

## RESPUESTAS SEROLOGICAS SECUNDARIAS EN LA EPIDEMIA DE DENGUE DE 1998 EN SALTA, ARGENTINA, DONDE CO-CIRCULAN OTROS FLAVIVIRUS\*

GABRIELA AVILES<sup>1</sup>, GRISELDA RANGEON<sup>2</sup>, MARIA VALERIA PAZ<sup>1</sup>, PABLO BARONI<sup>1</sup>, MARTA S. SABATTINI<sup>1</sup>, DELIA ENRIA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto Nacional de Enfermedades Virales Humanas (INEVH) Dr. J.I. Maiztegui, ANLIS, Pergamino;

<sup>2</sup>Ministerio de Salud, Salta

**Resumen** En 1998, ocurrió una epidemia de dengue (serotipo 2) en la provincia de Salta, Norte de Argentina, después de la primera detección de dengue en esa zona en 1997. En este trabajo se clasificaron las respuestas serológicas de los casos ocurridos en 1998 como primarios o secundarios, dado que el riesgo de la enfermedad severa es mayor en los casos secundarios. Se estudiaron 154 casos por las pruebas de neutralización (NT) e Inhibición de la hemoaglutinación. Se clasificaron 38 casos (25%) como respuestas primarias y 84 casos (54%) como respuestas secundarias. Los restantes 32 casos (21%) con títulos de IgG en el límite no pudieron ser clasificados. Se analizó la exposición previa a otros flavivirus (Encefalitis de San Luis [SLE] y Fiebre Amarilla [YF]) que pueden cruzar serológicamente, como posible causa de los patrones secundarios. Nuestros resultados indican que el 83% de los casos clasificados como respuesta a dengue secundaria, podrían atribuirse a exposiciones previas a los virus SLE o YF, o a reacciones serológicas cruzadas. La vacunación contra YF fue un factor menor contribuyente al patrón de respuesta secundaria encontrado. El hallazgo de serología positiva para YF en personas que no reconocen vacunación previa debe alertar acerca de la posible circulación silenciosa del virus de la YF, en un área que puede soportar tanto ciclos urbanos como selváticos. Otros casos que mostraron respuestas secundarias permanecen sin explicación, sugiriendo la ocurrencia de infecciones previas por otros serotipos de dengue o por otros flavivirus distintos a SLE o YF.

**Palabras clave:** dengue, arbovirus, fiebre amarilla, encefalitis de San Luis, infecciones secundarias.

**Abstract** *Secondary serologic responses to dengue virus during the 1998 outbreak in Salta, Argentina, where other flaviviruses co-circulate.* In 1998, a dengue outbreak (serotype 2) occurred in Salta province in Northern Argentina, following the first detection of dengue in the same area in 1997. We classified the serologic response of cases from 1998 as primary or secondary, since the risk of severe disease is greater for secondary cases. We studied 154 cases by plaque reduction neutralization and hemagglutination inhibition tests. Thirty-eight cases (25%) were classified as primary serologic responses and 84 cases (54%) as secondary responses. Thirty-two cases (21%) with borderline IgG titers could not be classified. Previous exposure to potentially cross-reacting flaviviruses (Saint Louis Encephalitis [SLE] and Yellow Fever [YF] viruses) was analyzed, as a possible cause of the secondary response pattern. Our results indicated that among cases classified as dengue secondary response, 83% could be attributed to previous SLE or YF exposure or serologic cross-reactivity. Vaccination against YF virus was at most a minor contributor to the secondary response pattern. The finding of a positive YF serologic result among persons not vaccinated may indicate silent circulation of YF in a region that can support both urban and jungle cycles. Other cases showing dengue secondary responses remained unexplained, suggesting the unrecognized occurrence of a previous infection with other dengue serotypes or of flaviviruses other than SLE or YF.

**Key words:** dengue, arboviruses, flaviviruses, yellow fever, Saint Louis encephalitis, secondary infections.

La infección primaria por virus dengue puede presentarse como una enfermedad febril aguda inespecífica,

que puede confundirse fácilmente con sarampión o gripe. Por lo tanto, el diagnóstico de laboratorio es esencial para el diagnóstico clínico y el reporte a Salud Pública<sup>1</sup>. Los factores de riesgo responsables del desarrollo de la enfermedad grave del dengue no se comprenden totalmente. Se ha demostrado que las infecciones sucesivas por diferentes serotipos de dengue están fuertemente relacionadas con el dengue hemorrágico y el síndrome de shock de dengue en Tailandia y Cuba, aunque en algunos brotes se han producido casos de enfermedad hemorrágica grave, a veces seguida de shock y muerte,

Recibido: 3-X-2000

Aceptado: 28-XII-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: (54-2477) 433045

e-mail: Gaby@inevh.sld.ar

después de una infección primaria por dengue. La segunda exposición al mismo serotipo generalmente no produce enfermedad debido a la protección de los anticuerpos preexistentes<sup>2</sup>.

