Universidad Nacional Mayor de San Marcos
Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

Comparación de la prueba de focos fluorescentes con el ensayo de placa para la cuantificación del virus Dengue serotipo 2, Fiebre Amarilla y Zika en las líneas celulares Vero-76, C6/36 y BHK-21

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo

AUTOR

Rubén Junior ARANCIBIA GONZÁLES

ASESOR

Dra. Egma MAYTA HUATUCO

Lima, Perú

2022



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Arancibia, R. (2022). *Comparación de la prueba de focos fluorescentes con el ensayo de placa para la cuantificación del virus Dengue serotipo 2, Fiebre Amarilla y Zika en las líneas celulares Vero-76, C6/36 y BHK-21*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Genética y Biotecnología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

Metadatos complementarios

Datos de autor	
Nombres y apellidos	Rubén Junior Arancibia Gonzáles
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	47090783
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0002-7037-3027
Datos de asesor	
Nombres y apellidos	Egma Marcelina Mayta Huatuco
Tipo de documento de identidad	DNI
Número de documento de identidad	06175080
URL de ORCID	https://orcid.org/0000-0001-8471-1675
Datos del jurado	
Presidente del jurado	
Nombres y apellidos	Juan Atilio Jiménez Chunga
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	06281952
Miembro del jurado 1	
Nombres y apellidos	Dan Erick Vivas Ruiz
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	41951131
Miembro del jurado 2	
Nombres y apellidos	Lourdes Elena Arbaiza Prado
Tipo de documento	DNI
Número de documento de identidad	07715318
Datos de investigación	
Línea de investigación	A.1.2.2. Principios Bioactivos

Grupo de investigación	Virologia Clinica Molecular Inmunopatogénesis y Antivirales - VIRMOLPA
Agencia de financiamiento	Perú. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Vicerrectorado de Investigación y Posgrado. Proyectos de investigación con Financiamiento para Grupos de Investigación Año-2018 RR Nº 03202-R-18 código B1810121
Ubicación geográfica de la investigación	Laboratorio de Virología Clínica y Molecular – Facultad de Ciencias Biológicas – Universidad Nacional Mayor de San Marcos. País: Perú Departamento: Lima Provincia: Lima Distrito: Lima Latitud: -12.059140711158639 Longitud: -77.08137919744274
Año o rango de años en que se realizó la investigación	2018 - 2020
URL de disciplinas OCDE	Virología https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.02 Bioquímica, Biología molecular https://purl.org/pe-repo/ocde/ford#1.06.03

Universidad Nacional Mayor de San Marcos
(Universidad del Perú, Decana de América)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE BIÓLOGO GENETISTA BIOTECNÓLOGO
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN VIRTUAL DE TESIS)

Siendo las 15:08 horas del 04 de enero de 2022, en el Salón de Grados Virtual de la Facultad de Ciencias Biológicas cuya dirección electrónica fue https://meet.google.com/cwb-uzei-zwe, y en presencia del Jurado formado por los profesores que suscriben, se inició la sesión para optar al **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** de **RUBÉN JUNIOR ARANCIBIA GONZÁLES.**

Luego de dar lectura y conformidad al expediente **N° UNMSM-20210059067**, el titulando expuso su Tesis: **"COMPARACIÓN DE LA PRUEBA DE FOCOS FLUORESCENTES CON EL ENSAYO DE PLACA PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL VIRUS DENGUE SEROTIPO 2, FIEBRE AMARILLA Y ZIKA EN LAS LÍNEAS CELULARES VERO-76, C6/36 Y BHK-21"**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 19, calificativo: Aprobado con máximos honores**.**

Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** a **RUBÉN JUNIOR ARANCIBIA GONZÁLES** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo grado, conforme a ley.

Siendo las 16:35 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 04 de enero de 2022.

UNMSM Firmado digitalmente por JIMENEZ CHUNGA Juan Atilio FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 04.01.2022 16:47:04 -08:00

Dr. JUAN JIMENEZ CHUNGA
(PRESIDENTE)

UNMSM Firmado digitalmente por MAYTA HUATUCO Egma Marcelina FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 04.01.2022 16:43:16 -05:00

Dra. EGMA MAYTA HUATUCO
(ASESORA)

UNMSM Firmado digitalmente por VIVAS RUIZ Dan Erick FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 04.01.2022 16:32:51 -05:00

Dr. DAN VIVAS RUIZ
(MIEMBRO)

UNMSM Firmado digitalmente por ARBAIZA PRADO Lourdes Elena FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 04.01.2022 16:36:46 -05:00

Blga. LOURDES ARBAIZA PRADO
(MIEMBRO)

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

INFORME DE EVALUACIÓN DE ORIGINALIDAD

ESCUELA PROFESIONAL : GENETICA Y BIOTECNOLOGIA
DIRECTOR DE LA ESCUELA PROFESIONAL : Mónica Paredes Anaya
OPERADOR DEL PROGRAMA INFORMATICO DE SIMILITUDES : DANIEL SAUL ORÉ CHáVEZ
DOCUMENTO EVALUADO* : COMPARACIÓN DE LA PRUEBA DE FOCOS FLUORESCENTES CON EL ENSAYO DE PLACA PARA LA CUANTIFICACIÓN DEL VIRUS DENGUE SEROTIPO 2, FIEBRE AMARILLA Y ZIKA EN LAS LÍNEAS CELULARES VERO-76, C6/36 Y BHK-21
AUTOR DEL DOCUMENTO** : Bach. RUBÉN JUNIOR ARANCIBIA GONZÁLES

FECHA DE RECEPCIÓN DEL DOCUMENTO : 25 /06 / 2020
FECHA DE APLICACIÓN DEL SISTEMA INFORMATICO : 25 /06 / 2020
SOFTWARE UTILIZADO :
TURNITIN (X)
ITHENTICATE ( )
OTRO
CONFIGURACION DEL PROGRAMA DE SIMILITUDES
Excluye textos entrecomillados (X)
Excluye bibliografía (X)
Excluye cadenas menores a 40 palabras (X)
Otro criterio ( ) (especificar)

PORCENTAJE DE SIMILITUDES * :** 2 POR CIENTO, 2%

FUENTES ORIGINALES DE LAS SIMILITUDES ENCONTRADAS ** :**
https://cybertesis.unmsm.edu.pe/handle/20.500.12672/9208 1%
https://repositorioinstitucional.buap.mx/bitstream/handle/20.500.12371/4784/838819T.pdf?se= 1%

OBSERVACIONES:
CALIFICACION DE ORIGINALIDAD:
Documento cumple criterios de originalidad sin observaciones (X)
Documento cumple criterios de originalidad con observaciones ( )
Documento no cumple criterios de originalidad ( )

FECHA DEL INFORME : 02 / 07 /2021

Daniel S. Oré Chavez
DNI: 10093526 COD:OA2046

UNMSM
Firmado digitalmente por PAREDES ANAYA Monica Yolanda FAU 20148092282 soft
Motivo: Soy el autor del documento
Fecha: 09.08.2021 06:33:34 -05:00

FIRMA DEL EVALUADOR

FIRMA DEL DIRECTOR EP

* Tesis para grado o título de pregrado
** Apellidos y nombres completos
*** En letras y números
**** Indicarlas en orden decreciente y su respectivo porcentaje

AGRADECIMIENTO

A mi familia y miembros del Laboratorio de Virología Clínica y Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM, por su apoyo constante e incondicional.

ÍNDICE

Página

LISTA DE ABREVIATURAS I

ÍNDICE DE FIGURAS II

ÍNDICE DE TABLAS IV

RESUMEN V

ABSTRACT VI

1. INTRODUCCIÓN 1

2. MARCO TEÓRICO 3

2.1 Características del género *Flavivirus* 3

2.1.1 Generalidades 3

2.1.2 Distribución geográfica y epidemiología 4

2.1.2 Líneas celulares permisivas 8

2.2 Cuantificación de partículas virales 9

2.2.1 Ensayo de placas 10

2.2.1 Ensayo de placas en *Flavivirus* 11

2.2.2 Prueba de focos fluorescentes 12

3. OBJETIVOS 14

4. MATERIALES 15

4.1 Material biológico 15

4.2 Insumos para cultivo celular y cuantificación viral 15

5. METODOLOGÍA 17

5.1 Propagación de las líneas celulares 17

5.2 Propagación y cosecha viral 18

5.3 Ensayo de placa para titulación viral 20

5.3.1 Ensayo de placa para titulación de ZIKV en las líneas celulares Vero-76 y BHK-21 20

5.3.1 Ensayo de placa para titulación de YFV en las líneas celulares Vero-76 y BHK-21 21

5.3.1 Ensayo de placa para titulación de DENV-2 en las líneas celulares Vero-76 y BHK-21 22

5.4 Prueba de focos fluorescentes para titulación viral 23

5.4.1 Prueba de focos fluorescentes para titulación de DENV-2, YFV y ZIKV en las líneas celulares Vero-76 y BHK-21 23
5.4.2 Prueba de focos fluorescentes para titulación de DENV-2, YFV y ZIKV en la línea celular C6/36 24
5.5 Estandarización de las diluciones de anticuerpo primario (anti-Flavivirus) y anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón) en la titulación por inmunofluorescencia 26
5.6 Análisis Estadístico 26
6. RESULTADOS 27
6.1 Mantenimiento y propagación de las líneas celulares 27
6.2 Propagación viral y preparación de las semillas virales 31
6.3 Preparación de las placas de cultivo celular con las líneas celulares Vero-76, BHK-21 y C6/36 32
6.4 Visualización del Efecto citopático en el ensayo de placas 33
6.5 Estandarización de las diluciones de anticuerpo primario (anti-Flavivirus) y anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón) en la titulación por Inmunofluorescencia 34
6.6 Titulación viral por ensayo de placas: Conteo de placas 36
6.7 Titulación viral por prueba de focos fluorescentes: Conteo de focos 37
6.8 Resultados de titulación de DENV-2 por ensayo de placas en las líneas celulares Vero-76 y BHK-21 39
6.9 Resultados de titulación de ZIKV por ensayo de placas en las líneas celulares Vero-76 y BHK-21 39
6.10 Resultados de titulación de YFV por ensayo de placas en las líneas celulares Vero-76 y BHK-21 40
6.11 Resultados de titulación de DENV-2 por prueba de focos fluorescentes en las líneas celulares Vero-76, BHK-21 y C6/36 40
6.12 Resultados de titulación de ZIKV por prueba de focos fluorescentes en las líneas celulares Vero-76, BHK-21 y C6/36 41
6.13 Resultados de titulación de YFV por prueba de focos fluorescentes en las líneas celulares Vero-76, BHK-21 y C6/36 41
6.14 Comparación entre la PFF y EP para titulación de DENV-2 en la línea celular Vero-76 42

6.15 Comparación entre la PFF y EP para titulación de DENV-2 en la línea celular BHK-21 42
6.16 Comparación entre la PFF y EP para titulación de ZIKV en la línea celular Vero-76 43
6.17 Comparación entre la PFF y EP para titulación de ZIKV en la línea celular BHK-21 43
6.18 Comparación entre la PFF y EP para titulación de YFV en la línea celular Vero-76 44
6.19 Comparación entre la PFF y EP para titulación de YFV en la línea celular BHK-21 44
7. DISCUSIÓN 45
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 49

LISTA DE ABREVIATURAS

DENV	Virus del Dengue
ZIKV	Virus del Zika
YFV	Virus de la Fiebre Amarilla
EP	Ensayo de placas
PFF	Prueba de focos fluorescentes
PRNT	Prueba de neutralización por reducción de placas
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
$TCID_{50}$	Dosis infectiva del cultivo celular al 50%
MC	Medio de Crecimiento
MM	Medio de Mantenimiento
E-MEM	Medio mínimo esencial con sales balanceadas de Earle
Ab	Anticuerpo
CMC	Carboximetilcelulosa
SBF	Suero Bovino Fetal
RT-PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa - Transcriptasa Reversa
UFF	Unidad Formadora de Foco
UFP	Unidad Formadora de Placa
ECP	Efecto citopático
OMS	Organización Mundial de la Salud
CDC	Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades
DMSO	Dimetilsulfóxido
NBB	Colorante Azul-Negro de Naftol
FITC	Fluoresceína Isotiocianato

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de trabajo para la realización del ensayo de placas 22

Figura 2: Esquema de trabajo para la realización de la prueba de focos fluorescentes 25

Figura 3: Crioviales descongelados para la propagación de la línea celular Vero-76) 26

Figura 4: Crecimiento de la línea celular Vero-76. Adherencia a la superficie y formación de la monocapa desde la etapa de descongelamiento 28

Figura 5: Crecimiento de la línea celular BHK-21. Adherencia a la superficie y formación de la monocapa desde la etapa de descongelamiento 29

