

EPIDEMIA POR VIRUS DENGUE-2 EN SALTA, ARGENTINA, 1998*

GABRIELA AVILES¹, GRISELDA RANGEON², PABLO BARONI¹, VALERIA PAZ¹,
MARIA MONTEROS², JOSE LUIS SARTINI², DELIA ENRIA¹¹ Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas (INEVH) Dr. Julio I. Maiztegui, ANLIS, Pergamino;² Ministerio de Salud, Salta

Resumen La reemergencia del dengue (DEN) en la Argentina fue primero detectada en Salta en 1997. Se determinó por serología y PCR que el virus DEN-2 estuvo asociado a casos esporádicos y transmisión autóctona. La implementación de un sistema de vigilancia permitió la detección de un brote en esa área varios meses después. Se diagnosticaron en total 378 casos de DEN de 646 (58%) estudiados por laboratorio. Los casos se distribuyeron en 10 localidades de esta provincia entre el 3 de enero y el 31 de mayo de 1998. El virus DEN-2 se recuperó en un caso por aislamiento y en 4 por PCR de pacientes provenientes de las localidades de Orán y Embarcación. Los hombres y las mujeres fueron afectados en una tasa similar (1:1), con un porcentaje de adultos (82.5%) casi cinco veces superior al de niños menores de 15 años (17.5%). Clínicamente, todos los casos correspondieron a DEN clásico. Esta es la primera vez que se diagnostica por laboratorio una epidemia de DEN en la Argentina y también la primera vez que se aisló el virus DEN en este país.

Abstract *Outbreak of Dengue-2 virus in Salta, Argentina, 1998.* Dengue (DEN) reemergence was first detected in Salta, Argentina, in 1997. It was confirmed by serology and PCR that DEN-2 virus was responsible for sporadic cases and indigenous transmission. A laboratory-based surveillance system allowed the detection of an outbreak in Salta several months later. In total, 378 DEN cases were laboratory diagnosed out of 646 (58%) studied. The cases were distributed in 10 localities of the province between January 3rd and May 31st, 1998. One DEN-2 viral isolation and 4 PCR products were obtained from patients coming from Orán and Embarcación localities. Male and female cases occurred at a similar rate (1:1), with adult cases (82.5%) nearly five times greater than for children under 15 years-old (17.5%). Clinically, all cases corresponded to classic DEN. This is the first time that a DEN outbreak has been laboratory-diagnosed in Argentina and also the first time that DEN virus has been isolated in this country.

Key words: dengue, arboviruses, flaviviruses, outbreak, Argentina

El dengue (DEN) es una enfermedad viral transmitida por mosquitos causada por uno de cuatro virus antigénicamente diferentes pero relacionados: DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4. Los virus DEN pertenecen a la familia *Flaviviridae*, género *Flavivirus*. Las partículas virales son envueltas, con un diámetro de 40-50 nm y contienen ARN (sentido +) de simple cadena. La fiebre del DEN se conoce clínicamente desde hace más de 200 años, pero su etiología se descubrió en 1944 cuando se aislaron los serotipos 1 y 2. En 1956, se aislaron por primera vez los serotipos 3 y 4. Desde estos aislamientos originales, miles de virus DEN han sido aislados en distintas partes del mundo; todos quedan compren-

didados dentro de esta clasificación inicial de 4 serotipos¹. La infección primaria con cualquiera de los serotipos puede llevar a una enfermedad aguda caracterizada por fiebre, dolor de cabeza, dolor retroorbital, mialgias, artralgias, exantema y algunas manifestaciones hemorrágicas. Los síntomas pueden persistir 3 o 4 días y el paciente puede recobrase completamente. Sin embargo, la exposición secundaria a diferentes serotipos puede llevar a otro episodio de DEN, y el paciente puede estar a riesgo de contraer las formas más serias de la enfermedad, la fiebre hemorrágica del DEN o el síndrome de shock de DEN².

