

Estado actual del diagnóstico de Dengue, Chikungunya, Zika y otros arbovirus en Argentina

Recibido: 06-09-2016 Aceptado: 01-11-2016

María A Morales¹, Cintia M Fabbri¹.

Resumen

Los virus transmitidos por artrópodos, particularmente los transmitidos por mosquitos, son amenazas sanitarias cada vez más importantes y se propagan rápidamente a nivel mundial. Existen múltiples arbovirus predominantemente de genoma ARN mantenidos en ciclos complejos que involucran huéspedes vertebrados. Muchos emergieron desde su reservorio silvestre y se dispersaron globalmente debido a la conjunción de factores tales como comportamiento antropológico, transporte comercial y uso de suelos, entre otros. Actualmente el dengue es un problema de salud creciente en las áreas subtropicales y templadas de Argentina. La reciente introducción de los virus Chikungunya y Zika en el noroeste de Argentina complejizaron el diagnóstico y notificación de casos. La clínica similar y las dificultades en la diferenciación de los agentes con las técnicas de laboratorio actualmente disponibles constituyen un desafío para el sistema de vigilancia y el equipo de salud. Se discuten en este artículo los aspectos críticos del diagnóstico etiológico de las infecciones por ZIKV, DENV y CHIKV.

Palabras claves: arbovirus, vigilancia, diagnóstico, métodos directos, métodos indirectos, algoritmo, virus Dengue, virus Chikungunya, virus Zika.

Introducción

Las enfermedades producidas por arbovirus son un problema muy grave a nivel mundial. 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. Son cientos de vi-

¹Centro Nacional de Referencia para diagnóstico de dengue y otros arbovirus, Centro Colaborador OPS/OMS.

Dirección para correspondencia:

INEVH "Dr. Julio I. Maiztegui"- ANLIS.

Monteagudo 2510. 2700 Pergamino.

Correos: amorales@anlis.gov.ar. cfabbri@anlis.gov.ar.

Conflicto de intereses:

Los autores expresan no poseer conflicto de intereses.

rus ARN 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. El comercio de esclavos fue uno de los eventos que marcó la primera aparición registrada en el Nuevo Mundo de dos arbovirus: el virus de la fiebre amarilla (YFV) y el dengue (DENV). Desde entonces, muchos otros han surgido de sus reservorios silvestres y se han dispersado a nivel mundial debido a factores que incluyen la evolución viral, conducta antropológica, transporte comercial y recuperación de suelos, entre otros. Nos encontramos frente a la emergencia o reemergencia de agentes virales descriptos por primera vez en su mayoría entre los 40' y 50' pero cuyos cuadros clínicos y ciclos de transmisión no han sido completamente caracterizados. Realizar la detección de viejos arbovirus en nuevos territorios es el desafío actual (1-6).

Diversos arbovirus han sido detectados en Argentina: YFV, Encefalitis de San Luis (SLEV), del Nilo Occidental (WNV), Ilheus (ILHV), Dengue 1, 2, 3 y 4 (DENV 1-4), y 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 algunos sólo se detectaron los ciclos enzoóticos y otros han sido identificados como los agentes causales de brotes limitados o casos humanos esporádicos (7-12). 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 de virus de Chikungunya (CHIKV), de la familia viral *Togaviridae*; y el virus Zika (ZIKV), de la familia viral *Flaviviridae*, en la parte noroeste de Argentina ha complejizado el escenario epidemiológico (13-15). 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 (16-17). 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.

La bioseguridad dentro y fuera del laboratorio: aspecto relevante en las infecciones por arbovirus

Dada la heterogeneidad de agentes virales incluidos dentro del grupo de arbovirus, su manipulación debe realizarse con niveles variables de bioseguridad dependiendo de las características biológicas de cada virus, la actividad a realizar y como consecuencia de un proceso de evaluación de riesgo exhaustivo que cada procedimiento debe tener. El ZIKV y los DENV están clasificados internacionalmente como agentes virales que requieren nivel 2 en términos de bioseguridad, mientras que CHIKV es un agente de nivel 3 cuando se trabaja con cepas establecidas. El manejo de muestras para diagnóstico puede realizarse en nivel 2 e inclusive puede optarse por métodos de inactivación química o por calor que permiten disminuir el riesgo para el operador. Los principales riesgos de laboratorio comprenden inoculación accidental, el contacto del virus con la piel lesionada o las membranas mucosas, mordeduras de animales de laboratorios infectados o artrópodos y la posibilidad de transmisión por aerosoles cuando se manipulan materiales con alta carga viral. La disponibilidad de vacunas está limitada solo para la prevención de algunos agentes (18).