Figura 6: Crecimiento de la línea celular C6/36. Adherencia a la superficie y formación de la monocapa desde la etapa de descongelamiento 30

Figura 7: Propagación viral evidenciada por la aparición del efecto citopático 31

Figura 8: Verificación de la formación de monocapa completa (100% de confluencia) en placas de cultivo celular 32

Figura 9: Reconocimiento de la formación de placas previo a la tinción 33

Figura 10: Lisado de Células C6/36 infectadas con virus de la Fiebre Amarilla. La dilución empleada para el anticuerpo primario es 1/10 y para el anticuerpo secundario 1/50 34

Figura 11: Lisado de Células C6/36 infectadas con virus de la Fiebre Amarilla. La dilución empleada para el anticuerpo primario es 1/50 y para el anticuerpo secundario 1/50 34

Figura 12: Lisado de Células C6/36 infectadas con virus de la Fiebre Amarilla. La dilución empleada para el anticuerpo primario es 1/100 y para el anticuerpo secundario 1/50 35

Figura 13: Lisado de Células C6/36 infectadas con virus de la Fiebre Amarilla. La dilución empleada para el anticuerpo primario es 1/200 y para el anticuerpo secundario 1/50 35

Figura 14: Resultados de titulación por ensayo de placas y su representación gráfica 36

Figura 15: Esquema de la distribución de las diluciones en la prueba de focos fluorescentes realizada 37

Figura 16: Resultados de la prueba de focos fluorescentes para infección por Virus Zika 38

Figura 17: Gráfico de cajas y bigotes para la comparación entre la titulación por PFF y EP de DENV-2 en la línea celular Vero-76 42

Figura 18: Gráfico de cajas y bigotes para la comparación entre la titulación por PFF y EP de DENV-2 en la línea celular BHK-21 42

Figura 19: Gráfico de cajas y bigotes para la comparación entre la titulación por PFF y EP de ZIKV en la línea celular Vero-76 43

Figura 20: Gráfico de cajas y bigotes para la comparación entre la titulación por PFF y EP de ZIKV en la línea celular bhk-21 43

Figura 21: Gráfico de cajas y bigotes para la comparación entre la titulación por PFF y EP de YFV en la línea celular Vero-76 44

Figura 22: Gráfico de cajas y bigotes para la comparación entre la titulación por PFF y EP de YFV en la línea celular BHK-21 44

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Número de subcultivos y temperaturas de mantenimiento de las líneas celulares empleadas 16

Tabla 2: Detalles de propagación viral y ensayos de titulación a los que serán sometidos 18

Tabla 3: Set de primers/sonda utilizados para determinación de estado de pureza 19

Tabla 4: Número de subcultivos realizados en la propagación de las líneas celulares 26

Tabla 5: Número de días empleados para realizar la cosecha y obtención de semillas virales 30

Tabla 6: Número de días empleados para realizar la visualización del efecto citopático necesario para la correcta titulación viral 32

Tabla 7: Resultados de titulación de DENV-2 por EP en las líneas celulares Vero-76 y BHK-21 38

Tabla 8: Resultados de titulación de ZIKV por EP en las líneas celulares Vero-76 y BHK-21 38

Tabla 9: Resultados de titulación de YFV por EP en las líneas celulares Vero-76 y BHK-21 39

Tabla 10: Resultados de titulación de DENV-2 por PFF en las líneas celulares Vero-76, BHK-21 y C6/36 39

Tabla 11: Resultados de titulación de ZIKV por PFF en las líneas celulares Vero-76, BHK-21 y C6/36 40

Tabla 12: Resultados de titulación de YFV por PFF en las líneas celulares Vero-76, BHK-21 y C6/36 40

RESUMEN

El género *Flavivirus* es un grupo de virus transmitidos por artrópodos pertenecientes a la familia *Flaviviridae*. Su genoma consiste de ácido ribonucleico de cadena simple positiva no segmentada y poseen partículas virales esféricas con envoltura entre los 40 a 60 nm de diámetro. Los Flavivirus han emergido globalmente y causan enfermedades humanas significativas en forma de encefalitis o fiebre hemorrágica. A nivel de laboratorio, el método "*Gold Standard*" para la cuantificación de *Flavivirus* es el ensayo de placa, el cual se basa en la formación de placas en una monocapa celular posterior a la infección viral. En esta investigación se propuso una técnica relacionada, la prueba de focos fluorescentes, la cual se realiza de forma muy similar a un ensayo de placa, y está basada en la detección de proteínas virales expresadas por las células infectadas mediante el uso de anticuerpos marcados fluorescentemente, la cual no requiere un recubrimiento fijador, y emplea sólo 48 horas de tiempo de infección para generar resultados. Para su evaluación y estandarización se seleccionaron 3 Flavivirus (Virus Dengue serotipo 2; virus de la Fiebre Amarilla y Virus Zika) en 3 líneas celulares utilizadas como sustrato (Vero-76, C6/36 y BHK-21). Se logró estandarizar el método para la cuantificación de Unidades Formadoras de Focos y los resultados demostraron que las titulaciones obtenidas por la prueba de focos fluorescentes son estadísticamente equivalentes o mayores a los obtenidos por el ensayo de placas.

ABSTRACT

Flavivirus is a genus of arthropod-borne viruses belonging to the family Flaviviridae. The flavivirus genome consists of nonsegmented single-stranded positive-sense ribonucleic acid and have enveloped and spherical virus particles that are between 40 and 60 nm in diameter. Flavivirus that emerge globally and cause significant human diseases like encephalitis or hemorrhagic fever. At laboratory level, plaque assay is a "Gold Standard" method for Flavivirus titer quantification, which is based on the formation of plaques in a cell monolayer after viral infection. In this investigation a related technique was proposed, the Fluorescent Focus Assay which is performed very similar to Plaque Assay, and is based on the detection of viral proteins expressed by infected cells through fluorescent-labeled antibodies, which does not require agar overlap, and uses only 24-72 hours of infection time to generate results. Three Flavivirus (Dengue serotype 2, Yellow Fever and Zika Virus) were selected in three cell lines used as substrate (Vero-76, C6/36 and BHK-21). The results showed that the titrations obtained by the fluorescent focus assay are statistically equivalent to or greater than the results obtained by the plaque assay.

1. INTRODUCCIÓN

El género *Flavivirus* es un grupo de virus transmitidos por artrópodos (arbovirus) pertenecientes a la familia *Flaviviridae*. Son virus con envoltura de ácido ribonucleico de cadena positiva que emergen globalmente y causan enfermedades humanas significativas en forma de encefalitis o fiebre hemorrágica (Monath y Heinz, 1996). Muchos patógenos humanos importantes, como los Serotipos del Virus del Dengue 1-4 (complejo DENV), Fiebre Amarilla (YFV), Encefalitis Japonesa (JEV), el Virus Zika (ZIKV) o el Virus de la Encefalitis de San Luis (SLEV) son miembros de este grupo (Huang et al. 2014). La diversidad de vectores artrópodos, las características de las enfermedades y la amplia distribución geográfica de los *Flavivirus* hace que estos virus sean interesantes, particularmente si se considera que la mayoría de las personas en todo el mundo viven en una región endémica de flavivirus. La relativa facilidad con la que algunos de estos virus pueden introducirse en nuevos entornos plantean inquietudes y resaltan la necesidad de una extensa investigación adicional sobre estos.

Entre las actividades de investigación en Virología, los ensayos de detección y cuantificación viral robustos y confiables son parte esencial del kit de herramientas del virólogo. En el caso de los *Flavivirus*, estos se pueden detectar y cuantificar usando una variedad de métodos básicos o sofisticados, que incluyen Ensayos de Placa, Reacción en Cadena de Polimerasa con Transcripción Inversa (RT-PCR), Microscopía Electrónica de Transmisión y ensayo de Dosis Infecciosas en Cultivo de Tejidos 50% ($DICT_{50}$), cada uno con sus propias limitaciones para la detección y cuantificación del material genómico viral, proteínas virales o partículas infecciosas intactas (Flint et al. 2004). El ensayo de placa clásico proporciona un método comprobado para determinar el título del virus; sin embargo, solo se puede aplicar a virus citopáticos (las placas surgen a través de la muerte celular mediada por virus dentro de una monocapa) y típicamente requiere que las placas crezcan hasta que sean visibles a simple vista, tomando varios días de espera. Una técnica relacionada, la prueba de focos fluorescentes (PFF), puede usarse para titular tanto virus citopáticos como no citopáticos en un tiempo considerablemente menor (Culley et al. 2016). Este ensayo se realiza de forma muy similar a un ensayo de placa. Sin embargo, no

necesita superposición de agar, y solo se requieren 24-72 horas de tiempo de infección para generar resultados, ahorrando así una cantidad de tiempo significativa en comparación con el ensayo de placa. Está basado en la detección de proteínas virales expresadas por las células infectadas mediante el uso de anticuerpos marcados fluorescentemente, donde las Unidades Formadoras de Fluorescencia (FFU) pueden visualizarse directamente y contabilizarse mediante microscopía de fluorescencia (Thiel y Smith, 1967).

La característica que resalta en la prueba de focos fluorescentes es el uso de anticuerpos como mecanismo de detección de antígenos virales, característica que se ha ido modificando y adaptando según la naturaleza viral. En un grado superior están los anticuerpos monoclonales (mAb) que actualmente son herramientas analíticas eficientes para la detección, cribado y caracterización de biomoléculas, y tienen una amplia aplicación como diagnóstico e inmunoterapia. Estos mAb se han utilizado con éxito para identificar la especificidad de serotipo de los virus del Dengue y de otros *Flavivirus* en el diagnóstico convencional como en aislamiento viral, y tanto proteínas de envoltura como las no estructurales han sido dianas de estos mAb en diferentes ensayos (Hogrefe et al. 2004; Young et al. 2000). Las proteínas de la cápside de distintos Flavivirus se han utilizado con fines terapéuticos y de vacunación, y ha sido posible detectarla en un estado intracelular gracias a la efectividad de los mAb (Bulich y Aaskov, 1992), esta ventaja evidencia la posibilidad del uso de un protocolo estandarizado extensible a muestras como cultivo celular infectado, vacunas con antígenos virales, muestras orgánicas, entre otras.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Características del Género Flavivirus

2.1.1 Generalidades

El género *Flavivirus* en la familia *Flaviviridae* comprende al menos 70 especies virales con un impacto epidemiológico global relevante (Vázquez et al., 2012). Más de la mitad de estas especies se consideran patógenos humanos que causan encefalitis, fiebre hemorrágica o fiebre bifásica (Calisher y Gould, 2003). Si bien la mayoría de los flavivirus son virus transmitidos por vectores (mosquitos o garrapatas), algunas especies son de vectores desconocidos (Karabatsos, 1985; Fauquet et al., 2005). Los flavivirus incluyen patógenos de vertebrados importantes como el virus del Nilo Occidental (WNV), virus del Dengue (DENV serotipos 1 al 4), virus de la Fiebre Amarilla (YFV), virus Zika (ZIKV), virus de la Fiebre Hemorrágica de Alkhumra (AHFV), virus de la Encefalitis Transmitida por Garrapatas (TBEV) y virus de la Encefalitis Japonesa (JEV) (Calisher y Gould, 2003).

Las partículas virales de flavivirus tienen una cápside icosaédrica, con un diámetro promedio de 40–60 nm, están envueltas y presentan un genoma compuesto por una única molécula de ARN de cadena sencilla y polaridad positiva de aproximadamente 11 kb de longitud, flanqueada por dos regiones no codificantes, éste contiene un único marco de lectura abierto (en inglés: Open Reading Frame, ORF) que codifica una sola poliproteína viral que se procesa mediante proteasas virales y celulares (Zhang et al, 2013; Sirohi et al. 2016). La entrada intracelular de los flavivirus se basa principalmente en la endocitosis mediada por fosas recubiertas de clatrina y su transporte por un compartimento endocítico. El entorno de pH bajo dentro de los endosomas desencadena cambios conformacionales en la glicoproteína de la envoltura (E), lo que conduce a la fusión de la membrana de la

envoltura viral con la membrana endosómica y la posterior liberación de la nucleocápside en el citosol. El ARN genómico de los flavivirus se traduce en una poliproteína viral, que es escindida por proteasas virales y celulares, para originar proteínas de flavivirus (Apte-Sengupta et al. 2014). Tres de estas proteínas son componentes estructurales de partículas virales, llamadas proteínas estructurales. La proteína E es el antígeno principal de la envoltura viral. Además de la proteína E, las partículas de flavivirus contienen también otra proteína de envoltura (M) y la proteína de la cápside (C). La poliproteína también origina proteínas no estructurales, que no están presentes en las partículas virales, pero tienen papeles importantes en la replicación viral y la patogénesis. Hay siete proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5. Después de la síntesis de proteínas, el ensamblaje de partículas virales se lleva a cabo en el retículo endoplásmico. Las partículas virales inmaduras se envían al complejo de Golgi para madurar por la actividad de la furina. Las partículas virales maduras se transportan a través de vesículas a la membrana plasmática y se liberan por exocitosis (Apte-Sengupta et al. 2014).