En las infecciones por DEN, las personas virémicas son usualmente infectivas para el mosquito vector desde un día antes del comienzo de los síntomas y hasta los 6-7 días posteriores; *Aedes aegypti* es el vector primario del DEN en las Américas. Cuando el mosquito ingiere el virus en una comida sanguínea, éste replica durante un período de incubación extrínseca de 8-12 días, luego del cual el mosquito permanece infectado toda la vida. La longevidad de *Ae. aegypti* es usualmen-

Recibido: 7-IX-2000

Aceptado: 3-X-2000

*Premio Osvaldo Bottaro 2000 de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires

Dirección postal: Dra. Gabriela Avilés, Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas Dr. Julio I. Maiztegui, Monteagudo 2510, 2700 Pergamino, Argentina
Fax: (54-02477) 433045

e-mail: Gaby@inevh.sld.ar

te 21 días, aunque ésta y el período de incubación extrínseca dependen de la temperatura y las lluvias³.

En 1955, cuando se inició una campaña de erradicación de *Ae. aegypti* en la Argentina, el área de infestación estimada era de 1 500 000 km². Se extendía desde las provincias del Norte hasta los 35° latitud Sur, correspondiente a la Ciudad de Buenos Aires. En 1963, *Ae. aegypti* se consideró erradicado del país⁴. En 1986, el Ministerio de Salud de la Nación reportó la reinfestación en el Norte. El área afectada en la actualidad corresponde a la de 1955. La provincia de Buenos Aires se reinfestó en 1991 y la Capital Federal en 1995, con altos niveles de infestación⁵.

A principios del siglo XX (1905, 1911, 1916) se reportaron casos clínicos del DEN en el Norte de la Argentina en las provincias de Chaco, Corrientes, Formosa y Misiones, sin localización precisa⁶. En 1916, ocurrió una epidemia que afectó a la provincia de Entre Ríos en las márgenes de los Ríos Uruguay y Paraguay, en la que se registraron 15 000 casos de DEN clásico. No se informó ningún caso de DEN hemorrágico⁷. En 1926, hay referencias de una probable epidemia en el Norte del país, con reporte de un caso presuntivo en Rosario⁸. Desde entonces, no se notificaron casos autóctonos hasta 1997.

En 1997, se detectó por primera vez la reemergencia del DEN en la provincia de Salta, después de 81 años sin notificación. Se estableció un sistema de vigilancia activa y se diagnosticaron 19 casos de 404 estudiados, confirmados por laboratorio por las técnicas de ELISA para anticuerpos IgM, neutralización en cultivos celulares (NT) y PCR. El serotipo circulante se identificó como DEN-2. Estos casos esporádicos ocurrieron entre abril y noviembre en un área subtropical⁹.

Esta situación, junto con la reaparición del DEN en los países limítrofes como Brasil, Paraguay y Bolivia², puso a la Argentina en un alto riesgo de epidemia. Se estableció una red de laboratorios para realizar la vigilancia de DEN en todas las provincias expuestas a riesgo y el Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas Dr. JI Maiztegui (INEVH-ANLIS) es el Centro Nacional de Referencia para el diagnóstico. El objetivo de este trabajo es documentar la primera epidemia de DEN diagnosticada por laboratorio en la Argentina y el primer aislamiento viral realizado en este país.

Materiales y métodos

Para evaluar la actividad de DEN, se estableció un sistema de vigilancia en la provincia de Salta desde 1997, el cual descansa en los reportes iniciales de los médicos al Ministerio de Salud de la provincia.

Pacientes estudiados

Los pacientes sospechosos que acudieron a los hospitales regionales. Se consideraron sospechosos los casos que presen-

taron síndromes febriles inespecíficos o clínica compatible con la enfermedad. Las muestras de suero obtenidas se enviaron al INEVH para diagnóstico y confirmación junto con información clínica. Los datos epidemiológicos obtenidos incluyeron: datos de identificación, sexo, edad, historia de viajes en las semanas previas y antecedentes de vacunación con vacuna 17D contra la fiebre amarilla.

Técnicas empleadas

ELISA de captura para anticuerpos IgM antidengue (MAC-ELISA): con el protocolo del *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, Puerto Rico)^{10, 11}, utilizando una mezcla de los 4 antígenos de DEN hechos en el INEVH. Los antígenos se preparan por el método sacarosa-acetona a partir de cerebros de ratones lactantes infectados con cada uno de los virus¹².

Neutralización en cultivos celulares (NT): se realizó en cultivos de células Vero C176 por el método del 80% de reducción de placas, enfrentando cada suero con cada uno de los cuatro virus DEN cepas DEN-1 Hawaii, DEN-2 New Guinea C, DEN-3 H87 y DEN-4 H241, provistas por el CDC, Dengue Branch, San Juan Laboratories, Puerto Rico¹³.