El hombre constituye el reservorio en los ciclos urbanos de DENV, ZIKV y CHIKV, siendo la fuente de virus para infectar a otros mosquitos en el transcurso de la fase de viremia. Este aspecto debe ser tenido en cuenta en los centros de salud ya que son zonas concentradoras de potenciales pacientes virémicos y es prioritario que el hospital posea un procedimiento de control de vectores en la institución, así como la implementación de medidas de aislamiento en los primeros días de la enfermedad.

Un porcentaje de las personas que se infectan con estos virus desarrollan una enfermedad febril leve y auto limitada, otros con clínica más característica pero un aspecto común de estas infecciones virales es la ocurrencia de casos asintomáticos que también deben tenerse en cuenta ya que contribuyen a los ciclos de transmisión. Los puntos relevantes que surgen de las últimas experiencias tienen que ver también con el reconocimiento de formas de transmisión no vectorial especialmente para ZIKV, incluyendo la transplacentaria y la transmisión perinatal, transfusión de sangre, por lactancia y potencialmente, la donación de órganos. 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 du-

rante el embarazo. El virus ha sido aislado en semen y en Argentina hemos hallado evidencias de ARN viral en fluido vaginal (16,17,19-21).

Lo expuesto determina que ante la incidencia creciente de las infecciones por arbovirus en nuestro país 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.

Algoritmo de diagnóstico de infecciones por arbovirus

El diagnóstico etiológico de estos agentes en el ser humano, animales o poblaciones de vectores constituye un componente esencial para direccionar programas de prevención y control. No existe una técnica de diagnóstico ideal que cubra todos los aspectos a evaluar en estas infecciones, pero se cuenta con un importante número de metodologías directas e indirectas que usadas en forma complementaria permiten arribar a un diagnóstico de certeza. La correcta aplicación de las técnicas disponibles requiere que el médico y el laboratorista conozcan la cinética de aparición de la viremia y los anticuerpos IgM e IgG en las infecciones por éstos agentes (Figura 1). Habitualmente se reconoce una fase de circulación viral breve que en general desaparece al iniciarse la producción de anticuerpos neutralizantes. No obstante, en infecciones

por ZIKV y CHIKV se ha descrito recientemente persistencia viral en algunos tejidos (17,22,23). Resulta fundamental para la selección correcta del método de diagnóstico que las muestras se remitan con la fecha de extracción y que se cuente con el dato de la fecha de inicio de síntomas, además de la ficha epidemiológica correspondiente.

La muestra de elección para estudios etiológicos es el suero y adicionalmente el líquido cefalorraquídeo cuando exista afectación neurológica. La muestra de orina se convirtió en una muestra muy útil en las infecciones por ZIKV en aquellos pacientes con 5-15 días de evolución desde el inicio de los síntomas como una alternativa para ampliar el período de detección de genoma viral (24). En el caso de embarazadas con sospecha de infección por ZIKV se pueden estudiar las muestras de suero, orina, líquido amniótico y también de placenta al momento del parto (4). Las muestras deben ser tomadas en condiciones de esterilidad y mantenidas a 4 °C hasta su llegada al laboratorio. Se deben evitar ciclos de congelado-descongelado. En el caso de fallecidos es factible el estudio de los órganos *post mortem* por metodologías directas, requiriendo que las muestras se mantengan a -70 °C o la menor temperatura disponible.

Si la primera muestra se tomó con menos de 7 días de evolución desde el inicio de los síntomas, se intentará demostrar la presencia de antígenos virales (detección de proteínas virales no estructurales), aislar el virus (replicación viral en cultivos celulares, ratones o inoculación de mosquitos) o detectar el genoma vi-

