno) se fraccionó, rotuló y conservó a -86°C hasta su uso.

2. Preparación de antígeno de los virus WNV y ZIKV en líneas celulares: Consistió en la obtención de una suspensión de células y sobrenadante [*Slurry*] de un cultivo celular previamente

infectado con una dosis adecuada del arbovirus. El lisado es realizado en el momento de máxima replicación viral y adecuadamente tratado para su posterior utilización como antígeno para la detección de anticuerpos específicos IgM en pruebas de ELISA de captura.

El antígeno de WNV fue obtenido en la línea celular C6/36HT, línea derivada de larvas del mosquito de la especie *Ae. albopictus* adaptada a crecer a 34°C (INEVH-ANLIS). Las células fueron cultivadas con medio de crecimiento (MC-C6/36) conformado por: EMEM (Gibco) con 1g/litro de NaHCO₃, 10 % de SFB inactivado (PAA Laboratories GmbH), 1% de P+S (10.000 unidades/ml penicilina- 10 m/ml estreptomicina en 0,9% de NaCl, Marca Sigma, USA) y 1 % de L-Glutamina (200 mM ICN-Biomecals INC. Ohio, USA). El crecimiento celular se realizó en una estufa a 34 °C y en un ambiente sin atmósfera de CO₂.

El antígeno de ZIKV fue obtenido en forma silimilar en cultivos BHK cubriendo sus requerimientos nutricionales. Esta línea fue seleccionada en base a una mayor recuperación de carga viral en relación a la línea Vero C76 y C6/36HT

Para llevar a cabo la infección se utilizaron cultivos al 80 % de confluencia de la monocapa celular en frascos de 75 cm² de superficie (T₁₅₀). Cuando los cultivos de 48 hs de edad mostraban aproximadamente un 80 % de confluencia de la monocapa celular fueron inoculados con un índice de multiplicidad de infección (MOI) de aprox. 0,1. Para la inoculación propiamente dicha: primeramente se descartó el MC de cada botella T₁₅₀ y se añadieron 2 ml de la dilución correspondiente de las cepas virales con medio de cultivo, pero en este caso el mismo contenía 5% de SFB (denominado medio de mantenimiento: MM). Como control negativo, una botella T₁₅₀ fue inoculada con 2 ml de MM. El inóculo se dejó adsorber durante 1 hora a 34 °C con agitación cada 15 minutos, y una vez transcurrido este tiempo, se añadieron 35 ml de MM. Las células se incubaron en estufa a 34 °C en ausencia de CO₂, durante 7 días, observándose diariamente al microscopio para la detección de ECP, el cual se observó entre el 4^{to} y 5^{to} día post inoculación.

Preparación del “Slurry”:

Al momento en que se observó un efecto ECP en aproximadamente el 70 % de la monocapa se congelaron las botellas a - 86 °C.

Se realizó 1 ciclo de congelamiento-descongelamiento colocando las botellas en el freezer de - 86°C durante al menos 4 horas. Transcurrido este tiempo se procedió a descongelar en baño de hielo hasta descongelamiento total. Se transfirieron las células y el sobrenadante (*Slurry*) a tubos plásticos estériles de 50 ml. Todo el procedimiento fue realizado en hielo. Posteriormente se realizó sonicación mediante pulsos de 30 segundos, con intervalos de 10 segundos, durante un tiempo total de 3 minutos con el *probe* de 13 mm (1/2 “).

ANEXO 4

MAC-ELISA DENGUE Y OTROS FLAVIVIRUS

4.1. Protocolo original para DENV (inicialmente desarrollado por Burke, D.S. y descripta por Kuno y col., 1987)

1. Preparación de la placa

Se lavó la placa 3 veces con PBS y se secó golpeando sobre papel de filtro. Se utilizaron placas de 96 pocillos (Dynatech Inmulon-2, Laboratorios Dinotech, USA). No se utilizaron los pocillos del borde de la placa (B)

2. Sensibilización de la placa

Para la sensibilización de la misma se preparó una dilución 1/200 en buffer carbonato 0,1 M de pH 9,6 del anticuerpo de captura anti-IgM (Goat anti-human IgM, Laboratorios Kirkegaard and Perry, USA) y se agregaron 100 µl del mismo a cada pocillo. Posteriormente se incubó a 4 °C en cámara húmeda toda la noche. Al día siguiente la placa se lavó 3 veces con PBS previo al proceso de bloqueo.

3. Bloqueo

Para el bloqueo, se llenaron los pocillos con albúmina bovina al 4 % en PBS y se llevó a la estufa de 37 °C durante 15 min, transcurrido ese tiempo se realizaron 2 lavados con PBS.

4. Muestras

- Sueros: se prepararon diluciones 1/40 en PBS con 0,5 % de albúmina.
- LCR: se utilizaron puros o cuando el volumen fue escaso se realizó una dilución 1/5 con el mismo diluyente usado para los sueros (PBS con 0,5% de albúmina).
- Controles positivo y negativo: se realizó dilución 1/40 del mismo modo y con el mismo diluyente utilizado para los sueros

Se agregaron 50 µl de suero o LCR a cada pocillo correspondiente por duplicado (M), al igual que el control positivo (P). El control negativo (N) se agregó por triplicado. Luego se incubó la placa por 2 horas a temperatura ambiente. Transcurrido ese tiempo se lavó 5 veces con PBS antes del agregado del antígeno viral correspondiente.

A continuación se muestra una representación esquemática de siembra de muestra y controles en la placa de ELISA.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
B	B	M1	M1	M2	M2	M3	M3	M4	M4	M5	M5	B
C	B	M6	M6	M7	M7	M8	M8	M9	M9	M10	M10	B
D	B	M11	M11	M12	M12	M13	M13	M14	M14	M15	M15	B
E	B	M16	M16	M17	M17	M18	M18	M19	M19	M20	M20	B
F	B	M21	M21	M22	M22	M23	M23	M24	M24	M25	M25	B
G	B	M26	M26	M27	M27		P	P	N	N	N	B
H	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B

M=muestra de suero o LCR, P=control positivo, N=control negativo

5. Antígeno viral

El antígeno viral, cuya preparación se describe en el Anexo 3, se diluyó en PBS con un 20 % de suero humano normal (SHN). En el Anexo 4 se describe la preparación de SHN. Se agregó el antígeno a la dilución apropiada (WNV= puro), la cual fue determinada previamente y se describe en el Anexo 5, a los pocillos según el esquema de la prueba. Luego esta placa se incubó toda la noche a 4 °C y al día siguiente la placa se lavó 5 veces con PBS.

6. Conjugado

Se agregó el conjugado 6B6C-1 a la óptima dilución determinada por titulación en box contra el antígeno (Anexo 5) (1/6000). El conjugado se diluyó en PBS con un 20% de SHN y se agregaron 25 µl de esta dilución por pocillo. Luego se incubó por 1 hora a 37 °C y posteriormente se lavó la placa 7 veces con PBS.

7. Sustrato

Como reactivo revelador de la prueba se utilizó el sustrato ABTS-peroxidasa (sulfonato de azinodietilbenzotiazolina de Laboratorios Kirkegaard y Perry, USA). Se agregaron 100 µl de sustrato ABTS (A+B) 1:1 a cada pocillo y se incubó 15 min a 37 °C. Se procedió a la lectura de la placa a 405-410 nm. El desarrollo de color se continuó a temperatura ambiente hasta que el control positivo alcanzó una DO de al menos 1.00, después de restarle la DO del control negativo. Para leer los resultados, el lector de placas

de ELISA debe ser llevado a cero con el control negativo. Se consideran positivos valores de densidades ópticas que sean 0,2 o mayores. Este valor de corte de 0,2 es un valor conservador que contempla más falsos negativos que falsos positivos. El 0,2 como punto de corte del MAC-ELISA fue determinado arbitrariamente (protocolo del CDC), comparándolo con el test de Inhibición de la Hemoaglutinación como patrón, lo cual dio como resultado una sensibilidad del MAC-ELISA del 90-97%. Se puede calcular alternativamente este punto de corte con las desviaciones standard de una batería de sueros negativos; un valor de 2 o 3 desviaciones standard sobre la media ha sido utilizado empíricamente por otros investigadores. Como la máquina se lleva a cero contra el aire, se sustrajo la lectura del control negativo a cada valor de lectura de las muestras.

4.2. EXTRACCIÓN ACETÓNICA DE SUERO HUMANO NORMAL (SHN), REACTIVO UTILIZADO PARA DILUIR LOS ANTÍGENOS Y EL CONJUGADO.

Este procedimiento fue desarrollado por Donald Burke y Walter Reed del Army Institute of Research, Washington D. C. (protocolo del CDC desarrollado por Burke y Reed)

Los especímenes de suero humano a usar se probaron por MAC-ELISA para distintos flavivirus (DENV, SLEV, WNV, YFV, ZIKV) para chequear que no existan anticuerpos para flavivirus presentes en los mismos y se hizo un pool con los negativos.

A 10 ml de suero o plasma a ser extraído se agregaron 500 ml de acetona y se lo sometió a agitación magnética a temperatura ambiente durante 15 min. Se dejó el recipiente toda la noche inclinado para que las proteínas del suero precipiten. Al día siguiente se decantó el sobrenadante y se repitió el paso de agregado de acetona, agitación, precipitación de proteínas y descarte del sobrenadante. Finalmente se dejó evaporar la acetona remanente a 37 °C en estufa y las proteínas extraídas se rehidrataron con PBS (2 veces el volumen original de plasma) a temperatura ambiente en agitador orbital. Por último se realizó clarificación por centrifugación (1000 rpm- 10 min). El producto fue alicuotado y conservado a -20 °C hasta su uso. Esta concentración se consideró el 100% de SHN para las diluciones sucesivas.

ANEXO 5

TITULACIÓN EN BOX DEL ANTÍGENO Y CONJUGADO

Los pasos iniciales de preparación de la placa, sensibilización y bloqueo, son los mismos a los descritos en Anexo 4.

1. Muestras de suero

Inicialmente, se utilizaron los sueros controles positivos y negativos para WNV provistos por CDC Fort Collins para estandarizar la prueba de MAC-ELISA WNV. Los sueros controles se diluyeron 1/40 en PBS con 0,5 % de albúmina bovina. Se agregaron 50 μ l a los pocillos situados en las columnas 2 a 4 y en las filas B a F, para el suero control positivo y en las columnas 6 a 8 y filas B a F, para el suero control negativo (ver esquema de inoculación). Luego se incubó 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente la placa se lavó 5 veces con PBS.

2. Antígeno

Se realizaron diluciones seriadas de los antígenos en PBS con un 20 % de SHN extraído con acetona (desde puro a 1/16 para WNV, factor de dilución 2 y se agregaron 50 μ l de cada dilución del antígeno a cada una de las 5 filas correspondientes donde se incubaron los sueros positivo y negativo (ver esquema de inoculación). Se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente la placa se lavó 5 veces con PBS.

3. Conjugado

Se realizaron diluciones factor 2 en forma seriada desde 1/3.000 hasta 1/12.000 del conjugado 6B6C-1 en PBS con un 20 % de SHN extraído con acetona. Cada dilución de conjugado se agregó a la columna correspondiente (25 μ l) (ver esquema de inoculación). Al finalizar ésta operación se realizó una incubación a 37°C por 1 hora. Luego se lavó la placa 7 veces con PBS.

4. Sustrato igual a lo descrito en el anexo 1

Las diluciones óptimas se determinaron haciendo un balance entre la DO del control positivo >1 y el negativo $< 0,2$ para cada antígeno en la prueba de MAC-ELISA.

Según nuestros resultados, la dilución óptima del conjugado fue de 1/6000 y la del antígeno para el mix de antígenos de DENV fue 1/20.

Esquema de inoculación

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Ag	Control positivo				Control negative							
B	Puro												
C	½												
D	1/10												
E	1/20												
F	1/40												
G	Conj.	3000	6000	12000		3000	6000	12000					
H													

ANEXO 6

PROTOCOLO MAC-ELISA ESTANDARIZADO PARA DENGUE Y OTROS ARBOVIRUS

- 1) **Preparación de las placas**
 - a. Rotular una placa de 96 pozos según el esquema adjunto al final del presente documento. No utilizar los pozos externos.
 - b. Realizar la dilución apropiada del anti- IgM humano en buffer carbonato/ bicarbonato pH 9.6. La dilución se ajusta según lote de antígeno en uso. Cubrir los pocillos de la placa con 75 ul por pocillo de anti-IgM humana.
 - c. Incubar a 4°C toda la noche Las placas deberán ser mantenidas en una cámara húmeda durante todos los períodos de incubación. Para este propósito puede ser utilizado un recipiente conteniendo un papel de filtro humedecido y cerrada con papel aluminio o tapa adecuada.
 - d. Remover el líquido y secar con papel absorbente. Cabe aclarar que no es necesario el lavado de la placa en este paso, sino se invierte la placa para eluir el líquido.
- 2) Bloquear la placa con 150 ul de solución de bloqueo e **incubar 30 minutos a temperatura ambiente.**
- 3) **Dilución de muestras**
 - 3.a Preparar las gradillas con los microtubos y realizar una dilución 1:40 de los sueros de las especies a estudiar y de los sueros controles positivo y negativo con el diluyente de muestras del punto 5.2.3 , y a partir de ésta , realizar una dilución 1:10 para llegar a la dilución final 1:400 requerida en la prueba. En caso que se requiera sembrar un mismo control positivo y negativo para más de una placa y no alcanza el volumen preparado en los microtubos, se sugiere preparar un volumen mayor en otro tubo contenedor y sembrar a partir de esa preparación todas las placas para disminuir variaciones.
 - 3.b. Utilizando un marcador permanente de punta fina, numere y etiquete la placa, identifique la localización de cada muestra clínica utilizando el código apropiado del laboratorio. **A fin de conservar los tiempos de incubación los reactivos deberán ser adicionados (durante todo el procedimiento) siguiendo el orden en que fueron numeradas las muestras.**
 - 3.c. Lavar los pocillos **5 veces** con la solución de lavado del punto 5.2.1 y secar golpeando dentro del GBS, sobre papel de filtro. El lavador de placa se mantiene en todo momento dentro GSB ya que se considera una fuente potencial generadora de aerosoles.

- 3.d Agregar **50 ul** por pocillo de la dilución 1:400 de las muestras a estudiar, por duplicado para ser enfrentadas al Ag positivo y se siembra un solo pozo para el Ag normal. Agregar **50 ul** por pocillo del control positivo y negativo según el esquema de la placa **Incubar las placas por 1 horas a 37 °C.**
4. Lavar **5 veces** con la solución de lavado del punto 5.2.1 como se indicó anteriormente y secar golpeando dentro del GSB, sobre papel de filtro.
5. Preparación de la dilución del antígeno del flavivirus en estudio y su antígeno Normal, agregando **50 ul** por well y luego incubación a 4°C toda la noche.
6. Lavar **5 veces** con la solución de lavado del punto 5.2.1 como se indicó anteriormente y secar golpeando dentro del GSB, sobre papel de filtro.
7. Preparación del conjugado: diluir el conjugado anti mouse marcado con peroxidasa con buffer bloqueador según se indicó en 5.2.3., en la dilución óptima de trabajo determinada previamente para el lote empleado. Agregar **50 ul** a cada pocillo de la dilución del conjugado e **incubar por 1 hora a 37 °C.**
8. Lavar 10 veces la placa. Se sugiere lavar 5 veces, rotar la placa 180° y repetir 5 lavados con la solución de lavado del punto 5.2.1. Secar golpeando dentro del flujo laminar, sobre papel de filtro.
9. **Agregar 75 ul de sustrato Sure Blue TMB sin diluir a cada pocillo.** Inmediatamente cubrir las placas de la luz. **Incubar 10 min a temperatura ambiente.** **Luego agregar la solución de STOP, 50 ul por pozo.**
10. **Lectura:** La lectura se realiza con espectrofotómetro para medir la absorbancia de cada pocillo con filtro de longitud de onda: 450 nm. **Se realiza una única lectura una vez agregada la solución stop.**

Validación de la prueba: Para obtener los resultados se aplica la fórmula:

(P) Promedio DO del suero control positivo con el antígeno positivo del flavivirus

(N) Promedio DO del suero control negativo con el antígeno positivo del flavivirus

Si el valor de P/N del suero control positivo es ≥ 2 la prueba es válida.

Si el valor es menor a 2 la prueba debe repetirse.

El valor óptimo de P/N del control positivo debe ser aproximadamente 5.

La misma fórmula se aplica a los sueros de la prueba para obtener los resultados

(P) Promedio DO del suero de paciente con el antígeno positivo del flavivirus

(N) Promedio DO del suero control negativo con el antígeno positivo del flavivirus

Los resultados de sueros que tengan un P/N entre 2 y 3 se considerarán indeterminados, menor a 2 es un resultado negativo.

Los resultados de sueros que tengan un P/N mayor a 3 se considerarán positivos.

Todos los resultados positivos deben ser revisados contra el antígeno normal de acuerdo a la siguiente fórmula:

(P) Promedio DO del suero del paciente con el antígeno del flavivirus

(N) DO del suero del paciente en el antígeno normal

Si el valor de P/N es menor a 2 la reacción tuvo ruido o background y el resultado se considera inespecífico.

Esquema de siembra en la placa de ELISA:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		M1 Ag +	M2 Ag +	M3 Ag +	M4 Ag +	M5 Ag +	M6 Ag +	M7 Ag +	M8 Ag +	M9 Ag +	M10 Ag +	
C		M1 Ag +	M2 Ag +	M3 Ag +	M4 Ag +	M5 Ag +	M6 Ag +	M7 Ag +	M8 Ag +	M9 Ag +	M10 Ag +	
D		M1 Ag -	M2 Ag -	M3 Ag -	M4 Ag -	M5 Ag -	M6 Ag -	M7 Ag -	M8 Ag -	M9 Ag -	M10 Ag -	
E		N1 Ag +	N2 Ag +	P Ag +	M11 Ag +	M12 Ag +	M13 Ag +	M14 Ag +	M15 Ag +	M16 Ag +	M17 Ag +	
F		N1 Ag +	N2 Ag +	P Ag +	M11 Ag +	M12 Ag +	M13 Ag +	M14 Ag +	M15 Ag +	M16 Ag +	M17 Ag +	
G		N1 Ag -	N2 Ag -	P Ag -	M11 Ag -	M12 Ag -	M13 Ag -	M14 Ag -	M15 Ag -	M16 Ag -	M17 Ag +	
H												

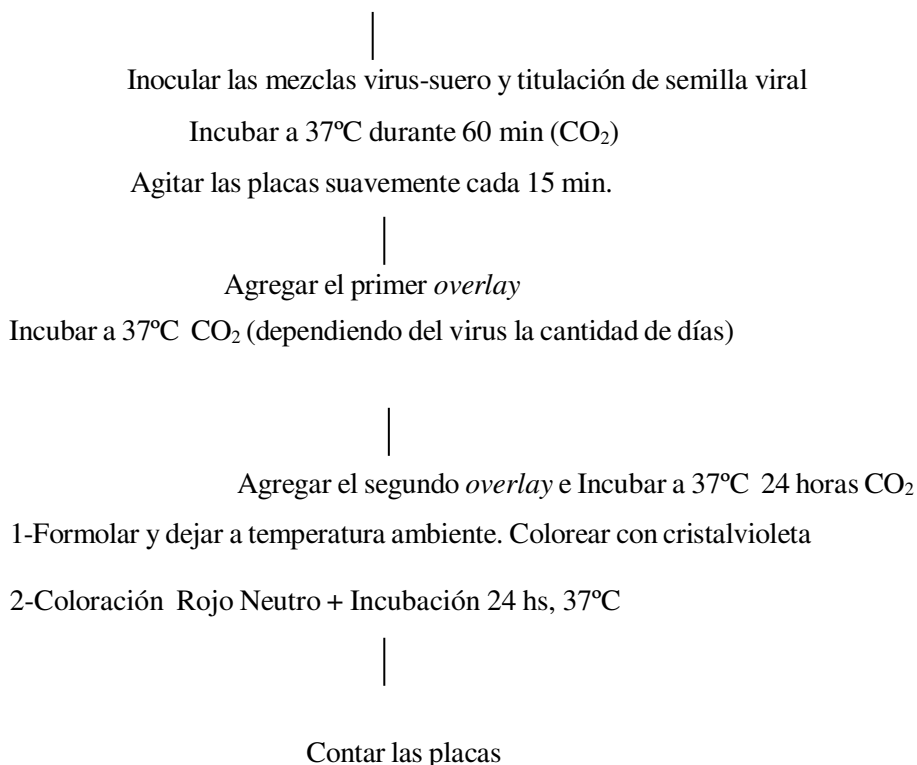
ANEXO 7

TÉCNICA DE NEUTRALIZACIÓN POR REDUCCIÓN DEL NÚMERO DE PLACAS EN CULTIVOS CELULARES (PRNT)

BIOSEGURIDAD: El trabajo se realizó en gabinete de seguridad clase II, utilizando buenas prácticas de laboratorio. Se realizaron en laboratorio de nivel BSL2 ya que se utilizaron cepas atenuadas para SLEV y WNV (cepas quiméricas Acambis) y YF (cepa vacunal) y los demás agentes de la familia incluidos en éste estudio (DENV-1 a 4) son clasificados como de nivel II de riesgo.