Inhibición de la hemoaglutinación (IHA) adaptada a microtécnica^{14, 15}: al igual que la NT, se realizó enfrentando cada suero con cada uno de los antígenos de DEN por separado, utilizando los antígenos hechos en el INEVH como se describió en la técnica de ELISA.

Aislamiento viral: se inocularon los sueros agudos en cultivos de células C6/36 obtenidas del banco de células del INEVH. Se incubaron en estufa a 34 °C y se cosecharon al 6° día para la detección del antígeno viral por inmunofluorescencia (IF)¹⁶. Se realizaron 3 pasajes en los mismos cultivos celulares por cada suero y se repitió la IF.

Inmunofluorescencia directa (IFD): se realizó según técnica estándar utilizando un anticuerpo policlonal antidengue marcado con fluoresceína provisto por el CDC, Puerto Rico.

Inmunofluorescencia indirecta: se realizó para tipificar los casos que dieran positivos por IFD, utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos contra cada uno de los virus DEN¹⁶.

Estudio de virulencia en ratón recién nacido: la cepa de virus aislada se inoculó en ratones SPF (libres de patógenos específicos), cepa Swiss NIH, de 24-48 hs de edad, provistos por el bioterio del INEVH. Se inocularon 0.02 ml de la suspensión viral vía intracerebral y se observaron los animales 19 días posteriores a la inoculación (pi) para el registro de síntomas clínicos. Se tomaron muestras de cerebros de ratones inoculados a diferentes días pi y se inocularon en células Vero C76 bajo agar para la observación de placas.

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): Luego de la extracción del ácido nucleico viral a partir de suero, se realizó una transcripción inversa y dos ciclos de PCR con *primers* específicos¹⁷.

Procesamiento de las muestras

Las muestras tempranas (menores al cuarto día de evolución) fueron procesadas por aislamiento y PCR. Las muestras correspondientes a casos con 5 o más días de evolución fueron procesadas por la técnica de MAC-ELISA para anticuerpos IgM. Se tomó una segunda muestra en el período convaleciente de aquellos pacientes que resultaron positivos por MAC-ELISA para anticuerpos IgM y se realizaron las pruebas de NT o IHA para anticuerpos IgG; no todos los sueros fueron procesados para IgG por las dos técnicas debido a que en muchos casos la cantidad de suero disponible fue insuficiente.

Resultados

Datos epidemiológicos y de laboratorio

A fines de 1997 se diagnosticaron 2 casos de DEN importados de Yacuiba, Bolivia; ambos se enfermaron en la localidad de Tartagal. El primero fue un ciudadano boliviano con fecha de comienzo de síntomas el primero de octubre; el segundo era un residente de Tartagal que había viajado a Yacuiba y se enfermó el 24 de diciembre. El primer caso autóctono diagnosticado por laboratorio en 1998 fue detectado el 3 de enero en la localidad de Tartagal y el último ocurrió el 31 de mayo en la localidad de Orán. Se estudiaron por diferentes técnicas un total de 646 muestras de aproximadamente 800 pacientes sospechosos clínicamente de padecer DEN, resultando 378 positivas (58%). La Fig. 1 muestra la distribución semanal de los casos positivos de DEN registrados durante el brote. Fueron afectadas 10 localidades de la provincia de Salta (Fig. 2), el número de casos positivos por cada localidad se muestra en la Tabla 1. De los 378 casos positivos, 185 fueron mujeres (49%), 192 eran hombres (51%) y en 1 no hubo información. La tasa de infección hombre: mujer fue 1:1. De los 378 casos positivos, 337 tenían datos de edad: 59 eran niños menores de 15 años (17.5%) y 278 eran adultos de 15-79 años (82.5%). Veintiún pacientes habían viajado a Bolivia a las siguientes localidades: Yacuiba, Pocitos y Santa Cruz. Ninguno de los pacientes había viajado a otro país excepto Bolivia (Tabla 1).