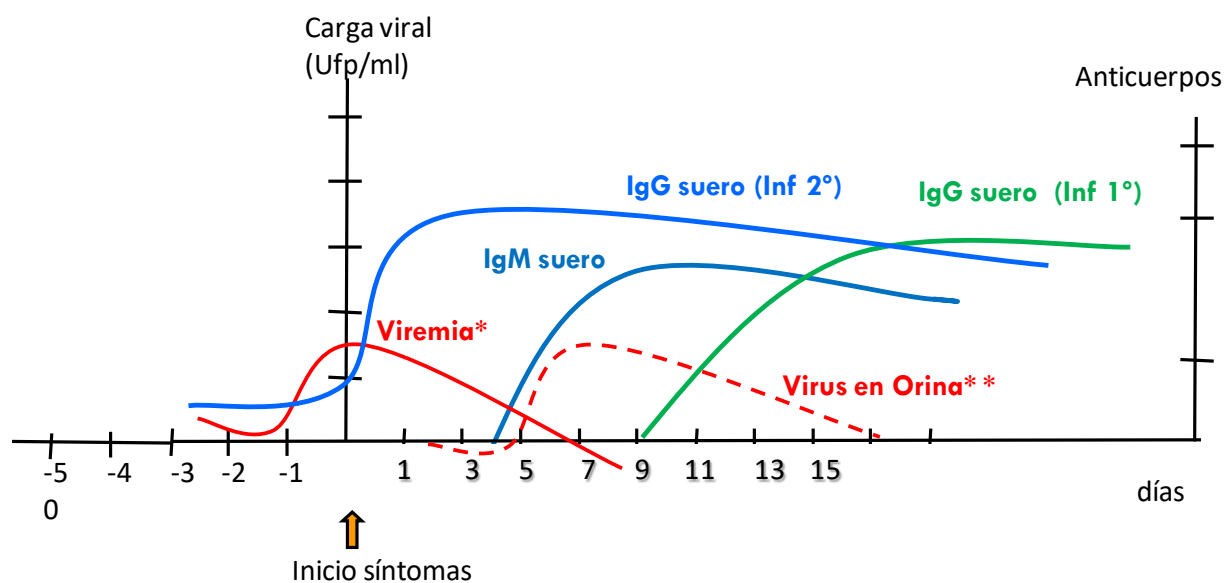


Figura 1. Cinética de la viremia y formación de anticuerpos en infecciones por Arbovirus.

*Los niveles de viremia son variables para los distintos arbovirus. ** Infecciones por virus ZIK.

ral (RT-PCR convencional o en tiempo real) (3,4,25). El incremento en la disponibilidad de técnicas moleculares en los últimos años determina que constituyan la principal herramienta para el estudio de muestras en la fase aguda de la infección. Para la realización de las metodologías moleculares, el RNA viral se extrae utilizando columnas de sílica (para suero, orina y sobrenadante de cultivos celulares) o técnica de TRIZOL (para los tejidos). 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. Las metodologías en tiempo real (qRT-PCR) utilizando sondas de hidrólisis o SYBR Green muestran mayor sensibilidad, permiten procesar un mayor número de muestras y en menor tiempo con respecto a la técnica convencional (RT-PCR). Una ventaja que sigue presentando el uso de la RT-PCR convencional es que los amplicones pueden ser purificados y utilizados para la secuenciación genómica que permita la identificación viral y análisis filogenético. Este procedimiento es el que permite diferenciar una infección natural por el YFV de un efecto adverso posvacunal en los casos severos y/o fatales, información que resulta relevante en áreas de riesgo y que no podría lograrse con las técnicas serológicas actuales (26). Similar estrategia podrá implementarse cuando se intensifique el uso de nuevas vacunas para arbovirus en la región, como por ejemplo vacunas para dengue. También es una herramienta necesaria para la identificación de los genotipos y linajes de los distintos arbovirus que circulan en la región (15,27).

Las metodologías moleculares pueden tener un formato *in house* o comercial, utilizando protocolos que realizan la detección de un único genoma viral o combinaciones de ellos, por ejemplo, los kits en trioplex que pueden detectar en una única reacción DENV, CHIKV y ZIKV. El empleo de estos reactivos requiere que se compruebe previamente si poseen sensibilidad y especificidad adecuadas. En este punto es bueno aclarar que las metodologías comerciales habitualmente no indican la región del genoma que amplifican los oligonucleótidos y sondas, así como tampoco el listado de cepas incluidas para el diseño. Estos puntos resultan estratégicos para la sensibilidad de la metodología y su selección considerando la posibilidad de circulación de cepas de diferentes genotipos.