En el mundo se han reconocido cerca de 70 *flavivirus*, incluyendo los 4 serotipos de virus dengue. La presencia de epitopes comunes en los *flavivirus* conduce a una amplia reactividad cruzada de los anticuerpos, la cual se exagera en las infecciones secuenciales, dificultando el diagnóstico. Esto es especialmente cierto en regiones donde 2 o más *flavivirus* son prevalentes. Entre los tests serológicos, la neutralización (NT) es considerada la más específica. Sobre la base de la cercanía de las relaciones por el test de NT, los *flavivirus* se clasifican en 8 subgrupos antigénicos (complejos), de los cuales uno está constituido por los 4 serotipos dengue. El patrón de respuesta serológica secundaria ocurre frecuentemente no sólo por infecciones sucesivas de virus de un mismo complejo, sino entre miembros de diferentes complejos aún por el test de NT<sup>3</sup>. Hasta la fecha no hay información que conduzca a establecer si hay asociación entre las respuestas secundarias debido a infecciones sucesivas con *flavivirus* de distintos complejos y las formas graves del dengue. En la Argentina hay evidencias de circulación de otros *flavivirus*: encefalitis de San Luis (SLE), fiebre amarilla (YF) e Ilheus, que han sido aislados de pacientes, y Bussuquara, del que sólo se han encontrado anticuerpos<sup>4</sup>. En distintas provincias del Norte incluyendo Salta, se realiza además la vacunación contra el virus de la YF (a virus atenuado) para prevenir la urbanización de la YF. Este riesgo está latente ya que *Aedes aegypti* es el vector urbano de la YF y otras especies de mosquitos que habitan en la selva en áreas vecinas a las ciudades son los vectores en el ciclo selvático (*Haemagogus*)<sup>5</sup>. Por otro lado, países limítrofes como Bolivia y Brasil denuncian periódicamente brotes de YF selvática y en Bolivia se registraron además casos urbanos en años recientes<sup>6</sup>.

En nuestro país, posteriormente a 1916, no se notificaron casos de dengue hasta 1997. En ese año se realizó una encuesta serológica en la provincia de Salta, por la cual se detectaron los primeros casos autóctonos de dengue<sup>7</sup>.

Entre el 3 de enero y el 31 de mayo de 1998, ocurrió una epidemia de dengue en la provincia de Salta que afectó a 10 localidades. Se diagnosticaron por laboratorio 378 casos confirmados o probables de 646 estudiados (58%). Se aisló el virus dengue-2 por primera vez en el país. Todos los casos correspondieron clínicamente a dengue clásico<sup>8</sup>.

El objetivo de este trabajo fue establecer el estado inmune a *flavivirus* de los casos de dengue para tener en cuenta la infección secundaria como factor de riesgo de formas graves de dengue en ese brote. Se clasificaron los casos de dengue ocurridos durante la epidemia en

primarios y secundarios mediante un análisis serológico de IgG frente a los 4 virus dengue. Debido a la alta endemicidad del virus SLE, a la vacunación previa con YF y a la posibilidad de casos de YF autóctonos en esa área geográfica, estos dos *flavivirus* fueron los investigados en los casos secundarios. La actividad previa del virus SLE en la zona del brote fue analizada utilizando los sueros de la encuesta serológica realizada en 1997.

## Materiales y métodos

Los estudios virológicos empleados se describen detalladamente en otro trabajo<sup>8</sup>. Resumiendo, las muestras de suero obtenidas entre el 3 de enero y el 31 de mayo fueron probadas por el test de ELISA de captura para anticuerpos IgM antidengue (MAC-ELISA)<sup>9,10</sup> utilizando una mezcla de los 4 antígenos de dengue. Las cepas dengue-1 HAW, dengue-2 NGC, dengue-3 H87 y dengue-4 H241 fueron provistas por el *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), Dengue Branch, San Juan, Puerto Rico. Se tomó una segunda muestra de suero de los pacientes positivos por MAC-ELISA para anticuerpos IgM y se probaron por NT contra los 4 virus dengue en células Vero CI 76<sup>11</sup> o por inhibición de la hemoaglutinación<sup>12</sup> (IHA) adaptada a microtécnica<sup>13</sup>. Las muestras tomadas antes del 4<sup>to</sup> día de evolución fueron inoculadas para aislamiento viral en células C6/36 o fueron procesadas por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los aislamientos se identificaron por el test de inmunofluorescencia indirecta<sup>14</sup> con anticuerpos monoclonales específicos de serotipo y por el test de PCR<sup>15</sup>.