Diagrama de flujo del procedimiento

Diluir los sueros en diluyente de la prueba en placa estéril. Agregar dilución de semilla viral. Preparar la titulación de semilla viral. Neutralizar (Incubar a 37°C durante 60 min)



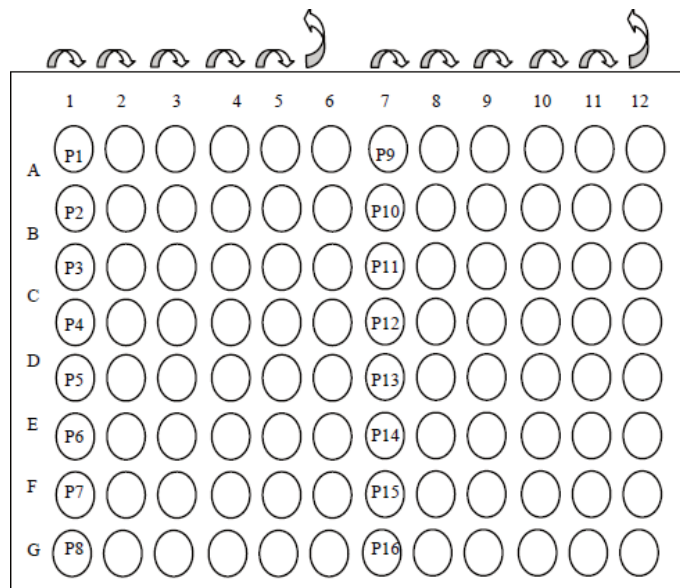
1. Diluciones de suero:

El diluyente de la prueba (DP) consistió en: medio esencial mínimo de Eagle Earle (EMEM) (Gibco) suplementado con 2 % de suero fetal bovino inactivado (SFB) (PAA Laboratories GmbH), 1% de penicilina y streptomomicina (P+S) (10.000 unidades/ml penicilina-10 m/ml streptomomicina en 0,9% de NaCl, Marca Sigma, USA). Los sueros que se comenzaron a estudiar desde dilución 1/20 (primera muestra en los pares serológicos o muestras únicas), se

comienza con dilución 1:10. Agregar 135 µl de DP a las columna 1. Luego agregar 75 µl de DP a las columnas restantes (2 a 5). Agregar 15 µl de suero a las columna 1 y correr 75 µl hasta las filas 6. Esta dilución de 1/10 se transformará en 1/20 al agregar igual volumen de virus a cada pozo (P1 a P8).

Los sueros que se comenzaron a estudiar desde dilución 1/40 (segunda muestra de suero), se comenzó con una dilución 1:20. Agregar 142.5 µl de DP a las columna 7. Luego agregar 75 µl de DP a las columnas restantes (8 a 12). Agregar 7.5 µl de suero a la columnas 7 y correr 75 µl hasta las filas 12. Esta dilución de 1/20 se transformará en 1/40 al agregar igual volumen de virus a cada pozo (P9 a P16)

Esquema de la placa y preparación de diluciones del suero



Utilizar pipetas multicanal para realizar las diluciones. Correr el volumen calculado evitando formar burbujas. En la última dilución, luego de mezclar, descartar un volumen igual al agregado, de modo que todos los pozos queden con igual volumen final (75 µl).

Cada suero se enfrentó con cada uno de los 7 agentes incluidos en la técnica de PRNT en éste estudio (DENV-1 a 4, SLEV, WNV, YFV).

2. Dilución de semilla viral:

Preparar una dilución de la semilla viral de modo que el volumen de mezcla suero-virus que se inocula en cada pozo de la placa de cultivo celular, aporte un número adecuado de UFP (en general, se recomienda trabajar con 60-100 UFP, valores que se ajustan de acuerdo a los tamaños de placa de lisis producido por el virus y el tipo de placa que se seleccione para usar).

Por ejemplo: se agregan 75 µl de la dilución de la semilla viral a 75 µl de la dilución de suero, pero luego se inocula en cada pozo 100 µl de la mezcla. Si se deseara contar

con 80 UFP en el pozo y la semilla viral de partida tuviera un título de $1,6 \cdot 10^7$ UFP/ml, deberían realizarse los siguientes cálculos:

100 μ l Mezcla virus-suero-----80 UFP

150 μ l Mezcla (75 μ l dil. virus + 75 μ l dil. Suero)-----x= 150. 80 /100 = 120 UFP

120 UFP (fueron aportadas sólo por la dil. Viral) o $1,2 \cdot 10^2$, 75 μ l de dil virus Semilla.

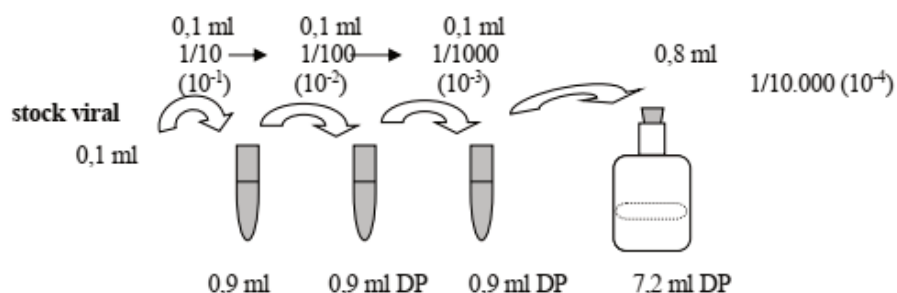
1000 μ l----- $1,6 \cdot 10^7$ UFP

75 μ l----- $1,2 \cdot 10^6$ UFP

Cálculo de la dilución de la semilla viral = $1,2 \cdot 10^6$ UFP/ $1,2 \cdot 10^2 = 1 \cdot 10^4$

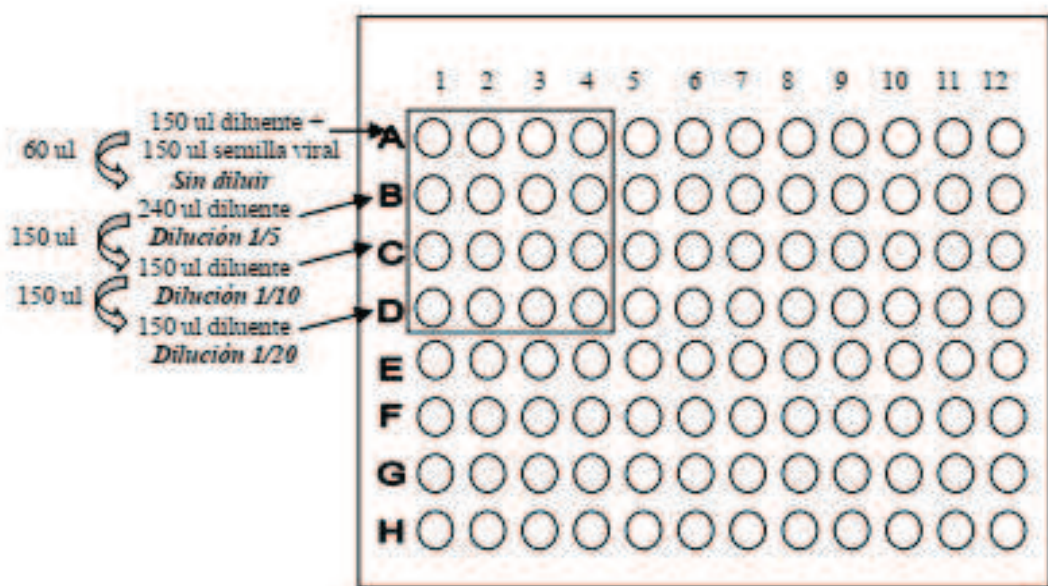
Esto significa que debería realizarse una dilución 1/10.000 de la semilla original.

Para calcular el volumen de semilla viral necesario para la prueba, siguiendo con el ejemplo anterior el cálculo será: Volumen de dilución= 75 μ l x 96 pozos= 7200 μ l (se prepara con un pequeño exceso, por ejemplo 8000 μ l)



3. Titulación simultánea de virus:

Se deben preparar diluciones de la dilución de trabajo de la semilla viral, de modo poder evaluar el número de UFP efectivamente presentes en la prueba. Inicialmente se debe realizar una dilución al $\frac{1}{2}$ de modo que refleje la situación de la mezcla suero-virus y a partir de esa se realizan las diluciones siguientes. Trabajando con un 90 % de neutralización se recomiendan las diluciones 1/5, 1/10 y 1/20. Utilizar pipetas multicanal para realizar las diluciones. Correr el volumen calculado evitando formar burbujas.



4. Incubar la placa de 96 pozos con la mezcla virus-suero y la titulación de los virus a 37°C durante 60 minutos. Envolver la placa en papel aluminio
5. Numerar las placas de cultivos celulares de acuerdo al esquema de trabajo planteado en la prueba. Descartar el medio de las mismas en una bandeja plástica y/o de acero inoxidable.
6. Inocular las placas de 12 pozos con 100 µl de la mezcla virus-suero y la titulación de los virus. El orde de inoculación en una muestra será comenzando desde la menor dilución de suero. La titulación de las UFP de la prueba se realiza por duplicado y en este caso se inoculará comenzando por la mayor dilución. Envolver la placa en papel aluminio.
7. Incubar las placaas a 37°C durante 60 minutos en ambiente de CO₂ para la adsorción del virus. Agitar las placas suavemente cada 15 minutos.
8. Primer *overlay*: 40 % de solución de agarosa al 1%, 60% medio de plaqueo + 1%P-S + 1%L-Glutamina. Fundir la mezcla de agar al 1% unos minutos en horno microondas. Mezclar con el resto de los reactivos necesarios. Enfriar toda la mezcla hasta alcanzar una temperatura de aproximadamente 40°C. La temperatura óptima debe ser aquella que no dañe el cultivo celular pero tampoco debe ser demasiado baja para evitar que se solidifique durante la manipulación. La forma de agregar esta mezcla debe ser suave y con un ángulo aproximado de 45° de modo de no despegar la monocapa celular. Se agregaron 2 ml por cada pozo.
9. Dejar solidificar e incubar a 37°C en ambiente de CO₂ al 4% durante un período que dependerá del virus

Virus	Días de incubación
DENV-1, 2, 3, 4	5
WNV	4
SLEV	4
YFV	5
ZIKV	5

10. Transcurrido los días indicados anteriormente, se preparó el segundo *overlay*.

Solución para segundo *overlay*: partes iguales de solución de agarosa al 1% y PBS pH 7.4 + colorante Rojo Neutro al 2.2%

11. Incubar las placas 24 hs a 37°C en ambiente de CO₂ y realizar el recuento de placas de lisis. La temperatura y el modo de agregar la mezcla en este caso no es tan crítico debido a que el cultivo celular se halla protegido por el primer *overlay*. Se agregó 1 ml del segundo *overlay* por pozo.

12. Al día siguiente se procedió a retirar el líquido directamente por inversión de la placa sobre una bandeja de descarte a la cual se le agregó Hipoclorito de Sodio de manera de contar con una concentración desinfectante de 10.000 ppm. El transiluminador que se utiliza para la lectura se ubicó en el Gabinete de Seguridad Biológica

13. CÁLCULOS

Para el cálculo de las UFP reales empleadas en el test, se contaron el número de UFP de virus en cada dilución de la titulación de virus. Se sacan los promedios por dilución y se multiplicó por el factor de dilución para obtener el número real de UFP en las condiciones del test. Por ejemplo, si en la dilución 1:5 de la titulación de virus se obtuvo un promedio de 20 placas, el recuento sería igual a: 5 [factor de dilución] x 20 = 100 placas. Esto es el 100%. Para un test de reducción del 90% de la UFP,

$$\begin{array}{r}
 100\% \text{ inhibición} \underline{\hspace{10em}} 100 \text{ placas} \\
 90\% \text{ inhibición} \underline{\hspace{10em}} x = 90 \text{ placas}
 \end{array}$$

$$100 - 90 = 10 \text{ placas}$$

Se considerarán positivas (o sea que inhiben más del 90%) todas las diluciones en las que el recuento de placas sea menor de 10 placas.

Título neutralizante del suero: Se calcula considerando la máxima dilución del mismo que neutraliza el 90% o más de las UFP. En este ejemplo sería la máxima dilución del suero en que se cuentan menos de 10 placas. El título se expresa como la inversa de la dilución.

ANEXO 8

PRIMERS UTILIZADO PARA GENOTIPADO Y SECUENCIACIÓN

Tabla 1. Primers RSS-PCR para amplificación y detección de fragmentos específicos de DENV-3

Primer	Secuencia	Posición genómica	Hebra
RSS5	9-CCA ACA TAA CAA CTG ACT C	1131–1149 1	+
RSS6	9-GGC AAG GGA AGC (C/T) TG GTA	1259–1276 1	+
RSS7	9-CTA CAT TTT AAG TGC CCC G	1785–1767 2	-
RSS8	9-GAC AGG CTC CTC CTT CTT G	2023–2005 2	-

PRIMERS UTILIZADOS EN GENOTIPADO Y SECUENCIACIÓN

Tabla 2- Primers DENV-1

Oligonucleótido	Secuencia	Uso
722F	CTCTGAAGGTGCCTGGAAAC	Amplificación y secuenciación
2069R	CGATGTAGCTCTCACAAAAG	Amplificación y secuenciación
1854F	CATTTAAGCTAGAGAAGGAAGTG	Amplificación y secuenciación
2616R	AAGACGCGTGGCTGATCGA	Amplificación y secuenciación
1289R	ACTTAGCACACGTCAGTAGG	Secuenciación
1160F	TGTCCAACACAAGGAGAGGC	Secuenciación
1622R	TTCCAAGTCTCTTGGGATG	Secuenciación
1517F	GAGATGGTTCTATTGACAATG	Secuenciación
2499R	GTGTGGACTTCATTGGTGAC	Secuenciación
2186F	ACCGCATGGGACTTTGGCTC	Secuenciación

Tabla 3 DENV-2

Oligonucleótido	Secuencia	Uso
DENV-2 PCR-F	TCG CTC CTT CAA TGA CAA TGC	Amplificación
DENV-2 PCR-R	CAG CTC ACA ACG CAA CCA CTA	Amplificación
D2SEQ1	TYG CTC CTT CAA TGA CAA TGC G	Secuenciación
D2SEQ2	ACA TGC AAA AAG AAC ATG GAA GGA	Secuenciación
D2SEQ3	AAT CCC CAY GCV AAG AAA CAG GAT	Secuenciación
D2SEQ4	CCA TTC GGR GAC AGC TAC ATC AT	Secuenciación
D2SEQ5	CAG CTC ACA ACG CAA CCA CTA	Secuenciación
D2SEQ6	TGA TGA TGT AGC TGT CTC CGA ATG	Secuenciación
D2SEQ7	CTG TGA GTG CCG TGT GCA TG	Secuenciación
D2SEQ8	CAA RTT TTC TGG TTG CAC GAC T	Secuenciación

Tabla 4. Primers genotipo DENV-3 (Lanciotti y cols, 1994)

Nombre	Secuencia 5'-3'	Uso
P722	GCTCCCCATGTCGGCATGGGACTGG	Amplificación y secuenciación
CP1559	TGGTAACGGCAGGTCTAGGAACCATTG	Amplificación y secuenciación
P1262	AAGGGAAGCTTGGTGACATGCGC	Amplificación y secuenciación
CP1816	CCCTTTGAGTTTCAATTTGTCCAT	Amplificación y secuenciación
P1685	CTAGGATCTCAAGAAGGAGCAATGCA	Amplificación y secuenciación
CP2250	ATGGCTGTTGCCACTCTTTTGGGGGA	Amplificación y secuenciación

Tabla 5. DENV-4

Oligonucleótido	Secuencia	uso
U486	CACGTATAAATGCCCCCTACTGGTC	Amplificación y secuenciación
L1786	GCTGTGTTTCTGCCATCTCTTTGTC	Amplificación y secuenciación
U1568	GCAATGGTTTTTTGAATCTGCCTCTT	Amplificación y secuenciación
L2679	CCTTCACATCCCCAGCCACTACAGT	Amplificación y secuenciación
U580	ACCCAGAGCGGAGAACGGAGACGAG	secuenciación
L803	GGGGCGACCAGCATCATTAGGACAA	secuenciación
L1136	AACAAGCCACAGCCATTGCCCCACC	secuenciación
U967	GAACTGACTAAGACAACAGCCAAGG	secuenciación
U1602	GCAGGAGCAGACACATCAGAGGTTC	secuenciación
L2519	TCTCGCTGGGGACTCTGGTTGAAAT	secuenciación
U2114	GAAAGGGAGTTCCATTGGCAAGATG	secuenciación

ANEXO 9.

**DATOS DE LA PROCEDENCIA DE LAS SECUENCIAS GENÓMICAS DE LOS SEROTIPOS
DE DENGUE INCLUIDAS EN EL ANÁLISIS DE GENOTIPO Y FILOGENIA VIRAL.**

Tabla 1. Principales características de las muestras de DENV-1 incluidas en el estudio.

a) Listado de muestras correspondientes al estudio inicial 2002-2010

Año	Provincia	Identificación	Localidad	Tipo de Muestra	Fragmento E-NS1	E completo	
2002	Salta	54615*	Salvador Mazza	Suero	X	X	
		54618	Salvador Mazza	Suero	X		
		54738	Tartagal	Suero	X		
		54739	Tartagal	Suero	X		
		54958*	Tartagal	Suero	X	X	
2003	Salta	56583*	Salvador Mazza	Suero	X	X	
		56785	Salvador Mazza	Suero	X		
		56589	Salvador Mazza	Suero	X		
		56595*	Salvador Mazza	Suero	X	X	
2008	Salta	71226*	Hipólito Irigoyen	Suero	X	X	
		71445	Hipólito Irigoyen	Suero	X		
		71498*	Oran	Suero	X	X	
		71565	Oran	Suero	X		
2009	Salta	72215*	Salvador Mazza	Suero	X	X	
		72232	Oran	Suero	X		
		72244	Salvador Mazza	Suero	X		
		72245	Salvador Mazza	Suero	X		
		72178	Tartagal	Suero	X		
		72809	S/I	Suero	X		
		74214	Rivadavia Banda Sur	Suero	X		
		73803	General Ballivián	Suero	X		
	Jujuy	74056	Rosario de Lerma	Suero	X		
			73638	San Pedro	Suero	X	
	Chaco	72617	Caimancito	Suero	X		
			72819	Campo Largo	Suero	X	
			72830	Saenz Peña	Suero	X	
			72832	Chaco	Suero	X	
	Catamarca	73897	Chaco	Suero	X		
			74718*	Capital	Bazo, suero e hígado	X	X
	Misiones	78618	Puerto Iguazú	Suero	X		
	Tucumán	74191	Yerba Buena	Suero	X		
	Córdoba	74893	Córdoba	Suero	X		
			76577	Córdoba	Suero	X	
			76486	Córdoba	Suero	X	
	Santa Fé	75038	Perez	Suero	X		
			75045*	Hersilia	Suero	X	X
			75044	Hersilia	Suero	X	
	Santiago del Estero	74680	Quimili	Suero	X		
			74678	Monte Quemado	Suero	X	
	Buenos Aires	74933	S/I	Suero	X		
			75899	San Isidro	Suero	X	

		75903	San Isidro	Suero	X	
	CABA	75510	CABA	Suero	X	
		75509	CABA	Suero	X	
2010	Misiones	78858	Puerto Iguazu	Suero	X	
		78852	Puerto Iguazu	Suero	X	
		79061*	El Dorado	Suero	X	X
		80349	El Dorado	Suero	X	
		80092	Puerto Esperanza	Suero	X	
		80111	Puerto Rico	Suero	X	
		80113*	Comandante Andrés	Suero	X	X
	Santiago del Estero	79989	Clodomira	Suero	X	
		79991	Clodomira	Suero	X	
	Chaco	79438	Corzuela	Suero	X	

b) Listado de muestras positivas DENV-1 en las que se realizó la secuencia completa de E

Identificacion en el árbol	provincia	Año	viaje	Clado Identificado
3352	Salta	2011	no	II
3361_la_Rioja_3-2011	La Rioja	2011	no	Ib-VE
3412_RSPeña_4-2011	Chaco	2011	no	Ib-VE
54615_SMazza2002	Salta	2002	no	Ib-BR
54958_Tartagal2002	Salta	2002	no	Ib-BR
56583_SMazza_2003	Salta	2003	no	Ib-BR
56595_SMazza_2003	Salta	2003	no	Ib-BR
5814_Tucuman	Tucumán	2016	no	II
5839_CAlberdiFomosa_2-2016	Formosa	2016	no	II
5845_Corrientes	Corrientes	2016	no	II
5939_Corrientes_1-2016	Corrientes	2016	no	II
6020_Ramallo	Buenos Aires	2016	no	II
6180_San_Isidro_3-2016	Buenos Aires	2016	no	Ib-VE
6305_Eldorado_12-2015	Misiones	2015	no	Ib-VE
6364_Lanus_1-2016	Buenos Aires	2016	no	Ib-VE
6471_Lanus_3-2016	Buenos Aires	2016	no	II
6480_San_Fernando_2-2016	Buenos Aires	2016	no	II
6522_Salta_3-2016	Salta	2016	no	II
6602_LaPlata_2-2016	Buenos Aires	2016	no	Ib-VE
6607_Parana_3-2016	Entre Rios	2016	no	II
6627_Concordia	Entre Rios	2016	no	II
6642_Jesus	Cordoba	2016	no	II
6843_Embarcacion_2-2016	Salta	2016	no	II
6851_CABA	CABA	2016	no	II
6897_Chajari	Entre Rios	2016	no	II
6942_CABA_4-2016	CABA	2016	no	Ib-VE
71226_HIrigoyen2008	Salta	2008	no	Ib-VE

