



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**IMPLEMENTACIÓN Y MEJORAMIENTO DE TÉCNICAS
SEROLOGICAS PARA LA OPTIMIZACIÓN DEL DIAGNOSTICO DE
ARBOVIRUS EN LA SECCIÓN DE INMUNOSEROLOGÍA VIRAL DEL
INSTITUTO NACIONAL DE HIGIENE RAFAEL RANGEL**

Trabajo Especial de Grado presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por la Bachiller Jeniffer Paola Cantillo Herrera, como requisito para optar al título de Licenciado en Biología.

Tutor(a): Lic. Julio Zambrano

Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (INHRR)

Co-Tutor(a): Dra. Valentina Salas

Instituto de Biología Experimental (IBE-UCV)

Caracas, Venezuela

Junio - 2009

DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a la memoria de mi padre EDUARDO ENRIQUE CANTILLO VILLADIEGO, que con tesón y mucho entusiasmo me enseñó a luchar por lo que quiero y a lograr mis metas aún cuando las vicisitudes estuvieran al acecho.

Por enseñarme que al mal tiempo buena cara y que del árbol caído sólo hacen leña mientras caiga en suelo seco. Porque como muy bien él lo decía todo lo que uno se propone se puede lograr siempre y cuando exista la voluntad. Papi te amo y me gustaría que al igual que mi mamá estuvieras aquí conmigo disfrutando todo lo que con mucho esfuerzo y amor cultivaste por nosotros (tus hijos).

También quisiera dedicarle este trabajo a la memoria de mi primo bello JONÁS ANTONIO HERRERA MONTOYA, que más que un primo fue un hermano, de quien durante la transición del trabajo de tesis, encontré su reflejo en mi ánimo y motivación por seguir luchando y trabajando día a día, para culminar una faceta de mi vida. Fueron muchos los momentos inundados de sus recuerdos, los que me impulsaban y me alentaban cuando tendía a desmayar. Te quiero mucho “hermanito”.

Y por su puesto a mi mami y mis hermanitos bellos, que me han apoyado en todo momento.

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas de las que me siento agradecida, que como bien dice mi mamá a cada santo le debo una vela.

En primer lugar quisiera comenzar agradeciéndole a Dios sobre todas las cosas, por ser el motor propulsor del barco, por llevar el timón de mi vida y porque nunca permitió que naufrague, a pesar de las adversidades. Te amo Dios.

En segundo lugar a mis padres EDUARDO y ELIZABETH, por ser uno de los pilares fundamentales más importantes de mi vida, quienes con sus hechos supieron transmitir el mensaje de satisfacción y aprobación por lo que cada día hacía para lograr mis metas porque con sus sabios consejos me condujeron por el camino, en el día de hoy Dios me dio la fortuna de al menos con uno de ellos pueda compartir este triunfo, “Los adoro”.

También quiero agradecerles a mis hermanitos EDWIN y LISBETH, que representan para mí, la otra parte de mí ser, el complemento de mi vida y otro de los motivos por los cuales me llevaron a alcanzar la meta que el día de hoy estoy culminando. Tengan siempre presente que donde quiera que estén siempre los amaré.

Agradezco también a una persona muy especial que a mi familia a mi nos brindó su apoyo, y se portó como un tío durante una dura travesía en ausencia de mi padre, en honor a la memoria del señor JOSÉ ANTONIO.

Le agradezco a toda mi familia (mis tíos, mis primos, a mi abuelito) por su compañía, apoyo incondicional, recuerden que la unión nos fortalece.

Quiero darle un agradecimiento especial al Señor Freddie Acive por su amistad, por sus sabios consejos y por dedicar parte de su valioso tiempo transmitiéndome sus conocimientos, lo aprecio mucho.

Miriam, señora Rossania, Elisa, Lieska, Nathalie, Nora, Yubi, Carmen María, señora Martha, Henry, Jonathan y Yeni, les doy mil gracias por hacerme sentir como parte de la familia de Inmunoserología, por compartir sus conocimientos conmigo, por el apoyo, por su carisma. De verdad mil gracias, conservan un lugar muy especial en mi corazón.

Agradezco también a todos los miembros del laboratorio de Aislamiento Viral por toda la colaboración, atención y asesoría brindada, en especial a Lolita y a Rosita, que en todo momento se esmeraron y compartieron conmigo la preocupación porque los experimentos salieran bien y rápido.

Un agradecimiento muy merecido quiero darles a todos los integrantes del Departamento de Cultivo Celular por el esfuerzo que hicieron en tratar de facilitarme parte de los cultivos celulares que emplee en las condiciones más óptimas para la obtención de resultados de experimentos satisfactorios.

También a los integrantes del Departamento de Medios de Cultivo y Reactivos y Colorantes, por suministrarme parte de los reactivos que fueron usados durante la realización de los experimentos.

Quiero también darle un caluroso agradecimiento al Doctor Jesús Querales por interesarse en que mi trabajo de tesis culmine pronto. Y ofrecerme una vacante aún estando en tesis y por brindarme su apoyo incondicional cuando más lo necesité durante la culminación de este trabajo.

A la Licenciada Dulce por ser siempre tan receptiva en cuanto a aclararme dudas relacionadas con la tesis.

A mi amigo David por enseñarme los detalles del PRNT sin ningún tipo de mezquindad, que sólo se adquieren a punta de golpes con la experiencia, por el valioso

tiempo que me dedicó durante la pasantía en BIOMED y por la paciencia que tuvo mientras me enseñaba.

A mi amiga Alex que siempre ha estado conmigo en las buenas y en las malas, por su incondicionalidad, humildad y sencillez. Te quiero mucho amiga, y espero yo también poder compartir contigo tus alegrías y tus tristezas.

A mis amigas Luz, Lucre, Yema y Liz que siempre me aconsejaron y me brindaron su apoyo, me escucharon y supieron entender, cuando me encontraba agobiada por problemas que se presentaban durante la tesis y siempre con palabras de aliento y chistes me levantaban el ánimo.

A la familia de mi amiga Luz, la Señora Emma, Señor Rubén, Emely y Doraluz por abrirme las puertas de su casa, brindarme apoyo, y por hacerme sentir parte de la familia, "MIL GRACIAS".

A mis amigas Kisbe, Nathy, Ana y Andre, por sus valiosas amistades.

Al Señor Juan por brindarnos su respaldo y su apoyo en el mantenimiento del techito.

A Marcel por ser tan colaboradora, por estar siempre en las buenas y en las malas.

A la profesora Valentina Salas por brindarme sus consejos, apoyo y asesoría para que esta tesis tuviera forma.

A la Licenciada Marlene, al Doctor Liprandi y al Doctor Álvaro Ramírez del laboratorio de Biología de virus del IVIC, por la colaboración y asesoría brindada.

También quiero agradecerle a la profesora Elizabeth Merentes por su colaboración y asesoría brindada en el tratamiento de las células BHK-21.

Agradezco también a los vigilantes del Instituto Nacional de Higiene que permitieran mi acceso al Instituto durante los días no laborables tales como fines de semana y días feriados, por entender mi necesidad de terminar los experimentos, de verdad sin su colaboración no hubiera sido posible haber avanzado tanto, Gracias.

Al Profesor Víctor Hugo, por su gran ayuda y asesoría en el análisis estadístico de los resultados.

Agradezco a la licenciada Rosalba Moros por su colaboración con suministro de una de las muestras.

A la profesora Guillermina Alonso por ayudarme con sus consejos y asesoría, por interesarse en mi bienestar, y por interceder académicamente cuando lo necesite.

A mi tutor por aceptarme en su laboratorio.

RESUMEN

Implementación y Mejoramiento de Técnicas Serológicas para la Optimización del Diagnóstico de Arbovirus en la Sección de Inmunoserología viral del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel.

Las técnicas serológicas constituyen una herramienta imprescindible en el diagnóstico virológico y se les confiere esta importancia por lo difícil que resulta en la mayoría de los casos lograr el diagnóstico por aislamiento viral (*Vázquez y col, 1968*). La Técnica de Neutralización por Reducción en Placas (PRNT), ha sido usada por más de 30 años, para medir anticuerpos neutralizantes contra *flavivirus*, los cuales son virus que se encuentran clasificados dentro de la familia *Flaviviridae*, a la cual pertenece el virus de la fiebre amarilla y del dengue. Estos virus son transmitidos a través de mosquitos (*Putnak y col, 2008*). A fin de Implementar la PRNT en el Laboratorio de Inmunoserología Viral del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel (INHRR), fueron comparados los parámetros, sensibilidad y especificidad, de la PRNT, cuya técnica es novedosa en esta institución, con los de la técnica patrón, Inhibición de la Hemaglutinación (I.H), que se usa de rutina en esta Sección del INHRR. Se analizaron 48 muestras de sueros de pacientes, separadas por grupos: 13 pares de muestras de sueros (constituidas por una muestra aguda y una convaleciente), 20 muestras de sueros únicos, en fase aguda y 15 muestras de sueros únicos, en fase convaleciente. Para el desarrollo del método de la PRNT, se amplificó semilla viral de la cepa vacunal del virus de la fiebre amarilla y de una cepa local de los serotipos 1 y 2 del dengue, en las líneas celulares Vero E6 y C6/36 HT, respectivamente. Se titularon las semillas virales, la de fiebre amarilla en Vero E6 y las del dengue en Vero NK, empleando el método semilíquido de plaqueo tradicional, con carboximetilcelulosa (CMC). Por su parte, para el desarrollo del método de la I.H, se produjeron antígenos virales de los serotipos 1 y 2 del dengue, a partir de las mismas cepas locales amplificadas en C636/HT, en cerebro de ratón lactante y se extrajeron empleando el método de la acetona-sacarosa de *Clarke y Casals*,

1958. Se encontró, según los análisis de residuales estandarizados para una tabla de contingencia de dos vías, con los cuatro grupos de muestras de sueros analizadas, que la PRNT tendió a ser igualmente sensible, pero mucho más específica que la I.H. En cuanto a los resultados serológicos, todas las muestras, en cada uno de los grupos, tuvieron títulos elevados de anticuerpos hacia los dos serotipos del virus dengue por PRNT, similar al que presentó el control positivo hacia Den-1. Por I.H todas las muestras resultaron tener anticuerpos hacia los dos serotipos del dengue, tan o más elevados como el control positivo. Encontrándose una relación entre los niveles elevados de anticuerpos detectados por I.H y la sensibilidad que presenta esta técnica para detectar anticuerpos contra cualquier *flavivirus*. Lo que se corresponde con los resultados de sensibilidad para esta técnica, obtenidos previamente por Análisis de Residuales Estandarizados. La técnica PRNT, fue capaz de discernir entre infección por dengue de infección por fiebre amarilla, con cada grupo de muestras de suero, por lo que es posible que el diagnóstico de estos arbovirus, sea optimizado próximamente, en el Laboratorio de Inmunoserología Viral del INHRR.

I.-Introducción	1
II.1.- Arbovirus	5
II.2.- Modalidades Clínicas del Dengue	6
II.2.1.- Fiebre por Dengue (F.D)	6
II.2.2.- Fiebre Hemorrágica por Dengue (FHD) y Síndrome de Choque por Dengue (SCD)	6
II.3.- Epidemiología del virus del dengue	8
II.4.-Ciclos de Transmisión del Dengue	10
II.5.- Fiebre Amarilla Hemorrágica	12
II.5.1.- Respuesta ante la vacuna de la fiebre amarilla	13
II.6.- Familia <i>Flaviviridae</i>	14
II.6.1.- Estructura de los <i>Flavivirus</i>	19
II.6.1.1.-Proteínas estructurales de los <i>flavivirus</i>	20
II.6.1.2.-Proteínas no estructurales de los <i>flavivirus</i>	23
II.7.- Patogénesis de la FHD/SCD	28
II.7.1.- Respuesta Inmunitaria Innata	28
II.7.2.- Respuesta Inmunitaria Adaptativa	33
II.7.3.- Respuesta Inmunitaria Humoral	33
II.7.4.- Efecto de los anticuerpos contra las proteínas E y NS1 del virus del dengue sobre las plaquetas y células endoteliales	39
II.7.5.- Otros factores involucrados en la patogénesis de la FHD/SCD	44
II.8.- Cultivo viral en sistema celular	45
II.8.1.- Titulación de placas virales	47
II.9.- Detección de transmisión reciente de dengue y fiebre amarilla	49
II.9.1.- Longevidad de los anticuerpos anti-dengue y anti-fiebre amarilla	50

II.9.2.- Ensayos para detectar infección pasada por dengue y fiebre amarilla	50
II.9.2.1.- Técnica de Inhibición de la Hemaglutinación (I.H)	51
II.9.2.2.- Técnica de Neutralización por Reducción en Placas (PRNT)	53
III.- Antecedentes	57
IV.- Justificación de la Investigación	68
V.- Objetivos	69
Generales	69
Específicos	69
VI. Materiales y Métodos	70
VI.1.-Selección de la muestra	70
VI.2.- ELISA IgM de captura	73
VI.3.- Características de las células C636/HT	74
VI.3.1.- Cultivo de células C636/HT	75
VI.3.2.- Amplificación de semillas virales de los serotipos 1 y 2 del dengue en células C636/HT	75
VI.3.3.- Inmunofluorescencia Indirecta	76
VI.4.- Características de las células Vero	76
VI.4.1.- Amplificación del virus de la fiebre amarilla cepa vacunal en Vero E6	77
VI.5.- Titulación de Placas Virales	77
VI.5.1.- Método de la Agarosa <i>overlay</i> al 0,5%	77
VI.5.2.- Método de la Carboximetilcelulosa <i>overlay</i> (CMC) al 1,5%	78
VI.6.- Neutralización por Reducción en Placas	79
VI.7.- Inoculación viral del dengue en cerebro e ratón lactante	80
VI.7.1.- Extracción de antígeno en cerebro de ratón lactante	80
VI.8.- Prueba de Hemaglutinación	81
VI.9.- Prueba de Inhibición de la Hemaglutinación	82

VI.10.- Estimación de la sensibilidad y la especificidad de la técnica PRNT tomando como referencia la técnica I.H	84
VI.11.- Análisis Estadístico	85
VI.11.1.- Prueba Chi-Cuadrado (χ^2)	85
VI.11.2.- Análisis de Residuales Estandarizados para una tabla de contingencia de dos vías para la estimación de la sensibilidad y la especificidad de las técnicas PRNT e I.H.	86
VII.- Resultados	87
VII.1.- Amplificación de los cuatro serotipos del virus del dengue en células C636/HT y del virus de la fiebre amarilla en células Vero E6	87
VII.2.- Titulación preliminar de la F.A y de las cepas locales de Den-1, Den-3 y Den-4	90
VII.3.- Titulación por plaqueo del virus de la fiebre amarilla y de los serotipos 1 y 2 del dengue	92
VII.3.1.- Titulación por plaqueo del serotipo 1 del virus del dengue	92
VII.3.2.- Titulación por plaqueo del serotipos 2 del virus del dengue	94
VII.3.3.- Titulación por plaqueo de la cepa vacunal 17DD del virus de la fiebre amarilla	96
VII.4.- Resultados de la inoculación de los cuatro serotipos del virus del dengue en cerebro de ratón lactante	97
VII.4.1.- Prueba de Hemaglutinación del antígeno extraído	98
VII.5.- Análisis de sensibilidad y especificidad de las técnicas serológicas en estudio	98
VII.5.1.- Pares de muestras de suero de pacientes	98
VII.5.2.- Muestras de suero de pacientes con anticuerpos IgM positivos para dengue y fiebre amarilla	104
VII.5.3.- Muestras de suero de pacientes en fase aguda	106
VII.5.4.- Muestras de suero de pacientes en fase convaleciente	110
VII.6.- Resultados serológicos para un grupo de pares de muestras de suero de pacientes	113

VII.7.- Resultados serológicos para un grupo de muestras de suero de pacientes con anticuerpos IgM positivos anti-dengue y anti-fiebre amarilla	118
VII.8.- Resultados serológicos para un grupo de muestras de suero de pacientes en fase aguda	123
VII.9.- Resultados serológicos para un grupo de muestras de suero de pacientes en fase convaleciente	128
VIII.- Discusión	133
IX.- Conclusiones	147
X.- Recomendaciones	149
XI.- Bibliografía	150

Fig. 1.- Ciclo de transmisión del virus del dengue por el mosquito <i>Aedes aegypti</i>	11
Fig. 2.- Ciclo de transmisión del virus del dengue	11
Fig. 3.- Pasos de la multiplicación viral de la Familia <i>Flaviviridae</i>	15
Fig. 4.- Estructura y expresión del genoma de los <i>flavivirus</i>	18
Fig. 5.-Crio-microscopia electrónica del virus del dengue	19
Fig. 6.- Replicación del Genoma de los <i>Flavivirus</i>	27
Fig. 7.- Encuentro del Sistema Inmunitario Innato luego de la inoculación del virus del dengue en los vasos capilares	31
Fig. 8.- Unión de pre-enfermedades	38
Fig. 9.- Vías de señalización mediadas por anticuerpos anti-NS1 que conducen a la activación inflamatoria de las células endoteliales y a la apoptosis.	43
Fig. 10.- Esquema de la técnica de plaqueo	48
Fig. 11.- Curva Dosis Respuesta	48
Fig. 12.-Prueba de Inhibición de la Hemaglutinación	53
Fig. 13.-Distribución Normal Estandarización	86
Fig. 14.-Inmunofluorescencia Indirecta de cepas locales de los cuatro serotipos del virus del dengue	89
Fig. 15.- Inmunofluorescencia Indirecta de la fiebre amarilla cepa vacunal 17DD FIOCRUZ Bio-Manguinhos	90
Fig. 16.- Titulación por plaqueo del virus Den-1, cepa local P:2 C636/HT	93
Fig. 17.- Titulación por plaqueo del virus Den-2, cepa local P:2 C636/HT	95
Fig. 18.- Titulación por plaqueo del virus de la fiebre amarilla, cepa vacunal 17DD	96

Fig. 19.- Perfil de residuales estandarizados para probar la sensibilidad y especificidad, respecto a la detección de anticuerpos a través de las técnicas PRNT e I.H con pares de muestras de suero de pacientes.	103
Fig. 20.- Perfil de residuales estandarizados para probar la sensibilidad y especificidad, respecto a la detección de anticuerpos a través de las técnicas PRNT e I.H con muestras de suero de pacientes positivas a IgM anti-dengue y anti-fiebre amarilla.	106
Fig.21.- Perfil de residuales estandarizados para probar la sensibilidad y especificidad, respecto a la detección de anticuerpos a través de las técnicas PRNT e I.H con muestras de suero de pacientes en fase aguda.	109
Fig. 22.- Perfil de residuales estandarizados para probar la sensibilidad y especificidad, respecto a la detección de anticuerpos a través de las técnicas PRNT e I.H con muestras de pacientes en fase convaleciente.	112
Fig. 23.- Comparación del Log 10 del recíproco de la dilución de suero, obtenida con pares de muestras de suero de pacientes, enfrentadas a Den-1 por las dos técnicas serológicas en estudio	114
Fig. 24.- Comparación del Log 10 del recíproco de la dilución de suero, obtenida con pares de muestras de suero de pacientes, enfrentadas a Den-2 por las dos técnicas serológicas en estudio	115
Fig. 25.- Comparación del Log 10 del recíproco de la dilución de suero, obtenida con pares de muestras de suero de pacientes, enfrentadas a F.A por las dos técnicas serológicas en estudio	117
Fig. 26.- Comparación del Log 10 del recíproco de la dilución de suero, obtenida con muestras de suero de pacientes con anticuerpos IgM positivos anti-dengue y anti-fiebre amarilla, enfrentadas a Den-1 por las dos técnicas serológicas en estudio	119

Fig. 27.- Comparación del Log 10 del recíproco de la dilución de suero, obtenida con muestras de suero de pacientes con anticuerpos IgM positivos anti-dengue y anti-fiebre amarilla, enfrentadas a Den-2 por las dos técnicas serológicas en estudio	120
Fig. 28.- Comparación del Log 10 del recíproco de la dilución de suero, obtenida con muestras de suero de pacientes con anticuerpos IgM positivos anti-dengue y anti-fiebre amarilla, enfrentadas a FÁ por las dos técnicas serológicas en estudio	122
Fig. 29.- Comparación del Log 10 del recíproco de la dilución de suero, obtenida con muestras de suero de pacientes en fase aguda, enfrentadas a Den-1 por las dos técnicas serológicas en estudio	124
Fig. 30.- Comparación del Log 10 del recíproco de la dilución de suero, obtenida con muestras de suero de pacientes en fase aguda, enfrentadas a Den-2 por las dos técnicas serológicas en estudio	125
Fig. 31.- Comparación del Log 10 del recíproco de la dilución de suero, obtenida con muestras de suero de pacientes en fase aguda, enfrentadas a F.A por las dos técnicas serológicas en estudio	127
Fig. 32.- Comparación del Log 10 del recíproco de la dilución de suero, obtenida con muestras de suero de pacientes en fase convaleciente, enfrentadas a Den-1 por las dos técnicas serológicas en estudio	129
Fig. 33.- Comparación del Log 10 del recíproco de la dilución de suero, obtenida con muestras de suero de pacientes en fase convaleciente, enfrentadas a Den-2 por las dos técnicas serológicas en estudio	130
Fig. 34.- Comparación del Log 10 del recíproco de la dilución de suero, obtenida con muestras de suero de pacientes en fase convaleciente, enfrentadas a F.A por las dos técnicas serológicas en estudio	132

<i>Tabla. 1.-</i> Características de los pares de muestras de suero de pacientes	71
<i>Tabla. 2.-</i> Características de las muestras de suero de pacientes en fase aguda	72
<i>Tabla. 3.-</i> Características de las muestras de suero de pacientes en fase convaleciente	73
<i>Tabla. 4.-</i> Distribución de los Positivos y negativos por I.H y PRNT	85
<i>Tabla. 5.-</i> Titulo viral de Den-1, Den-3, Den-4 y F.A	92
<i>Tabla. 6.-</i> Titulo del virus Den-1 cepa local P:2 C636/HT	93
<i>Tabla. 7.-</i> Titulo del virus Den-2 cepa local P:2 C636/HT	95
<i>Tabla. 8.-</i> Titulo del virus de la fiebre amarilla cepa vacunal 17DD Fiocruz Bio-Manguinhos	96
<i>Tabla. 9.-</i> Distribución de positivos y negativos por I.H y PRNT de F.A, Den-1 y Den-2 con pares de muestras de suero de pacientes	99
<i>Tabla. 10.-</i> Sensibilidad y especificidad de la PRNT e I.H con pares de muestras de suero de pacientes	99
<i>Tabla. 11.-</i> Datos positivos y negativos para las técnicas en estudio con pares de muestras de suero de pacientes	100
<i>Tabla. 12.-</i> Residual estandarizado de datos con pares de muestras de suero de pacientes	103
<i>Tabla. 13.-</i> Distribución de positivos y negativos por I.H y PRNT de F.A, Den-1 y Den-2 con muestras de suero de pacientes positiva a IgM anti-dengue y anti-fiebre amarilla	104
<i>Tabla. 14.-</i> Sensibilidad y especificidad de la PRNT e I.H con muestras de suero de pacientes positiva a IgM anti-dengue y anti-fiebre amarilla.	104
<i>Tabla. 15.-</i> Datos positivos y negativos para las técnicas en estudio con muestras de suero de pacientes positivas a IgM anti-dengue y anti-fiebre amarilla.	105

<i>Tabla. 16.-</i> Residual estandarizado de datos con muestras de suero de pacientes positivas a IgM anti-dengue y anti-fiebre amarilla.	106
<i>Tabla. 17.-</i> Distribución de positivos y negativos por I.H y PRNT de F.A, Den-1 y Den-2 con muestras de suero de pacientes en fase aguda	107
<i>Tabla. 18.-</i> Sensibilidad y especificidad de la PRNT e I.H con muestras de suero de pacientes en fase aguda	107
<i>Tabla. 19.-</i> Datos positivos y negativos para las técnicas en estudio con muestras de suero de pacientes en fase aguda.	108
<i>Tabla. 20.-</i> Residual estandarizado de datos con muestras de suero de pacientes en fase aguda.	109
<i>Tabla. 21.-</i> Distribución de positivos y negativos por I.H y PRNT de F.A, Den-1 y Den-2 con muestras de suero de pacientes en fase convaleciente	110
<i>Tabla. 22.-</i> Sensibilidad y especificidad de la PRNT e I.H con muestras de suero de pacientes en fase convaleciente	110
<i>Tabla. 23.-</i> Datos positivos y negativos para las técnicas en estudio con muestras de suero de pacientes en fase convaleciente.	111
<i>Tabla. 24.-</i> Residual estandarizado de datos con muestras de suero de pacientes en fase convaleciente.	111
<i>Tabla. 25.-</i> Cuadro comparativo de resultados de la PRNT y de la I.H para Den-1, con pares de muestras de suero de pacientes.	114
<i>Tabla. 26.-</i> Cuadro comparativo de resultados de la PRNT y de la I.H para Den-2, con pares de muestras de suero de pacientes.	115
<i>Tabla. 27.-</i> Cuadro comparativo de resultados de la PRNT y de la I.H para F.A, con pares de muestras de suero de pacientes.	117
<i>Tabla. 28.-</i> Cuadro comparativo de resultados de la PRNT y de la I.H para Den- con muestras de suero de pacientes positivas a IgM anti-dengue y anti-fiebre amarilla.	119

<i>Tabla. 29.- Cuadro comparativo de resultados de la PRNT y de la I.H para Den-2 con muestras de suero de pacientes positivas a IgM anti-dengue y anti-fiebre amarilla</i>	120
<i>Tabla. 30.- Cuadro comparativo de resultados de la PRNT y de la I.H para F.A con muestras de suero de pacientes positivas a IgM anti-dengue y anti-fiebre amarilla.</i>	122
<i>Tabla. 31.- Cuadro comparativo de resultados de la PRNT y de la I.H para Den-1 con muestras de suero de pacientes en fase aguda.</i>	124
<i>Tabla. 32.- Cuadro comparativo de resultados de la PRNT y de la I.H para Den-2 con muestras de suero de pacientes en fase aguda.</i>	125
<i>Tabla. 33.- Cuadro comparativo de resultados de la PRNT y de la I.H para F.A con muestras de suero de pacientes en fase aguda.</i>	127
<i>Tabla. 34.- Cuadro comparativo de resultados de la PRNT y de la I.H para Den-1 con muestras de suero de pacientes en fase convaleciente.</i>	129
<i>Tabla. 35.- Cuadro comparativo de resultados de la PRNT y de la I.H para Den-2 con muestras de suero de pacientes en fase convaleciente.</i>	130
<i>Tabla. 36.- Cuadro comparativo de resultados de la PRNT y de la I.H para F.A con muestras de suero de pacientes en fase convaleciente.</i>	132

ARN: Ácido Ribonucleico

IH: Inhibición de la Hemaglutinación

NCR: Región No codificante

HA: Hemaglutinación

MAbs: Anticuerpos Monoclonales

IgM: Inmunoglobulina M

IgG: Inmunoglobulina G

EC: Efecto Citopático

ufp: Unidades Formadoras de Placa

FA: Fiebre Amarilla

DEN: Dengue

PRNT: Técnica de Neutralización por Reducción en Placas

SCD: Síndrome de Choque por Dengue

NS: Proteína No Estructural

kDa: Kilodalton

E: Proteína de Envoltura

prM: Proteína precursora de Membrana

CAP: Caperuza (5- metil-guanosina)

Cys: Cisteína

ARNm: Ácido Ribonucleico Mensajero

UTR: Región No Codificante

DH: Dengue Hemorrágico

FHD: Fiebre Hemorrágica por Dengue

ICAM: Molécula de Adhesión Intercelular

IL: Interleucina

p53: gen p53

Bax: gen Bax

Bcl-2: gen Bcl-2

Bcl-xL: gen Bcl-xL

MAC ELISA: ELISA IgM de Captura

BHK: Riñón de Hámster Bebé

PKR: Quinasa de Proteína dependiente de ARN_{dc}

DC-SING: Molécula de Adhesión Intercelular No integrina Específica de Células Dendríticas

ETG: Encefalitis Transmitida por Garrapatas

EJ: Encefalitis Japonés

ESL: Encefalitis de SanLuis

VON: Virus del Oeste del Nilo

BABS: Solución de Borato Albúmina

DGV: Veronal-Gelatina-Dextrosa

ACD: Acido Cítrico Dextrosa

I.- INTRODUCCION

Las técnicas serológicas constituyen una herramienta imprescindible en el diagnóstico virológico y se les confiere esta importancia por lo difícil que resulta en la mayoría de los casos lograr el diagnóstico por aislamiento viral (*Vázquez y col, 1986*).

Para el diagnóstico de arbovirus, los cuales son un grupo de virus transmitidos por artrópodos, se han aplicado pruebas serológicas que por su amplio uso, se consideran como técnicas clásicas, tal es el caso de la inhibición de la hemaglutinación (I.H) y la fijación del complemento (FC). Cada una de ellas detecta anticuerpos de diferentes clases y sus resultados tienen distinta significación para el diagnóstico (*Vázquez y col, 1986, Unnasch y col, 2006*).

La Técnica de Neutralización por Reducción en placas (PRNT) ha sido usada por más de 30 años, para medir anticuerpos neutralizantes contra *flavivirus* (*Putnak y col, 2008*). Los anticuerpos neutralizantes actúan como bloqueadores de la infección inicial y de la posterior diseminación de la infección de una célula a otra, por neutralización del virus (*Kolokoltsov y col, 2006; Roehrig y col, 2008*); por ello juegan un rol clave en la prevención de la infección por dengue y fiebre amarilla (*Álvarez y col, 2005*).

La PRNT es considerada actualmente, la prueba serológica patrón, para determinar inmunidad hacia *flavivirus*. Es llevada a cabo por la incubación de un limitado número de unidades formadoras de placas (ufp) de una dosis de virus estimulante con diluciones seriadas del suero o del plasma a ser probados, luego por la incubación de la mezcla en monocapa de células susceptibles y finalmente por el contaje de las placas que se forman luego de varios días. El título de anticuerpos neutralizantes normalmente es calculado por un método interpolativo tal como el análisis de regresión lineal (probit) y son reportados como el

recíproco de la dilución de suero que exhibe un 50 % (frecuentemente un 70 % o 90 %) en la reducción del número de placas virales comparado con el control de monocapa inoculada con virus (Guzmán y col, 2005; Putnak y col, 2008).

La fiebre amarilla y el dengue son virus pertenecientes al grupo de los Arbovirus, y se encuentran clasificados dentro del género *Flavivirus* de la familia *Flaviviridae* (Álvarez y col, 1998; Álvarez y col, 2005; WHO World Health Organization. Dengue en las Américas [En línea]. 2005. Disponible desde: URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/index.html> Consulta: 20/03/08; Goncalvez y col, 2007).

Estos *flavivirus* están estrechamente relacionados y comparten en su envoltura, antígenos comunes de grupo, capaces de inducir la producción de anticuerpos débiles o no neutralizantes de reactividad cruzada, detectables mediante diferentes técnicas serológicas (Álvarez y col., 1998; Goncalvez y col., 2007).

No obstante, cuando se hace diagnóstico serológico de infección por estos *flavivirus*, a través de las técnicas clásicas, resulta difícil llegar a una conclusión definitiva de casos, en zonas donde co-circulan estos virus, dado que la estrecha relación antigénica entre estos *flavivirus*, evocan a los anticuerpos presentes en las muestras de pacientes, a reconocer epítopes específicos del virus hacia el que fueron producidos, pero también los inducen a reconocer epítopes comunes de familia, obteniéndose títulos de anticuerpos muy similares por titulación de anticuerpos de una muestra particular, siendo esto lo que se conoce como cruzamiento serológico (Acuña y col, 2001). La estrecha relación entre el virus del dengue y el virus de la fiebre amarilla, y la desafortunada incapacidad de las técnicas clásicas, en discernir entre diferentes infecciones por *flavivirus*, ha hecho sugerir a los investigadores la necesidad de desarrollar un método que sea realmente específico para la discriminación entre infección por dengue de infección por fiebre amarilla.

La enfermedad del Dengue es reconocida como la infección arboviral humana más importante en el mundo (*Pang y col, 2007*). Es transmitida principalmente por los mosquitos *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* y en general es mantenida en un ciclo de transmisión humano-mosquito. Puede causar una enfermedad febril benigna similar a la gripe, y a veces pueden presentarse complicaciones potencialmente mortales tales como dengue hemorrágico (DH) y Síndrome de Choque por Dengue (SCD) (*Álvarez y col., 2005*; WHO World Health Organization. Dengue en las Américas [En línea]. 2005. Disponible desde: URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/index.html> Consulta: 20/03/08).

Por otra parte, la fiebre amarilla es una enfermedad febril aguda causada también por un arbovirus, la cual en su forma más seria, podría conducir a la muerte (*Suzano y col., 2006*). Se ha mantenido como un problema importante de salud en las áreas selváticas y rurales de las Américas y en África. Se conocen dos formas epidemiológicas principales, la fiebre amarilla urbana que se transmite de persona a persona a través de la picadura del mosquito *Aedes aegypti*, y la fiebre amarilla selvática que se encuentra generalmente en los monos y se transmite de mono a mono a través de la picadura de mosquitos del género *Haemagogus* en América y *Aedes africanus* en África (*Álvarez y col., 1998*).

Con el aumento de los casos de dengue y de fiebre hemorrágica del dengue (FHD) aumenta la coincidencia de las áreas endémicas de ambas enfermedades y existen áreas endémicas de dengue donde la vacunación por fiebre amarilla es frecuente debido a la existencia de fiebre amarilla selvática (*Álvarez y col., 1998*).

Con base en la capacidad que tienen los anticuerpos de unirse eficientemente a partículas virales mediante interacciones no covalentes, en este trabajo se intenta implementar la técnica serológica Neutralización por Reducción en Placas (PRNT), usando muestras de suero de pacientes con clínica de dengue y fiebre amarilla, en fase aguda y fase convaleciente de la enfermedad. Dado que la misma presenta el potencial de ser altamente

específica y a su vez de tener la capacidad de discernir entre infección primaria e infección secundaria por virus dengue (*Crespo, 2000; Guzmán y col, 2005; Roehrig y col, 2008*).

La implementación de esta técnica en el Laboratorio de Inmunoserología Viral del Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel" (INHRR), permitirá un diagnóstico más completo.

Su utilidad se ve reflejada, principalmente en brotes epidémicos en los que la viremia en los pacientes es muy baja, ya sea porque la muestra fue tomada después que se completara el período de incubación del virus para poder ser detectado en sangre o simplemente porque el virus no se replica a altos títulos, impidiéndose la detección por cultivo viral o por PCR; en casos como éste, la única alternativa o fuente de información, la generaría el análisis del nivel de anticuerpos en suero de los pacientes, a través de técnicas serológicas. Lo que marca la diferencia de esta técnica de las otras, es que ésta detecta anticuerpos del tipo IgG1 que son almacenados por las células de memoria del plasma en la médula ósea durante la fase convaleciente, y con el pasar del tiempo se vuelven más específicos de virus (*Watanaveeradej y col, 2003; Guzmán y col, 2005*).

II. - MARCO TEÓRICO

II.1.- Arbovirus

Son un grupo de virus que se mantiene en la naturaleza, principalmente a través de la transmisión biológica en ciclos que incluyen artrópodos hematófagos, por ejemplo insectos, garrapatas y ácaros, los cuales sirven como vectores para estos agentes virales (*Unnasch y col, 2006*), y hospedadores vertebrados susceptibles, que pueden servir de reservorios (*Unnasch y col, 2006; Harley y col, 2001*). Muchos arbovirus son virus cuyos genomas están constituidos por ARN. Estos virus se multiplican y producen viremia en los vertebrados que infectan artrópodos a través de la picadura, se replican en los tejidos de los artrópodos sin producir alteraciones a través de un proceso conocido como período de incubación extrínseca y pueden ser transmitidos a nuevos vertebrados por la picadura de estos artrópodos (*Harley y col, 2001; Pumarola y Pumarola, 1987*).

Familias que actualmente pertenecen a los arbovirus son *Arenaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae* y *Togaviridae* (*Cann, 2001*).

Esta familia de virus se encuentra conformada por los géneros *Flavivirus*, *Pestivirus* y *Hepacivirus* (*Cann, 2001; Field, Knipe y Howley, 2007*).

El género de los *Flavivirus* incluye más de 70 virus de ARN cadena sencilla, que comparten determinantes antigénicos comunes y es dividido en 8 serosubgrupos y 9 serotipos individuales (*Scaramozzino y col, 2001; Fields. Knipe y Howley, 2007*).

Este género incluye los virus de la Fiebre Amarilla (FA), Dengue (DEN-1, -2, -3 y -4), Encefalitis Transmitida por Garrapatas (ETG), Encefalitis Japonesa (EJ), Encefalitis de San Luis (ESL) y Virus del Oeste del Nilo (VON) (*Scaramozzino y col, 2001*).

II.2. –Modalidades Clínicas de la enfermedad del Dengue

II.2.1.- Fiebre por Dengue (FD)

La Fiebre por Dengue (FD) se produce a través de la picadura de mosquitos.

Es una enfermedad aguda y un síndrome que está asociado con la ocurrencia de fiebre que dura de 2 a 7 días, dolor de cabeza, mialgia, erupción a menudo acompañado por leucopenia y dolor en las articulaciones y en los huesos. Ocasionalmente se observa trombocitopenia y hemorragias cutáneas en grados variables (CDC Dengue: Aspectos clínicos y de salud pública. [En línea]. 2002. Disponible desde: URL: <http://www.cdc.gov/Ncidod/dvbid/dengue/slideset/spanish/set1/i/slide04.htm> Consulta: 12 de febrero de 2008; Yamashiro y col, 2004; Noisakran y Perng, 2007; Álvarez y col, 2007).

II.2.2.- Fiebre Hemorrágica por Dengue (FHD) y Síndrome de Choque por Dengue (SCD)

Una de las formas más severas de enfermedad, FHD, está definida por incremento en la permeabilidad vascular, manifestaciones hemorrágicas a través de las mucosas y la piel, niveles disminuidos de plaquetas, fiebre, mialgia o artralgia, erupción, linfadenopatía, trombocitopenia (Richards y col, 1997; Balmaseda y col, 2006; Falconar, 2007).

Las características clínicas de la FHD son muy similares a la de FD en muchos aspectos durante la fase febril temprana. La prominencia de esta enfermedad es su potencial de desarrollarse hacia el fatal SCD. La principal distinción fisiopatológica que determina la severidad de la enfermedad y distingue la FHD de la FD es la pérdida del plasma como resultado de la permeabilidad vascular incrementada y la hemostasia anormal, que ocurre en un grupo selectivo de pacientes durante el curso de la infección por dengue. La evidencia actual sugiere que la intensidad de la respuesta inmunitaria hacia el virus del dengue, juega un rol clave en la cascada patofisiológica que conduce a la pérdida de plasma. Además la FHD y SCD han sido asociados con altos niveles de citoquinas proinflamatorias en el suero de pacientes. Adicionalmente, se ha sugerido que otros mediadores producidos por las

células fagocíticas y los anticuerpos juegan un rol en la patogénesis del dengue (CDC. Dengue: Aspectos clínicos y de salud pública. [En línea]. 2002. Disponible desde: URL: <http://www.cdc.gov/Ncidod/dvbid/dengue/slideset/spanish/set1/i/slide04.htm> Consulta: 12/02/08; Yamashiro y col, 2004; Noisakran y Perng, 2007; Álvarez y col, 2007).

El SCD está asociado con hipotensión o presión de pulso débil, así como también signos clínicos por pérdida de proteínas y plasma desde los vasos sanguíneos (*Richards y col, 1997; Montes, 2001; Balmaseda y col, 2006; Falconar, 2007*).

Los virus del dengue son serológicamente clasificados en cuatro serotipos antigénicamente distintos (DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4) y son mantenidos en un ciclo de transmisión humano-mosquito. Con el *Aedes aegypti* como el principal vector (*Álvarez y col, 2005*).

Recientemente se demostró la presencia de varias poblaciones virales (cuasiespecies), posiblemente debido a la circulación simultánea de genotipos diferentes de un serotipo en un mismo hospedero. La diversidad genética del virus del dengue puede ocasionar la aparición de cepas con mayor capacidad de replicación, de más fácil transmisión o más virulentas. Esta diversidad genética también pudiera asociarse con la aparición de cepas con determinantes antigénicos o tropismos alterados (*Guzmán y col, 2006*).

El tropismo celular *in Vitro* de los cuatro serotipos del virus del dengue es diverso, pueden replicarse en una gran variedad de cultivos celulares, primarios y continuos derivados de tejidos de mamíferos, aves y artrópodos, cuya sensibilidad a la infección viral es variable. Varios factores pueden estar implicados en esto: la presencia de receptores específicos en las diferentes células, el ambiente en el que ocurre el reconocimiento del receptor, así como la afinidad de la unión del virus a este en la superficie celular. La unión de

un virus a su receptor específico es un factor principal del tropismo celular y un determinante importante en la patogénesis (*Aguilar y col, 2005*).

En ciertas ocasiones en las que el virus del Dengue se muestra más virulento, podría estar asociado a los receptores Fc y I, II y III, de los cuales se especula, son los responsables de capturar el complejo inmune anticuerpo-virus dengue que inicia el aumento de replicación viral dependiente de anticuerpo (*Kuno y Chang, 2005*).

II.3.- Epidemiología del virus del Dengue

La infección por dengue es una de las enfermedades virales de humanos transmitidas por mosquitos más comunes a nivel mundial actualmente. Inicialmente las infecciones por dengue fueron registradas cuando ocurrieron como epidemias en los países tropicales y subtropicales. Pero con el tiempo, el incremento de la globalización y el movimiento de humanos, acoplado con el incremento del área geográfica donde habita el mosquito vector-transmisor *Aedes aegypti*, ha promovido que la infección por el virus del dengue se disperse por todas partes del mundo. El Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas (por sus siglas en inglés NIAID), ha clasificado al virus del dengue como un patógeno de amenaza biológica de prioridad, ubicado en la categoría A (*Noisakran y Perng, 2007*).

El virus del Dengue ha ocasionado brotes e importantes epidemias en la mayoría de las áreas tropicales y subtropicales donde *Aedes aegypti* y *Aedes albopictus* son abundantes. Estos mosquitos, específicamente la hembra de esta especie, son los principales vectores responsables de la transmisión de humano a humano y de la dispersión de la infección por este virus (*Yamashiro y col, 2004*).

La incidencia mundial de la enfermedad ocasionada por este virus ha aumentado extraordinariamente en todo el mundo en los últimos decenios. Encontrándose que unos 2,5 millones de personas (dos quintos de la población mundial) corren el riesgo de contraer la enfermedad (WHO World Health Organization. Dengue en las Américas [En línea]. 2005.

Disponible desde: URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/index.html>
Consulta: 20 de marzo de 2008).

Según la OMS, anualmente este virus es responsable de aproximadamente 50 millones de casos de dengue en todo el mundo. En el 2007 se reportaron 890.000 casos en las Américas, de los cuales 26.000 fueron de DH. En Venezuela se notificaron más de 80.000 casos entre ellos más de 6.000 de DH. A medida que la enfermedad se propaga a nuevas zonas, no solo aumenta el número de casos, sino que se están produciendo brotes explosivos (WHO World Health Organization. Dengue en las Américas [En línea]. 2005.

Disponible desde: URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/index.html>
Consulta: 20 de marzo de 2008).

La exposición al virus del Dengue generalmente ocurre en el período infantil a juvenil entre residentes de áreas endémicas para el Dengue, y la prevalencia de la IgG específica del Dengue incrementa con la edad y alcanza su pico antes de la adolescencia. En esta población la tasa de mortalidad está alrededor del 5 %, predominantemente en niños menores de 15 años (*Yamashiro y col, 2004; Noisakran y Perng, 2007*).

Epidemiológicamente las infecciones secundarias, que normalmente ocurren en áreas endémicas al dengue, se han correlacionado con enfermedades virales de dengue severas y por lo tanto son consideradas uno de los principales factores de riesgo para desarrollar la enfermedad. Tres décadas atrás esta visión condujo a avanzar en la teoría del aumento dependiente de anticuerpos. Y como se mencionó anteriormente otros de los importantes factores de riesgo de sufrir fiebre hemorrágica por dengue incluye el serotipo y la cepa del virus infectante, la edad del paciente y el perfil genético del paciente (*Noisakran y Perng, 2007*).

II.4.- Ciclo de Transmisión del virus del Dengue

El virus puede detectarse en la sangre a partir de 2 ó 3 días antes del comienzo de la fiebre hasta 4 ó 5 días después de su desaparición, a través de técnicas moleculares (Guzmán y col, 2006).