Datos clínicos

Se obtuvieron datos clínicos de 353 pacientes positivos. De éstos, 274 eran adultos, 58 fueron niños y 21 no tenían datos de edad. Los resultados se muestran en la Tabla 2. Todos los casos correspondieron clínicamente

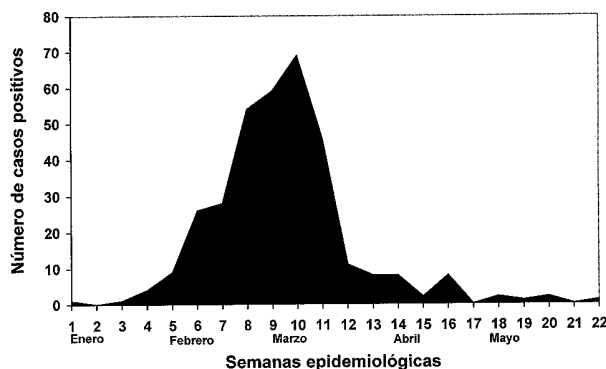


Fig. 1.— Distribución semanal de los casos positivos de DEN ocurridos durante la epidemia de Salta, 1998.

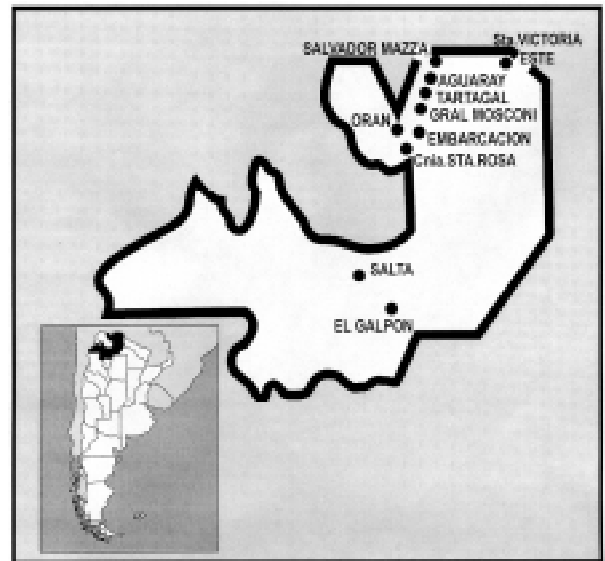


Fig. 2.— Localidades de la provincia de Salta afectadas por la epidemia de dengue, 1998.

a DEN clásico, no se registró ningún caso de DEN hemorrágico.

Aislamiento viral y PCR:

Se realizaron 112 intentos de aislamiento viral y PCR con sueros agudos (Tabla 1). Se obtuvo una cepa de virus identificada como DEN-2 por los tests de inmunofluorescencia indirecta y PCR. Se obtuvieron otros 4 positivos por PCR correspondientes a virus DEN-2.

El virus fue aislado del suero de un paciente de sexo masculino de 19 años de edad residente de la Localidad de Orán, con fecha de comienzo de síntomas 22/4/98. La cepa aislada fue pasada 3 veces en células C6/36 y fue inoculada posteriormente en células Vero CI76. Produjo pequeñas placas bajo agar en el 6° día luego de la tinción con Rojo Neutro. Los sobrenadantes de los pasajes 2 y 3 de las células C6/36 infectadas fueron también inoculados en ratón recién nacido vía intracerebral. No se registró ningún síntoma clínico en los ratones durante todo el período de observación, se realizaron 2 pasajes ciegos con resultados negativos. Las muestras de cerebros cosechadas en los días 5, 6, 7 y 8 pi fueron inoculadas en células Vero con resultados negativos.

Los 4 positivos por PCR se obtuvieron de sueros de pacientes que tenían entre 0 y 1 día de evolución, procedentes 2 de la localidad de Orán y 2 de la localidad de Embarcación. Correspondieron a 2 hombres y 2 mujeres, 3 adultos y una niña, con fecha de comienzo de síntomas entre el 27/03/1998 y el 22/05/1998.

TABLA 1.- *Epidemia de dengue en la provincia de Salta, Argentina, 1998*

Procedencia de los casos	MAC-ELISA IgM	NT	IHA	Aislamiento + PCR	Total todas las técnicas
	Positivo/estudiado	Positivo/estudiado	Positivo/estudiado	Positivo/estudiado	Positivo/estudiado
Tartagal	221/284	105/105	61/61	0/43	225/309
Salvador Mazza	15/60	9/10	1/1	0/14	16/70
Salta Capital	5/8	2/2	-	0/1	5/9
Orán	8/31	2/2	-	3/23	12/52
General Mosconi	37/49	-	3/4	0/1	37/49
Embarcación	13/20	3/3	1/1	2/14	15/33
Aguaray	22/48	3/5	6/6	0/4	26/51
Colonia Sta. Rosa	1/3	-	-	0/2	1/4
Sta. Victoria Este	2/4	1/1	-	-	2/4
El Galpón	1/8	-	-	0/2	1/10
Dragones	-	-	-	0/2	0/2
Probablemente* importados	19	10	6	0	21
Desconocida	15/23	4/5	1/1	0/6	17/32
Total	359/560 (64.0%)	139/143 (97.0%)	79/80 (99.0%)	5/112 (4.5%)	378/646 (58.0%)