71498_Oran2008	Salta	2008	no	Ib-VE
72215_SMazza2009	Salta	2009	no	Ib-VE
74718_bazo_Catamarca2009	Catamarca	2009	no	Ib-VE
74718_suero_Catamarca2009	Catamarca	2009	no	Ib-VE
75045_Hersilia2009	Santa Fe	2009	no	Ib-VE
7612_CABA_2017	CABA	2017	no	II
7831_CABA_2017	CABA	2017	no	II
79061_Misiones2010	Misiones	2010	no	Ib-VE
80113_CteAndres2010	Misiones	2010	no	Ib-VE
8012_Rosario_3-2017	Santa Fe	2017	no	Ib-VE
8013_Rosario_3-2017b	Santa Fe	2017	no	Ib-VE
8014_Rosario_3-2017c	Santa Fe	2017	no	Ib-VE
8016_Rosario_3-2017d	Santa Fe	2017	no	Ib-VE
8017_Rosario_3-2017e	Santa Fe	2017	no	Ib-VE
8152_Rosario_3-2017f	Santa Fe	2017	no	Ib-VE
8167_Cba-Form_2017	Cordoba	2017	si-Formosa	Ib-VE
8728	Formosa	2017	no	Ib-VE
8734	Formosa	2017	no	Ib-VE
8764	Formosa	2017	no	Ib-VE
8851	Formosa	2017	no	Ib-VE
9141	Formosa	2017	no	Ib-VE
9634	Formosa	2018	no	Ib-VE
9670	CABA	2018	no	Ib-VE
KY283848_116341	Formosa	2016	no	II
KY283849_116448	Entre Rios	2016	no	II
KY283850_116603	Buenos Aires	2016	no	II
KY283851_115614	Buenos Aires	2016	no	II
KY283852_115962	Tucumán	2016	no	II
KY283853_117490	Misiones	2016	no	Ib-VE
3352	Salta	2011	no	II
3361_la_Rioja_3-2011	La Rioja	2011	no	Ib-VE
3412_RSPeña_4-2011	Chaco	2011	no	Ib-VE
54615_SMazza2002	Salta	2002	no	Ib-BR
54958_Tartagal2002	Salta	2002	no	Ib-BR
56583_SMazza_2003	Salta	2003	no	Ib-BR
56595_SMazza_2003	Salta	2003	no	Ib-BR
5814_Tucuman	Tucumán	2016	no	II
5839_CAlberdiFomosa_2-2016	Formosa	2016	no	II
5845_Corrientes	Corrientes	2016	no	II
5939_Corrientes_1-2016	Corrientes	2016	no	II
6020_Ramallo	Buenos Aires	2016	no	II
6180_San_Isidro_3-2016	Buenos Aires	2016	no	Ib-VE
6305_Eldorado_12-2015	Misiones	2015	no	Ib-VE

6364_Lanus_1-2016	Buenos Aires	2016	no	Ib-VE
6471_Lanus_3-2016	Buenos Aires	2016	no	II
6480_San_Fernando_2-2016	Buenos Aires	2016	no	II
6522_Salta_3-2016	Salta	2016	no	II
6602_LaPlata_2-2016	Buenos Aires	2016	no	Ib-VE
6607_Parana_3-2016	Entre Rios	2016	no	II
6627_Concordia	Entre Rios	2016	no	II
6642_Jesus	Cordoba	2016	no	II
6843_Embarcacion_2-2016	Salta	2016	no	II
6851_CABA	CABA	2016	no	II
6897_Chajari	Entre Rios	2016	no	II
6942_CABA_4-2016	CABA	2016	no	Ib-VE
71226_Hirigoyen2008	Salta	2008	no	Ib-VE
71498_Oran2008	Salta	2008	no	Ib-VE
72215_SMazza2009	Salta	2009	no	Ib-VE
74718_bazo_Catamarca2009	Catamarca	2009	no	Ib-VE
74718_suero_Catamarca2009	Catamarca	2009	no	Ib-VE
75045_Hersilia2009	Santa Fe	2009	no	Ib-VE
7612_CABA_2017	CABA	2017	no	II
7831_CABA_2017	CABA	2017	no	II
79061_Misiones2010	Misiones	2010	no	Ib-VE
80113_CteAndres2010	Misiones	2010	no	Ib-VE
8012_Rosario_3-2017	Santa Fe	2017	no	Ib-VE
8013_Rosario_3-2017b	Santa Fe	2017	no	Ib-VE
8014_Rosario_3-2017c	Santa Fe	2017	no	Ib-VE
8016_Rosario_3-2017d	Santa Fe	2017	no	Ib-VE
8017_Rosario_3-2017e	Santa Fe	2017	no	Ib-VE
8152_Rosario_3-2017f	Santa Fe	2017	no	Ib-VE
8167_Cba-Form_2017	Cordoba	2017	si-Formosa	Ib-VE
8728	Formosa	2017	no	Ib-VE
8734	Formosa	2017	no	Ib-VE
8764	Formosa	2017	no	Ib-VE
8851	Formosa	2017	no	Ib-VE
9141	Formosa	2017	no	Ib-VE
9634	Formosa	2018	no	Ib-VE
9670	CABA	2018	no	Ib-VE

Tabla 2. Datos de las muestras de DENV-2 incluidas en el estudio.

Identificación	CABA	Nexo epidemiológico	Fecha Inicio Síntomas
ARG RNA 11658	CABA	Sin viaje	1/01/2020
ARG 10141	CABA	Sin viaje	14/4/2018

Tabla3. Datos de las muestras de DENV-3 incluidas en el estudio y procesadas por RSS-PCR

Identificación	FIS (mes/año)	Provincia	Localidad
776	10/03/2004	Jujuy	Yuto
823	15/03/2004	Tucumán (con viaje a Salta)	
714	3/03/2004	Morillo	Salta
594	15/04/2003	Colonia Santa Rosa	Salta
596	1/04/2003	Tartagal	Salta
598	10/04/2003	Colonia Santa Rosa	Salta
602	11/04/2003	Colonia Santa Rosa	Salta
592	13/03/2003	Salvador Mazza (viaje a Bolivia)	Salta
574*	18/03/2003	Tartagal	Salta
561	01/04/2003	Colonia Santa Rosa	Salta
633	9/12/2003	Embarcación	Salta
630	12/12/2003	Embarcación	Salta
634	9/12/2003	Embarcación	Salta
635	9/12/2003	Embarcación	Salta
642	15/01/2004	Pichanal	Salta
647	22/01/2004	Orán	Salta
655	21/01/2004	Pichanal	Salta
657	21/01/2004	Pichanal	Salta
670	30/01/2004	Aguas Blancas	Salta
671	03/02/2004	Pichanal	Salta
672	02/02/2004	H. Irigoyen	Salta
673	03/02/2004	H. Irigoyen	Salta
676	28/01/2004	Orán	Salta
677	28/01/2004	Orán	Salta
682	05/02/2004	Yuto	Jujuy
685	04/02/2004	Salta Capital	Salta
698	08/02/2004	Salvador Mazza	Salta
700	06/02/2004	Orán	Salta
704	12/02/2004	Yuto	Jujuy
708	12/02/2004	Yuto	Jujuy
709	9/02/2004	Aguaray	Salta
718	7/02/2004	Libertador Gral. San Martín	Salta
721	12/02/2004	Yuto	Jujuy
722	12/02/2004	Yuto	Jujuy
725	12/02/2004	Tartagal	Salta
732	06/02/2004	Aguas Blancas	Salta

733	06/02/2004	Aguas Blancas	Salta
745	19/02/2004	Tartagal	Salta
750	13/02/2004	Yuto	Jujuy
756	16/02/2004	San Pedro de Jujuy	Jujuy
760	20/02/2004	Yuto	Jujuy
769	23/02/2004	Salvador Mazza	Salta
770	02/03/2004	Aguaray	Salta

3b) Secuenciación Sanger de la E.

Identificación	Localidad	Fecha de inicio de síntomas
Argentina 2012	CABA	29/3/2012

Tabla 4. Principales características de las cepas de DENV-4 incluidas en el estudio.

Identificación	Fecha de inicio de síntomas	Provincia	Localidad	Observaciones
ARG-210	2010	Santa Fe	Rosario	Sin viaje
3895	12/02/2013	Córdoba	Córdoba	Viaje a Bolivia
3896	06/02/2013	Salta	Ballivian	Sin viaje
3897	12/02/13	Salta	Gral. Cornejo	Sin viaje
4448	S/D	Salta	Salvador Mazza	asintomático
5895	04/01/16	Formosa	Formosa	Sin viaje
5896	26/01/16	Formosa	Fomosa	Sin viaje
6273	19/02/16	Bs. As	El Palomar	Sin viaje
5583	17/12/15	Tierra del Fuego	Ushuaia	Viajero internacional-Latinoamérica
5635	10/01/2016	Santa Fé	Rosario	Viaje a Iguazú
11917	25/01/20	CABA	CABA	Viaje a Posadas
11957	21/01/20	Misiones	Posadas	Sin viaje
5927	26/01/16	Bs. As	San Martín	Sin viaje
12492	14/01/2021	Formosa	Estanislao del Campo	Sin viaje
12494	6/01/2021	Formosa	Estanislao del Campo	Sin viaje
12493	5/01/2021	Formosa	Estanislao del Campo	Sin viaje

ANEXO 10

DATOS DE LAS SECUENCIAS GENÓMICAS EXTRAÍDAS DE GEN-BANK E INCLUIDAS EN LOS ANÁLISIS FILOGENÉTICOS PARA LOS 4 SEROTIPOS DE DENV

1. DENV-1

Identificación	Origen	Año	N° acceso GB
AB111065_99-36-1HuNIID	Paraguay	1999	AB111065
AF226685_Den1BR_90	Brasil	1990	AF226685
AF311957_BR_97-409	Brasil	1997	AF311957
AF425614_BeH_584526	Brasil	1997	AF425614
AF514876_301arg00	Argentina	2000	AF514876
AF514878_280par00	Paraguay	2000	AF514878
AF514883_259par00	Paraguay	2000	AF514883
AF514885_295arg00	Argentina	2000	AF514885
AF514889_297arg00	Argentina	2000	AF514889
AY206457_293arg00	Argentina	2000	AY206457
AY277652_ARG9920c1	Argentina	2000	AY277652
AY277653_ARG9920c2	Argentina	2000	AY277653
AY277654_ARG0023	Argentina	2000	AY277654
AY277655_ARG0023C1	Argentina	2000	AY277655
AY277656_ARG0023c2	Argentina	2000	AY277656
AY277657_ARG0028c1	Argentina	2000	AY277657
AY277658_ARG0028c2	Argentina	2000	AY277658
AY277659_ARG0044	Argentina	2000	AY277659
AY277660_ARG0044c1	Argentina	2000	AY277660
AY277661_ARG0044c2	Argentina	2000	AY277661
AY277662_ARG0048c1	Argentina	2000	AY277662
AY277663_ARG0048c2	Argentina	2000	AY277663
AY277664_ARG9920	Argentina	2000	AY277664
AY277665_ARG0028	Argentina	2000	AY277665
AY277666_ARG0048	Argentina	2000	AY277666
AY780642_Puerto_Rico_1994	Puerto Rico	1994	AY780642
AY780643_Peru_Iqt-6152	Peru	sin datos	AY780643
FJ205872_DENV-1_US_BID-V1739_1998	Puerto Rico	1998	FJ205872
FJ205875_DENV-1_US_BID-V1744_1995	Puerto Rico	1995	FJ205875
FJ410173_DENV-1_US_BID-V2093_1998	Puerto Rico	1998	FJ410173
FJ410179_DENV-1_US_BID-V2127_1994	Puerto Rico	1994	FJ410179
FJ410184_DENV-1_US_BID-V2133_1993	Puerto Rico	1993	FJ410184
FJ478458_DENV-1_US_BID-V2142_1987	Puerto Rico	1987	FJ478458
FJ639735_DENV-1_VE_BID-V2162_1997	Venezuela	1997	FJ639735
FJ639740_DENV-1_VE_BID-V2168_1998	Venezuela	1998	FJ639740

FJ639741_DENV-1_VE_BID-V2169_1998	Venezuela	1998	FJ639741
FJ639797_DENV-1_VE_BID-V2230_2004	Venezuela	2004	FJ639797
FJ639821_DENV-1_VE_BID-V2261_2006	Venezuela	2006	FJ639821
FJ850070_DENV-1_BR_BID-V2374_2000	Brasil	2000	FJ850070
FJ850075_DENV-1_BR_BID-V2381_2002	Brasil	2002	FJ850075
FJ850081_DENV-1_BR_BID-V2389_2004	Brasil	2004	FJ850081
FJ850084_DENV-1_BR_BID-V2392_2005	Brasil	2005	FJ850084
FJ850087_DENV-1_BR_BID-V2395_2006	Brasil	2006	FJ850087
FJ850093_DENV-1_BR_BID-V2401_2008	Brasil	2008	FJ850093
FJ850100_DENV-1_VE_BID-V2461_2007	Venezuela	2007	FJ850100
FJ850103_DENV-1_VE_BID-V2468_2008	Venezuela	2008	FJ850103
FJ850114_DENV-1_NI_BID-V519_2005	Nicaragua	2005	FJ850114
FJ898437_DENV-1_NI_BID-V656_2004	Nicaragua	2004	FJ898437
GQ868498_DENV-1_MX_BID-V3659_2006	Mejico	2006	GQ868498
GQ868560_DENV-1_CO_BID-V3377_1998	Colombia	1998	GQ868560
GQ868601_DENV-1_VG_BID-V2937_1985	British Virgin Islands	1985	GQ868601
GU056029_DENV-1_VE_BID-V3540_1997	Venezuela	1997	GU056029
GU056033_DENV-1_VE_BID-V3545_1998	Venezuela	1998	GU056033
GU131839_DENV-1_VE_BID-V3565_2006	Venezuela	2006	GU131839
GU131863_DENV-1_BR_BID-V3490_2008	Brasil	2008	GU131863
HM450077_BeAR721365	Brasil	2007	HM450077
HM450080_BeH547625	Brasil	1996	HM450080
HM450082_BeH551022	Brasil	1997	HM450082
HM450083_BeH611377	Brasil	1999	HM450083
HM450084_BeH622822	Brasil	2000	HM450084
HM450086_BeH631185	Brasil	2000	HM450086
HM450090_BeH650975	Brasil	2002	HM450090
HM450091_BeH651987	Brasil	2002	HM450091
HM450093_BeH655251	Brasil	2002	HM450093
HM450094_BeH656274	Brasil	2002	HM450094
HM450095_BeH660415	Brasil	2002	HM450095
HM450100_BeH716995	Brasil	2006	HM450100
HM450101_BeH721251	Brasil	2007	HM450101
HQ026760_31768_BR_RJ_1986	Brasil	1986	HQ026760
HQ332183_VE_61081_2007	Venezuela	2007	HQ332183
HQ603916_BR_1986mosq	Brasil	1986	HQ603916
HQ603917_BR_74342mosq_01	Brasil	2001	HQ603917
JN713897_1107_2011_mosq_BR_RR_2010	Brasil	2010	JN713897
JN819410_DENV-1_VE_BID-V2241_2005	Venezuela	2005	JN819410
JN982362_BR_0594_2011_CE_2010	Brasil	2010	JN982362
JQ581613_OC_236_CO_SAN_2005	Colombia	2005	JQ581613
JQ581619_08_194_CO_SAN_2008	Colombia	2008	JQ581619
JX669461_9808_BR-PE_10	Brasil	2010	JX669461

JX669463_13501_BR-PE_10	Brasil	2010	JX669463
JX669464_13671_BR-PE_10	Brasil	2010	JX669464
JX669465_13861_BR-PE_10	Brasil	1997	JX669465
JX669468_40604_BR-PE_97	Brasil	1997	JX669468
JX669469_41111_BR-PE_97	Brasil	1997	JX669469
JX669470_52082_BR-PE_98	Brasil	1998	JX669470
JX669471_59049_BR-PE_99	Brasil	1999	JX669471
JX669472_70523_BR-PE_00	Brasil	2000	JX669472
JX669474_75861_BR-PE_01	Brasil	2001	JX669474
JX669475_88463_BR-PE_02	Brasil	2002	JX669475
KC692495_HNRG12188	Argentina	2009	KC692495
KC692496_HNRG12447	Argentina	2009	KC692496
KC692497_HNRG12560	Argentina	2009	KC692497
KC692498_HNRG12589	Argentina	2009	KC692498
KC692499_HNRG13154	Argentina	2009	KC692499
KC692500_HNRG13188	Argentina	2009	KC692500
KC692501_HNRG13301	Argentina	2009	KC692501
KC692502_HNRG13405	Argentina	2009	KC692502
KC692503_HNRG13561	Argentina	2009	KC692503
KC692504_HNRG13707	Argentina	2009	KC692504
KC692505_HNRG13708	Argentina	2009	KC692505
KC692506_HNRG14043	Argentina	2009	KC692506
KC692507_HNRG14076	Argentina	2009	KC692507
KC692508_HNRG14194	Argentina	2009	KC692508
KC692509_HNRG14635	Argentina	2009	KC692509
KC692510_HNRG15417	Argentina	2009	KC692510
KC692511_HNRG24827	Argentina	2010	KC692511
KC692512_HNRG25001	Argentina	2010	KC692512
KC692513_HNRG27213	Argentina	2010	KC692513
KC692514_HNRG27486	Argentina	2010	KC692514
KC692515_HNRG28226	Argentina	2010	KC692515
KC692516_HNRG28425	Argentina	2010	KC692516
KC692517_HNRG37945	Argentina	2010	KC692517
KF419418_D1PY_MR74_11	Paraguay	2011	KF419418
KF419419_D1PY_LU25_11	Paraguay	2011	KF419419
KF419420_D1PY_VE82_11	Paraguay	2011	KF419420
KF419421_D1PY_NM88_11	Paraguay	2011	KF419421
KF419422_D1PY_MR84_11	Paraguay	2011	KF419422
KF419423_D1PY_MR44_11	Paraguay	2011	KF419423
KF419424_D1PY_LM54_11	Paraguay	2011	KF419424
KF419425_D1PY_LM38_11	Paraguay	2011	KF419425
KF419426_D1PY_CA57_11	Paraguay	2011	KF419426
KF419427_D1PY_AS95_11	Paraguay	2011	KF419427
KF419428_D1PY_AS67_11	Paraguay	2011	KF419428

KF419429_D1PY_AS65_11	Paraguay	2011	KF419429
KF419430_D1PY_AS27_11	Paraguay	2011	KF419430
KF419431_D1PY_93_11	Paraguay	2011	KF419431
KF419432_D1PY_AS12_11	Paraguay	2011	KF419432
KF672762_38159_BR_RJ_1989	Brasil	2011	KF672762
KF672766_325_2011_BR_RJ_2011	Brasil	2011	KF672766
KF672767_512_2011_BR_RJ_2011	Brasil	2011	KF672767
KF672768_876_2010_BR_MS_2010	Brasil	2010	KF672768
KF672770_58522_BR_MG_1997	Brasil	1997	KF672770
KF672771_58540_BR_RJ_1997	Brasil	1997	KF672771
KF672772_58610_BR_RJ_1997	Brasil	1997	KF672772
KF672780_64450_BR_RJ_1999	Brasil	1999	KF672780
KF672782_66568_BR_RJ_2000	Brasil	2000	KF672782
KF672783_75424_BR_ES_2002	Brasil	2002	KF672783
KF672786_2676_2010_BR_RJ_2010	Brasil	2010	KF672786
KF672787_67993_BR_PI_2000	Brasil	2000	KF672787
KF672788_71602_BR_RJ_2001	Brasil	2001	KF672788
KF672791_45907_BR_MS_1991	Brasil	1991	KF672791
KF719187_568_2010_BR_ES_2010	Brasil	2010	KF719187
KF955438_DENV-1_PR_BID-V1053_1998	Puerto Rico	1998	KF955438
KF955439_DENV-1_PR_BID-V1056_1995	Puerto Rico	1995	KF955439
KJ189304_DENV-1_CO_BID-V7292_2005	Colombia	2005	KJ189304
KJ189342_DENV-1_MX_BID-V7611_2009	Mejico	2009	KJ189342
KJ189367_DENV-1_PR_BID-V8188_2010	Puerto Rico	2010	KJ189367
KJ651912_BR_Alfenas_2012	Brasil	2012	KJ651912
KP188568_BR_SJRP_2271_2014	Brasil	2014	KP188568
KP903771_k34d1_Divi_MG_BR_2013	Brasil	2013	KP903771
KP903774_k18d1_Divi_MG_BR_2013	Brasil	2013	KP903774
KP903776_k58d1_Divi_MG_BR_2013	Brasil	2013	KP903776
KP903778_k80d1_Divi_MG_BR_2013	Brasil	2013	KP903778
KP903781_k111d1_Divi_MG_BR_2013	Brasil	2013	KP903781
KT382187_DENV1_Bolivia_2010-FSB-3363	Bolivia	2010	KT382187
KT438566_DENV1BR_SJRP_64_2011	Brasil	2011	KT438566
KT438568_DENV1BR_SJRP_287_2011	Brasil	2012	KT438568
KT438572_DENV1BR_SJRP_387_2011	Brasil	2013	KT438572
KT438575_DENV1BR_SJRP_430_2011	Brasil	2014	KT438575
KT438578_DENV1BR_SJRP_484_2012	Brasil	2012	KT438578
KT438582_DENV1BR_SJRP_531_2012	Brasil	2012	KT438582
KT438584_DENV1BR_SJRP_709_2013	Brasil	2013	KT438584
KT438589_DENV1BR_SJRP_2271_2014	Brasil	2014	KT438589
KT825041_Sth_America_2015	sin datos	2013	KT825041
KT825054_Barbados_2013	Barbados	2015	KT825054
KU509251_DENV1-3852	Venezuela	2008	KU509251
KU509311_DENV1-8246	Brasil	2014	KU509311