El desarrollo en los últimos años de las denominadas tecnologías de secuenciación masiva permite actualmente obtener millones de secuencias de ADN a una velocidad sin precedentes y a un costo cada vez más reducido. El beneficio de éste tipo de tecnologías radica fundamentalmente en la posibilidad de estudiar

genomas completos de manera tal de poder detectar cambios en distintas partes del genoma que pudieran afectar su potencial epidémico, por ejemplo adaptándose a un vector en particular como ocurrió con el CHIKV en el brote del Océano Indico del 2005-2006 (28,29). Adicionalmente el estudio de genomas completos es una manera de detectar posibles eventos de recombinación entre las cepas virales circulantes, algunos ya descritos en la bibliografía (30).

Sin embargo, de ningún modo las metodologías moleculares desplazan a las técnicas de la virología clásica. Las cepas virales circulantes pueden ser caracterizadas más completamente al disponer de semillas virales obtenidas en diferentes huéspedes. En el Centro Nacional de Referencia se realiza de rutina el intento de aislamiento viral en una selección de pacientes positivos en primera instancia mediante las técnicas moleculares. El uso de líneas celulares (por ej.: C6/36 derivada de *Aedes albopictus* para aislamiento de los distintos serotipos de DENV o BHK-21 para CHIKV o VERO E6 para ZIKV) constituyen el mejor sistema en base a sensibilidad, conveniencia y relación costo-efectividad.

En el caso de infecciones por DENV, se dispone de reactivos comerciales que permiten detectar la proteína no estructural NS1. Se trata de una glicoproteína que participa en la replicación viral, que es secretada en el suero de personas infectadas con dengue en el período agudo de la enfermedad, detectándose inclusive en presencia de anticuerpos IgM, tanto en infecciones primarias como secundarias. Esta técnica posee la limitación que no discrimina serotipo, pero permitiría el procesamiento de un gran número de muestras tempranas en laboratorios de menor complejidad técnica y en un corto tiempo, agilizando la respuesta laboratorial, sobretodo en situaciones de brote. Se ha evaluado el desempeño de esta metodología en terreno y si bien, se ha observado menor sensibilidad frente a los serotipos 2 y 4, no se ha evidenciado cruce serológico con los otros flavivirus que han circulado en Argentina en los últimos años (SLEV, YFV, WNV y ZIKV) (31). Existen desarrollos que intentan extender esta posibilidad a la detección de infecciones por otros flavivirus que se encuentran en fase de evaluación.

Un resultado positivo de las técnicas directas confirma la infección, pero un resultado negativo no es suficiente para descartar un caso sospechoso y debe estudiarse una muestra de suero tomada durante la convalecencia por métodos de diagnóstico indirecto o serológico.

La detección de anticuerpos IgM ha sido una herramienta fundamental para la vigilancia del dengue y de otros arbovirus, pero no tiene valor confirmato-

rio considerando la existencia de cruces serológicos y la persistencia de los anticuerpos IgM inclusive por más de un año en un porcentaje de los pacientes (32).

Entre las infecciones virales que pueden ser diagnosticadas por serología, las infecciones por *Flavivirus* resultan ser de las de mayor complejidad por varias razones. 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 *Flavivirus* comparten sitios antigénicos y presentan un alto grado de reactividad cruzada que debe ser considerada a la hora de interpretar resultados serológicos. Particularmente la emergencia de ZIKV y los cruces serológicos con DENV ha puesto en duda la utilidad de esta metodología como pilar de los programas de vigilancia este agente especialmente en regiones endémicas. La vigilancia de CHIKV por serología resulta menos compleja en nuestro país y en general en América, ya que los virus de la familia más relacionados serológica y filogenéticamente no circulan hasta el momento en el continente. En este sentido, el virus Mayaro (MAY) y su variante UNAV deben ser los primeros cuyo cruce serológico debe descartarse en nuestro medio. Argentina ha tenido en el pasado epizootias equinas por EEEV y WEEV, pero infecciones por estos agentes no han sido detectadas en los últimos años.