Los mosquitos suelen adquirir el virus mientras se alimentan de la sangre de una persona infectada. Una vez que se encuentra en el mosquito, se replica en el mesenterón o zona media del tubo digestivo, los ovarios, el tejido nervioso y el cuerpo grasoso; se difunde luego hacia la cavidad corporal y posteriormente infecta las glándulas salivales, sin producir alteraciones, a través de un proceso conocido como período de incubación extrínseca. Tras la incubación del virus durante 8 a 10 días un mosquito infectado es capaz de transmitir el virus para el resto de su vida a nuevas personas, durante la picadura y la alimentación. Los mosquitos hembras infectados, también son capaces de transmitir el virus a su descendencia por vía transovárica (a través de los huevos), pero todavía no se ha definido el papel de este mecanismo en la transmisión del virus al ser humano (*figura 4*). Una vez inoculado el virus en la sangre de los seres humanos por la saliva del mosquito, circula en la sangre, se localiza y se replica en diversos órganos diana. Luego el virus se libera de estos tejidos y circula por la sangre para infectar leucocitos y otros tejidos linfáticos. El virus se libera luego de estos tejidos y de nuevo circula por la sangre. Este proceso dura de 2 a 7 días, coincidiendo aproximadamente con el período febril y es conocido como el período de incubación intrínseca. Un segundo mosquito ingiere sangre que contiene el virus y se repite el ciclo (*figura 5*) (CDC. Dengue: Aspectos clínicos y de salud pública. [En línea]. 2002. Disponible desde: URL: <http://www.cdc.gov/Ncidod/dvbid/dengue/slideset/spanish/set1/i/slide04.htm> Consulta: 12 de marzo de 2008).

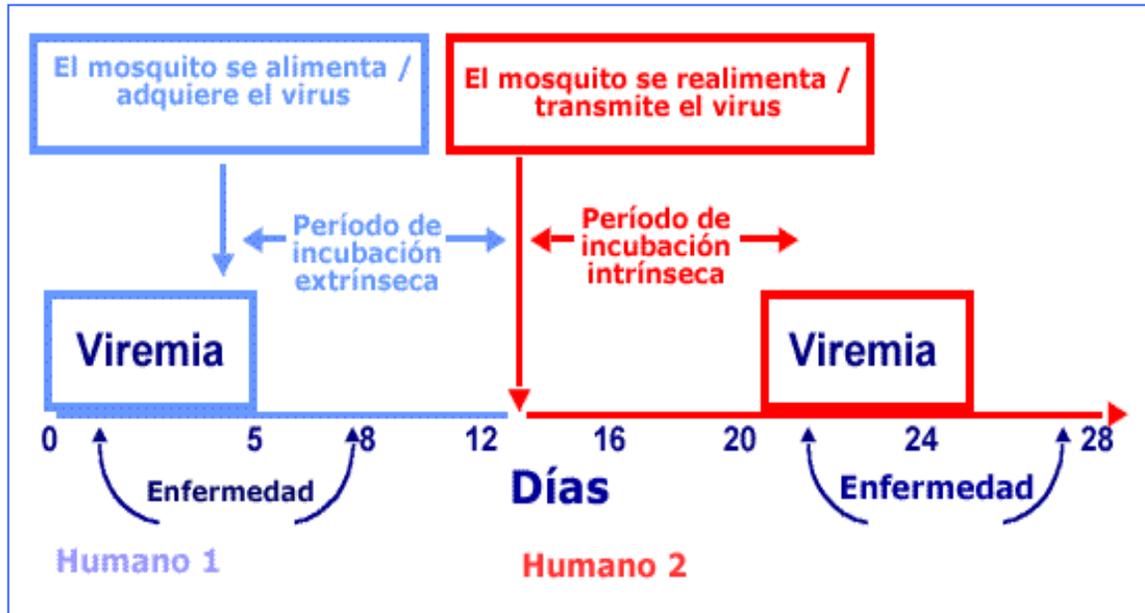


Figura. 1.- Ciclo de transmisión del virus del dengue por el mosquito *Aedes aegypti*. Comienza con una persona infectada con el dengue. Esta persona tendrá el virus circulando en la sangre (una viremia que dura aproximadamente 5 días). Durante el período virémico, este mosquito *Aedes aegypti* hembra pica a la persona e ingiere sangre que contiene el virus del dengue. Seguidamente el virus se replica dentro de un período de incubación extrínseca dentro del mosquito de 8 a 12 días de duración. A continuación el mosquito pica a una persona susceptible y le transmite el virus también a ésta, así como a cualquier otra persona susceptible que el mismo pique durante el resto de su vida. El virus se replica en la segunda persona y produce síntomas. Los síntomas comienzan a aparecer en un promedio de 4 a 7 días después de la picadura de mosquito (este es el período de incubación intrínseca dentro de los seres humanos). La viremia comienza algo antes de la aparición de los síntomas. Los síntomas ocasionados por la infección por dengue pueden durar de 3 a 10 días, con un promedio de 5 días después de la aparición de los síntomas.

Tomado de <http://www.cdc.gov/Ncidod/dvbid/dengue/slideset/spanish/set1/i/slide04.htm> Consulta: 12 de febrero de 2008.

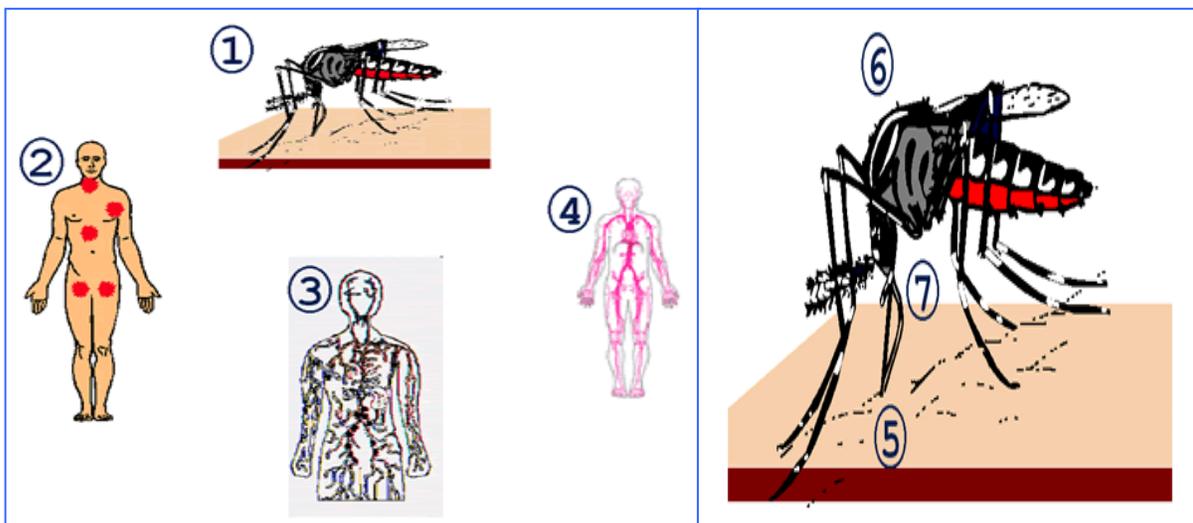


Figura.2.- Ciclo de transmisión del virus del dengue. 1- El virus es inoculado en los seres humanos con la saliva del mosquito. 2- Se localiza y replica en diversos órganos diana, por ejemplo nódulos linfáticos locales e hígado. 3- Se libera luego de estos tejidos y se difunde por la sangre para infectar los leucocitos y otros tejidos linfáticos. 4- Se libera y luego circula en la sangre. 5- Un segundo mosquito ingiere sangre que contiene el virus. 7- Se replica en la zona embrionaria del tubo digestivo del mosquito, los ovarios, el tejido nervioso y el cuerpo gordo, se difunde luego hacia la cavidad corporal y posteriormente infecta las glándulas salivales. 8- Se replica en las glándulas salivales y cuando el mosquito pica a otro ser humano el ciclo continúa.

Tomado de <http://www.cdc.gov/Ncidod/dvbid/dengue/slideset/spanish/set1/i/slide04.htm> Consulta: 12 de febrero de 2008.

II.5.- Fiebre Amarilla Hemorrágica

La fiebre amarilla es una enfermedad viral aguda, perteneciente al grupo de las fiebres hemorrágicas causadas por virus. En un primer momento se creyó que era una enfermedad exclusiva de la especie *homo sapiens*, pero las investigaciones demostraron que es una zoonosis que afecta también a monos de diferentes especies. Los monos infectados en África y América tropical son la fuente principal de infección, y los mosquitos la transmiten al humano. Este tipo de enfermedad, que sólo aparece de forma accidental en el hombre cuando éste invade áreas de riesgo sin la debida protección, se conoce como fiebre amarilla selvática. Si la persona infectada se desplaza a una zona poblada, puede ser picado por especies semi-domésticas de mosquitos como el *Aedes aegypti*, principales transmisores en las epidemias de fiebre amarilla urbana (Valero, 2003; Barnett, 2007).

Aproximadamente 200.000 casos de fiebre amarilla ocurren anualmente, de los cuales el 90 % ocurren en África (Barnett, 2007). Los anticuerpos aparecen en sangre en cuanto desaparece el virus (Barnett, 2007). Las diferencias en las cepas del virus, los factores inmunitarios y genéticos del hospedador incompletamente entendidos y las edades infantiles y adultas juegan un rol y posiblemente son los responsables de la susceptibilidad, severidad y letalidad incrementada de la infección con virus de fiebre amarilla (Barnett, 2007).

Los picos de viremia duran 2 a 3 días después de la infección y los pacientes con casos fatales tienen duración de viremia mas larga que la de los sobrevivientes (Barnett, 2007).

El periodo de incubación de la fiebre amarilla, por lo general dura de tres a seis días. En los casos graves el inicio es súbito, con síntomas típicos como cefalea, dolor de espalda y fiebre. La primera fase se caracteriza por náuseas, vómitos y la presencia de albúmina en la orina. La segunda fase está marcada por la ictericia, hemorragias en las membranas mucosas, hematemesis (vómito negro característico) y degeneración grasa del hígado,

riñones y corazón. La destrucción de las células hepáticas produce acumulación de pigmentos biliares en la piel, lo que da nombre a la enfermedad. La muerte suele ocurrir entre el cuarto y octavo día desde el inicio. En los casos de recuperación espontánea, la convalecencia es corta, aunque la ictericia puede persistir durante algún tiempo. La enfermedad nunca es recidiva, dado que la primoinfección genera inmunidad permanente (Valero, 2003).

El virus de la fiebre amarilla es un serotipo único del cual se han distinguido cinco genotipos (3 en África y 2 en Suramérica). Es muy inestable y por calentamiento o por desinfectantes comunes se puede inactivar. Es un virus viscerótrofo (tiende a situarse en hígado, riñón y corazón) y en algunos casos a los post-vacunales se le han atribuido propiedades neurotrópicas (Valero, 2003).

II.5.1.- Respuesta a la Vacuna de la Fiebre amarilla

La vacunación contra la fiebre amarilla produce altos niveles de protección con tasas de seroconversión por encima del 95 % tanto en niños como en adultos, y la inmunidad dura alrededor de 10 años. Noventa por ciento de los receptores vacunados desarrollan anticuerpos neutralizantes en 10 días después de la inmunización y 99 % desarrollan anticuerpos neutralizantes en 30 días. Aunque la inmunidad es posible que sea de por vida después de una única dosis, las regulaciones de salud internacional recomiendan revacunación a intervalos de 10 años para quienes permanecen en riesgo (Barnett, 2007).

El virus del dengue y de la fiebre amarilla, pertenecen a un grupo de virus que se conocen como Arbovirus.

II.6.- Familia *Flaviviridae*

El genoma de la familia *Flaviviridae* comprende una molécula de ARN sentido positivo cadena sencilla de alrededor de 10,5 Kb; el extremo 5' del genoma presenta un CAP metilado y el extremo 3' no es poliadenilado. Las proteínas estructurales son codificadas en la parte 5' del genoma y las no estructurales en la parte 3'. La expresión involucra la producción de una única gran poliproteína de más de 3000 aminoácidos que es cortada por una combinación de proteasas virales y hospedadoras (*Cann, 2001; Fields. Knipe y Howley, 2007*).

La unión y toma de los viriones por la célula hospedadora se cree que involucra endocitosis mediada por receptor vía los receptores celulares específicos para las proteínas de la envoltura. El bajo pH de la vía endocítica induce la fusión de la envoltura del virión con la membrana del endosoma, lo cual conlleva a la descapsidación de la nucleocápside. Seguido de la descapsidación, el genoma de ARN es liberado en el citoplasma. Luego de lo cual ocurre la replicación del ARN por la vía de la síntesis de un genoma de ARN intermediario cadena negativa, que se produce en complejos de replicación citoplasmáticos que se encuentran asociados con membranas perinucleares (*figura 7*) (*Fields. Knipe y Howley, 2007; Li y col, 2008*).

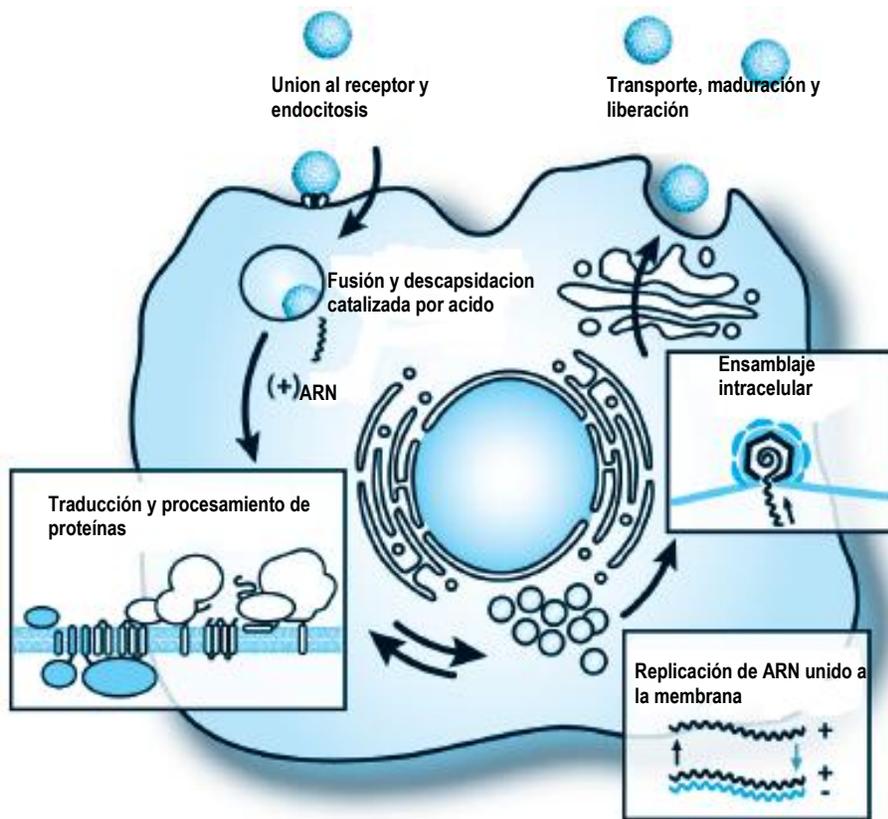


Figura. 3.- Pasos de la multiplicación viral de la Familia *Flaviviridae*

Tomado de Fields. Knipe y Howley, 2007

El genoma viral presenta tres funciones discretas dentro del ciclo de multiplicación viral: funciona como ARN mensajero (ARNm) para la traducción de todas las proteínas virales, como templado durante la replicación del ARN y como material genético empaquetado dentro de nuevas partículas de virus. Se piensa que los viriones progenie luego de ensamblarse en un compartimento de membrana intracelular, posiblemente del retículo endoplasmático (RE), transiten a través de la vía secretoria del hospedador y sean liberados en la superficie celular (*Fields. Knipe y Howley, 2007*).

Los viriones de los miembros de esta familia, presentan una envoltura, compuesta por una bicapa lipídica con 2 o más especies de glicoproteínas de envoltura que rodean una

nucleocápside, que consiste en un genoma de ARN que forma un complejo con copias múltiples de una pequeña proteína básica de la cápside (C) (*Fields. Knipe y Howley, 2007*).

La proteína de fusión es conocida como glicoproteína E, de la que se ha sugerido que tiene una estructura muy similar entre *flavivirus*, debido a que presentan un considerable grado de homología en la secuencia primaria de aminoácidos, incluido los residuos conservados de cisteína (Cys) (*Seligman y Bucher, 2003*).

La glicoproteína E desempeña un papel fundamental durante la penetración del virus en la célula (*Guzmán y col, 2006*). Por lo cual, las mutaciones en la proteína E de los *Flavivirus* han sido implicadas en alteraciones del tropismo viral y la virulencia (*McArthur y col, 2003*).

La accesibilidad de los anticuerpos neutralizantes a los epítomos sobre la glicoproteína E es de considerable importancia, puesto que esta proteína constituye el principio estimulador para estos anticuerpos y de la inmunidad protectora (*Seligman y Bucher, 2003*).

Los *Flavivirus* pueden utilizar múltiples receptores en diferentes tipos de células y en diferentes especies de hospedadores. La infección de las células dendríticas (CD) es particularmente importante debido a que estas células pueden ser blancos primarios al inicio de la infección. Algunas proteínas tentativamente identificadas como receptores para *flavivirus* incluyen las integrinas $\alpha\beta3$, GRP78 (BiP) y CD14 o una molécula relacionada. Además, se ha demostrado que los glicosaminoglicanos altamente sulfatados (por ejemplo sulfato de Heparan) juegan un papel importante en la adhesión inicial de varios *flavivirus* que apuntan a la célula. También partículas de virus opsonizadas con inmunoglobulinas muestran unión incrementada e infección de células que expresan receptores Fc de inmunoglobulinas. Los *flavivirus* son internalizados vía vesículas cubiertas con clatrina y transportados hacia un compartimiento endocítico prelisosomal donde el pH bajo induce fusión entre el virus y la membrana del endosoma para liberar la nucleocápside del virus.

Durante esta transición, los dímeros de proteína E se disocian en monómeros, y luego se reforman a homodímeros. La eficiencia de fusión es influenciada por la composición de lípidos de membranas blancos: el colesterol y el ácido oléico incrementa la fusión, mientras que la liofosfatidilcolina inhibe la fusión. Por lo tanto, la composición de lípidos puede influir en el umbral de pH de fusión (*Fields. Knipe y Howley, 2007*).

En relación a la expresión del genoma, la traducción de un único gran marco abierto de lectura produce una gran poliproteína que es co y post-traduccionalmente cortada en al menos 10 proteínas. Hacia el extremo N-terminal de esta poliproteína se encuentran las proteínas estructurales (C-PrM-E), seguido de las proteínas no-estructurales (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-2K-NS4B-NS5). La señal de la peptidasa del hospedador es responsable del corte entre C/PrM, PrM/E, E/NS1 y 2K-NS4B. Una serin-proteasa codificada por el virus, es responsable del corte entre las uniones NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, NS4A/2K y de NS4B/NS5. La enzima responsable del corte NS1-NS2A es desconocida (*Fields. Knipe y Howley, 2007*).

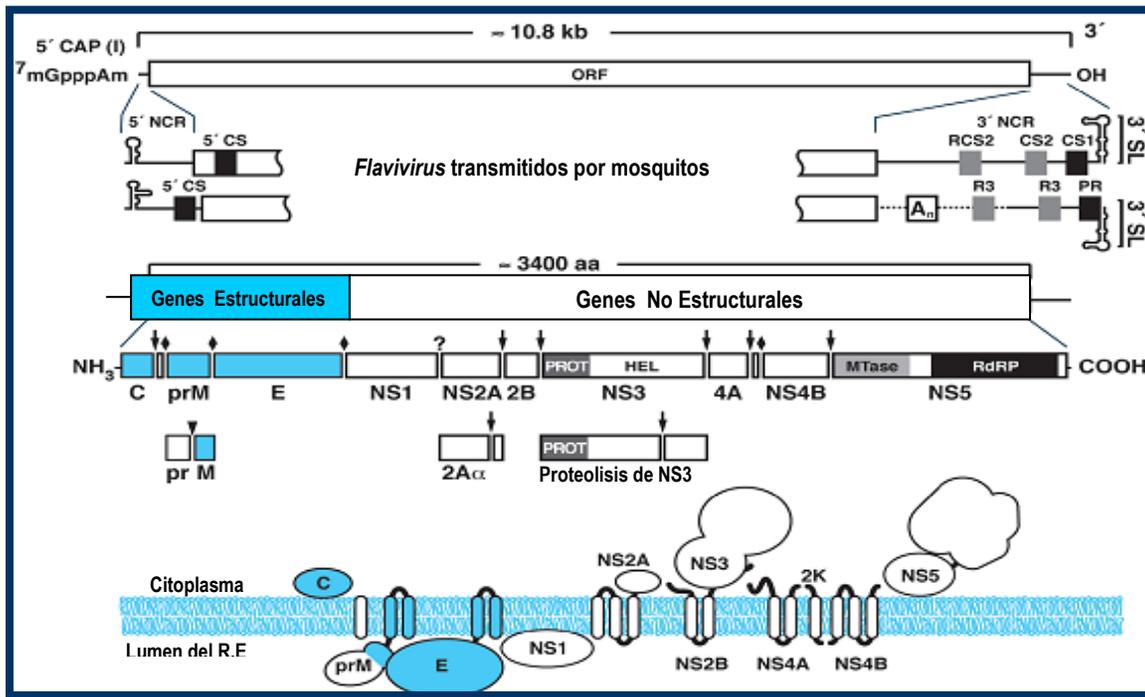


Figura 4.- Estructura y expresión del genoma de los flavivirus. A. Estructura del genoma y elementos del ARN. El genoma viral es descrito con la región codificante de proteínas no-estructurales y estructurales, la regiones del CAP 5' y la región no codificante (NCR) 5' y 3'. Los modelos de estructuras secundarias importantes funcionalmente y terciario dentro de 5' y 3' NCR y la región codificante son mostrados con predichas horquillas hairpin indicadas por letras. B: Procesamiento de poliproteínas y cortes de productos. Los recuadros debajo del genoma indican los precursores y las proteínas maduras generadas por la cascada del procesamiento proteolítico, las proteínas estructurales son mostradas en azul, mientras que las proteínas no estructurales (NS) son blancas. Los sitios de corte para la señalasa del hospedador, la serin proteasa viral, furina o proteasa relacionada o proteasas desconocidas son indicados con un signo de interrogación. C: Muestra la topología de los productos de corte de la poliproteína de los flavivirus con respecto a la membrana del Retículo Endoplasmático (RE). Las proteínas están aproximadamente a escala y arregladas a fin de su aparición en la poliproteína.

Tomado de Fields. Knipe y Howley, 2007

La región NCR 5' no es conservada entre diferentes *flavivirus*, aunque se han encontrado estructuras secundarias comunes para algunos *flavivirus*, en esta región (Fields. Knipe y Howley, 2007).

El género de los *Flavivirus* incluye más de 70 virus de ARN cadena sencilla, que comparten determinantes antigénicos comunes y es dividido en 8 serosubgrupos y 9 serotipos individuales (Scaramozzino y col, 2001; Fields. Knipe y Howley, 2007).

II.6.1.- Estructura de los flavivirus

En general, los *flavivirus* poseen una estructura uniforme, la envoltura del virión es ligeramente esférica, la nucleocápside es icosaédrica y contiene al virión. La estructura de la partícula viral infecciosa del dengue (la primera estructura de un *flavivirus* en ser determinada) revela una estructura diferente. La superficie viral es inusualmente lisa y la membrana esta completamente cubierta por la proteína E. Los investigadores han utilizado una técnica avanzada de toma de imágenes llamada crio-microscopía electrónica, que permite obtener retratos tridimensionales de la partícula de Dengue.

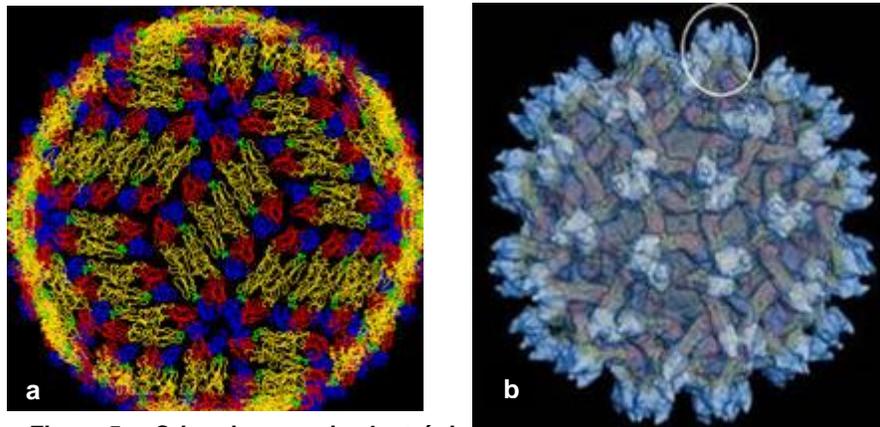


Figura.5. .- Crio-microscopia electrónica del virus del dengue: Partícula madura (a), Partícula inmadura (b).

Tomado de Rodríguez y Marzal, 2004

Estas imágenes demuestran que la partícula inmadura de los *flavivirus* sufre un cambio estructural sorprendente para poder convertirse en madura. Por ejemplo, la forma inmadura tiene un diámetro un 15 por ciento mayor, y posee 60 protuberancias de proteína que parten de su superficie. La forma madura presenta una superficie que consiste en 90 dímeros de envoltura (E) (figura 5) (Gromowski y Barrett, 2007), y tiene el aspecto de una esfera casi lisa, como una pelota de golf. Durante la metamorfosis, las protuberancias desaparecen (Rodríguez y Marzal, 2004).

La partícula viral de los *flavivirus* mide entre 40 y 60 nm de diámetro. El material genético se encuentra protegido por una nucleocápside circular de simetría icosaédrica; el diámetro del núcleo es de 25 a 30 nm (CENAVE. Dengue: Estructura viral. [En línea]. 2008. Disponible desde: URL: <http://www.cenave.gob.mx/dengue/default.asp?id=12> Consulta: 18 de noviembre 2007).

II.6.1.1.- Proteínas estructurales de los flavivirus

La proteína **C** es una proteína altamente básica. Tiene una masa molecular de 11 kDa (Fields. Knipe y Howley, 2007). Los residuos cargados están agrupados en el extremo N y C- terminal, separado por una región hidrofóbica interna que interviene en la asociación de membrana. La proteína C naciente, también contiene un anclaje C-terminal hidrofóbico que sirve como un péptido señal para la traslocación de PrM hacia el RE (Fields. Knipe y Howley, 2007).

La **PrM** (26 kDa) es el precursor glicosilado de la proteína estructural M (Fields. Knipe y Howley, 2007). Es traslocada hacia el RE por el dominio hidrofóbico del C-terminal. La región N-terminal de esta proteína contiene uno a tres sitios de Glicosilación N-ligados y seis residuos de cisteína conservados (Fields. Knipe y Howley, 2007; Sánchez y col, 2005).

La proteína PrM se pliega rápidamente y ayuda en el plegamiento de la proteína E. El dominio TM del C-terminal de PrM actúa como señales de retención del RE y podría ayudar en su heterodimerización. Una de las funciones principales de PrM es prevenir que E experimente rearrreglos que la conviertan hacia la forma fusogénica, lo cual es catalizado por ácidos durante el tránsito a través de la vía secretoria (Fields. Knipe y Howley, 2007; Sánchez y col, 2005).

La conversión de las partículas víricas en maduras ocurre en la vía secretora y coincide con el corte de PrM en los fragmentos Pr y M por la furin-proteasa residente de Golgi o una enzima relacionada. Seguido del corte, los heterodímeros PrM-E se disocian, el

fragmento Pr es liberado y E forma homodímeros (*Fields. Knipe y Howley, 2007; Sánchez y col, 2005*).

La proteína **E**, es una glicoproteína con una masa molecular entre 51 y 60 kDa, se encuentra glicosilada y es la más conservada. Están estrechamente asociadas a la envoltura lipídica. Es la que constituye la mayor parte de la envoltura, el componente principal de las proyecciones de la superficie del virión y contiene los determinantes antigénicos responsables de la neutralización del virus, induciendo respuesta inmunitaria en el huésped infectado (*Sánchez y col, 2005*). Debido al alto grado de similaridad y conservación en secuencia de todos los residuos de cisteína, se asume que la proteína E de todos los *flavivirus* comparten una estructura tridimensional. El ectodominio de la proteína E se pliega en tres dominios distintos, un dominio central (I), un dominio de dimerización y de fusión (II) y un dominio parecido a las IgG responsables de la interacción con el receptor celular desconocido (III) (*Daffis y col, 2005*).

Esta proteína se encarga de mediar la unión y fusión de membrana, en condiciones de pH bajo, durante la entrada del virus a la célula (*Fields. Knipe y Howley, 2007; Aguilar y col, 2005; Seligman y Bucher, 2003; Sánchez y col, 2005*).

Es sintetizada como una proteína de membrana tipo I que contiene 12 cisteínas conservadas que forman las uniones disulfuro. El plegamiento, estabilización a pH bajo y secreción de E depende de la co-expresión con PrM (*Fields. Knipe y Howley, 2007*).

La forma nativa de E plegada es una estructura elongada rica en láminas β , forma homodímeros cabeza y cola que yacen paralelas a la envoltura del virus (*Fields. Knipe y Howley, 2007; Sánchez y col, 2005*).

Debido a que las proteínas E de los *flavivirus* experimentan cambios conformacionales irreversibles a pH bajo, *Sánchez y col (2005)* estudiaron si alguno de los epítopes reconocidos por los anticuerpos monoclonales que estaban estudiando, resultaba afectado por el tratamiento de los virus a pH bajo. Mientras que los epítopes del dominio III

normalmente no son afectados por tratamiento a pH bajo, los epítopes del dominio I y II pueden ser alterados o perdidos debido a grandes rearrreglos que ocurren en estos dominios a pH bajo. Los ensayos de placas demostraron que los virus tratados a pH bajo fueron inactivados mientras que los tratados a pH neutro, permanecieron infecciosos, confirmando que el tratamiento a pH bajo dispara un cambio conformacional irreversible en la proteína E que inhibe la entrada e infección por el virus. Sin embargo, todos los anticuerpos monoclonales reconocieron virus tratados a pH bajo o neutro, indicando que los epítopes reconocidos por estos anticuerpos monoclonales no fueron perdidos durante los cambios conformacionales inducidos por pH aunque pequeñas diferencias fueron observadas en la reactividad de los anticuerpos (*Sánchez y col, 2005*).

El péptido de fusión putativo, el cual media la inserción en la membrana de la célula blanco, está localizado en la punta del dominio II, distantes de la región transmembrana. El dominio III parece estar involucrado en la unión al receptor y es el principal blanco de los anticuerpos neutralizantes (*Fields. Knipe y Howley, 2007*).

Hay un considerable grado de homología en la secuencia primaria de aminoácidos, incluyendo la conservación de todos los residuos de cisteína de todas las glicoproteínas E de los *flavivirus*, lo que sugiere que la estructura de la glicoproteína E de los *flavivirus* es muy similar.

Las proteínas PrM y E de los *flavivirus* forman un heterodímero en el cual la PrM probablemente cumple la función de proteger a la proteína E de la inactivación con ácidos durante el transporte en vesículas intracelulares (*Sánchez y col, 2005*).

II.6.1.2. -Proteínas no estructurales de los flavivirus

La primera proteína no estructural **NS1**, es una glicoproteína con una masa molecular de 46 kDa (*Fields. Knipe y Howley, 2007*).

Es transportada hacia el RE durante la síntesis y separada de la proteína E por señal de peptidasa del hospedador, mientras una enzima hospedadora desconocida, residente del RE, corta la unión NS1/NS2A (*Fields. Knipe y Howley, 2007*).

Esta proteína es mayormente retenida dentro de las células infectadas, pero pueden localizarse en la superficie celular y es lentamente secretada de las células de mamíferos. Contiene 2 o 3 sitios de glicosilación ligados al N-terminal y 12 cisteínas conservadas que forman uniones disulfuro. Aproximadamente 30 minutos después que la proteína NS1 es sintetizada, forma homodímeros altamente estables y adquiere una afinidad por la membrana. A su vez también tiene un importante papel, aún no claro en la replicación del ARN. Su localización se encuentra hacia sitios de replicación de ARN y la mutación de sitios de glicosilación ligados al N-terminal de esta proteína, puede conducir a defectos dramáticos en la replicación del ARN y en la producción del virus. La función de la forma extracelular de esta proteína no es aún clara (*Fields. Knipe y Howley, 2007*). Participa en la maduración viral y pudiera servir para el diagnóstico temprano (*Halstead, 1982; Guzmán y col, 2006*).

Durante la infección, fuertes respuestas humorales son producidas contra esta proteína, y en el caso en el que son expresadas en la superficie celular los anticuerpos contra la misma pueden dirigir la lisis mediada por complemento de las células infectadas por virus (*Fields. Knipe y Howley, 2007*).

La proteína NS1 del virus del dengue tiene tanto una forma secretada como una asociada a la células. Los niveles de NS1 secretados han estado asociados con niveles de viremia más altos en infecciones de virus dengue-2 secundarias. Los anticuerpos contra la proteína NS1 han estado implicados en los roles protectores, así como también los patogénicos, en la infección de virus dengue.

Un rol directo en la patogénesis de la pérdida vascular ha sido propuesto también; los sueros de los individuos con infección por virus dengue aguda son capaces de unirse a las células del endotelio de la vena umbilical (HUVECs), y este proceso puede ser bloqueado por la adición de NS1 recombinante (*Green y Rothman, 2006*).

La proteína **NS2A** es una proteína hidrofóbica relativamente pequeña de aproximadamente 22 kDa. Es un candidato atractivo para coordinar el cambio entre el empaquetamiento y la replicación del ARN.

La proteína **NS2B** es también una proteína pequeña, asociada a la membrana de aproximadamente 14 kDa. Forma un complejo estable con la NS3 y actúa como un cofactor para la serin-proteasa NS2B-NS3. La actividad de cofactor consiste en un péptido central que intercala dentro del pliegue del dominio de la serin-proteasa (*Fields. Knipe y Howley, 2007*).

La proteína **NS3** es la segunda proteína en tamaño, con una masa molecular entre 68 y 70 kDa, asociada a la membrana. Es multifuncional debido a que contiene varias actividades requeridas para el procesamiento de la poliproteína y de la replicación del ARN. Es altamente conservada en los flavivirus. La comparación de sus secuencias nucleotídicas y los análisis bioquímicos sugieren que es trifuncional, conteniendo actividad de proteasa (contra la poliproteína), de helicasa y de ARN trifosfatasa trifosfato (formación de la estructura 5' CAP). Su extremo N terminal contiene el dominio catalítico del complejo serin-proteasa **NS2B-NS3**, parecido a la serin-proteasa de las subfamilias de las tripsinas, la cual lleva a cabo la ruptura citosólica de la unión NS2A/NS2B, sugiriendo una topología transmembrana de NS2A (*Fields. Knipe y Howley, 2007*).

Además de cortar las uniones NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A y NS4B/NS5, la proteasa genera el C-terminal de la proteína de la cápside madura y de la NS4A y puede cortar en sitios internos dentro de la NS2A y NS3. La proteasa corta preferiblemente después de los residuos básicos adyacentes a la región C-terminal de la NS3, en la que presenta

significativa homología con la superfamilia de las helicasas. La actividad de la nucleósido trifosfatasa (NTPasa) estimulada por ARN ha sido demostrada por proteínas de NS3 de *flavivirus*. La estructura de las helicasas consiste en tres subdominios, dos dominios conservados entre los miembros de la familia de las helicasas e involucrados en hidrólisis trifosfatos y un único dominio C-terminal que puede estar involucrado en el reconocimiento específico de ARN viral y en actividades de reconocimiento de proteínas.

La **NS4A** y **NS4B** son pequeñas proteínas hidrofóbicas de 16 y 27 kDa respectivamente. El rol **NS4A** en la replicación es soportado por la co-localización de esta proteína con complejos de replicación. Algunos estudios de sobre-expresión muestran que el corte regulado de NS4A/2K/NS4B es necesario para la inducción de rearrreglos de membrana por NS4A. La **NS4B** co-localiza con NS3 y con el ARN de doble cadena viral (ARNdc) en estructuras de membrana derivadas del RE que se presume que sean sitios de replicación de ARN (*Fields. Knipe y Howley, 2007*).

Se ha encontrado que la proteína no estructural **NS4B** de este virus, inhibe fuertemente la señalización del INF tipo I, mientras que NS4A y NS2A bloquea parcialmente la señalización de este efector inmunológico (*Aguilar y col, 2007; Fields. Knipe y Howley, 2007*).

La última y más grande proteína codificada es la **NS5**, con una masa molecular de 103 a 104 kDa, es multifuncional y una de las más conservadas entre los *flavivirus*. Funciona como Metiltransferasa (Mtasa) y como RdRP (ARN polimerasa dependiente de ARN). La presencia de una región altamente conservada (YF NS5 666-668) en esta enzima, es característico de este tipo de enzimas presentes en los virus ARN con cadena positiva y es lo que sirvió de base para determinar que la proteína NS5 tiene actividad de ARN polimerasa. Debido a que la NS5 se ha demostrado que funciona como un RdRP, debe localizarse en sitios de síntesis de ARN viral, aunque esto aún no ha sido demostrado (*Fields. Knipe y Howley, 2007*).

Originalmente, la región N-terminal de NS5 se encontró que exhibía homología con MTasa dependiente de S-adenosil-metionina (SAM), sugiriendo que esta proteína estaba involucrada en la modificación del CAP 5'. Se demostró subsecuentemente que el dominio N-terminal purificado de NS5 del virus DEN-2 podría transferir grupos metilos SAM hacia substratos de ARN que presenten la proteína CAP en el extremo 5'.

La NS5 forma un complejo con NS3 y puede estimular tanto la actividad de NTPasa como la de RTPasa de NS3. La NS5 y la forma fosforilada en particular, se ha demostrado que se localiza hacia el núcleo. Recientemente se demostró que la región interdominio interviene en la interacción con la NS3 que contiene señales de localización nuclear reconocidas por importina β 1 e importina α/β . La NS5 del virus del DEN-2 induce transcripción y secreción de IL-8 que puede incrementar la dispersión viral o enfermedad por el reclutamiento inflamatorio de células hacia el sitio de infección. La replicasa de los *flavivirus* se asocia con la membrana a través de interacciones que involucran las proteínas hidrofóbicas NS (no estructurales) pequeñas, ARN viral, y presumiblemente algunos factores del hospedador.

La replicación comienza con la síntesis de un genoma de ARN sentido negativo, que sirve como templado para la síntesis adicional de ARN cadena positiva. Las tres especies principales de ARN de *flavivirus* marcados han sido descubiertos, incluyendo el genoma de ARN, una forma replicativa de doble cadena (FR) y una población heterogénea de un ARN intermediario replicativo (IR) que posiblemente contiene regiones dúplex y ARN cadena positiva recientemente sintetizadas exhibidas por la cadena naciente que experimenta elongación. El ARN viral se acumula en asociación con las vesículas empaquetadas en la región perinuclear de células de mamíferos. La actividad de la replicasa es concentrada en las fracciones densas de membrana, que están enriquecidas de la mayoría de las proteínas no estructurales virales. La mayoría de las NS5 pueden estar físicamente separadas de las fracciones de membrana o ser removidas por proteólisis sin afectar la actividad de la

replicasa. Esto sugiere que solo una fracción de NS5 (y de NS3) reside en los complejos de replicación (*Fields. Knipe y Howley, 2007*).

La replicación es lenta y comienza a las 15 horas después de la infección (*figura 6*). No afecta significativamente la función metabólica de las células hospedadoras, como lo ejemplifican los niveles normales de síntesis de proteínas de las células hospedadoras infectadas (*Noisakran y Perng, 2007*).

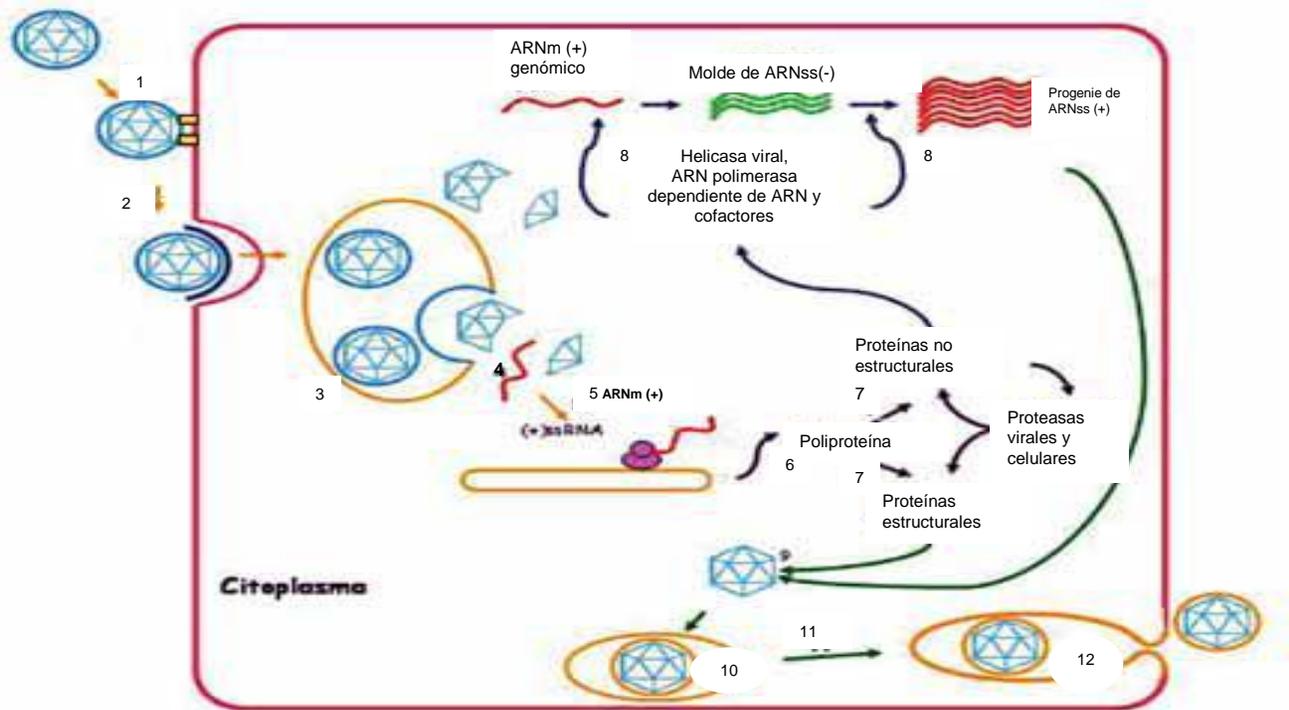


Figura 6.- Replicación del Genoma de los flavivirus. La replicación comienza con la síntesis de un genoma de ARN sentido negativo, que sirve como templado para la síntesis adicional de ARN cadena positiva. El ARN viral se acumula en asociación con las vesículas empaquetadas en la región perinuclear de células de mamíferos. La actividad de la replicasa es concentrada en las fracciones densas de membrana, que están enriquecidas de la mayoría de las proteínas no estructurales virales. La replicación es lenta y comienza a las 15 horas después de la infección.

Tomado de del Ángel, 2006

II.7.- Patogénesis de la FHD/SCD

Las primeras defensas del hospedador contra la infección por virus son barreras fisicoquímicas hacia la infección (*Fields. Knipe y Howley, 2007*). Es crucial para que el hospedador inicie contra el virus una inmunidad mediada por células y humoral efectiva (*Lin y col, 2006*). Estos mecanismos de defensa son llevados a cabo por el sistema inmunitario.

El sistema inmunitario puede ser dividido en dos componentes: el sistema inmunitario innato y el sistema inmunitario adaptativo. Esta división esta basada en las propiedades de los tipos de células inmunitarias y moléculas involucradas en la respuesta hacia la infección y en el tiempo de la respuesta (*Fields. Knipe y Howley, 2007*).

Es importante advertir que las inmunidades innatas y adaptativas no operan de manera independiente: funcionan como un sistema muy relacionado y colaborador que genera una respuesta combinada más eficaz que la que podría activar por si misma cada rama.

II.7.1.- Respuesta Inmunitaria Innata

El sistema inmunitario innato consiste en varios componentes que varían ampliamente, e incluye desde barreras de la piel hasta mecanismos efectores celulares y moléculas codificadas por genomas, que actúan en sincronía para proveer al hospedador una barrera inicial contra organismos extraños (*Noisakran y Perng, 2007*). Los constituyentes de la respuesta inmunitaria innata incluyen proteínas del sistema del complemento entre otros factores involucrados en el mantenimiento de la homeóstasis. Estas moléculas están presentes constitutivamente en la sangre y en los fluidos de los tejidos, y se pueden unir directamente a ciertos virus, mientras inhibe la infección. Los tipos de células que predominan en la respuesta inmunitaria innata y que responden ante la infección por virus son los leucocitos, en particular los neutrófilos, los monocitos de la sangre, los macrófagos de tejidos, las células dendríticas y las células asesinas naturales (NK) (*Fields. Knipe y*

Howley, 2007). La característica clave de la inmunidad innata es que no es antígeno-específica y que no puede responder inmediatamente, sino dentro de pocas horas después del encuentro con un nuevo agente extraño (*Fields. Knipe y Howley, 2007; Noisakran y Perng, 2007*). La respuesta de la defensa inicial por el cuerpo es eliminar o contener temporalmente el agente extraño y mientras prevenir o reducir la infección (*Noisakran y Perng, 2007*).

La respuesta inmunitaria innata hacia una infección por virus, es disparada por dos vías: primero, a través del reconocimiento de constituyentes virales por una serie limitada de receptores de reconocimiento de patrón celular para moléculas extrañas exhibidas sobre las células inmunitarias innatas; y segundo a través de la activación de moléculas de señalización intracelular seguido de la entrada del virus a la célula y de la iniciación de la replicación del virus. La exposición repetida al mismo virus desencadena una respuesta idéntica del sistema inmunitario innato (*Fields.Knipe y Howley, 2007*).