KX380805_D1_SG_CT48_2013	Singapore	2013	KX380805
KX768338_HNRG103745	Argentina	2016	KX768338
KX768339_HNRG106691	Argentina	2016	KX768339
KX768340_HNRG102886	Argentina	2016	KX768340
KX768341_HNRG105212	Argentina	2016	KX768341
KX768342_HNRG105214	Argentina	2016	KX768342
KX768343_HNRG107068	Argentina	2016	KX768343
KX768344_HNRG105776	Argentina	2016	KX768344
KX768345_HNRG110386	Argentina	2016	KX768345
KX768346_HNRG105076	Argentina	2016	KX768346
KX768347_HNRG104694	Argentina	2016	KX768347
KX768348_HNRG104922	Argentina	2016	KX768348
KX768349_HNRG103191	Argentina	2016	KX768349
KX768350_HNRG102652	Argentina	2016	KX768350
KX768351_HNRG106373	Argentina	2016	KX768351
KX768352_HNRG105481	Argentina	2016	KX768352
KX768353_HNRG105691	Argentina	2016	KX768353
KX768354_HNRG105836	Argentina	2016	KX768354
KX768355_HNRG107038	Argentina	2016	KX768355
KX768356_HNRG104865	Argentina	2016	KX768356
KX768357_HNRG104842	Argentina	2016	KX768357
KX768358_HNRG102532	Argentina	2016	KX768358
KX768359_HNRG103646	Argentina	2016	KX768359
KX768360_HNRG105835	Argentina	2016	KX768360
KX768361_HNRG103677	Argentina	2016	KX768361
KX768362_HNRG106060	Argentina	2016	KX768362
KX768363_HNRG107955	Argentina	2016	KX768363
KX768364_HNRG108235	Argentina	2016	KX768364
KX768365_HNRG104048	Argentina	2016	KX768365
KX768366_HNRG104492	Argentina	2016	KX768366
KX768367_HNRG104100	Argentina	2016	KX768367
KX768368_HNRG108252	Argentina	2016	KX768368
KX768369_HNRG103330	Argentina	2016	KX768369
KX768370_HNRG104247	Argentina	2016	KX768370
KX768371_HNRG103430	Argentina	2016	KX768371
KX768372_HNRG103696	Argentina	2016	KX768372
KX768373_HNRG104255	Argentina	2016	KX768373
KX768374_HNRG103011	Argentina	2016	KX768374
KX768375_HNRG105486	Argentina	2016	KX768375
KX768376_HNRG104580	Argentina	2016	KX768376
KX768377_HNRG104047	Argentina	2016	KX768377
KX768379_HNRG108046	Argentina	2016	KX768379
KX768380_HNRG104075	Argentina	2016	KX768380
KX768381_HNRG106045	Argentina	2016	KX768381

KX768382_HNRG104513	Argentina	2016	KX768382
KX768385_HNRG105949	Argentina	2016	KX768385
KX768386_HNRG104496	Argentina	2016	KX768386
KX768387_HNRG102917	Argentina	2016	KX768387
KX768388_HNRG105346	Argentina	2016	KX768388
KX768390_HNRG107216	Argentina	2016	KX768390
KX768391_HNRG105686	Argentina	2016	KX768391
KX768393_HNRG103674	Argentina	2016	KX768393
KX768394_HNRG106613	Argentina	2016	KX768394
KX768395_HNRG104323	Argentina	2016	KX768395
KX768396_HNRG106428	Argentina	2016	KX768396
KX768397_HNRG106053	Argentina	2016	KX768397
KX768398_HNRG102741	Argentina	2016	KX768398
KX768401_HNRG106056	Argentina	2016	KX768401
KX768402_HNRG104983	Argentina	2016	KX768402
KX768405_HNRG105220	Argentina	2016	KX768405
KX768406_HNRG104228	Argentina	2016	KX768406
KX768408_HNRG106110	Argentina	2016	KX768408
KX768410_HNRG102566	Argentina	2016	KX768410
KX768411_HNRG105620	Argentina	2016	KX768411
KX768412_HNRG104789	Argentina	2016	KX768412
KX768413_HNRG104546	Argentina	2016	KX768413
KX768414_HNRG105546	Argentina	2016	KX768414
KX768415_HNRG104768	Argentina	2016	KX768415
KX768417_HNRG105107	Argentina	2016	KX768417
KX768418_HNRG104715	Argentina	2016	KX768418
KX768419_HNRG104763	Argentina	2016	KX768419
KX901655_DENV- 1_CO_SAN_F15030291_2015	Colombia	2015	KX901655
KY369949_GU128_2013_BR	Brasil	2013	KY369949
KY474305_00099-S	Ecuador	2014	KY474305
KY818070_DV1_COLOMBIA_525_2011	Colombia	2011	KY818070
KY818143_DV1_COLOMBIA_515_2013	Colombia	2013	KY818143
KY818236_DV1_BRAZIL_123_2013	Brasil	2013	KY818236
KY818255_DV1_PUERTORICO_551_2013	Puerto Rico	2013	KY818255
KY818270_DV1_MEXICO_535_2012	Mejico	2012	KY818270
China2003 GIV	China	2003	FJ196842
Hawaii2001 GIV	Hawaii	2001	DQ672561
Myanmar71 GIII	Myamar	1971	AY713473
Myanmar76 GIII	Myamar	1976	AY72280
Dengue1 GII	sin datos	sin datos	AF180817
Thailandia94 GI	Thailandia	1994	AY732480
SriLanka2009 GI	Sri Lanka	2009	HQ891316

Tabla 2. DATA-SET FILOGENIA DENV-2

Se muestran los datos de las secuencias más asociadas según los resultados filogenéticos obtenidos en el capítulo 3.

Identificación	Origen	Año	Nº acceso GB
DENV2 EU482603 DENV-2_NI_BID-V615_2007 Nicaragua_Managua 2007	Nicaragua	2007	EU482603
DENV2 FJ898478 DENV-2_NI_BID-V2924_2000 Nicaragua_Leon 2000	Nicaragua	2000	FJ898478
DENV2 EU482601 DENV-2_NI_BID-V663_2007 Nicaragua_Managua 2007	Nicaragua	2007	EU482601
DENV2 EU482623 DENV-2_NI_BID-V1210_2007 Nicaragua_Managua 2007	Nicaragua	2007	EU482623
DENV2 HM631865 DENV-2_NI_BID-V4156_2007 Nicaragua_Managua 2007	Nicaragua	2007	HM631865
DENV2 JX079688 DENV-2_NI_BID-V3152_2008 Nicaragua_Ciudad_Sandino 2008	Nicaragua	2008	JX079688
DENV2 JF730052 DENV-2_NI_BID-V5073_2009 Nicaragua_Managua 2009	Nicaragua	2009	JF730052
DENV2 GQ868604 DENV-2_NI_BID-V518_2005 Nicaragua_Managua 2005	Nicaragua	2005	GQ868604
DENV2 FJ850050 DENV-2_NI_BID-V2356_2007 Nicaragua_Managua 2007	Nicaragua	2007	FJ850050
DENV2 KJ189370 DENV-2_MX_BID-V8199_2011 Mexico 2011	Mejico	2011	KJ189370
DENV2 HQ999999 DENV-2_GU_FDA-GUA09_2009 Guatemala_Guatemala_City 2009	Guatemala	2009	HQ999999

En el siguiente link se encuentran los alineamientos realizados para los 4 serotipos de DENV:

<https://drive.google.com/drive/folders/1WiD3RbXXTUHwEqbPLWJagtxY4mDQKWjy?usp=sharing>

Tabla 3: DATA-SET FILOGENIA DENV-3

ID en el árbol filogenético	Origen	Año	N° acceso GB
DENV-3/VE/BID-V2268/2008	Venezuela	2008	FJ639827
DENV-3/VE/BID-V1102/2007	Venezuela	2007	EU529683
DENV-3/VE/BID-V2483/2007	Venezuela	2007	GQ868587
DENV-3/VE/BID-V1149/2007	Venezuela	2007	EU932687
DENV-3/US/BID-V2126/2006	Venezuela	2006	FJ547085
DENV-3/VE/BID-V2482/2007	Venezuela	2007	FJ850110
DENV-3/VE/BID-V2247/2005	Venezuela	2005	FJ639810
IDAMS-910115	Venezuela	2015	MH450298
IDAMS-910106	Venezuela	2015	MH450296
DENV-3/CO/SAN/P201080482/2016	Colombia	2016	MF173450
DENVEN-CC0010	Venezuela	2010	MH450311
D10023-JM	China	2010	JN029822
DENV-3/VE/BID-V2457/2001	Venezuela	2001	KF955480
COD3_LV057	Colombia	2003	FJ189456
DENV-3/VE/BID-V2195/2001	Venezuela	2001	FJ639765
DENV-3/VE/BID-V1113/2001	Venezuela	2001	EU529684
DENV-3/CO/SAN/P201080358/2016	Colombia	2016	MF173448
F1013-0751	Colombia	2013	MK614070
3HSG61	Ecuador	2014	MH346207
IDAMS-910118	Venezuela	2015	MH450299
Cuba_118_2001	Cuba	2001	KT726340
DENV-3/VE/BID-V2579/2001	Venezuela	2001	KF955486
H50978	Venezuela	2000	HM348813
DENV-3/CO/BID-V3400/2004	Colombia	2004	GQ868575
DENV-3/CO/BID-V3398/2003	Colombia	2003	GQ868574
DENV-3/VE/BID-V2965/2000	Venezuela	2000	FJ898468
DENV-3/VE/BID-V2452/2001	Venezuela	2001	FJ850097
DENV-3/VE/BID-V2178/2000	Venezuela	2000	FJ639749
DENV-3/VE/BID-V906/2001	Venezuela	2001	EU482613
LARD5990	Venezuela	2000	AY146764
C02-003/Maracay 2001	Venezuela	2001	DQ367720
DENV-3/VE/BID-V1121/36892.5	Venezuela	sin dato	KF955449
DENV-3/VE/BID-V913/2001	Venezuela	2001	EU482614
449982_Meta_CO_2015	Colombia	2015	MH544650
449686_Antioquia_CO_2015	Colombia	2015	MH544649
DENV-3/CO/SAN/LV117/2003	Colombia	2003	KX926469
DENV-3/CO/SAN/02132/2002	Colombia	2002	KX926465
DENV-3/VE/BID-V2580/2001	Venezuela	2001	KF955487

H63788	Venezuela	2001	HM348823
H63607	Venezuela	2001	HM348822
H62000	Venezuela	2001	HM348821
H63263	Venezuela	2001	HM348815
DENV-3/CO/BID-V3401/2004	Colombia	2004	GU131953
COD3_LV428	Colombia	2004	FJ189460
15859_BELLO/02	Colombia	2002	FJ389908
DENV-3/VE/BID-V2967/2001	Venezuela	2001	FJ898470
DENV-3/VE/BID-V2205/2007	Venezuela	2007	FJ639772
DENV-3/VE/BID-V2192/2001	Venezuela	2001	FJ639762
DENV-3/VE/BID-V1117/2001	Venezuela	2001	EU529686
LARD6397	Venezuela	2000	AY146769
DENV-3/CO/SAN/LV105/2003	Colombia	2003	KX926471
H64276 envelope	Venezuela	2001	HM348824
DENV-3/CO/BID-V3392/2001	Colombia	2001	GU131950
DENV-3/CO/BID-V3393/2002	Colombia	2002	GQ868571
COD3_02200 envelope	Colombia	2002	FJ204475
DENV-3/VE/BID-V2220/2004	Venezuela	2004	FJ639787
DENV-3/VE/BID-V2213/2003	Venezuela	2003	FJ639780
MKS-0098	Indonesia	2007	KC762684
MKS-0396	Indonesia	2008	KC762687
BDH02-1	Bangladesh	2002	AY496871
Singapore 8120/95	Singapore	sin dato	AY766104
dengue	Sri Lanka	2000	NC_001475
DENV-3/MX/BID-V2989/2007	Mejico	2007	DENV-3/MX/BID-V2989/2007
ARG6475-07	Argentina	2007	FJ898442
ARG6645-07	Argentina	2007	EU052792
ARG6694-07	Argentina	2007	EU052794
ARG6733-07	Argentina	2007	EU052795
ARG6768-07	Argentina	2007	EU052796
ARG11586-07	Argentina	2007	EU052797
ARG6541-07	Argentina	2007	EU052798
ARG11595-07	Argentina	2007	EU052793
D3BR/BR8/04	Brasil	2004	DQ118864
D3BR/BV4/02	Brasil	2002	DQ118865
D3BR/CU6/02	Brasil	2002	DQ118866
D3BR/MR9/03	Brasil	2003	JF808124
D3BR/PP15/04	Brasil	2004	DQ118878
D3BR/SL3/02	Brasil	2002	JF808125
D3BR/ST14/04	Brasil	2004	DQ118882
D3PY/AS12/02	Paraguay	2002	DQ118884
D3PY/FM11/03	Paraguay	2003	DQ118886
D3PY/YA2/03 envelope protein	Paraguay	2003	DQ118891

gene,			
bol03a	Bolivia	2003	DQ177887
bol03b	Bolivia	2003	DQ177886
Cuba2000	Cuba	2000	AY702032
Cuba2001	Cuba	2001	AY702030
Cuba2002	Cuba	2002	AY702031
H87	Philippines	1956	L11423
India84	India	1984	L11424
Indonesi98	Indonesia	1998	AY858039
Indonesi04	Indonesia	2004	AY858045
MX96	Mejico	1996	DQ341203
MX97	Mejico	1997	DQ341206
MX00	Mejico	2000	DQ341207
MX06	Mejico	2006	HM171538
MX07	Mejico	2007	FJ898442
Nicaragua94	Nicaragua	1994	AY702033
PANAMA94	Panamá	1994	DQ341209
PERU00	Peru	2000	DQ177903
PERU03	Peru	2003	DQ177896
PERU04	Peru	2004	DQ177894
PERU05	Peru	2005	DQ177902
PERU07	Peru	2007	KJ189268
PERU08	Peru	2008	KJ189261
PERU09	Peru	2009	KJ189292
PERU06	Puerto Rico	2006	KF955456
PRico63	Puerto Rico	1963	AY146762
SOMALIA93	Somalia	1993	DQ341208
D3BR/AL95/2009	Brasil	2009	JF808120
D3BR/ACN/2007	Brasil	2007	JF808121
FSL706/Loreto-2002	Peru	2002	DQ177889
FST 346/Tumbes-2004	Peru	2004	DQ177894
MFI624/Iquitos-Jan.2005	Peru	2005	DQ177897
OBT1467/Tumbes-2001	Peru	2001	DQ177900
OBT4024/Lima-Comas	Peru	2005	DQ177902
OBT412/Tumbes-2000	Peru	2000	DQ177903

Tabla 4: DATA-SET FILOGENIA DENV-4

Identificación	Origen	Año	N° acceso GB
PY27	Paraguay	2018	MT040679
PY34	Paraguay	2018	MT040674
PY32	Paraguay	2018	MT040675
GU11/2013/BR	Brasil	2013	KY369950
PY28	Paraguay	2018	MT040680
DENV-4/MT/BR40_TVP17926/2012	Brasil	2012	KJ596660
DENV-4/MT/BR73_TVP17951/2012	Brasil	2012	KJ596669
H772854	Brasil	2010	JN559741
BR/SJRP/514/2012	Brasil	2012	KP188560
DENV-4/MT/BR33_TVP17919/2012	Brasil	2012	KJ596658
DENV-4/MT/BR53_TVP17939/2012	Brasil	2012	KJ596666
DENV-4/MT/BR12_TVP17898/2012	Brasil	2012	KJ579243
BR/SJRP/850/2013	Brasil	2013	KP188566
BR/SJRP/610/2013	Brasil	2013	KP188563
DENV-4/MT/BR9_TVP17895/2012	Brasil	2012	KJ579242
H780120	Brasil	2010	JQ513341
H780090	Brasil	2010	JQ513340
DENV-4/VE/BID-V2500/2007	Venezuela	2007	FJ882591
DENV-4/VE/BID-V2492/2007	Venezuela	2007	FJ882583
DENVEN-CC0030	Venezuela	2010	MH450305
BR/SJRP/733/2013	Brasil	2013	KP188565
VE_61073_2007	Venezuela	2007	HQ332174
DENV-4/CO/BID-V3411/2004	Colombia	2004	GQ868584
COL97	Colombia	1997	FJ024476
COL01a	Colombia	2001	GQ868582
COL01b	Colombia	2001	GQ868581
COL01c	Colombia	2001	GQ868580
COL01d	Colombia	2001	GQ868579
COL04a	Colombia	2004	GQ868584
COL04b	Colombia	2004	GQ868583
COL05	Colombia	2005	GQ868585
COL82	Colombia	1982	GU289913
H241	Philipiinas	1956	AY947539
BRA82	Brasil	1982	U18426
ElSal83	El Salvador	1983	U18426

EISal94	El Salvador	1994	U18427
IND73	Indonesia	1973	U18428
IND76	Indonesia	1976	U18429
IND77	Indonesia	1977	U18430
MEX84	Mejico	1984	U18431
NewCaledonia84	Nueva Caledonia	1984	U18432
PHIL56	Philipiinas	1956	U18433
PHIL64	Philipiinas	1964	U18434
PR86	Puerto Rico	1986	AY152056
PHIL84	Philipiinas	1984	U18435
PR98a	Puerto Rico	1998	AY152056
PR98b	Puerto Rico	1998	AY152068
VEN95	Venezuela	1995	AY152092
MART95	Martinica	1995	AY152100
CR96	Costa Rica	1996	AY152104
PR92a	Puerto Rico	1992	AY152112
PR94a	Puerto Rico	1994	AY152144
PR94b	Puerto Rico	1994	AY152148
PR92b	Puerto Rico	1992	AY152208
PR87a	Puerto Rico	1987	AY152236
PR87b	Puerto Rico	1987	AY152268
EISal93	El Salvador	1993	AY152300
MEX95	Mejico	1995	AY152304
PR82a	Puerto Rico	1982	AY152336
PR82b	Puerto Rico	1982	AY152344
DOMIN81	Rep Dominicana	1981	AY152360
BAH98a	Bahamas	1998	AY152364
BAH98b	Bahamas	1998	AY152365
BAH98c	Bahamas	1998	AY152372
TRI99	Trinidad	1999	AY152367
BDS99	Barbados	1999	AY152368
MON94a	Monserrat	1994	AY152369
MON94b	Monserrat	1994	AY152370
MON94c	Monserrat	1994	AY152371
SUR94a	Suriname	1994	AY152385
SUR94b	Suriname	1994	AY152373
SUR94c	Suriname	1994	AY152374
BDS93a	Barbados	1993	AY152375
BDS93b	Barbados	1993	AY152376
TRI94	Trinidad	1994	AY152377
MEX91	Mejico	1991	AY152378
HON91	Honduras	1991	AY152379
TRI84a	Trinidad	1984	AY152380

TRI82a	Trinidad	1982	AY152380
TRI82b	Trinidad	1982	TRI82b
JAM83	Jamaica	1983	AY152384
SUR82a	Suriname	1982	AY152385
SUR82b	Suriname	1982	AY152386
SUR82c	Suriname	1982	AY152387
SUR82d	Suriname	1982	AY152388
JAM81	Jamaica	1981	AY152389
PR90	Puerto Rico	1990	AY152855
PR85a	Puerto Rico	1985	AY152856
PR85b	Puerto Rico	1985	AY152857
THAIL97a	Thailandia	1997	AY618989
THAIL97b	Thailandia	1997	AY618988
BRA10a	Brasil	2010	JN559741
BRA10b	Brasil	2010	JQ513334
BRA11a	Brasil	2011	JQ513345
BRA11b	Brasil	2011	JQ513336
BRA11c	Brasil	2011	JQ513343

NOTA: En el siguiente link se disponen los alineamientos realizados para los 4 serotipos de DENV:

<https://drive.google.com/drive/folders/1WiD3RbXXTUHwEqbPLWJagtxY4mDQKWjy?usp=sharing>

BIBLIOGRAFÍA

- [1] MG Guzmán, G Kourí, and JL. Pelegrino (2001) “Enfermedades virales emergentes.,” *Rev. Cubana Med. Trop.*, vol. 53, no. 1, pp. 5–15.
- [2] J Frenk, JL Bobadilla, C Stern, T Frejka, and R Lozano (1991) Elementos para una teoría de la transición en Salud. ” *Salud Publica Mex.*, vol. 33, no. 5, pp. 448–462. [Online]. Available: <http://saludpublica.mx/index.php/spm/article/view/5434/5733> (ultimo acceso 27-08-2021)
- [3] PA Kuri-Morales (2011) La transición en salud y su impacto en la demanda de servicios. *Gac. Med. Mex.*, vol. 147, no. 6, pp. 451–454.
- [4] R S Sikkema and M. P. G. Koopmans. (2021) Preparing for Emerging Zoonotic Viruses. *Encycl. Virol.*, no. January, pp. 256–266, doi: 10.1016/b978-0-12-814515-9.00150-8.
- [5] M. Woolhouse (2011) How to make predictions about future infectious disease risks. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 366, no. 1573, pp. 2045–2054, , doi: 10.1098/rstb.2010.0387.
- [6] KE Jones, NG Patel, MA Levy, A Storeygard, D Balk , JL Gittleman, P Daszak P (2008) Global trends in emerging infectious diseases. *Nat.* 4517181, vol. 451, no. 7181, pp. 990–993, doi: 10.1038/nature06536.
- [7] BA Jones, D Grace , R Kock, S Alonso, J Rushton , MY Said, D McKeever, F Mutua, J Young, J McDermott, DU Pfeiffer (2013) Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and environmental change. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 110. no. 21, pp. 8399–8404, doi: 10.1073/PNAS.1208059110.
- [8] C Gortazar, LA Reperant, T Kuiken, J de la Fuente, M Boadella, B Martínez-Lopez, F Ruiz-Fons, A Estrada-Peña, C Drosten, G Medley, R Ostfeld, T Peterson, KC VerCauteren, C Menge, M Artois, C Schultsz, R Delahay, J Serra-Cobo, R Poulin, F Keck, A A Aguirre, H Henttonen, A P Dobson, Susan Kutz, J Lubroth, A Mysterud (2014) Crossing the Interspecies Barrier: Opening the Door to Zoonotic Pathogens. *PLOS Pathog.*, vol. 10. no. 6, p. e1004129, doi: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1004129.
- [9] SE Randolph and D J Rogers (2010) Zoonosis The arrival, establishment and spread of exotic diseases: patterns and predictions. *Nat. Rev. | Microbiol.*, vol. 8, p. 361, doi: 10.1038/nrmicro2336.
- [10] T. Allen, KA Murray, C Zambrana- Torrelío, SS Morse, C Rondinini, M Di Marco, N Breit N, KJ Olival, P Daszak (2017) Global hotspots and correlates of emerging zoonotic diseases. *Nat. Commun.* 81, vol. 8, no. 1, pp. 1–10. Oct. 2017, doi: 10.1038/s41467-017-00923-8.