En aquellos casos en que había suero disponible, las muestras se procesaron también para los virus SLE (cepa Cba AN 9275) y YF (cepa vacunal 17D) en NT o IHA.

### Definición de casos

En una primera etapa de tamizaje, un caso probable de dengue fue definido como una enfermedad clínicamente compatible con dengue en una persona que tenía un resultado positivo para anticuerpos IgM en una sola muestra de suero aguda tardía (mayor de 5 días de evolución) o en fase convaleciente, según criterio de la Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la Salud (OPS/OMS)<sup>2</sup>.

Las infecciones por dengue fueron luego clasificadas en forma definitiva en casos confirmados o probables, ya sea en muestras pareadas (aguda, aguda-tardía o convaleciente) o en una sola muestra según los siguientes criterios:

- *Infecciones confirmadas de dengue*: Caso en el cual, además de los síntomas clínicos compatibles con una infección por dengue, se demostró la detección de anticuerpos IgM específicos en suero y tuvo un aislamiento viral positivo o seroconversión por IgG (incremento del título de anticuerpos de por lo menos 4 veces entre muestras pareadas).

- *Infecciones probables por dengue*: Caso en el cual, además de los síntomas clínicos compatibles con dengue, se demostró la detección de anticuerpos IgM específicos o IgG en suero, pero que no seroconvirtieron.

### Clasificación de casos

Para la clasificación de las infecciones por dengue en primarias o secundarias se siguieron los criterios de la OMS<sup>16</sup> de acuerdo a los títulos en NT e IHA frente a los 4 serotipos de dengue:

- *Caso de dengue con respuesta primaria*: Caso cuya muestra de suero aguda (hasta 6 días de evolución) presentó títulos de anticuerpos IgG por NT o IHA < 160 y la muestra aguda

tardía o convaleciente títulos de anticuerpos <1280, con evidencias de baja o nula reactividad serológica cruzada entre los virus dengue.

- *Caso de dengue con respuesta secundaria:* Caso cuya muestra de suero aguda (hasta 6 días de evolución) presentó títulos de anticuerpos IgG por NT o IHA >160 y la muestra aguda tardía o convaleciente títulos  $\geq$  2560.

- *Caso de dengue no clasificable en primario o secundario:* Caso probable o confirmado cuya fecha exacta de colección de la muestra de suero convaleciente no estuvo disponible, o caso incompletamente estudiado, pero que resultó positivo por la técnica de MAC-ELISA para anticuerpos IgM, o caso con títulos de 160 para IgG por NT o IHA en la muestra aguda o de 1280 en la muestra convaleciente.

#### *Encuesta serológica en Salta, 1997*

Entre el 22/04/97 y el 12/05/97 se tomaron muestras de suero de pacientes que acudieron a los hospitales regionales en consulta por cualquier enfermedad, de las localidades de Orán, Salvador Mazza y Güemes. Estas muestras fueron procesadas previamente para dengue y los resultados publicados<sup>7</sup>. En este trabajo se procesaron 281 muestras para virus SLE por la técnica de NT.

## Resultados

### *Análisis serológico de los casos de dengue de la epidemia de 1998:*

De acuerdo a los criterios descriptos anteriormente, los casos positivos de dengue se clasificaron en primarios y secundarios y entre ellos en infecciones probables o confirmadas. Se encontraron 38 casos con respuesta serológica primaria y 84 casos con respuesta serológica secundaria y 32 casos no clasificables con esos criterios (Tabla 1 A, B, C).

### *Aislamiento viral y PCR:*

Se realizaron 112 intentos de aislamiento viral y PCR y se obtuvieron 5 positivos para virus dengue-2 (Tabla 1 C). La descripción de estos casos se realizó en otro trabajo<sup>8</sup>. La muestra de suero que resultó positiva para aislamiento viral fue procesada por NT y dio un resultado de títulos de anticuerpos IgG de 160 para los 4 virus dengue, por lo cual no se pudo clasificar como infección primaria o secundaria. Los 4 sueros que resultaron positivos por PCR no se pudieron estudiar serológicamente por NT por no disponer de cantidad suficiente de suero.

### *Relación entre las respuestas secundarias de dengue y la vacunación contra fiebre amarilla*

Se analizaron los datos disponibles de vacunación contra YF para establecer si esta condición se asocia a las respuestas serológicas observadas. La Tabla 2 muestra los registros de vacunación de los casos positivos de dengue clasificados como primarios y secundarios. El

68% de los casos con respuesta serológica secundaria no había sido vacunado.