Cierto número de mecanismos efectores específicos de la inmunidad, junto con mecanismos de defensa inespecíficos entran en juego para la eliminación del virus infectante. Al mismo tiempo el virus actúa para contrarrestar uno o más de estos mecanismos con la finalidad de prolongar su supervivencia. El resultado de la infección depende de la eficacia con la que los mecanismos de defensa del huésped resistan las tácticas ofensivas del virus (*Goldsby y col, 2004*).

La reacción innata contra las infecciones virales consiste sobre todo en la inducción de interferones del tipo I (IFN- α e IFN- β) y la activación de las células NK, así como también consiste en la activación de macrófagos, linfocitos y fibroblastos, y en la síntesis de estas citosinas por parte estas células. El ARN de doble cadena (ARN_{dc}) que se produce durante el ciclo de replicación viral, puede inducir la expresión de IFN- α e IFN- β por la célula infectada, que a su vez inducen resistencia a la replicación del virus al fijarse al receptor de IFN- α/β . Una vez fijados, el IFN- α e IFN- β activan la vía JAK-STAT, que a su vez induce la transcripción

de varios genes. Uno de ellos codifica una enzima, una ribonucleasa (ARN-asa L) que degrada el ARN viral. Otros genes activados por la fijación de IFN- α e IFN- β a su receptor contribuyen a la inhibición de la replicación viral. Por ejemplo la fijación de IFN- α e IFN- β induce una quinasa de proteínas específica denominada quinasa de proteína dependiente de ARN_{dc} (PKR), que activa la síntesis de proteínas y por tanto bloquea la replicación viral dentro de las células infectadas (*Goldsby y col, 2004*).

La infección del virus del dengue es iniciada por inyección directa del virus, al torrente sanguíneo desde el mosquito vector, por lo que inicialmente en este estado el virus predominantemente encuentra el sistema inmunitario innato del hospedador (*figura 7*) (*Noisakran y Perng, 2007*).

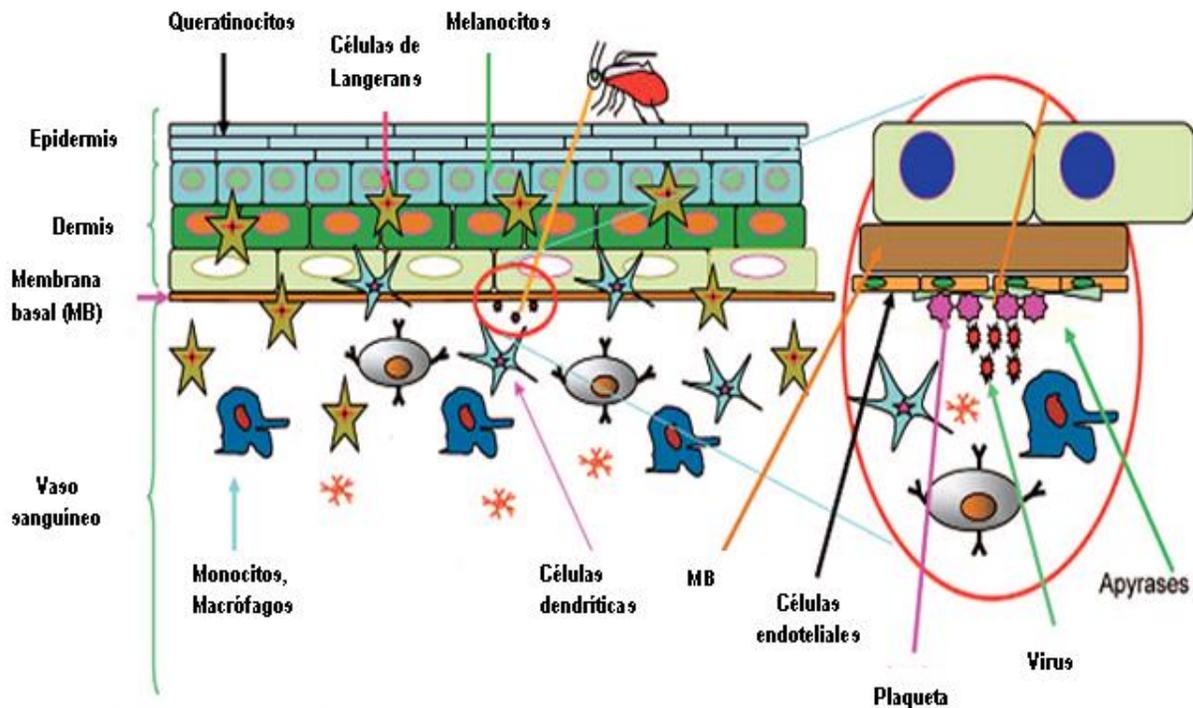


Figura. 7.- Encuentro con el Sistema Inmunitario Innato luego de la inoculación del virus del dengue en los vasos capilares. Hay varios componentes relacionados al sistema inmunitario circulando por los vasos capilares, los cuales están rodeados por múltiples capas de células. El círculo alargado indica el sitio de búsqueda del mosquito. Pevio al proceso de alimentación la saliva del mosquito que contiene factores tales como apirasis y el virus son liberados en el torrente sanguíneo.

Tomado de Noisakran y Perng, 2007

Las células NK, presentes en poblaciones de células mononucleares de sangre periférica de individuos infectados con virus dengue, lisan mayor número de células infectadas que células no infectadas. En infecciones secundarias, la presencia de anticuerpos anti-Dengue aumentan la lisis celular por células NK a través del mecanismo conocido como Citotoxicidad Celular Dependiente de Anticuerpos (CCDA) (*Rodríguez y Marzal, 2004*).

Algunos estudios han reportado que el virus del dengue usa al menos dos rutas de entrada en el mismo tipo de célula, dependiendo del entorno. Es decir muestra gran versatilidad de explotar múltiples rutas para ganar acceso al mismo blanco celular produciendo resultados diferentes (*Boonnak y col, 2008*).

La ruta de entrada en las células dendríticas maduras influye en la intensidad de la infección celular, rendimiento viral, transmisibilidad y secreción de citosinas (*Boonnak y col, 2008*).

A su vez en los pacientes con DH se activa, el sistema del complemento. El cual es una de las barreras fisiológicas de defensa que comprende el sistema inmunitario innato. En los casos graves se pueden detectar concentraciones elevadas de las proteínas C3 y C1q. Se plantea que los complejos virus-anticuerpos circulantes podrían ser los que activen la reacción en cascada del complemento (*Guzmán y col, 2006; Raja y col, 2007*).

II.7.2.- Respuesta Inmunitaria Adaptativa

La respuesta del sistema inmunitario adaptativo en un primer encuentro con un virus toma días para evolucionar. La respuesta de las células de este sistema (es decir los linfocitos T y B) es disparada por constituyentes virales, a través del comprometimiento de receptores de reconocimiento de superficie celular altamente específicos exhibidos por una fracción minúscula del repertorio total de células inmunitarias adaptativas para algún virus dado. Estos receptores sólo reconocen los constituyentes (antígenos) de ese virus en particular. Lo más interesante de esto es que esta arma del sistema inmunitario se adapta a la exposición repetida de una proteína de un virus en particular; esto resulta en una respuesta más rápida o de mayor magnitud por las células inmunitarias adaptativas específicas hacia la infección ó exposición repetida (un fenómeno llamado memoria inmunológica) (*Fields. Knipe y Howley, 2007*).

II.7.3.- Respuesta Inmunitaria Humoral

Los anticuerpos como componentes de la inmunidad humoral, funcionan como armas de importancia inmunológica en la prevención y el control de muchas infecciones virales, actuando contra partículas de virus libres así como también contra células infectadas (*Pupo y col, 2004; Álvarez y col, 2005; Fields. Knipe y Howley, 2007*).

Tienen la eficacia particular de proteger contra la infección si se localizan en el sitio de entrada del virus en el cuerpo. La mayoría de los virus expresan moléculas en su superficie que les permiten iniciar la infección al fijarse a moléculas receptoras específicas sobre la membrana de la célula hospedadora (*Goldsby col, 2004; Pupo y col, 2004; Álvarez y col, 2005*).

La actividad antiviral más estudiada de los anticuerpos *in vitro* y unas de las más importantes *in vivo*, en términos de protección, es la neutralización de partículas de virus

libre. La neutralización ha sido definida como la pérdida de infectividad que sigue cuando moléculas de anticuerpo se unen a una partícula de virus (*Fields. Knipe y Howley, 2007*).

En ocasiones la neutralización viral por anticuerpo abarca mecanismos que operan después de la fijación viral a la célula hospedadora. Bloqueando la penetración del virus y su diseminación en una infección aguda, al fijarse a epítomos que son indispensables para mediar la fusión de la cubierta viral con la membrana plasmática.

Los mecanismos de neutralización han sido muy debatidos durante años. Como se mencionó anteriormente, los modelos más simples están basados en la obstrucción estérica de la adhesión o entrada del virus por la molécula de anticuerpo. Hay evidencias que los anticuerpos pueden neutralizar los virus sin unirse directamente a los sitios funcionales sobre la superficie del virión.

Los anticuerpos que se unen a moléculas expresadas sobre células infectadas, pero no a viriones, por ejemplo la proteína NS1 del virus del dengue, pueden ser efectivos contra células infectadas, aunque sean no neutralizantes.

Las inmunoglobulinas IgA e IgM poliméricas han demostrado tener la capacidad de neutralizar intracelularmente los virus. Estos anticuerpos son activamente transportados hacia el epitelio de las mucosas después de unirse a receptores de inmunoglobulinas y podría, durante el transporte, contactar y neutralizar, virus por transitocis (*Fields. Knipe y Howley, 2007*).

Si el anticuerpo inducido es de un isotipo activador del complemento, se induce la lisis de los viriones. El anticuerpo y el complemento pueden aglutinar también las partículas virales y funcionar como agentes opsonizantes que facilitan la fagocitosis de estas partículas mediada por los receptores Fc ó C3b (*Goldsby col, 2004; Pupo y col, 2004; Álvarez y col, 2005*).

Una infección viral puede activar también respuestas inmunitarias anormales que no solo interrumpen el balance inmunitario sino que alargan los efectos patogénicos virales (*Lin*

y col, 2006). Como por ejemplo el efecto conocido como amplificación dependiente de anticuerpos (ADA), el cual es el resultado de que algunos anticuerpos específicos contra un virus incrementen o amplifiquen la replicación viral (*Pupo y col, 2004; Álvarez y col, 2005*).

En el curso de la infección primaria el virus del dengue penetra en los monocitos y macrófagos mediante su unión a receptores específicos en la superficie de estas células y se producen anticuerpos neutralizantes capaces de proteger por largo período de tiempo contra la infección con ese mismo serotipo (haciéndose más tipo específicos con el tiempo y produciendo inmunidad de por vida), mientras que la protección contra otros serotipos solo dura alrededor de 2 a 3 meses en el caso de una infección secundaria por un serotipo heterólogo. De hecho podría incrementarse la severidad de una infección secundaria con un serotipo diferente a través del fenómeno ADA antes mencionado, debido a que se forman complejos virus-anticuerpos que penetran en las células del sistema fagocítico mononuclear (monocitos y macrófagos), gracias a la unión del fragmento constante (Fc) de la inmunoglobulina (que forma parte del inmunocomplejo) a los receptores Fc celulares del tipo γ . Como consecuencia se infecta un mayor número de células y se favorece la diseminación viral. Este es el principal factor de riesgo de sufrir FHD (*Álvarez y col, 2007; Guzmán y col, 2006; Raja y col, 2007; Rodríguez y Marzal, 2004*). Frente a esta agresión, el individuo responde inicialmente con una respuesta inmunitaria inespecífica hacia el virus (*Rodríguez y Marzal, 2004*).

Algunos estudios confirman que el fenómeno ADA ocurre como consecuencia de la unión de anticuerpos con reactividad cruzada, no neutralizantes, a nuevos serotipos del virus; en estas condiciones los complejos virus-anticuerpos son tomados más rápidamente que las partículas virales que se unen por sí solas a los receptores Fc γ que expresan algunas células del sistema inmunitario, y consecuentemente se observa una viremia más alta, conllevando a un aumento en la severidad de la infección secundaria (*Gil y col, 2004; Álvarez y col, 2005; Guzmán y col, 2006; Sierra y col, 2006; Álvarez y col, 2007; Raja y col,*

2007; Guzmán y col, 2007; Boonnak y col, 2008). La replicación del virus induce a estas células infectadas a liberar mediadores vasoactivos que producen permeabilidad vascular, daño reversible del tejido y manifestaciones hemorrágicas tal como la pérdida de plasma típicas del DH (*Watanaveeradej y col, 2003; Pupo y col, 2004*).

Como se mencionó en la sección de respuesta inmunitaria innata, el virus del dengue también infecta las células dendríticas. El mismo para su entrada a estas células usa preferencialmente moléculas DC-SIGN también conocidas como receptores inmunitarios innatos de patrones de reconocimiento de patógenos parecidos a lectinas, las cuales facilitan la entrada del virus (*Boonnak y col, 2008*).

Halstead, 1979 por ejemplo, evaluaba el fenómeno ADA en células dendríticas por uso de los cuatro serotipos del virus del dengue y por empleo de suero inmune, como fuente de anticuerpos, de la misma manera, *Boonnak y col (2008)* estudió, en una investigación piloto, los efectos de sueros inmune anti-Den 1 sobre la infección con el virus Den 2, y encontró que la secuencia de infección Den 1 seguido por Den 2 fue un factor de riesgo reconocido para la predisposición de FHD.

El estudio realizado por *Watanaveeradej y col, 2003*, en infantes menores de 12 meses de edad infectados con el virus del dengue, reportó que esta población de estudio estuvo en riesgo de desarrollar FHD si los anticuerpos maternos contra el virus del dengue se hubieran encontrado presentes en niveles subneutralizantes.

Esta evidencia indica que el incremento viral ocurre cuando los anticuerpos subneutralizantes contra el virus del dengue están presentes, o desde una previa infección o desde anticuerpos maternos transferidos por la placenta (*Watanaveeradej y col, 2003*).

El fenómeno ADA ha sido atribuido al isotipo IgG aunque el isotipo IgM en presencia de complemento ha estado involucrado también de forma teórica. Las subclases de anticuerpos IgG, no se han usado como parámetro para explicar la amplificación de

diferentes cepas, sin embargo existen evidencias de que los AcMs IgG1, IgG2a e IgG2b específicos contra el virus del dengue pueden amplificar la infección (*Pupo y col, 2004*).

Por lo general, en una infección primaria los anticuerpos de la clase IgM contra el virus del dengue se pueden detectar en más de 95% de los casos a partir del quinto día de la enfermedad. Mientras que en algunos casos de infección secundaria esta clase de anticuerpos no son detectables (*Vázquez y col, 2004; Guzmán y col, 2006*).

Los anticuerpos de la clase IgG en una infección primaria se comienzan a detectar entre el séptimo y el décimo día de fiebre, mientras que en la infección secundaria se observa un incremento muy temprano de los anticuerpos IgG, con títulos muy elevados a partir del segundo día de fiebre (*figura 8*) (*Vázquez y col, 2004; Guzmán y col, 2006*). Cuando una infección viral se encuentra en fase aguda los niveles de IgG3 incrementan más rápidamente que los niveles de anticuerpos IgG1, siendo esta última almacenada por las células memoria del plasma en la médula ósea durante la fase convaleciente. Particularmente en neonatos, la subclase de anticuerpos hacia el virus del dengue, derivados maternalmente fue la subclase IgG1; aunque las 4 subclases de anticuerpos del tipo IgG (1, 2, 3 y 4) se encontró que se transferían a través de la placenta, fue la subclase 2 al igual que la subclase 1, las que se transferían más eficientemente; sin embargo sólo la IgG3 se demostró que fuera más alta en el suero materno que en el suero del cordón umbilical. Debido a que las IgG3 tienen tasas sintéticas y catabólicas más altas que las otras subclases, encontramos que las IgG3 podrían ser detectadas en pequeñas cantidades en el suero de cordón umbilical (*Watanaveeradej y col, 2003*).

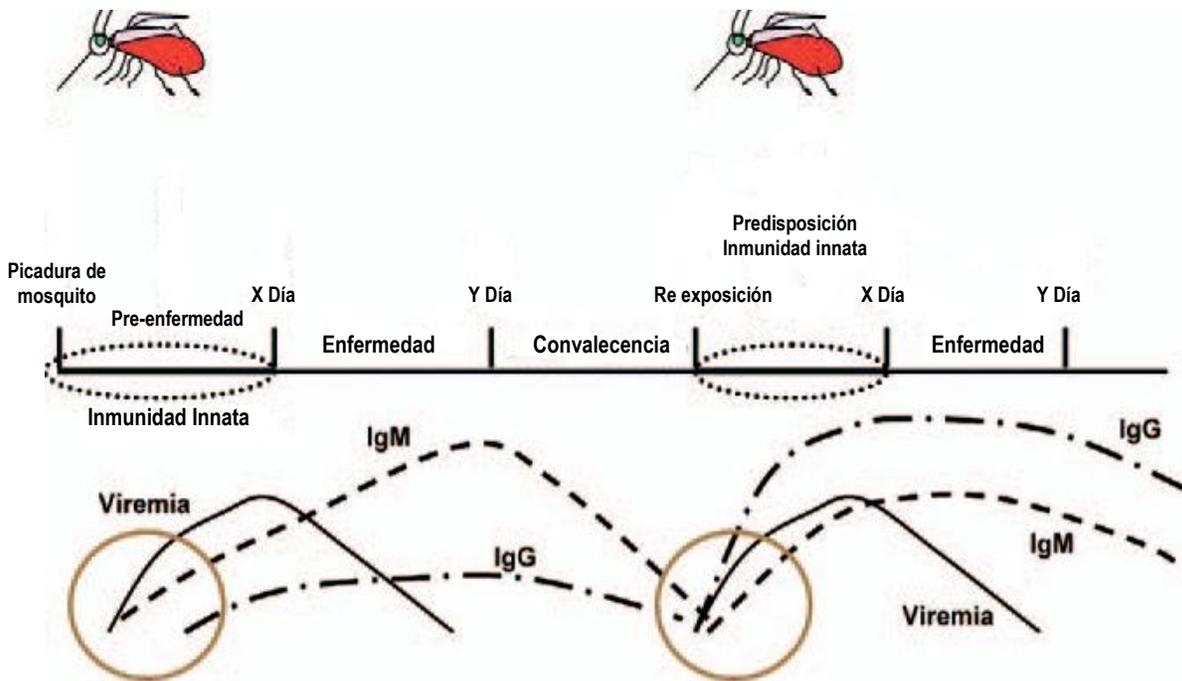


Figura. 8.- Unión de pre-enfermedades. Los factores inmunitarios innatos entre la picadura del mosquito y la aparición de los síntomas clínicos son misteriosos en la enfermedad del dengue, en la infección primaria o secundaria. La viremia, la IgM y la IgG son todos rápidamente detectables durante los síntomas clínicos aparentes. Los círculos punteados indican los parámetros que son desconocidos entre la infección (picada de mosquito) y la aparición de la enfermedad (día x , 2 a 5 días). Los círculos sólidos indican la convergencia de conocimientos en la infección por dengue, primaria o secundaria. El día y indica el período de viremia que dura de 5 a 7 días. La convalecencia es el período en el cual la fiebre y la viremia han disminuido.

Tomado de Noisakran y Perng, 2007

II.7.4.- Efecto de los anticuerpos contra las proteínas E y NS1 del virus del dengue, sobre las plaquetas y células endoteliales

Es posible que el DH se acompañe de reacciones autoinmunitarias (*Guzmán y col, 2006; Raja y col, 2007*). La autoinmunidad está caracterizada por la generación de autoanticuerpos (Auto-Acs) y la activación de linfocitos autoreactivos. Los auto-Acs ejercen efectos patogénicos en el hospedador que resultan en el mal funcionamiento de las plaquetas y de las células endoteliales (*Lin y col, 2006*).

Los anticuerpos contra las proteínas virales E y NS1 del dengue, se considera que tienen la capacidad de inducir reactividad cruzada con algunos factores de la coagulación y con las plaquetas (*Guzmán y col, 2006; Raja y col, 2007*). En algunos estudios se ha reportado que los anticuerpos anti-E incrementan la unión del virus del dengue a las plaquetas humanas por una vía distinta a los receptores Fc (*Lin y col, 2006*). Los anticuerpos generados contra la proteína viral NS1, específicamente contra los motivos tipo ELK/KLE de esta proteína, se ha encontrado que durante la infección con este virus funcionan como auto-Acs, que forman complejos inmunitarios con las proteínas de la coagulación circulantes, reaccionan con la matriz extracelular y con las proteínas integrinas/adhesinas y se unen a las plaquetas y a las células endoteliales, causando efectos patológicos sobre estas últimas (*Lin y col, 2006; Falconar, 2007*). Se ha demostrado que el suero de pacientes con FHD/SCD muestra una actividad de unión a las plaquetas más alta que el de los pacientes con FD, y los anticuerpos disminuyen con el tiempo (*Lin y col, 2006*). La reacción de estos auto-Acs se confirmó recientemente por el descubrimiento de altas concentraciones de IgM e IgG sobre la superficie de las plaquetas en pacientes con FHD/SCD, y por la identificación de IgM, IgG y proteínas del complemento (C1q y C3), formando complejos inmunitarios circulantes de alto peso molecular en pacientes con SCD (*Falconar, 2007*). Según *Watanaveeradej y col (2003)* las observaciones sobre la patogénesis de la FHD sugirieron un alto grado de activación inmunitaria con activación extensa del complemento precediendo el inicio del

shock, sugiriendo un rol de los productos del complemento divididos tal como C3a o C5a en el daño de las células endoteliales y pérdida de plasma. Esto sugiere que las subclases de IgG podrían ser un determinante importante de la severidad de la enfermedad, ya que la IgG1 e IgG3 se conoce que activan el sistema del complemento efectivamente mientras la IgG2 y la IgG4 son pobres activadores del complemento. La IgG4 podría en sí inhibir la activación del complemento. Esto sugiere que la IgG1 específica del dengue podría ser importante en la activación del complemento en la FHD y en la inducción de la pérdida de plasma.

Por lo que, la severidad de la enfermedad está fuertemente correlacionada con reducciones en las plaquetas y en la concentración de fibrinógeno, así como también con las elevadas concentraciones de histaminas vasoactivas y del producto C3a del complemento libres en la circulación sanguínea y con la localización de anticuerpos, complemento y fibrinógeno sobre el endotelio vascular de pacientes con FHD/SCD (*Falconar, 2007*). Lo cual se corresponde con el hallazgo de que el suero de pacientes con dengue causa lisis de las plaquetas mediada por complemento e inhiben la agregación de las plaquetas mediada por ADP (*Lin y col, 2006*). Estas anomalías hemostáticas son sugerentes de coagulación intravascular diseminada (CID) (*Sosothikul y col, 2007*). Lo cual explica en parte el complejo mecanismo patogénico durante la infección secundaria, la trombocitopenia y la pérdida de plasma observadas durante FHD/SCD (*Falconar, 2007*). Esta última puede llevar a la muerte al enfermo por choque hipovolémico (*Rodríguez y Marzal, 2004*).

Es importante resaltar que no solamente los auto-Acs son los responsables de la pérdida del plasma o del defecto hemostático en la FHD/SCD, sino además la activación de vías inflamatorias que conllevan a un incremento en los niveles del componente C3a del complemento y de diferentes citoquinas, liberadas tanto por los monocitos infectados por el virus del dengue como por los linfocitos T específicos, tal como la IL-6 (estimulante de la

producción de anticuerpos) y la histamina (vasodilatador) (*Gil y col, 2004; Falconar, 2007; Soothikul y col, 2007; Boonnak y col, 2008*).

De acuerdo con la teoría de incremento dependiente de anticuerpo, la pérdida de plasma en FHD es una consecuencia directa de una incrementada carga viral. El inicio de la pérdida de plasma, ocurre varios días después que la viremia ha sido reducida o eliminada significativamente, lo cual sugiere un mecanismo inmuno-mediado para la FHD (*Green y Rothman, 2006*).

El síndrome de pérdida de plasma visto en la FHD es de corta vida y como se explicó anteriormente es causado más bien por los efectos de los mediadores inmunitarios que por los efectos destructivos de la infección del virus del dengue sobre las células.

Algunos estudios *in vitro* han demostrado que la línea de células endoteliales humanas infectadas productivamente con virus dengue pueden producir mediadores proinflamatorios (IL-6 e IL-8), alterar la expresión de la molécula de adhesión intercelular tipo 1 y la estructura del citoesqueleto de actina, e incrementar la permeabilidad a las moléculas pequeñas. Estos efectos podrían ser particularmente revertidos por los anticuerpos neutralizantes dirigidos contra la IL-8. Los estudios de autopsia han sugerido que los hepatocitos podrían ser también algunas de las células blanco para el virus del dengue, y que la infección de los hepatocitos es responsable del daño del hígado (*Green y Rothman, 2006*).

La pérdida de plasma en la FHD es a su vez el resultado del mal funcionamiento del endotelio, que al igual que los daños ocasionados sobre las plaquetas son directamente el resultado de los efectos virales y de los cambios en la permeabilidad vascular mediados por el sistema inmunitario. El estudio de los efectos de la anti-NS1 del virus del dengue después de unirse a las células endoteliales, demostró que la anti-NS1 induce a las células endoteliales a experimentar apoptosis mediada por óxido nítrico (NO) (*Lin y col, 2006*). El NO que se produce es en respuesta a la infección viral (tiene actividad antiviral) (*Neves-*

Souza y col, 2007). La producción de NO causada por una alta regulación de los productos de los genes p53 y Bax y por una baja regulación de los productos de los genes Bcl-2 y Bcl-xL, conduce a la liberación de citocromo c y a la activación de la caspasa-3. Por lo tanto la anti-NS1 puede inducir la activación inflamatoria de las células endoteliales. Las células endoteliales incrementan la expresión de IL-6, IL-8 y MCP-1, luego de la estimulación con anti-NS1. De igual forma incrementa tanto la expresión de las moléculas de adhesión ICAM-1 como la capacidad de adhesión de las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) a las células endoteliales (*figura 9*) (*Lin y col, 2006*).

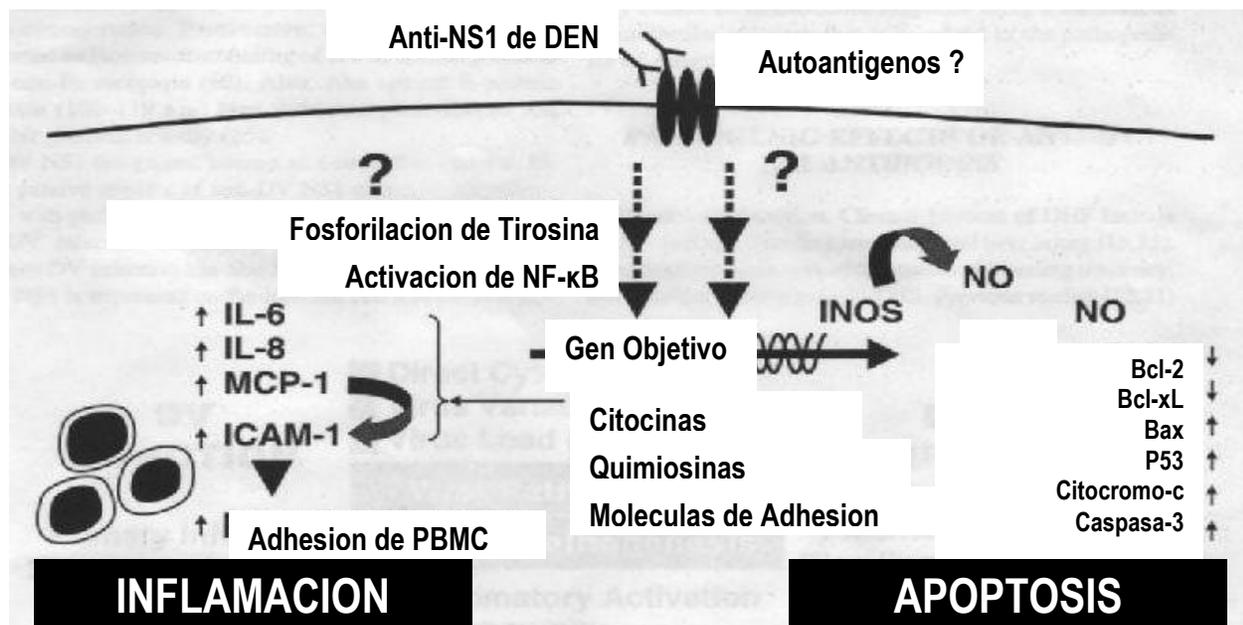


Figura. 9.- Vías de señalización mediadas por anticuerpos anti-NS1 que conducen a la activación inflamatoria de las células endoteliales y a la apoptosis. Las vías de señalización de la apoptosis inducida por los anticuerpos anti-NS1 es disparada por la producción de óxido nítrico (NO), la cual sobregula p53 y Bax y bajoregula Bcl-2 y Bcl-xL, factores pro- y anti-apoptóticos, respectivamente, seguido por la liberación de citocromo c y la activación de caspasa-3. La señalización inflamatoria en células endoteliales después de estimulación con anti-NS1 involucra la fosforilación de la proteína tirosina y la activación de NF-κB. El NF-κB es requerido para la expresión de citoquinas (por ejemplo IL-6) y quimiosinas (por ejemplo IL-8 y MCP-1). La expresión de ICAM-1 inducida por anti-NS1 es regulada por NF-κB y MCP-1. Por lo tanto, la capacidad de las PBMC de adherirse a las células endoteliales es mediada por ICAM-1. La activación inflamatoria de células endoteliales y la apoptosis estimulada por anti-NS1 podría estar involucrada en la patogénesis de la FHD.

Tomado de Lin y col, 2006

La patogénesis inducida por el virus del dengue por la cual el anticuerpo anti-NS1 cruza su reacción hacia las plaquetas y las células endoteliales, puede explicarse a su vez por la existencia de una similitud molecular entre los epítopes reconocidos por la anti-NS1 sobre la proteína viral NS1 y los motivos tipo ELK presentes en las moléculas de adhesión ICAM-1 que expresan las células endoteliales (*Lin y col, 2006*).

II.7.5.- Otros Factores involucrados en la patogénesis de la FHD/SCD

La severidad de la enfermedad también está asociada a la edad, raza, nutrición, características genéticas y estado inmunológico del humano, al movimiento de viajeros desde áreas endémicas hacia áreas donde existen pocos casos de la enfermedad, a la virulencia y a la circulación de múltiples serotipos del virus (*Rodríguez y Marzal, 2004*).

Las características antropomórficas también se han asociado con la severidad de la enfermedad del dengue. Esto hace referencia a la baja incidencia de FHD cuando prevalecen en los individuos infectados, características antropomórficas Negroides, mientras que los individuos con una predominancia de características antropométricas Caucásicas tienen una incidencia mucho más alta. Sin embargo, aún son necesarios algunos estudios más profundos sobre la raza, a fin de considerar su rol como un factor de riesgo en la progresión clínica de una infección por dengue (*Sierra y col, 2006*).

Al mismo tiempo, la virulencia de la cepa infectante se considera también otro factor que se debe tomar en cuenta al analizar el complejo mecanismo patogénico del DH. En este sentido se ha reconocido la asociación de algunos genotipos, como los serotipos Den 2 y Den 3 de origen asiático, con casos y epidemias de DH en las Américas, a partir de la epidemia de dengue en el año 1981 en Cuba. De hecho se ha demostrado que los enfermos con dengue presentan una menor carga viral que los enfermos con DH (*Guzmán y col, 2006*).

Rodríguez-Roche y col, 2004 encontraron que el incremento en la severidad de las epidemias cubanas del virus Den-2 se debe a que aparecieron cepas más virulentas, como resultado del escape de anticuerpos neutralizantes heterotípicos.

II.8.- Cultivo viral en sistema celular

El cultivo viral es el procedimiento que se emplea para dar diagnóstico virológico, además de las otras áreas del diagnóstico microbiológico. Debido a que los virus requieren de la maquinaria celular para la replicación, deben ser usados sistemas vivos (*Fields. Knipe y Howley, 2007*).

El método de amplificación viral, incrementa la cantidad de patógeno, facilitando la detección y caracterización (*Fields. Knipe y Howley, 2007*).

El crecimiento de virus en cultivo de células a menudo (pero no siempre), esta asociado con cambios morfológicos visibles microscópicamente en células infectadas, denominados efecto citopático (CPE). Las características del CPE pudieran permitir reconocimiento del virus infectante. Las características importantes del CPE incluyen (a) que tipo de cultivo celular son afectados, (b) el tiempo y la tasa de progresión, (c) la distribución (focal, difusa, limitado a los márgenes del cultivo celular) y (d) la naturaleza de los cambios morfológicos. El CPE pudiera ser suficientemente distintivo para permitir identificación inequívoca del virus, pero en otros casos no (*Fields. Knipe y Howley, 2007*).

El virus del dengue es capaz de multiplicarse en diferentes sistemas celulares (esté o no adaptado a ratón), por ejemplo en cultivos primarios de células Vero, cultivo de células BHK-21, cultivo de células HeLa, etc. En algunos cultivos produce efectos citopatogénicos, pero éste, es de aparición lenta y poco evidente. En cuanto al rendimiento viral, este varía dependiendo tanto del sistema celular como del tipo viral empleado (*Guzmán, 1980*).

El virus del dengue y el virus de la fiebre amarilla crece en muchas líneas celulares diferentes derivadas tanto de fuente vertebrado como de invertebrado. Para evitar problemas de adaptación del virus a cultivo celular, debería desarrollarse y emplearse un banco reserva de virus de bajo pasaje para su crecimiento en cultivo celular. Aun cuando el número de pasajes considerados aceptables en la PRNT no ha sido determinado experimentalmente, el pasaje del banco debería usarse no con más de 5 a 10 pasajes en cultivo celular. El virus debería ser cosechado durante la mitad del extremo de la fase exponencial, para evitar altas concentraciones de partículas inactivadas en las preparaciones virales. El sobrenadante de los cultivos celulares infectados, debería ser centrifugado con el fin de obtener las partículas virales por separación diferencial del detrito celular y resto de células viables. Adicionalmente debería ser estabilizado con agentes crioprotectores (por ejemplo 20% de suero bovino fetal) antes de alicuotar y almacenar a -70 °C. Previo a su uso, al banco de trabajo del virus se le debería realizar una prueba de esterilidad para descartar la posibilidad de crecimiento de bacterias, hongos y micoplasma, realizar una titulación del virus en la línea celular usada para PRNT, para verificar la cantidad de partículas virales presentes en el mismo y si es posible identificarlo usando anticuerpos monoclonales serotipo-específico (Roehrig y col., 2008).

II.8.1.- Titulación de placas virales

Este método consiste en infectar un cultivo celular y agregar el medio nutritivo del mismo en fase semisólida (agar, agarosa, carboximetilcelulosa). De esta manera, cuando un virus infecta una célula, su progenie sólo puede migrar a las células inmediatamente vecinas, y no a las alejadas, ya que el medio semisólido limita su movilidad. Coloreando las células se observarán zonas no teñidas (placas de lisis), correspondientes a las células destruidas por la partícula infecciosa inoculada y las nuevas partículas que ella produjo (*figura 10*). Si la coloración se realiza con un colorante vital (rojo neutro), que no mata las células teñidas ni al virus, es posible tomar material de una placa, que contendrá la progenie viral correspondiente a un único virus infectante, constituyendo, por lo tanto, un “clon” (*Dulbecco y Ginsberg, 1990*).

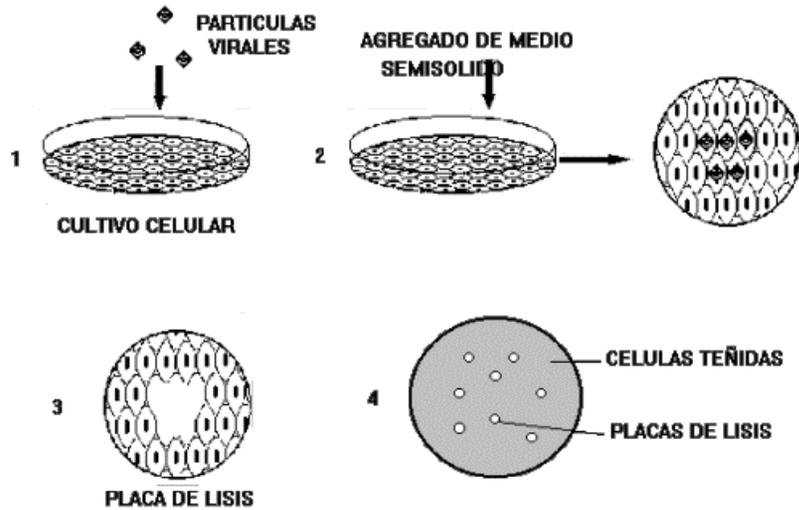


Figura. 10.- Esquema de la técnica de plaqueo. Inicia cuando: 1.-se infecta un cultivo celular y 2.-se agrega el medio nutritivo del mismo en fase semisólida, 3.- cuando un virus infecta una célula, su progenie sólo puede migrar a las células inmediatamente vecinas, 4.-al teñir las células viables se observarán zonas no teñidas (placas de lisis), correspondientes a las células destruidas por la partícula infecciosa inoculada y las nuevas partículas que ella produjo. Tomado de Dulbecco y Ginsberg, 1990

La curva "Dosis-Respuesta" para este método es lineal indicando que a cada placa de lisis corresponde una única partícula infectante. Por esta razón el margen de error es menor para este método, lo cual lo hace mucho más preciso (Dulbecco y Ginsberg, 1990).

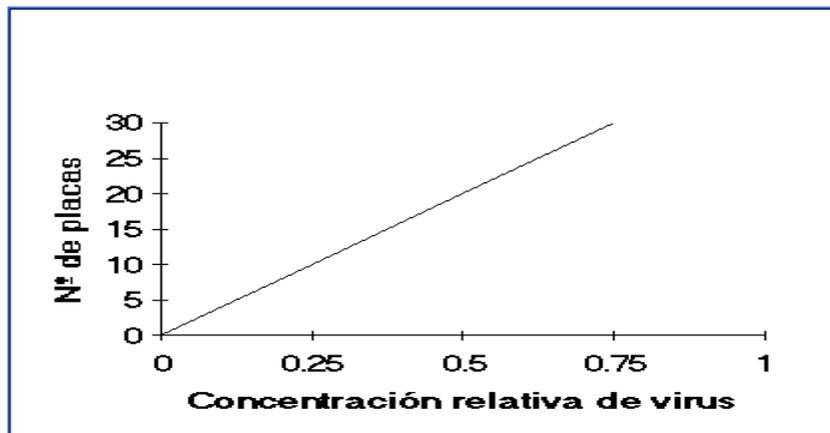


Figura 11.- Curva Dosis Respuesta

Tomado de Dulbecco y Ginsberg, 1990

El título de la preparación viral se calcula contando el número de placas que produce una determinada dilución de la muestra, y haciendo las correcciones necesarias para llegar a la cantidad de virus en la muestra original. Cada partícula infecciosa da origen a una placa de lisis, y se denomina en este caso "Unidad Formadora de Placa" (ufp). El título se expresa como ufp/ml (*Dulbecco y Ginsberg, 1990*).

La eficiencia de plaqueo, es un parámetro importante en determinar los resultados de PRNT. El uso de stock de virus que contienen grandes cantidades de viriones inactivos podría resultar en títulos falsamente bajos por PRNT (*Roehrig y col, 2008*).

II.9.- Detección de transmisión reciente de dengue y fiebre amarilla

Los estudios seroepidemiológicos pueden ser usados para definir infecciones recientes, y confirmar la transmisión de dengue y fiebre amarilla, o un incremento en su incidencia en áreas donde el dengue y la fiebre amarilla no son endémicos (donde el *Aedes aegypti* está presente) o en países endémicos durante períodos interepidémicos.

Pueden usarse diferentes marcadores serológicos, entre los que se encuentran las IgM anti-dengue y anti-fiebre amarilla, las cuales son usadas como marcadores de infección reciente. La presencia de IgG anti-dengue o anti-fiebre amarilla, en el suero se usa como un criterio de infección pasada con dengue o fiebre amarilla; sin embargo, la presencia de un título alto de IgG en una muestra única de suero sugiere una infección reciente, mientras que la seroconversión o un incremento de cuatro veces el título de IgG en muestras de suero pareadas de un paciente con sospecha de infección por dengue, confirma la infección (*Guzman y col, 2005*).

Los resultados de las pruebas realizadas en el laboratorio deben ser complementados con la información clínica y epidemiológica apropiada. La utilidad de estos estudios dependerá de la situación epidemiológica, la capacidad del sistema de vigilancia en detectar los primeros casos de los brotes y la rapidéz con la cual las medidas de control del vector puedan ser establecidas (Guzmán y col, 2005).

II.9.1.- Longevidad de los anticuerpos anti-dengue y anti-fiebre amarilla

La duración de la inmunidad hacia virus dengue y fiebre amarilla no es bien conocida. Varios estudios retrospectivos han determinado la presencia de anticuerpos anti-dengue y anti-fiebre amarilla neutralizantes en muestras de suero de personas previamente infectadas hace 40 años o más. La persistencia de anticuerpos neutralizantes por mas de cuatro décadas en personas estudiadas sugiere que la inmunidad contra el dengue y la fiebre amarilla puede ser de por vida, pero la cinética y longevidad, tanto de los anticuerpos neutralizantes homotípicos como la de los heterotípicos, no están bien caracterizadas.

II.9.2.- Ensayos para detectar infección pasada por dengue y fiebre amarilla

Los ensayos basados en I.H (Inhibición de la Hemaglutinación) y ELISA IgG de captura (Inmunoensayo ligado a enzima) son útiles para detectar una infección pasada por dengue y por fiebre amarilla. La I.H a pesar de ser sensible y reproducible, requiere que los sueros sean tratados con acetona o caolín para remover los inhibidores inespecíficos de la hemaglutinación, y con los glóbulos rojos de ganso para eliminar aglutininas no específicas. Este ensayo es satisfactorio para la identificación de *flavivirus*, sin embargo, carece de la especificidad necesaria para distinguir el tipo de *flavivirus* involucrado. Sin embargo, la presencia, de anticuerpos en el suero por I.H no suministra información acerca de una infección previa con el antígeno de virus de prueba, solo suministra evidencia de infección pasada con un *flavivirus* no especificado.

Al igual que con la I.H, los anticuerpos IgG detectados por ELISA normalmente son de reactividad cruzada, incluso durante una infección primaria por dengue (*Guzmán y col, 2005*).

II.9.2.1.- Técnica de Inhibición de la Hemaglutinación (I.H)

Los miembros de algunas familias de virus contienen proteínas que se pueden unir a eritrocitos; estos virus se pueden unir a múltiples células, tales como eritrocitos, dando como resultado una maya. Esta propiedad es conocida como Hemaglutinación (*Flint y col, 2004*).

El virus del Dengue y de la fiebre amarilla presentan esta propiedad, por lo que son capaces de aglutinar los glóbulos rojos de ganso y de pollo, y es utilizada en la técnica de Hemaglutinación y de Inhibición de la Hemaglutinación (*Guzmán, 1980*).

Debido a que el ensayo es rápido, es usado a menudo como un indicador para la relativa cantidad de partículas de virus. Sin embargo no es suficientemente sensible para determinar pequeños números de partículas (*Flint y col, 2004*).

La capacidad del virus de unirse a eritrocitos es bloqueada por la presencia de anticuerpos específicos, en el suero del paciente que evitan la aglutinación de los eritrocitos por tales antígenos (Método de *Clarke y Casals*, Tomado del manual de procedimientos del IPK. Cuba). Para cuantificarlos se hacen diversas diluciones del suero con el fin de hacer una titulación, con las cuales se determina el título o nivel de anticuerpos que corresponde a la dilución de anticuerpos más alta que inhibe la hemaglutinación (*Crespo, 2000; Flint y col, 2004*).

La reacción se considera positiva cuando se demuestra una seroconversión o un aumento significativo del título de anticuerpos, en el segundo suero colectado y analizado, y en el caso de sueros únicos cuando los anticuerpos van ligados a la fracción IgM. Hay que tener en cuenta que en el suero problema pueden existir inhibidores inespecíficos de la

hemaglutinación, que por ser causas de error en la interpretación de los resultados (reacciones falsas positivas) deben eliminarse previamente por tratamiento del suero con RDE (Enzima Destructora de Receptor), una mezcla de tripsina y per-yodato de potasio ó caolín (*Pumarola y Pumarola, 1987*).

Los anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación aparecen a los 7 días, aunque a veces se detectan títulos bajos procedentes de infecciones anteriores con cepas relacionadas, alcanzan el título máximo alrededor de las 2 a 4 semanas y disminuye progresivamente luego de 1 año hasta llegar a los niveles de preinfección, y persisten anticuerpos residuales durante muchos años (*Pumarola y Pumarola, 1987*). Los anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación pueden persistir por tiempos prolongados, 48 años o más, por lo que esta prueba es ideal para estudios sero-epidemiológicos (*Faingezicht y Avila, 1999*).