2.1.2 Distribución Geográfica y Epidemiología

Las Américas, África, Medio Oriente, Sudeste de Asia y Europa tienen al menos un seroritpo de Flavivirus en circulación (Saron et al. 2018). Muchas áreas del mundo presentan tanto fauna de vectores como condiciones geográficas compatibles con co-circulación, importación, emergencia y epidemias de flavivirus. El encuentro con múltiples flavivirus en la vida es cada vez más probable. La respuesta inmune humoral en reacción cruzada de flavivirus es compleja, teniendo el potencial de ayudar o empeorar el curso de la inmunidad a una infección posterior; características como el grado de similitud genética, la conformación de proteínas estructurales y la existencia de epítopos de células T de reacción cruzada pueden influir en cómo la inmunidad a un flavivirus puede

modificar el desarrollo de inmunidad y el resultado clínico de otro (Mansfield et al. 2011).

El mosquito *Aedes aegypti* es el vector primario de los flavivirus en estudio, mientras que *Aedes albopictus* permanece como el vector secundario. Al ser mosquitos hidrófilos, prefieren contenedores artificiales para la oviposición. Hasta hace poco, se creía que ovipositaban en agua clara y limpia. Sin embargo, algunos hallazgos recientes evidencian que pueden reproducirse no solo en cuerpos de agua limpia y clara, sino también en agua con alto contenido de materia orgánica, en condiciones de alta salinidad y bajos niveles de oxígeno disuelto (Gunathilaka et al. 2018).

En nuestra región, la infección por flavivirus transmitida por mosquitos está ampliamente propagada, y su complejidad ha ido aumentando con los años debido a varios factores, como el crecimiento urbano no planificado, problemas de agua y saneamiento, el cambio climático y ambiental y la circulación simultánea en la región de los cuatro serotipos de dengue, que aumenta el riesgo de presentar casos graves y la ocurrencia de brotes. En los últimos años se ha centrado la importancia en las condiciones ambientales, como la lluvia y la temperatura, relacionados ampliamente con los cambios en la dinámica de la población de los vectores de artrópodos. En el Perú una de las principales variables climáticas manifestadas es el Fenómeno del Niño, que es el ciclo climático más importante que contribuye a la variabilidad anual del clima, las temperaturas y la probabilidad de eventos naturales como fuertes lluvias, sequías y tormentas (Kovats et al. 2003). Estas condiciones climáticas han dado paso a la exacerbación de los casos de enfermedades transmitidas por vectores del género *Aedes*, trayendo consigo desnutrición causada por la pérdida de las plantaciones costeras e interrupción de los servicios de salud.

Durante la infección causada por vectores, el agente flaviviral es introducido en el hospedero a través de la saliva del mosquito infectado. El virus se replica en el punto de inoculación a nivel de los ganglios linfáticos. A partir de aquí se libera al torrente sanguíneo y alcanza diferentes órganos. El tropismo viral es variado y, generalmente, incluye el sistema nervioso, las fibras musculares, el miocardio, el endotelio vascular, las glándulas endocrinas y exocrinas, los músculos lisos, etc. Los síntomas que siguen a la infección humana con flavivirus varían desde infecciones asintomáticas clínicamente no aparentes hasta enfermedades graves y, a veces, fatales, que incluyen manifestaciones hemorrágicas de infección severa por virus de la Fiebre Amarilla (YFV) y virus Dengue (DENV), y encefalitis causada por infección con el virus de Encefalitis Japonesa (JEV) o virus del Oeste del Nilo (WNV). Los humanos al ser anfitriones sin salida para muchos arbovirus, incluidos JEV y WNV, desempeñan un papel importante en los ciclos de transmisión de YFV y DENV (Bowen et al. 2007; Barrett y Higgs, 2007; Gubler, 2004; Barret y Monath, 2003).

El género Flavivirus está involucrado en capítulos importantes de la historia epidemiológica mundial. Los arbovirus YFV, DENV, JEV y WNV causan colectivamente millones de infecciones y decenas de miles de muertes cada año (Petersen et al. 2005). Los virus de la Fiebre Amarilla, el virus del Dengue y el virus del Zika se importaron secuencialmente a varios países de América del Sur. Los casos de fiebre amarilla, causados por YFV, se notificaron por primera vez en Perú en 1740, miles de casos de fiebre amarilla fueron reportados hasta principios del siglo XX, cuando el mosquito *Aedes aegypti* fue identificado como el principal vector de la enfermedad. La erradicación del vector junto con la vacunación contribuyó a la eliminación de la fiebre amarilla de las zonas urbanas peruanas (Palma, 1873).

El virus Dengue es el patógeno más frecuentemente reportado como responsable de la enfermedad febril aguda en América Latina (Moreira et al. 2018). La infección es causada por cualquiera de los cuatro virus de dengue estrechamente relacionados (llamados serotipos) y estos pueden conducir a un amplio espectro de síntomas, incluidos algunos que son extremadamente leves (imperceptibles) a aquellos que pueden requerir intervención médica y hospitalización. En casos severos, pueden ocurrir muertes. No hay tratamiento para la infección en sí; pero los síntomas que experimenta un paciente pueden ser manejados. El año pasado, la OMS enumeró al dengue como una amenaza potencial entre diez enfermedades y los brotes actuales en muchos países confirman esta observación. En 1990, la primera epidemia causada por DENV se confirmó en Perú, desde entonces, muchas epidemias han llegado al país, generalmente relacionadas con la introducción de un nuevo serotipo o el cambio del serotipo dominante en una región determinada (MINSA, 2011). Tal flavivirus fue responsable de aproximadamente 17 mil casos de infecciones confirmadas durante el año 2019 (PAHO/WHO, 2019). Por lo tanto, DENV es considerado como el flavivirus de mayor relevancia epidemiológica del país.

El virus Zika se descubrió por primera vez en Uganda en 1947 (Dick et al. 1973), y desde entonces, ha habido datos limitados disponibles sobre su circulación en la región. Anteriormente, la evidencia virológica e inmunológica sugería que, aunque el ZIKV se distribuía ampliamente en África y Asia, la fiebre del Zika no era una enfermedad de preocupación sustancial para los seres humanos porque solo se habían documentado 14 casos en todo el mundo (Filipe et al. 1973; Simpson et al. 1964). En 2016 se notificaron brotes del virus en las Américas (Kindhauser et al. 2016), que condujeron a la declaración de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de una emergencia de salud pública de interés internacional por causa del virus del Zika. La mayor detección del

virus del Zika en todo el mundo y su asociación con brotes de enfermedades cada vez más grandes ha aumentado la conciencia de este patógeno emergente transmitido por mosquitos. Recientemente, el ZIKV, que era un patógeno previamente asociado con infecciones leves en África y Asia, se asoció con la microcefalia y el síndrome de Guillain-Barré en las Américas (PAHO/WHO, 2019). En el Perú, los primeros casos de infección por ZIKV se informaron a principios de 2015, en el noreste de Perú. El virus se propagó muy rápidamente y se informaron 14 casos sospechosos de microcefalia, además de muchos casos de abortos espontáneos y mortinatos en el país (PAHO/WHO, 2016). A pesar de la alta morbilidad y mortalidad asociadas con las infecciones por flavivirus, faltan terapias antivirales y los ensayos relacionados a esto continúan desarrollándose, por lo tanto, existe una necesidad apremiante de desarrollar una comprensión más profunda de las interacciones entre los flavivirus y su huésped celular.

2.1.3 Líneas celulares permisivas

En la naturaleza, los mosquitos y los mamíferos juegan un papel esencial en la propagación de los flavivirus, infectados a través de células susceptibles que, a su vez, pueden presentar factores únicos de huésped (Sessions et al. 2009). La conversión de estas células a sistemas de cultivo celular altamente permisivos ha contribuido en gran medida al aislamiento, propagación, diagnóstico, comprensión biológica, desarrollo de vacunas y pruebas de agentes antivirales.

La línea celular Vero, se obtuvo del riñón de un adulto de *Cercopithecus aethiops* (mono verde africano) (Sheets, 2000). Sin embargo, utilizando el análisis de ADN mitocondrial, se estableció que las células Vero provienen de *Chlorocebus sabaeus* (Osada, 2014). La característica que hace que las células Vero sean una de las líneas celulares más utilizadas en virología es su alta susceptibilidad a arbovirus, adenovirus, enterovirus e

influenzavirus (Nougairede et al. 2013; Damen et al. 2008; Liu et al. 2011; Zhai et al. 2012).

C6/36 es una línea celular clonal genéticamente homogénea derivada de tejidos larvarios de *Aedes albopictus* (Igarash, 1978). La línea celular C6/36 es altamente susceptible a diferentes arbovirus (Singh, 1967). Esta línea celular es fácil de manejar en un laboratorio, ya que puede incubarse a temperatura ambiente por hasta dos semanas sin cambiar el medio de cultivo celular. Además, tiene una alta proporción de propagación en subcultivos de 1:10, convirtiéndose en una monocapa confluente en cuatro días (White, 1996). La desventaja de esta línea celular es la resolución de resultados en el ensayo de placas, por lo que no es recomendada para este ensayo (Payne et al. 2006).

La línea celular BHK-21 en 1961 fue derivada originalmente por el aislamiento de una sola célula a partir de riñones de cinco hámsteres de un día de nacidos. Como características fundamentales esta línea posee rápido crecimiento, pasajes ilimitados y alta eficiencia en el plaqueo como la mayoría de las líneas de células continuas. Está constituida por células pseudo-fribroblásticas y actúa como un excelente substrato para la producción de varios virus como adenovirus, herpesvirus, virus de estomatitis vesicular y rabia, entre otros. Estas células derivan de la especie *Mesocricetus auratus*, comúnmente conocido como hámster dorado sirio. (ATCC, 1994).

2.2 Cuantificación de partículas virales

Uno de los procedimientos más importantes en virología es medir el título del virus: la concentración de virus en una muestra determinada. Un método ampliamente utilizado para determinar la cantidad de virus infecciosos es el ensayo en placa. Esta técnica se utilizó por primera vez para calcular los títulos de las reservas de bacteriófagos y fue Renato Dulbecco quien modificó este procedimiento para su uso en virología

animal en 1952 (Dulbecco y Vogt, 1953), y desde entonces se ha utilizado para la determinación confiable de los títulos de varios virus diferentes. Este tipo de cuantificación viral es posible gracias al proceso de formación de monocapa celular, donde células dependientes de anclaje requieren adherirse a un sustrato rígido para poder replicarse *in vitro*. Este proceso presenta un patrón característico de cinética de crecimiento. Primero, las células después de la alimentación se someten a un periodo quiescente durante el cual no hay división celular, a esta etapa se le conoce como fase de latencia. El tiempo de duración de esta fase es parcialmente dependiente del tipo de línea celular, composición del medio de cultivo, la densidad de alimentación y la manipulación previa de la línea celular. Segundo, las células ingresan a la fase logarítmica de crecimiento donde hay un incremento exponencial en el número de células. En esta fase el metabolismo celular se incrementa en su nivel máximo. Por último, ya cuando las condiciones de cultivo celular no toleran más divisiones este entra a la fase estacionaria donde el número de células permanece constante. Alcanzar la fase estacionaria es dependiente en gran medida de factores los nutricionales dentro del sistema y puede ocurrir antes o después de que la población cultivada ocupe toda la superficie de crecimiento disponible, lo que se conoce como confluencia (McAteer & Douglas 1979).

2.2.1 Ensayo de placas (EP)

Durante un ensayo de placa, una monocapa confluente de células huésped se infecta con un virus lítico de una concentración desconocida que se ha diluido en serie en un rango contable, típicamente entre 5-100 viriones. Luego, las monocapas infectadas se cubren con un medio de superposición inmovilizante para prevenir la infección viral, que se propaga indiscriminadamente a través del flujo mecánico o convectivo del medio líquido durante la propagación viral. Para evitar esta situación, tradicionalmente se han utilizado superposiciones sólidas o semisólidas como la agarosa, metilcelulosa o carboximetilcelulosa (CMC) en distintas concentraciones.