- [11] MA Espinal, JK Andrus, B Jauregui, S Hull Waterman, DM Morens, JI Santos, O Horstick, LA Francis y D Olson (2019) Emerging and Reemerging Aedes-Transmitted Arbovirus Infections in the Region of the Americas: Implications for Health Policy. *Am. J. Public Health*, vol. 109, no. 3, pp. 387–392, 2019, doi: 10.2105/AJPH.2018.304849.
- [12] WM Hammond and WC Reeves (1945) Recent Advances in the Epidemiology of the Arthropod-borne Virus Encephalitides. Including Certain Exotic Types. *Am. J. Public Health Nations. Health*, vol. 35, no. 10, pp. 994–1004, Oct. 1945, doi: 10.2105/AJPH.35.10.994.
- [13] DJ Gubler (2002) The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch. Med. Res.*, vol. 33, no. 4, pp. 330–342, doi: 10.1016/S0188-4409(02)00378-8.
- [14] SC Weaver and W K Reisen (2010) Present and future arboviral threats, vol. 85, no. 2. 2010. *Antiviral Res.* 85(2):328-45, doi: 10.1016/j.antiviral.2009.10.008.
- [15] YJS Huang, S Higgs, and D L Vanlandingham (2019) Arbovirus-mosquito vector-host interactions and the impact on transmission and disease pathogenesis of arboviruses. *Front. Microbiol.*, vol. 10, no. JAN, pp. 1–14, 2019, doi: 10.3389/fmicb.2019.00022.
- [16] Y Y Go, UBR Balasuriya, CH Lee (2014) Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. *Clin. Exp. Vaccine Res.*, vol. 3, no. 1, p. 58, 2014, doi: 10.7774/CEVR.2014.3.1.58.
- [17] H Artsob, R Lindsay, and M Drebot (2017) Arboviruses. *Int. Encycl. Public Heal.*, pp. 154–160. Jan. 2017, doi: 10.1016/B978-0-12-803678-5.00023-0.
- [18] NN Gaudreault, DW Madden, WC Wilson, JD Trujillo, and JA Richt (2020) “African Swine Fever Virus: An Emerging DNA Arbovirus,” *Front. Vet. Sci.*, vol. 7, no. May, pp. 1–17, doi: 10.3389/fvets.2020.00215.
- [19] E Domingo and JJ Holland (2003) RNA VIRUS MUTATIONS AND FITNESS FOR SURVIVAL. vol. 51, pp. 151–178, Nov. 2003, doi: 0.1146/ANNUREV.MICRO.51.1.151.
- [20] G Kuno and GJJ Chang (2005) Biological Transmission of Arboviruses: Reexamination of and New Insights into Components, Mechanisms, and Unique Traits as Well as Their Evolutionary Trends. *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 18, no. 4, pp. 608–637, 2005, doi: 10.1128/CMR.18.4.608-637.
- [21] DJGubler (1998) Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 11, no. 3, pp. 480–496.
- [22] D. J. Gubler (2001) Dengue, Urbanization and globalization: The unholy trinity of the 21 st century. *Trop. Med. Health*, vol. 39, no. 4 SUPPL., pp. 3–11, 2011, doi:

10.2149/tmh.2011-S05.

- [23] MU Kraemer, ME Sinka, KA Duda, AQ Mylne, FM Shearer, CM Barker, CG Moore, RG Carvalho, GE Coelho, W Van Bortel, G Hendrickx, F Schaffner, IR Elyazar, HJ Teng, OJ Brady, JP Messina, DM Pigott, TW Scott, DL Smith, GR Wint, N Golding, SI Hay (2015) The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*, *Elife*, vol. 4, no. JUNE2015, pp. 1–18, 2015, doi: 10.7554/eLife.08347.
- [24] B de Thoisy, V Lacoste, A Germain, J Muñoz-Jordán, C Colón, JF Mauffrey, M Delaval, F Catzefflis, M Kazanji, S Matheus, P Dussart, J Morvan, AA Setián, X Deparis & A Lavergne (2009) Dengue infection in neotropical forest mammals. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, vol. 9, no. 2, pp. 157–169, doi: 10.1089/VBZ.2007.0280.
- [25] B. de Thoisy, P. Dussart, and M. Kazanji (2004) Wild terrestrial rainforest mammals as potential reservoirs for flaviviruses (yellow fever, dengue 2 and St Louis encephalitis viruses) in French Guiana. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 98, no. 7, pp. 409–412, doi: 10.1016/J.TRSTMH.2003.12.003.
- [26] R. Chen and N. Vasilakis (2011) Dengue-Quo tu et quo vadis? *Viruses*, vol. 3, no. 9, pp. 1562–1608, 2011, doi: 10.3390/v3091562.
- [27] L. Tadeu and M. Figueiredo (2019) Human Urban Arboviruses Can Infect Wild Animals and Jump to Sylvatic Maintenance Cycles in South America,” vol. 9, no. July, pp. 1–6, doi: 10.3389/fcimb.2019.00259.
- [28] BJ Blitvich, T Magallanes, SV Laredo-Tiscareños, and BD Fox (2020) Sexual Transmission of Arboviruses: A Systematic Review,” *Viruses*, vol. 12, no. 9, doi: 10.3390/V12090933.
- [29] A J Rodriguez-Morales, AC Bandeira and C. Franco-Paredes (2016) The expanding spectrum of modes of transmission of Zika virus: a global concern. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, vol. 15, no. 1, p. 13, doi: 10.1186/S12941-016-0128-2.
- [30] AS Oliveira Melo, R Aguiar, MM Ramos Amorim, MB Arruda, F de Oliveira Melo, ST Clementino Ribeiro, AG Medeiros Batista, T Ferreira, M Pereira dos Santos, V Vilar Sampaio, SR Martins Moura, L Portela Rabello, CE Gonzaga, G Malinger, R Ximenes, P Soares de Oliveira-Szejnfeld, F Tovar-Moll, Leila Chimelli, PP Silveira, R Delvechio, L Higa, L Campanati, RM Nogueira, AM Bispo Filippis, J Szejnfeld, C Moreira Voloch, OC Ferreira Jr, RM Brindeiro, A Tanuri (2016) Congenital Zika Virus Infection: Beyond Neonatal Microcephaly,” *JAMA Neurol.*, vol. 73, no. 12, pp. 1407–1416, doi: 10.1001/JAMANEUROL.2016.3720.
- [31] LN Pealer, AA Marfin, LR Petersen, RS Lanciotti, PL Page, SL Stramer, MG Stobierski, K Signs, B Newman, H Kapoor, JL Goodman, ME Chamberland & West Nile Virus Transmission Investigation Team (2009) Transmission of West Nile Virus through

- Blood Transfusion in the United States in 2002.
<http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa030969>, vol. 349, no. 13, pp. 1236–1245, doi: 10.1056/NEJMOA030969.
- [32] KM Gaskell, C Houlihan, E Nastouli, and AM Checkley (2017) Persistent zika virus detection in semen in a traveler returning to the United Kingdom from Brazil, 2016. *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 23, no. 1, pp. 137–139, doi: 10.3201/eid2301.161300.
- [33] MS Sabattini, G Aviles, and TO Monath (1998) Historical, Epidemiological and Ecological Aspects of Arboviruses in Argentina: Flaviviridae, Bunyaviridae and Rhabdoviridae, pp. 113–34.
- [34] M. B. Pisano *et al.*, “Enzootic Activity of Pixuna and Rio Negro Viruses (Venezuelan Equine Encephalitis complex) in a Neotropical Region of Argentina,” *Vector-Borne Zoonotic Dis.*, 2009, doi: 10.1089/vbz.2008.0156.
- [35] LA Diaz, V Ré, WR Almirón, A Farías, A Vázquez, MP Sanchez-Seco, J Aguilar, L Spinsanti, B Konigheim, A Visintin A, J Garcíá, MA Morales, A Tenorio, M Contigiani (2006) Genotype III Saint Louis Encephalitis Virus Outbreak, Argentina, 2005. *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 12, no. 11, p. 1752, 2006, doi: 10.3201/EID1211.060486.
- [36] LSpinsanti, LA Diaz, NV Glatstein, S Arselan, MA Morales, AA Farias; CM Fabbri, JJ Aguilar, VE Ré, M Frías, WA Almirón, E Hunsperger, M Siirin, A Travassos da Rosa; RB Tesh, DA Enría, MS Contigiani de Minio (2007) Human outbreak of St. Louis encephalitis detected in Argentina, 2005. *J. Clin. Virol.*, vol. 42, no. 1, pp. 27–33, doi: 10.1016/J.JCV.2007.11.022.
- [37] A. Seijo *et al.*, “Brote de encefalitis de san luis en el area metropolitana buenos aires,” *Medicina (B. Aires).*, vol. 71, no. 3, pp. 211–217, 2011.
- [38] MA Morales, M Barranteguy, C Fabbri, JB Garcia, A Vissani, K Trono, G Gutierrez, S Pigretti, H Menchaca, N Garrido, N Taylor, F Fernandez, S Levis, D Enría D (2006) West Nile virus isolation from equines in Argentina, 2006. *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 12, no. 10. pp. 1559–1561, doi: 10.3201/eid1210.060852.
- [39] C Giovacchini, M Mariscal, T Varela (2016) Epidemiología de las arbovirosis emergentes en las Américas con foco en la Argentina. Actualizaciones en SIDA e Infectología, Buenos Aires, volumen 24, número 93:73-89.
- [40] AL Tellechea, V Luppó, MA Morales, B Groisman, A Baricalla, CM Fabbri, A Sinchi, A Alonso, C Gonzalez, B Ledesma, P Masi, M Silva, A Israilev, M Rocha, M Quaglia, MP Bidondo, R Liascovich, P Barbero. (2018) Surveillance of microcephaly and selected brain anomalies in Argentina: Relationship with Zika virus and other congenital infections. *Birth Defects Res.* Jul 17; 110 (12):1016-1026.
- [41] P Simmonds, P Becher, J Bukh, EA Gould, G Meyers, T Monath, S Muerhoff, A

- Pletnev, R Rico-Hesse, DB Smith, JT Stapleton, Ictv Report Consortium (2017) ICTV virus taxonomy profile: Flaviviridae. *J. Gen. Virol.*, vol. 98, no. 1, pp. 2–3, 2017, doi: 10.1099/jgv.0.000672.
- [42] KC Lin, HL Chang, RY Chang RY (2004) Accumulation of a 3'-terminal genome fragment in Japanese encephalitis virus-infected mammalian and mosquito cells," *J. Virol.*, vol. 78, no. 10. pp. 5133–5138, doi: 10.1128/JVI.78.10.5133-5138.2004.
- [43] V Ramakrishnaiah, C Thumann, I Fofana, F Habersetzer, Pan Q, PE de Ruiter, R Willemsen, JA Demmers, V Stalin Raj, G Jenster, J Kwekkeboom, HW Tilanus, BL Haagmans, TF Baumert, LJ van der Laan (2013) Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7.5 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 110. no. 32, pp. 13109–13113, doi: 10.1073/PNAS.1221899110.
- [44] EJ Lefkowitz, DM Dempsey, RC Hendrickson, RJ Orton, SG Siddell and DB Smith (2018) Virus taxonomy: The database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). *Nucleic Acids Res.*, vol. 46, no. D1, pp. D708–D717, 2018, doi: 10.1093/nar/gkx932.
- [45] BJ Blitvich and AE Firth (2015) *Insect-specific flaviviruses: A systematic review of their discovery, host range, mode of transmission, superinfection exclusion potential and genomic organization*, vol. 7, no. 4.
- [46] AT de Madrid and JS Porterfield (1974) The flaviviruses (group B arboviruses): a cross-neutralization study. *J. Gen. Virol.*, vol. 23, no. 1, pp. 91–96, doi: 10.1099/0022-1317-23-1-91.
- [47] CH Calisher, N Karabatsos, JM Dalrymple, RE Shope, JS Porterfield, EG Westaway, WE Brandt (1989) Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-Determined by Cross-neutralization Tests with Polyclonal Antisera. *J. gen. Virol.*, vol. 70. pp. 37–43, 1989.
- [48] CM Rice, EM Lenches, SR Eddy, SJ Shin, RL Sheets, JH Strauss (1985) Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution," *Science*, vol. 229, no. 4715, pp. 726–733, 1985, doi: 10.1126/SCIENCE.4023707.
- [49] TJ Chambers, CS Hahn, R Galler, CM Rice (1990) Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 44, pp. 649–688, 1990. doi: 10.1146/ANNUREV.MI.44.100190.003245.
- [50] BD Lindenbach and CM Rice (2007) Flaviviridae: The Viruses and Their Replication, *Fields Virol.*, pp. 1101–1151.
- [51] Y Chen, T Maguire, RM Marks (1996) Demonstration of binding of dengue virus envelope protein to target cells. *J. Virol.*, vol. 70. no. 12, pp. 8765–8772, Dec. 1996, doi:

- 10.1128/JVI.70.12.8765-8772.
- [52] JT Roehrig, RA Bolin, and RG Kelly (1998) Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the dengue 2 virus, Jamaica. *Virology*, vol. 246, no. 2, pp. 317–328, doi: 10.1006/VIRO.1998.9200.
- [53] G Kuno, GJ Chang, KR Tsuchiya, N Karabatsos, CB Cropp (1998) Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *J. Virol.*, vol. 72, no. 1, pp. 73–83, doi: 10.1128/JVI.72.1.73-83.1998.
- [54] F Billoir, R De Chesse, H Tolou, P De Micco, EA Gould and X De Lamballerie (2000) Phylogeny of the genus *Flavivirus* using complete coding sequences of arthropod-borne viruses and viruses with no known vector,” *J. Gen. Virol.*, vol. 81, no. 3, pp. 781–790. doi: 10.1099/0022-1317-81-3-781.
- [55] MW Gaunt, AA Sall, X de Lamballerie, AKI Falconar, TI Dzhivianian and EA Gould (2001) Phylogenetic relationships of flaviviruses correlate with their epidemiology, disease association and biogeography. *J. Gen. Virol.*, vol. 82, no. Pt 8, pp. 1867–1876, doi: 10.1099/0022-1317-82-8-1867.
- [56] JO Pettersson and O Fiz-Palacios (2014) Dating the origin of the genus *Flavivirus* in the light of Beringian biogeography. *J. Gen. Virol.*, vol. 95, no. Pt 9, pp. 1969–1982, doi: 10.1099/VIR.0.065227-0.
- [57] A Díaz, FS Flores, AI Quaglia and MS Contigiani (2018) Evaluation of argentinean bird species as amplifying hosts for St. Louis encephalitis virus (*Flavivirus, Flaviviridae*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 99, no. 1, pp. 216–221, 2018, doi: 10.4269/ajtmh.17-0856.
- [58] MD Beranek, AI Quaglia, GC Peralta, M Stein M, LA Diaz, WR Almirón, MS Contigiani. *Culex interfor* and *Culex saltanensis* (Diptera: *Culicidae*) are susceptible and competent to transmit St. Louis encephalitis virus (*Flavivirus: Flaviviridae*) in central Argentina (2020) *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 114(10):725-729. doi: 10.1093/trstmh/traa058. PMID: 32722771.
- [59] G Avilés, G Rangeón, V Vorndam, A Briones, P. Baroni, D. Enria, and M.S. Sabbatini (1999) Dengue reemergence in Argentina,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 5, no. 4, pp. 575–578, doi: 10.3201/EID0504.990424.
- [60] H. Masuh (2008) Re-emergence of dengue in Argentina: Historical development and future challenges. *Dengue Bull.*, vol. 32, pp. 44–54.
- [61] A Seijo, D Curcio, G Avilés, B Cernigoi, B Deodato and S Lloveras (2000) Imported dengue in Buenos Aires, Argentina. *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 6, no. 6, pp. 655–656, 2000. doi: 10.3201/eid0606.000619.
- [62] A Seijo, “Dengue 2009: Cronología de una epidemia,” *Arch. Argent. Pediatr.*, vol. 107, no. 5, pp. 387–389, 2009.
- [63] I Holzmann, I Agostini, JI Areta, H Ferreyra, P Beldomenico, MS Di Bitetti (2010)

- Impact of yellow fever outbreaks on two howler monkey species (*Alouatta guariba clamitans* and *A. caraya*) in Misiones, Argentina. *Am. J. Primatol.*, vol. 72, no. 6, pp. 475–480. doi: 10.1002/AJP.20796.
- [64] S Goenaga, C Fabbri, JC Dueñas, CN Gardenal, GC Rossi, G Calderon, MA Morales, JB Garcia, DA Enria, S Levis (2012) Isolation of yellow fever virus from mosquitoes in Misiones Province, Argentina. *Vector-Borne Zoonotic Dis.*, vol. 12, no. 11, pp. 986–993, doi: 10.1089/vbz.2011.0730.
- [65] H Artsob, DJ Gubler, DA Enria, MA Morales, M Pupo, ML Bunning, JP Dudley (2009) West Nile Virus in the New World: trends in the spread and proliferation of West Nile Virus in the Western Hemisphere. *Zoonoses Public Health*, vol. 56, no. 6–7, pp. 357–369, Aug. 2009, doi: 10.1111/J.1863-2378.2008.01207.X.
- [66] I Kurane, FE Ennis (1992) Immunity and immunopathology in dengue virus infections.,” *Semin. Immunol.*, vol. 4, no. 2, pp. 121–127.
- [67] GE Snow, B Haaland, EE Ooi and DJ Gubler (2014) Review article: Research on dengue during world war II revisited. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 91, no. 6, pp. 1203–1217, doi: 10.4269/ajtmh.14-0132.
- [68] K Clyde, JL Kyle, E Harris E (2006) Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J. Virol.*, vol. 80. no. 23, pp. 11418–11431, Dec. 2006, doi: 10.1128/JVI.01257-06.
- [69] MG Guzman, DJ Gubler, A Izquierdo, E Martinez, SB Halstead (2016) Dengue infection. *Nat. Rev. Dis. Prim.*, vol. 2, doi: 10.1038/NRDP.2016.55.
- [70] DJ Gubler (2014) Chapter 1, Dengue Viruses: Their Evolution, History and Emergence as a Global Public Health Problem. In : *Dengue and dengue hemorrhagic fever*. (Ed: D Gubler, E Ooi, S Vasudevan, J Farrar), Wallingford, Oxfordshire : CABI
- [71] JR Anderson and R Rico-Hesse (2006) *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus. *Am J Trop Med Hyg.* 75(5):886-92.
- [72] BT Beerntsen, AA James, BM Christensen (2000) Genetics of mosquito vector competence. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 64, no. 1, pp. 115–137, doi: 10.1128/MMBR.64.1.115-137.2000.
- [73] M Casas-Martínez, R Tamayo-Domínguez, JC Bond-Compeán, JC Rojas, M Weber, A Ulloa-García (2020) Oogenic development and gonotrophic cycle of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in laboratory. *Salud Pública De México*, 62(4, jul-ago), 372-378. <https://doi.org/10.21149/10164>
- [74] NA Honório, C Silva Wda, PJ Leite, JM Gonçalves, LP Lounibos, R Lourenço-de-Oliveira (2003) Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in an urban endemic dengue area in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo*

- Cruz*, vol. 98, no. 2, pp. 191–198, doi: 10.1590/S0074-02762003000200005.
- [75] P Matangkasombut, K Manopwisedjaroen, N Pitabut, S Thaloengsok, S Suraamornkul, T Yingtaweesak, V Duong, A Sakuntabhai, R Paul, P Singhasivanon (2020) Dengue viremia kinetics in asymptomatic and symptomatic infection. *Int. J. Infect. Dis.*, vol. 101, pp. 90–97, doi: 10.1016/j.ijid.2020.09.1446.
- [76] MR Periago and MG Guzmán (2007) Dengue y dengue hemorrágico en las Américas,” *Rev. Panam. Salud Pública*, vol. 21, no. 4, pp. 187–191, Apr. 2007, doi: 10.1590/S1020-49892007000300001.
- [77] JG Rigau-Pérez JG, GG Clark, DJ Gubler, P Reiter, EJ Sanders, AV Vorndam (1998) Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet* (London, England), vol. 352, no. 9132, pp. 971–977, doi: 10.1016/S0140-6736(97)12483-7.
- [78] WHO, *Comprehensive guidelines for prevention and control of dengue and dengue haemorrhagic fever*, no. 1. 2011.
- [79] Organización Panamericana de la Salud, *Guías para la atención de enfermos en la región de las américas*, vol. dos. 2015.
- [80] R Rico-Hesse, LM Harrison, RA Salas, D Tovar, A Nisalak, C Ramos, J Boshell, MT de Mesa, RM Nogueira, AT da Rosa (1997) Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology*, vol. 230. no. 2, pp. 244–251, doi: 10.1006/viro.1997.8504.
- [81] World Health Organization. (2009). Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control: new edition. World Health Organization. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44188> (ultimo acceso: 30-08-2021)
- [82] S Bhatt, PW Gething, OJ Brady, JP Messina, AW Farlow, CL Moyes, JM Drake, JS Brownstein, AG Hoen, O Sankoh, MF Myers, DB George, T Jaenisch, GR Wint, Simmons CP, TW Scott, JJ Farrar, SI Hay (2013) The global distribution and burden of dengue. *Nature*, vol. 496, no. 7446, p. 504, Apr. 2013, doi: 10.1038/NATURE12060.
- [83] OJ Brady, PW Gething, S Bhatt, JP Messina, JS Brownstein, AG Hoen, CL Moyes, AW Farlow, TW Scott, SI Hay (2012) Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 6, no. 8, p. e1760. doi: 10.1371/JOURNAL.PNTD.0001760.
- [84] O. P. de la Salud and O. M. de la Salud, “Actualización Epidemiológica Dengue,” *Actual. epidemiológica dengue*, p. 21, 2020. [Online]. Available: <https://bit.ly/2Pes0li%0Ahttps://bit.ly/2Pes0li%0Awww.paho.org>.
- [85] World Health Organization, “Alerta Epidemiológica: Dengue en el contexto de COVID-19,” p. 8, 2020. [Online]. Available: <https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/biblio-1103086>.