Esta prueba es el método de opción para el ensayo de anticuerpos para algún virus que causa hemaglutinación (*Flint y col, 2004*). Cuando una muestra es negativa para la infección por un *flavivirus*, es decir negativa de anticuerpo inhibidores de la hemaglutinación anti-*flavivirus* al ser mezclada con el antígeno viral, resulta la formación de una malla de eritrocitos, por el contrario si la muestra es positiva de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación anti-*flavivirus*, los anticuerpos que se encuentren presentes se unen al antígeno, dejando libre los glóbulos rojos, los cuales consecuentemente precipitan (*figura 12*).

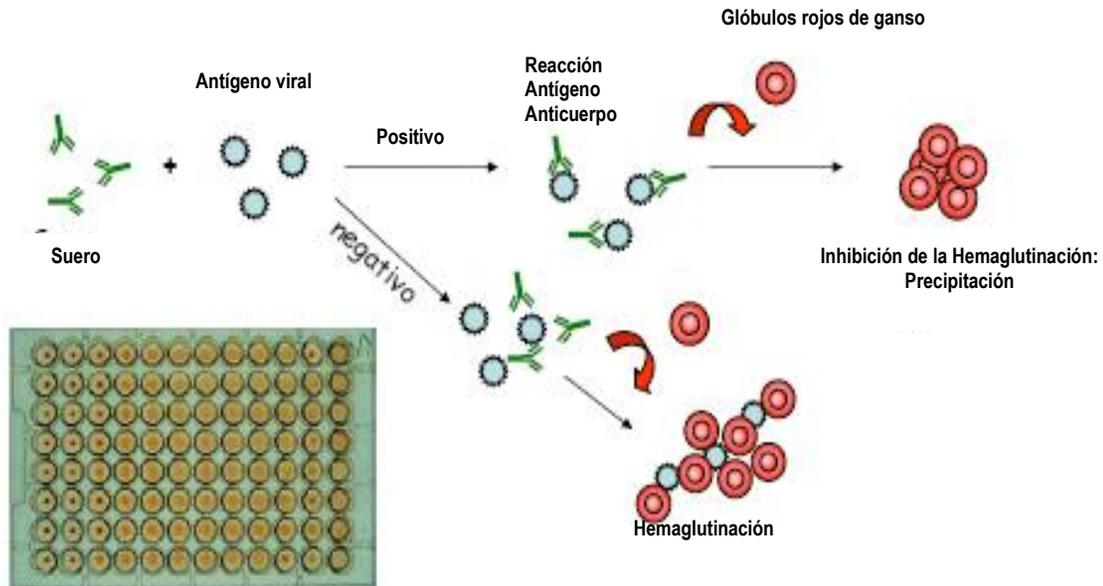


Figura. 12.- Prueba de Inhibición de la Hemaglutinación. Una muestra de suero de paciente, es negativa para la infección por un *flavivirus*, es decir negativa de anticuerpo inhibidores de la hemaglutinación anti-*flavivirus*, cuando al ser mezclada en una relación 1:1 con el antígeno viral, resulta la formación de una maya de eritrocitos, por el contrario si la muestra es positiva de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación anti-*flavivirus*, los anticuerpos que se encuentren presentes se unen al antígeno, dejando libre los glóbulos rojos, los cuales consecuentemente precipitan

Tomado de: <http://minnie.uab.es/~veteri/21277/pruebas%20serologicas.pdf>. Consulta: 21/10/2008

II.9.2.2.- Técnica de Neutralización por Reducción en Placas (PRNT)

La PRNT se basa en la capacidad que tienen los anticuerpos neutralizantes de neutralizar el virus y de bloquear la infección viral (Roehrig y col, 2008).

Mide el parámetro biológico de la neutralización del virus *in Vitro* y es considerada la técnica serológica con la mayor especificidad, permitiendo la diferenciación entre *flavivirus* y la determinación de anticuerpos neutralizantes hacia los cuatro serotipos del dengue, correlacionándose bien con los niveles de protección en suero (Guzmán y col, 2005; Roehrig y col, 2008).

El ensayo de la PRNT fue descrito por primera vez en el año 1950 y después fue adaptado al virus dengue. El diseño básico de la PRNT permite que ocurra la interacción virus-anticuerpo en un tubo de prueba o placas de microtítulo, y entonces los efectos de los

anticuerpos sobre la infectividad viral son medidos por probar la capacidad lítica del virus presente en la mezcla, sobre células susceptibles al virus. Las células son cubiertas con un medio semisólido que restringe la dispersión del virus progenie. Cada uno de los virus que inician una infección productiva produce un área localizada de infección (una placa), que puede ser detectada por varias vías. Las placas son contadas y comparadas con la concentración del virus de partida para determinar el porcentaje de reducción en la infectividad del virus total (Roehrig y col, 2008).

En la PRNT el espécimen de suero a ser probado, normalmente es sometido a diluciones seriadas previo a la mezcla con una cantidad estandarizada de virus. La concentración de virus es mantenida constante tal que, al ser agregada a células susceptibles y cubiertas con medio semisólido, las placas individuales pueden ser discernidas y contadas. Los títulos del punto final de la PRNT, pueden ser determinados para cada uno de los especímenes de sueros en algún porcentaje seleccionado de la reducción de la actividad del virus (Roehrig y col, 2008).

La técnica de inactivación de los especímenes de suero por calor a 56 °C durante 30 minutos para la evaluación serológica fue introducido para limitar el efecto que el complemento o virus extraños podrían tener sobre los resultados finales. La filtración de los especímenes de suero para remover partículas no es necesaria. La neutralización del virus dengue no requiere complemento, así que la adición de fuentes exógenas de complemento al PRNT no es necesaria (Roehrig y col, 2008).

Algunos aspectos importantes relacionados con la prueba de neutralización son:

- Los anticuerpos neutralizantes son dirigidos hacia la envoltura y las proteínas de membrana del virus.
- La especificidad de los anticuerpos neutralizantes incrementa con el tiempo.
- Es observado un nivel bajo de reactividad cruzada en una infección primaria con dengue y fiebre amarilla.

- La detección de anticuerpos neutralizantes hacia varios serotipos sugieren que ha ocurrido una infección múltiple con dengue.
- En general un nivel bajo de reactividad cruzada es observado con diferentes *flavivirus*. Algunos han adoptado un criterio estricto a fin de definir el serotipo infectante. *Sangkawibha y col (1984)*, consideraron que una prueba resulta positiva para el virus del dengue cuando una reducción del 70 % o más en la formación de placas virales fue observada en una dilución de suero de 1/30. La tendencia inherente en este criterio no es conocido, considerando que la mayoría de los estudios serológicos han sido realizados en áreas donde co-circulan los virus del dengue (*Guzmán y col, 2005*).

Los criterios necesarios para validar una prueba individual son: (1) integridad del control de monocapa celular no infectado; (2) apropiado contaje de placas por pozos, como el determinado por retitulación de la dilución de trabajo del virus; (3) poca o ninguna reducción de placas con suero control negativo; (4) apropiado título PRNT del suero control positivo; (5) ninguna toxicidad observada con las diluciones bajas del suero (*Roehrig y col, 2008*).

El punto final de la titulación es la dilución de suero más alta que reduce el número de placas en un 50 % a un 90 %, y son expresados como el recíproco de esa última dilución de suero que muestra el porcentaje de reducción deseado en cantidad de placas. En algunas ocasiones, una dilución única de suero es empleada para detectar la presencia de anticuerpos neutralizantes hacia un virus en particular (*Guzmán y col, 2005; Roehrig y col, 2008*).

Como se menciono anteriormente, la PRNT es la técnica serológica más específica y tradicional. Han sido empleados varios protocolos en los que se usa agar, agarosa, carboximetilcelulosa y diferentes cultivos celulares, tales como células de riñón de mono

verde africano (Vero), células de riñón de hámster bebe (BHK 21), células de riñón de mono rhesus (LLCMK₂) y células de riñón porcino (PS).

Requiere de buena estandarización a fin de obtener resultados que sean reproducibles y comparables entre laboratorios. Tres aspectos importantes merecen cuidadosa atención: la selección de la cepa viral a ser empleada, su número de pasaje y el sistema biológico de pasaje influye en los resultados obtenidos (*Guzmán y col, 2005*).

La PRNT es una técnica útil cuando es usada correctamente. Ha sido empleada en varios estudios seroepidemiológicos con donantes Cubanos para obtener información importante tal como la prevalencia de anticuerpos hacia el virus infectante y resalta el rol de infección secundaria en la enfermedad severa. Además, en estos estudios ha sido posible medir la transmisión silente de dengue durante una epidemia de FHD, el rol de la edad en el curso de una infección secundaria y el rol del intervalo de secuencia del virus (*Guzmán y col, 2005*).

Después de la infección primaria, una reacción monotípica es observada generalmente hacia el virus infectante. Por el contrario después de una infección secundaria la respuesta de IgG es de amplia reacción cruzada y resulta en títulos de neutralización mas altos hacia el primer serotipo infectante (*Guzmán y col, 2005*).

Además de la PRNT, algunos investigadores han empleado una prueba de neutralización por reducción en microfoco (basado en la técnica de peroxidada-antiperoxidasa) y una prueba de microneutralización basada en un formato ELISA (*Guzmán y col, 2005*).

Una de las desventajas de la PRNT es la intensa labor, consume mucho tiempo por el largo proceso que involucra y además es costosa, dificultando su uso en la vigilancia a gran escala (*Roehrig y col, 2008*).

III. - ANTECEDENTES

A continuación se mencionan algunos trabajos en los que se han aplicado tanto la técnica PRNT, como la técnica Inhibición de la Hemaglutinación. El orden de los mismos se dará de acuerdo a lo más actualizado respecto a la técnica.

- ❖ *Halstead y Russ, 1962; Guzmán y col, 2007* sugirieron que la persistencia a largo término de los anticuerpos después de una infección viral está basada en la presencia de células de plasma y de memoria B de larga vida. También sugirieron que el mejoramiento en el título de anticuerpos neutralizantes homotípicos y la disminución en el título de anticuerpos neutralizantes heterotípicos evocan la maduración de la afinidad.
- ❖ En 1969, *Singh y Paul*, fueron los primeros que reportaron el aislamiento de virus del dengue en cultivo celular de *A. albopictus*. Desde entonces otras líneas celulares de mosquitos han sido también usadas para este propósito.
- ❖ *Tesh, 1979*, sugirió que las ventajas de estas células de mosquitos son: 1) el hecho de ser más sensibles que el sistema de cultivos de vertebrados para la recuperación del virus dengue, 2) que son relativamente fáciles de mantener y crecer a temperatura ambiente y que pueden ser mantenidos por al menos 14 días sin cambiar el medio. Sin embargo, la desventaja es que el ECP producido en cultivo celular de mosquito para muchas cepas de dengue es difícil de detectar y es completamente variable.
- ❖ *Halstead, 1979; Guzmán y col, 2007* en estudios epidemiológicos en los que analizaron anticuerpos neutralizantes de personas después de la infección con virus dengue-2, que seguía a una infección con dengue-1, encontraron que el título de anticuerpos neutralizantes homotípicos hacia el virus dengue-1 aumenta y el título de anticuerpos heterotípicos hacia el virus dengue-2 disminuye.

- ❖ En estudios serológicos donde se usan suero inmune o fluido ascítico producido contra *flavivirus*, los ensayos de neutralización son generalmente los más específicos para la cepa inmunizante mientras que los ensayos de I.H tienden a ser los de mayor reactividad cruzada entre la cepa inmunizante y los *flavivirus* relacionados (*Schlesinger y col, 1983*).
- ❖ *Morens y col, 1985* compararon favorablemente la PRNT en BHK-21 semimicro con la PRNT macro en términos de especificidad (95%), sensibilidad (96%), y capacidad de detectar seroconversión hacia tres serotipos del virus del dengue (93%).
- ❖ *Morens y col, 1985* encontraron que el título de anticuerpos se incrementa conforme aumenta el tiempo de enfermedad.
- ❖ *Álvarez y col, 1998*, normalizaron la PRNT para evidenciar posible relación directa entre casos de FHD asociados con una historia de previa vacunación por F.A, los resultados obtenidos permitieron contar con una técnica útil y de gran especificidad para la realización de estudios serológicos que facilitaron dilucidar la presencia de anticuerpos contra F.A aún en individuos que han sufrido una o varias infecciones por dengue.
- ❖ Varios estudios han demostrado que después de 30 años post-vacunación con la cepa 17D de la FA, los anticuerpos neutralizantes están presentes aunque en títulos bajos (*Álvarez y col, 1998*).
- ❖ *Faingezicht y Ávila, 1999* propusieron que los anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación pueden persistir por tiempos prolongados, de hasta 48 años o más, por lo que esta prueba es ideal para estudios sero-epidemiológicos. Los títulos de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación, empiezan a aparecer a niveles detectables a los días 5 y 6 de la enfermedad, los títulos de anticuerpos en la fase de convalecencia son superiores a 640 en infecciones primarias. Los anticuerpos neutralizantes aumentan al mismo tiempo o más lentamente que los inhibidores de la hemaglutinación y ELISA, pero más rápido que los Fijadores del complemento. El desarrollo de anticuerpos IgM anti dengue, puede presentarse para el día quinto de la

enfermedad. Cerca del 93% de los pacientes desarrollan anticuerpos IgM detectables entre los 6-10 días del inicio de la enfermedad, en el 99% de los pacientes entre los días 10-20. Los títulos de anticuerpos IgM en infección primaria, son significativamente mayores que en infecciones secundarias. En muchas infecciones primarias, la IgM detectable puede persistir por más de 90 días, aunque lo normal es que ya no se detecten niveles a los 60 días de la infección. La viremia normalmente tiene un pico corto antes del inicio de la enfermedad y puede ser detectable en promedio entre los 4 a 5 días.

- ❖ *Acuña y col, 2001* plantearon que las reacciones de neutralización detectan anticuerpos dirigidos contra antígenos superficiales de los virus (glicoproteínas de envoltura o antígenos de la cápside). Estos anticuerpos son tipo-específicos, por lo que permiten determinar el subtipo viral causante de la enfermedad.
- ❖ *Acuña y col, 2001*, corroboraron la sensibilidad y especificidad de la técnica PRNT de F.A, al enfrentarla con los sueros controles e hiperinmunes, dando resultados positivos con los de F.A y negativos con los de dengue.
- ❖ *Acuña y col, 2001* obtuvieron títulos de anticuerpos superiores a 160 en muestras de pacientes después de los 30 días de la enfermedad de la fiebre amarilla. Para las muestras con antecedentes vacunales y diagnóstico positivo de F.A los títulos fueron más elevados y para las muestras que no refirieron antecedente vacunal (los que la adquirieron naturalmente, por exposición a parientes antigénicos cercanos al virus amarílico en áreas de transmisión) los títulos fueron variados desde 10 hasta 2560.
- ❖ *Weingartl y col, 2002* infirieron que la reactividad cruzada en la prueba de inhibición de la hemaglutinación se debe a que todos los miembros del género *Flavivirus* comparten epítopes comunes.
- ❖ *Espinosa-Gómez y col, 2003* indicaron que existen lugares donde el dengue ha adquirido un equilibrio endémico con una transmisión perpetua de baja intensidad, la cual puede

pasar por desapercibida para los sistemas de vigilancia epidemiológica tradicionales, debido a que un alto porcentaje de individuos infectados son asintomáticos, o bien porque su sintomatología es tan leve que no amerita la búsqueda de consulta médica, aunque de todas formas participan en la cadena de transmisión.

- ❖ *Bastos y col, 2004* compararon la inmunogenicidad de la vacuna 17D producida por la OMS con la 17DD Brasileira, para lo cual vacunaron un número igual de individuos con ambas vacunas, que nunca antes habían sufrido infección por otros *flavivirus*, analizaron el estatus inmunológico de los individuos de prueba antes y después de la vacunación por PRNT, basando su estudio en el hecho de que la PRNT es altamente específica, y exitosamente no encontraron infecciones previas por otros *flavivirus*, como consecuencia de resultados falsos positivos.
- ❖ *Bastos y col, 2004* definieron por seroconversión a un incremento por PRNT de cuatro veces el título de anticuerpos en muestras de suero de individuos después de la vacunación con la cepa vacunal 17D fiebre amarilla, con respecto al que presentaban antes de la vacunación.
- ❖ Para determinar el serotipo del virus del Dengue circulante entre los habitantes de Santo Domingo, fue usada la Prueba de Neutralización por Reducción en Placas. Esta prueba mostró mayor especificidad para los serotipo del virus, y representó una aproximación aceptable para obtener información acerca de previas exposiciones al virus e inmunidad presente a partir de la comparación de los resultados serológicos obtenidos por este método y el de ELISA IgG específica del virus del dengue (*Yamashiro y col, 2004*).
- ❖ *Vázquez y col, 2004* reafirmaron la idea que el diagnóstico definitivo de una infección depende del aislamiento del virus, la detección del antígeno viral o el ARN en suero o en tejido o la detección de anticuerpos específicos en el suero de pacientes.

- ❖ *Vázquez y col, 2004* encontraron que a través de la técnica MAC-ELISA la respuesta de IgM presenta reacción cruzada con los serotipos del virus dengue. En la mayoría de los casos con la más alta respuesta contra el serotipo infectante.
- ❖ *Shu y Huang, 2004; Herrera y col, 2005* propusieron que dos patrones de respuestas serológicas pueden ser observadas en pacientes con infección del virus del dengue: respuesta de anticuerpos primarias y respuesta de anticuerpos secundarias, dependiendo del estatus inmunológico del individuo infectado. Una respuesta de anticuerpos primaria es vista en individuos que no son inmunes a *flavivirus*. Una respuesta de anticuerpos secundaria, es vista en individuos quienes han tenido una previa infección con *flavivirus*.
- ❖ *Shu y Huang, 2004* concluyeron que el diagnóstico serológico de la infección del virus del dengue se complica por las siguientes razones: a.- los pacientes pudieran tener infecciones secuenciales y múltiples, con los cuatro serotipos del virus del dengue debido a una carencia de anticuerpos de neutralización protectora cruzada; b.- las infecciones secuenciales y múltiples por *flavivirus*, dificultan el diagnóstico diferencial debido a la presencia de anticuerpos pre-existentes y al *sin antigénico original* (muchos clones de células B, que responden a la primera infección por *flavivirus*, son re-estimuladas a sintetizar anticuerpos tempranos con una mayor afinidad hacia el primer virus infectante que para el virus presente infectante en cada infección subsiguiente con *flavivirus*) en regiones donde dos o más *flavivirus* se encuentren circulando; c.- los anticuerpos IgG tienen alto grado de reactividad cruzada hacia antígenos de *flavivirus* homólogos y heterólogos; y d.- el serodiagnóstico de infecciones pasadas, recientes y presentes del virus del dengue, es difícil debido a la persistencia por largo tiempo de anticuerpos IgG en muchos pacientes con infecciones secundarias de dengue. De tal manera, entre las infecciones virales que pueden ser diagnosticadas por serología, la infección del virus del dengue está entre las más desafiantes.

- ❖ *Shu y Huang, 2004* propusieron que los anticuerpos IgM anti-virus dengue son producidos transitoriamente durante las infecciones primarias y secundarias, los anticuerpos IgM se desarrollan rápidamente y son detectables a los 3 a 5 días de la enfermedad en la mitad de los pacientes hospitalizados. Los estudios de dinámica de respuesta de anticuerpos, han demostrado que los niveles de IgM anti-dengue alcanzan su pico alrededor de 2 semanas post-infección y luego disminuyeron hasta niveles indetectables a los 2 o 3 meses. La IgG anti-virus dengue aparece un poco más tarde. Al contrario de la infección primaria, la infección secundaria con virus dengue, resulta en la aparición temprana de altos títulos de anticuerpos IgG de reactividad cruzada antes o simultáneamente con la respuesta IgM.
- ❖ *Shu y Huang, 2004* demostraron que los pacientes con infección por virus del dengue primaria, no tendrían anticuerpos IgM o IgG detectables a los 4 meses post-infección. Esto es contrario a los títulos altos de IgG detectados en muchos de los pacientes con dengue secundario, incluso 10 meses después de la infección.
- ❖ *Shu y Huang, 2004; Cordeiro y col, 2009* clasificaron la respuesta inmunitaria hacia el dengue analizada por el título de anticuerpos por I.H, de acuerdo al criterio de la OMS: los casos sin anticuerpos por I.H para dengue (< 20) en suero en fase aguda, colectadas antes del cuarto día de la enfermedad y muestras de suero en fase convaleciente con título de anticuerpos < 1280 se clasifica como infección primaria. Las infecciones se clasifican como secundarias en pacientes con títulos de anticuerpos por I.H ≥ 20 en muestras de suero en fase aguda y un título de anticuerpos por I.H en fase convaleciente ≥ 2560 . Después de 20 días de haber iniciado la enfermedad no es posible distinguir la respuesta de IgG de las muestras de infección primaria y de las de infección secundaria. Este tipo de diagnóstico está basado en título de anticuerpos de muestras de suero pareadas pero la reactividad cruzada entre flavivirus es común y puede conducir a falsos resultados. Además durante la infección secundaria aguda del dengue, los anticuerpos

serotipo-específicos pre-existentes aumentan y si el número de días desde el inicio de los síntomas no son tomados en cuenta, el ensayo de la I.H puede resultar en una clasificación engañosa. Diferenciar reactividad cruzada de infección natural podría no ser una tarea fácil en áreas endémicas. Es realmente importante poder verificar con muestras estándares, colectadas localmente.

- ❖ *Herrera y col, 2005* sugirieron que el primer patrón de respuesta sérica se ve en individuos que no son inmunes a *flavivirus* y en ella los anticuerpos IgM se incrementan entre el tercer y el quinto día de comienzo de los síntomas, alcanzan un pico a las dos semanas y prácticamente a los tres meses descienden a niveles no detectables, aunque en algunos casos pueden persistir por más de 90 días. La elevación de los anticuerpos IgG se produce entre los días 10 al 14, y permanecen así durante toda la vida. La respuesta secundaria se observa en aquellos individuos con una infección aguda por dengue, los que han padecido previamente una infección por flavivirus. En este caso, los títulos de anticuerpos IgG se elevan entre el primer y el segundo día hasta niveles altos, y los IgM lo hacen más lentamente y en menor nivel que en las infecciones primarias. Consideraron positivos, aquellos pares de muestras de suero en los que entre la primera y la segunda, hubo un incremento de 4 veces el título de anticuerpos. En los casos en que alguno de los dos sueros presentó títulos ≥ 2560 se consideró infección secundaria. Con la I.H se detectan anticuerpos totales, es decir tanto IgM como IgG, y en infecciones secundarias predominan las IgG, es por ello que en las re-infecciones son consideradas el marcador por excelencia.
- ❖ *Daffis y col, 2005* quienes trabajaron con anticuerpos monoclonales contra el virus de la fiebre amarilla (tipo silvestre y vacunales) concluyeron que todos los anticuerpos neutralizantes scFv se unen al mismo o a un epítipo conformacional cercanamente relacionado sobre la proteína de envoltura.

- ❖ *Rodríguez-Roche y col, 2005* encontraron que durante una infección primaria, los individuos desarrollan anticuerpos IgM después de 5 a 6 días de iniciarse la enfermedad que duran de 30 a 90 días. Los niveles de anticuerpo IgG incrementan una vez se incrementan los niveles de anticuerpo IgM y son detectables de por vida. Durante una infección secundaria los niveles de anticuerpo IgM son más bajos y en algunos casos están ausentes. Por el contrario los niveles de anticuerpos IgG incrementan rápidamente a más altos niveles que en la infección de dengue primaria o pasada.
- ❖ La técnica de I.H es sensible y reproducible. Posee la ventaja de emplear reactivos que pueden ser localmente preparados y de ser aplicadas a diferentes infecciones, primarias y secundarias, basada en el serotítulo de I.H. Las desventajas de esta técnica incluye el hecho de requerir muestras de suero pareadas (aguda y convaleciente) para la precisión de la técnica, y la dificultad de discriminar entre infecciones de dengue y otros *flavivirus* cercanamente relacionados. Estas desventajas, limitan su aplicabilidad a esas áreas geográficas en las cuales otros *flavivirus* junto con el virus del dengue, también son prevalentes. Tales problemas de reactividad cruzada se extienden a la serotipificación del virus del dengue para entender las infecciones pasadas del individuo de prueba (*Kao y col, 2005*).
- ❖ La técnica de neutralización por reducción en placas (PRNT) es la técnica mas usada para determinar el serotipo del virus del dengue con los que los pacientes son infectados. Un incremento de 4 veces o más en el título de anticuerpos entre las muestra en fase aguda y convaleciente, indican una infección actual. La serotipificación por PRNT es especialmente importante en infección de dengue primaria, debido a que los resultados de laboratorio por lo general exhiben una reacción monotípica al virus infectante. En las infecciones del virus del dengue secundarias el anticuerpo neutralizante con título alto es producido contra al menos 2 tipos del virus del dengue y es reactivo en forma cruzada contra los cuatro serotipos del virus del dengue y otros *flavivirus*. La desventaja que

incluye la PRNT es el tiempo que consume la titulación del virus del dengue y la cuidadosa manipulación de las técnicas de cultivo requeridas en cada paso (*Kao y col, 2005*).

- ❖ Las muestras de suero fueron consideradas positivas para uno de los virus en estudio, si el título PRNT 70 para ese virus en particular, fue mayor o igual de 4 veces el título determinado por PRNT para los otros virus usados en el ensayo. El título de anticuerpos fue definido como la mayor dilución en la cual se encuentra un porcentaje de reducción igual o mayor al 70% (*Pupo y col, 2006*).
- ❖ *Ocazonez y col, 2007* a partir de sus resultados, sugirieron que la magnitud de la respuesta de anticuerpos podría ser un factor determinante en la severidad del dengue: cuanto menor, más probabilidad de DH.
- ❖ Tras la infección del virus del dengue se produce una respuesta de anticuerpos IgM, IgG e IgA. La respuesta de anticuerpos IgM comienza temprano, frecuentemente antes del inicio de los síntomas. La IgM es normalmente detectable en ensayos de serología alrededor de los 7 a 8 días después de los síntomas. Los anticuerpos IgA son también detectables y tienen vida media similar a las IgM. Los anticuerpos IgG son detectables pronto después de la infección y son mantenidos por años (*Roehrig y col, 2008*).
- ❖ La PRNT mide el parámetro biológico de neutralización viral *in vitro* y es la prueba más virus específica entre *flavivirus*, la prueba serotipo-específica entre virus dengue, correlacionando bien con los niveles de protección de la infección viral en suero (*Roehrig y col, 2008*).
- ❖ *Borges y col, 2008* aplicaron una prueba de neutralización por reducción en micro-placas y encontraron que el *cut-off* asociado con la mejor realización de la prueba demostró muy buena especificidad (90,8% o 99,0%), con resultados negativos que presentaron una alta probabilidad de ser verdaderos negativos.

- ❖ *Cordeiro y col, 2009* enfatizaron que la técnica de la PRNT es principalmente usada para la clasificación serológica de las infecciones del dengue, pero a su vez mencionaron, que esta técnica es difícil de realizar para la mayoría de los laboratorios y debido a que los resultados toman varios días para obtenerse, tiende a limitar su utilidad clínica.
- ❖ *Cordeiro y col, 2009* describieron un proceso para validar y designar un método de clasificación para discriminar entre infección por dengue primaria de secundaria, basado en los niveles de anticuerpos IgG y los días de síntomas de la enfermedad. Para ello asignaron las muestras de referencia de acuerdo al siguiente criterio: la infección primaria fue caracterizada por la ausencia de anticuerpos IgG específicos contra dengue en la muestra de suero aguda y por la presencia de IgM anti-dengue, por el aislamiento del virus y/o la detección del ARN viral, seguido por la presencia de IgG anti-dengue en la muestra en fase convaleciente. La infección secundaria fue caracterizada por la presencia de IgG específica anti-dengue en la muestra en fase aguda y la ausencia de IgM anti-dengue asociado con un RT-PCR positivo y/o aislamiento del virus; seguido por la presencia de anticuerpos IgM en muestra de suero en fase convaleciente.
- ❖ *Cordeiro y col, 2009* indicaron que la ELISA IgM de captura es la prueba más comúnmente usada, sin embargo esta prueba no es lo suficientemente sensible durante los primeros 3 a 5 días de los síntomas.
- ❖ *Cordeiro y col, 2009* infirieron que la clasificación de respuesta inmunitaria primaria versus secundaria exclusivamente en base a la técnica de la I.H, siguiendo el criterio de la OMS no es siempre confiable y puede ser engañosa. En este caso el diagnóstico está basado en el título de anticuerpos de muestras de suero pareadas y la reactividad cruzada entre *flavivirus* es común y puede conducir a resultados falsos positivos. Además durante la infección de dengue secundaria en fase aguda, los anticuerpos serotipo específicos pre-existentes son disparados y si el número de días desde el inicio de los

síntomas, no es tomado en cuenta, la técnica de I.H puede resultar en una clasificación engañosa.

IV.- JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

La Finalidad del presente estudio es implementar en el Laboratorio de Inmunoserología Viral del “INHRR”, una técnica serológica que permita discriminar entre infecciones por *flavivirus*. La técnica a la cual se hace referencia, es la Neutralización por Reducción en Placas (PRNT), que se fundamenta en la capacidad que tienen los anticuerpos neutralizantes de unirse eficientemente a partículas virales mediante interacciones no covalentes, y se llevó a cabo, usando muestras de suero de pacientes con clínica de dengue y fiebre amarilla, en fase aguda y fase convaleciente de la enfermedad.

La especificidad de la técnica PRNT, puede ser utilizada en brotes epidémicos en los que la viremia en los pacientes es muy baja, a consecuencia que la muestra fue tomada después que se completara el período de incubación del virus para poder ser detectado en sangre, del deterioro de las muestras por no mantener una cadena de frío, de la toma incorrecta de muestras o escasa diversidad y cantidad de muestras en el caso de fallecidos, o del limitado volumen de muestra en el caso de pacientes que esperan por un diagnóstico definitivo.

Todas estas manipulaciones incorrectas conllevan a la pérdida de material genético y protéico del virus así como también de material protéico de nuestro interés, producido por el hospedador (las inmunoglobulinas o anticuerpos).

En casos como los que se acaban de mencionar, a veces es posible obtener información acerca de los casos, a través del análisis de niveles de anticuerpos en suero de pacientes, a través de técnicas serológicas.

V.1. - OBJETIVO GENERAL

Implementar y optimizar la técnica serológica Neutralización por Reducción en Placas (PRNT) para la detección de anticuerpos específicos contra diferentes *flavivirus* a fin de determinar respuesta inmunitaria específica a partir de muestras de sueros humanos con reactividad cruzada.

V.2. - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Amplificar partículas virales de la F.A (cepa vacunal) y de los serotipos 1 y 2 del virus del dengue (cepas locales) en las líneas celulares Vero E6 y C636/HT, respectivamente, para su utilización en la técnica de plaqueo y PRNT.

2.- Comprobar por la técnica de Inmunofluorescencia indirecta, la infección de las partículas virales presentes en los frotis de células Vero E6 y C636/HT, que se usaron para amplificar las partículas de la fiebre amarilla y de los serotipos 1 y 2 del virus del dengue.

3.- Titular las partículas virales producidas previamente a través de la técnica de plaqueo.

4.- Producir antígeno viral de cepas salvajes de los serotipos 1 y 2 del virus dengue en cerebro de ratón lactante.

5.- Extraer antígenos virales a través del método de la acetona-sacarosa de *Clarke y Casals*.

6.- Titular antígenos hemaglutinantes de la fiebre amarilla y de los serotipos 1 y 2 del dengue previamente producidos por la técnica de Hemaglutinación (HA).

7 y 8.- Titular anticuerpos anti-fiebre amarilla, anti-dengue-1 y anti-dengue-2, presentes en 48 muestras de suero de pacientes con la clínica de Dengue y Fiebre amarilla, almacenadas en la seroteca del INHRR, a través de la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación y Neutralización por Reducción en Placas.

VI. - MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1.- Selección de la muestra

Las muestras de suero, fueron seleccionadas en base al estatus inmunológico que presentaban los pacientes según los días que habían transcurrido desde que se instauraba la enfermedad. Se analizaron 48 muestras de suero provenientes de la seroteca del Laboratorio de Inmunoserología Viral del INHRR, procedente de diversas zonas endémicas y no endémicas del país, obtenidas entre 2005 y 2007. De las cuales, 30 presentaron IgM anti-dengue positiva y 13 IgM anti-fiebre amarilla positiva. Todas estas muestras tenían en la ficha epidemiológica la información del paciente, historial de infecciones contraídas y antecedentes de vacunación. El control negativo del PRNT de DEN y de F.A, consistió de una muestra de suero de paciente, negativo por serología para dengue y fiebre amarilla. El control positivo de DEN, consistió de una muestra de suero con PCR positivo para Dengue-3 y el control positivo de F.A de una muestra de suero que presentó vacunación por F.A y resultó positivo por serología.

Las tablas 1 a 3, contemplan la información presente en la ficha epidemiológica de cada grupo de muestras de suero de pacientes analizadas. En la *tabla 1*, se resume la información epidemiológica del grupo de pares de muestras de suero (un par de muestras de suero, se caracteriza por una muestra extraída en fase aguda y otra extraída en fase convaleciente de la enfermedad), en la *tabla 2*, se encuentra resumida la información del grupo de muestras de suero agudas y en la *tabla 3*, se sintetiza la información del grupo de muestras de suero convalecientes.

Tabla 1.- Características de los pares de muestras de sueros de pacientes (en fase aguda y fase convaleciente)

Nº muestra	Edad	Sexo	Vacuna de F.A	Días desde el inicio de la enfermedad	Tipo de muestra	Año de toma	IgM DEN	IgM F.A	I.H DEN	I.H F.A
1	28	M	No	4	A	2007	-	-	40	320
1'	28	M	No	14	C	2007	+	+	>=10240	>=10240
8	29	M	Sí	6	C	2005	+	+	>=10240	>=10240
8'	29	M	Sí	37	C	2005	+	-	NR	NR
16	2	F	Sí	4	A	2007	+	+/-	40	80
16'	2	F	Sí	48	C	2007	-	-	5120	>=10240
26	16	F	Sí	5	A	2007	+	-	640	1280
26'	17	F	Sí			2007	-	-	>=10240	>=10240
40	7	F	No	1	A	2008	-	-	<10	20
40'	7	F	No	10	C	2008	+	-	<10	20
41	21	M	No	3	A	2008	-	-	320	320
41'	21	M	No	13	C	2008	-	-	320	640
42	12	F	No	1	A	2008	-	-	40	80
42'	12	F	No	14	C	2008	-	-	40	80
43	13	M	No	2	A	2008	-	-	1280	1280
43'	13	M	No	12	C	2008	-	-	1280	2560
44	20	F	No	2	A	2008	-	-	320	640
44'	20	F	No	13	C	2008	-	-	320	1280
45	16	M	No	1	A	2008	-	+	2560	5120
45'	16	M	No	13	C	2008	-	-	2560	5120
46	15	F	No	5	A	2008	-	-	320	640
46'	15	F	No	13	C	2008	-	-	640	1280
47	8	M	No	4	A	2008	+	-	>=10240	>=10240
47'	8	M	No	14	C	2008	+	-	>=10240	>=10240
48	37	M	No	1	A	2008	+	+	>=10240	>=10240
48'	37	M	No	20	C	2008	+	+	>=10240	>=10240

F.A: Fiebre amarilla; **F:** Femenino; **M:** Masculino; **A:** Agudo; **C:** Convaleciente; **IgM:** Inmunoglobulina M; **DEN:** Dengue; **I.H:** Inhibición de la Hemaglutinación; -: Negativo; +: Positivo; **NR:** No realizado. ': Muestras convalecientes

Tabla 2.- Características de las muestras de suero de pacientes en fase Aguda

Nº muestra	Edad	Sexo	Vacuna de F.A	Días desde el inicio de la enfermedad	Año de toma	IgM DEN	IgM F.A	I.H DEN	I.H F.A	PCR Dengue
2	5	F	Sí	1	2004	NR	NR	NR	NR	NR
3 F.A+	8	M	Sí	1	2004	-	-	160	2560	NR
4	17	F	No	1	2005	NR	NR	NR	NR	NR
9	69	M	Sí	1	2005	-	+	160	1280	NR
10 C -	23	M	No	5	2005	-	-	<10	<10	-
11	37	F	Sí	1	2005	+	-	1280	10240	NR
13	23	F	No	5	2005	+	-	10240	10240	NR
18	5	F	No	5	2007	+	-	>=10240	>=10240	NR
20	7	F	No	6	2007	+	-	>=10240	>=10240	NR
21	7	F	No	4	2007	+	-	640	2560	NR
22	5	F	No	4	2007	+	-	>=10240	>=10240	NR
24	6	M	No	5	2007	+	-	>=10240	>=10240	NR
28	10	M	No	5	2007	+	-	5120	10240	NR
29	2	M	No	5	2007	+	-	20480	40960	NR
30	7	F	No	4	2007	+	-	1280	>=10240	NR
32	10	M	No	5	2007	+	-	5120	10240	NR
35	9	M	No	5	2007	+	-	5120	20480	NR
36	4	M	No	4	2007	+	-	10240	10240	NR
37	4	M	Sí	5	2007	+	-	20480	10240	NR
39	4	F	Sí	5	2008	+	-	1280	>=10240	NR
50 D+	9	F	No	3	2009	-	NR	640	5120	D3+

DEN: Dengue; **F.A:** Fiebre amarilla; **IgM:** Inmunoglobulina M; **I.H:** Inhibición de la Hemaglutinación; **PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa; **F:** Femenino; **M:** Masculino; **D3:** Dengue-3; **+**: positivo; **-:** negativo; **NR:** No realizado

Tabla 3.- Características de las muestras de suero de pacientes en fase Convaleciente

Nº muestra	Edad	Sexo	Vacuna de F.A	Días desde el inicio de la enfermedad	Año de toma	IgM DEN	IgM F.A	I.H DEN	I.H F.A
5	44	F	No	15	2005	-	+	1280	>=10240
6	9	M	No	6	2005	-	NR	2560	>=10240
7	44	F	Sí	8	2005	-	+	2560	>=10240
12	15	M	Sí	6	2005	+	+	1280	>=10240
14	14	M	No	6	2005	-	-	640	>=10240
15	38	M	No	14	2005	+	+	>=10240	>=10240
17	7	M	Sí	6	2007	+	-	<10	>=10240
23	7	M	No	6	2007	+	-	>=10240	>=10240
25	6	M	No	6	2007	+	-	>=10240	>=10240
27	8	M	No	31	2007	+	-	>=10240	>=10240
31	12	M	No	6	2007	+	-	>=10240	>=10240
33	6	M	Sí	6	2007	+	-	5120	>=10240
34	7	F	No	6	2008	+	-	>=10240	>=10240
38	13	F	Sí	6	2008	+	-	>=10240	>=10240
49	7	M	No	21	2008	+	NR	5120	2560

F.A: Fiebre amarilla; **F:** Femenino; **M:** Masculino; **A:** Agudo; **C:** Convaleciente; **IgM:** Inmunoglobulina M; **DEN:** Dengue; **I.H:** Inhibición de la Hemaglutinación; **-:** Negativo; **+:** Positivo; **NR:** No realizado.

VI.2.- ELISA IgM de Captura

Con el propósito de detectar la presencia de anticuerpos IgM anti-dengue y anti-fiebre amarilla en las muestras de suero analizadas se aplicó el ensayo ELISA IgM de captura.

Se sensibilizaron las tiras de ELISA con anti-IgM humana diluida 1:200 en buffer carbonato, se incubaron estas tiras durante 24 horas a 4° C y se lavó 5 veces con PBS, 1 minuto cada vez. Se bloquearon con leche descremada al 5% en PBS incubándose a 37 °C por 30 minutos. Luego de 5 lavados como en el paso anterior, se agregó 50 µl de muestras y los controles diluidos 1:40 en leche descremada al 0,5% en PBS, en los pocillos de reacción y se incubó 1 hora a 37 °C. Se lavó 5 veces con PBS, se añadió 50 µl de mezcla de antígeno-conjugado según el protocolo de la prueba y se incubó durante 1 hora a 37 °C. Luego se lavó 5 veces con PBS, se añadió 100 µl de sustrato TMB y se incubó en oscuridad

y a temperatura ambiente por 30 minutos. Por último se detuvo la reacción con 100 µl de H₂SO₄ 1N y se leyó a 450 nm. El valor de corte (*cut off*) se calculó multiplicando por dos el valor de absorbancia promedio de los controles negativos. Muestras con absorbancias por encima del 10% del *cut off* fueron consideradas positivas y aquellas con absorbancias por debajo del 10% del *cut off* se consideraron negativas. Las muestras con absorbancias dentro de la zona gris (valores entre el 10% por encima ó 10% por debajo del valor de corte) fueron consideradas equívocas y se repitieron y/o fueron eliminadas del trabajo.

VI.3.- Características de las Células C6/36 HT

Las células de mosquito se cultivan a 28°C, sin embargo el clon C6/36 podría adaptarse a crecer a 36 °C pero bajo esas condiciones las células dejan de multiplicarse cuando la temperatura sobrepasa los 35 °C. *Kuno y Oliver (1989)* propusieron que las líneas de células de insectos, altamente sensibles y acostumbradas a crecer a 28 °C al adaptarse a temperaturas más elevadas mejoran su capacidad para la replicación viral (siempre que la temperatura no exceda los 35 °C). Esta sublínea C6/36 HT está adaptada a crecer a 34 °C (*Kuno y Oliver, 1989*) y exhibe el mismo ECP (efecto citopatogénico) que las C6/36 originales aunque éste se manifieste más rápidamente y se obtienen mayores títulos virales que a 28 °C. Algunas cepas de Dengue son capaces de producir ECP de tipo sincitial en las C6/36 pero este fenómeno no es característico de la línea.

VI.3.1.- Cultivo de células C6/36 HT

Con el objetivo de amplificar las semillas virales de las cepas locales de los serotipos 1 y 2 del dengue, se mantuvo en cultivo la línea de células de mosquito, C636/HT.

Se eliminó el medio de crecimiento de las células del frasco de 25 cm². Luego se añadió 1 ml de medio fresco y se desprendieron las células golpeando vigorosamente el frasco. Se homogenizó con pipeta Pasteur o de 1 ml. Se resuspendió en medio de crecimiento para el pase de la línea, realizando una división de 1:8 o ajustando la concentración a 1×10^4 cel/ml y se incubó a 34°C sin ambiente de CO₂.

VI.3.2.- Amplificación de Semillas virales de los serotipos 1 y 2 del dengue en células C6/36 HT

Con el propósito de incrementar la cantidad de partículas virales de los serotipos 1 y 2 del dengue, se realizó una amplificación en células C636/HT de las semillas virales de cada uno de estos serotipos del dengue, proveniente de aislados virales provenientes de sueros de pacientes en fase aguda de la enfermedad.

Sobre una monocapa confluyente de células C6/36 HT, crecidas en frascos de cultivo de 25 cm², luego de descartar el medio, se inocularon 200 µl de aislado viral dengue, el cual era proveniente de muestras de suero de pacientes en fase aguda. Se agregó 1 ml de medio MEM de Earle al 10% de SFB a los frascos, se incubaron durante 45 min a 33 °C en ausencia de CO₂, y se agitaron cada 15 min. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se completó el medio hasta un volumen de 5 ml. Las muestras se incubaron nuevamente a 33 °C, variando el período de incubación dependiendo del serotipo: 6 días Den-2, 7 días Den-4 y 8 días Den-3 y Den-4. Esto dependió del serotipo del dengue del que se trató. Por lo general, el período de incubación para la visualización del efecto citopático-para cualquiera de los 4 serotipos es de 6 a 7 días. Luego se transfirió el sobrenadante hacia un tubo estéril

y se realizó el lavado con PBS y el raspado de la monocapa para análisis por inmunofluorescencia indirecta, para detectar la infección por el virus.

VI.3.3.- Inmunofluorescencia Indirecta

Con el objetivo de detectar la infección del virus que se amplificó en el paso anterior se realizó una inmunofluorescencia indirecta.

Las láminas portaobjetos para inmunofluorescencia con frotis de la suspensión celular en la cual se amplificó el virus, se introdujeron en acetona fría (-20 °C por 20 minutos), para fijar las células. Luego se extrajeron de la acetona y se dejaron secar, posteriormente se colocó una alícuota de anticuerpos monoclonal serotipo-específicos producidos en ratón y se dejaron incubar en cámara húmeda a 37 °C por 30 minutos. Se lavaron dos veces las láminas con PBS, la primera vez durante 1 minuto y la segunda vez durante 10 minutos. Se agregó una alícuota de un anticuerpo anti-ratón marcado con FITC, se dejaron incubar en cámara húmeda a 37 °C por 30 minutos y de nuevo se lavó dos veces con PBS y con agua destilada por 10 minutos en el primero y rápidamente en el segundo. Las láminas se observaron al microscopio de fluorescencia con luz ultravioleta.

VI.4.- Características de las Células Vero

Las células Vero provienen de riñón de mono verde africano de la especie *Cercopithecus aethiops*, cuya forma es epitelial y crecen por adhesión al substrato. El medio usado que generalmente requieren las células Vero para su crecimiento es medio esencial mínimo de Eagle (MEM).