Después de la infección inicial y la aplicación de la capa de inmovilización, comenzarán a desarrollarse placas individuales o zonas de muerte celular, ya que la infección viral y la replicación están limitadas a la monocapa circundante. Las células infectadas continuarán el ciclo de replicación-lisis-infección, propagando aún más la infección, dando lugar a placas cada vez más distintas y discretas. De acuerdo con la cinética del crecimiento viral y la célula huésped utilizada, normalmente se formará una placa visible dentro de 2-14 días (Cooper, 1961). El efecto citopático causado por flavivirus suele ser degeneración de citoplasma, redondeamiento de células y desprendimiento de las mismas *in vitro* (Pereira, 1962). Después de fijar y teñir la monocapa celular infectada, se cuentan las placas de modo que se titulen las muestras de stock viral en términos de Unidades Formadoras de Placa (UFP) por mililitro.

La base de la técnica es medir la capacidad de una Unidad Formadora de Placa (UFP) de virus para formar una "placa" en un cultivo confluente en monocapa de células adherentes. Una placa resulta de la infección de una célula por una unidad formadora de placa seguida de la replicación de ese virus y, finalmente, la muerte de la célula. Desde la muerte de esta célula, las partículas virales recién replicadas se liberan, infectando y matando las células circundantes. Luego, el cultivo se expone a tinción, distinguiendo las células en la placa de la monocapa sana circundante.

2.2.2 Ensayo de placas en flavivirus

A diferencia de muchos otros flavivirus transmitidos por mosquitos, las cepas de los virus Dengue, Zika y Fiebre Amarilla crecen rápidamente y tienen títulos altos en cultivos de células de mamíferos y mosquitos. Además, de forma natural, las cepas de estos flavivirus generalmente tienen características de plaqueado consistentes que facilitan la cuantificación de partículas de virus infecciosos. Los materiales de partida para la propagación de estos virus pueden ser sobrenadantes de cultivo, suero/plasma, o tejidos

de animales clarificados y/o homogeneizados de mosquitos (CDC, 2009).

2.2.3 Prueba de focos fluorescentes (PFF)

A lo largo del tiempo se han reportado inmunoensayos cuantitativos basados en la identificación de focos de células infectadas por virus. Igarashi y Mantani (1974) describieron un ensayo de focos fluorescentes para la titulación del virus de Dengue 4 en células BHK21. Ambos autores resaltaron que las pruebas replicadas indicaban que los focos fluorescentes formados se correlacionaban con las diluciones de virus y que la sensibilidad de este método es comparable con las titulaciones en ratones y en cultivos de tejidos. Randolph y Hardy (1988) emplearon un ensayo de concentración de inmunoperoxidasa para evaluar líneas celulares de mosquitos que estaban infectadas de forma persistente con el virus St. Louis encephalitis. Mendez y colaboradores (1998) visualizaron los focos formados en las células MDBK por el virus de la diarrea viral bovina no citopática mediante tinción con inmunoperoxidasa. Yang et al. el mismo año validaron el ensayo de focos fluorescentes para la detección y cuantificación de una vacuna tetravalente de rotavirus, cuya prueba identificó los cuatro componentes diferentes de la vacuna empleando anticuerpos monoclonales específicos. Lonsdale y colaboradores (2003) desarrollaron un método rápido para la inmunotitulación del virus de la influenza mediante citometría de flujo cuyos títulos virales obtenidos por clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS) se correlacionaron con los obtenidos en un ensayo de placa estándar.

El ensayo se realiza de la misma manera que un ensayo en placa, sin embargo, no se requiere superposición de agar y solo se necesitan 24-72 horas de tiempo de infección para generar resultados, reduciendo drásticamente el tiempo y eliminando las revisiones diarias hasta la formación de placas. Las proteínas

virales expresadas por las células infectadas se detectan mediante el uso de anticuerpos marcados con fluorescencia y las unidades formadoras de focos (UFF) de fluorescencia pueden visualizarse y contarse directamente mediante microscopía de fluorescencia entre 24 a 72 horas posteriores a la infección.

Estas pruebas son más sensibles y más rápidas que los ensayos de placa tradicionales (Payne et al. 2006), integrando la detección de los focos de fluorescencia por anticuerpos específicos como un medio de aumentar la sensibilidad del ensayo y, por lo tanto, permite la detección más temprana de focos muy pequeños que normalmente no son visibles a simple vista y disminuye los errores de contabilización provocados por superposición de las placas al aumentar su radio con el paso de los días.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

- Evaluar la eficacia de la prueba de Focos Fluorescentes para la cuantificación de los virus causantes del Dengue (serotipo 2), Fiebre Amarilla y Zika en las líneas celulares Vero-76, BHK-21 y C6/36 en comparación con el ensayo de placas.

3.2 Objetivos Específicos

- Estandarizar la prueba de focos fluorescentes para Virus Dengue serotipo 2 en las líneas celulares Vero-76, BHK-21 y C6/36.
- Estandarizar la prueba de focos fluorescentes para Virus de Fiebre Amarilla en las líneas celulares Vero-76, BHK-21 y C6/36.
- Estandarizar la prueba de focos fluorescentes para Virus Zika en las líneas celulares Vero-76, BHK-21 y C6/36
- Comparar los resultados de cuantificación viral de la prueba de focos fluorescentes contra el ensayo de placas para el Virus Dengue serotipo 2, Virus de Fiebre Amarilla y Virus Zika en cultivo en la línea celular Vero-76.
- Comparar los resultados de cuantificación viral de la prueba de focos fluorescentes contra el ensayo de placas para el Virus Dengue serotipo 2, Virus de Fiebre Amarilla y Virus Zika en la línea celular BHK-21.

4. MATERIALES

4.1 Material biológico

- **Líneas Celulares:** Se emplearon 3 líneas celulares como sustrato para los ensayos de cuantificación viral: línea celular Vero-76 (células de riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*), la línea celular C6/36 (células de larvas de mosquito tigre asiático *Aedes albopictus*) y la línea celular BHK-21 (células de hámster dorado sirio *Mesocricetus auratus*). Las 3 líneas fueron adquiridas desde ATCC (American Type Culture Collection) y criopreservadas en Nitrógeno líquido a -196°C. Cada línea celular presentaba un número de subcultivo distinto (Tabla 1).

- **Cepas virales:**

  - Virus Zika (ZIKV): Obtenida del laboratorio de Virología Clínica y Molecular de la Universidad de São Paulo - Brasil.
  - Virus Dengue – 2 (DENV-2): Aislado de una muestra de suero en fase aguda de Dengue (CLAS Tambopata, Madre de Dios - Perú).
  - Virus de Fiebre Amarilla (YFV): Cepa vacunal 17D (virus atenuados cultivados en embriones de pollo libres de patógenos) otorgado por el laboratorio de Virología Clínica y Molecular de la Universidad de São Paulo - Brasil.

4.2 Insumos

- **Medio de crecimiento:** Conformado por Medio Mínimo Esencial (E-MEM) suplementado con suero bovino fetal al 10% (SBF), 2% de L-glutamina 200 mM, 100 µg/mL de antibióticos/antimicóticos, 2% de aminoácidos no esenciales.

- **Medio de mantenimiento:** Conformado por Medio Mínimo Esencial (MEM Eagle) suplementado con suero bovino fetal al 2% (SBF), 2% de L-glutamina 200 mM, 100 µg/mL de antibióticos/antimicóticos, 2% de aminoácidos no esenciales.

- **Medio de recubrimiento - CMC:** Conformado por Carboximetilcelulosa (CMC) al 3%, Medio Mínimo Esencial (MEM Eagle) suplementado con suero bovino fetal al 10% (SBF), 2% de L-glutamina 200 mM, 100 µg/mL de antibióticos/antimicóticos, 2% de aminoácidos no esenciales.

- **Anticuerpos:** Se empleó un Kit de tinción por anticuerpos para detección de Flavivirus:
  - **Anticuerpo primario**: Producido en ratón, anticuerpo anti-Grupo de antígenos de flavivirus, clona D1-4G2-4-15 específico para virus del género flavivirus (Sigma-Aldrich, USA).
  - **Anticuerpo secundario**: Específico, anti - IgG de ratón (molécula completa), anticuerpo con Fluoresceína Isotiocianato (FITC) producido en cabra (Sigma-Aldrich, USA).

5. METODOLOGÍA

La Investigación se ejecutó en el Laboratorio de Virología Clínica y Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM.

5.1 Propagación de las líneas celulares:

Descongelación: Los 3 crioviales que preservaban las líneas celulares en Nitrógeno Líquido contaban con una cantidad de 1-2x10^5 células/mL de cada línea celular aproximadamente. Éstos fueron retirados de criopreservación y descongelados inicialmente en baño maría. Inmediatamente el contenido de cada criovial descongelado (~1 mL) fue inoculado a frascos de cultivo celular T-25 que contenían 5 mL de medio de crecimiento y fueron incubados por una hora a una temperatura correspondiente según la línea celular (Tabla 1), posteriormente se realizó un cambio de medio por decantación, retirando el medio inicial y reponiendo 6 mL de medio de crecimiento. Los 3 frascos se incubaron nuevamente hasta observar la formación de monocapa confluente al 100% (4-6 días).

Tabla 1: Número de subcultivos y temperaturas de mantenimiento de las líneas celulares empleadas.

Línea Celular	N° de subcultivo Inicial	Temperatura de descongelamiento	Temperatura de incubación
Vero-76	144	37°C	37°C
BHK-21	76	37°C	37°C
C6/36	71	28°C	28°C

Mantenimiento y Propagación: La metodología de subcultivo celular fue realizada para mantener activas y propagar las líneas celulares, generando estabilidad posterior al descongelamiento. Para las células Vero-76 y BHK-21 el subcultivo se realiza en un estado de monocapa celular confluente al 100%, en este estado el medio de crecimiento contenido de los frascos de cultivo celular es decantado y descartado,

para posteriormente adicionar 1 mL de Tripsina – EDTA (Sigma-Aldrich, USA) por cada 20 cm^2 de monocapa celular. Se deja en incubación por aproximadamente 5 – 15 minutos hasta observar el desprendimiento de las células por microscopio invertido. Rápidamente las células en suspensión son mezcladas con medio de mantenimiento y son llevadas a centrifugación. Paralelamente una alícuota es retirada en condiciones de esterilidad para realizar el conteo celular. La centrifugación es realizada a 1500 RPM por 5 minutos y el pellet formado es separado del sobrenadante por decantación. Finalmente, las células son resuspendidas en medio de crecimiento y alicuotadas en nuevos frascos de cultivo celular T en concentraciones de $1x10^6$ células/mL aproximadamente.

En el caso del subcultivo de la línea celular C6/36, no requiere el componente Tripsina-EDTA, debido a que las células se liberan al medio por acción mecánica dando suaves golpes en la base del frasco de cultivo que los contiene, dejando a las células en suspensión. Al igual que la metodología descrita para Vero-76 y BHK-21, una alícuota fue retirada en condiciones de esterilidad para realizar el conteo celular y se realiza una centrifugación a 1500 RPM por 5 minutos, resuspendiendo el pellet en medio de crecimiento y alicuotándolo en nuevos frascos de cultivo celular T en concentraciones de $1x10^6$ células/mL aproximadamente.

5.2 Propagación y cosecha viral:

Propagación: Se realizó la propagación de las 3 cepas virales en estudio en la línea celular BHK-21, generando 3 frascos de cultivo infectados, ejecutando la siguiente metodología para cada caso: En un frasco de cultivo celular T-25 se introdujo la mezcla celular designada y se incubó posteriormente hasta observar la formación de monocapa en una confluencia entre el 80 al 100%. En este estado el medio sobrenadante fue retirado y reemplazado por 150 µL del virus designado, incubando por 1 hora (periodo de adherencia). Posterior a la incubación se inocularon 6

mL de medio de mantenimiento y se incubó nuevamente hasta observar efecto citopático de 3 cruces.

Tabla 2: Detalles de propagación y ensayos de titulación viral

Línea celular	Concentración de la mezcla celular	Días para formación de monocapa confluente (80-100%)	Cepa viral	Ensayos en los que serán titulados*
Vero-76	1.25 x 10^5 células por mL de MC	4-6 días	ZIKV	PFF Y EP
			DENV-2	PFF Y EP
			YFV	PFF Y EP
BHK-21	1.25 x 10^5 células por mL de MC	5-7 días	ZIKV	PFF Y EP
			DENV-2	PFF Y EP
			YFV	PFF Y EP
C6/36	2.5 x 10^5 células por mL de MC	3-5 días	ZIKV	PFF
			DENV-2	PFF
			YFV	PFF

* **PFF:** Prueba de focos fluorescentes; **EP:** Ensayo de placas

Cosecha viral: Se realizaron pasajes virales sucesivos para adaptación de los virus a la línea celular, evidenciado por efecto citopático de 3 cruces en la menor cantidad de días. Después de la adaptación el medio de mantenimiento sobrenadante y contenedor de restos celulares y partículas virales fue centrifugado a 6000 rpm a 4°C durante 10 minutos, del cual el sobrenadante fue rescatado, homogenizado y alicuotado en crioviales para ser almacenado (-80°C) y usado en los posteriores ensayos titulación viral.