La confirmación del diagnóstico serológicos se realiza mediante el estudio de un par de sueros (período agudo-convaleciente) por técnica de neutralización en cultivos celulares (33). La demostración de una cuadruplicación en el título de anticuerpos indicará la existencia de un proceso agudo. En estas familias virales se utiliza la prueba de neutralización con un porcentaje del 90% de reducción de placas (PRNT₉₀) en VERO C76 para dar la mayor especificidad a la técnica indirecta confirmatoria. Se trata de una prueba biológica que requiere manejo de cultivos celulares, mantenimiento de cepas virales y condiciones estrictas de bioseguridad por lo cual se halla centralizada en el centro de referencia en el país. Esta metodología posee limitaciones en infecciones secundarias por la exacerbación de los cruces serológicos, pero en nuestro país se ha confirmado y caracterizado brotes por SLEV, WNV y YFV por PRNT₉₀, constituyendo una de las fortalezas de nuestro sistema de vigilancia laboratorial. El uso de esta metodología resulta de fundamental importancia a la hora de descartar infecciones por estos agentes, mostrando gran utilidad en el estudio de embarazadas y recién nacidos con síndrome congénito asociado a ZIKV. En este sentido, remarcamos la necesidad de estudiar en forma conjunta el binomio madre-hijo para contar con herramientas que posibiliten una mejor interpretación de resultados. La búsqueda de metodologías alternativas a la PRNT₉₀ es uno de los principales desafíos y uno de los principales requerimientos para los próximos años.

En la figura 2 se resumen los criterios laboratoriales para la clasificación y notificación de los casos.

Organización de la vigilancia laboratorial en el ámbito público en Argentina

En Argentina funciona desde 1997 una Red Nacional de Laboratorios para el diagnóstico de dengue y otros arbovirus, con más de 65 laboratorios estratégicamente distribuidos en las áreas de mayor riesgo

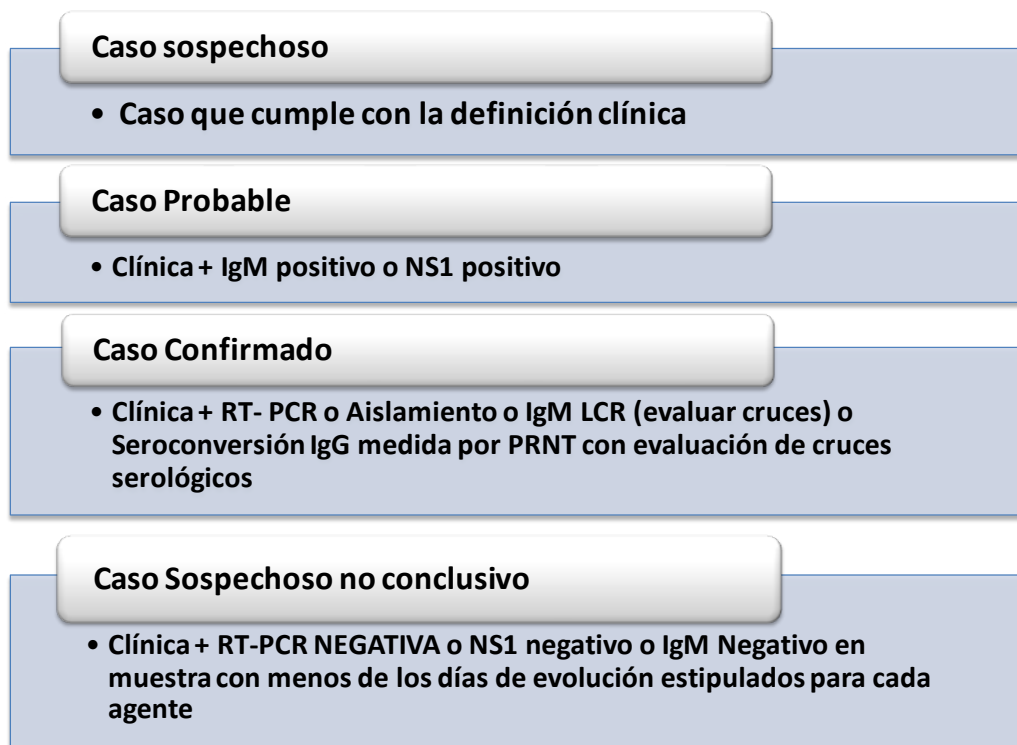


Figura 2. Criterios del laboratorio para la clasificación y notificación de casos en infecciones por arbovirus