VI.4.1.- Amplificación del virus de la Fiebre Amarilla cepa vacunal en células Vero E6

Con el fin incrementar el número de partículas virales de la fiebre amarilla, se amplificó una alícuota de la cepa vacunal 17DD en cultivo de células Vero E6, tal y como se hizo para los serotipos 1 y 2 del dengue, con la variante de que el cultivo de células inoculado se incubó a 37 °C en presencia de una atmósfera al 5 % de CO₂. Luego se llevó a cabo la detección de la infección de las células presentes en el cultivo viral, por la técnica de Inmunofluorescencia indirecta.

VI.5.- Titulación de placas virales

Con la intención de hallar la dilución viral que contuviera de 15 a 20 ufp, necesaria para producir la reacción virus-anticuerpo en la técnica PRNT, se realizaron varias titulaciones virales, de los virus que previamente fueron amplificados en cultivo celular, por el método de plaqueo tradicional, para lo cual se siguieron los pasos que se dan a continuación:

VI.5.1.-Método de la Agarosa overlay al 0,5%

La técnica de titulación de placas virales por el método de la Agarosa *overlay* al 0,5%, para fiebre amarilla y los serotipos 1 y 2 del dengue, se realizó según el procedimiento descrito por *Morens y col (1985)*, con algunas modificaciones. En los ensayos preliminares de titulación se probaron las líneas celulares BHK-21, Vero E6 y Vero NK. Se emplearon monocapas confluentes de estas células, a una concentración que varió dependiendo de la línea celular empleada:

- Células BHK-21: 250.000 cel/ml (0,5 ml/pozo)
- Células Vero E6 y Vero Nk: 400.000 cel/ml (1 ml/pozo);

sembradas e incubadas a 37 °C en ambiente al 5% de CO₂, en placas de 24 pozuelos, 24 horas, antes de llevar a cabo la inoculación del virus. Se descartó el sobrenadante de las células y se inocularon 50 µl de dilución viral en cada pozuelo con células BHK-21 y 200 µl con células Vero E6 y Vero Nk, luego se incubaron a 37 °C en atmósfera al 5% de CO₂ durante 2 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se agregó 0,5 mL de una mezcla 1:1 de agarosa al 1% con medio MEM de Earle 2X al 4 % de SFB, se mantuvo a temperatura ambiente durante 10 minutos para que gelificara la agarosa y se incubaron bajo las mismas condiciones antes mencionadas. El tiempo de incubación del virus de la fiebre amarilla fue de 6 días y en el caso del virus del dengue, el tiempo de incubación dependió del serotipo en estudio (6 días para Den-2, 7 días para Den-4 y 8 días para Den-1 y 3). Por último se descartó el bloque de Agarosa, se fijaron y tiñeron las células, con formol al 10% y violeta de cristal al 1%, respectivamente.

Para preparar la Agarosa *overlay* al 0,5% se mezcló un volumen de agarosa al 1 % precalentada a 40 °C con un volumen igual de Medio MEM de Earle 2X al 4 % de SFB a temperatura ambiente y se mantuvo a 40 °C, con el fin de mantener una mezcla homogénea y evitar que se gelifique antes de ser agregado sobre la monocapa de células.

VI.5.2.-Método de la Carboximetilcelulosa (CMC) *overlay* al 1,5%

La técnica de titulación de placas virales por el método de la Carboximetilcelulosa *overlay* al 1,5 %, para fiebre amarilla y los serotipos 1 y 2 del dengue, se realizó según el procedimiento descrito por *Morens y col (1985)*. En los ensayos preliminares de titulación se probaron las líneas celulares Vero E6 y Vero NK, Las cuales fueron seleccionadas para realizar las titulaciones definitivas del virus de la fiebre amarilla y de los dos serotipos del dengue, respectivamente. Se emplearon monocapas confluentes de células, a una concentración de 400.000 cel/ml, sembradas (1 ml/pozo) e incubadas a 37 °C en ambiente al 5% de CO₂, en placas de 24 pozuelos, 24 horas, antes de llevar a cabo la inoculación del

virus. Se descartó el sobrenadante de las células y se inocularon 200 µl de dilución viral en cada pozuelo y se incubaron a 37 °C en atmósfera al 5% de CO₂ durante 2 horas. Luego, se agregó una capa de CMC al 1,5%, se incubaron bajo las mismas condiciones antes mencionadas. El tiempo de incubación del virus de la fiebre amarilla fue de 6 días y en el caso del virus del dengue, el tiempo de incubación dependió del serotipo en estudio (6 días para Den-2, 7 días para Den-4 y 8 días para Den-1 y 3). Por último se descartó la CMC, se fijaron y tiñeron las células, con formol al 10% y violeta de cristal al 1%, respectivamente.

VI.6.- Neutralización por Reducción en Placas

Con el propósito de titular los anticuerpos totales, principalmente los tipo IgG anti-dengue y anti-fiebre amarilla, que se encontraban presentes en las muestras de suero de los pacientes, se aplicó la técnica PRNT.

La Técnica de Neutralización por Reducción en Placas con el virus de la fiebre amarilla y los serotipos 1 y 2 del dengue, se realizó según el procedimiento descrito por *Morens y col (1985)*; se emplearon las líneas celulares Vero E6 y Vero NK, tal y como se indica en la sección anterior. Se mezcló el virus con el suero, en una relación 1:1 y se incubó a 37 °C en un ambiente al 5 % de CO₂ durante 1 hora. Una vez que el complejo virus-anticuerpo se formó, se inoculó en la monocapa celular, 200 µl de la mezcla y se incubó bajo las condiciones antes mencionadas durante 2 horas. El resto de los pasos se siguió tal y como se indica en la sección de titulación de placas virales.

El porcentaje de Neutralización fue expresado como sigue: $100 - (\text{número de placas obtenidas con la mezcla virus-suero} / \text{número de placas obtenidas con el virus solo}) \times 100$. (*Daffis y col, 2005*).

A las muestras de suero se les determinó como positivas de acuerdo al criterio del 70 %, establecido por *Morens y col (1985)* y el título de anticuerpos que presentaba la muestra

se hallaba en la dilución mas alta en la cual el porcentaje de reducción era igual o mayor al 70%.

VI.7.- Inoculación viral del dengue en cerebro de ratón lactante

Con el objetivo de producir antígenos virales de los serotipos 1 y 2 del dengue, se inoculó en cerebro de ratón lactante una cepa local de estos serotipos virales, para luego ser empleados en los experimentos de Hemaglutinación y de Inhibición de la Hemaglutinación.

En el cerebro de ratones neonatos de la especie *Mus musculus*, se inoculó 200 µl de una suspensión viral de una cepa local de DEN-1 y DEN-2. Se mantuvieron en observación durante 5 a 7 días o hasta detectar los síntomas neurológicos compatibles con la infección viral. Los animales fueron entonces sacrificados y almacenados a -80 °C en caso de haber presentado síntomas, en caso contrario, se continuó haciendo pases en ratón con los cerebros infectados, hasta la observación de los síntomas mencionados.

VI.7.1.- Extracción de Antígeno en cerebro de ratón Lactante

Con el fin de obtener los antígenos virales necesarios para la prueba de hemaglutinación y de inhibición de la hemaglutinación, se extrajeron los antígenos empleando el método de la acetona-sacarosa de *Clarke y Casals*.

A los ratones congelados a – 80 °C se le extrajeron los cerebritos, se pesaron, se transfirieron a un homogenizador, y se agregó 4 volúmenes de sacarosa al 8,5% por cada gramo de peso. Se aplicó 3 ciclos de homogenización de 1 minuto cada uno, dejando un tiempo de descanso entre ciclo y ciclo. Se midió el volumen de homogenato con una inyectora de vidrio ajustada a una aguja N° 18 y se transfirió rápidamente hacia un *beaker* de vidrio con 20 volúmenes de acetona por gramo de peso de cerebro. Durante la primera

extracción, se agitó constantemente con una varilla de vidrio durante 1 hora, cuidando de que no se formaran grumos, y después con una trampa de vacío se extrajo toda la acetona, cuidando de no tomar parte del homogenato. Luego se realizó una segunda extracción del antígeno, para lo cual se volvió a agregar 20 volúmenes de acetona y se repitió la operación de agitación, durante 1 hora. Posteriormente se transfirió toda la acetona hacia una trampa de vacío con hipoclorito de sodio. El homogenato tratado con acetona se transfirió hacia una botella de centrífuga de 250 ml que contenía en su interior perlas de vidrio y se conectó a una de las válvulas de un liofilizador a - 40 °C y una alta presión de vacío, esto fue con el fin de extraer toda la acetona que se encontraba presente en el homogenato. Posteriormente se agregaron 4 volúmenes de buffer borato salino pH 9, se agitó bien y se dejó a 4 °C durante la noche, para rehidratar el homogenato. Al día siguiente se centrifugó a 10000 rpm durante 30 min, se alicuotó en volúmenes de 1 ml y se conservó a - 70 °C hasta ser usado en el experimento de Hemaglutinación y de Inhibición de la hemaglutinación.

VI.8.- Prueba de Hemaglutinación

Con la finalidad de corroborar la presencia de antígeno hemaglutinante extraído previamente, se aplicó la técnica de Hemaglutinación, siguiendo el procedimiento descrito por *Clarke y Casals (1958)*.

Preparación de la suspensión celular

Se empleó sangre de Ganso macho. Se extrajeron 8,5 ml de sangre de la yugular del ganso con una inyectadota que contenía 1,5 ml de solución de Acido Cítrico-Dextrosa (ACD). Se filtraron en una maya de gasa. Se lavó la sangre 3 veces con Veronal-Gelatina-Dextrosa (DGV), centrifugándose a la vez a 1000 x g durante 15 min. Se preparó una suspensión de glóbulos rojos al 25% para el tratamiento de los sueros y al 8% para el revelado tanto de la prueba de Hemaglutinación como de la prueba de Inhibición de la Hemaglutinación. Se

diluyó 1/24 la suspensión de glóbulos rojos al 8% en solución A+B, que se emplea para ajustar el pH.

Prueba de Hemaglutinación (Titulación de Hemaglutininas)

Se hidrataron los antígenos liofilizados y se mantuvo a 4 °C por al menos 1 hora, pero preferiblemente durante la noche. Se preparó una dilución 1/10 en BABS al 0,4% pH 9 (Solución de Borato Salino-Albúmina al 0,4%, pH 9), del antígeno. Se mantuvo a 4 °C. Se preparó una dilución de antígeno que contuviera entre 4 a 8 unidades hemaglutinantes en un volumen de 0,025 ml. Se agregaron 100 µl de la dilución de antígeno al primer pozo y 50 µl de BABS al 0,4% pH 9 en el resto de los pozos. Se diluyó de forma seriada el antígeno en un factor de 2, hasta el pozo 7 en placas de 96 pozuelos. Se agregaron 50 µl de suspensión de glóbulos rojos al 8% diluida 1/24 en buffer fosfato. Se agitaron las placas. Se dejaron reposar durante 30 min a temperatura ambiente y se leyeron los patrones de aglutinación, los cuales se observaron por la formación de una capa delgada de células, eventualmente distribuida.

VI.9.- Prueba de Inhibición de la Hemaglutinación

Con el propósito de titular los anticuerpos totales anti-dengue y anti-fiebre amarilla, principalmente el tipo IgG, que se encontraban presentes en las muestras de suero de pacientes, se aplicó la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación siguiendo el procedimiento descrito por *Clarke y Casals (1958)*.

Tratamiento del Suero

Se preparó una dilución 1/10 de la muestra de suero usando caolín al 25% en BBS pH 9, como diluyente (el caolín sirve como removedor de inhibidores inespecíficos de la hemaglutinación). Se agitó vigorosamente la mezcla. Se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 min y se agitó a intervalos de 5 a 10 min. Se centrifugó a 1400 x g durante 10 min. Se agregó 25 µl de la suspensión de glóbulos rojos al 25% en DGV a cada tubo con mezcla suero-caolín (para remover las hemaglutininas naturales (*Weingartl y col., 2002*)). Se mantuvo a 4 °C durante 20 min con agitación ocasional cada 5 min. Se centrifugó a 500 x g durante 5 min.

Prueba de Inhibición de la Hemaglutinación

Se agregaron 25 µl de BABS al 0,4% a partir del pozo 2 hasta el 11 en la placa de 96 pozos. Se agregó 25 µl de suero diluido 1/10 en los pozos 1, 2 y 12. Se diluyó el suero de forma seriada en un factor de 2, partiendo desde el pozo 2 hasta el 11. Se agregaron 25 µl de antígeno diluido que contenía de 4 a 8 unidades hemaglutinantes (UH), desde el pozo 1 hasta el 11. Se agitaron las placas. Se incubaron toda la noche a 4°C. Al día siguiente se reveló la prueba al agregar 25 µl de suspensión de glóbulos rojos al 8% diluida 1/24. Se agitaron las placas. Y luego se dejaron en reposo durante 30 min a temperatura ambiente. Se colocaron sobre una superficie blanca y se leyó la prueba.

El título de anticuerpos de la muestra de suero fue determinado como la dilución más alta en la cual se obtuvo inhibición completa de la aglutinación de eritrocitos de ganso por 8 UH del antígeno viral (*Weingartl y col., 2002*).

VI.10.- Estimación de sensibilidad y especificidad de la técnica PRNT tomando como referencia la técnica I.H

La sensibilidad de una prueba diagnóstica se define como la probabilidad que el resultado de la prueba sea positivo en una persona afectada por la enfermedad. Representa, pues, la fracción de verdaderos positivos. La sensibilidad expresada en tanto por ciento, representa el porcentaje de resultados positivos respecto del total de enfermos esto es el porcentaje de verdaderos positivos que se obtendrían al aplicar la prueba diagnóstica a los enfermos. Cuanto más sensible es una prueba diagnóstica menor es la probabilidad de obtener falsos negativos, por lo que un resultado negativo es bastante confiable y permite descartar la presencia de la enfermedad.

La Especificidad de la prueba diagnóstica se define como la probabilidad que el resultado de la prueba sea negativo en una persona sana, que no padece de la enfermedad. Así pues, la especificidad, expresada en tanto por ciento, representa el porcentaje de resultados negativos respecto del total de personas sanas, esto es, el porcentaje de verdaderos negativos al aplicar la prueba a personas sanas (Scielo. Sensibilidad y especificidad de los métodos diagnósticos convencionales de la caries oclusal según la evidencia científica disponible. [En línea]. 2002. Disponible desde: URL:http://www.scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1138-123x2002000600004&script=sci_arttext Consulta: 10/07/09).

Los porcentajes de los parámetros Sensibilidad y Especificidad para la técnica PRNT fue calculada tomando como referencia el número de muestras que resultaron positivas y las que resultaron negativas por la técnica I.H. Es decir comparándola con la I.H. Y aplicando la ecuación de % sensibilidad y % especificidad que aplica *Torres y col, 1998*.

Tabla.- 4. Distribución de los Positivos y negativos por I.H y PRNT

		I.H		
		Positivo	Negativo	Total
PRNT	Positivo	VP	FN	VP + FN
	Negativo	FP	VN	FP + VN
	Total	VP + FP	FN + VN	2 (VP + FN+ FP + VN)

$$\% \text{ Sensibilidad} = \text{VP} \times 100 / (\text{VP} + \text{FN})$$

$$\% \text{ Especificidad} = \text{VN} \times 100 / (\text{VN} + \text{FP})$$

Tomada de *Torres y col, 1998*

VI.11.- Análisis Estadísticos

VI.11.1.- Prueba Chi-Cuadrado (χ^2)

La independencia entre cada uno de los resultados obtenidos y los métodos empleados para su obtención se determinó a través del análisis de los datos por tablas de contingencia de dos vías tomando como nivel de significación de la prueba la probabilidad del 95% y la cual se comparó con la probabilidad que el valor Chi-cuadrado se encuentre dentro de este intervalo de confianza.

VI.11.2.- Análisis de Residuales Estandarizados para una tabla de contingencia de dos vías para estimación de sensibilidad y especificidad de las técnicas PRNT e I.H

Con relación a la estimación de la sensibilidad y especificidad de la PRNT y la I.H, se aplicó un análisis de residuales estandarizados.

La finalidad de este estudio era obtener de manera preliminar el nivel que presentan cada uno de los parámetros antes mencionados para ambas técnicas.

Los resultados para las muestras positivas representaban la sensibilidad y los resultados para las muestras negativas representaban la especificidad.

Los Residuales Estandarizados para muestras positivas y negativas, fueron comparados con los valores críticos de una distribución normal (valor inferior = - 1,96 y valor superior = 1,96).

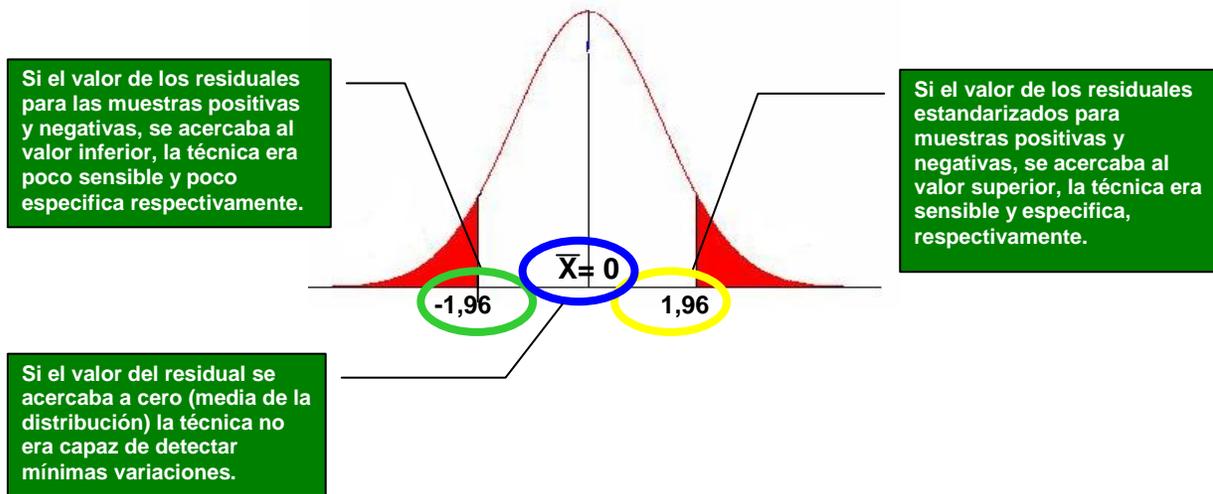


Figura.- 13. Distribución Normal Estandarizada

VII.- RESULTADOS

VII.1.- Amplificación de los cuatro serotipos del virus del Dengue en células C636/HT y del virus de la Fiebre Amarilla en células Vero E6

Una cepa tipo salvaje (local) de cada uno de los serotipos del virus del dengue (1, 2, 3 y 4) provenientes de aislados virales de muestras de suero de pacientes en fase aguda, fue amplificada en el sistema celular C636/HT, con el fin de usarlos en los experimentos de titulación viral y PRNT. A pesar de que no fue posible observar efecto citopático durante el cultivo viral, estas cepas, fueron seleccionadas como semillas virales apropiadas para el desarrollo de los experimentos de titulación y PRNT con los serotipos 1, 2, 3 y 4 del dengue, en base a los resultados confirmatorios de tipificación por técnicas moleculares tales como RT-PCR y secuenciación. Por lo que sirvieron de controles virales de estos experimentos.

Una vez amplificadas las semillas virales, se hizo a su vez, la confirmación de la presencia de cada uno de los cuatro serotipos en los sobrenadantes de los amplificados por la técnica de Inmunofluorescencia indirecta, empleando anticuerpos monoclonales tipo específicos. La amplificación de los serotipos 3 y 4 del Dengue fue realizada aun cuando no formaba parte de los objetivos de este estudio, con el fin de ser usados en posteriores estudios. En la *figura 14* se muestran los resultados de la inmunofluorescencia del primer y segundo pasaje de los cuatro serotipos del dengue. La intensidad de fluorescencia fue asignada según los criterios de positividad establecidos en el Laboratorio de Aislamiento Viral del INHRR.

El primer y el segundo pasaje del serotipo 1, presentaron una intensidad de fluorescencia de + 3 y + 4, respectivamente, esto quiere decir que en el segundo pasaje, con respecto al primero hubo un incremento de células fluorescentes, y se corresponde con lo observado en la *figura 14.A* y *14.B*. Para el primer y segundo pasaje del serotipo 2, la

intensidad de fluorescencia fue + 2 y + 4, respectivamente. En este caso, también se encontró un incremento en la cantidad de células fluorescentes (*figura 14.C y 14.D*). En el caso del primer y segundo pasaje del serotipo 3, la intensidad de fluorescencia en ambos fue + 4. Encontrándose que no hubo cambio en el número de células fluorescentes, es decir que desde el primer pasaje el virus fue capaz de infectar una cantidad grande de células (*figura 14.E y 14.F*). En cuanto al serotipo 4, en el segundo se obtuvo una intensidad de fluorescencia de + 4, con gran población de células marcadas (*figura 14.G*).

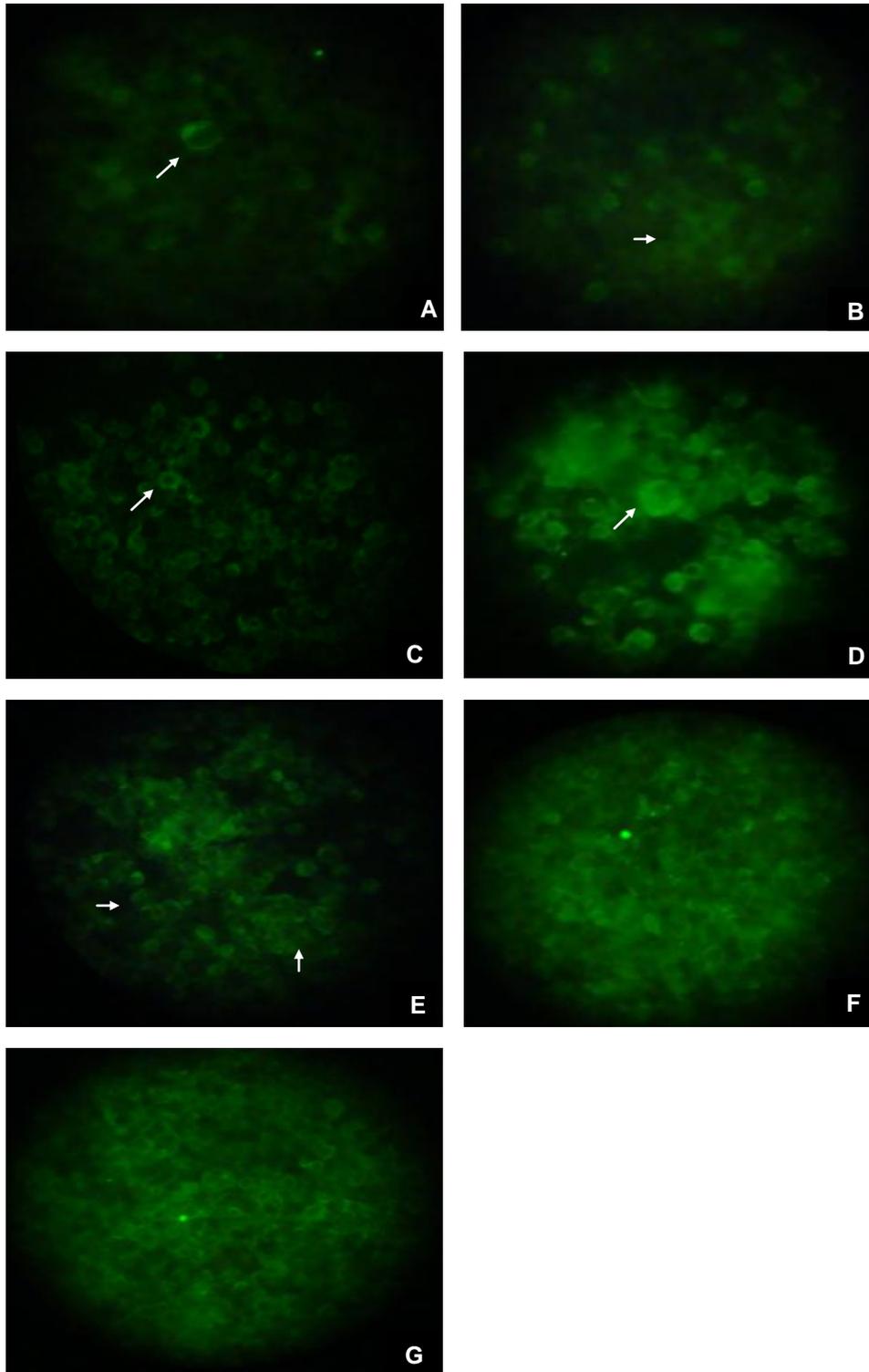


Figura. 14.- Inmunofluorescencia Indirecta de cepas locales de los cuatro serotipos del virus del dengue. A.- y B.- representan el primer y el segundo pasaje del serotipo 1, en células C636/HT, cuya intensidad de fluorescencia fue de +3 y +4, respectivamente. C.- y D.- representan el primer y segundo pasaje del serotipo 2, en células C636/HT y la intensidad de fluorescencia que presentó fue +2 y +4, respectivamente. E.- y F.- representan el primer y segundo pasaje del serotipo 3, en células C636/HT, ambos presentaron una intensidad de fluorescencia de +4. Las flechas señalan la fluorescencia de las células, nótese que se produjo un incremento en el número de células fluorescentes en el segundo pasaje para los serotipos 1 y 2. En el caso de los serotipos 3 y 4, la fluorescencia fue alta a partir del primer pasaje. G.- representa el segundo pasaje del serotipo 4 en células C636/HT con intensidad de fluorescencia +4. Aumento: 40X.

De igual modo se realizó la amplificación del virus de la fiebre amarilla cepa vacunal 17DD Fiocruz Bio-Manguinhos Brasil, pero en este caso empleando como sistema amplificador, las células Vero E6, del que se conoce es un virus vivo atenuado, por lo que sólo fue necesario realizar la confirmación de la presencia del virus en el sobrenadante del amplificado por Inmunofluorescencia indirecta. El nivel de fluorescencia de las células infectadas fue de + 4, observándose un elevado número de células marcadas (*figura 15*).

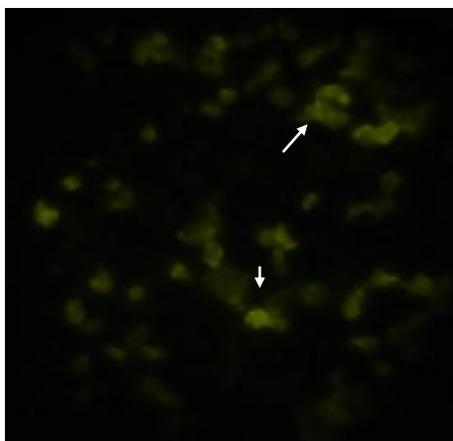


Figura. 15.- Inmunofluorescencia indirecta del virus de la Fiebre Amarilla cepa vacunal 17DD FIOCRUZ Bio-Manguinhos. Segundo pasaje del virus en células Vero E6. La intensidad de la fluorescencia observada en las células con el número de pasaje alcanzó un nivel de +3. Las flechas señalan un grupo de células fluorescentes. Aumento: 40X.

VII.2.-Titulación preliminar de la Fiebre Amarilla y de las cepas locales del Den-1, Den-3 y Den-4

Con el objetivo de seleccionar la línea celular que presentara susceptibilidad a la infección de los virus en estudio y de probar el medio *overlay*, apropiado para realizar el resto de las titulaciones y los experimentos de PRNT, se probó un ensayo de titulación de placas virales preliminar.

En principio se tituló de manera preliminar una cepa local de los serotipos 1, 3 y 4 del dengue, que fueron amplificadas y confirmadas por Inmunofluorescencia indirecta, con el objetivo de verificar la operatividad del método de plaqueo. A su vez fue probada también la

cepa vacunal de la fiebre amarilla. La Titulación del virus de la Fiebre Amarilla y de los serotipos del dengue, se realizó según la técnica de titulación viral por plaqueo convencional descrita en materiales y métodos, con ciertas modificaciones. Se probó la susceptibilidad que presentan las líneas celulares (Vero NK y Vero E6) a la replicación viral empleando dos métodos *overlay* (CMC al 1,5% y Agarosa al 0,5%). En el experimento donde se prueba la susceptibilidad que presentan las células Vero NK y Vero E6, a la infección por estos virus, en combinación con el método de la Carboximetilcelulosa, se observó que la primera es igualmente susceptible a la infección por estos virus (con la excepción del serotipo 1 del dengue, el cual había sido previamente descongelado, por lo que se inactivó), a diferencia de la línea celular Vero E6 que únicamente muestra susceptibilidad a la infección del virus de la fiebre amarilla (bajo el mismo método de la CMC al 1,5%). Esta respuesta no fue observada cuando se probó la susceptibilidad de las mismas líneas celulares a la infección viral de los virus en estudio en presencia del método de la Agarosa al 0,5%. El tamaño de las placas líticas del serotipo 4 fue de mayor tamaño que el del serotipo 3. Por su parte las placas virales del virus de la fiebre amarilla y las del serotipo 3 y 4 presentaron bordes bien definidos. El título viral para F.A, Den-3 y Den-4 fue de $1,2 \times 10^6$ ufp/ml, 4×10^4 ufp/ml y $7,5 \times 10^3$ ufp/ml, respectivamente (*tabla 5*). El título del serotipo 1 no se pudo determinar debido a que las placas se observaron difusas aunado al solapamiento que estas presentaron. En cuanto al experimento en el que se probaron dos métodos *overlay*, se encontró que el semilíquido, es decir el de la Carboximetilcelulosa al 1,5% fue más apropiado que el de la Agarosa al 0,5%, para el desarrollo del experimento de titulación viral y el de Neutralización por Reducción en Placa.

Tabla.- 5. Título Viral de Den-1, Den-3, Den-4 y F.A

Semillas virales	Vero E6 / Agarosa	Vero NK/ Agarosa	Vero E6/ CMC	Vero NK/ CMC
Den-1 P=2	--	--	--	--
Den-3 P=2	--	--	--	4x10 ⁴
Den-4 P=2	7x10 ²	7,5x10 ³	3x10 ³	4,5x10 ³
F.A C.V P=2	4x10 ⁶	6,5x10 ⁶	5x10 ⁵	5x10 ⁶

Se expresan los títulos virales en unidades formadoras de placas (ufp) por ml, de cada uno de los virus, obtenidos bajo los cuatro ensayos realizados.

VII.3.- Titulación por plaqueo del virus de la fiebre amarilla y de los serotipos 1 y 2 del dengue

Con el propósito de hallar la dilución viral que contenga de 15 a 20 unidades formadoras de placas (ufp), requeridos para el experimento de la PRNT, se titularon la cepa vacunal del virus de la fiebre amarilla y las cepa locales del serotipo 1 y 2 del dengue por la técnica de plaqueo convencional, empleando el método semi-líquido, tal y como se explicó en materiales y métodos.

VII.3.1.- Titulación por plaqueo del serotipo 1 del virus del dengue

El tiempo de incubación óptimo, que permitió visualizar en forma nítida, sin solapamiento, las placas virales producidas por este serotipo, fue de 8 días. El sobrenadante viral se diluyó en forma seriada diez veces cada vez y se obtuvo formación de placas virales hasta la dilución 10⁻⁵, como se muestra en la *figura 16.A*, con un título viral de 1,25x10⁵ ufp/ml (*tabla 6*). Se observó que a medida que incrementa la dilución viral, es decir que disminuye la concentración del virus, el número de ufp tendió a disminuir (*figura 16.B*). El número de réplicas (n=5) que se realizó para este experimento, permitió dilucidar que la dilución de virus que presentaba el número de ufp apropiado para trabajar en la PRNT, fue 1x10⁻², con 21 ufp, por ello se seleccionó esta dilución como dilución de trabajo para los experimentos de PRNT con Den-1.

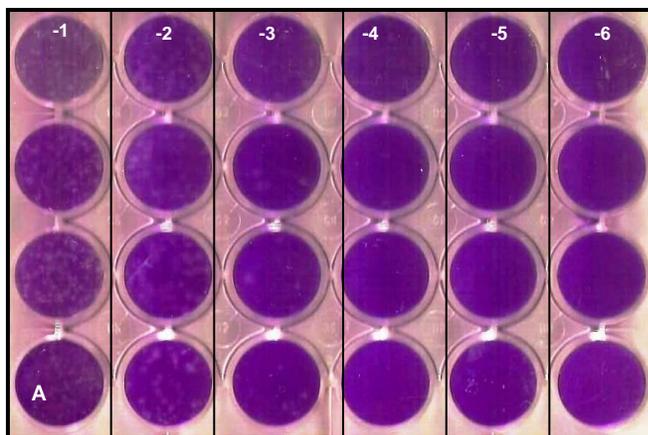


Tabla.- 6. Título del virus del Dengue-1 Cepa local P:2 C636/HT

Dilución viral	Log 10 recíproco dilución viral	ufp	Título (ufp/ml)	Log 10 ufp/ml
1×10^{-2}	2	21	$1,05 \times 10^4$	4,02
1×10^{-3}	3	11	$5,5 \times 10^4$	4,74
1×10^{-4}	4	2	$8,3 \times 10^4$	4,92
1×10^{-5}	5	0	$1,25 \times 10^4$	5,1

ufp: unidades formadoras de placa: Promedio de n=5

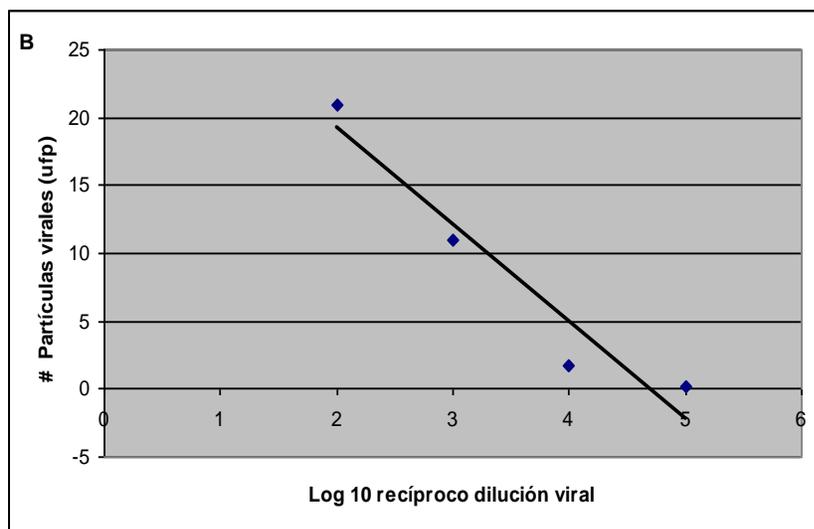


Figura.16. Titulación por plaqueo del virus Dengue-1, cepa local P:2 C636/HT. A.- Representa un experimento de titulación por plaqueo del serotipo 1 del dengue. Se probaron seis diluciones seriadas del virus, diez veces diluidas; obsérvese que las placas virales fueron visibles hasta la dilución 10^{-5} . B.- Número de partículas virales (ufp) vs Log 10 recíproco dilución viral. El número de ufp, tendieron a disminuir a medida que la dilución del sobrenadante viral incrementaba. n=5.

VII.3.2.- Titulación por plaqueo del serotipo 2 del virus del dengue

Se encontró que el período de incubación óptimo para observar mejor definidas las placas virales, es de 6 días. Las placas virales de este serotipo fueron pequeñas y presentaban bordes definidos. Los datos presentados en la *tabla 7* corresponden a la titulación entre las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} , para las cuales el número de ufp obtenido en una previa titulación fue de 41 y 11, respectivamente. Dado que el número de ufp promedio al cual se exponen los anticuerpos de la muestra de suero es 15 a 20, se realizó una búsqueda entre estas dos diluciones para hallar la dilución que contuviera una cantidad igual de ufp. Y de las diluciones probadas se seleccionó la 3×10^{-2} , debido a que dentro de las diluciones probadas, esta fue la que contuvo el número de ufp, necesario para llevar a cabo los experimentos de PRNT con Den-2. El número de ufp tendió a disminuir a medida que se incrementaban las diluciones virales (*figura 17.B*) y el título viral alcanzó un valor promedio de $4,25 \times 10^4$ ufp/ml en la dilución más alta 1×10^{-3} (*tabla 7*).

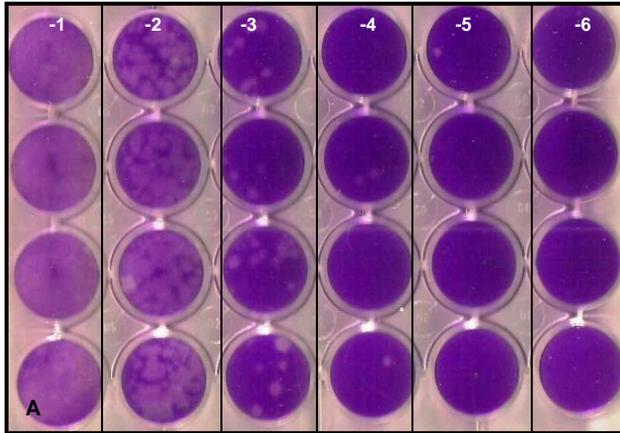


Tabla.- 7 Título del virus del Dengue-2 cepa local P:2 C636/HT

Dilución viral	Log 10 recíproco dilución viral	ufp	Título (ufp/ml)	Log 10 ufp/ml
1×10^{-2}	2	38	$1,9 \times 10^4$	4,3
2×10^{-2}	2,3	21	$2,1 \times 10^4$	4,3
3×10^{-2}	2,5	21	$4,1 \times 10^4$	4,6
4×10^{-2}	2,6	18	$2,63 \times 10^4$	4,4
5×10^{-2}	2,7	12	3×10^4	4,5
6×10^{-2}	2,8	12	$3,6 \times 10^4$	4,6
7×10^{-2}	2,85	18	$6,3 \times 10^4$	4,8
8×10^{-2}	2,9	9	$3,4 \times 10^4$	4,5
9×10^{-2}	2,95	8	$3,38 \times 10^4$	4,5
1×10^{-3}	3	9	$4,25 \times 10^4$	4,6

ufp: unidades formadoras de placa; Promedio de n=5

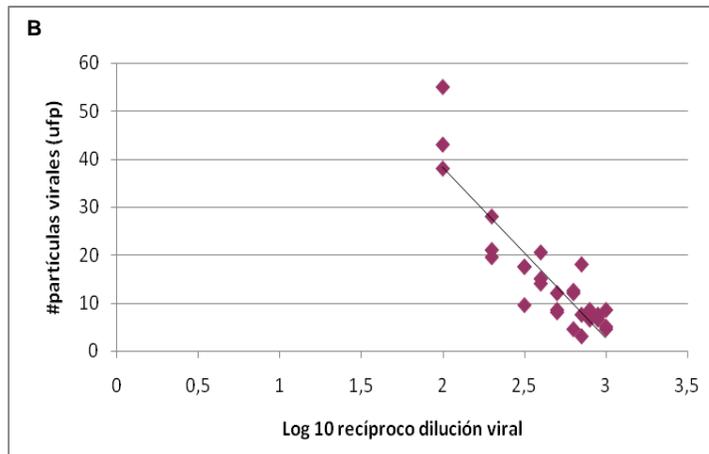
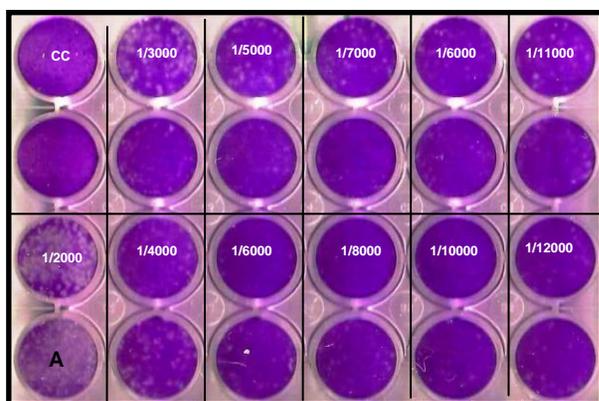


Figura.17. Titulación por plaqueo del virus Dengue-2, cepa local P:2 C636/HT. A.- Representa un experimento de titulación por plaqueo del serotipo 2 del dengue, obsérvese que las placas virales son visibles hasta la dilución 10^{-6} . B.- Número de partículas virales (ufp) vs Log 10 recíproco dilución viral. Se observa que las ufp tendieron a disminuir como consecuencia de una mayor dilución del sobrenadante viral. n=5.

VII.3.3.- Titulación por plaqueo del virus de la Fiebre amarilla cepa vacunal 17DD

El título viral promedio obtenido fue de $1,4 \times 10^6$ ufp/ml (*tabla 8*) este fue encontrado en la mayor dilución viral estudiada ($1,1 \times 10^{-4}$). Las placas fueron fácilmente observables y contables hasta esta dilución viral, presentando bordes poco definidos pero claramente distinguibles unas de otras. Al igual que los serotipos 1 y 2 del virus del dengue se encontró que el número de ufp tendía a disminuir al hacer más alta la dilución viral (*figura 18.B*).

Tabla.- 8. Título del virus de la Fiebre Amarilla cepa vacunal 17DD Friocruz-Brasil.



Dilución viral	Log 10 recíproco dilución viral	ufp	Título (ufp/ml)	Log 10 ufp/ml
3×10^{-3}	3,47	79	$1,19 \times 10^6$	6,07
4×10^{-3}	3,6	61	$1,22 \times 10^6$	6,08
5×10^{-3}	3,69	44	$1,1 \times 10^6$	6,04
6×10^{-3}	3,77	40	$1,2 \times 10^6$	6,07
7×10^{-3}	3,8	41	$1,4 \times 10^6$	6,2
8×10^{-3}	3,9	33	$1,32 \times 10^6$	6,12
9×10^{-3}	3,95	32	$1,44 \times 10^6$	6,2
1×10^{-4}	4	30	$1,5 \times 10^6$	6,2
$1,1 \times 10^{-4}$	4,04	26	$1,4 \times 10^6$	6,1

ufp: unidades formadoras de placa; Promedio de n=5

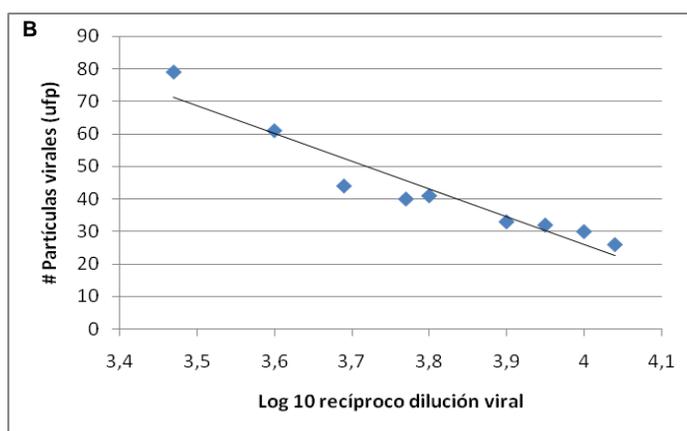


Figura.18. Titulación por plaqueo del virus de la fiebre amarilla. A.- Representa un experimento de titulación por plaqueo de la cepa vacunal 17DD del virus de la fiebre amarilla, en el que se empleó diluciones seriadas entre las diluciones 1×10^{-3} a $1,2 \times 10^{-4}$; obsérvese que las placas virales son visibles hasta la dilución $1,2 \times 10^{-4}$. **B.-** Número de partículas virales (ufp) vs Log 10 recíproco dilución viral. Se observa una tendencia a disminuir el número de partículas virales como consecuencia de una mayor dilución del sobrenadante viral. n=5.

La dilución viral $1,1 \times 10^{-4}$, fue seleccionada como dilución de trabajo para llevar a cabo el experimento de PRNT para fiebre amarilla, debido a que entre las diluciones virales estudiadas, ésta fue la que contuvo un número de ufp que se acercaba más al número de ufp recomendado para realizar dicho experimento.

VII.4.- Resultados de la inoculación de los cuatro serotipos del virus del dengue en cerebro de ratón lactante

A fin de producir antígenos virales de los serotipos 1 y 2 del virus del dengue, para ser empleados en los experimentos de Inhibición de la Hemaglutinación, se inoculó una alícuota de suspensión viral en cerebro de ratones neonatos de la especie *Mus musculus*.

Se realizó un total de 7 pases continuos en siete meses de cada uno de los serotipos del virus del dengue, hasta lograr la activación de los mismos. La prolongación del tiempo en la activación de cada uno de los serotipos se debió a que inicialmente se estuvo empleando otras cepas virales que no lograron adaptarse exitosamente al sistema de amplificación (cerebro de ratones neonatos), y a su vez, a que las madres de los ratones neonatos, adoptaban un comportamiento agresivo que finalizaba en canibalismo, una vez inoculados los mismos. Este comportamiento fue observado repetidas veces, retrasando el cumplimiento del objetivo final. De los cuatro serotipos inoculados sólo fue posible activar las cepas locales de los serotipos 1 y 2. Los otros dos serotipos llegaron a alcanzar el pase siete y aún no fueron capaces de producir el efecto neurológico en los neonatos.