- [86] G Aviles, G Rangeon, MV Paz, P Baroni, MS Sabattini, D Enria (2001) Respuestas serológicas secundarias en la epidemia de dengue de 1998 en Salta, Argentina, donde co-circulan otros flavivirus. *Medicina (B Aires)*, 61(2):129-36.
- [87] G Avilés, MV Paz, G Rangeon, MY Ranaivoarisoa, N Verzeri, S Roginski, P Baroni, D Enria (2003) Laboratory surveillance of dengue in Argentina, 1995-2001. *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 9, no. 6, p. 738, doi: 10.3201/EID0906.020483.
- [88] FA Ramírez, R Cuezzo, EB Sarrouf, FA Hilal, G Alcaraz, R Núñez Mrad, **A Morales**, D Enria, CM Fabbri, S Caillou, H Echenique, I Flores, R Calli Flores (2013) Seroprevalencia de anticuerpos contra dengue en niños de uno a nueve años luego de una epidemia, Aguilares, Tucumán, 2009. *Rev Argent Salud Pública*, 4 (14): 18-22.
- [89] G Avilés, J Rowe, J Meissner, JC Manzur Caffarena, D Enria, and S St. Jeor (2002) “Phylogenetic relationships of dengue-1 viruses from Argentina and Paraguay,” *Arch. Virol.*, vol. 147, no. 11, pp. 2075–2087, doi: 10.1007/S00705-002-0886-3.
- [90] E Tittarelli, SB Lusso, S Goya, GL Rojo, MI Natale, M Viegas, AS Mistchenko, LE Valinotto (2017) dengue virus 1 Outbreak in Buenos Aires, Argentina, 2016. *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 23, no. 10. pp. 1684-1685.
- [91] T Varela, C Giovacchini, P Angeleri, M Morales, CFabbri, V Luppo. (2019) Sala de Situación: Elaboración de criterios epidemiológicos para estratificar por departamento el riesgo poblacional de dengue grave. *Rev Argent Salud Pública* 10 (39): 38-41.
- [92] “Biv 527 | se 51 1,” pp. 1–29, 2020.
- [93] G. F. O. R. Diagnosis, “Recommendations for Treatment,” *Psychiatr. News*, vol. 41, no. 1, pp. 29–29, 2006, doi: 10.1176/pn.41.1.0029b.
- [94] DW Vaughn, S Green, S Kalayanarooj, BL Innis, S Nimmannitya, S Suntayakorn, TP Endy, B Raengsakulrach, AL Rothman, FA Ennis, A Nisalak (2000) Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity,” *J. Infect. Dis.*, vol. 181, no. 1, pp. 2–9, doi: 10.1086/315215.
- [95] DA Muller, ACI Depelseñaire, and PR Young (2017) Clinical and laboratory diagnosis of dengue virus infection. *J. Infect. Dis.*, vol. 215, no. Suppl 2, pp. S89–S95, doi: 10.1093/infdis/jiw649.
- [96] H Harapan, A Michie, RT Sasmono and A Imrie (2020) Dengue: A minireview. *Viruses*, vol. 12, no. 8.
- [97] S Chanama, S Anantapreecha, A A-nuegoonpipat, A Sa-gnasang, I Kurane, P Sawanpanyalert P (2004) Analysis of specific IgM responses in secondary dengue virus infections: levels and positive rates in comparison with primary infections. *J. Clin. Virol.*, vol. 31, no. 3, pp. 185–189, Nov. 2004, doi: 10.1016/J.JCV.2004.03.005.
- [98] M Guzman y G Kouri (1996). MINIREVIEW Advances in Dengue Diagnosis. *Clin.*

- Diagnostic Lab. Immunol.*, vol. 3, no. 6, pp. 621–627.
- [99] KF Tang and EE Ooi (2012) “Diagnosis of dengue: An update,” *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.*, vol. 10, no. 8, pp. 895–907, doi: 10.1586/eri.12.76.
- [100] F Medina, JF Medina, C Colon, E Vergne, GA Santiago, and JL Munoz-Jordan (2012) “Dengue virus: Isolation, propagation, quantification, and storage,” *Curr. Protoc. Microbiol.*, no. SUPPL.27, pp. 1–24, doi: 10.1002/9780471729259.mc15d02s27.
- [101] DJ Gubler, W Suharyono, R Tan, M Abidin, and A Sie (1981) Viraemia in patients with naturally acquired dengue infection,” *Bull. World Health Organ.*, vol. 59, no. 4, pp. 623–630.
- [102] FRR Teles, DMF Prazeres, JL Lima-Filho (2005) Trends in dengue diagnosis. *Rev. Med. Virol.*, vol. 15, no. 5, pp. 287–302, doi: 10.1002/RMV.461.
- [103] RG Jarman, A Nisalak, KB Anderson, C Klungthong, B Thaisomboonsuk, W Kaneechit, S Kalayanarooj, RV Gibbons (2011) Factors influencing dengue virus isolation by C6/36 cell culture and mosquito inoculation of nested PCR-positive clinical samples. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 84, no. 2, pp. 218–223, doi: 10.4269/ajtmh.2011.09-0798.
- [104] EA Henchal, JM McCown, MC Seguin, MK Gentry, WE Brandt (1983) Rapid identification of dengue virus isolates by using monoclonal antibodies in an indirect immunofluorescence assay. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 32, no. 1, pp. 164–169, doi: 10.4269/AJTMH.1983.32.164.
- [105] PY Shu and JH Huang (2004) Current advances in dengue diagnosis. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, vol. 11, no. 4, pp. 642–650. doi: 10.1128/CDLI.11.4.642-650.2004.
- [106] V Deubel, M Laili, JP Hugnot, E Chungue, JL Guesdon, MT Drouet, S Bassot, D Chevrier (1990) Identification of dengue sequences by genomic amplification: rapid diagnosis of dengue virus serotypes in peripheral blood,” *J. Virol. Methods*, vol. 30, no. 1, pp. 41–54, doi: 10.1016/0166-0934(90)90042-E.
- [107] RS Lanciotti, CH Calisher, DJ Gubler, GJ Chang, and AV Vorndam (1992) Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 30, no. 3, pp. 545–551
- [108] E Harris, TG Roberts, L Smith, J Selle, LD Kramer, S Valle, E Sandoval, A Balmaseda (1998) Typing of Dengue Viruses in Clinical Specimens and Mosquitoes by Single-Tube Multiplex Reverse Transcriptase PCR. *J. Clin. Microbiol.*, vol. 36, no. 9, pp. 2634–2639.
- [109] BW Johnson, BJ Russell, and RS Lanciotti (2005) Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J. Clin. Microbiol.*, vol. 43, no. 10, pp. 4977–4983, doi: 10.1128/JCM.43.10.4977-4983.2005.
- [110] GA Santiago, E Vergne, Y Quiles, J Cosme, J Vazquez, JF Medina, F Medina, C Colón, H Margolis, JL Muñoz-Jordán (2013) Analytical and Clinical Performance of the CDC

- Real Time RT-PCR Assay for Detection and Typing of Dengue Virus,” *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 7, no. 7, pp. 36–38, doi: 10.1371/journal.pntd.0002311.
- [111] YK Yong, RThayan, HT Chong, CT Tan, and SD Sekaran(2007) Rapid detection and serotyping of dengue virus by multiplex RT-PCR and real-time SYBR green RT-PCR. *Singapore Med. J.*, vol. 48, no. 7, pp. 662–668.
- [112] HW Godoy dos Santos, TR Ramos Silva Poloni, KP Souza, VD Menjon Muller, F Tremeschin, L Christensen Nali, LR Fantinatti, AA Amarilla, HL Alfonso Castro, MR Nunes, SM Casseb, PF Vasconcelos, SJ Badra, LT Moraes Figueiredo, VH Aquino (2008) A simple one-step real-time RT-PCR for diagnosis of dengue virus infection.*J. Med. Virol.*, vol. 80. no. 8, pp. 1426–1433, doi: 10.1002/JMV.21203.
- [113] PR Young, PA Hilditch, C Bletchly, W Halloran (2000) An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 38, no. 3, pp. 1053–1057, doi: 10.1128/JCM.38.3.1053-1057.2000.
- [114] S Alcon, A Talarmin, M Debruyne, A Falconar, V Deubel, and M Flamand (2002) Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. *J. Clin. Microbiol.*, vol. 40. no. 2, pp. 376–381, 2002, doi: 10.1128/JCM.40.02.376-381
- [115] K Bessoff, M Delorey, W Sun, E Hunsperger (2008) Comparison of Two Commercially Available Dengue Virus (DENV) NS1 Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assays Using a Single Clinical Sample for Diagnosis of Acute DENV Infection. *Clin. VACCINE Immunol.*, vol. 15, no. 10. pp. 1513–1518, doi: 10.1128/CVI.00140-08.
- [116] EA Hunsperger, S Yoksan, P Buchy, VC Nguyen, SD Sekaran, DA Enria, S Vazquez, E Cartozian, JL Pelegriño, H Artsob, MG Guzman, P Olliaro, J Zwang, M Guillerm, S Kliks, S Halstead, RW Peeling, HS Margolis (2014) Evaluation of Commercially Available Diagnostic Tests for the Detection of Dengue Virus NS1 Antigen and Anti-Dengue Virus IgM Antibody. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 8, no. 10. doi: 10.1371/journal.pntd.0003171.
- [117] EA Hunsperger, J Muñoz-Jordán, M Beltran, C Colón, J Carrión, J Vazquez, LN Acosta, JF Medina-Izquierdo, K Horiuchi, BJ Biggerstaff, HS Margolis (2016) Performance of Dengue Diagnostic Tests in a Single-Specimen Diagnostic Algorithm, *J. Infect. Dis.*, vol. 214, no. 6, pp. 836–844, doi: 10.1093/infdis/jiw103.
- [118] RW Peeling, H Artsob, JL Pelegriño, P Buchy, MJ Cardosa, S Devi, DA Enria, J Farrar, DJ Gubler, MG Guzman, SB Halstead, E Hunsperger, S Kliks, HS Margolis, CM Nathanson, VC Nguyen, N Rizzo, S Vázquez, S Yoksan (2010) Evaluation of diagnostic

- tests: dengue. *Nat Rev Microbiol*;8(12 Suppl):S30-8 doi: 10.1038/nrmicro2459.
- [119] KH Changal, AH Raina, A Raina A, M Raina, R Bashir, M Latief , T Mir, QH Changal. Differentiating secondary from primary dengue using IgG to IgM ratio in early dengue: An observational hospital based clinico-serological study from North India. *BMC Infect. Dis.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–7, doi: 10.1186/s12879-016-2053-6.
- [120] S Schilling, D Ludolfs, L Van An, and H Schmitz (2004) Laboratory diagnosis of primary and secondary dengue infection. *J. Clin. Virol.*, vol. 31, no. 3, pp. 179–184, doi: 10.1016/j.jcv.2004.03.020.
- [121] C Domingo, F de Ory, JC Sanz, N Reyes, J Gascón, O Wichmann, S Puente, M Schunk, R López-Vélez , Ruiz J, Tenorio A (2009) Molecular and serologic markers of acute dengue infection in naive and flavivirus-vaccinated travelers,” *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 65, no. 1, pp. 42–48, doi: 10.1016/J.DIAGMICROBIO.2009.05.004.
- [122] K. B. Gibney *et al.*, “Detection of anti-yellow fever virus immunoglobulin M antibodies at 3-4 years following yellow fever vaccination,” *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 87, no. 6, pp. 1112–1115, 2012, doi: 10.4269/ajtmh.2012.12-0182.
- [123] JT Roehrig, D Nash, B Maldin, A Labowitz, DA Martin, RS Lanciotti, GL Campbell (2003) Persistence of virus-reactive serum immunoglobulin m antibody in confirmed west Nile virus encephalitis cases. *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 9, no. 3, pp. 376–379, doi: 10.3201/EID0903.020531.
- [124] PK Russell, A Nisalak, P Sukhavachana, and S Vivona (1967) Plaque Reduction Test for Dengue Virus Neutralizing Antibodies. *J. Immunol.*, vol. 99, no. 2.
- [125] SB Halstead, S Rojanasuphot, and N Sangkawibha (1983) Original Antigenic Sin in Dengue. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 32, no. 1, pp. 154–156, doi: 10.4269/AJTMH.1983.32.154.
- [126] A. DE, C. MP, N. L, and T. JV, “Overcoming original (antigenic) sin,” *Clin. Immunol.*, vol. 101, no. 2, pp. 152–157, 2001, doi: 10.1006/CLIM.2001.5114.
- [127] G. Aviles *et al.*, “RESPUESTA SECUNDARIA POR DENGUE EN ARGENTINA *Premio Osvaldo Bottaro 2000 de la Academia Nacional de Medicina,” *Buenos Aires*), vol. 61, pp. 129–136, 2001.
- [128] Katzelnick LC, Narvaez C, Arguello S, Lopez Mercado B, Collado D, Ampie O, Elizondo D, Miranda T, Bustos Carillo F, Mercado JC, Latta K, Schiller A, Segovia-Chumbez B, Ojeda S, Sanchez N, Plazaola M, Coloma J, Halloran ME, Premkumar L, Gordon A, Narvaez F, de Silva AM, Kuan G, Balmaseda A, Harris E (2020) Zika virus infection enhances future risk of severe dengue disease. *Science*, vol. 369, no. 6507, pp. 1123–1128, doi: 10.1126/science.abb6143.Zika.

- [129] JL Huang, JH Huang, RH Shyu, CW Teng, YL Lin, MD Kuo, CW Yao, MF Shaio (2001) High-level expression of recombinant dengue viral NS-1 protein and its potential use as a diagnostic antigen. *J. Med. Virol.*, vol. 65, no. 3, pp. 553–560. doi: 10.1002/JMV.2072.
- [130] PR Young, PA Hilditch, C Bletchly, and W Halloran (2000) An Antigen Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Reveals High Levels of the Dengue Virus Protein NS1 in the Sera of Infected Patients. *J. Clin. Microbiol.*, vol. 38, no. 3, pp. 1053–1057.
- [131] P Koraka, CP Burghoorn-Maas, A Falconar, TE Setiati, K Djamiatun, J Groen, AD Osterhaus (2003) Detection of Immune-Complex-Dissociated Nonstructural-1 Antigen in Patients with Acute Dengue Virus Infections. *J. Clin. Microbiol.*, vol. 41, no. 9, p. 4154, doi: 10.1128/JCM.41.9.4154-4159.2003.
- [132] H Xu, B Di, YX Pan, LW Qiu, YD Wang, W Hao, LJ He, KY Yuen, XY Che (2006) Serotype 1-specific monoclonal antibody-based antigen capture immunoassay for detection of circulating nonstructural protein NS1: Implications for early diagnosis and serotyping of dengue virus infections. *J. Clin. Microbiol.*, vol. 44, no. 8, pp. 2872–2878, doi: 10.1128/JCM.00777-06.
- [133] DH Libraty, PR Young, D Pickering, TP Endy, S Kalayanarooj, S Green, DW Vaughn, A Nisalak, FA Ennis, AL Rothman (2002) High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever,” *J. Infect. Dis.*, vol. 186, no. 8, pp. 1165–1168, doi: 10.1086/343813.
- [134] PCG Nunes, RMR Nogueira, M Heringer, T Chouin-Carneiro, C Damasceno Dos Santos Rodrigues, AMB de Filippis, MDRQ Lima, FB Dos Santos (2018) NS1 antigenemia and viraemia load: Potential markers of progression to dengue fatal outcome?. *Viruses*, vol. 10, no. 6, pp. 1–11, doi: 10.3390/v10060326.
- [135] P Dussart, L Baril, L Petit, L Beniguel, LC Quang, S Rdo Azevedo, JB Meynard, S Vong, L Chartier, A Diop, O Sivuth, V Duong, CM Thang, M Jacobs, A Sakuntabhai, MR Nunes, VT Huong, P Buchy, PF Vasconcelos (2012) Clinical and virological study of dengue cases and the members of their households: The multinational denframe project,” *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 6, no. 1, doi: 10.1371/journal.pntd.0001482.
- [136] V Kumarasamy, SK Chua, Z Hassan, AH Wahab, YK Chem, M Mohamad, KB Chua. Evaluating the sensitivity of a commercial dengue NS1 antigen-capture ELISA for early diagnosis of acute dengue virus infection. *Singapore Med J*; 48(7):669-73.
- [137] SD Blacksell, MP Mammen, S Thongpaseuth, RV Gibbons, RG Jarman, K Jenjaroen, A Nisalak, R Phetsouvanh, PN Newton, NP Day (2008) Evaluation of the Panbio dengue

- virus nonstructural 1 antigen detection and immunoglobulin M antibody enzyme-linked immunosorbent assays for the diagnosis of acute dengue infections in Laos,” *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 60. no. 1, pp. 43–49, doi: 10.1016/J.DIAGMICROBIO.2007.07.011.
- [138] P Dussart, L Petit, B Labeau, L Bremand, A Leduc, D Moua, S Matheus, L Baril (2008) Evaluation of two new commercial tests for the diagnosis of acute dengue virus infection using NS1 antigen detection in human serum,” *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 2, no. 8, doi: 10.1371/journal.pntd.0000280.
- [139] H Zhang, W Li, J Wang, H Peng, X Che, X Chen, Y Zhou (2014) NS1-based tests with diagnostic utility for confirming dengue infection: a meta-analysis,” *Int. J. Infect. Dis.*, vol. 26, pp. 57–66, doi: 10.1016/J.IJID.2014.02.002.
- [140] MG Guzman, T Jaenisch, R Gaczkowski, VT Ty Hang, SD Sekaran, A Kroeger, S Vazquez, D Ruiz, E Martinez, JC Mercado, A Balmaseda, E Harris, E Dimano, PS Leano, S Yoksan, E Villegas, H Benduzu, I Villalobos, I Farrar, CP Simmons (2010) Multi-country evaluation of the sensitivity and specificity of two commercially-available NS1 ELISA assays for dengue diagnosis. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 4, no. 8, doi: 10.1371/JOURNAL.PNTD.0000811.
- [141] SD Blacksell, RG Jarman, RV Gibbons, A Tanganuchitcharnchai, MP Jr Mammen, A Nisalak, S Kalayanarooj, MS Bailey, R Premaratna, HJ de Silva, NP Day, DG Lalloo (2012) Comparison of Seven Commercial Antigen and Antibody Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detection of Acute Dengue Infection. *Clin Vaccine Immunol*; 19(5):804-10. doi: 10.1128/CVI.05717-11.
- [142] K Bessoff, E Phoutrides, M Delorey, LN Acosta, E Hunsperger. Utility of a Commercial Nonstructural Protein 1 Antigen Capture Kit as a Dengue Virus Diagnostic Tool. *Clin Vaccine Immunol*, 17(6):949-53, doi: 10.1128/CVI.00041-10.
- [143] A Igarashi (1978) Isolation of a Singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. *J Gen Virol*; 40(3):531-44. Doi: 10.1099/0022-1317-40-3-531. PMID: 690610.
- [144] TM Sharp, M Fischer, JL Muñoz-Jordán, G Paz-Bailey, JE Staples, CJ Gregory, SH Waterman (2019) Dengue and Zika Virus Diagnostic Testing for Patients with a Clinically Compatible Illness and Risk for Infection with Both Viruses. *MMWR Recomm Rep*; 68(No. RR-1):1–10.
- [145] SJ Chung, PU Krishnan, and YS Leo (2015) Two Cases of False-Positive Dengue Non-Structural Protein 1 (NS1) Antigen in Patients with Hematological Malignancies and a Review of the Literature on the Use of NS1 for the Detection of Dengue Infection. *Am J Trop Med Hyg*, vol. 92, no. 2, pp. 367–369, doi: 10.4269/ajtmh.14-0247.

- [146] X Shan, X Wang, Q Yuan, Y Zheng, H Zhang, Y Wu, J Yang (2015) Evaluation of the diagnostic accuracy of nonstructural protein 1 Ag-based tests for dengue virus in Asian population: a meta-analysis. *BMC Infect. Dis.*, vol. 15, no. 1, doi: 10.1186/S12879-015-1088-4.
- [147] World Health Organization. (2009). Dengue guías para el diagnóstico, tratamiento, prevención y control: nueva edición. Organización Mundial de la Salud. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44504> (ultimo acceso 30/08/2021)
- [148] DH Clarke and J Casals (1958) Techniques for Hemagglutination and Hemagglutination-Inhibition with Arthropod-Borne Viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 7, no. 5, pp. 561–573, doi: 10.4269/AJTMH.1958.7.561.
- [149] S Vene, J Mangiafico, B Niklasson (1995) Indirect immunofluorescence for serological diagnosis of dengue virus infections in Swedish patients. *Clin. Diagn. Virol.*, vol. 4, no. 1, pp. 43–50. doi: 10.1016/0928-0197(94)00060-8.
- [150] EA Hunsperger, S Yoksan, P Buchy, VC Nguyen, SD Sekaran, DA Enria, JL Pelegrino, S Vázquez, H Artsob, M Drebot, DJ Gubler, SB Halstead, MG Guzmán, HS Margolis, CM Nathanson, NR Rizzo, KE Bessoff, S Kliks, RW Peeling. Evaluation of commercially available anti-dengue virus immunoglobulin M tests,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 15, no. 3, pp. 436–440. 2009, doi: 10.3201/eid1503.080923.
- [151] N Raafat, SD Blacksell, and RJ Maude (2019) A review of dengue diagnostics and implications for surveillance and control. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 113(11):653-660. doi: 10.1093/trstmh/trz068.
- [152] M Namekar, EM Ellis, M O'Connell, J Elm, A Gurary, SY Park, A Imrie, VR Nerurkar (2013) .Evaluation of a new commercially available immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of dengue virus infection,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 51, no. 9, pp. 3102–3106, doi: 10.1128/JCM.00351-13.
- [153] DA Martin, DA Muth, T Brown, AJ Johnson, N Karabatsos, and JT Roehrig (2000) Standardization of Immunoglobulin M Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Routine Diagnosis of Arboviral Infections. *J. Clin. Microbiol.*, vol. 38, no. 5, p. 1823.
- [154] BL Innis, A Nisalak, S Nimmannitya, S Kusalerdchariya, V Chongswasdi, S Suntayakorn, P Puttisri, CH Hoke (1989) An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate,” *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 40. no. 4, pp. 418–427, doi: 10.4269/AJTMH.1989.40.418.
- [155] G. Guzmán and G. KourI (2004) Dengue diagnosis , advances and challenges. *International Journal of Infectious Diseases*, vol. 8, 2004, doi: 10.1016/j.ijid.2003.03.003.