epidemiológico del país. Las provincias efectúan los primeros estudios y posibilitan la rápida implementación de medidas de control ante la aparición de casos sospechosos de dengue. La red utiliza reactivos que se gestionan y controlan en forma centralizada y posee un algoritmo de diagnóstico uniforme. El laboratorio nacional de referencia coordina actividades, participa en la normatización de la vigilancia laboratorial, produce reactivos de referencia, corrobora y realiza confirmación diagnóstica y estudios de caracterización viral, y también conduce el control de calidad externo de las metodologías de diagnóstico implementadas en los laboratorios provinciales. Los próximos pasos incluyen el fortalecimiento de la interacción con el sector privado de manera de generar una estrategia diagnóstica conjunta y también garantizar que la totalidad de la información esté disponible para la toma de decisiones de prevención y control de las arbovirosis en el país.

Referencias

1. Monath TP. In: Monath TP (ed.) *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*, CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 1988, p1-18.
2. Weaver SC, Barrett AD. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nat Rev Microbiol*. 2004, 2(10): 789-801.
3. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Panella AJ, Velez JO, Lambert AJ, Campbell GL. Chikungunya virus in US travelers returning from India, 2006. *Emerg Infect Dis*. 2007 May;13(5):764-7.
4. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, Stanfield SM, Duffy MR. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis*. 2008 Aug;14(8):1232-9.
5. Weaver SC, Reisen WK. Present and future arboviral threats. *Antiviral Res*. 2010, Feb;85(2):328-45.
6. Morales MA, Fabbri C. y Enría D. Generalidades sobre Arbovirus y arbovirosis. Capítulo 90, pp 635-637. Libro de *Infectología y Enfermedades Infecciosas*. 1º Edición. Buenos Aires: Ediciones Journal Emilio Cecchini, Silvia E. González Ayala, 2008.
7. Sabattini MS, Avilés G, Monath TP. In: Travassos da Rosa APA, Vasconcelos PFC and Travassos da Rosa JFS (Eds). *Historical and ecological aspects of arboviruses in Argentina: Flaviviridae, Bunyaviridae and Rhabdoviridae*. Instituto Evandro Chagas, Belém, Brasil, 1998 pp 113-34.
8. Sabattini MS, Avilés G and Monath TP. In: Travassos da Rosa APA, Vasconcelos PFC y Travassos da Rosa JFS (Ed). *An overview of Arbovirology in Brazil and neighboring countries*. Instituto Evandro Chagas, Belém, Brasil 1998; p 113-153.
9. Morales MA, Barrandeguy M, Fabbri C, García JB, Vissani A, Trono K, Gutiérrez G, Pigretti S, Menchaca H, Garrido N, Taylor N, Fernández F, Levis S y Enría D. Isolation of West Nile virus (WNV) from equines in Argentina, 2006. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12: 1559-1561.
10. Diaz LA, Ré V, Almirón W, Fariás A, Vazquez A, Sanchez-Seco MP, Aguilar J, Spinsanti L, Konigheim B, Visintín A, García J, Morales MA, Tenorio A, Contigiani M. Genotype III Saint Louis Encephalitis Virus Outbreak, Argentina, 2005. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12: 1752-1754.
11. Spinsanti LI, Díaz LA, Glatstein N, Arselán S, Morales MA, Fariás AA, Fabbri C, Aguilar JJ, Ré V, Frías M, Almirón WR, Hunsperger E, Siirin M, Da Rosa AT, Tesh RB, Enría D, Contigiani M. Human outbreak of St. Louis encephalitis detected in Argentina, 2005. *J Clin Virol*. 2008 May; 42(1):27-33.
12. Seijo A, Morales A, Poustis G, Romer Y, Efron E, Vilora G, Lloveras S, Giamperetti S, Puentes T, Monroig J, Luppo V, Enría D. Brote de Encefalitis de San Luis en el Área Metropolitana de Buenos Aires. *Medicina (Buenos Aires)* 2011; 71: 211-217.
13. Luppo, VC, Morales, MA, Fabbri, C, Goenaga, S, Levis, S y Enría, D. "Vigilancia laboratorial del virus Chikungunya (CHIKV) en la Argentina". *Revista Argentina de Zoonosis y Enfermedades Infecciosas Emergentes*, Volumen IX, N°2, Junio 2014. Páginas 44-45, Argentina.
14. López de Caillou, S, Costas, D, Salmerón, M, Fabbri, CM, Luppo, VC, Zamora, A, Ruiz de Huidobro, G, Morales, MA. Primer brote de enfermedad febril exantemática por virus Zika en Argentina, Tucumán-2016. Presentado en el IV International Clinical Virology Symposium and Avances in Vaccines. Buenos Aires, Argentina, 2016.
15. Fabbri C, Morales MA, Luppo V, Costas D, López De Caillou S, Sinchi A, Enría D, Levis S. Caracterización genética de cepas de virus Zika circulantes en Argentina, 2016. Presentado en el IV International Clinical Virology Symposium and Avances in Vaccines. Buenos Aires, Argentina, 2016.
16. Rodriguez-Morales AJ, Bandeira AC, Franco-Paredes C. The expanding spectrum of modes of transmission of Zika virus: a global concern. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2016 Mar 3;15:13.
17. Gaskell KM, Houlihan C, Nastouli E, Checkley AM. Persistent Zika Virus Detection in Semen in a Traveler Returning to the United Kingdom from Brazil, 2016. *Emerg Infect Dis*. 2017 Jan;23(1):137-139.
18. Manual de Bioseguridad en laboratorios de Microbiología y Biomedicina, 4º edición, CDC-NIH. Versión en español: http://www.uib.cat/digitalAssets/195/195210_cdc_bmb1_4.pdf