VII. 4.1.- Prueba de Hemaglutinación del antígeno extraído

Con miras en la medición del título de aglutininas presentes en el antígeno extraído a través del método de la acetona - sacarosa, se empleo la prueba de hemaglutinación.

Luego de realizar la extracción exitosa de cada antígeno, se probó la actividad hemaglutinante de cada uno de ellos, y se observó un buen patrón de hemaglutinación con títulos de antígeno elevados, de 81920 para Den-1 y 40960 para Den-2, lo cual reveló que el tratamiento crucial del homogenato con acetona fue llevado a cabo en las condiciones óptimas, ya que en caso contrario el antígeno no hubiera rendido para probar todas las muestras o en un caso extremo hubiera sido necesario volver a activar la cepa en ratón. Al presentar una alta concentración de antígeno viral hemaglutinante, se contaba con suficiente antígeno para realizar un número grande de réplicas de los experimentos de Inhibición de la hemaglutinación. Que las mismas por razones de tiempo no fueron hechas. Este banco de antígeno viral, que se produjo será empleado en posteriores experimentos y quedara en uso en el laboratorio de inmunoserología viral para ser empleado en los ensayos rutinarios de ELISA e Inhibición de la Hemaglutinación.

VII.5.- Análisis de sensibilidad y especificidad de las técnicas serológicas en estudio

VI.5.1.- Pares de muestras de suero de pacientes

Con la finalidad de hallar una estimación preliminar de los parámetros sensibilidad y especificidad para la técnica PRNT con los tres virus en estudio, se compara esta técnica con la I.H, tomando como referencia el número de muestras que por IH resultaron positivas y negativas con cada grupo de muestras. Para ello, primero se halló el número de Verdaderos Positivos (VP), Falsos Negativos (FN), Verdaderos Negativos (VN) y Falsos Positivos (FP), que se indica en la *tabla 4*, ubicada en la sección de materiales y métodos. Con estos datos se calculó el porcentaje de sensibilidad y especificidad de la PRNT con cada grupo de

muestras, enfrentadas a cada uno de los virus empleados, según la ecuación descrita en la misma sección.

En este caso específico se estimó con el grupo de pares de muestras de suero (cada una constituida por una muestra en fase aguda y otra en fase convaleciente de la enfermedad). En la *tabla 9* se muestran el número de muestras que resultaron positivas y negativas de anticuerpos por PRNT de F.A, Den-1 y Den-2, tomando como referencia la I.H. Por su parte, la *tabla 10* presenta el porcentaje de sensibilidad y especificidad, inherente a la técnica, con este grupo de muestras.

$$\% \text{ Sensibilidad} = \frac{VP \times 100}{(VP+FN)}$$

$$\% \text{ Especificidad} = \frac{VN \times 100}{(VN+FP)}$$

Tabla.-9. Distribución de positivos y negativos por I.H y PRNT de F.A, Den-1 y Den-2 con pares de muestras de suero de pacientes

		I.H F.A		Total
		Positivo	Negativo	
PRNT F.A	Positivo	8 (VP)	4 (FN)	12
	Negativo	0 (FP)	1 (VN)	1
Total		8	5	13

		I.H Den-1		Total
		Positivo	Negativo	
PRNT Den-1	Positivo	10 (VP)	1 (FN)	11
	Negativo	0 (FP)	1 (VN)	1
Total		10	2	12

		I.H Den-2		total
		Positivo	Negativo	
PRNT Den-2	Positivo	7 (VP)	3 (FN)	10
	Negativo	0 (FP)	3 (VN)	3
total		7	6	13

Tabla.-10. Sensibilidad y especificidad de la PRNT con pares de muestras de suero de pacientes

Método	Positivos	Negativos	Sensibilidad	Especificidad
PRNT F.A	8	5	66,60%	100%
PRNT Den-1	10	2	90,90%	100%
PRNT Den-2	7	6	70%	100%

En principio con los tres virus, la técnica presentó un 100% de especificidad y la sensibilidad fue variable con cada virus. El virus con el que presentó la más alta sensibilidad fue con Den-1, y estuvo alrededor de 90,9%. Por lo que, con estos resultados se podría inferir que la PRNT tendió a ser más específica y poco sensible.

Adicionalmente se determinó si existe independencia entre los resultados obtenidos (positivos y negativos) y los métodos empleados, aplicando el estadístico Chi-cuadrado, para lo que se asignó un nivel de confianza de $\alpha = 0,05$ y se planteó la hipótesis alternativa: existe relación entre los resultados y las técnicas a través de las cuales se determinan estos resultados. Un resultado era positivo si el título de anticuerpo era mayor o igual a 10 y era negativo si el título de anticuerpos era menor de 10.

Se realizó una tabla de contingencia de dos vías y se comparó el valor de Chi-cuadrado esperado (χ^2_{esp}) con la probabilidad que se estableció como nivel de confianza de la prueba ($\chi^2_{\text{esp}} = 0,111$; $\alpha = 0,05$), y se encontró que los resultados se producen netamente al azar, es decir que no hay relación entre los resultados obtenidos y los métodos aplicados (tabla 11), indicando a su vez, que los resultados sólo dependen de las condiciones que presenten las muestras que se analicen.

Tabla.-11. Datos positivos y negativos para las técnicas en estudio con pares de muestras de suero de pacientes

Método	Positivos	Negativos
I.H F.A	0,43564149	1,403733693
PRNT FA	0,37198101	1,198605488
I.H Den-1	0,37053842	1,193957115
PRNT Den-1	0,07743497	0,249512671
I.H Den-2	0,00062823	0,002024291
PRNT Den-2	0,86004467	2,771255061

$\chi^2_{\text{calculado}} = 8,935357108$; $\chi^2_{\text{esperado}} = 0,111670493$; $\alpha = 0,05$

A su vez, se realizó la estimación de la sensibilidad y especificidad, esta vez para ambas técnicas (PRNT y I.H), aplicando un análisis de residuales estandarizados (R.E) para tablas de contingencia de dos vías, partiendo del supuesto que los datos estaban distribuidos normalmente, y planteando como hipótesis alternativa que la PRNT es más específica y sensible que la I.H para detectar anticuerpos contra los virus en estudio. Aquí ninguna de las dos técnicas se usa como referencia solo se comparan sus resultados por el método estadístico antes mencionado.

Los resultados para las muestras positivas representaban la sensibilidad y los resultados para las muestras negativas representaban la especificidad.

Los valores de los residuales estandarizados fueron comparados con los valores críticos de una distribución normal (valor inferior = -1,96 y valor superior = 1,96) (*figura 13*). Los cuales indicaban cuándo la técnica era menos y cuándo era más sensible y específica, esto es:

- Si el valor del residual estandarizado para las muestras positivas y negativas, se acercaba al valor crítico inferior (-1,96), la técnica era poco sensible y poco específica, respectivamente, con tendencia a ser insensible e inespecífica
- Si el valor del residual se acercaba al valor crítico superior (1,96) la técnica era más sensible y más específica, respectivamente.
- Si el valor del residual era mayor que el valor crítico superior la técnica tenía altísima sensibilidad y altísima especificidad.
- Si el valor del residual era menor que el valor crítico inferior o se acercaba a cero (la media de la distribución) entonces la técnica no era capaz de detectar mínimas variaciones.

En la *tabla 12* se aprecian los valores de R.E del número de muestras positivas y negativas que resultaron por la técnica I.H y por la PRNT, con el grupo de muestras de suero

pareadas con Den-1, Den-2 y F.A y en *la figura 19* se muestra el perfil de los residuales estandarizados con este grupo de muestras para cada una de las técnicas, el cual describe gráficamente la tendencia de estos valores. La técnica I.H para Den-1 y F.A y la PRNT para Den-1, con los resultados positivos, presentaron valores de R.E que tendieron a acercarse al valor superior, y con los resultados negativos tendieron a acercarse al valor inferior, lo cual quiere decir que estas técnicas tendieron a ser mas sensibles que específicas, con este grupo de muestras. Mientras que la PRNT para Den-2 y F.A al igual que la I.H para Den-2 con los resultados positivos presentaron valores de R.E cercanos al valor inferior y con los resultados negativos, estas técnicas presentaron valores de R.E que tendieron a acercarse al valor superior, es decir, tendieron a ser menos sensibles y mas específicas.

Tabla.-12. Residual estandarizado de datos con pares de muestras de suero de pacientes

Método	Positivos	Negativos	Sup	Inf
I.H F.A	0,6786275	-1,218173652	1,96	-1,96
PRNT FA	-0,62708618	1,125654134	1,96	-1,96
I.H Den-1	0,62586903	-1,123469286	1,96	-1,96
PRNT Den-1	0,28611156	-0,513585959	1,96	-1,96
I.H Den-2	0,02577066	-0,046259759	1,96	-1,96
PRNT Den-2	-0,9535146	1,711611081	1,96	-1,96

Sup: Valor superior de la distribución normal; **Inf:** valor inferior de la distribución normal

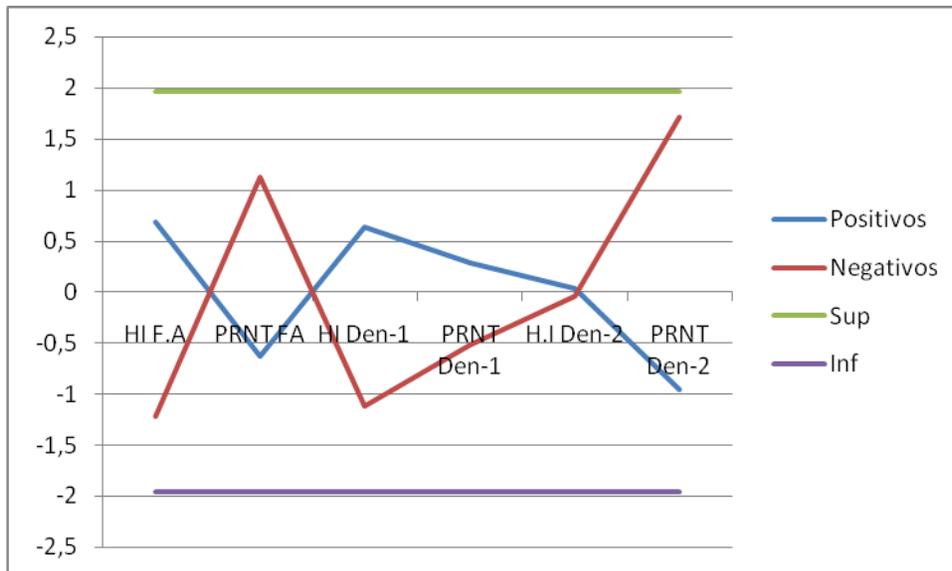


Figura.- 19. Perfil de residuales estandarizados para probar la sensibilidad y especificidad, respecto a la detección de anticuerpos a través de las técnicas PRNT e I.H con pares de muestras de suero de pacientes

VII.5.2.- Muestras de suero de pacientes con anticuerpos IgM positivos para DEN y F.A

Al igual que con el grupo de pares de muestras de suero de pacientes, se estimó la sensibilidad y especificidad de la PRNT con el grupo de muestras de suero de pacientes positivas a IgM anti-dengue y anti-fiebre amarilla, aplicando la ecuación de *Torres y col (1998)* ubicada en la sección de materiales y métodos, tomando como referencia el número de muestras que por I.H resultaron positivas y negativas. Para ello, también se hallaron el número de VP, FN, VN, FN, que se muestran en la *tabla 13*, con la PRNT de F.A, Den-1 y Den-2.

Tabla.-13. Distribución de positivos y negativos por I.H y PRNT de Den-1, F.A y Den-2 con muestras de suero de pacientes con IgM positiva anti-dengue y anti-fiebre amarilla

		I.H Den-1		Total
		Positivo	Negativo	
PRNT Den-1	Positivo	8 (VP)	0 (FN)	8
	Negativo	0 (FP)	1 (VN)	1
Total		8	1	9

		I.H F.A		Total
		Positivo	Negativo	
PRNT F.A	Positivo	7 (VP)	3 (FN)	10
	Negativo	0 (FP)	1 (VN)	1
Total		7	4	11

		I.H Den-2		Total
		Positivo	Negativo	
PRNT Den-2	Positivo	9 (VP)	0 (FN)	9
	Negativo	0 (FP)	2 (VN)	2
Total		9	2	11

Tabla.-14. Sensibilidad y especificidad de la PRNT con muestras de suero de pacientes positivas a IgM anti-dengue y anti-fiebre amarilla

Método	Positivos	Negativos	Sensibilidad	Especificidad
PRNT F.A	7	4	70%	100%
PRNT Den-1	8	1	100%	100%
PRNT Den-2	9	2	100%	100%

Los resultados de la estimación se muestran en la *tabla 14*. Se encontró que la PRNT fue 100% específica con los tres virus, y fue 100% sensible a la detección de anticuerpos contra el virus del dengue-1 y dengue-2, y presentó un 70% de sensibilidad hacia los anticuerpos contra F.A.

En cuanto a la independencia que tienen los resultados obtenidos con este grupo de muestras de las técnicas en estudio (PRNT e I.H), puede apreciarse en la *tabla 15*, que no hay una dependencia o estrecha relación entre los resultados obtenidos y alguno de las dos técnicas ($\chi^2_{\text{esp}} = 0,589$; $\alpha = 0,05$), es decir que los resultados obtenidos sólo van a depender de la exposición o no a los virus en estudio, que haya tenido el individuo del cual proviene la muestra. El que la técnica detecte o no, la presencia de anticuerpos contra el virus, solo va a requerir la condición anterior.

Tabla.-15. Datos positivos y negativos para las técnicas en estudio con muestras de suero de pacientes positivas a IgM anti-dengue y anti-fiebre amarilla

Método	Positivos	Negativos
I.H F.A	0,1000805	0,4640096
PRNT FA	0,46371687	2,14996001
I.H Den-1	0,04810598	0,22303682
PRNT Den-1	0,04810598	0,22303682
I.H Den-2	0,00025875	0,00119968
PRNT Den-2	0,00025875	0,00119968

$$\chi^2_{\text{calculado}} = 3,72296445; \chi^2_{\text{esperado}} = 0,589949513; \alpha = 0,05$$

La estimación de la sensibilidad y la especificidad por análisis de R.E con este grupo de muestras, se encuentra reflejada en la *tabla 16* y el perfil de estos residuales se encuentran graficados en la *figura 20*. Con los resultados positivos, las técnicas que tendieron a mostrar valores de R.E cercanos al valor superior de la distribución Z, fueron la

I.H de F.A y Den-1 y la PRNT de Den-1, y con los resultados negativos, las que mostraron valores cercanos al superior fueron la PRNT de F.A y Den-2 y la I.H de Den-2, es decir que, la PRNT con el grupo de muestras de suero de pacientes positivos a IgM anti-dengue y anti-fiebre amarilla, tendió a ser específica sólo para F.A y Den-2, y sensible sólo para Den-1.

Tabla.-16. Residual estandarizado de datos con muestras de suero de pacientes positivas a IgM anti-dengue y anti-fiebre amarilla

Método	Positivos	Negativos	Sup	Inf
I.H F.A	0,32745856	-0,3932809	1,96	-1,96
PRNT FA	-0,39315682	0,8465538	1,96	-1,96
I.H Den-1	0,12663067	-0,27266391	1,96	-1,96
PRNT Den-1	0,12663067	-0,27266391	1,96	-1,96
I.H Den-2	-0,00928717	0,01999733	1,96	-1,96
PRNT Den-2	-0,00928717	0,01999733	1,96	-1,96

Sup: Valor superior de la distribución normal; **Inf:** valor inferior de la distribución normal

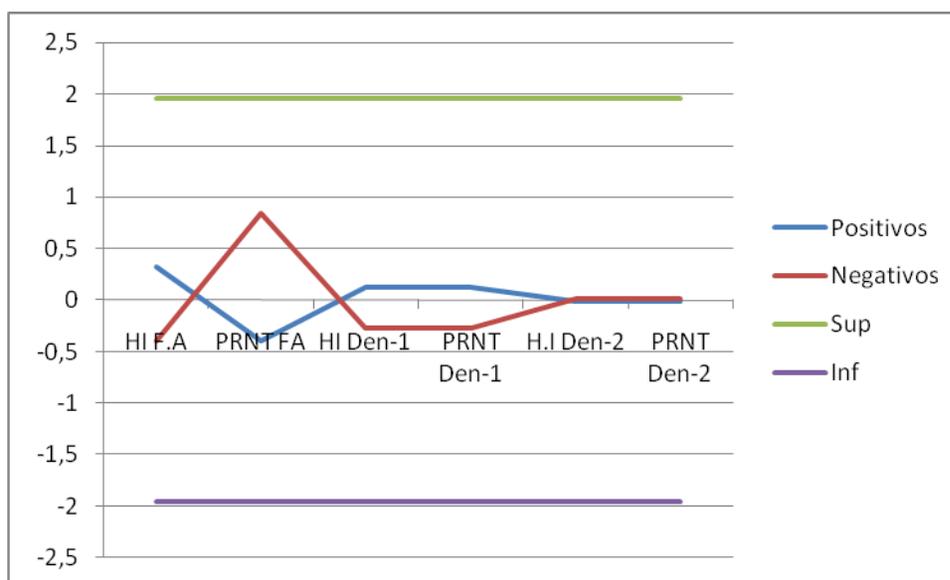


Figura.- 20. Perfil de residuales estandarizados para probar la sensibilidad y especificidad, respecto a la detección de anticuerpos a través de las técnicas PRNT e I.H con muestras de suero pacientes positivas a anticuerpos IgM anti-dengue y anti-F.A

VII.5.3.- Muestras de suero de pacientes en fase aguda

Con este grupo de muestras también fueron calculados los porcentajes de sensibilidad y especificidad para la técnica PRNT tomando como referencia la técnica I.H. El número de VP, FN, VN y FP con los que se calcularon dichos porcentajes, para la técnica PRNT con los tres virus en estudio, se muestran en la *tabla 17*. En la *tabla 18* se encuentran insertados los porcentajes de sensibilidad y especificidad de la PRNT con cada uno de los virus en estudio, obtenidos con el grupo de muestras de suero en fase aguda. El mayor nivel de sensibilidad de la PRNT fue observado con Den-1 con un 100 %, mientras que el menor nivel fue observado con F.A, con un 87,5%. La especificidad con los tres virus fue elevada y estuvo alrededor del 100%.

Tabla.-17. Distribución de positivos y negativos por I.H y PRNT de F.A, Den-1, Den-2 con muestras de suero de pacientes en fase aguda

		I.H F.A		
		Positivo	Negativo	total
PRNT F.A	Positivo	7 (VP)	5 (FN)	12
	Negativo	0 (FP)	1 (VN)	1
total		7	6	13

		I.H Den-1		
		Positivo	Negativo	total
PRNT Den-1	Positivo	11 (VP)	0 (FN)	11
	Negativo	0 (FP)	1 (VN)	1
total		11	1	12

		I.H Den-2		
		Positivo	Negativo	total
PRNT Den-2	Positivo	10(VP)	1(FN)	11
	Negativo	0(FP)	2(VN)	2
total		10	3	13

Tabla.-18. Sensibilidad y especificidad de la PRNT con muestras de suero de pacientes en fase aguda

Método	Positivos	Negativos	Sensibilidad	Especificidad
PRNT F.A	7	6	87,50%	100%
PRNT Den-1	11	1	100%	100%
PRNT Den-2	10	3	90,90%	100%

Con relación al supuesto de independencia, se encontró que no hubo relación entre los resultados obtenidos y las técnicas, con un nivel de significancia de $\alpha = 0,0569$ (*tabla 19*). Aquí nuevamente se aplica una interpretación similar a la de los resultados anteriores.

Tabla.- 19. Datos positivos y negativos para las técnicas en estudio con muestras de suero de pacientes en fase aguda

Método	Positivos	Negativos
I.H F.A	0,18342693	0,81231926
PRNT FA	1,22561055	5,427703875
I.H Den-1	1,22561055	0,662907268
PRNT Den-1	0,14968874	0,662907268
I.H Den-2	0,14968874	0,065066512
PRNT Den-2	0,01469244	0,1529786

$$\chi^2_{\text{calculado}} = 10,7326007; \chi^2_{\text{esperado}} = 0,05694719; \alpha = 0,05$$

Los resultados mostrados en la *tabla 20*, expresan el análisis de residuales estandarizados para los resultados de las técnicas PRNT e I.H con los virus Den-1, Den-2 y F.A. El perfil de estos residuales estandarizados se encuentra describiendo el nivel de sensibilidad y especificidad de las técnicas antes mencionadas en la *figura 21*. En cuanto a la estimación de la sensibilidad (resultados positivos) a través de este método estadístico, la PRNT con Den-1 fue la única que presentó R.E cercanos al valor superior de la distribución Z. En cuanto a la estimación de la especificidad (resultados negativos), las que presentaron valores de R.E cercanos al superior, fueron la PRNT de F.A y Den-2, del resto, todas estuvieron próximas al valor inferior. Lo que se traduce en alta sensibilidad de la PRNT solo para Den-1 y en elevada especificidad solo para F.A y Den-2.

Tabla.- 20. Residual estandarizado de datos con muestras de suero de pacientes en fase aguda

Método	Positivos	Negativos	Sup	Inf
I.H F.A	0,44035039	-0,926680907	1,96	-1,96
PRNT FA	-1,13826422	2,395382721	1,96	-1,96
I.H Den-1	0,39779691	-0,837130625	1,96	-1,96
PRNT Den-1	0,39779691	-0,837130625	1,96	-1,96
I.H Den-2	0,12462747	-0,262268181	1,96	-1,96
PRNT Den-2	-0,19109545	0,402144544	1,96	-1,96

Sup: Valor superior de la distribución normal; **Inf:** valor inferior de la distribución normal

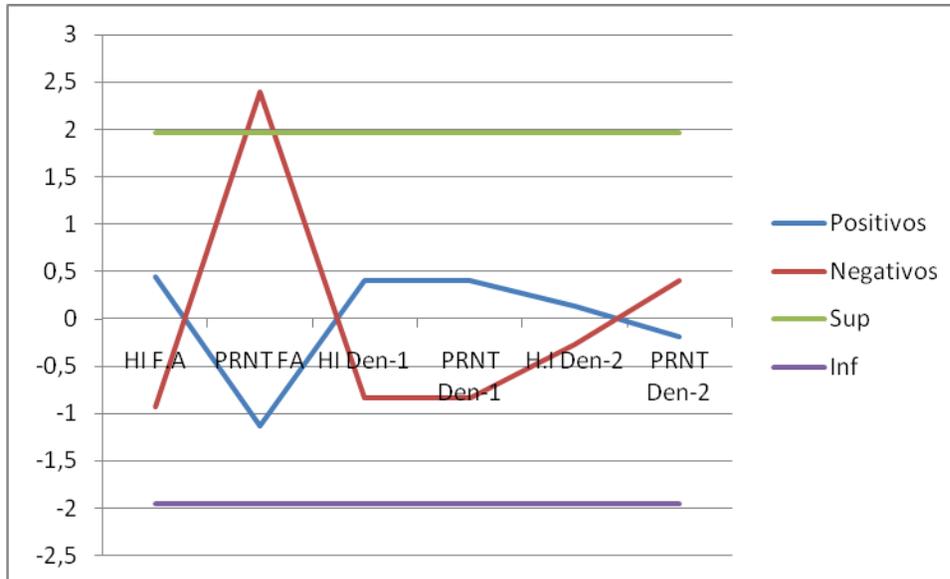


Figura.- 21. Perfil de residuales estandarizados para probar la sensibilidad y especificidad, respecto a la detección de anticuerpos a través de las técnicas PRNT e I.H con muestras de pacientes en fase aguda

VII.5.4.- Muestras de suero de pacientes en fase convaleciente

La distribución de positivos y negativos por I.H y PRNT, se muestra en la *tabla 21* Por su parte, en la *tabla 22* se muestran los resultados de la estimación de los parámetros sensibilidad y especificidad de la PRNT, tomando como referencia la técnica I.H.

Con este grupo de muestras de suero, a diferencia de los otros grupos, la especificidad varió de acuerdo al virus empleado. Por ejemplo, con F.A, presentó la más alta especificidad (100%), y con Den-1 presentó la menor especificidad (66,6%). En cuanto a la sensibilidad fue igual tanto con Den-1 como con Den-2 (100%), mientras que con F.A fue sensible en un 75%.

Tabla.-21. Distribución de positivos y negativos por I.H y PRNT de F.A, Den-1, Den-2 con muestras de suero de pacientes en fase convaleciente

		I.H F.A		
		Positivo	Negativo	total
PRNT	Positivo	6(VP)	2(FN)	8
F.A	Negativo	0(FP)	1(VN)	1
total		6	3	9

		I.H Den-1		
		Positivo	Negativo	total
PRNT	Positivo	5 (VP)	0 (FN)	5
Den-1	Negativo	1 (FP)	2 (VN)	3
total		6	2	8

		I.H Den-2		
		Positivo	Negativo	total
PRNT	Positivo	4(VP)	0(FN)	4
Den-2	Negativo	1(FP)	3(VN)	4
total		5	3	8

Tabla.- 22. Sensibilidad y especificidad de la PRNT con muestras de suero de pacientes en fase convaleciente

Método	Positivos	Negativos	Sensibilidad	Especificidad
PRNT F.A	6	3	75%	100%
PRNT Den-1	6	1	100%	66,66%
PRNT Den-2	5	2	100%	75%

En cuanto a la determinación de la independencia, se encontró que los resultados fueron obtenidos meramente al azar, las técnicas no tuvieron influencia sobre los resultados ($\chi^2_{\text{esp}} = 0,721$; $\alpha = 0,05$) (tabla 23).

Tabla.- 23. Datos positivos y negativos para las técnicas en estudios con muestras de suero de pacientes en fase convaleciente

Método	Positivos	Negativos
I.H F.A	0,27308895	0,773752013
PRNT FA	0,06393862	0,18115942
I.H Den-1	0,00584582	0,016563147
PRNT Den-1	0,13189624	0,373706004
I.H Den-2	0,26635002	0,754658385
PRNT Den-2	0,00584582	0,016563147

$$\chi^2_{\text{calculado}} = 2,86336757; \chi^2_{\text{esperado}} = 0,7210407; \alpha = 0,05$$

Tabla.- 24. Residual estandarizado de datos con muestras de suero de pacientes en fase convaleciente

Método	Positivos	Negativos	Sup	Inf
I.H F.A	0,54808561	-0,922565561	1,96	-1,96
PRNT FA	-0,26520272	0,446402691	1,96	-1,96
I.H Den-1	-0,08018976	0,134979486	1,96	-1,96
PRNT Den-1	0,38090138	-0,64115256	1,96	-1,96
I.H Den-2	0,54128091	0,911111532	1,96	-1,96
PRNT Den-2	-0,08018976	0,134979486	1,96	-1,96

Sup: Valor superior de la distribución normal, Inf: Valor inferior de la distribución normal

Según los resultados mostrados en la tabla 24 y en la figura 22, en relación a la sensibilidad (detección de muestras positivas), las únicas técnicas que presentaron valores de R.E que se aproximan al valor superior de la distribución Z, fueron la I.H de F.A y la PRNT de Den-1, del resto, presentaron valores que tendieron a acercarse al valor inferior. En cuanto a la especificidad (resultados negativos), las únicas técnicas que presentaron R.E cercanos al valor superior, fueron PRNT de F.A, I.H de Den-1, I.H de Den-2 y PRNT de Den-2. En pocas palabras la PRNT tendió a ser sensible, sólo para Den-1 y a ser específica para

F.A y Den-2. En general, con estos resultados se podría inferir que tanto la PRNT como la I.H fueron más específicas que sensibles.

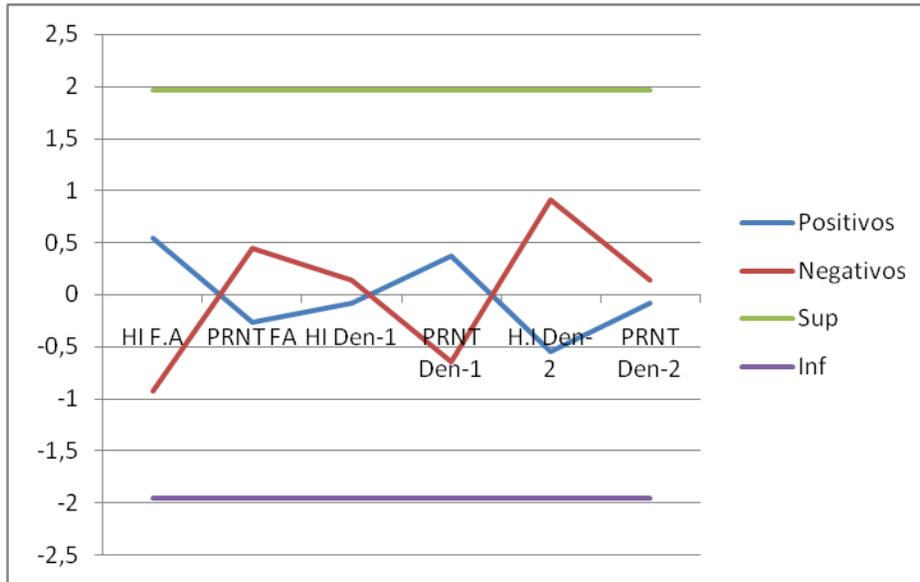


Figura.- 22. Perfil de residuales estandarizados para probar la sensibilidad y especificidad, respecto a la detección de anticuerpos a través de las técnicas PRNT e I.H con muestras de pacientes en fase convaleciente

Finalmente la estimación de la sensibilidad y la especificidad para la PRNT con los cuatro grupos de muestras, aplicando la ecuación de *Torres y col (1998)*, al igual que por análisis de residuales estandarizados, resultó indicar que la PRNT podría ser más específica que sensible. Mientras que la estimación de estos parámetros por análisis de residuales estandarizados en el caso de la I.H, resultó indicar que la misma tendió a ser más sensible que específica.

Con estos resultados se acepta la hipótesis alternativa que la PRNT es más específica que la I.H, pero se rechaza la hipótesis alternativa que es más sensible que la I.H.

VII.6.- Resultados serológicos para un grupo de pares de muestras de suero de pacientes

Con el objetivo de detectar infecciones primarias e infecciones secundarias de dengue y de discriminar entre infecciones por dengue de infecciones por fiebre amarilla, así como también de corroborar o conjeturar los resultados obtenidos por análisis de residuales estandarizados para la estimación de la sensibilidad y la especificidad, se llevó a cabo un análisis de los resultados serológicos con cada grupo de muestras de suero.

En las *tablas 25, 26 y 27*, se resumen los resultados serológicos obtenidos para el grupo de pares de muestras de suero de pacientes con los virus Den-1, Den-2 y F.A, respectivamente y en las *figuras 23, 24 y 25*, se muestran Log 10 del recíproco de la dilución de anticuerpos o el Log 10 del título de anticuerpos para cada muestra contra cada uno de los virus antes mencionados; la línea negra indica el nivel mínimo de anticuerpos detectado por ambas técnicas.

Todos los pares de muestras presentaron anticuerpos IgM anti-dengue, a diferencia de lo encontrado para el control positivo, como se muestra en las *tablas 25 y 26*. Por PRNT a excepción del par de muestras 26 que no reaccionó frente a Den-2, todos presentaron anticuerpos anti-dengue hacia los dos serotipos. El nivel de anticuerpos hacia cada uno de los serotipos varió dependiendo de la secuencia de infección del individuo con estos dos serotipos y del tiempo que tardó en tomarse la muestra una vez iniciado los síntomas. En algunos casos como el del par de muestras 48, no se detectó cambio en el nivel de anticuerpos en la muestra en fase convaleciente en relación a la aguda.

En general el nivel de anticuerpos para la mayoría de los pares de muestras fue alto en fase aguda y aún mayor en fase convaleciente. Por I.H algunos pares de muestras tuvieron niveles de anticuerpos similares a los observados por PRNT en las muestra en fase convaleciente, pero los niveles de anticuerpos que presentaron las muestras en fase aguda

por I.H, fue en algunos casos más bajos y en otros más altos a los observados por PRNT para estos serotipos (figuras 23 y 24). Lo que concuerda con la estimación de sensibilidad obtenida por Análisis de Residuales Estandarizados para la técnica I.H.

Tabla.- 25. Cuadro comparativo de resultados de la PRNT y de la I.H para Den-1 con pares de muestras de suero de pacientes

Nº muestra	IgM Den	IgM F.A	Título I.H Den-1	Log 10 título I.H Den-1	Título PRNT 70 Den-1	Log 10 título PRNT Den-1	Vacuna	D.I.E
1 A	-	-	40	1,6	10	1		4
1' C	+	+	10240	4	640	2,8		14
16 A	-	-	40	1,6	160	2,2	FA	4
16' C	+	+/-	5120	3,7	10240	4	FA	48
26 A	+	-	640	2,8	640	2,8	FA	5
26' C	-	-	10240	4	10240	4	FA	
47 A	+	-	10240	4	640	2,8		4
47' C	+	-	10240	4	2560	3,4		14
48 A	+	+	10240	4	2560	3,4		1
48' C	+	+	10240	4	10240	4		20
50 D+	-	-	640	2,8	2560	3,4		3
10C-	-	-	10	1	10	1		5

I.H: Inhibición de la Hemaglutinación; **PRNT:** Prueba de neutralización por Reducción en Placas; **F.A:** fiebre amarilla; **Den:** Dengue; **D.I.E:** Días desde el inicio de la enfermedad; **50 D+:** Control positivo de dengue (consiste de una muestra de suero de paciente en fase aguda con PCR positivo para Den-3); **10 C - :** Control negativo para dengue 1, dengue 2 y fiebre amarilla; **A:** Agudo; **C:** Convaleciente. ' : Muestras de suero en fase convaleciente.

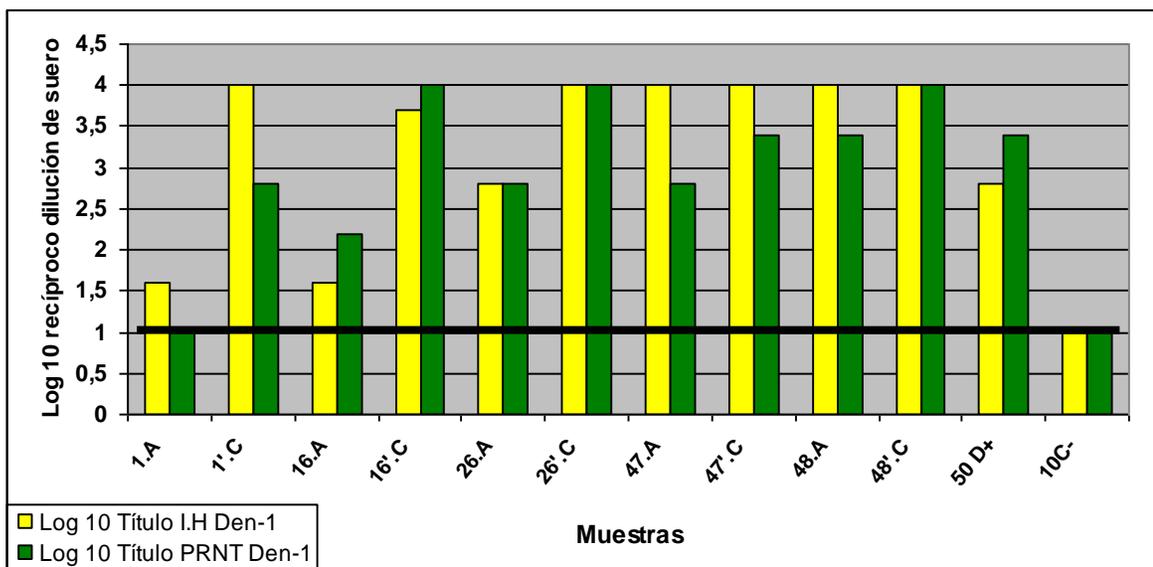


Figura.- 23. Comparación del Log 10 recíproco de la dilución de suero, obtenida con pares de muestras de suero de pacientes enfrentadas a Den-1 por las dos técnicas serológicas en estudio; 50 D+: Control positivo de dengue (consiste de una muestra de suero de paciente en fase aguda con PCR positivo para Den-3); **10 C - :** Control negativo para dengue 1, dengue 2 y fiebre amarilla. Se muestran los resultados de un experimento típico.

Tabla.- 26. Cuadro comparativo de resultados de la PRNT y de la I.H para Den-2 con pares de muestras de suero de pacientes

Nº muestra	IgM Den	IgM F.A	Título I.H Den-2	Log 10 título I.H Den-2	Título PRNT 70 Den-2	Log 10 título PRNT Den-2	Vacuna	D.I.E
1 A	-	-	10	1	10	1		4
1' C	+	+	10240	4	2560	3,4		14
16 A	-	-	20	1,6	10	1	FA	4
16' C	+	+/-	2560	3,4	160	2,2	FA	48
26 A	+	-	320	2,5	10	1	FA	5
26' C	-	-	5120	3,7	10	1	FA	
47 A	+	-	5120	4	640	2,8		4
47' C	+	-	10240	4	10240	4		14
48 A	+	+	10240	4	2560	3,4		1
48' C	+	+	10240	4	2560	3,4		20
50 D+	-	-	1280	3,1	10	1		3
10C-	-	-	10	1	10	1		5

I.H: Inhibición de la Hemaglutinación; **PRNT:** Prueba de neutralización por Reducción en Placas; **F.A:** fiebre amarilla; **Den:** Dengue; **D.I.E:** Días desde el inicio de la enfermedad; **50 D+:** Control positivo de dengue (consiste de una muestra de suero de paciente en fase aguda con PCR positivo para Den-3); **10 C - :** Control negativo para dengue 1, dengue 2 y fiebre amarilla; **A:** Agudo; **C:** Convaleciente. ' : Muestras de suero en fase convaleciente.

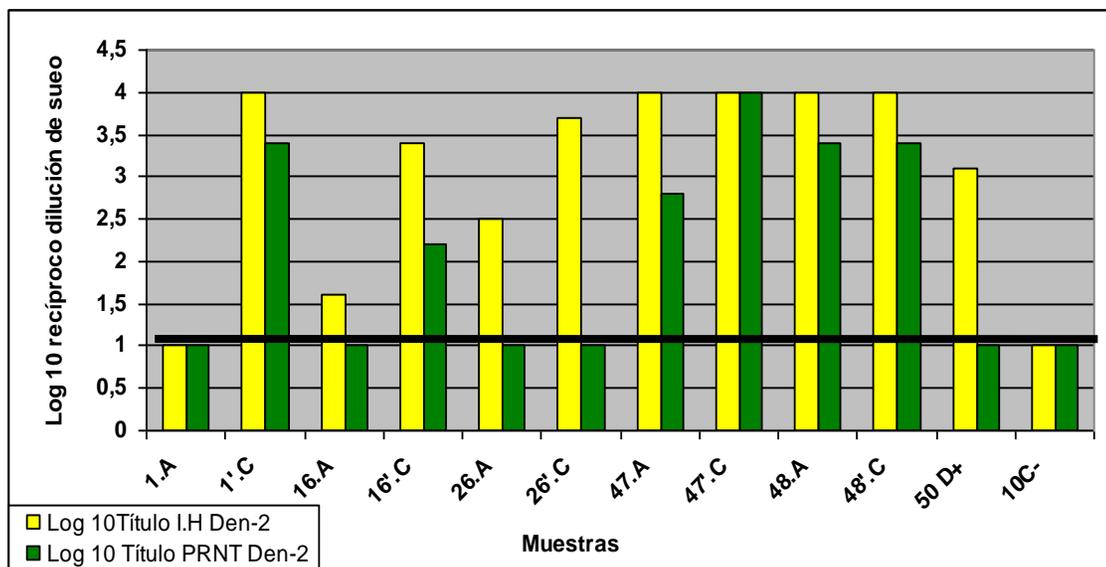


Figura.- 24. Comparación del Log 10 recíproco de la dilución de suero, obtenida con pares muestras de suero de pacientes enfrentadas a Den-2 por las dos técnicas serológicas en estudio; **50 D+:** Control positivo de dengue (consiste de una muestra de suero de paciente en fase aguda con PCR positivo para Den-3); **10 C - :** Control negativo para dengue 1, dengue 2 y fiebre amarilla. Se muestran los resultados de un experimento típico.

Por su parte, los pares de muestras 16 y 26 en ausencia de anticuerpos IgM anti-fiebre amarilla, presentaron por PRNT una seroconversión a fiebre amarilla, esto es, pasar de un nivel de anticuerpos ≤ 10 en la muestra en fase aguda a un nivel 4 veces mayor en la muestra en fase convaleciente. El nivel de anticuerpos encontrado hacia este virus se corresponde con el que presenta por PRNT el control positivo para F.A. El resto de los pares de muestras no presentaron por PRNT, anticuerpos anti-fiebre amarilla en concordancia con la ausencia de anticuerpos IgM, aunque hubo algunos pares de muestras en los que al menos una de las dos muestras fue positiva a la IgM de fiebre amarilla. Por I.H todos los pares de muestras presentaron títulos de anticuerpos altos anti-fiebre amarilla a partir de la muestra en fase aguda. Siendo por PRNT que se logró discriminar, entre los casos que posiblemente, correspondían a infecciones por fiebre amarilla.

Tabla.- 27. Cuadro comparativo de resultados de la PRNT y de la I.H para F.A con pares de muestras de suero de pacientes

Nº muestra	IgM Den	IgM F.A	Título I.H F.A	Log 10 título I.H F.A	Título PRNT 70 F.A	Log 10 título PRNT F.A	Vacuna	D.I.E
1 A	-	-	320	2,5	10	1		4
1' C	+	+	10240	4	10	1		14
16 A	-	-	80	1,9	10	1	FA	4
16' C	+	+/-	10240	4	640	2,8	FA	48
26 A	+	-	1280	3,1	10	1	FA	5
26' C	-	-	10240	4	640	2,8	FA	
47 A	+	-	10240	4	10	1		4
47' C	+	-	10240	4	10	1		14
48 A	+	+	10240	4	10	1		1
48' C	+	+	10240	4	10	1		20
3 F.A +	-	+	2560	3,4	640	2,8	F.A	1
10C-	-	-	10	1	10	1		5

I.H: Inhibición de la Hemaglutinación; **PRNT:** Prueba de neutralización por Reducción en Placas; **F.A:** fiebre amarilla; **Den:** Dengue; **D.I.E:** Días desde el inicio de la enfermedad; **3 F.A+:** Control positivo de fiebre amarilla (consiste en una muestra de suero de paciente vacunado contra fiebre amarilla y positivo para F,A por serología); **10 C - :** Control negativo para dengue 1, dengue 2 y fiebre amarilla; **A:** Agudo; **C:** Convaleciente. **'**: Muestras de suero en fase convaleciente.

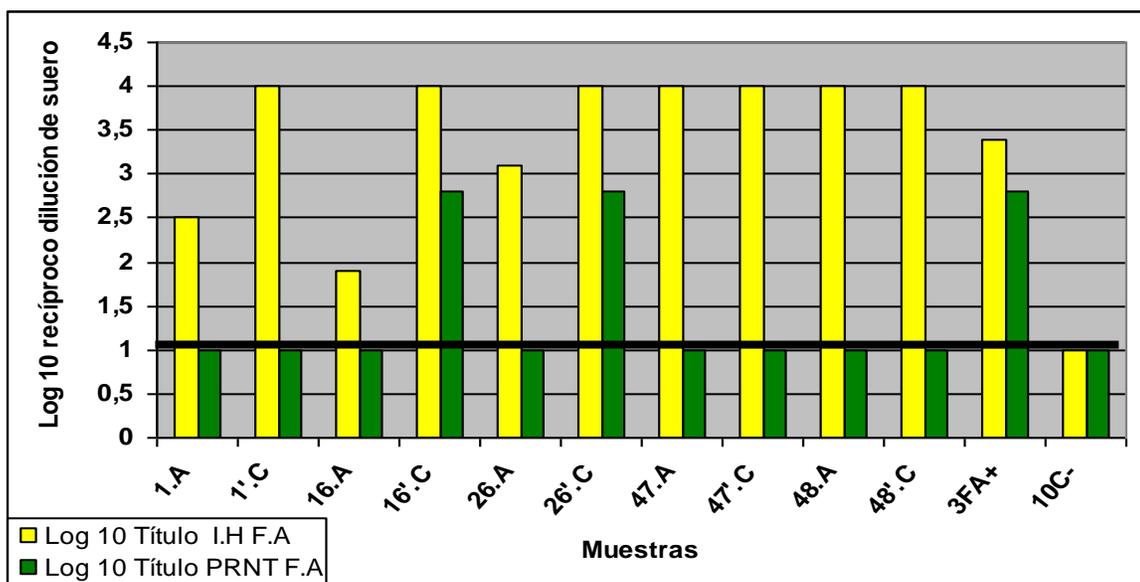


Figura.- 25. Comparación del Log 10 recíproco de la dilución de suero obtenida con pares muestras de suero de pacientes enfrentadas a F.A por las dos técnicas serológicas en estudio; **3 F.A+:** Control positivo de fiebre amarilla (consiste en una muestra de suero de paciente vacunado contra fiebre amarilla y positivo para F,A por serología); **10 C - :** Control negativo para dengue 1, dengue 2 y fiebre amarilla. Se muestran los resultados de un experimento típico.