- [156] THT Nguyen, HE Clapham, KL Phung, HK Nguyen, TT Dinh, TH Quyen Nguyen, V N Tran, S Whitehead, C Simmond, M Wolbers, B Wills (2018) Methods to discriminate primary from secondary dengue during acute symptomatic infection. *BMC Infect. Dis.*, vol. 18, no. 1, pp. 1–10. doi: 10.1186/s12879-018-3274-7.
- [157] RMR Nogueira, MP Miagostovich, SMB Cavalcanti, KBF Marzochi, and HG Schatzmayr, (1992) Levels of IgM antibodies against dengue virus in Rio de Janeiro, Brazil. *Res. Virol.*, vol. 143, no. C, pp. 423–427, doi: 10.1016/S0923-2516(06)80136-6.
- [158] DW Vaughn, S Green, S Kalayanarooj, BL Innis, S Nimmannitya, S Suntayakorn, AL Rothman, FA Ennis, A Nisalak (1997) Dengue in the early febrile phase: viremia and antibody responses. *J. Infect. Dis.*, vol. 176, no. 2, pp. 322–330. doi: 10.1086/514048.
- [159] HE Prince and JL Matud (2011) Estimation of dengue virus IgM persistence using regression analysis. *Clin. Vaccine Immunol.*, vol. 18, no. 12, pp. 2183–2185, doi: 10.1128/CVI.05425-11.
- [160] N Houghton-Triviño, D Montaña, and JE Castellanos (2008) Dengue-yellow fever sera cross-reactivity; challenges for diagnosis,” *Rev. Salud Publica*, vol. 10. no. 2, pp. 299–307, doi: 10.1590/S0124-00642008000200010.
- [161] MPA van Meer, R Mögling, J Klaasse, FD Chandler, SD Pas, AA van der Eijk, MPG Koopmans, CBEM Reusken, CH GeurtsvanKessel (2017) Re-evaluation of routine dengue virus serology in travelers in the era of Zika virus emergence. *J. Clin. Virol.*, vol. 92, pp. 25–31, doi: 10.1016/J.JCV.2017.05.001.
- [162] AC Felix, NCS Souza, WM Figueiredo, AA Costa, M Inenami, RMG da Silva, JE Levi, CS Pannuti, CM Romano (2017) Cross reactivity of commercial anti-dengue immunoassays in patients with acute Zika virus infection. *J. Med. Virol.*, vol. 89, no. 8, pp. 1477–1479, doi: 10.1002/JMV.24789.
- [163] DS Burke and A Nisalak (1982) Detection of Japanese encephalitis virus immunoglobulin M antibodies in serum by antibody capture radioimmunoassay. *J. Clin. Microbiol.*, vol. 15, no. 3, p. 353
- [164] TP Monath, RR Nystrom, RE Bailey, CH Calisher, and DJ Muth (1984) Immunoglobulin M antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of St. Louis encephalitis,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 20. no. 4, p. 784
- [165] G Tardei, S Ruta S, V Chitu, C Rossi, TF Tsai, C Cernescu (2000) Evaluation of immunoglobulin M (IgM) and IgG enzyme immunoassays in serologic diagnosis of West Nile Virus infection. *J. Clin. Microbiol.*, vol. 38, no. 6, pp. 2232–2239, 2000. doi: 10.1128/JCM.38.6.2232-2239.2000.
- [166] RS Lanciotti, OL Kosoy, JJ Laven, JO Velez, AJ Lambert, AJ Johnson, MR Duffy (2008) Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic,

- Yap State, Micronesia. *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 14, no. 8, pp. 1232–1239, Aug. 2008, doi: 10.3201/EID1408.080287.
- [167] NP Lindsey, JE Staples, K Powell, IB Rabe, M Fischer, AM Powers, O Kosoy, EC Mossel, JL Munoz-Jordan, M Beltran, WT Hancock, KE Toews, EM Ellis, BR Ellis, AJ Panella, AJ Basile, AE Calvert, J Laven, CH Goodman, CM Gould, SW Martin, JD Thomas, J Villanueva, ML Mataia, R Sciulli, R Gose, AC Whelen, SL Hills (2018) Ability To Serologically Confirm Recent Zika Virus Infection in Areas with Varying Past Incidence of Dengue Virus Infection in the United States and U.S. Territories in 2016. *J. Clin. Microbiol.*, vol. 56, no. 1, doi: 10.1128/JCM.01115-17.
- [168] YW Chien, ZH Liu, FC Tseng, TC Ho, HR Guo, NY Ko, WC Ko, GC Perng (2018) Prolonged persistence of IgM against dengue virus detected by commonly used commercial assays. *BMC Infect Dis*, 2; 18(1):156. doi: 10.1186/s12879-018-3058-0.
- [169] Ministerio de Salud de la Nación Dirección de Epidemiología. Area de Análisis y Monitoreo de la Salud. (2009). Situación del dengue en Argentina. Primer semestre del 2009. *Boletín Epidemiológico Periódico*, Edición Especial. vol. 44, no. 1, pp. 7–11, 2009,
- [170] S Yacoub, J Mongkolsapaya, G Screaton. Recent advances in understanding dengue. *F1000Res*, 19; 5:F1000 Faculty Rev-78, doi: 10.12688/f1000research.6233.1.
- [171] JL San Martín, O Brathwaite, B Zambrano, JP Solórzano, A Bouckennooghe, GH Dayan, G Guzmán (2010). The Epidemiology of Dengue in the Americas Over the Last Three Decades: A Worrisome Reality. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 82, no. 1, pp. 128–135, doi: 10.4269/AJTMH.2010.09-0346.
- [172] JP Messina, OJ Brady, TW Scott, C Zou, DM Pigott, KA Duda, S Bhatt, L Katzelnick, RE Howes, KE Battle, CP Simmons, SI Hay (2014) Global spread of dengue virus types: Mapping the 70 year history,” *Trends Microbiol.*, vol. 22, no. 3, pp. 138–146, doi: 10.1016/j.tim.2013.12.011.
- [173] WB Messer, DJ Gubler, E Harris, K Sivananthan, and AM De Silva (2003) Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 9, no. 7, pp. 800–809, doi: 10.3201/eid0907.030038.
- [174] R Rico Hesse (2003) Microevolution and virulence of dengue viruses,” *Adv. Virus Res.*, vol. 59, pp. 315–341, doi: 10.1016/S0065-3527(03)59009-1.
- [175] EC Holmes and SS Twiddy (2003) The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect. Genet. Evol.*, vol. 3, no. 1, pp. 19–28, doi: 10.1016/S1567-1348(03)00004-2.
- [176] J Ramos-Castañeda, F Barreto dos Santos, R Martínez-Vega, J M Galvão de Araujo, G. Joint, and E Sarti (2017) Dengue in Latin America: Systematic Review of Molecular

- Epidemiological Trends. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–24, doi: 10.1371/journal.pntd.0005224.
- [177] F Touret, C Baronti, O Goethals, M Van Loock, X de Lamballerie, and G Querat (2019) Phylogenetically based establishment of a dengue virus panel, representing all available genotypes, as a tool in dengue drug discovery. *Antiviral Res.*, vol. 168, no. May, pp. 109–113, 2019, doi: 10.1016/j.antiviral.2019.05.005.
- [178] L Cuypers, PJK Libin, P Simmonds, A Nowé, J Muñoz-Jordán, LCJ Alcantara, AM Vandamme, GA Santiago, K Theys (2018) Time to harmonize dengue nomenclature and classification,” *Viruses*, vol. 10. no. 10. doi: 10.3390/v10100569.
- [179] C J Villabona-Arenas and PMA de Zanolto (2013) Worldwide Spread of Dengue Virus Type 1. *PLoS One*, vol. 8, no. 5, doi: 10.1371/journal.pone.0062649.
- [180] Dirección Nacional de Epidemiología y Análisis de Situación de Salud (2017) Boletín Integrado de Vigilancia. N° 391– SE 51, pp 1-99. Disponible en: <https://bancos.salud.gob.ar/recurso/boletin-integrado-de-vigilancia-n391-se51-26122017> (último acceso 30-08-2021)
- [181] Dirección Nacional de Epidemiología y Análisis de Situación de Salud (2018) Boletín Integrado de Vigilancia. N° 433 SE 51, pp. 1–38. Disponible en: <https://bancos.salud.gob.ar/recurso/boletin-integrado-de-vigilancia-n433-se51-28122018>(último acceso 30-08-2021)
- [182] Dirección Nacional de Epidemiología y Análisis de Situación de Salud (2019) Boletín Integrado de Vigilancia. N° 479 SE 52, pp 1- 45. Disponible en: <https://bancos.salud.gob.ar/recurso/boletin-integrado-de-vigilancia-n479-se52-30122019>(último acceso 30-08-2021)
- [183] Dirección Nacional de Epidemiología y Análisis de Situación de Salud (2020) Boletín Integrado de Vigilancia. N° 530 SE 1-53, Edición especial: Vigilancia de COVID-19 y Vigilancia de Arbovirosis pp. 1–37. Disponible en: <https://bancos.salud.gob.ar/recurso/boletin-integrado-de-vigilancia-n530-se-1-532020> (último acceso 30-08-2021)
- [184] LM Carosella, D Pryluka, A. Maranzana, L Barcan, R Cuini, C Freuler, ME Stryjewski (2021) Characteristics of Patients Co-infected with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 27, no. 2, 2021.
- [185] G Avilés, J Meissner, R Mantovani, S St Jeor (2003) Complete coding sequences of dengue-1 viruses from Paraguay and Argentina,” *Virus Res.*, vol. 98, no. 1, pp. 75–82, 2003, doi: 10.1016/J.VIRUSRES.2003.08.018.
- [186] PR Barrero and AS Mistchenko (2008) Genetic analysis of Dengue virus type 3 isolated in Buenos Aires, Argentina. *Virus Res.*, vol. 135, no. 1, pp. 83–88, doi:

- 10.1016/j.virusres.2008.02.013.
- [187] E Tittarelli, A S Mistchenko, and PR Barrero (2014) Dengue virus 1 in buenos aires from 1999 to 2010: Towards local spread,” *PLoS One*, vol. 9, no. 10. doi: 10.1371/journal.pone.0111017.
- [188] R Rico Hesse (1990) Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*, vol. 174, no. 2, pp. 479–493, 1990. doi: 10.1016/0042-6822(90)90102-W.
- [189] AP Goncalvez, AA Escalante, FH Pujol, JE Ludert, D Tovar, RA Salas, FG Liprandi (2002) Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1,” *Virology*, vol. 303, no. 1, pp. 110–119, 2002, doi: 10.1006/VIRO.2002.1686.
- [190] KP Hwang, PY Chu, YC Tung, HL Wang, YY Yueh, YC Wu, C Chin, KH Lin (2003) Molecular epidemiological study of dengue virus type 1 in Taiwan,” *J. Med. Virol.*, vol. 70. no. 3, pp. 404–409, Jul. 2003, doi: 10.1002/JMV.10410.
- [191] GA Santiago, GL González, F Cruz-López, and JL Muñoz-Jordan (2018) Development of a standardized sanger-based method for partial sequencing and genotyping of dengue viruses,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 57, no. 4, pp. 1–11, doi: 10.1128/JCM.01957-18.
- [192] F de Bruycker-Nogueira, D Mir, F B dos Santos, and G Bello (2016) Evolutionary history and spatiotemporal dynamics of DENV-1 genotype V in the Americas. *Infect. Genet. Evol.*, vol. 45, pp. 454–460. doi: 10.1016/J.MEEGID.2016.09.025.
- [193] F de Bruycker-Nogueira, RM Nogueira, NR Faria, JB Simões, PC Nunes, AM de Filippis, FB dos Santos (2015) Insights of the genetic diversity of DENV-1 detected in Brazil in 25years: Analysis of the envelope domain III allows lineages characterization. *Infect. Genet. Evol.*, vol. 34, pp. 126–136, doi: 10.1016/j.meegid.2015.07.007.
- [194] J DJ Diaz Aquino, W-F Tang, R Ishii, T Ono, Y Eshita, H Aono, Y Makino (2008) Molecular epidemiology of dengue virus serotypes 2 and 3 in Paraguay during 2001-2006: The association of viral clade introductions with shifting serotype dominance. *Virus Res.*, vol. 137, no. 2, pp. 266–270. 2008.
- [195] SN Bennett, EC Holmes, M Chirivella, DM Rodriguez, M Beltran, V Vorndam, DJ Gubler , WO McMillan (2002) Selection-Driven Evolution of Emergent Dengue Virus. *Mol Biol Evol.* 20(10):1650-8, doi: 10.1093/molbev/msg182.
- [196] M Vilsker, Y Moosa, S Nooij, V Fonseca, Y Ghysens, K Dumon, R Pauwels, LC Alcantara, E Vanden Eynden, AM Vandamme, K Deforche, T de Oliveira (2019) Genome Detective: an automated system for virus identification from high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, vol. 35, no. 5, pp. 871–873, Mar. 2019, doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/BTY695.
- [197] V Fonseca, PJK Libin, K Theys, NR Faria, MRT Nunes, MI Restovic, M Freire, M

- Giovanetti, L Cuypers, A Nowé, A Abecasis, K Deforche, GA Santiago, IC Siqueira, EJ San, KCB Machado, V Azevedo, AMB Filippis, RVD Cunha, OG Pybus, AM Vandamme, LCJ Alcantara, T de Oliveira (2019) A computational method for the identification of Dengue, Zika and Chikungunya virus species and genotypes,” *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 13, no. 5, p. e0007231, doi: 10.1371/JOURNAL.PNTD.0007231.
- [198] K Tamura, G Stecher, D Peterson, A Filipski, S Kumar (2013) MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, vol. 30. no. 12, pp. 2725–2729, doi: 10.1093/MOLBEV/MST197.
- [199] D Posada (2008) jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.*, vol. 25, no. 7, pp. 1253–1256, doi: 10.1093/molbev/msn083.
- [200] S Kalyaanamoorthy, BQ Minh, TKF Wong, A von Haeseler, LS Jermin (2017) ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. *Nat. Methods*, vol. 14, no. 6, pp. 587–589, doi: 10.1038/NMETH.4285.
- [201] LT Nguyen, HA Schmidt, A von Haeseler, and BQ Minh (2015) IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, vol. 32, no. 1, pp. 268–274, doi: 10.1093/MOLBEV/MSU300.
- [202] BQ Minh, MAT Nguyen, and A von Haeseler (2013) Ultrafast Approximation for Phylogenetic Bootstrap. *Mol. Biol. Evol.*, vol. 30. no. 5, pp. 1188–1195, doi: 10.1093/MOLBEV/MST024.
- [203] RS Lanciotti, JG Lewis, DJ Gubler, DW Trent (1994) Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J. Gen. Virol.*, vol. 75 (Pt 1), no. 1, pp. 65–75, 1994, doi: 10.1099/0022-1317-75-1-65.
- [204] SS Twiddy, EC Holmes, and A. Rambaut (2003) Inferring the Rate and Time-Scale of Dengue Virus Evolution. *Mol. Biol. Evol.*, vol. 20. no. 1, pp. 122–129, doi: 10.1093/MOLBEV/MSG010.
- [205] C Koo, WP Tien, H Xu, J Ong, J Rajarethinam, YL Lai, LC Ng, HC Hapuarachchi (2018) Highly Selective Transmission Success of Dengue Virus Type 1 Lineages in a Dynamic Virus Population: An Evolutionary and Fitness Perspective. *iScience*, vol. 6, pp. 38–51, doi: 10.1016/j.isci.2018.07.008.
- [206] C Klungthong, R Putnak, MP Mammen, T Li, and CZhang (2008) Molecular genotyping of dengue viruses by phylogenetic analysis of the sequences of individual genes. *J. Virol. Methods*, vol. 154, no. 1–2, pp. 175–181, doi: 10.1016/J.JVIROMET.2008.07.021.
- [207] H Zhang, Y Zhang, R Hamoudi, G Yan, X Chen, and Y Zhou (2014) Spatiotemporal characterizations of dengue virus in mainland China: Insights into the whole genome from 1978 to 2011,” *PLoS One*, vol. 9, no. 2, pp. 1–10. doi:

- 10.1371/journal.pone.0087630.
- [208] BP Drumond, A Mondini, DJ Schmidt, I Bosch, and M L. Nogueira (2012) Population dynamics of DENV-1 genotype V in Brazil is characterized by co-circulation and strain/lineage replacement. *Arch. Virol.*, vol. 157, no. 11, pp. 2061–2073, doi: 10.1007/s00705-012-1393-9.
- [209] F de Bruycker-Nogueira, D Mir, F. B. dos Santos, and G Bello (2016) Evolutionary history and spatiotemporal dynamics of DENV-1 genotype V in the Americas. *Infect. Genet. Evol.*, vol. 45, pp. 454–460. doi: 10.1016/j.meegid.2016.09.025.
- [210] SP Yenamandra, C Koo, S Chiang, HSJ Lim, ZY Yeo, LC Ng, HC Hapuarachchi (2021) Evolution, heterogeneity and global dispersal of cosmopolitan genotype of Dengue virus type 2,” *Sci. Rep.*, vol. 11, no. 1, pp. 1–15, doi: 10.1038/s41598-021-92783-y.
- [211] D Mir, H Romero, LM Fagundes De Carvalho, and GBello (2014) Spatiotemporal dynamics of DENV-2 Asian-American genotype lineages in the Americas,” *PLoS One*, vol. 9, no. 6, doi: 10.1371/journal.pone.0098519.
- [212] NM Nguyen, DTH Kien, TV Tuan, NTH Quyen, CNB Tran..CP Simmons (2013) Host and viral features of human dengue cases shape the population of infected and infectious *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110 (22) 9072-9077; doi: 10.1073/pnas.1303395110.
- [213] VH Aquino, AA Amarilla, HL Alfonso, WC Batista, and LTM Figueiredo (2009) New Genotype of Dengue Type 3 Virus Circulating in Brazil and Colombia Showed a Close Relationship to Old Asian Viruses. *PLoS One*, vol. 4, no. 10. pp. 1–8, 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0007299.
- [214] L Barcelos Figueiredo, A Batista Cecílio, G Portela Ferreira, B Paiva Drumond, J Germano de Oliveira, CA Bonjardim, PC Peregrino Ferreira, EG Kroon (2008) Dengue virus 3 genotype 1 associated with dengue fever and dengue hemorrhagic fever, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 14, no. 2, pp. 314–316, doi: 10.3201/eid1402.070278.
- [215] PR Barrero, AS Mistchenko (2008) Genetic analysis of dengue virus type 3 isolated in Buenos Aires, Argentina,” *Virus Res.*, vol. 135, no. 1, pp. 83–88, doi: 10.1016/J.VIRUSRES.2008.02.013.
- [216] CJ Villabona-Arenas and PM de A. Zanotto (2011) Evolutionary history of Dengue virus type 4: Insights into genotype phylodynamics,” *Infect. Genet. Evol.*, vol. 11, no. 5, pp. 878–885, doi: 10.1016/j.meegid.2011.02.007.
- [217] T Gräf, C Vazquez, M Giovanetti, F de Bruycker-Nogueira, V Fonseca, I Claro, I...L Alcantara (2021) Epidemiologic history and genetic diversity origins of chikungunya and dengue viruses, paraguay. *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 27, no. 5, pp. 1393–1404, doi:

- 10.3201/EID2705.204244.
- [218] A Wilder-Smith, LH Chen, E Massad, and ME Wilson (2009) Threat of Dengue to Blood Safety in Dengue-Endemic Countries. *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 15, no. 1, p. 8, doi: 10.3201/EID1501.071097.
- [219] B Pozzetto, M Memmi, and O Garraud (2015) Is transfusion-transmitted dengue fever a potential public health threat?. *World J. Virol.*, vol. 4, no. 2, p. 113, doi: 10.5501/WJV.V4.I2.113.
- [220] SL Stramer, FB Hollinger, LM Katz, S Kleinman, PS Metzler, KR Gregory, RY Dodd (2009) Emerging infectious disease agents and their potential threat to transfusion safety. *Transfusion*, vol. 49, no. SUPPL. 2, pp. 1S-29S, doi: 10.1111/J.1537-2995.2009.02279.X.
- [221] WMPB Wahala and AM de Silva (2011) The human antibody response to dengue virus infection. *Viruses*, vol. 3, no. 12, pp. 2374–2395, doi: 10.3390/v3122374.
- [222] A Gordon, G Kuan, JC Mercado, L Gresh, W Avilés, A Balmaseda, E Harris (2013) The Nicaraguan Pediatric Dengue Cohort Study: Incidence of Inapparent and Symptomatic Dengue Virus Infections, 2004–2010.” *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 7, no. 9, p. e2462, doi: 10.1371/JOURNAL.PNTD.0002462.
- [223] R Iturrino-Monge, ML Avila-Agüero, CR Avila-Agüero, T Moya-Moya, A Cañas-Coto, K Camacho-Badilla, B Zambrano-Mora (2006) Seroprevalence of dengue virus antibodies in asymptomatic Costa Rican children, 2002-2003: a pilot study 1,” *Rev Panam Salud Publica/Pan Am J Public Heal.*, vol. 20. no. 1.
- [224] V Duong, L Lambrechts, RE Paul, S Ly, RS Lay, KC Long, R Huy, A Tarantola, TW Scott , A Sakuntabhai, P Buchy (2015) Asymptomatic humans transmit dengue virus to mosquitoes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 112, no. 47, pp. 14688–14693, doi: 10.1073/PNAS.1508114112.
- [225] H Nishiura and SB Halstead (2007) Natural History of Dengue Virus (DENV)-1 and DENV-4 Infections: Reanalysis of Classic Studies. *Nat. Hist. Dengue JID*, p. 1007, doi: 10.1086/511825.
- [226] HT Duyen, TV Ngoc, T Ha do, VT Hang, NT Kieu, PR Young, JJ Farrar, CP Simmons, M Wolbers, BA Wills (2011) Kinetics of Plasma Viremia and Soluble Nonstructural Protein 1 Concentrations in Dengue: Differential Effects According to Serotype and Immune Status,” *J Infect Dis*, 203(9):1292-300. doi: 10.1093/infdis/jir014.
- [227] BM Althouse, AP Durbin, KA Hanley, SB Halstead, SC Weaver, and DAT Cummings (2014) Viral kinetics of primary dengue virus infection in non-human primates: A systematic review and individual pooled analysis. *Virology*, vol. 452–453, no. March, pp. 237–246, doi: 10.1016/j.virol.2014.01.015.