*Estos casos probablemente importados corresponden a 21 pacientes residentes de las localidades Aguaray, Embarcación y Tartagal que habían viajado a Bolivia. El denominador de esta categoría está considerado en todos los casos negativos de todas las localidades que habían viajado a Bolivia. NT: Neutralización en cultivos celulares; IHA: Inhibición de la hemoaglutinación.

TABLA 2.- *Signos y síntomas observados en pacientes con dengue en Salta, 1998*

Signos y síntomas N° de casos: 353	Adultos (15-79 años)		Edad Niños (< 15 años)		Edad desconocida	
	N° de casos: 274	%	N° de casos: 58	%	N° de casos: 21	%
Fiebre		93.8		87.9		95.2
Dolor de cabeza		81		63.8		66.6
Artralgias		79.6		46.5		71.4
Mialgias		74.1		41.4		90.5
Decaimiento		72.3		55.2		76.2
Dolor retro-orbital		70.1		48.3		66.6
Rash		40.5		72.4		23.8
Dolor abdominal		33.6		22.4		38.1
Náuseas		28.8		20.7		42.8
Faringitis		14.2		20.7		14.3
Vómitos		10.9		5.2		14.3
Epistaxis		4.4		3.4		9.5
Hepatomegalia		1.1		1.7		4.7
Equimosis		0.7		1.7		0
Hemorragia gastrointestinal		0.3		0		0
Tos		0		6.9		0

El bajo porcentaje de aislamientos/PCR obtenido (4.5%) se debió a que muchas de las muestras estaban contaminadas y habían pasado una semana a temperatura ambiente antes de su arribo al laboratorio.

Discusión

Después de varios meses de haber detectado los primeros casos de DEN diagnosticados por laboratorio en

la provincia de Salta, Argentina⁹, ocurrió una epidemia en la misma zona. Se aisló el virus DEN-2, siendo el responsable de la epidemia. La cepa viral resultó ser no patogénica y no neurovirulenta para el ratón recién nacido. El serotipo circulante se caracterizó como DEN-2 por el aislamiento, las PCR, y los patrones serológicos resultantes en las NT o IHA. El primer caso autóctono se detectó el 3 de enero y la mayoría de los casos ocurrieron en las semanas epidemiológicas 5 a 12 (febrero-abril), alcanzando un pico en la semana 10 (marzo) con 69 casos. La epidemia se extendió durante 5 meses entre el verano y el otoño en un área subtropical. Tres de las localidades afectadas durante el brote de 1998: Orán, Salvador Mazza y Tartagal habían tenido casos positivos en 1997 (6, 7 y 3, respectivamente)⁹. Las mujeres y los hombres fueron afectados en una tasa similar y los adultos (82.5%) fueron más afectados que los niños (17.5%). En las epidemias de DEN, las mujeres y los niños suelen ser los más afectados porque sus actividades condicionan mayores períodos de contacto con los mosquitos infectados en el entorno doméstico². En nuestro caso, se podría decir que el hecho de haber detectado mayor cantidad de adultos podría deberse a que las infecciones en personas de mayor edad fueron en este caso sintomáticas y que la infección en niños ocurrió en forma más benigna o asintomática, o que no acudieron a la consulta.

La hipótesis del origen de esta epidemia es que el virus haya provenido de Bolivia, ya que el mismo serotipo se detectó en ese país en 1996/97¹⁸. Por otra parte, a fines de 1997 (octubre-diciembre), detectamos 2 casos importados del vecino país.

Consideramos los 21 casos positivos que habían viajado a Bolivia detectados durante el brote de 1998 como probablemente importados ya que no podemos establecer con certeza el sitio de contagio de los mismos.