Conclusiones

Argentina posee un sistema de vigilancia laboratorial con capacidad de proveer información oportuna y de calidad que ha permitido detectar y caracterizar diversas epidemias por arbovirus en las últimas dos décadas. Los algoritmos de diagnóstico se ajustan de acuerdo al escenario epidemiológico. Es fundamental la articulación con los centros de atención de pacientes y los responsables de epidemiología para el establecimiento de prioridades para los estudios de laboratorio en el marco de epidemias de modo de hacer un buen uso de los recursos, tanto humanos como materiales. Investigaciones operativas, desarrollos y colaboraciones interdisciplinarias e intersectoriales permitirán aumentar el conocimiento de las infecciones por arbovirus, contar con nuevas herramientas y permitirán mejorar considerablemente nuestra capacidad para manejar estas enfermedades en el futuro.

19. López de Caillou S, Rodríguez Raimondo M, Costas D, Salmerrón M, Zamora, A, Ruiz de Huidobro G, Fonio S, Fabbri C, Morales MA. Primera detección de Virus Zika en exudado vaginal, en viajera internacional que regresa de Venezuela a Argentina, Julio 2016. IV Congreso Latinoamericano de Medicina del Viajero, SLAMVI, Buenos Aires, Argentina, 6-7 Octubre, 2016.
20. Zika- Epidemiological update, 22 September 2016, PAHO-WHO: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=readall&cid=7880&Itemid=41484&lang=en
21. de Araújo TV, Rodrigues LC, de Alencar Ximenes RA, de Barros Miranda-Filho D, Montarroyos UR, de Melo AP, Valongueiro S, de Albuquerque MF, Souza WV, Braga C, Filho SP, Cordeiro MT, Vazquez E, Di Cavalcanti Souza Cruz D, Henriques CM, Bezerra LC, da Silva Castanha PM, Dhalia R, Marques-Júnior ET, Martelli CM. Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. *Lancet Infect Dis.* 2016;3099(16)30318-8.
22. Bhatnagar J, Rabeneck DB, Martines RB, Reagan-Steiner S, Ermias Y, Estetter LB, Suzuki T, Ritter J, Keating MK, Hale G, Gary J, Muehlenbachs A, Lambert A, Lanciotti R, Oduyebo T, Meaney-Delman D, Bolaños F, Saad EA, Shieh WJ, Zaki SR. Zika Virus RNA Replication and Persistence in Brain and Placental Tissue. *Emerg Infect Dis.* 2017 Mar 15;23(3).
23. Poo YS, Rudd PA, Gardner J, Wilson JA, Larcher T, Colle MA, Le TT, Nakaya HI, Warrilow D, Allcock R, Bielefeldt-Ohmann H, Schroder WA, Khromykh AA, Lopez JA, Suhrbier A. Multiple immune factors are involved in controlling acute and chronic chikungunya virus infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014 Dec 4;8(12)
24. Gourinat AC, O'Connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M. Detection of Zika virus in urine. *Emerg Infect Dis.* 2015 Jan;21(1):84-6
25. Santiago GA, Vergne E, Quiles Y, Cosme J, Vazquez J, Medina JF, Medina F, Colón C, Margolis H, Muñoz-Jordán JL. Analytical and clinical performance of the CDC real time RT-PCR assay for detection and typing of dengue virus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013 Jul 11;7(7)
26. Morales MA y Fabbri CM. Diagnóstico de las infecciones por el virus de la Fiebre Amarilla (YFV): Experiencia durante la emergencia de Fiebre Amarilla Selvática en Argentina, 2008-2009. Capítulo 16, pp157-166, Temas de Zoonosis VI, Asociación Argentina de Zoonosis, 2014, Buenos Aires, Argentina.