Determinación del estado de pureza de las cepas virales: Se realizó una RT-PCR en tiempo real para cada una de las cepas virales. Se empleó el termociclador Rotor-Gene Q de la marca QIAGEN. El set de primers utilizado en cada cepa se muestra en la tabla 3.

Tabla 3: Set de primers/sonda utilizados para determinación de estado de pureza.

Cepa viral	Primer/Sonda	Secuencia
ZIKV*	ZIKV F	5´-TTGGTCATGATACTGCTGATTGC-3´
	ZIKV R	5´-CCTTCCACAAAGTCCCTATTGC-3´
	ZIKV FAM	5´-CGGCATACAGCATCAGGTGCATAGGAG-3´
DENV-2**	DEN-2 F	5´-CAGGTTATGGCACTGTCACGAT-3´
	DEN-2 C	5´-CCATCTGCAGCAACACCATCTC-3´
	DEN-2 HEX	5´-CTCTCCGAGAACAGGCCTCGACTTCAA-3´
YFV***	YFV F	5´-GCTAATTGAGGTGYATTGGTCTGC-3´
	YFV R	5´-CTGCTAATCGCTCAAMGAACG-3´
	YF Cy5	5´-CTGCTAATCGCTCAAMGAACG-3´

*Diseñados en la cepa ZIKV 2007, posición genómica 835-890 (Lanciotti et al. 2008)
** Detección específica de serotipo 2 de DENV, posición genómica 1583-1605 (Johnson et al. 2005)
*** Compatible con la cepa vacunal, posición genómica 15-103 (Domingo et al. 2012)

5.3 Ensayo de placa para titulación viral

5.3.1 Ensayo de placa para titulación de ZIKV en las líneas celulares Vero-76 y BHK-21

Plaqueo: Para la prueba en cada línea celular se utilizó una placa de 24 pozos donde se adicionaron 500 µL de células a cada pozo a una concentración de 1.25 x 10^5cél/mL; luego, se incubaron a 37°C (Vero-76 y BHK-21) hasta la formación de monocapa en el fondo del pozo. El esquema de trabajo de titulación viral por ensayo de placa es compartido por las 3 cepas virales en estudio (**Figura 1**).

Infección viral: Posterior a la formación de la monocapa se infectó con ZIKV usando una dilución seriada de 10^{-1} hasta 10^{-7} usando medio de mantenimiento. Se selló cada pozo después de 4 horas de incubación usando el medio de recubrimiento y se incubó herméticamente hasta la visualización de efecto citopático (placas).

Coloración: Se colorearon los pozos con 500 µL de colorante Naphthol Blue Black para el respectivo análisis de placas y la obtención del título viral de ZIKV por ensayo de placa.

5.3.2 Ensayo de placa para titulación de YFV en las líneas celulares Vero-76 y BHK-21

Plaqueo: Usando una placa de 24 pozos se adicionó a cada pozo 500 µL a una concentración de 1.25 x 10^5 cel/ml; luego, se incubaron a 37°C durante 1 hora.

Infección viral: Posterior a la incubación los pozos se infectaron con DENV-2 usando una dilución seriada desde 10^{-1} hasta 10^{-7} usando medio de mantenimiento. Se selló cada pozo después de 4 horas de incubación usando el medio de recubrimiento y se incubó herméticamente hasta la visualización de efecto citopático (placas).

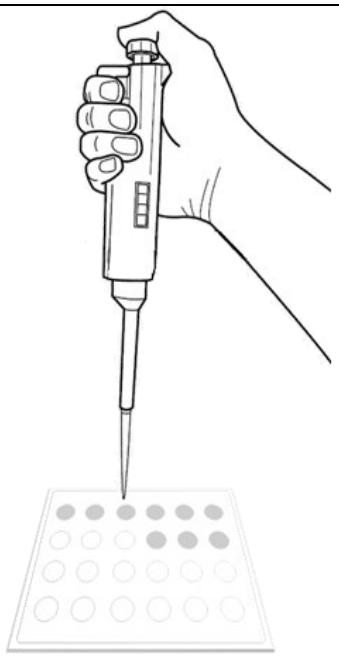
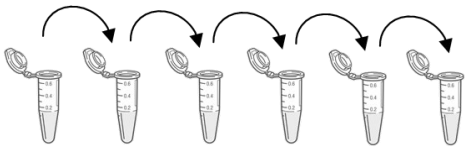
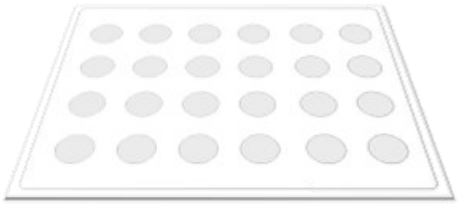
Coloración: Se colorearon los pozos con 500 µL de colorante Naphthol Blue Black para el respectivo análisis de placas y la obtención del título viral de DENV-2 por ensayo de placa.

5.3.3 Ensayo de placa para titulación de DENV-2 en las líneas celulares Vero-76 y BHK-21

Plaqueo: Usando una placa de 24 pozos se adicionó a cada pozo 500 µL a una concentración de 1.25 x 10^5 cel/mL, luego se incubó a 37°C durante 1 hora.

Infección viral: Posterior a la incubación los pozos se infectaron con DENV-2 adaptado a su respectiva línea celular usando una dilución seriada desde 10^{-1} hasta 10^{-7} usando medio de mantenimiento. Se selló cada pozo después de 4 horas de incubación usando el medio de recubrimiento y se incubó herméticamente hasta la visualización de efecto citopático (placas).

Coloración: Se colorearon los pozos con 500 µl de colorante Naphthol Blue Black para el respectivo análisis de placas y la obtención del título viral de DENV-2 por ensayo de placa.

<table>
<tr><td></td><td>Se prepararon las placas de cultivo de fondo plano a una concentración determinada según la Línea celular y el diámetro del pozo. Las células fueron incubadas en medio de crecimiento hasta llegar al 100% de confluencia.</td></tr>
<tr><td colspan="2">1 – 2 días de incubación (Formación de monocapa)</td></tr>
<tr><td>
→ 1:10 →</td><td>Se realizaron diluciones seriadas de un determinado flavivirus en medio de mantenimiento. Se incubaron por 1 hora antes de ser inoculados.</td></tr>
<tr><td>↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓

10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} 10^{-7} B C</td><td>Distintas diluciones fueron inoculadas e incubadas 4 horas antes de sellarlas con medio de recubrimiento.

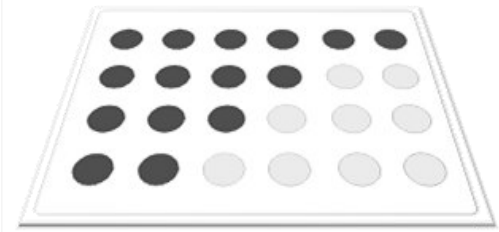
B = Blanco
C= Control</td></tr>
<tr><td colspan="2">6 – 8 días de incubación</td></tr>
<tr><td></td><td>Las placas son reveladas con el colorante Naphthol Blue Black.</td></tr>
</table>

Figura 1. Esquema de trabajo para la realización del ensayo de placas

5.4 Prueba de focos fluorescentes para titulación viral

El esquema de trabajo de titulación viral por prueba de focos fluorescentes es compartido por las 3 cepas virales en estudio (**Figura 2**)

5.4.1 Prueba de focos fluorescentes para titulación de DENV-2, YFV y ZIKV en las líneas celulares Vero-76 y BHK-21

La prueba de focos fluorescentes se realizó de manera similar para las 3 cepas virales en las 2 líneas celulares.

Plaqueo: En una placa de 96 pozos se adicionó a cada pozo 100 µL de células a una concentración de 1.25 x 10^5cel/mL (BHK-21 y Vero-76); luego, se incubaron a 37°C (Vero-76 y BHK-21) hasta la formación de monocapa en el fondo de los pozos.

Infección viral: Posterior a la formación de la monocapa se infectó con el virus usando una dilución seriada desde 10^{-1} hasta 10^{-7}. Se selló cada pozo después de 4 horas de incubación usando el medio de recubrimiento y se incubó herméticamente.

Tinción fluorescente: Para la estandarización de esta etapa las células se incubaron con los virus durante 24, 48 y 36 horas para determinar un tiempo mínimo de incubación que produzca una tinción efectiva y una adecuada titulación viral. En los tiempos programados las células se fijaron con metanol-etanol 1:1 durante unos minutos y se lavaron con solución PBS 1X por 5 minutos 3 veces. Posteriormente, las placas se incubaron con el anticuerpo primario específico para la familia flavivirus durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda, luego fueron lavados con PBS 1X 3 veces e incubados con el anticuerpo conjugado marcado fluorescentemente durante 1 hora a 37°C. Finalmente las células se lavaron con PBS 1X y se analizaron para la detección de focos infecciosos usando un microscopio de fluorescencia Leica DM2500.

5.4.2 Prueba de focos fluorescentes para titulación de DENV-2, YFV y ZIKV en la línea celular C6/36

La prueba de focos fluorescentes se realizó de manera similar para las 3 cepas virales en la línea celular C6/36 (Figura 2):

Plaqueo: Usando una placa de 96 pozos se adicionó a cada pozo 100 µL de células a una concentración de 2.5 x 10^5cel/mL; luego, se incubaron a 28°C hasta la formación de monocapa en el fondo de los pozos.

Infección viral: Posterior a la formación de la monocapa se infectó con el virus usando una dilución seriada desde 10^{-1} hasta 10^{-7}. Se selló cada pozo después de 4 horas de incubación usando el medio de recubrimiento y se incubó herméticamente.

Tinción fluorescente: Para la estandarización de esta etapa las células se incubaron con los virus durante 24, 48 y 36 horas para determinar un tiempo mínimo de incubación que produzca una tinción efectiva y una adecuada titulación viral. En los tiempos programados las células se fijaron con metanol-etanol 1:1 durante unos minutos y se lavaron con solución PBS 1X por 5 minutos 3 veces. Posteriormente, las placas se incubaron con el anticuerpo primario específico para la familia flavivirus durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda, luego fueron lavados con PBS 1X 3 veces e incubados con el anticuerpo conjugado marcado fluorescentemente durante 1 hora a 37°C. Finalmente las células se lavaron con PBS 1X y se analizaron para la detección de focos infecciosos usando un microscopio de fluorescencia Leica DM2500.

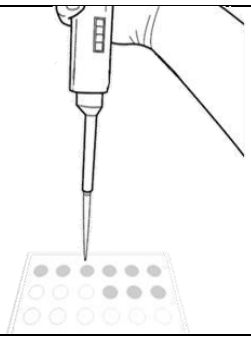
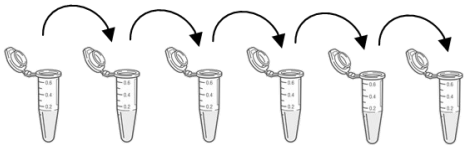
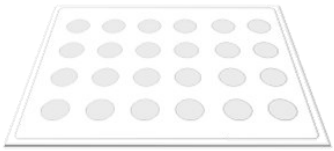
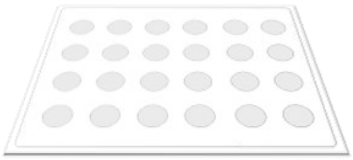
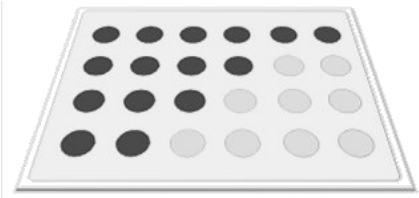
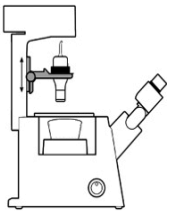
	Se prepararon las placas de cultivo de fondo plano a una concentración determinada según la línea celular y el diámetro del pozo. Las células fueron incubadas en medio de crecimiento hasta llegar al 100% de confluencia.
1 – 2 días de incubación (Formación de monocapa)	
 → 1:10 →	Se realizaron diluciones seriadas de un determinado flavivirus en medio de mantenimiento. Se incubaron por 1 hora antes de ser inoculados.
↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓ ↓  10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} 10^{-6} 10^{-7} B C	Distintas diluciones fueron inoculadas e incubadas 4 horas antes de sellarlas con medio de recubrimiento. B = Blanco C= Control
2 días de incubación	
	Las células se fijaron con metanol-etanol 1:1 (250 µl) durante unos minutos.
Los pozos se lavaron con solución PBS 1X a -4°C por 5 minutos 3 veces.	
	Las placas se incubaron con el anticuerpo primario específico para la familia flavivirus durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda.
Los pozos se lavaron con solución PBS 1X a -4°C por 5 minutos 3 veces.	
	Son incubados con el anticuerpo conjugado marcado fluorescentemente durante 1 hora a 37°C. Finalmente las células se lavaron con PBS 1X y se analizaron para la detección de focos infecciosos usando un microscopio de fluorescencia.
Los pozos se lavaron con solución PBS 1X a -4°C por 5 minutos 3 veces.	
	Finalmente la detección de focos infecciosos usando un microscopio de fluorescencia.