### *Comparación de resultados entre diferentes técnicas*

#### Comparación entre ELISA IgM y NT e IHA

El 100% de los casos positivos para anticuerpos IgM que se estudiaron después por NT para virus dengue-2 resultaron también positivos por esta técnica. El 99% de los casos positivos para anticuerpos IgM estudiados luego por IHA concordaron entre ambas técnicas. Seis sueros negativos para anticuerpos IgM estudiados luego por NT resultaron positivos por NT con los siguientes títulos de anticuerpos: 2 tuvieron títulos entre 80-640 y fueron considerados no interpretables, 2 tuvieron títulos  $\geq$  2560 y fueron considerados casos de dengue probables secundarios y 2 tuvieron títulos = 1280 y fueron considerados casos probables no clasificables. De 3 sueros negativos para anticuerpos IgM estudiados por IHA, 1 tuvo un título >1280 y fue considerado un caso probable secundario; 2 tuvieron títulos entre 80-320 y fueron considerados como no interpretables (Tabla 1: A, B, C).

#### Comparación entre NT e IHA

Se realizó una prueba de asociación entre los títulos obtenidos por las técnicas de IHA y NT utilizando 40 muestras procesadas por ambas técnicas.

Teniendo en cuenta los criterios de clasificación en infecciones primarias y secundarias, se evaluó por un lado las muestras tempranas agrupándolas en menores o mayores de 160 y por otro, las muestras tardías o convalecientes según fueran menores o mayores de 1280. Se analizaron luego los resultados coincidentes o discordantes entre las dos técnicas y se calculó luego el  $\chi^2$ . La probabilidad obtenida con la corrección por continuidad de Yates fue menor a 0.0005. De estos resultados se podría inferir que existe una asociación entre los títulos de la IHA y la NT y que las diferencias no están sujetas al azar.

### *Análisis serológicos de otros Flavivirus: encefalitis de San Luis y fiebre amarilla*

#### Epidemia de dengue, Salta, 1998

De 38 casos de dengue primarios, 26 fueron probados por NT para SLE o YF (Tabla 3 A); 0/9 y 11/24 (46 %) resultaron positivos para SLE y YF, respectivamente. Tres de los casos positivos para YF habían sido vacunados, 4 no habían sido vacunados y 4 no tenían datos. Siete de estos casos resultaron negativos para los dos virus. De 84 infecciones con respuesta serológica secundaria para dengue, 65 fueron probadas por NT para

TABLA 1.- Patrones de respuestas serológicas en casos confirmados o probables de dengue, Salta, 1998

## 1. A: Respuesta primaria a dengue

MAC-ELISA IgM	NT IgG	Rango de títulos por neutralización								Interpretación	N° casos
		Sueros de etapa aguda ( $\leq 6$ días)				Sueros de etapa aguda-tardía o convaleciente					
		DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4		
No hecho	Seroconversión positiva $\geq 4x$	160	<20-160	160	40	<20-40	80-640	<20-320	<20-80	Confirmado	4
Positivo	Sin cambios o seroconversión inversa	<20	80-160	<20-80	<20-20	<20-320	40-640	<20-320	<20-40	Probable	34
Total: 38											

## 1. B: Respuestas secundarias a dengue

MAC-ELISA IgM	NT IgG	Rango de títulos en sueros de etapa aguda ( $\leq 6$ días)				Rango de títulos en sueros de etapa aguda-tardía o convaleciente				IHA DEN-2	Interpretación	N° casos
		DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4			
Positivo	Seroconversión positiva $\geq 4x$	640	1280	NH*	<40	160- $\geq 2560$	640- $\geq 2560$	640- $\geq 2560$	<40-1280	1280- $\geq 2560$	Confirmado	4
Positivo	Sin cambios o seroconversión inversa	<20- $\geq 2560$	2560- $\geq 2560$	<20- $\geq 1280$	<20-1280	<40- $\geq 2560$	80-40960	<20-5120	<40- $\geq 2560$	1280- $\geq 1280$	Probable	58
Positivo	Sólo una muestra	160	$\geq 1280$	$\geq 1280$	160	320-640	2560- $\geq 2560$	160-1280	160	$\geq 1280$	Probable	22**
Total: 84												