VII.7.- Resultados serológicos para un grupo de muestras de suero de pacientes con anticuerpos IgM anti-dengue y anti-fiebre amarilla

En las *tablas 28, 29 y 30* se resumen los resultados serológicos que por I.H y PRNT se hallaron con el grupo de muestras de suero de pacientes con IgM positivo anti-dengue y anti-fiebre amarilla; en las *figuras 26, 27 y 28* se encuentran graficados los Logs 10 del recíproco de la dilución de suero, en la cual se halló en el caso de la técnica I.H, inhibición completa de la aglutinación y en el caso de la PRNT, un 70% de reducción en el número de placas virales.

Con respecto al dengue, todas las muestras tuvieron títulos elevados de anticuerpos hacia los dos serotipos virales por PRNT. El control positivo por PRNT presentó anticuerpos solamente hacia Den-1. A diferencia de ello, las muestras respondieron a los dos serotipos en evaluación, con niveles de anticuerpos similares a los del control positivo para dengue (*figuras 26 y 27*). Por I.H todas las muestras resultaron tener anticuerpos hacia los dos serotipos del dengue, tan o más elevados como el control positivo. Lo que concuerda con la estimación de sensibilidad obtenida por Análisis de Residuales Estandarizados para la técnica I.H.

Tabla.- 28. Cuadro comparativo de resultados de la PRNT y de la I.H para Den-1 con muestras de suero de pacientes con IgM positivos anti-dengue y anti-fiebre amarilla

Nº muestra	IgM Den	IgM F.A	Título I.H Den-1	Log 10 título I.H Den-1	Título PRNT 70 Den-1	Log 10 título PRNT Den-1	Vacuna	D.I.E
1'	+	+	10240	4	640	2,8		14
1''	+	+/-	10240	4	NR	NR		8
8	+	+	10240	4	10240	4	FA	6
12	+	+	320	2,5	2560	3,4	FA	6
15	+	+	10240	4	10240	4		14
48	+	+	10240	4	2560	3,4		1
48'	+	+	10240	4	10240	4		20
49	+	NR	5120	3,7	10240	4		21
51	+	+	10240	4	10240	4		
50 D+	-	NR	640	2,8	2560	3,4		3
10C-	-	-	10	1	10	1		5

I.H: Inhibición de la Hemaglutinación; **PRNT:** Prueba de neutralización por Reducción en Placas; **F.A:** fiebre amarilla; **Den:** Dengue; **D.I.E:** Días desde el inicio de la enfermedad; **50 D+:** Control positivo de dengue (consiste de una muestra de suero de paciente en fase aguda con PCR positivo para Den-3); **10 C - :** Control negativo para dengue 1, dengue 2 y fiebre amarilla. ' y '' :muestras de suero en fase convaleciente

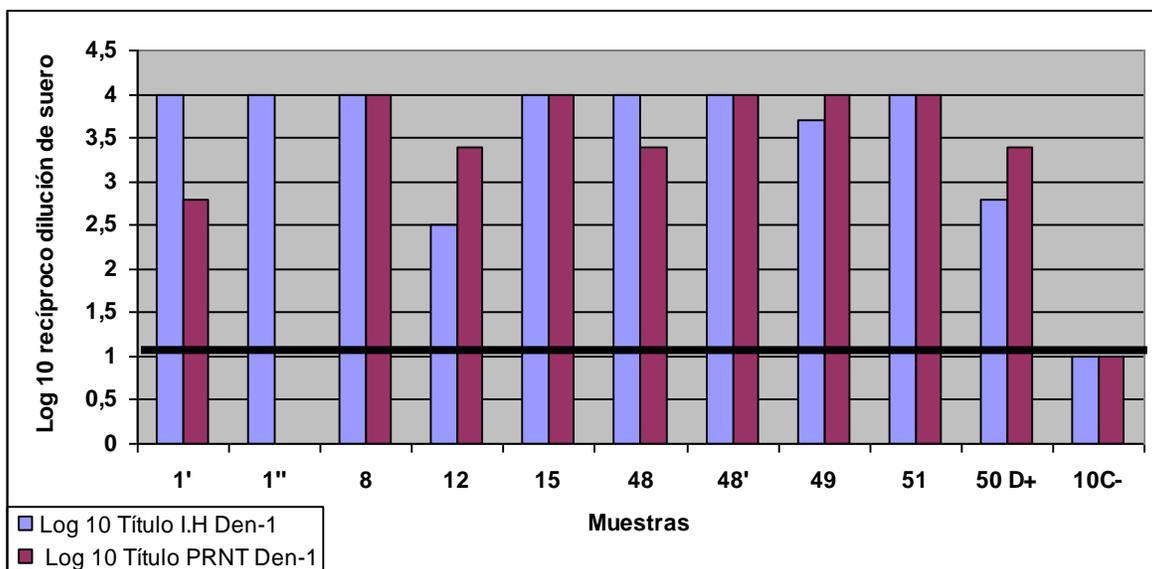


Figura.- 26. Comparación del Log 10 recíproco de la dilución de suero, obtenida con muestras de suero de pacientes con anticuerpos IgM positivos anti-dengue y anti-fiebre amarilla, enfrentadas a Den-1 por las dos técnicas serológicas en estudio; **50 D+:** Control positivo de dengue (consiste de una muestra de suero de paciente en fase aguda con PCR positivo para Den-3); **10 C - :** Control negativo para dengue 1, dengue 2 y fiebre amarilla. Se muestran los resultados de un experimento típico.

Tabla.- 29. Cuadro comparativo de resultados de la PRNT y de la I.H para Den-2 con muestras de suero de pacientes con IgM positivos anti-dengue y anti-fiebre amarilla

Nº muestra	IgM Den	IgM F.A	Título I.H Den-2	Log 10 título I.H Den-2	Título PRNT 70 Den-2	Log 10 título PRNT Den-2	Vacuna	D.I.E
1'	+	+	10240	4	2560	3,4		14
1''	+	+/-	10240	4	10240	4		8
8	+	+	10240	4	2560	3,4	FA	6
12	+	+	160	2,2	640	2,8	FA	6
15	+	+	5120	3,7	2560	3,4		14
48	+	+	10240	4	2560	3,43,4		1
48'	+	+	10240	4	2560	3,4		20
49	+	NR	10240	4	2560	3,4		21
51	+	+	5120	3,7	160	2,2		
50 D+	-	NR	1280	3,1	10	1		3
10C-	-	-	10	1	10	1		5

I.H: Inhibición de la Hemaglutinación; **PRNT:** Prueba de neutralización por Reducción en Placas; **F.A:** fiebre amarilla; **Den:** Dengue; **D.I.E:** Días desde el inicio de la enfermedad; **50 D+:** Control positivo de dengue (consiste de una muestra de suero de paciente en fase aguda con PCR positivo para Den-3); **10 C - :** Control negativo para dengue 1, dengue 2 y fiebre amarilla. ' y '' :muestras de suero en fase convaleciente

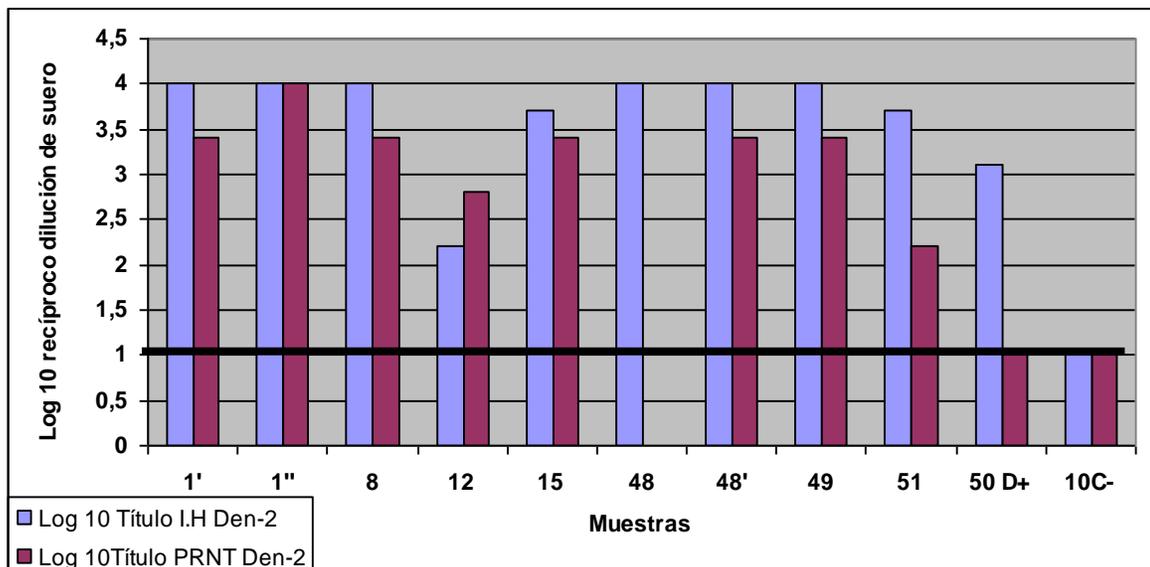


Figura.- 27. Comparación del Log 10 recíproco de la dilución de suero, obtenida con muestras de suero de pacientes con anticuerpos IgM positivos anti-dengue y anti-fiebre amarilla, enfrentadas a Den-2 por las dos técnicas serológicas en estudio; **50 D+:** Control positivo de dengue (consiste de una muestra de suero de paciente en fase aguda con PCR positivo para Den-3); **10 C - :** Control negativo para dengue 1, dengue 2 y fiebre amarilla. Se muestran los resultados de un experimento típico.

Por PRNT de F.A, las muestras 8 y 12 presentaron títulos elevados de anticuerpos, similares a los del control positivo, el resto de las muestras no reaccionaron. Por I.H todas las muestras presentaron títulos elevados de anticuerpos hacia este virus (*figura 28*). Lo cual se corresponde con los resultados de especificidad para PRNT y sensibilidad para I.H, obtenidos con este grupo de muestras por Análisis de Residuales Estandarizados.

Tabla.- 30. Cuadro comparativo de resultados de la PRNT y de la I.H para F.A con muestras de suero de pacientes con IgM positivos anti-dengue y anti-fiebre amarilla

Nº muestra	IgM Den	IgM F.A	Título I.H F.A	Log 10 título I.H F.A	Título PRNT 70 F.A	Log 10 título PRNT F.A	Vacuna	D.I.E
1'	+	+	4	4	10	1		14
1''	+	+/-	4	4	10	1		8
8	+	+	4	4	2560	3,4	FA	6
12	+	+	4	4	640	2,8	FA	6
15	+	+	4	4	10	1		14
48	+	+	4	4	10	1		1
48'	+	+	4	4	10	1		20
49	+	NR	3,4	3,4	10	1		21
51	+	+	4	4	10	1		
3 F.A+	-	+	3,4	3,4	640	2,8	F.A	1
10C-	-	-	1	1	10	1		5

I.H: Inhibición de la Hemaglutinación; **PRNT:** Prueba de neutralización por Reducción en Placas; **F.A:** fiebre amarilla; **Den:** Dengue; **D.I.E:** Días desde el inicio de la enfermedad; **3 F.A+:** Control positivo de fiebre amarilla (consiste en una muestra de suero de paciente vacunado contra fiebre amarilla y positivo para F,A por serología); **10 C - :** Control negativo para dengue 1, dengue 2 y fiebre amarilla. ' y '' :muestras de suero en fase convaleciente

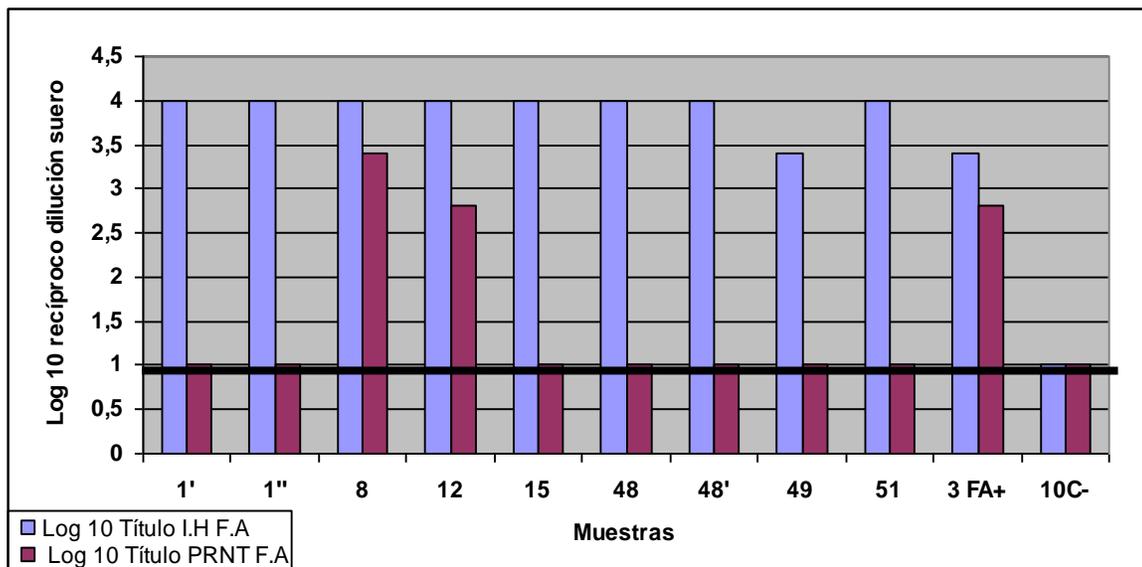


Figura.- 28. Comparación del Log 10 recíproco de la dilución de suero, obtenida con muestras de suero de pacientes con anticuerpos IgM positivos anti-dengue y anti-fiebre amarilla, enfrentadas a F.A por las dos técnicas serológicas en estudio; **3 F.A+:** Control positivo de fiebre amarilla (consiste en una muestra de suero de paciente vacunado contra fiebre amarilla y positivo para F,A por serología); **10 C - :** Control negativo para dengue 1, dengue 2 y fiebre amarilla. Se muestran los resultados de un experimento típico.

VII.8.- Resultados serológicos de muestras de suero de pacientes en fase aguda

Los resultados serológicos que se obtuvieron con este grupo de muestras se reunieron en las *tablas 31, 32 y 33* y las diferencias entre el título de anticuerpos obtenidos por las dos técnicas en estudio contra cada uno de los virus, con este grupo de muestras, se representan en las *figuras 29, 30 y 31*, como el Log 10 del recíproco de la dilución de suero.

En todas las muestras se encontró presencia de anticuerpos contra los dos serotipos del dengue, por PRNT, similares a los del control positivo por esta técnica. Igualmente por I.H todas las muestras presentaron títulos elevados de anticuerpos para los dos serotipos del dengue (*figuras 29 y 30*), y por ELISA IgM de captura, todas a excepción de la muestra 9 fueron positivas a la IgM anti-dengue (*tablas 31 y 32*).

En la mayoría de los casos la I.H detectó niveles de anticuerpos superiores a los que fue capaz de detectar la PRNT. Encontrándose una correspondencia con los resultados de sensibilidad obtenidos previamente por Análisis de Residuales Estandarizados para esta técnica.

Tabla.- 31. Cuadro comparativo de resultados de la PRNT y de la I.H para Den-1 con muestras de suero de pacientes en fase aguda

Nº muestra	IgM Den	IgM F.A	Título I.H Den-1	Log 10 Título I.H Den-1	Título PRNT 70 Den-1	Log 10 Título PRNT Den-1	Vacuna	D.I.E
9	-	+	160	2,2	160	2,2	FA	1
13	+	-	5120	3,7	10240	4		5
11	+	-	1280	3,1	2560	3,4	FA	1
18	+	-	10240	4	2560	3,4		5
20	+	-	10240	4	640	2,8	FA	5
21	+	-	640	2,8	2560	3,4		4
22	+	-	10240	4	640	2,8		4
24	+	-	10240	4	10240	4		5
30	+	-	1280	3,1	2560	3,4		4
39	+	-	1280	3,1	10240	4	FA	5
50 D+	-		640	2,8	2560	3,4		3
10C-	-	-	10	1	10	1		5

I.H: Inhibición de la Hemaglutinación; **PRNT:** Prueba de neutralización por Reducción en Placas; **Den:** Dengue; **F.A:** fiebre amarilla; **D.I.E:** Días desde el inicio de la enfermedad; **50D+:** Control positivo de dengue (consiste de una muestra de suero de paciente en fase aguda con PCR positivo para Den-3); **10 C-:** Control negativo para dengue 1, dengue 2 y fiebre amarilla

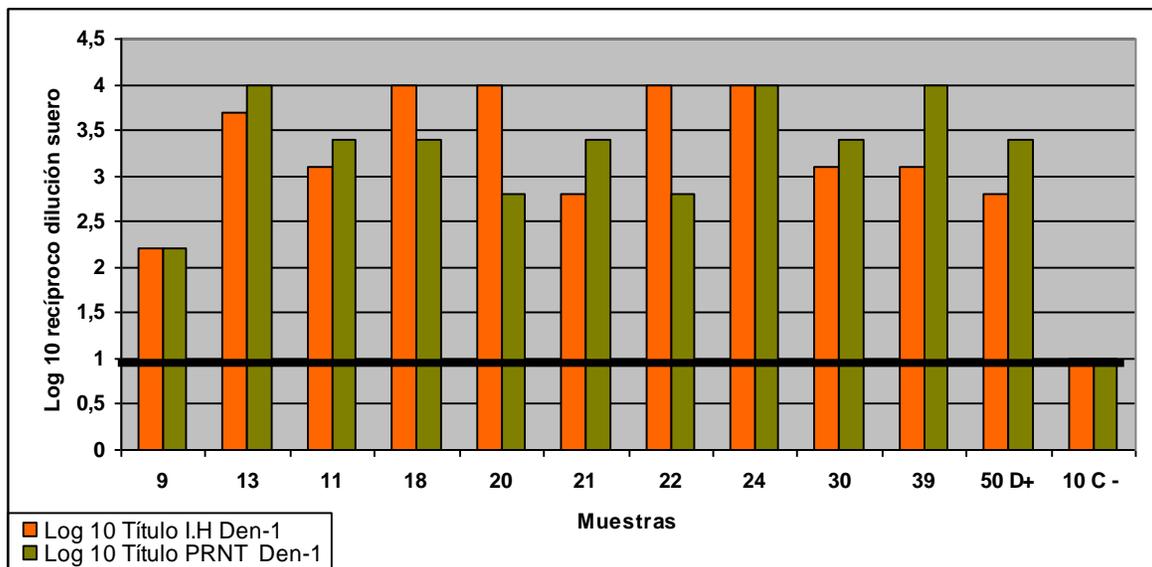


Figura.- 29. Comparación del Log 10 recíproco de la dilución de suero, obtenida con muestras de suero de pacientes en fase aguda enfrentadas a Den-1 por las dos técnicas serológicas en estudio; **50D+:** Control positivo de dengue (consiste de una muestra de suero de paciente en fase aguda con PCR positivo para Den-3); **10 C - :** Control negativo para dengue 1, dengue 2 y fiebre amarilla. Se muestran los resultados de un experimento típico.

Tabla.- 32. Cuadro comparativo de resultados de la PRNT y de la I.H para Den-2 con muestras de suero de pacientes en fase aguda

Nº muestra	IgM Den	IgM F.A	Título I.H Den-2	Log 10 Título I.H Den-2	Título PRNT 70 Den-2	Log 10 Título PRNT Den-2	Vacuna	D.I.E
9	-	+	160	2,2	2560	3,4	FA	1
13	+	-	10240	4	10240	4		5
11	+	-	640	2,8	10240	4	FA	1
18	+	-	10240	4	2560	3,4		5
20	+	-	5120	3,7	10240	4	FA	5
21	+	-	640	2,8	2560	3,4		4
22	+	-	10240	4	2560	3,4		4
24	+	-	10240	4	10240	4		5
30	+	-	160	2,8	640	2,8		4
39	+	-	10240	4	2560	3,4	FA	5
50 D+	-	-	1280	3,1	10	1		3
10C-	-	-	10	1	10	1		5

I.H: Inhibición de la Hemaglutinación; **PRNT:** Prueba de neutralización por Reducción en Placas; **Den:** Dengue; **F.A:** fiebre amarilla; **D.I.E:** Días desde el inicio de la enfermedad; **50D+:** Control positivo de dengue (consiste de una muestra de suero de paciente en fase aguda con PCR positivo para Den-3); **10 C-:** Control negativo para dengue 1, dengue 2 y fiebre amarilla

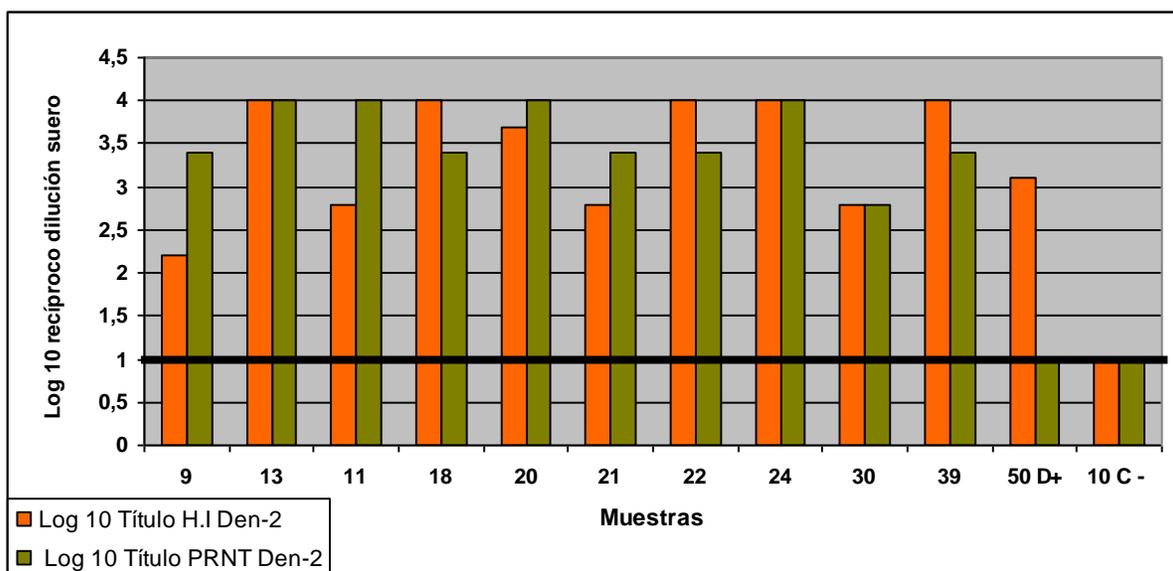


Figura.- 30. Comparación del Log 10 recíproco de la dilución de suero, obtenida con muestras de suero de pacientes en fase aguda enfrentadas a Den-2 por las dos técnicas serológicas en estudio; **50D+:** Control positivo de dengue (consiste de una muestra de suero de paciente en fase aguda con PCR positivo para Den-3); **10 C - :** Control negativo para dengue 1, dengue 2 y fiebre amarilla. Se muestran los resultados de un experimento típico.

Con relación a F.A, las muestras 9, 11, 20 y 39, presentaron por PRNT títulos elevados de anticuerpos hacia F.A, similares al reflejado por el control positivo, y el resto de las muestras fueron negativas para la presencia de anticuerpos hacia este virus (*figura 31*). Por I.H, todas las muestras presentaron títulos elevados de anticuerpos, que se encontraron alrededor del mismo nivel reportado para el control positivo de fiebre amarilla por este método. Todas a excepción de la muestra 9, fueron negativas a la presencia de anticuerpos IgM anti-fiebre amarilla (*tabla 33*). Estos resultados confirman, las inferencias propuestas a través de Análisis de Residuales Estandarizados con respecto a la especificidad de la técnica PRNT.

Tabla.- 33. Cuadro comparativo de resultados de la PRNT y de la I.H para F.A con muestras de suero de pacientes en fase aguda

Nº muestra	IgM DEN	IgM F.A	Título I.H F.A	Log 10 Título I.H F.A	Título PRNT 70 F.A	Log 10 Título PRNT F.A	Vacuna	D.I.E
9	-	+	1280	3,1	640	2,8	FA	1
13	+	-	10240	4	<10	1		5
11	+	-	10240	4	2560	3,4	FA	1
18	+	-	10240	4	10	1		5
20	+	-	10240	4	160	2,2	FA	5
21	+	-	2560	3,4	10	1		4
22	+	-	10240	4	10	1		4
24	+	-	10240	4	10	1		5
30	+	-	10240	4	<10	1		4
39	+	-	10240	4	640	2,8	FA	5
3FA+	-	+	2560	3,4	640	2,8	FA	1
10C-	-	-	10	1	10	1		5

I.H: Inhibición de la Hemaglutinación; **PRNT:** Prueba de neutralización por Reducción en Placas; **Den:** Dengue; **F.A:** fiebre amarilla; **D.I.E:** Días desde el inicio de la enfermedad; **3 F.A+:** Control positivo de fiebre amarilla (consiste en una muestra de suero de paciente vacunado contra fiebre amarilla y positivo para F,A por serología); **10 C-:** Control negativo para dengue 1, dengue 2 y fiebre amarilla

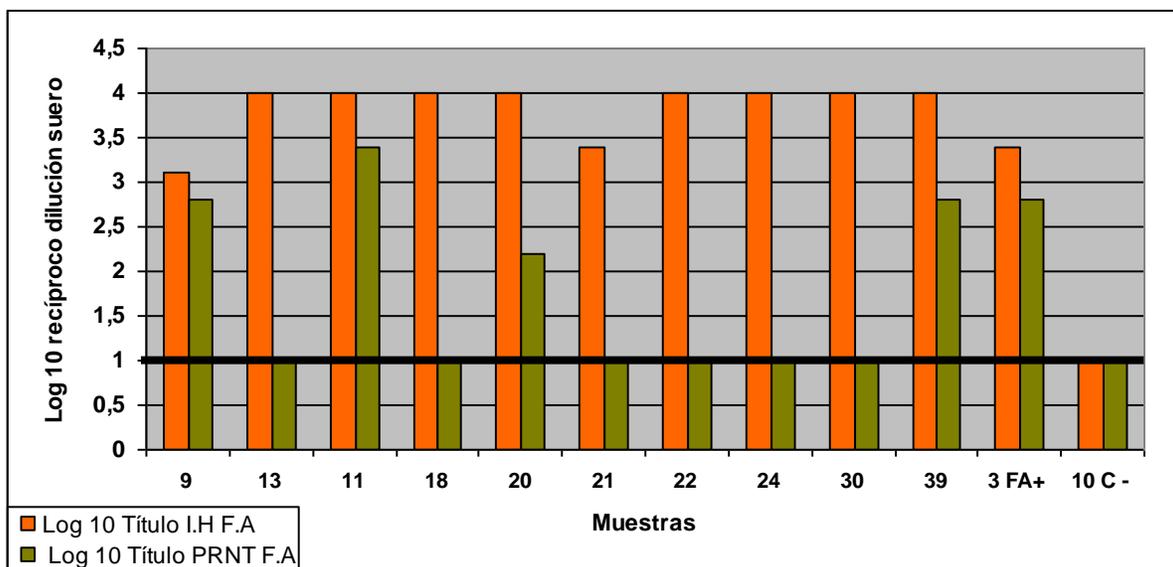


Figura.- 31. Comparación del Log 10 recíproco de la dilución de suero, obtenida con muestras de suero de pacientes en fase aguda enfrentadas a F.A por las dos técnicas serológicas en estudio; **3 F.A+:** Control positivo de fiebre amarilla (consiste en una muestra de suero de paciente vacunado contra fiebre amarilla y positivo para F,A por serología); **10 C - :** Control negativo para dengue 1, dengue 2 y fiebre amarilla. Se muestran los resultados de un experimento típico.

**VII.9.- Resultados serológicos de muestras de suero de pacientes en fase
convaleciente**

Los resultados serológicos que se obtuvieron con este grupo de muestras se reunieron en las *tablas 34, 35 y 36* y las diferencias entre el título de anticuerpos obtenidos por las dos técnicas en estudio contra cada uno de los virus, con este grupo de muestras, se representan en las *figuras 32, 33 y 34*, como el Log 10 del recíproco de la dilución de suero.

Aunque no todas reaccionaron ante los dos serotipos del dengue, todas las muestras por PRNT fueron positivas a este virus. Sólo hubo una muestra que reaccionó únicamente ante el serotipo 1 y de la otra que no se presentó resultado con Den-2 fue debido a su limitado volumen (muestra 27). En principio el título de anticuerpos encontrado para cada una de las muestras hacia Den-1 y Den-2 fue elevado y se encontraban alrededor del nivel presentado por el control positivo para este virus por este método. En cambio por I.H todas las muestras a excepción de la muestra 17, fueron positivas a los dos serotipos del dengue, con niveles de anticuerpos semejantes a los del control positivo (*figuras 32 y 33*). Todas a excepción de la muestra 5, 7 y 14 fueron positivas de anticuerpos IgM anti-dengue (*tablas 34 y 35*). Encontrándose congruencia con los resultados de sensibilidad obtenidos previamente por Análisis de Residuales Estandarizados para esta técnica.

Tabla.- 34. Cuadro comparativo de resultados de la PRNT y de la I.H para Den-1, con muestras de suero de pacientes en fase convaleciente

Nº muestra	IgM DEN	IgM F.A	Título I.H Den-1	Log 10 Título I.H Den-1	Título PRNT 70 Den-1	Log 10 Título PRNT Den-1	Vacuna	D.I.E
5	-	+	1280	3,1	640	2,8		15
7	-	+	2560	3,4	10240	4	FA	8
14	-	-	640	2,8	10240	4		6
17	+	-	<10	1	10240	4	FA	6
19	+	-	10240	4	10240	4		6
25	+	-	10240	4	640	2,8		6
27	+	-	10240	4	2560	3,4		31
50 D+	-		640	2,8	2560	3,4		3
10C-	-	-	10	1	10	1		5

I.H: Inhibición de la Hemaglutinación; **PRNT:** Prueba de neutralización por Reducción en Placas; **Den:** Dengue; **F.A:** fiebre amarilla; **D.I.E:** Días desde el inicio de la enfermedad; **50D+:** Control positivo de dengue (consiste de una muestra de suero de paciente en fase aguda con PCR positivo para Den-3); **10 C-:** Control negativo para dengue 1, dengue 2 y fiebre amarilla

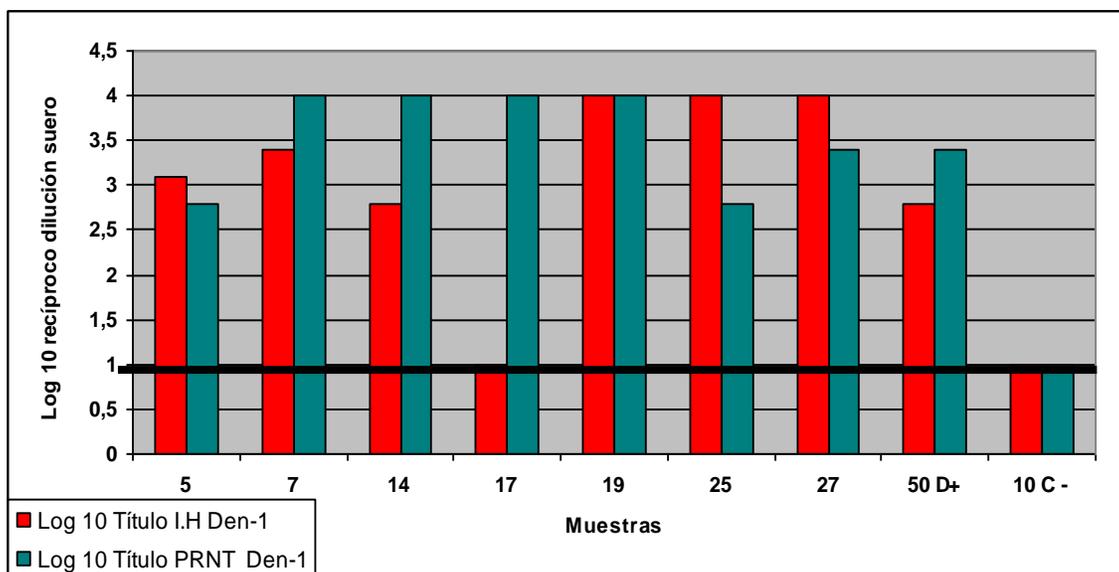


Figura.- 32. Comparación del Log 10 recíproco de la dilución de suero, obtenida con muestras de suero de pacientes en fase convaleciente enfrentadas a Den-1 por las dos técnicas serológicas en estudio; **50D+:** Control positivo de dengue (consiste de una muestra de suero de paciente en fase aguda con PCR positivo para Den-3); **10 C - :** Control negativo para dengue 1, dengue 2 y fiebre amarilla. Se muestran los resultados de un experimento típico.

Tabla.- 35. Cuadro comparativo de resultados de la PRNT y de la I.H para Den-2 con muestras de suero de pacientes en fase convaleciente

Nº muestra	IgM DEN	IgM F.A	Título I.H Den-2	Log 10 Título I.H Den-2	Título PRNT 70 Den-2	Log 10 Título PRNT Den-2	Vacuna	D.I.E
5	-	+	640	2,8	<10	1		15
7	-	+	2560	3,4	2560	3,4	FA	8
14	-	-	640	2,8	160	2,2		6
17	+	-	<10	1	640	2,8	FA	6
19	+	-	5120	3,7	640	2,8		6
25	+	-	10240	4	10240	4		6
27	+	-	10240	4	NR			31
50 D+	-	-	1280	3,1	10	1		3
10C-	-	-	10	1	10	1		5

I.H: Inhibición de la Hemaglutinación; **PRNT:** Prueba de neutralización por Reducción en Placas; **Den:** Dengue; **F.A:** fiebre amarilla; **D.I.E:** Días desde el inicio de la enfermedad; **50D+:** Control positivo de dengue (consiste de una muestra de suero de paciente en fase aguda con PCR positivo para Den-3); **10 C-:** Control negativo para dengue 1, dengue 2 y fiebre amarilla

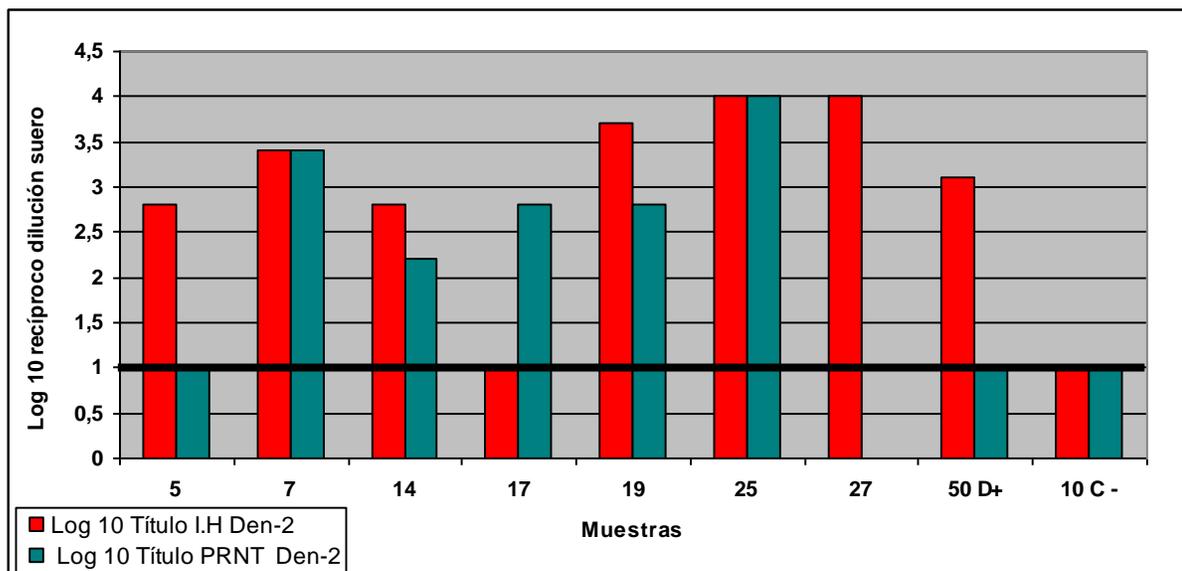


Figura.- 33. Comparación del Log 10 recíproco de la dilución de suero, obtenida con muestras de suero de pacientes en fase convaleciente enfrentadas a Den-2 por las dos técnicas serológicas en estudio; **50D+:** Control positivo de dengue (consiste de una muestra de suero de paciente en fase aguda con PCR positivo para Den-3); **10 C- :** Control negativo para dengue 1, dengue 2 y fiebre amarilla. Se muestran los resultados de u experimento típico.

Al ser enfrentadas al virus de la fiebre amarilla por PRNT, las únicas muestras que mostraron reacción ante este virus fueron la 5, 7, 14 y 17, con niveles de anticuerpos similares al que presentó el control positivo para este virus por este método. Todas a excepción de las muestras 5 y 7 (*figura 34*), resultaron ser negativas de anticuerpos IgM anti-fiebre amarilla (*tabla 36*). Contrario a estos resultados, por I.H todas fueron positivas para anticuerpos hacia este virus con títulos altos. Estos resultados confirman, las inferencias propuestas a través de Análisis de Residuales Estandarizados con respecto a la especificidad de la técnica PRNT.

Tabla.- 36. Cuadro comparativo de resultados de la PRNT y de la I.H para F.A con muestras de suero de pacientes en fase convaleciente

Nº muestra	IgM DEN	IgM F.A	Título I.H F.A	Log 10 Título I.H F.A	Título PRNT F.A	Log 10 Título PRNT F.A	Vacuna	D.I.E
5	-	+	5120	3,7	640	2,8		15
7	-	+	10240	4	2560	3,4	FA	8
14	-	-	10240	4	160	2,2		6
17	+	-	10240	4	2560	3,4	FA	6
19	+	-	10240	4	10	1		6
25	+	-	10240	4	<10	1		6
27	+	-	10240	4	10	1		31
3FA+	-	+	2560	3,4	640	2,8	FA	1
10C-	-	-	10	1	10	1		5

I.H: Inhibición de la Hemaglutinación; **PRNT:** Prueba de neutralización por Reducción en Placas; **Den:** Dengue; **F.A:** fiebre amarilla; **D.I.E:** Días desde el inicio de la enfermedad; **3 F.A+:** Control positivo de fiebre amarilla (consiste en una muestra de suero de paciente vacunado contra fiebre amarilla y positivo para F,A por serológica) ; **10 C-:** Control negativo para dengue 1, dengue 2 y fiebre amarilla

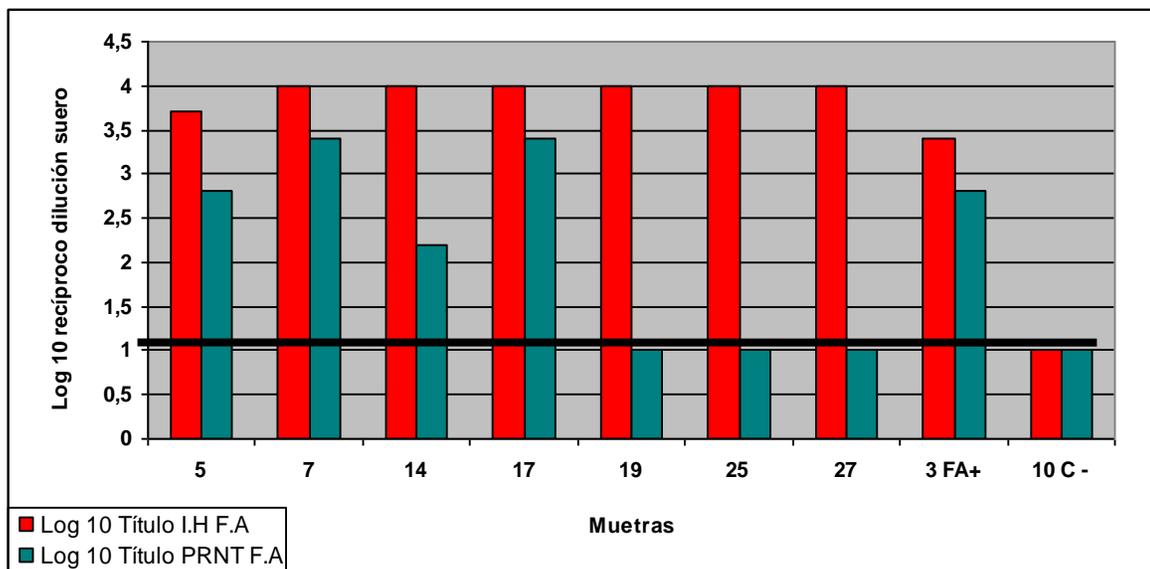


Figura.- 34. Comparación del Log 10 recíproco de la dilución de suero, obtenida con muestras de suero de pacientes en fase convaleciente enfrentadas a F.A por las dos técnicas serológicas en estudio; **3 F.A+:** Control positivo de fiebre amarilla (consiste en una muestra de suero de paciente vacunado contra fiebre amarilla y positivo para F,A por serología); **10 C - :** Control negativo para dengue 1, dengue 2 y fiebre amarilla. Se muestran los resultados de un experimento típico.

VIII.- DISCUSIÓN

Durante la etapa inicial de los experimentos de la PRNT, se seleccionó como semilla viral de la fiebre amarilla la cepa vacunal 17DD y se amplificó en células Vero E6, presentando un nivel de intensidad de fluorescencia +3 a la presencia de material infeccioso, igual al nivel reportado por *Acuña y col (2001)* para la cepa 17D-V3 de la fiebre amarilla. Posteriormente se amplificó en sistema celular C636/HT, cepas locales de cada uno de los cuatro serotipos del virus del dengue, cuyo resultado por Inmunofluorescencia indirecta tuvo un nivel intensidad + 4, con todos los serotipos, similar al reportado por *Acuña y col (2001)* para la otra cepa de la fiebre amarilla con la que trabajó.

En este estudio, durante los primeros ensayos de titulación por plaqueo convencional realizados para los dos serotipos del virus del dengue, se usó la línea celular BHK-21 (resultados no mostrados) tal y como lo recomienda *Morens y col (1985)* y *Guzmán y col (2007)*; esta línea celular no permitió alcanzar visualización de efecto citopático del virus del dengue, ya que presentaba una elevada tasa metabólica, característico del tejido del cual provienen estas células. De acuerdo a las observaciones realizadas durante el presente estudio y en concordancia con lo reportado por *Nowak y Schnellmann (1995)*, la explicación que más se ajusta a tales observaciones es que estas células tienden a cambiar el metabolismo de la glucosa, de glucólisis y producción neta de lactato a gluconeogénesis y consumo neto de lactato. Y debido a que entre los suplementos que contenía el medio de cultivo, no estaba incluido el Lactato, luego de agotarse la glucosa presente en el mismo, las moléculas de lactato que producían las células no eran suficientes para cubrir las exigencias metabólicas de las mismas, por lo que en corto tiempo se exponían a una escasa fuente de energía para crecer y multiplicarse deteniendo su crecimiento y división, que resultaba en el

desprendimiento de las mismas a los tres días de cultivadas e impidiendo así su mantenimiento hasta cumplirse el tiempo de incubación requerido por este virus.

En cuanto al experimento en el que se probó dos métodos *overlay*, se encontró que el semilíquido, es decir el de la Carboximetilcelulosa al 1,5% fue más apropiado que el de la Agarosa al 0,5%, para el desarrollo del experimento de titulación viral y el de Neutralización por Reducción en Placas. El método semilíquido permitió la formación de placas virales, a diferencia de lo observado por el método semisólido. Esto posiblemente se debe a que la agarosa contiene radicales cargados negativamente que impiden que el virus del dengue se replique.

La titulación del virus del dengue en células Vero NK, produjo placas virales con bordes definidos, esta definición en los bordes de las placas virales es, según *Morens y col (1985)* y *Acuña y col (2001)*, consecuencia de la función que cumple la Carboximetilcelulosa al confinar la infección a las células que se encuentren contiguas a la que inicialmente fue infectada, por impedir que las partículas virales se diseminen hacia otra célula que no se encuentren en la vecindad de la que se infectó inicialmente. El título de estos serotipos virales se encontró en el orden de 10^4 y la dilución que se seleccionó como la adecuada para llevar a cabo los experimentos de PRNT con Den-1 fue 1×10^{-2} y con Den-2 fue 3×10^{-2} , por contener un número de ufp cercano al rango óptimo indispensable para observar reducción de placas virales.

El título viral infectivo obtenido para las cepas locales de los serotipos 1 y 2 del dengue y para el virus de la fiebre amarilla cepa vacunal 17DD, se encontró alrededor del orden de magnitud de 10^5 tal y como fue reportado por *Álvarez y col (1998)* para la cepa vacunal 17DD de la fiebre amarilla.

Este estudio, tuvo varias limitaciones en cuanto a la serología. Una de ellas fue el reducido número de muestras pareadas que la OMS y el grupo de trabajo de *Cordeiro y col (2009)*, *Shu y Huang (2004)* y *Kao y col (2005)*, recomendaron adecuados e indispensables

para extraer una interpretación correcta de los resultados obtenidos por ambos métodos, con respecto a la clasificación de infecciones primarias versus secundarias. Otra de las limitaciones fue el poco volumen de cada una de las muestras, que permitiera realizar un número representativo de réplicas experimentales.