La vigilancia laboratorial de síndromes febriles inespecíficos en las áreas de riesgo es fundamental para la detección precoz de la circulación viral. En nuestro país el área de riesgo de DEN es muy amplia y comprende las zonas templada y subtropical infestadas por *Ae. aegypti*. El objetivo primordial de los laboratorios pertenecientes a la red distribuidos en esta área es la vigilancia proactiva, la que permite realizar las acciones de control con el fin de interrumpir la transmisión.

Esta es la primera vez que se diagnostica por laboratorio una epidemia de DEN en la Argentina y también la primera vez que se aísla el virus DEN en este país.

Agradecimientos: Los autores agradecen a los médicos de las diferentes localidades que atendieron a los pacientes y proveyeron las muestras. Al Dr. Vance Vorndam del *Centers for Disease Control and Prevention*, Puerto Rico, por proveer los reactivos para los estudios virológicos. A la Dra. Ana Ambrosio y su personal por la provisión de medios y reactivos, células certificadas y ratones SPF. A todo el personal del INEVH y en especial a las Dras. Silvana Levis y Marta Sabattini por el apoyo recibido.

Bibliografía

- Gubler DJ, Dengue. In: Monath TP (ed). *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*. Volume II. Boca Raton, Florida, USA 1988; chapter 23: 223-61.
- Pan American Health Organization. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever in the Americas: guidelines for prevention and control*. Washington, DC 1994 (Scientific Publication N° 548).
- Gill J, Stark LM and Clark GG. Dengue surveillance in Florida, 1997-98. *Emerg Inf Dis* 2000; 6: 30-5.
- Sabattini MS, Avilés G and Monath TP. Historical, epidemiological and ecological aspects of Arboviruses in Argentina: *Flaviviridae, Bunyaviridae and Rhabdoviridae*. In: Travassos da Rosa APA, Vasconcelos PSC, Travassos da Rosa JFS (Eds). *An overview of Arbovirology in Brazil and neighboring countries*. Instituto Evandro Chagas, Belém, Brasil 1998: 113-34.
- Boffi R. Programa de prevención del dengue y control del *Aedes aegypti*. En: 2do. Congreso Argentino de Zoonosis, 1er Congreso Argentino y Latinoamericano de Enfermedades Emergentes y Asociación Argentina de Zoonosis (eds). *Temas de Zoonosis y Enfermedades Emergentes*, Buenos Aires, 1998; 413-9.
- Sa Fleitas MJ y Actis AS. Algunas enfermedades por virus y rickettsias como problema para la seguridad nacional. En: Bejarano J, Del Ponte E, Orfila R (eds). *Primeras Jornadas Entomoepidemiológicas Argentinas*, Buenos Aires 1959; 421-47.
- Gaudino NM, 1916. El Dengue. Algunas consideraciones sobre la epidemia de Entre Ríos en 1916. *Rev Sanid Militar (Argentina)* 15: 617-27.
- Gandolfo F, González H. Dengue. En: *Clínica de las Enfermedades Infecciosas y su Tratamiento*. Tomo 1, 3ra edición, Buenos Aires, López editores: 1945: 494-500.
- Avilés G, Rangeón G, Vorndam V et al.: Dengue emergence in Argentina. *Emerg Inf Dis* 1999; 5: 575-8.
- Innis BL, Nisalak A, Nimmannitya S, et al.: An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am J Trop Med Hyg* 1989; 40: 418-27.
- Kuno G, Gómez I, Gubler DJ. An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. *J Virol Methods* 1991; 33: 101-13.
- Shope RE, Sather GE. Arboviruses. In: Lennette EH, Schmidt NJ (eds) *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*. 5th edition. American Public Health Association, Inc, Washington DC 1979; chapter 26: 767-814.
- Russel PK, Nisalak A, Sukhavachana P, Vivona S. A plaque reduction test for dengue virus neutralizing antibodies. *J Immunol* 1967; 99: 291-6.
- Clarke DH, Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1958; 7: 561-73.
- Shope RE. The use of a micro-hemagglutination-inhibition test to follow antibody response, after arthropod-borne virus infection in a community of forest animals. *Anais de Microbiología* 1963: 167-71.
- Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, Velez M, Oliver A. Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1984; 33: 158-65.
- Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 545-51.
- Gianella A, Pirard M, Holzman A, et al.: Brote epidémico de denguevirus 2, genotipo Jamaica, en Bolivia. *Salud Pública de México* 1998; 40: 469-73.