Figura 2. Esquema de trabajo para la realización de la prueba de focos fluorescentes

5.5 Estandarización de las diluciones de anticuerpo primario (anti-Flavivirus) y anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón) en la titulación por inmunofluorescencia

Se evaluaron ambos anticuerpos en distintas diluciones, asegurando el uso óptimo de los mismos. Para esta estandarización se preparó un cultivo de células C6/36 (por técnica de subcultivo) en un frasco de cultivo celular T-75 hasta la observación de una confluencia cercana al 100%. En este estado, se retiró el sobrenadante (medio de crecimiento) y se inoculó 100 µL de virus de la Fiebre Amarilla por una hora. Finalmente se añadió 15 mL de medio de mantenimiento y se incubó por 9 días aproximadamente hasta lograr un efecto citopático de 3 cruces. Posterior a la propagación viral, todo el contenido del frasco fue centrifugado a 2000 RPM por 10 minutos a 4°C. El pellet consistente de células C6/36 infectadas fue resuspendida en 5mL de PBS 1X estéril. Esta suspensión fue inoculada en láminas de visualización de alícuotas de 18 campos a razón de 20 µL por pozo. Estas láminas secaron en Cabina de Bioseguridad Tipo 2A por 6 horas y fijadas en metanol-etanol 1:1 por 30 minutos. Posteriormente, las láminas se incubaron con el anticuerpo primario específico para la familia flavivirus durante 1 hora a 37°C en cámara húmeda, luego fueron lavados con PBS 1X 3 veces e incubados con el anticuerpo conjugado marcado fluorescentemente durante 1 hora a 37°C. Finalmente las células se lavaron con PBS 1X y se analizaron para visualización de intensidad usando un microscopio de fluorescencia Leica DM2500.

5.6 Análisis Estadístico

Todos los análisis estadísticos para determinar los resultados de especificidad, exactitud y precisión de la prueba de Focos Fluorescentes comparada al ensayo de placas Estándar se realizaron en el software IBM SPSS Statistics V22.0

6. RESULTADOS

6.1 Mantenimiento y Propagación de las líneas celulares Vero-76, BHK-21 y C6/36

Todas las líneas celulares mostraron estabilidad a las condiciones en que fueron cultivadas (**Figuras 4, 5 y 6**), el cambio de medio inicial posterior al descongelamiento se realizó para liberar a las células del componente criopreservante Dimetil-Sulfóxido (DMSO) el cual resulta tóxico a temperatura de ambiente y representa un 10% del volumen del vial criopreservado. Las rutinas de Propagación - subcultivo resultaron exitosos para la obtención de células requeridas permitiendo su disponibilidad para los protocolos de infección y titulación viral. Durante el desarrollo completo de esta investigación se realizó una cantidad reducida de subcultivos (**Tabla 4**) en las líneas celulares utilizadas.

Tabla 4: Número de subcultivos realizados en la propagación de las líneas celulares.

Línea Celular	N° de subcultivo Inicial	N° de subcultivos Realizados
Vero-76	144	8
C6/36	76	7
BHK-21	71	8



Figura 3: Criovial descongelado para la propagación de la línea celular Vero-76.

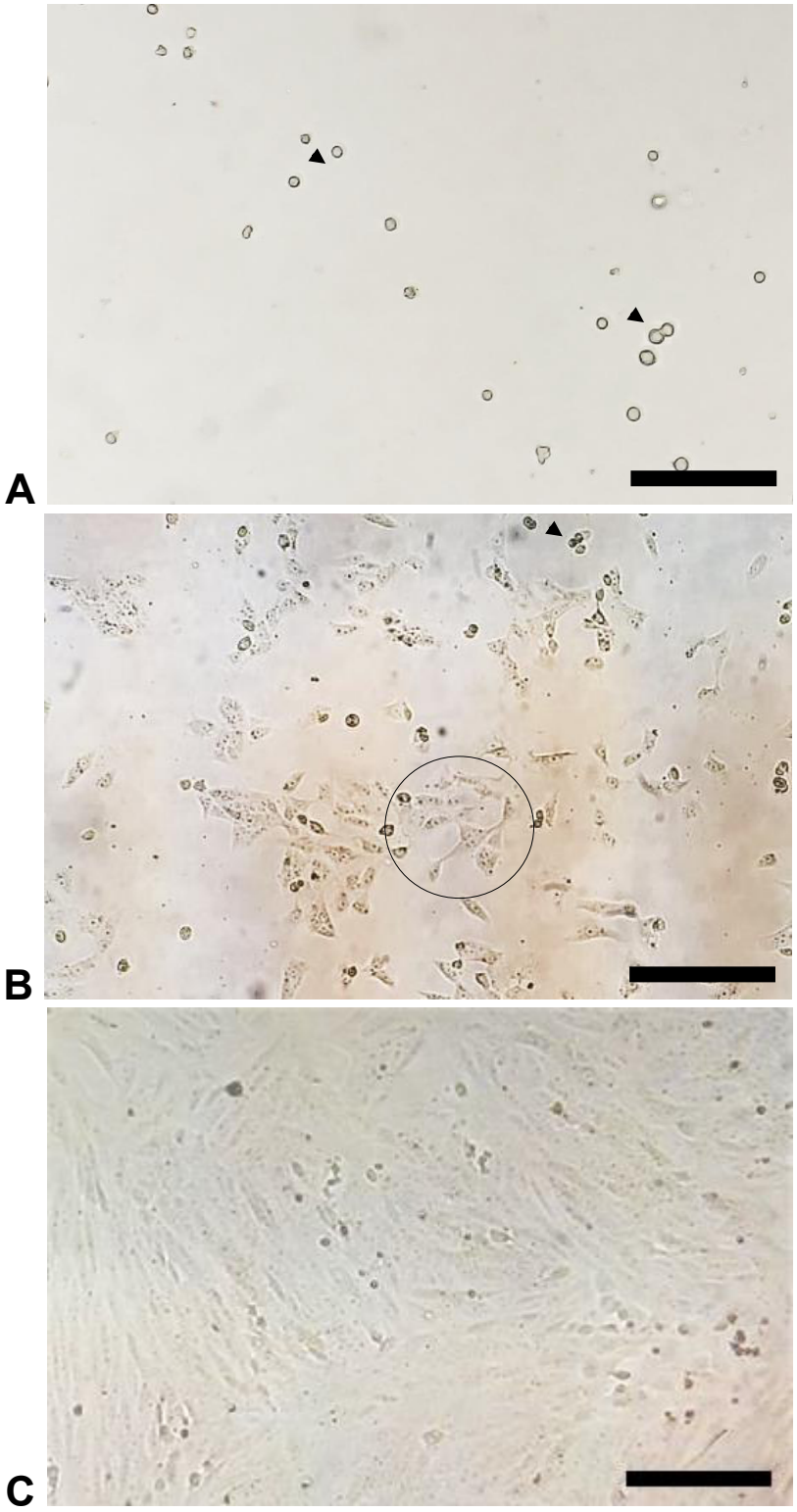


Figura 4: Crecimiento de la línea celular Vero-76. Adherencia a la superficie y formación de la monocapa desde la etapa de descongelamiento (**A**), 2 días posterior al descongelamiento (**B**) y 5 días posterior al descongelamiento (**C**). Las flechas en A y B muestras células en suspensión. El círculo negro de B muestra como inicia la adhesión y el crecimiento estratificado con un patrón fibroblástico, el cual se completa al 100% de confluencia en C. La barra de escala indica 100µm.

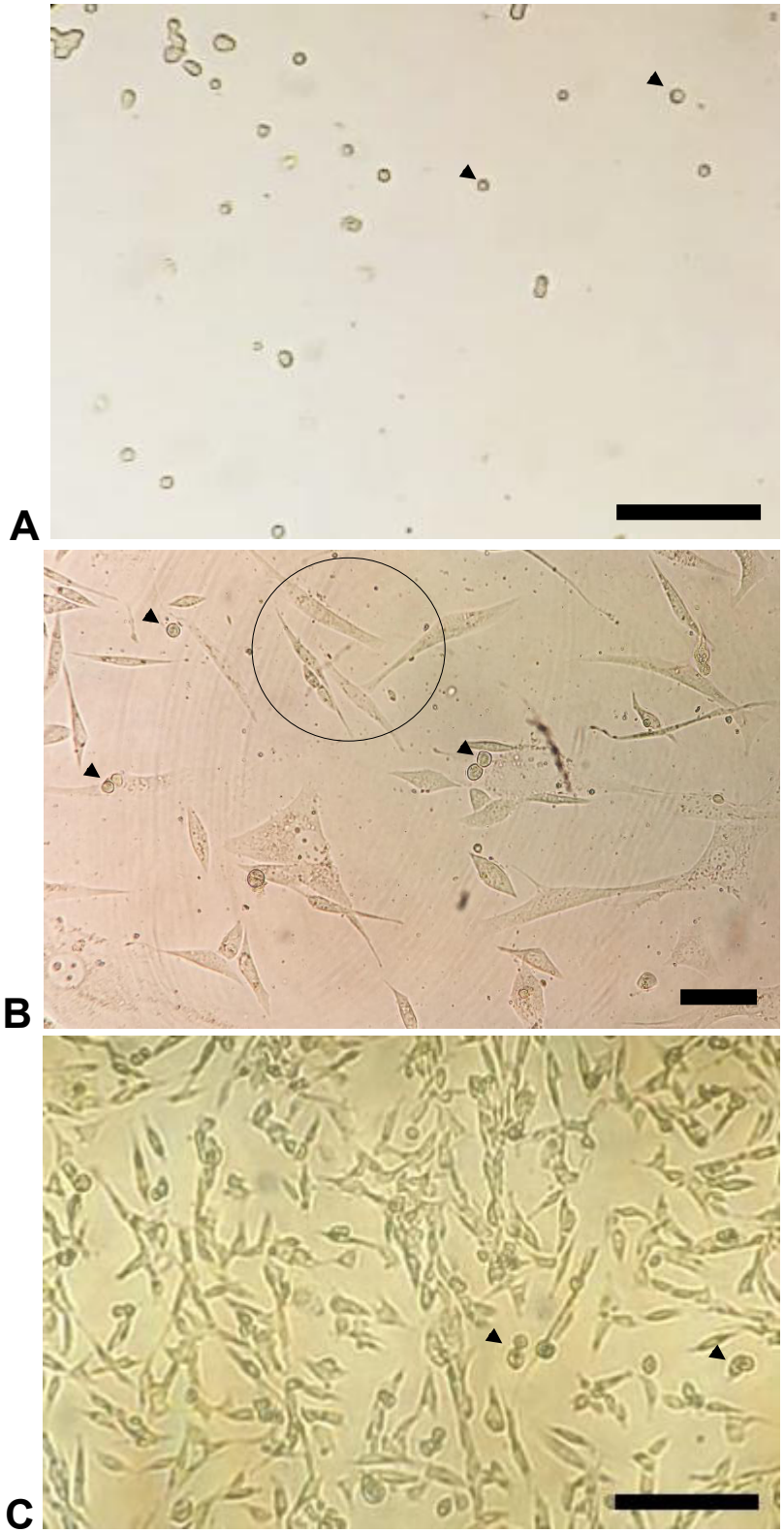


Figura 5: Crecimiento de la línea celular BHK-21. Adherencia a la superficie y formación de la monocapa desde la etapa de descongelamiento (**A**), 2 días posterior al descongelamiento (**B**) y 6 días posterior al descongelamiento (**C**). Las flechas en A, B y C muestras células en suspensión. El círculo negro de B muestra como inicia la adhesión y el crecimiento estratificado con un patrón fibroblástico, el cual se observa al 80% de confluencia en C. La barra de escala indica 100µm.