\* NH: No hecho; \*\* Tres sueros agudos tardíos con ELISA IgM negativa

## 1. C: Respuestas a dengue no clasificables

MAC-ELISA IgM dengue	NT IgG	PCR	Aislamiento viral	Rango de títulos por neutralización								Interpretación	N° casos
				Sueros de etapa aguda ( $\leq 6$ días)				Sueros de etapa aguda-tardía o convaleciente					
				DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4	DEN-1	DEN-2	DEN-3	DEN-4		
Positivo	Seroconversión positiva $\geq 4x$	NH*	NH	<20	160-320	NH	<20	<20-1280	80-1280	<40-640	<20-320	Confirmado	5
NH	Sólo una muestra	NH	Positivo DEN 2	160	160	160	160	NH	NH	NH	NH	Confirmado	1
NH	Sólo una muestra	Positivo DEN 2	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	Probable	4
Positivo	Sin cambios	NH	NH	40-160	320-1280	<20	<40-80	<40- $\geq 2560$	320-1280	<20-1280	<20-640	Probable	18
Positivo	Sólo una muestra	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	Probable	220
Negativo o no hecho	Sólo una muestra	NH	NH	NH	NH	NH	NH	NH	1280	NH	NH	Probable	3
Negativo o no hecho	Sólo una muestra	NH	NH	NH	NH	NH	NH	40	80-640	160	160	No interpretable	5
Total: 256													

\* NH: No hecho

SLE o YF (Tabla 3 B); 12/28 (43%) y 50/63 (79%) resultaron positivos para SLE o YF, respectivamente. De 26 casos probados para los dos virus, SLE y YF, 3 fueron negativos para los dos, 3 fueron positivos solo para SLE, 12 fueron positivos solo para YF y 8 casos fueron posi-

tivos para ambos virus. Los restantes 39 casos fueron probados para un solo virus (SLE o YF), por no disponer de cantidad de suero suficiente, resultando 8 negativos para cualquiera de los virus. Trece de los 50 casos positivos para YF habían sido vacunados, 29 no habían sido

TABLA 2.- Registros de vacunación contra fiebre amarilla en los casos con respuestas serológicas de dengue primarias y secundarias

Respuesta	Nº de casos con registro de vacunación		
	Total	No vacunados(%)	Vacunados(%)
Secundaria	66	45 (68.2%)	21 (31.8%)
Primaria	27	22 (81.5%)	5 (18.5%)

TABLA 3.- Presencia de anticuerpos contra otros flavivirus en los casos de dengue de la epidemia de 1998

## 3-A: Respuestas de dengue primarias

Virus	Rango de títulos por neutralización		
	Sueros de etapa aguda	Sueros de etapa aguda-tardía o convaleciente	Total (positivo/ estudiado)
SLE	NH*	<40	0/9
YF	<20	<20-1280	11/24

\*NH: No hecho

## 3-B: Respuestas de dengue secundarias

Virus	Rango de títulos por neutralización		
	Sueros agudos	Sueros agudos tardíos o convalecientes	Total (positivo/ estudiado)
SLE	NH*	<40-≥1280	12/28
YF	<20-≥1280	<20-2560	50/63

\*NH: No hecho

TABLA 4.- Presencia de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la Encefalitis de San Luis en humanos, Salta, 1997

Localidad	Fecha de Muestra	Positivos/Procesados (%)	Rango Títulos NT SLE
Orán	22/04-25/04/97	19/96 (19.8)	40 - >160
Sal. Mazza	17/04-28/04/97	15/97 (15.5)	20 - >40
Güemes	21/04-12/05/97	19/88 (21.6)	20 - >40
Total	17/04-12/05/97	53/281 (18.9)	20 - >160

vacunados y 8 no tenían datos (Tabla 3). Resumiendo, de los 65 casos con respuesta serológica secundaria a dengue estudiados para SLE o YF, 54 (83%) resultaron positivos para uno o ambos virus, 3 (5%) fueron negativos para los dos virus y los 8 restantes (12%) fueron incompletamente estudiados y resultaron negativos para uno solo de los dos virus.

## Encuesta serológica, Salta, 1997

La Tabla 4 muestra los resultados de 281 sueros de las localidades de Orán, Salvador Mazza y Güemes obtenidos antes del brote y procesados por NT para virus SLE. En total, se encontraron 53 positivos (19%) con rangos de títulos entre 20 y >160. De los sueros positivos para SLE, sólo 2 habían resultado positivos con títulos > 40 para dengue por NT, procedentes 1 de Orán y 1 de Güemes<sup>7</sup>.