- [228] EA Hunsperger, KL McElroy, K Bessoff, C Colón, R Barrera, and J L Muñoz-Jordán (2009) West Nile Virus from Blood Donors, Vertebrates, and Mosquitoes, Puerto Rico, 2007. *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 15, no. 8, p. 1298, doi: 10.3201/EID1508.090333.
- [229] PA Tambyah, ESC Koay, MLM Poon, RVTP Lin, and BKC Ong (2008) Dengue Hemorrhagic Fever Transmitted by Blood Transfusion. *N. Engl. J. Med.*, vol. 359, no. 14, pp. 1526–1527, doi: 10.1056/nejmc0708673.
- [230] V Chuang, TY Wong, YH Leung, E Ma, YL Law, O Tsang, KM Chan, I Tsang, , TL Que, R Yung, SH Liu (2008) Review of dengue fever cases in Hong Kong during 1998 to 2005. *Hong Kong Med J*, 14(3):170-7.
- [231] JE Levi (2016) Dengue virus and blood transfusion,” *J. Infect. Dis.*, vol. 212, no. 11, pp. 689–690. doi: 10.1093/infdis/jiv322.
- [232] JM Linnen, E Vinelli, EC Sabino, LH Tobler, C Hyland, TH Lee, DP Kolk, AS Broulik, CS Collins, RS Lanciotti, MP Busch (2008) Dengue viremia in blood donors from Honduras, Brazil, and Australia. *Transfusion*, vol. 48, no. 7, pp. 1355–1362, doi: 10.1111/J.1537-2995.2008.01772.X.
- [233] KM Tomashek and HS Margolis(2011) Dengue: A potential transfusion-transmitted disease. *Transfusion*, vol. 51, no. 8, pp. 1654–1660. doi: 10.1111/J.1537-2995.2011.03269.X.
- [234] DA Enría, MA Morales, CM Fabbi (2008) Capítulo Dengue, en: *Infectología y Enfermedades Infecciosas*. E. Cecchini and S. E. González Ayala, Ediciones Journal, 1 ed, pp 1-1157, CABA, Argentina.
- [235] C Hennekens (1987) *Analysis of Epidemiologic Studies: Evaluating the role of confounding*, 1st edition. Boston Massachusetts: Little Brown.
- [236] K Tamura, D Peterson, N Peterson, G Stecher, M Nei, S Kumar(2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, vol. 28, no. 10. pp. 2731–2739, Oct. 2011, doi: 10.1093/MOLBEV/MSR121.
- [237] JP Huelsenbeck and FRonquist (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees,” *Bioinformatics*, vol. 17, no. 8, pp. 754–755, doi: 10.1093/BIOINFORMATICS/17.8.754.
- [238] J Arroyo, CA Miller, J Catalan, and TP Monath, “Yellow fever vector live-virus vaccines: West Nile virus vaccine development. *Trends Mol. Med.*, vol. 7, no. 8, p. 350. doi: 10.1016/S1471-4914(01)02048-2.
- [239] KV Pugachev, F Guirakhoo, F Mitchell, S Ocrum, M Parson, BW Johnson , OL Kosoy, RS Lanciotti, JT Roehrig, DW Trent, TH Monath (2004) Construction of yellow fever/St. Louis encephalitis chimeric virus and the use of chimeras as a diagnostic tool.

- Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 71, no. 5, pp. 639–645, doi: 10.4269/AJTMH.2004.71.639.
- [240] V Tricou, NN Minh, J Farrar, HT Tran, and CP Simmons (2011) Kinetics of viremia and NS1 antigenemia are shaped by immune status and virus serotype in adults with dengue. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 5, no. 9, doi: 10.1371/journal.pntd.0001309.
- [241] MP Busch, EC Sabino, D Brambilla, ME Lopes, L Capuani, D Chowdhury, C McClure, JM Linnen, H Prince, G Simmons, TH Lee, S Kleinman, B Custer (2016) Duration of Dengue Viremia in Blood Donors and Relationships Between Donor Viremia, Infection Incidence and Clinical Case Reports During a Large Epidemic. *J. Infect. Dis.*, vol. 214, no. 1, p. 49, doi: 10.1093/INFDIS/JIW122.
- [242] LB Carrington and CP Simmons (2014) Human to mosquito transmission of dengue viruses. *Front. Immunol.*, vol. 5, no. JUN, pp. 1–8, doi: 10.3389/fimmu.2014.00290.
- [243] PA Tambyah, ESC Koay, MLM. Poon, RVT P Lin, and B K C Ong (2009) Dengue Hemorrhagic Fever Transmitted by Blood Transfusion. vol. 359, no. 14, pp. 1526–1527, doi: 10.1056/NEJMC0708673.
- [244] HB Oh, V Muthu, ZJ Daruwalla, SY Lee, ES Koay, and PA Tambyah (2015) Bitten by a bug or a bag? Transfusion-transmitted dengue: a rare complication in the bleeding surgical patient. *Transfusion*, vol. 55, pp. 1655–1661.
- [245] JE Levi, A Nishiya, AC Félix, NA Salles, LR Sampaio, F Hangai, EC Sabino, A Jr Mendrone (2015) Real-time symptomatic case of transfusion-transmitted dengue,” *Transfusion*, vol. 55, no. 5, pp. 961–964, doi: 10.1111/TRF.12944.
- [246] SL Stramer, JM Linnen, JM Carrick, GA Foster, DE Krysztof DE, Zou S, Dodd RY, Tirado-Marrero LM, Hunsperger E, Santiago GA, Muñoz-Jordan JL, Tomashek KM (2012) Dengue viremia in blood donors identified by RNA and detection of dengue transfusion transmission during the 2007 dengue outbreak in Puerto Rico,” *Transfusion*, vol. 52, no. 8, pp. 1657–1666, doi: 10.1111/J.1537-2995.2012.03566.X.
- [247] G Añez, DA Heisey, C Chancey, RC Fares, LM Espina, KP Souza, A Teixeira-Carvalho, DE Krysztof, GA Foster, SL Stramer, M Rios (2016) Distribution of Dengue Virus Types 1 and 4 in Blood Components from Infected Blood Donors from Puerto Rico,” *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 10. no. 2, p. e0004445, doi: 10.1371/JOURNAL.PNTD.0004445.
- [248] K Rooks, CR Seed, JJ Fryk, CA Hyland, RJ Harley, JA Holmberg, DC Marks, RL Flower, HM Faddy (2016) Mitigating the Risk of Transfusion-Transmitted Dengue in Australia. *J Blood Transfus*, 2016:3059848. doi: 10.1155/2016/3059848.
- [249] R Kulkarni, D Tiraki, D Wani, AC Mishra, and VA Arankalle (2019) Risk of transfusion-associated dengue: screening of blood donors from Pune, western India. *Transfusion*, vol. 59, no. 2, pp. 458–462, doi: 10.1111/TRF.15007.

- [250] H Mohammed, JM Linnen, JL Muñoz-Jordán, K Tomashek, G Foster, AS Broulik, L Petersen, SL Stramer D (2008) Dengue virus in blood donations, Puerto Rico, 2005. *Transfusion*, vol. 48, no. 7, pp. 1348–1354, doi: 10.1111/J.1537-2995.2008.01771.X.
- [251] D Matos, KM Tomashek, J Perez-Padilla, J Muñoz-Jordán, E Hunsperger E, K Horiuchi, D Noyd, C Winton, G Foster, M Lanteri, JM Linnen, SL Stramer (2016) Probable and possible transfusion-transmitted dengue associated with NS1 antigen-negative but RNA confirmed-positive red blood cells,” *Transfusion*, vol. 56, no. 1, pp. 215–222, doi: 10.1111/trf.13288.
- [252] KE Jones, NG Patel, MA Levy, A Storeygard, D Balk, JL Gittleman, P Daszak (2008) Global trends in emerging infectious diseases, *Nat. 2008 4517181*, vol. 451, no. 7181, pp. 990–993, doi: 10.1038/nature06536.
- [253] NR Faria, RDSDS Azevedo, MUG Kraemer, R Souza, MS Cunha, SC Hill, J Thézé, MB Bonsall, TA Bowden, I Rissanen, IM Rocco, JS Nogueira, AY Maeda, FGDS Vasami, FLL Macedo, A Suzuki, SG Rodrigues, ACR Cruz, BT Nunes, DBA Medeiros, DSG Rodrigues, ALN Queiroz, EVP da Silva, DF Henriques, da Rosa EST, de Oliveira CS, Martins LC, Vasconcelos HB, Casseb LMN, Simith DB, JP Messina, L Abade, J Lourenço, LCJ Alcantara, MM de Lima, M Giovanetti, SI Hay, RS de Oliveira, PDS Lemos, LF de Oliveira, CPS de Lima, SP da Silva, JM de Vasconcelos, L Franco, JF Cardoso, JLDSG Vianez-Júnior, D Mir, G Bello, E Delatorre, K Khan, M Creatore, GE Coelho, WK de Oliveira, R Tesh, OG Pybus, MRT Nunes, PFC, Vasconcelos (2016) Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings,” *Science (80-.)*, vol. 352, no. 6283, pp. 345–349, doi: 10.1126/SCIENCE.AAF5036.
- [254] LR Petersen, JT Roehrig (2001) West Nile virus: a reemerging global pathogen. *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 7, no. 4, pp. 611–614, doi: 10.3201/EID0704.010401.
- [255] LR Petersen, DJ Jamieson, AM Powers, MA Honein (2016) Zika Virus. *N. Engl. J. Med.*, vol. 374, no. 16, pp. 1552–1563, doi: 10.1056/NEJMRA1602113.
- [256] L Lindquist (2018) Recent and historical trends in the epidemiology of Japanese encephalitis and its implication for risk assessment in travellers. *J. Travel Med.*, vol. 25, no. 1, pp. 3–9, doi: 10.1093/jtm/tay006.
- [257] N Vasilakis, J Cardosa, KA Hanley, EC Holmes, and SCWeaver (2011) Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health,” *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 9, no. 7, p. 532, doi: 10.1038/NRMICRO2595.
- [258] ML de Figueiredo, A de C Gomes, AA Amarilla, AS Leandro, AS Orrico, RF de Araujo, J doSM Castro, EL Durigon, VH Aquino and LTM Figueiredo (2010) “Mosquitoes infected with dengue viruses in Brazil,” *Virol. J.*, vol. 7, no. Table 1, pp. 1–5.
- [259] TJ Davies and AB Pedersen (2008) Phylogeny and geography predict pathogen

- community similarity in wild primates and humans. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 275, no. 1643, pp. 1695–1701, doi: 10.1098/rspb.2008.0284.
- [260] C Nunn and S Altizer (2010) Infectious Diseases in Primates: Behavior, Ecology and Evolution. *Infect. Dis. Primates Behav. Ecol. Evol.*, pp. 1–400. doi: 10.1093/ACPROF:OSO/9780198565857.001.0001.
- [261] GE Zunino and MM Kowalewski (2008) Primate Research and Conservation in Northern Argentina: The Field Station Corrientes (Estación Biológica de Usos Múltiples –EBCo),” *Trop. Conserv. Sci.*, vol. 1, no. 2, pp. 140–150. doi: 10.1177/194008290800100206.
- [262] MP Sánchez-Seco, D Rosario, C Domingo, L Hernández, K Valdés, MG Guzmán, A Tenorio (2005) Generic RT-nested-PCR for detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control followed by sequencing for specific identification, *J. Virol. Methods*, vol. 126, no. 1–2, pp. 101–109, doi: 10.1016/J.JVIROMET.2005.01.025.
- [263] RB Tesh, APA Travassos Da Rosa, H Guzman, TP Araujo, and SY Xiao (2002) Immunization with Heterologous Flaviviruses Protective Against Fatal West Nile Encephalitis, *Emerg. Infect. Dis.* vol. 8, no. 3, 2002.
- [264] LS Catenacci, M Ferreira, LC Martins, KM De Vleeschouwer, CR Cassano, LC Oliveira, G Canale, SL Deem, JS Tello, P Parker, PFC Vasconcelos, ES Travassos da Rosa (2018) Surveillance of Arboviruses in Primates and Sloths in the Atlantic Forest, Bahia, Brazil,” *EcoHealth*, 154, vol. 15, no. 4, pp. 777–791, doi: 10.1007/S10393-018-1361-2.
- [265] MJ Valentine, CC Murdock, and PJ Kelly (2019) Sylvatic cycles of arboviruses in non-human primates,” *Parasites and Vectors*, vol. 12, no. 1, pp. 1–18, doi: 10.1186/s13071-019-3732-0.
- [266] I Holzmann, I Agostini, JI Areta, H Ferreyra, P Beldomenico, MS Di Bitetti (2010) Impact of yellow fever outbreaks on two howler monkey species (*Alouatta guariba clamitans* and *A. caraya*) in Misiones, Argentina. *Am. J. Primatol.*, vol. 72, no. 6, pp. 475–480. doi: 10.1002/AJP.20796.
- [267] MA de Almeida, E Dos Santos, J da Cruz Cardoso, DF da Fonseca, CA Noll, VR Silveira, AY Maeda, RP de Souza, C Kanamura, RA Brasil (2012) Yellow fever outbreak affecting *Alouatta* populations in southern Brazil (Rio Grande do Sul State), 2008–2009. *Am. J. Primatol.*, vol. 74, no. 1, pp. 68–76, doi: 10.1002/AJP.21010.
- [268] GC Rossi, NT Pascual, and F J Krsticevic (1999) First record of *Aedes albopictus* (Skuse) from Argentina. *J. Am. Mosq. Control Assoc.*, vol. 15, no. 3, p. 422.
- [269] AA Lizuain, M Leporace, MS Santini, ME Utgés and N Schweigmann (2019) Update on the distribution of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Misiones, Argentina. *Rev.*

- Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, vol. 61, doi: 10.1590/S1678-9946201961046.
- [270] S. Goenaga, A. Chuchuy, M. V. Micieli, B. Natalini, J. Kuruc, and M. Kowalewski (2020) Expansion of the distribution of *aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): New records in Northern Argentina and their implications from an epidemiological perspective. *J. Med. Entomol.*, vol. 57, no. 4, pp. 1310–1313, doi: 10.1093/jme/tjaa009.
- [271] EA Gould and S Higgs (2009) Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 103, no. 2, p. 109, doi: 10.1016/J.TRSTMH.2008.07.025.
- [272] PAHO/WHO (2020) Actualización Epidemiológica Dengue y otras Arbovirosis, pp. 1–15, Disponible en : <https://www.paho.org/es/documentos/actualizacion-epidemiologica-dengue-otras-arbovirosis-10-junio-2020> (ultimo acceso 30-08-2021)
- [273] PAHO/WHO (2017) Estrategia de Gestión Integrada para la prevención y control del dengue en la Región de las Américas, pp. 1–70. Available: https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/34859/OPSCHA17039_spa.pdf?sequence=8&isAllowed=y ((ultimo acceso 30-08-2021)
- [274] KY Pok, YL Lai, J Sng, and LC Ng (2010) Evaluation of nonstructural 1 antigen assays for the diagnosis and surveillance of dengue in Singapore. *Vector-Borne Zoonotic Dis.*, vol. 10. no. 10. pp. 1009–1016, doi: 10.1089/vbz.2008.0176.
- [275] D Gyurech, J Schilling, J Schmidt-Chanasit, P Cassinotti, F Kaeppli, and M Dobec (2016) False positive dengue NS1 antigen test in a traveller with an acute Zika virus infection imported into Switzerland. *Swiss Med. Wkly.*, vol. 146, no. February, p. w14296, doi: 10.4414/smw.2016.14296.
- [276] Y Firmansyah, J Elizabeth, H Hendsun, and D Gosal (2020) Case Report: False-Positive Dengue Non-Structural Protein 1 Antigen in a Patient with COVID-19 Infection. *Arch. Clin. Med.*, vol. 26, no. 2, pp. 20–23, doi: 10.21802/acm.2020.2.10.
- [277] I Griffin, SW Martin, M Fischer, TV Chambers, O Kosoy, A Falise, O Ponomareva, LD Gillis, C Blackmore, RJean (2019) Zika virus IgM detection and neutralizing antibody profiles 12–19 months after illness onset. *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 25, no. 2, pp. 299–303, doi: 10.3201/eid2502.181286.
- [278] AE Calvert, K Horiuchi, KL Boroughs, YT Ong, KM Anderson, BJ Biggerstaff, M Stone, G Simmons, MP Busch, CY Huang (2021) The Specificity of the Persistent IgM Neutralizing Antibody Response in Zika Virus Infections among Individuals with Prior Dengue Virus Exposure. *J. Clin. Microbiol.*, vol. 59, no. 8, doi: 10.1128/jcm.00400-21.
- [279] DA Martin, BJ Biggerstaff, B Allen, AJ Johnson, RS Lanciotti, and JT Roehrig (2002) Use of immunoglobulin M cross-reactions in differential diagnosis of human flaviviral encephalitis infections in the United States. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, vol. 9, no. 3, pp.

- 544–549, doi: 10.1128/CDLI.9.3.544-549.2002.
- [280] J Loroño-Pino M, Ellis C, Shaw K, Blitvich B, Beaty B, et al. (2011) The evaluation of widely used diagnostic tests to detect West Nile virus infections in horses previously infected with St. Louis encephalitis or dengue virus. *Clin Vaccine Immunol*, 18: 580–587
- [281] PJ Patiris , LF Oceguera , Peck GW, Chiles RE, WK Reisen , CV Hanson (2008) Serologic diagnosis of West Nile and St. Louis encephalitis virus infections in domestic chickens. *Am J Trop Med Hyg*, 78:434–441, pmid:18337340.
- [282] ME Smith, AM Targovnik, J Cerezo, MA Morales, MV Miranda, and JR Talou (2017) Integrated process for the purification and immobilization of the envelope protein domain III of dengue virus type 2 expressed in *Rachiplusia* nu larvae and its potential application in a diagnostic assay. *Protein Expr. Purif.*, vol. 131, pp. 76–84, doi: 10.1016/J.PEP.2016.11.007.
- [283] J Cerezo, AM Targovnik, ME Smith, D González Maglio, VC Luppo, MA Morales, MV Miranda, J Rodríguez Talou (2020) Simple production of hydrophobin-fused domain III of dengue envelope protein and induction of neutralizing antibodies against the homotypic serotype of dengue virus,” *Biotechnol. Lett.*, vol. 42, no. 3, pp. 419–428, doi: 10.1007/S10529-019-02767-2.
- [284] SJ Wong, RH Boyle, VL Demarest, AN Woodmansee, LD Kramer, H Li, M Drebot, RA Koski, E Fikrig, DA Martin, PY Shi (2003) Immunoassay Targeting Nonstructural Protein 5 To Differentiate West Nile Virus Infection from Dengue and St. Louis Encephalitis Virus Infections and from Flavivirus Vaccination. *J. Clin. Microbiol.*, vol. 41, no. 9, p. 4217, doi: 10.1128/JCM.41.9.4217-4223.2003.
- [285] MB Simari, SE Goñi, VC Luppo, CM Fabbri, MH Argüelles, ME Lozano, MA Morales, NG Iglesias (2019) Specific diagnostic method for St. Louis encephalitis virus using a non-structural protein as the antigen. *J Gen Virol*. 2019 Dec 17. doi: 10.1099/jgv.0.001359. PMID: 31846411.
- [286] WHO (2018) Dengue vaccines: WHO position paper. Disponible en: https://www.who.int/immunization/policy/position_papers/who_pp_dengue_2018_summary.pdf?ua=1. (ultimo acceso: 30-08-2021)
- [287] Althouse BM, Hanley KA, Diallo M, Sall AA, Ba Y, Faye O, Diallo D, Watts DM, Weaver SC, Cummings DA (2015) Impact of climate and mosquito vector abundance on sylvatic arbovirus circulation dynamics in senegal,” *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 92, no. 1, pp. 88–97, doi: 10.4269/ajtmh.13-0617.
- [288] A Aliaga-Samanez, M Cobos-Mayo, R Real, M Segura, D Romero, JE Fa, J Olivero (2021) Worldwide dynamic biogeography of zoonotic and anthroponotic dengue,” *PLoS*

Negl. Trop. Dis., vol. 15, no. 6, pp. 1–30. doi: 10.1371/journal.pntd.0009496.

- [289] A. Rubio, MV Cardo, D Vezzani, and AE Carbajo (2020) *Aedes aegypti* spreading in South America: New coldest and southernmost records. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, vol. 115, no. 4, pp. 1–4, doi: 10.1590/0074-02760190496.