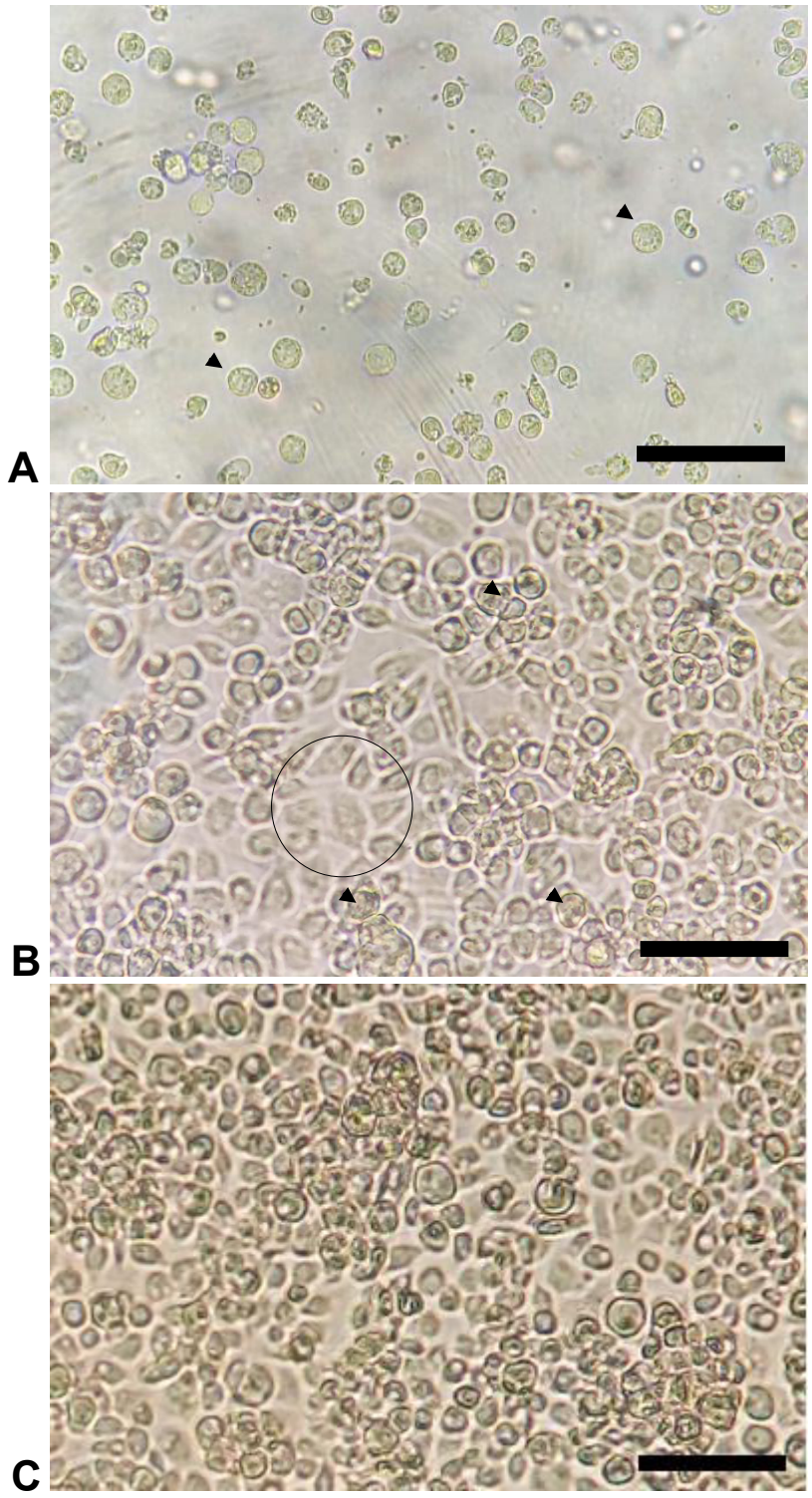


Figura 6: Crecimiento de la línea celular C6/36. Adherencia a la superficie y formación de la monocapa desde la etapa de descongelamiento (**A**), 3 días posterior al descongelamiento (**B**) y 4 días posterior al descongelamiento (**C**). Las flechas en A y B muestras células en suspensión. El B el círculo muestra células estratificadas con un patrón de crecimiento tipo epitelial, el cual se observa al 100% de confluencia en C. La barra de escala indica 100µm.

6.2 Propagación viral y preparación de las semillas virales

Las cepas virales utilizadas en esta investigación: DENV-2, ZIKV y YFV, fueron cultivadas en la línea celular BHK-21, revelando luego de varios días el efecto citopático característico **(Figura 7**). Se contabilizaron los días para la obtención de semillas virales, al presentar una monocapa con reducción de confluencia del 100 al 25% (**Tabla 5**).

Tabla 5: Número de días empleados para realizar la cosecha y obtención de semillas virales.

Cepa viral	Línea celular usada para propagación	N° de días empleados para realizar la cosecha
DENV-2	BHK-21	10
ZIKV	BHK-21	9
YFV	BHK-21	11

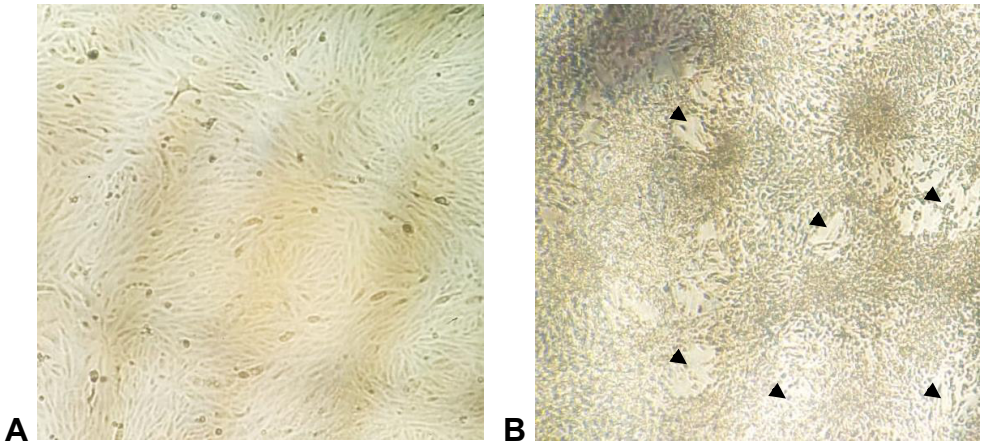


Figura 7: Propagación viral evidenciada por la aparición del efecto citopático. La imagen muestra una monocapa 100% confluente (A) y el efecto citopático (flechas negras) revelado luego de 5 días de infección (B).

6.3 Preparación de las placas de cultivo celular con las líneas celulares Vero-76, BHK-21 y C6/36

La formación de la monocapa confluente fue comprobada mediante la observación de las placas de cultivo celular en el Microscopio Invertido. Se revisó la formación de la monocapa confluente de las 3 líneas celulares en estudio (**Figura 8**).

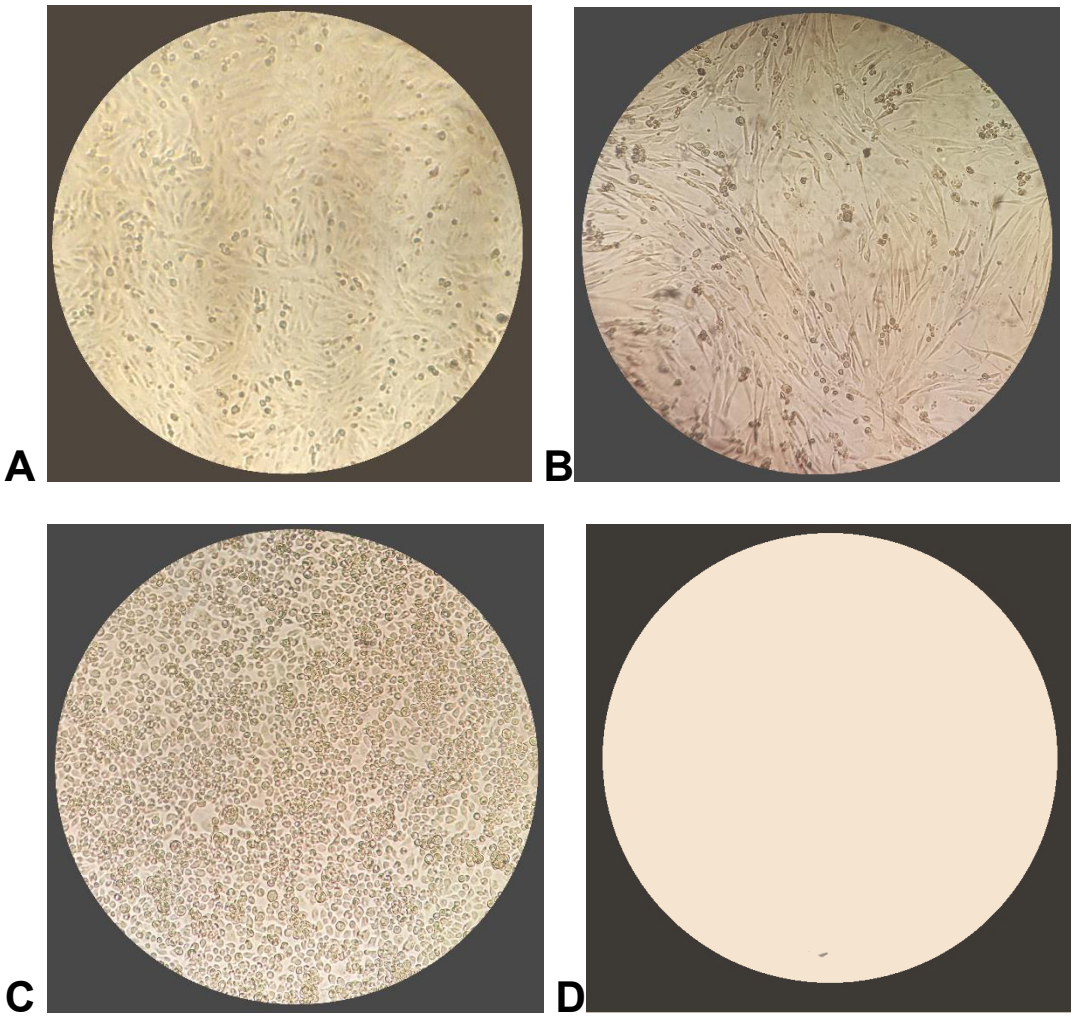


Figura 8: Verificación de la formación de monocapa completa (100% de confluencia) en placas de cultivo celular para el ensayo de placas y prueba de focos fluorescentes. células Vero **(A)**, células BHK-21 **(B)** y células C6/36 **(C)**. Se muestra un campo en blanco con sólo medio de crecimiento para visualización del fondo (**D**).

6.4 Visualización del Efecto citopático en el ensayo de placas

El efecto citopático (EP) fue evidenciado en las placas infectadas mediante observación en microscopio invertido (**Figura 9**). Los días necesarios para lograr la visualización manual de las placas (sin uso de microscopio) posterior a la tinción con colorante Naphthol Blue Black se muestran en la **Tabla 6**.

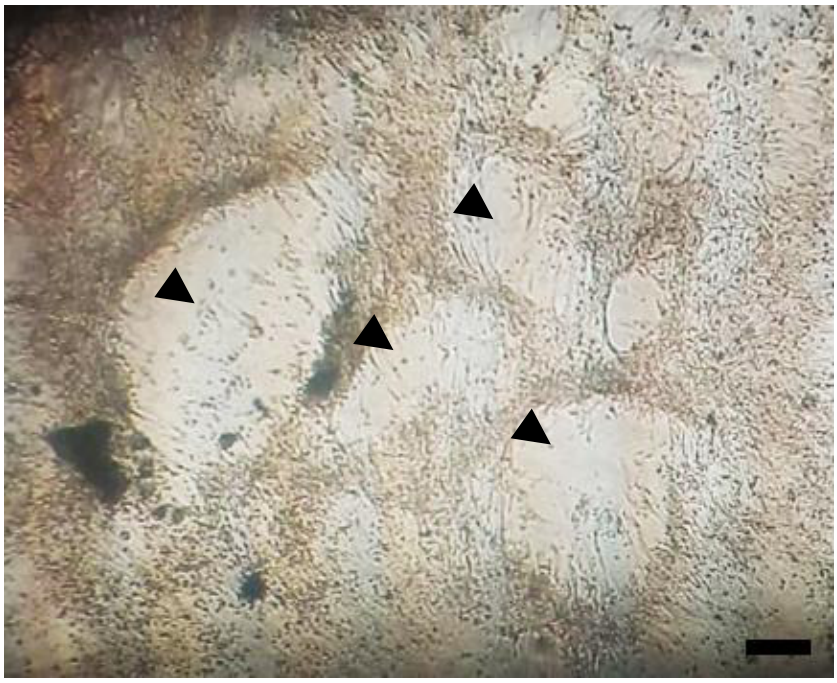


Figura 9: Reconocimiento de la formación de placas previa a la tinción. Se observa una monocapa de células Vero-76 a 4 días de infección por ZIKV. Las flechas muestran las "calvas" que evidencian el efecto citopático. La barra de escala indica 400µm.