## Discusión

Si bien no existe una completa comprensión de los factores de riesgo responsables de la enfermedad severa del dengue, se han propuesto varios que han demostrado utilidad, aún cuando siguen siendo objetos de controversias. Estos incluyen: 1) las infecciones secuenciales por diferentes serotipos de dengue, 2) la virulencia de la cepa viral, 3) la susceptibilidad innata individual, 4) la intensidad de transmisión del dengue y la circulación simultánea de varios serotipos de virus, 5) otros, además de una combinación de los arriba mencionados. No se han mencionado entre estos factores a las infecciones secuenciales de un *flavivirus* distinto a dengue seguida por dengue.

Las respuestas de anticuerpos que se desarrollan a consecuencia de infecciones con los diferentes serotipos de dengue comparten muchas características generales en su evolución y tipos de inmunoglobulinas. Sin embargo, a pesar de la estrecha relación antigénica de los virus dentro del complejo dengue, la inmunidad cruzada es corta, por lo que dos o más virus pueden infectar secuencialmente el mismo huésped después que ésta desaparece. Cuando esto ocurre, lo que frecuentemente se produce en las áreas de alta endemicidad, la respuesta de anticuerpos en las infecciones secundarias es marcadamente diferente a la producida por la infección primaria<sup>17</sup>: títulos de IgG más altos y reacción positiva con varios serotipos.

En este trabajo, nos propusimos clasificar los casos de dengue ocurridos durante la epidemia de Salta de 1998 de acuerdo a su respuesta serológica. De los 378 casos positivos diagnosticados por laboratorio, se pudieron estudiar 154 por NT o IHA, lo que permitió caracterizar sorprendentemente sólo 38 casos (25%) como respuestas primarias a la infección por dengue y 84 casos (54%) reunieron criterios para ser considerados como respuesta secundaria. En los restantes 252 no fue posible arribar a la definición de respuesta primaria o secundaria, en algunos casos por resultados serológicos no concluyentes y en otros por carencia de las muestras adecuadas. Este resultado fue inesperado si se tiene en cuenta que se había detectado en la zona

un solo serotipo de dengue, tanto en la encuesta previa como durante la epidemia. El patrón de respuesta secundaria fue idéntico al descrito en países donde se han producido infecciones secuenciales por 2 serotipos de dengue.

Las manifestaciones clínicas en las infecciones primarias son generalmente benignas, a veces con manifestaciones hemorrágicas. En las infecciones secundarias por varios serotipos de dengue se producen manifestaciones clínicas graves en una proporción muy variable con respecto a casos de dengue clásico: 1/100 a 1/1000 en los brotes más severos, 1/10 000 según los reportes, aunque se considera que las estadísticas no reflejan el real porcentaje<sup>2</sup>. El número pequeño de casos confirmados y probables en el brote de dengue-2 ocurrido en Salta no llegaría a estos denominadores, lo que puede explicar la ausencia de formas graves. Esto permite considerar que podrían haber ocurrido formas hemorrágicas severas de haberse registrado una epidemia mayor.

En nuestro país, donde no se habían registrado casos autóctonos por 7 u 8 décadas hasta 1997, las respuestas serológicas secundarias a dengue encontradas resultaron difíciles de atribuir a actividad de otro dengue. Surgieron dos hipótesis para explicarlas:

a) La circulación previa o cocirculación inadvertida de otro serotipo de dengue en Salta. Al respecto, el serotipo de dengue-1 se detectó por primera vez en Bolivia en 1987, produciendo un número estimado de 200 000 personas infectadas en Santa Cruz<sup>18,19</sup>. La provincia de Salta comparte fronteras con el vecino país y existe un constante tránsito de personas en esas áreas fronterizas, con la consecuente posibilidad de existencia del denominado "tráfico viral", en ese caso de dengue-1. De hecho, el virus dengue-2 que provocó la epidemia de Salta en 1998 debió provenir de Bolivia, donde se habían registrado casos por este serotipo durante 1996 y 1997, previamente a los ocurridos en la Argentina<sup>18,19</sup>. Esta hipótesis incluye la posibilidad de personas que habiéndose infectado en Bolivia con dengue-1 en 1987, trasladaron su residencia a Salta en 1998. La encuesta previa para dengue en Salta<sup>7</sup> minimiza esta hipótesis.

b) La interacción con otros *flavivirus*. Como también puede producirse una respuesta de anticuerpos secundaria cuando el huésped presenta anticuerpos contra un *flavivirus* distinto de los del complejo dengue y en la Argentina se han reconocido 4 especies de *flavivirus*, de las cuales 3 infectan a los humanos, se pueden presentar una amplia gama de interacciones serológicas.