VIII.1.- Sensibilidad y especificidad de las técnicas serológicas en estudio

La estimación de la sensibilidad y la especificidad para la PRNT con los cuatro grupos de muestras, aplicando la ecuación de *Torres y col (1998)*, al igual que por Análisis de Residuales Estandarizados, resultó indicar que la PRNT podría ser más específica que sensible. Similar a lo encontrado por *Borges y col, 2008* con relación al *cut-off* asociado con la mejor realización de la prueba de neutralización por reducción en micro-placas que demostró buena especificidad (90,8% o 99,0%), con resultados negativos que presentaron una alta probabilidad de ser verdaderos negativos.

Mientras que la estimación de estos parámetros para la técnica I.H por Análisis de Residuales Estandarizados, resultó indicar que la misma tendió a ser más sensible que específica.

Con estos resultados se acepta la hipótesis alternativa número 1, que plantea que la PRNT es más específica que la I.H, pero se rechaza la hipótesis alternativa número 2, que plantea que es más sensible. Estos resultados en concordancia con lo reportado en la bibliografía por *Schlesinger y col (1983)*, parecen indicar que los ensayos de neutralización fueron los más específicos para los virus en estudio mientras que los ensayos de I.H tendieron a ser los de mayor reactividad cruzada entre los mismos virus, que como se mencionó anteriormente se trata de *flavivirus* relacionados. Según *Weingartl y col (2002)* la reactividad cruzada en la técnica I.H, se debe a que todos los miembros del género *Flavivirus*

comparten epítopes comunes de superficie, lo cual contribuye con la alta sensibilidad de la técnica.

A su vez estos resultados se encuentran en concordancia con lo encontrado por *Morens y col (1985)* en cuanto a la especificidad (95%), sensibilidad (96%), y capacidad de detectar seroconversión hacia tres serotipos del virus del dengue (93%).

La razón por la cual la técnica PRNT es altamente específica se debe a lo que *Acuña y col (2001)* plantearon acerca de las reacciones de neutralización. Ellos sugirieron que estas reacciones detectan anticuerpos dirigidos contra antígenos superficiales de los virus (glicoproteínas de envoltura o antígenos de la cápside). Estos anticuerpos son tipo-específicos, por lo que permiten determinar el subtipo viral causante de la enfermedad.

Al igual que lo encontrado por *Acuña y col (2001)*, en relación a la sensibilidad y especificidad de la técnica PRNT de F.A, en el presente estudio pudo confirmarse que esta técnica presenta un alto nivel de especificidad y su sensibilidad fue variable. A diferencia del trabajo realizado por los mismos investigadores, que enfrentaron al virus de la F.A a los sueros controles e hiperinmunes producidos en ratón, en el presente estudio fue posible estandarizar preliminarmente la técnica PRNT, con un grupo de muestras de sueros de pacientes inmunes al virus del dengue y con otro grupo de muestras de suero inmunes a F.A, en su mayoría por vacunación. Con lo cual se obtuvieron resultados preliminares que se correspondían a lo encontrado en la bibliografía, tal como se indicó anteriormente.

A pesar que la PRNT mide el parámetro biológico de neutralización viral *in vitro* y es la prueba más virus específica entre *flavivirus*, además de ser la prueba serotipo-específica entre virus dengue, que correlaciona bien con los niveles de protección de la infección viral en suero (*Roehrig y col, 2008*), los resultados obtenidos preliminarmente en el presente estudio, no son suficientes para aseverar que la técnica está completamente estandarizada. Para ello son necesarios varios estudios adicionales con el fin que la técnica quede a punto para las corridas rutinarias en el diagnóstico serológico durante epidemias de dengue y F.A,

que se presenten el país. Así como también puede ser usada principalmente, tal y como sugieren *Cordeiro y col (2009)* para la clasificación serológica de las infecciones del dengue.

VIII.2.- APLICABILIDAD DE LAS TÉCNICAS SEROLÓGICAS EN ESTUDIO

VIII.2.1.- Análisis de resultados serológicos para un grupo de pares de muestras de suero de pacientes

En general, cuando este grupo de muestras fue enfrentado a Den-1 y a Den-2 (*figuras 24 y 25*, respectivamente), se pudo apreciar que ambas técnicas fueron capaces de detectar anticuerpos contra estos serotipos virales, siendo la I.H, la que en la mayoría de los casos detectó niveles superiores de anticuerpos, en correspondencia con los resultados de sensibilidad obtenidos previamente por Análisis de Residuales Estandarizados para esta técnica.

En este sentido, se encontró una correlación con lo reportado en la bibliografía por *Kao y col (2005)* con respecto a la sensibilidad de la técnica I.H y respecto a la dificultad de serotipificación del virus del dengue por esta misma técnica, para entender las infecciones pasadas del individuo de prueba.

A diferencia del control positivo (50D+), todos los pares de muestras de suero presentaron anticuerpos IgM anti-dengue. Lo cual podría sugerir que todos los pares de muestras se trataron de infecciones recientes, de acuerdo a lo propuesto por *Rodríguez - Roche y col (2005)* y *Guzmán y col (2005)*. El suero control careció de anticuerpos IgM, posiblemente debido a que fue tomado, antes que este anticuerpo comenzara a ser detectable en sangre (*Shu y Huang, 2004; Roehrig y col, 2008*), considerando que la cinética de respuesta de anticuerpos varía en cada individuo.

En general se pudo apreciar, un cambio en el nivel de anticuerpos totales (principalmente del tipo IgG) por PRNT, hacia cada uno de los virus en estudio, según la fase de la enfermedad que presentara el individuo. Aunque hubo un caso, en el que el nivel de anticuerpos por PRNT contra Den, en la muestra en fase convaleciente en relación a la aguda, no presentó cambio (par 48), posiblemente debido a una mala percepción durante el contaje de placas virales resultantes en el experimento de PRNT.

Uno de los casos representativos en el que se observó cambio en el nivel de anticuerpos, para explicar los patrones de respuestas o infecciones primarias y secundarias, fue el par de muestras 16, que cuando fue enfrentado a Den-1 por PRNT, la muestra en fase aguda presentó un título de anticuerpos de 160 y en fase convaleciente un nivel de 10240, y cuando fue enfrentado a Den-2, la muestra en fase aguda presentó el mínimo nivel de anticuerpos detectado por las técnicas, es decir < 20 , y la muestra en fase convaleciente un nivel de anticuerpos de 640. Lo cual concuerda con lo propuesto por *Shu y Huang (2004)* y *Cordeiro y col (2009)*, con relación al incremento en los niveles de anticuerpos serotipo-específicos pre-existentes, durante la infección secundaria aguda del dengue.

Se ha demostrado en previos estudios (*Shu y Huang, 2004; Herrera y col, 2005; Cordeiro y col, 2009*) que en presencia de una infección secundaria, la muestra de suero en fase aguda presenta títulos de anticuerpos ≥ 20 , y en fase convaleciente presenta títulos de anticuerpos ≥ 2560 . Esto a su vez concuerda con la curva de respuesta secundaria que describe la memoria inmunológica (*Janeway, 2005*). Por lo tanto, a partir de estos resultados podría inferirse, que este par de muestras (16) se trata de un caso de infección secundaria por dengue, en el que la secuencia de infección fue Den-1, seguido por Den-2.

En la mayoría de los casos, pudo determinarse por PRNT, la secuencia de infección por los serotipos del dengue en estudio, con alta sensibilidad y especificidad, semejante a lo encontrado por *Yamashiro y col (2004)* durante la determinación del serotipo del virus del Dengue circulante entre los habitantes de Santo Domingo. En aquella oportunidad, esta

técnica mostró gran especificidad para los serotipo del virus del dengue, y representó una aproximación aceptable para obtener información acerca de previas exposiciones al virus e inmunidad presente a partir de la comparación de los resultados serológicos obtenidos por este método y el de ELISA IgG específica del virus del dengue. Mientras que por I.H en la mayoría de los casos no se pudo dilucidar la secuencia de infección por los dos serotipos del virus del dengue en estudio.

De igual modo, *Halstead y Russ (1962)*, *Shu y Huang (2004)* y *Guzmán y col (2007)* en el mismo contexto a lo encontrado en el presente estudio, concluyeron que cuando los pacientes tienen infecciones secuenciales y múltiples, con los cuatro serotipos del virus del dengue como consecuencia de una carencia de anticuerpos de neutralización protectora cruzada, la presencia de anticuerpos pre-existentes así como la existencia del *sin antigénico original* (muchos clones de células B que responden a la primera infección por *flavivirus*) son re-estimuladas a sintetizar anticuerpos tempranos con una mayor afinidad hacia el primer virus infectante que para el virus recientemente infectante en cada infección subsiguiente con *flavivirus* en regiones donde dos o más *flavivirus* se encuentren circulando.

En este estudio, específicamente con el par de muestras 16, se encontró el mismo comportamiento encontrado por *Halstead (1979)* y *Guzmán y col (2007)*, en cuanto a las diferencias en los niveles de anticuerpos homotípicos y heterotípicos. Estos investigadores, en estudios epidemiológicos en los que analizaron anticuerpos neutralizantes de personas después de la infección con virus dengue-2, que seguía a una infección con dengue-1, encontraron que el título de anticuerpos neutralizantes homotípicos hacia el virus dengue-1 aumenta y el título de anticuerpos heterotípicos hacia el virus dengue-2 disminuye.

En contraste, *Cordeiro y col, 2009* infirieron que la clasificación de respuesta inmunitaria primaria versus secundaria exclusivamente en base a la técnica de la I.H, siguiendo el criterio de la OMS, no es siempre confiable y puede ser engañosa. Por lo que en

el presente estudio la determinación de la secuencia de infección estuvo basada en la comparación de los niveles de anticuerpos hallados por PRNT.

Con relación a la F.A, los pares de muestras 16 y 26 en ausencia de anticuerpos IgM anti-fiebre amarilla, presentaron por PRNT seroconversión a este virus, esto es, pasar de un nivel de anticuerpos ≤ 10 en la muestra en fase aguda a un nivel 4 veces mayor en la muestra en fase convaleciente (*Pupo y col, 2006*).

El nivel de anticuerpos encontrado contra este virus en estos pares de muestras se corresponde con el que presenta por PRNT el control positivo para F.A.

El resto de los pares de muestras no presentaron por PRNT, anticuerpos anti-fiebre amarilla en concordancia con la ausencia de anticuerpos IgM. Aunque hubo algunos pares de muestras en los que al menos una, fue positiva a la IgM, posiblemente debido al cruce serológico que por ELISA IgM de captura es detectado (*Vázquez y col, 2004*).

Por I.H todos los pares de muestras presentaron títulos de anticuerpos anti-fiebre amarilla elevados, a partir de la muestra en fase aguda.

Con la técnica PRNT se logró discriminar, entre los casos que posiblemente correspondieron a infecciones por fiebre amarilla. Estos resultados confirman, las inferencias propuestas a través de Análisis de Residuales Estandarizados para la especificidad de esta técnica. Con lo que se podría inferir entonces, que el elevado nivel de anticuerpos detectado contra F.A por I.H se debe al cruce serológico que dificulta el poder discriminar entre infecciones de dengue y otros *flavivirus* cercanamente relacionados, tal y como propone *Kao y col (2005)*. De igual manera, los resultados obtenidos por *Álvarez y col (1998)*, sugirieron que la PRNT presentaba gran especificidad para dilucidar la presencia de anticuerpos contra F.A aún en individuos que han sufrido una o varias infecciones por dengue.

VIII.2.2.- Análisis de resultados serológicos para un grupo de muestras de suero de pacientes con anticuerpos IgM positivos anti-dengue y anti-fiebre amarilla

Todas las muestras tuvieron títulos elevados de anticuerpos hacia los dos serotipos del virus dengue por PRNT, similar al que presentó el control positivo hacia Den-1. Por I.H todas las muestras resultaron tener anticuerpos hacia los dos serotipos del dengue, tan o más elevados como el control positivo. Encontrándose una relación entre los niveles elevados de anticuerpos detectados por I.H y la sensibilidad que presenta esta técnica para detectar anticuerpos contra cualquier *flavivirus*. Lo que se corresponde con los resultados de sensibilidad para esta técnica, obtenidos previamente por Análisis de Residuales Estandarizados. Esto concuerda también con lo reportado en la bibliografía por *Kao y col (2005)* con respecto a la sensibilidad de la técnica I.H.

Con este grupo de muestras de suero, se pudo encontrar casos de infecciones secundarias por PRNT. Las muestras 1' y 12 se trataron de casos de infección secundaria actual. En el que la secuencia de infección en cada muestra, se encontraba invertida. La secuencia de infección en cada caso varió, dependiendo del nivel de anticuerpos hacia cada uno de los serotipos, de acuerdo al criterio de *Shu y Huang (2004)* y *Cordeiro y col (2009)*.

En particular la muestra de suero 51, fue seleccionada, entre este grupo de muestras, para explicar los patrones de respuestas o infecciones primarias y secundarias, debido a que representó un caso típico de infección secundaria por Den-2. En la que el nivel de anticuerpos hacia este serotipo del dengue, manifestó un comportamiento de anticuerpos heterotípicos, encontrándose en el rango de 20 a 1280, aunado al hecho que el paciente se encontraba en fase convaleciente de la enfermedad. A diferencia de ello el nivel de anticuerpos contra Den-1 fue mayor, manifestando un comportamiento de anticuerpos homotípicos, que se ubicó en un rango por encima de 2560. Lo que condujo a inferir que la secuencia de infección fue Den-1, seguido por Den-2.

Por PRNT de F.A, las muestras 8 y 12 presentaron títulos elevados de anticuerpos, similares a los del control positivo. Los cuales fueron confirmados con la información encontrada en la ficha epidemiológica, en cuanto al antecedente de vacunación contra este virus, que presentaban los individuos a los cuales correspondían estas muestras. El resto de las muestras no reaccionaron.

Estos resultados se corresponden con lo encontrado con este grupo de muestras por Análisis de Residuales Estandarizados en relación a la especificidad para PRNT, así como también se corresponde con lo reportado en la bibliografía por *Álvarez y col (1998)*, con respecto a la gran especificidad que presenta la PRNT para dilucidar la presencia de anticuerpos contra F.A aún en individuos que han sufrido una o varias infecciones por dengue.

Por I.H todas las muestras presentaron títulos elevados de anticuerpos hacia este virus. Con lo que se podría inferir entonces, que el elevado nivel de anticuerpos detectado contra F.A por esta técnica se debe al cruce serológico que dificulta el poder discriminar entre infecciones por dengue e infecciones por otros *flavivirus* cercanamente relacionados, tal y como propone *Kao y col (2005)*.

En la mayoría de los casos fue descartada la posibilidad de reactividad ante este virus, aún cuando la mayoría de las muestras de suero contuvieron anticuerpos IgM anti-fiebre amarilla. Esto fue posible hacerlo por deducción a partir de los resultados de la PRNT y la información suministrada por la ficha epidemiológica.

VIII.2.3.- Análisis de resultados serológicos para un grupo de muestras de suero de pacientes en fase aguda

Se encontró presencia de anticuerpos para los dos serotipos del dengue, en todas las muestras, a un nivel similar al del control positivo por PRNT, pero los niveles de anticuerpos detectados por I.H en cada una de las muestras contra cada uno de los virus en estudio fue superior a los detectados por PRNT.

Tal como ocurrió con los grupos de muestras antes analizados, los resultados serológicos obtenidos con este grupo de muestras, concuerdan con la estimación de sensibilidad obtenida por Análisis de Residuales Estandarizados para la I.H. Y se correlaciona con lo propuesto por *Kao y col (2005)*.

La muestra de suero que se seleccionó como representativa de este grupo, para explicar los patrones de respuestas o infecciones primarias y secundarias, fue la número 9. Cuando esta muestra, fue enfrentada a Den-1 por PRNT, presentó un título de anticuerpos de 160, y cuando fue enfrentado a Den-2, presentó un nivel de anticuerpos de 2560. Lo cual concuerda con lo propuesto por *Shu y Huang (2004)*, *Herrera y col (2005)* y *Cordeiro y col (2009)* con relación al incremento en los niveles de anticuerpos serotipo-específicos pre-existentes, durante la infección secundaria aguda del dengue. Por lo que con estos resultados se podría inferir que la secuencia de infección que presentó el individuo al cual pertenece esta muestra, fue Den-2 seguido por Den-1.

Así mismo, el hallazgo *Guzmán y col (2007)*, en concordancia con lo encontrado en el presente estudio, sugiere que el elevado nivel de anticuerpos obtenido contra Den-2 seguido de un nivel más bajo de anticuerpos contra Den-1, se debe a la presencia de anticuerpos homotípicos contra Den-2 y a la presencia de anticuerpos heterotípicos contra Den-1.

Adicionalmente *Halstead y Russ (1962)*, *Shu y Huang (2004)* y *Guzmán y col (2007)* sugirieron que la persistencia a largo término de los anticuerpos después de una infección viral está basada en la presencia de células de plasma y B de memoria de larga vida.

También sugirieron que el mejoramiento en el título de anticuerpos neutralizantes homotípicos y la disminución en el título de anticuerpos neutralizantes heterotípicos evocan la maduración de la afinidad.

Por otro lado, las muestras 9, 11, 20 y 39, presentaron por PRNT títulos elevados de anticuerpos contra F.A, similares al reflejado por el control positivo, y el resto de las muestras fueron negativas para la presencia de anticuerpos hacia este virus. Por I.H todas las muestras presentaron títulos elevados de anticuerpos, que se encontraron alrededor del mismo nivel reportado por esta técnica para el control positivo de fiebre amarilla. Todas estas muestras son casos de vacunación contra F.A, y todas a excepción de la muestra 9, fueron negativas a la presencia de anticuerpos IgM anti-fiebre amarilla, posiblemente debido a que tenían más de 20 días desde la vacunación, para el momento de la toma de la muestra. Las diferencias observadas en el nivel de anticuerpos detectado por ambas técnicas para una misma muestra se debieron a la especificidad de la PRNT. Ya que siendo estas muestras casos de infección por dengue, la PRNT, dilucidó fielmente los casos que realmente correspondieron a vacunación por F.A y descartó los que la técnica I.H tendió a confundir por casos de F.A. Confirmando así los resultados de especificidad obtenidos para esta técnica por Análisis de Residuales Estandarizados y en congruencia con lo propuesto por *Roehrig y col (2008)* y con lo encontrado por *Borges y col (2008)*.

VIII.2.4.- Análisis de Resultados serológicos para un grupo de muestras de suero de pacientes en fase convaleciente

En todas las muestras a excepción de la muestra 5, se encontró presencia de anticuerpos contra los dos serotipos del dengue por PRNT, a un nivel similar al del control positivo por esta técnica, y en la mayoría de los casos los niveles de anticuerpos detectados por I.H en cada una de las muestras contra cada de los serotipos del virus del dengue en estudio, fue superior a los detectados por PRNT. Estos resultados concuerdan con la estimación de sensibilidad obtenida por Análisis de Residuales Estandarizados para la I.H. Y se correlaciona con lo propuesto por *Kao y col (2005)*, en cuanto a la sensibilidad de la técnica I.H.

La muestra de suero que se seleccionó como representativa de este grupo, para explicar los patrones de respuestas o infecciones primarias y secundarias fue la número 5. Cuando esta muestra, fue enfrentada a Den-1 por PRNT, presentó un título de anticuerpos de 640, y cuando fue enfrentado a Den-2, presentó el mínimo nivel de anticuerpos detectado por ambas técnicas. Con estos resultados y de acuerdo al criterio propuesto por *Shu y Huang (2004)*, *Herrera y col (2005)* y *Cordeiro y col (2009)*, con relación al patrón de respuesta humoral y a la clasificación de infecciones primarias e infecciones secundarias, cuando la muestra de suero se encuentra en fase convaleciente en presencia de niveles de anticuerpos tipo IgG entre 20 y 1280 (≥ 20) se trata de una infección primaria o actual, y en presencia de títulos de anticuerpos ≥ 2560 se trata de una infección secundaria. Por lo que se podría inferir, que esta muestra de suero corresponde a un caso de infección primaria por Den-1.

Al ser enfrentadas al virus de la fiebre amarilla por PRNT, las únicas muestras que mostraron reacción ante este virus fueron la 5, 7, 14 y 17, con niveles de anticuerpos similares al que presentó el control positivo para este virus por esta técnica. Todas a excepción de las muestras 5 y 7, resultaron ser negativas de anticuerpos IgM anti-fiebre

amarilla. Lo cual nos podría hacer pensar que estas dos últimas muestras, se tratan de casos de infección natural o vacunación con F.A, que corresponde a más de 20 días desde la infección o vacunación. Contrario a estos resultados, por I.H todas fueron positivas para anticuerpos hacia este virus con títulos altos. Lo cual resulta congruente con la estimación de especificidad encontrada para la técnica PRNT por Análisis de Residuales Estandarizados.

Estos resultados serológicos contra F.A, también concuerdan con lo encontrado en la bibliografía, en cuanto a estudios serológicos, donde se usan suero inmune o fluido ascítico producido contra *flavivirus*, en los que, los ensayos de neutralización generalmente son los más específicos para la cepa inmunizante mientras que los ensayos de I.H tienden a ser los de mayor reactividad cruzada entre la cepa inmunizante y los *flavivirus* relacionados (Schlesinger y col, 1983).

IX.- CONCLUSIONES

- Las cepas locales de cada uno de los cuatro serotipos del virus del dengue, fueron capaces de adaptarse al sistema celular C636/HT, en el que se amplificaron, produciendo resultados por Inmunofluorescencia indirecta con alto nivel intensidad de fluorescencia con todos los serotipos.
- Las células Vero NK presentaron mayor susceptibilidad a la infección de los cuatro serotipos del virus del dengue.
- Las células BHK-21, bajo las condiciones disponibles durante el estudio, no fueron ideales para realizar los ensayos de Titulación viral y Neutralización por Reducción en Placas.
- El método de la Carboximetilcelulosa *overlay* 1,5%, permitió el desarrollo de placas líticas del virus del dengue y de la fiebre amarilla, con mejor eficiencia que la Agarosa *overlay* al 0,5%.
- El método de la Agarosa *overlay* a través de un mecanismo desconocido no favorece o no permite la formación de placas virales del virus del dengue. No es recomendable su uso si se desea establecer estudios de titulación viral y de neutralización.
- Algunas cepas locales (salvajes) del virus del dengue tardaron en adaptarse al sistema de amplificación (cerebro de ratones neonatos).
- Tanto la Técnica de Neutralización por Reducción en Placas (PRNT) como la Inhibición de la Hemaglutinación (I.H), fueron capaces de detectar anticuerpos contra los dos serotipos del virus del dengue en estudio, siendo la I.H, la que en la mayoría de los casos detectó niveles superiores de anticuerpos, en correspondencia con los resultados de sensibilidad obtenidos por Análisis de Residuales Estandarizados para esta técnica.

- Con la técnica PRNT se logró discriminar, entre los casos que posiblemente correspondieron a infecciones por fiebre amarilla. Pudiéndose confirmar, las inferencias propuestas a través de Análisis de Residuales Estandarizados para la especificidad de esta técnica. Con lo que se pudo inferir, que el elevado nivel de anticuerpos detectado contra F.A por I.H se debió al cruce serológico detectado por esta técnica, que dificulta discriminar entre infecciones por dengue e infecciones por otros *flavivirus* cercanamente relacionados. Lo cual categoriza a la I.H, como una buena técnica para predecir inmunidad anti-*flavivirus*, más no para un *flavivirus* en específico.

X.- RECOMENDACIONES

- Es recomendable usar la línea celular Vero E6 para realizar titulación del virus de la fiebre amarilla, la cual muestra mayor susceptibilidad a la infección de este virus que a los virus del dengue.
- Es recomendable no someter a las semillas virales a procesos de congelación y descongelación sucesivas, previo a su uso en el método de titulación y PRNT, debido a que los cambios de temperatura ocasionan la pérdida de gran cantidad de partículas infecciosas, modificando así el título viral, y en algunos casos causa inactivación del virus.
- Es recomendable realizar al menos 3 réplicas del experimento de la PRNT, para poder tener una estimación más real de la sensibilidad y especificidad del método, así como también para poder hallar una tendencia más real de la secuencia de infección por cada uno de los serotipos.
- Para estudios posteriores, es recomendable, realizar el método con controles que hayan sido caracterizados y confirmados por varias técnicas, entre las cuales deben estar incluidas las moleculares. Cuyo nivel de especificidad y sensibilidad es elevado, tal es el caso de la RT-PCR y la Secuenciación. Esto es, en el caso en el que los controles positivos se encuentren en fase aguda. En caso que se encuentren en fase convaleciente, las técnicas más idóneas serían, el Inmunoelctrotransferencia (*Western blot*) y Cromatografía de Inmunoafinidad.
- A fin de visualizar las placas virales mejor definidas y sin correr el riesgo que se solapen, son recomendables los períodos de incubación: 6 días para F.A y Den-2 , 7 días para Den-4 y 8 días para Den-1 y Den-3.

XI. – BIBLIOGRAFÍA

- Acuña, M., Castillo, R., García, M. 2001. **Neutralización por Reducción en Placas como método específico para el diagnóstico serológico de Fiebre amarilla.** *Rev Med Exp.* 18: 3-4.
- Aguilar Barroso, A., Amin, N., Morier, L., Pérez, E.M. 2005. **Evaluación de la infectividad de cepas de dengue 1 en las líneas celulares Hep G2 y Vero.** *Rev Cubana Med Trop* 57(2): 105-110.
- Aguilar, P. V., Scott, C., Weaver, S. C., Basler C. F. 2007. **Capsid Protein of Eastern Equine Encephalitis Virus Inhibits Host Cell Gene Expression.** *J Virol* 81(8): 3866–3876.
- Álvarez, M., Valdéz, D., Vázquez, S., Delgado, I., García, S., Morier, D., Guzmán, G. 1998. **Normalización de la técnica de reducción de placas para diferenciar una infección por dengue de una infección por fiebre amarilla.** *Rev Cubana Med Trop* 50(3): 177-181.
- Álvarez, M., Rodríguez-Roche, R., Bernardo, L., Morier L., Guzman, M. 2005. **Improned Dengue Virus Plaque Formation on BHK-21 and LLCMK₂ Cells: Evaluation of Some Factors.** *Dengue Bulletin* 29:49-57.
- Álvarez, M., Rodríguez-Roche, R., Bernardo, L., Vázquez, S., Morier, L., González, D., Castro, O., y colaboradores. 2007. **Dengue Hemorrhagic fever caused by sequential dengue1-3 virus infections over a long time interval: Havana epidemic, 2001-2002.** *Am. J. Trop. Med. Hyg* 75(6): 1113-1117.
- Balmaseda, A., Hammond, S., Pérez, L., Tellez, Y., Saborío, S., Mercado, J., Cuadra, R., y colaboradores. **Serotype-specific Differences in Clinical Manifestations of Dengue.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 74(3): 449–456.
- Barnett, E. 2007. **Yellow Fever: Epidemiology and Prevention.** *Emerging Infections* 44: 850- 856.
- Bastos, L., da Silva, M., Fernandes, M., Gomes, S., Pereira, J., Iguchia, T., Azevedo J., y colaboradores. 2004. **Immunogenicity of WHO-17D and Brazilian 17DD yellow fever vaccines: a randomized trial Imunogenicidade das vacinas contra febre amarela WHO-17D e 17DD: ensaio randomizado.** *Rev. Saúde. Publica* 34(5):671-8.
- Boonnak, K., slide, B., Burgess, T., Mason, R., Wu, S- J., Su, P., Porter, K., y colaboradores. 2008. **Rol of Dendritic Cells in Antibody- Dependent Enhancement of Dengue Virus Infection.** *J Virol* 82(8): 3939-3951.

Borges, M., Kato, S., Damaso, C., Moussatché, N., Freire, M., Lambert, S., do Nascimento, J. 2008. **Accuracy and repeatability of a micro plaque neutralization test for vaccino antibodies.** *Biologicals* **36**: 105- 110.

Cann, A. 2001. **Principles of Molecular Virology.** ACADEMIC PRESS. 3er Edition. London.

Casals, J., Olitsky, P. 1947. **Inactivation of Certain Neurotropic Viruses in vitro by serum Lipids.** *Science* **106**: 267-268.

Clarke, D., Casals, J. 1958. **Techniques for Hemagglutination and Hemagglutination- inhibition with anthropod-borne virases.** *Am J Trop Med Hyg* **7(5)**: 561-573.

Cordeiro, M., Braga-Neto, U., Nogueira, R., Marques, E. 2009. **Reliable Classifier to Differentiate Primary and Secondary Acute Dengue Infection Based on IgG ELISA.** *PLoS ONE* **4(4)**: e4945. doi:10.1371/journal.pone.0004945.

Crespo, M. 2000. **El diagnóstico viral por el laboratorio.** *Colombia Médica* **31**: 135-150.

Daffis, S., Kontermann, R., Korimbocus, J., Zeller, H., Klenk, H-D., Meulen, J t. 2005. **Antibody responses against wild-type yellow fever virus and the 17D vaccine strain: Characterization with human monoclonal antibody fragments and neutralization escape variants.** *Virology.* **337**: 262 - 272.

Dulbecco, D., Ginsberg, E. 1990. **Microbiology.** 4^o Edición. J.B. Lippincott Company, Filadelfia.

Espinoza, F., Hernández, C., Rendón, R., Carrillo, M., Flores, J. 2003. **Transmisión interepidémica del dengue en la ciudad de Colima, México.** *Salud Pública de México* **45(5)**:365 - 370.

Faingezicht, I., Ávila, M. 1999. **Diagnóstico clínico y de laboratorio del paciente con dengue.** *Rev. méd. Hosp. Nac. Niños Costa Rica* **34**

Falconar, A. 2007. **Antibody Responses are Generated to Immunodominant ELK/ELK-Type Motifs on the Nonstructural-1 Glycoprotein durin Live Dengue Virus Infections in Mice and Humans: Implications for Diagnosis, Pathogenesis, and Vaccine Desing.** *Clin. Vaccine Immunol* **14(5)**: 493-504.

Fields. Knipe, D. M., Howley, P. M. 2007. **Virology.** 5th Edition. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia. **Flaviviridae: The Viruses and Their Replication.**

Flint, S., Enquist, L., Racaniello, V., Skalka, A. 2004 **Principles of virology. Molecular Biology. Pathogenesis and control of animal viruses.** Second Edition. Washington, DC.

Gil, L., Martínez, G., Tápanes, R., Castro, O., Gonzáles, D., Bernardo, L., Vázquez, S., y colaboradores. 2004. **Oxidative Stress in Adult Dengue Patients**. *Am. J. Trop. Med. Hyg* **71**(5): 652-657.

Goldsby, R., Kindt, T., Osborne, B., Kuby, J. 2004. **Inmunología**. Mc Graw Hill. Quinta Edición.

Goncalvez, A., Engle, R., Claire, M., Purcell, R., Lai, Ch-J. 2007. **Monoclonal antibody-mediated enhancement of dengue virus infection in vitro and in vivo and strategies for prevention**. *PNAS* **104**(22): 9422-9427.

Green, S., Rothman, A. 2006. **Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever**. *Curr Opin Infect Dis* **19**: 429-436.

Gromowski, G., Barrett, A. 2007. **Characterization of an antigenic site that contains a dominant, type-specific neutralization determinant on the envelope protein domain III (ED3) of dengue 2 virus**. *Virology* **366**(2): 349- 360.

Guzmán, M. 1980. **Dengue. I. Antecedentes Históricos; Agentes etiológicos; Cuadros Clínico**. *Rev Cub Med Trop* **32**: 2.

Guzmán, M., Alvarez, M., Vazquez, S., Kouri, G. 2005. **Laboratory diagnosis of dengue infection: epidemiology and field studies**. *TDR/IRM/DIAG/DEN* **1**:20-27.

Guzmán, M., García, G., Kourí, G. 2006. **El dengue y el dengue hemorrágico: prioridades de investigación**. *Rev Panam Salud Pública / Pan Am J Public Health* **19**(3): 204-215.

Guzmán, M., Álvares, M., Rodríguez-Roche, R., Bernardo, L., Montes, T., Vázquez, S., Morier, L., y colaboradores. 2007. **Neutralizing Antibodies after Infection with Dengue 1 Virus**. *EID Journal Home* **13** (2).

Halstead, S., Russ, S. B. 1962. **Subclinical Japanese encephalitis. II. Antibody responses of Americans to single exposure to JE virus**. *Am J Hyg.* **75**: 202 – 11.

Halstead, S. B. 1979. **In vivo enhancement of dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody**. *J. Infect. Dis.* **140**: 527 – 533.

Halstead, S. D. 1982. **Immune enhancement of viral infection**. *Prog in Allergy.* **31**: 202 – 9.

Harley, D., Sleight, A., Ritchie, S. 2001. **Ross River Virus Transmission, Infection, and Disease: a Cross-Disciplinary Review**. *Clin. microbiol. Rev* **14**(4): 909–932.

Herrera, R., Acosta, C., Melchor, A., Alonso, V., Solís, R., Vázquez, S. (2005). **UltramicroELISA para la detección de IgM anti dengue con reactivos listos para el uso**. *Rev Biomed* **16**(1):1-13.

- Janeway, Ch., Travers, P., Walport, M., Shlomchik, M., 2005. ***Immunobiology: The Immune System in Health & Disease***. Sixth Edition. Cap 2. p.p 87-92.
- Kao, C-L., King, C-C., Chao, D-Y., Wu, H-L., Chang, G-J. 2005. ***Laboratory diagnosis of dengue virus infection: current and future perspectives in clinical diagnosis and public health***. *J Microbiol Immunol Infect* **38**: 5-16.
- Kolokoltsov, A., Wang, E., Colpitts, T., Weaver S., Davey R. 2006. ***Pseudotyped Viruses Permit Rapid Detection of Neutralizing Antibodies in Human and Equine Serum Against Venezuelan Equine Encephalitis Virus***. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **75**(4):702-709.
- Kuberski, T., Rosen, L. 1977. ***Identification of Dengue viruses using Complement Fixing antigen produced in mosquitoes***. *Am. J. Trop. Med. Hyg* **26**(3): 538-543.
- Kuno, G., Oliver, A. 1989. ***Maintaining mosquito cell lines at high temperatures: effects on the replication of flaviviruses***. *In Vitro Cell Dev Biol.* **25**(2):193-6.
- Kuno, G., Chang, G-J. 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.* **18**: 608–637.
- Lambert, A., Martin, D., Lanciotti, R. 2002. ***Detection of North American Eastern and Western Equine Encephalitis Viruses by Nucleic Acid Amplification Assays***. *Journal of Clinical Microbiology* **41**(1):379–385.
- Li, L., Lok, S-M., Yu, I-M., Zhang, Y., Kuhn, R., Rossman, M. 2008. ***The Flavivirus Precursor Membrane – Envelope Protein Complex: Structure and Maturation***. *Science* **319**: 830- 834.
- Lin, C-F., Wan, S-W., Cheng, H-J., Lei, H-Y., Lin, Y-S. 2006. ***Autoimmune Pathogenesis in Dengue Virus Infection***. *Viral Immunology* **19**(2): 127-132.
- McArthur, M., Suderman, M., Mutebi, J., Xiao, S., Barrett, A. 2003. ***Molecular Characterization of a Hamster Viscerotropic Strain of Yellow Fever Virus***. *Journal of Virology* **77**(2):1462-1468.
- Montes, T. 2001. ***Actualización en dengue- Parte 2***. *Rev. Soc. Ven. Microbiol.* **21**(2)
- Morens, D., Halstead, S., Repik, P., Putvatana, R., Raybourne, N. 1985. ***Simplified Plaque Reduction Neutralization Assay for Dengue Viruses by Semimicro Methods in BHK-21 Cells: Comparison of the BHK suspension test with Standard Plaque Reduction Neutralization***. *Journal of Clinical Microbiology* **22**(2): 250 - 254.
- Neves-Souza, P., Azeredo, E., Zagne, S., Valls-de-Souza, R., Reis, S., Cerqueira, D., Nogueira, R., Claire, F., Kubelka, C. 2005. ***Inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in monocytes during acute Dengue Fever in patients and during in vitro infection***. *BMC Infect Dis* **5** (64).

Noisakran, S., Perng, G. 2007. ***Alternate Hypothesis on the Pathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever (DHF)/Dengue Shock Syndrome (DSS) in Dengue Virus Infection.*** *Minireview* **198**: 401-408.

Nowak, G., Schnellmann, R. G. 1995. ***Improved culture conditions stimulate gluconeogenesis in primary cultures of renal proximal tubule cells.*** *The American Physiological Society* **95**:C1053 - C1061.

Ocazonez, R., Gómez, S., Cortéz, F. 2007. ***Serotipo, Patrón de Infección y Dengue Hemorrágico en Área endémica Colombiana.*** *Rev Salud Pública* **9(2)**: 262 - 674.

Pang, T., Cardoso, M., Guzman, M. 2007. ***Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS).*** *Immunology and Cell Biology* **85**: 43-45

Pumarola, A., Pumarola, B. 1987. ***Microbiología y Parasitología Médica.*** 2ª Edición. Masson. España. **Cap. Virología.** p.p. 664-678.

Pupo, M., Amín, N., Álvarez, M., Morier, L., Rodríguez, Z., Guzmán, M.G. 2004. ***Amplificación dependiente de anticuerpos del virus del dengue en cepas cubanas utilizando anticuerpos monoclonales.*** *Rev cubana Med Trop.* **56(3)**:1987-202.

Pupo, M., Guzmán, M., Fernández, R., Llop, A., Dickinson, F., Pérez, D., Cruz, R., y colaboradores. 2006. ***West Nile Virus Infection in Humans and Horses, Cuba.*** *Emerging Infectious Diseases* **12** (6).

Putnak, R., de la Barrera, R, Burgess, T., Pardo, j., Dessy, F., Gheysen, D., Lobet, Y., y colaboradores. 2008. ***Comparative Evaluation of Three Assays for Measurement of Dengue Virus Neutralizing Antibodies.*** *Am. J. Trop Med. Hyg.* **79(1)**:115-122.

Raja, N., Holman, D., Wang, D., Raviprakash, K., Joumpan, L., Deitz, S., Luo, M., y colaboradores. 2007. ***Induction of Bivalent immune responses by expression of Dengue Virus Type 1 and Type 2 Antigens from a single complex adenoviral vector.*** *Am. J. Trop. Med. Hyg* **76(4)**: 743-751.

Richards, A., Bagus, R., Baso, S., Follows, G., Tan, R., Graham, R., Sandjaja, B., y colaboradores. 1997. ***The First reported outbreak of Dengue Hemorrhagic Fever in Irian Jaya, Indonesia.*** *Am.J.Trop. Med. Hyg* **57(1)**: 49-55.

Rodríguez, M., Marzal, M. 2004. ***Dengue: Una Revisión. Curso Latinoamericano Sobre Enfermedades Infecciosas.*** Instituto de Biomedicina, UCV. p.p.8,10,14

Rodríguez-Roche, R., Vázquez, S., Guzmán, M. 2005. ***Evaluation of a MRL Diagnostic IgM Capture ELISA Kit for Dengue Diagnosis.*** *Dengue Bulletin* **29**

Roehrig, J., Hombach, J., Barret, A. 2008. **Guidelines for Plaque-Reduction Neutralization testing of Human Antibodies to Dengue Viruses.** *Viral Immunology.* **21(2):** 123- 132.

Sanchez, M., Pierson, T., Mc Allister, D., Hanna, Sh., Puffer, B., Valentine, L., Murtadha, M., y colaboradores. 2005. **Characterization of neutralizing antibodies to West Nile virus.** *Virology.* **336:** 70-82.

Sangkawibha, N., Rojanasuphot, S., Ahandrik, S., Viriyapongse, S., Jatanasen, S., Salitul, V., Phanthumachinda, B., y colaboradores. 1984. **Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak.** *Am J Epidemiol.* **120(5):**653-69.

Scaramozzino, N., Crance, J-M., Jouan, A., Debriel, D., Stoll, F., Garin, D. 2001. **Comparison of Flavivirus Universal Primer Pairs and Development of a Rapid, Highly Sensitive Heminested Reverse Transcription-PCR Assay for Detection of Flaviviruses Targeted to a Conserved Region of the NS5 Gene Sequences.** *Journal of Clinical Microbiology* **39:(5)**1922–1927.

Schlesinger, J., Brandriss, M., Monath, T. 1983. **Monoclonal Antibodies Distinguish between Wild and Vaccine Strains of Yellow Fever Virus by Neutralization, Hemagglutination Inhibition, and Immune Precipitation of the Virus Envelope Protein.** *Virology* **125:** 8-17.

Seligman, S., Bucher, D. 2003. **The importance of being outer: consequences of distinction between the outer and inner surfaces of flavivirus glycoprotein E.** *Trends Microbiol.* **11(3):** 108-110.

Shu, P-Y, Huang, J-H. 2004. **Current Advances in Dengue Diagnosis.** *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology.* **11(4):** 642-650.

Sierra, B de la C., Kourí, G., Guzmán, M. 2006. **Race: a risk factor for dengue hemorrhagic fever.** *Arch Virol.* DOI. 10.1007/s00705-006-0869-x.

Singh, K.R y Paul, S.D. 1969. **Isolation of dengue viruses in Aedes albopictus cell cultures.** *Bull World Health Organ.* **40(6):** 982-3.

Sosothikul, D., Seksarn, P., Pongsewalak, S., Thisyakorn, U., Lusher, J. 2007. **Activation of endothelial cells, coagulation and fibrinolysis in children with Dengue virus infection.** *Thromb Haemost* **97:** 627-634.

Suzano, C., Amaral, E., Sato, H., Papaioordanou, P. 2006. **The effects of Bellow fever immunization (17DD) inadvertently used in early pregnancy Turing a mass campaign in Brazil.** *Vaccine* **24:**1421-1426.

Teixeira, A., Cunha, A., Clemente, J., Moreira, J., Cruz, H., Alves, P., Carrondo, M., y colaboradores. 2005. **Modelling and optimization of a recombinant BHK-21 cultivation process using hybrid grey-box systems.** *Journal of Biotechnology* **118**: 290- 303.

Tesh, RB. 1979. **A method for the isolation and identification of Dengue viruses, using mosquito cell cultures.** *Am. J. Trop. Med. Hyg* **28**(6): 1053-1059.

Torres, E., Muñoz, M., Rocha, M., López, J., Romero, F., Medina, A., García, A. 1998. **Validación Clínica del Inmunoensayo Rápido BioLine-hCG para el Diagnóstico precoz del embarazo Bioline-hCG.** *Rev Cubana Med* **37**(3): 131-5.

Unnasch, R., Sprenger, T., Katholi, C., Cupp, E., Hill, G., Unnasch, T. (2006). **A dynamic transmission model of eastern equine encephalitis virus.** *Ecol Modell* **192**(3-4): 425–440.

Valero, N. 2003. **Yellow fever in Venezuela.** *Invest Clin* **44**(4):269-71.

Vázquez, S., de la Cruz, F., Guzmán, M., Fernández, R. 1986. **Comparación de la Técnica de Fijación del Complemento, la Inhibición de la Hemaglutinación y el Ensayo Inmunoenzimático sobre fase sólida, para el diagnostico serológico del dengue.** *Rev Cub. Med. Trop* **38**(1): 7-14.

Vázquez, S., Pérez, A., Ruíz, D., Rodríguez, R., Pupo, M., Calzada, N., González, L., y colaboradores. 2004. **Serological markers during dengue 3 primary and secondary infections.** *Journal and Clinical Virology* **33** (2005): 132-137.

Watanaveeradej, V., Endy, T., Samakoses, R., Kerdpanich, A., Simasathien, S., Polprasert, N., Aree, C., y colaboradores. 2003. **Transplacentally transferred maternal-infant antibodies to dengue virus.** *Am. J. Trop. Med. Hyg* **69**(2): 123-128.

Weingartl, H., Debrot, M A., Hubálek, Z., Halouzka, J., Andonova, M., Dibernardo, A., Cottam-Birt, C., Larence, J., Marszal, P. 2002. **Comparison of assays for the detection of West Nile Virus antibodies in chicken serum.** *The Canadian Journal of Veterinary Research* **67**: 128-132.

Yamashiro, T., Disla, M., Petit, A., Taveras, D., Castro-Bello, M., Lora-Orste, M., Vardez, y colaboradores. 2004. **Seroprevalence of IgG Specific for Dengue Virus Among Adults and Children in Santo Domingo, Dominican Republic.** *Am. J. Trop. Med. Hyg* **71**(2): 138-14.

WHO. World Health Organization. Dengue en las Américas [En línea]. 2005. Disponible desde: URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/es/index.html>
Consulta: 20/03/08.

CDC. Dengue: Aspectos clínicos y de salud pública. [En línea]. 2002. Disponible desde: URL: <http://www.cdc.gov/Ncidod/dvbid/dengue/slideset/spanish/set1/i/slide04.htm>
Consulta: 12/02/08.

CENAVE. Dengue: Estructura viral. [En línea]. 2008. Disponible desde: URL: <http://www.cenave.gob.mx/dengue/default.asp?id=12> Consulta: 18/11/2007.

Universidad Virtual Manuel Fajardo. Dengue. [En línea]. 2005. Disponible desde: URL: http://www.uvfajardo.sld.cu/.../dengue/den_virus1.gif Consulta: 15/02/08.

Scielo. Sensibilidad y especificidad de los métodos diagnósticos convencionales de la caries oclusal según la evidencia científica disponible. [En línea]. 2002. Disponible desde: URL: http://www.scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1138-123x2002000600004&script=sci_arttext
Consulta: 10/07/09.