27. Lanciotti RS, Lambert AJ. Phylogenetic Analysis of Chikungunya Virus Strains Circulating in the Western Hemisphere. *Am J Trop Med Hyg.* 2016 Apr;94(4):800-3.
28. de Lamballerie X, Leroy E, Charrel RN, Tsetsarkin K, Higgs S, Gould EA. Chikungunya virus adapts to tiger mosquito via evolutionary convergence: a sign of things to come? *Virology.* 2008 Feb 27; 5:33.
29. Schuffenecker I, Iteman I, Michault A, Murri S, Frangeul L, Vanev MC, Lavenir R, Pardigon N, Reynes JM, Pettinelli F, Biscornet L, Diancourt L, Michel S, Duquerroy S, Guigon G, Frenkiel MP, Bréhin AC, Cubito N, Desprès P, Kunst F, Rey FA, Zeller H, Brisse S. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med.* 2006 Jul;3(7):e263.
30. de Bruycker-Nogueira F, Nogueira RM, Faria NR, Simões JB, Nunes PC, de Filippis AM, dos Santos FB. Insights of the genetic diversity of DENV-1 detected in Brazil in 25 years: Analysis of the envelope domain III allows lineages characterization. *Infect Genet Evol.* 2015 Aug;34:126-36.
31. MA Morales, G Castro, M Figueredo, S Lejona, R Fontana, ME Garay, G Barbas, M Borda, C Ubeid, AD. Fridman, G Gregory, CM Fabbri, VC Luppó, G Poustis, S Catalayud, S Giamperetti, M Ovejero, MD Foussal, D Costas, D Carrizo, N Filomarino**, G Bravo, V Minervini, G Cabral, MB Robles, G Achkar, G Rompato, DM Enría y S Levis. "Evaluación de desempeño de la técnica de ELISA NS1 de virus Dengue (DEN) en la Red Nacional, 2013". Revista: Revista Argentina de Zoonosis y Enfermedades Infecciosas Emergentes, Volumen IX, N°3, Diciembre 2014. Páginas 48-49, Argentina.
32. Martin DA1, Muth DA, Brown T, Johnson AJ, Karabatsos N, Roehrig JT. Standardization of immunoglobulin M capture enzyme-linked immunosorbent assays for routine diagnosis of arboviral infections. *J Clin Microbiol.* 2000; May;38(5):1823-6.
33. Russel PK, Nisalak A, Sukhavachana P, Vivona S. A plaque reduction test for dengue virus neutralizing antibodies. *J Immunol.* 1967; 99: 291-296.

Diagnosis of Dengue, Chikungunya, Zika, and other arboviruses in Argentina: state of the art

Summary

Arthropod-borne viruses, mosquito-borne viruses, are becoming increasingly important global health threats and spreading rapidly worldwide. They are hundreds of predominantly RNA viruses transmitted by arthropods and maintained in complex cycles involving vertebrates such as mammals or birds. Many arboviruses have emerged from their sylvatic reservoirs and dispersed globally due to evolving factors that include anthropological behavior, commercial transportation and land-remediation. Nowadays dengue is a growing health problem in most of the provinces of the subtropical and temperate part of Argentina. The recent introduction of Chikungunya (CHIKV) and Zika (ZIKV) viruses in the northwest part of Argentina has become more complex dengue diagnosis and report. Clinical similarities as well as the difficulties of differentiating them with currently available laboratory tests constitute a challenge for the surveillance system and health staff. Critical aspects of the etiological diagnosis of ZIKV, DENV and CHIKV infections will be presented.

Key words: arbovirus, surveillance, diagnosis, direct methods, indirect methods, algorithm, Dengue virus, Chikungunya virus, Zika virus