En este trabajo se presentan evidencias a favor de esta hipótesis:

Se analizó la interacción de las infecciones por dengue con los *flavivirus* SLE y YF. Los resultados de la encuesta serológica en Salta en 1997, muestran un alto porcentaje de positividad para virus SLE (19%) lo que

indicaría una alta endemicidad que ya ha sido observada en otras áreas del país<sup>4</sup>. Esta es la primera vez que se incluye a la provincia de Salta en la distribución de este virus. De los casos con respuesta secundaria estudiados durante la epidemia de dengue de 1998, un 43% resultó positivo para SLE por NT.

La vacunación contra YF no explicó el patrón encontrado ya que un 68% de los casos con respuesta secundaria refirieron no haber sido vacunados, si bien en este punto se debería considerar la posibilidad de una incorrecta información, teniendo en cuenta que las personas suelen confundir u olvidar sus inmunizaciones. Debe, sin embargo, también reflejarse que un 18.5% de los casos considerados primarios refirieron vacunación contra YF.

La presencia de anticuerpos contra YF en casos no vacunados, explicada en parte por los probables cruces serológicos, hace también sugerir la posibilidad de una circulación silenciosa del virus YF en un área geográfica con condiciones ecológicas como para sostener tanto ciclos urbanos como selváticos de este agente. Nuevamente debe referirse la cercanía del área con Bolivia, donde se registran en los últimos años brotes de YF, algunos con sospecha de transmisión urbana<sup>6</sup>.

En regiones como la que se produjo el brote de dengue en Salta de clima subtropical, puede darse la actividad sucesiva o simultánea de varios *flavivirus*; esto se vio reflejado en los 8 casos con respuesta secundaria para los virus dengue que también fueron positivos para SLE y YF en NT. Es necesario, sin embargo, profundizar este análisis ya que las hipótesis analizadas permitirían explicar un 83% de estas respuestas secundarias debido a exposición previa a SLE o YF, o a cruces serológicos, pero todavía 3 casos permanecerían sin explicación. Ello lleva a sugerir la posibilidad de circulación de otros *flavivirus* en el área. Al respecto, nuestros estudios futuros contemplan la inclusión de los virus Ilheus y Bussuquara en el análisis combinado con dengue, YF y SLE.

No hay muchos datos sobre la importancia en la clínica de las infecciones secuenciales por otro *flavivirus* y luego un dengue. De las numerosas posibles infecciones secuenciales heterólogas por diferentes *flavivirus*, relacionadas a la concurrencia geográfica de los virus, la más difundida y la mejor estudiada es la infección secuencial por un virus dengue y el virus de la encefalitis japonesa, o viceversa<sup>17,20</sup>. Estos estudios han originado el desarrollo de pautas que permiten inferir la exposición a virus dengue a partir de la respuesta de anticuerpos, pero no hay indicación sobre la gravedad de la enfermedad en esos casos. Con respecto a la clínica, estudios realizados en personas vacunadas contra fiebre amarilla y luego infectadas por dengue la sintomatología no fue grave<sup>21</sup>. Estudios en pacientes con fiebre hemorrágica de dengue y encefalopatía por dengue en infecciones secuenciales por el virus de la encefalitis japonesa-dengue, demuestran la

existencia de cruces serológicos entre estos virus, aunque los autores no hacen mención a la secuencia de estas infecciones como causante de la gravedad clínica de los cuadros observados<sup>20</sup>. No hay datos sobre este punto con los *flavivirus* circulantes en la Argentina.

Este trabajo indica que las infecciones previas con SLE y YF en pacientes con dengue-2 conducen a respuestas secundarias para los 4 virus dengue indistinguibles de las obtenidas por las infecciones sucesivas de 2 serotipos de dengue, lo cual abre la necesidad de estudiar una asociación entre respuesta secundaria por infecciones sucesivas heterólogas con los *flavivirus* prevalentes en Argentina y las condiciones que conducen a las formas clínicas graves del dengue. Todos estos puntos son objeto de estudio y discusión en Asia, donde existe una alta endemicidad para el dengue<sup>17</sup> y han sido escasamente abordados en otras regiones, particularmente en las Américas. Los *flavivirus* autóctonos son diferentes a los del sudeste asiático y por lo tanto, cuando se introducen los virus dengue en este continente, se presenta la concurrencia geográfica de *flavivirus* que abre una posibilidad nueva para la forma clínica de la enfermedad y para la respuesta serológica secundaria por una infección subsecuente por un virus dengue.

Con posterioridad a la epidemia de dengue de 1998, se realizó una encuesta serológica en la localidad de Tartagal, que fue la más afectada durante el brote, la cual demostró una positividad del 71% de 519 sueros estudiados por NT para virus dengue-2. (Zaidemberg y Avilés, datos no publicados). Esto indica que un alto porcentaje de la población estaría sensibilizada con virus dengue-2. Por otra parte, en 1999-2000 se registró una epidemia de dengue-1 en Paraguay<sup>21</sup>. Nuestro laboratorio ha obtenido aislamientos virales del serotipo 1 provenientes de Paraguay y de Argentina. Muchos casos provenientes de Paraguay se han enfermado en diferentes provincias de la Argentina, y se ha registrado transmisión autóctona en el Norte de nuestro país (Avilés y col., datos no publicados). Estos datos revelan que en la Argentina se incrementa el riesgo de aparición de formas graves en la población afectada por infecciones con 2 serotipos de dengue. Además en esa zona el vector podría estar activo todo el año, lo que permitiría a los virus la posibilidad de hacerse endémicos. Esto no puede ocurrir en la zona templada del país, donde los virus deberían ser introducidos en cada temporada estival, ya que el vector no puede permanecer activo durante el invierno debido a las bajas temperaturas.

La profundización de estos estudios, que aportan las primeras evidencias acerca del riesgo de la Argentina de la ocurrencia de formas graves de dengue, permitirá orientar las acciones de vigilancia y diagnóstico laboratorial, a fin de reducir el alto impacto sanitario de la enfermedad.

**Agradecimientos:** A todo el personal del INEVH. A los médicos y personal sanitario de la región afectada. A los Dres. Goro Kuno y Vance Vorndam por su asesoramiento.

## Bibliografía

- Gubler DJ, Dengue. In: The Arboviruses: Epidemiology and Ecology. Volume II. ED. Monath (ed), TP. Boca Raton, FL 1988; chapter 23: 223-61.
- Pan American Health Organization. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever in the Americas: guidelines for prevention and control. Washington, D.C 1994 (Scientific Publication N° 548).
- Westaway EG, Blok J. Taxonomy and evolutionary relationships of flaviviruses. In: Dengue and dengue hemorrhagic fever. Ed. Gubler DJ, Kuno G. (eds), New York: CAB International 1997; chapter 18: 147-73.
- Sabattini MS, Avilés G, Monath TP. Historical, epidemiological and ecological aspects of Arboviruses in Argentina: *Flaviviridae*, *Bunyaviridae* and *Rhabdoviridae*. In: An overview of Arbovirology in Brazil and neighboring countries. Travassos da Rosa APA, et al (eds). Instituto Evandro Chagas, Belém, Brasil 1998: 113-34.
- Bejarano JFR. Protección de la población del Norte argentino contra la fiebre amarilla selvática. *Segundas Jornadas Entomoepidemiológicas* 1965; 2: 209-29.
- Van der Stuyft P, Gianella A, Pirard M, et al. Urbanisation of yellow fever in Santa Cruz, Bolivia. *Lancet* 1999; 353: 1558-62.
- Avilés G, Rangeón G, Vorndam V, et al. Dengue reemergence in Argentina. *Emerg Inf Dis* 1999; 5:575-8.
- Avilés G, Rangeón G, Baroni P, et al. Epidemia por virus Dengue-2 en Salta, Argentina, 1998. En prensa *Medicina (Buenos Aires)* 2000; 60.
- 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.
- 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; 2: 167-71.
- Gubler DJ, Kuno G, Sather GE, et al. 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, et al. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1992; 30: 545-51.
- World Health Organization. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention and control. 2<sup>nd</sup> edition Washington DC. 1997.
- Innis BL. Antibody responses to dengue virus infections. In: Dengue and dengue hemorrhagic fever. Gubler DJ, Kuno G. (eds) New York: CAB International, 1997; chapter 15: 313-33.
- Peredo C, Garrón T, Pelegrino JL, et al. Detection and Identification of Dengue-2 virus from Santa Cruz-Bolivia by a single tube RT-PCR Method. *Rev Inst Med Trop S. Paulo*

- 1999; 41: 207-8.
19. Gianella A, Pirard M, Holzman A, et al. Brote epidémico de dengue virus 2, genotipo Jamaica, en Bolivia. *Salud Pública de México* 1998; 40: 469-73.
  20. Yoshihiro M, Massayuki T, Mika S, et al. Studies on serological cross-reaction in sequential Flavivirus infections. *Microbiol Immunol* 1994; 38: 951-5.
  21. Bancroft WH, Top FH, Eckels KH, et al. Dengue-2 vaccine: virological, immunological, and clinical responses of six yellow fever-immune recipients. *Infection and Immunity* 1981; 31: 698-703.
  22. Boletín Epidemiológico República del Paraguay. La epidemia de dengue del 99. Ed. Páez M. Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social. Año 5 N° 17 1999: 1-4.