Tabla 6: Número de días empleados para realizar la visualización del efecto citopático necesario para la correcta titulación viral.

Cepa viral	Línea Celular usada para Propagación	N° de días empleados para visualización de EP
DENV-2	Vero-76	7 – 8 días
	BHK-21	
ZIKV	Vero-76	6 – 7 días
	BHK-21	
YFV	Vero-76	6 – 8 días
	BHK-21	

6.5 Estandarización de las diluciones de anticuerpo primario (anti-Flavivirus) y anticuerpo secundario (anti-IgG de ratón) en la titulación por Inmunofluorescencia.

El anticuerpo primario fue sometido a 4 diluciones para evaluar su respuesta (nivel de fluorescencia) al ser observado por microscopía. Simultáneamente se probaron las diluciones 1/10, 1/50, 1/100 y 1/200 para el anticuerpo primario y 1/50 y 1/100 para el anticuerpo secundario (**Figuras 10, 11, 12 y 13**).

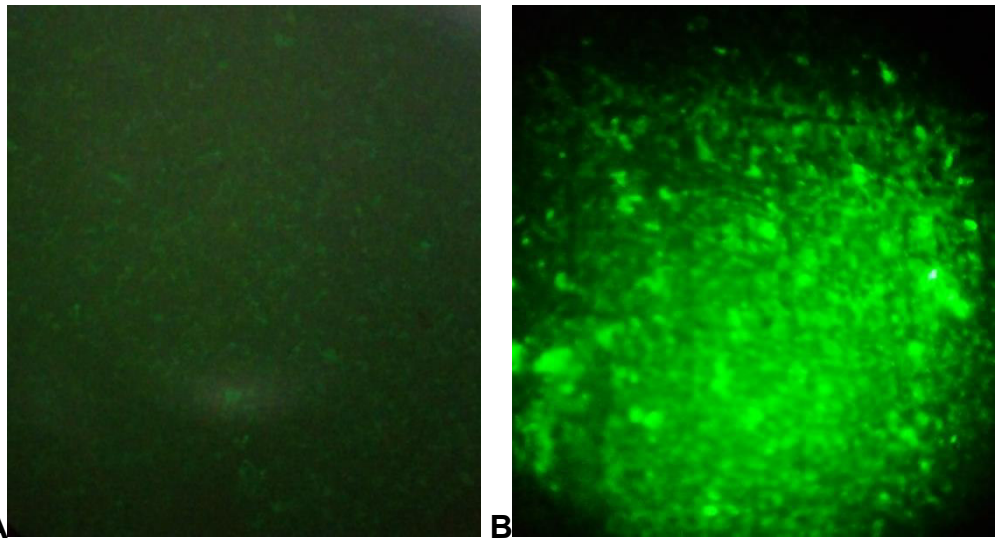


Figura 10: Lisado de Células C6/36 infectadas con virus de la Fiebre Amarilla. La dilución empleada para el anticuerpo primario es 1/10 (A y B) y para el anticuerpo secundario es 1/100 (A) y 1/50 (B). Fotografía tomada a un aumento de 400X por microscopía de Fluorescencia.

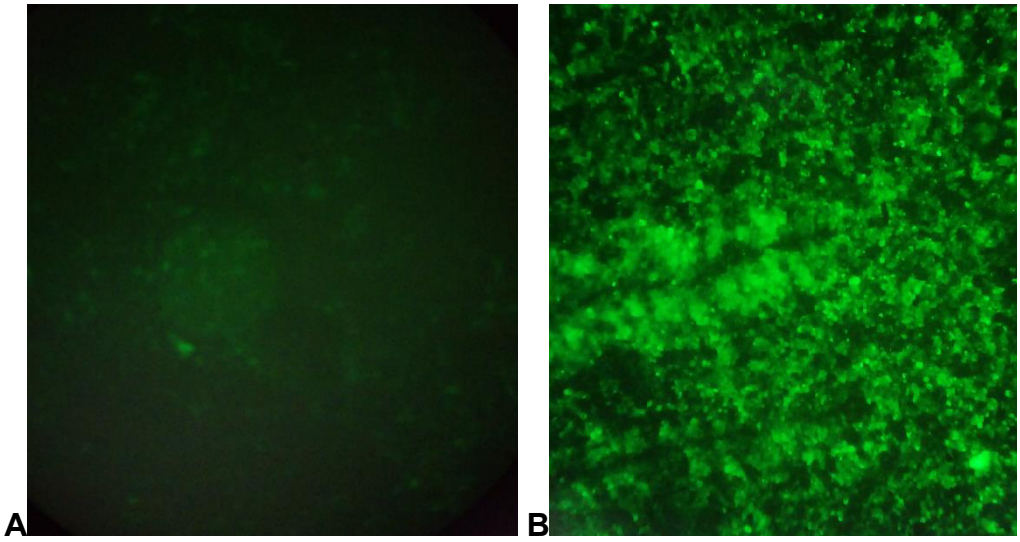


Figura 11: Lisado de Células C6/36 infectadas con virus de la Fiebre Amarilla. La dilución empleada para el anticuerpo primario es 1/50 (A y B) y para el anticuerpo secundario es 1/100 (A) y 1/50 (B). Fotografía tomada a un aumento de 100X por microscopía de Fluorescencia.

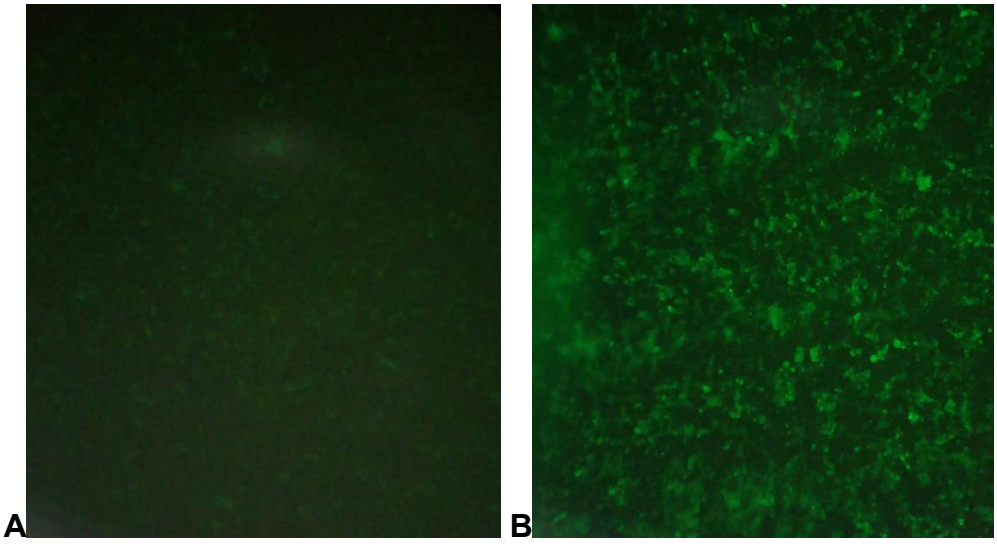


Figura 12: Lisado de Células C6/36 infectadas con virus de la Fiebre Amarilla. La dilución empleada para el anticuerpo primario es 1/100 (A y B) y para el anticuerpo secundario es 1/100 (A) y 1/50 (B). Fotografía tomada a un aumento de 100X por microscopía de Fluorescencia.

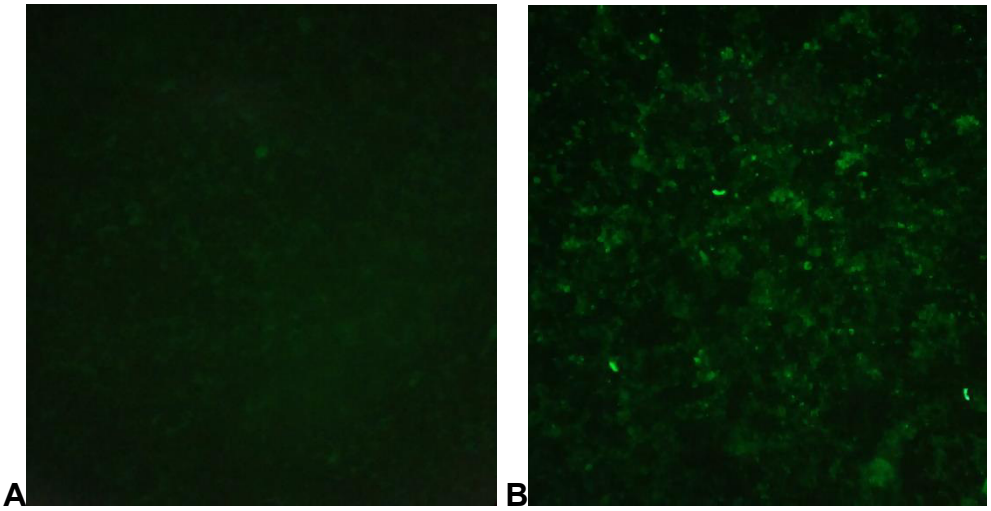


Figura 13: Lisado de Células C6/36 infectadas con virus de la Fiebre Amarilla. La dilución empleada para el anticuerpo primario es 1/200 (A y B) y para el anticuerpo secundario es 1/100 (A) y 1/50 (B). Fotografía tomada a un aumento de 100X por microscopía de Fluorescencia.

Al comparar el patrón de fluorescencia de cada pozo, se concluyó que la dilución de 1/50 para el anticuerpo primario y 1/50 para el anticuerpo secundario (**Figura 11B**) era óptima para la revisión microscópica.

6.6 Titulación viral por ensayo de placas: Conteo de placas

El conteo de placas se realizó siguiendo la recomendación del Instituto Pedro Kouri (2009), el cual indica que en placas de cultivo celular de 24 Pozos se debe realizar el conteo en la columna de dilución donde se observen entre 1 a 15 placas. Todos los ensayos de placas realizados siguieron el mismo sistema de titulación. Los resultados se calcularon promediando el número de placas de la columna de la dilución seleccionada, multiplicándolo por su factor de dilución (10^x) y por el factor de conversión a mL (es 20 debido a que se emplean 50 µL por pozo) (**Figura 14).**

Título viral por ensayo de placas **=** Promedio **x** 10^x **x** 20

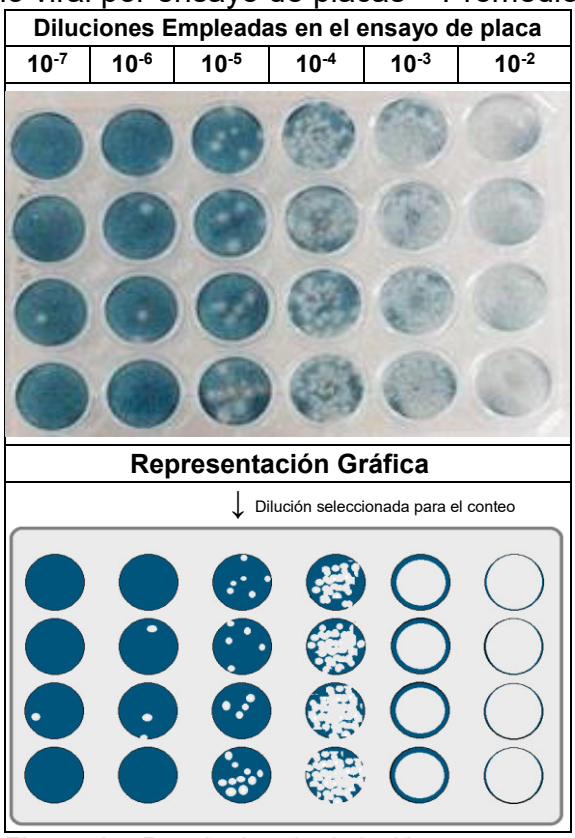


Figura 14: Resultados de titulación por ensayo de placas y su representación gráfica.

En el ejemplo mostrado el título viral que se calculó fue de 1.25 **x** 10^7 UFP/mL. Para los cálculos comparativos, los valores resultantes serán transformados a escala logarítmica, por lo que el título viral empleado será 7.097 en Log_{10}UFP/mL.

6.7 Titulación viral por prueba de focos fluorescentes: Conteo de focos

El conteo de focos fue realizado de manera similar al de placas, se tuvo en cuenta las columnas con una cantidad visible y contable de focos. El factor de conversión a mL fue de 50 (debido a que se emplearon 20 µL por pozo).

Título viral por prueba de focos fluorescentes **=** Promedio **x** 10^{x} **x** 50

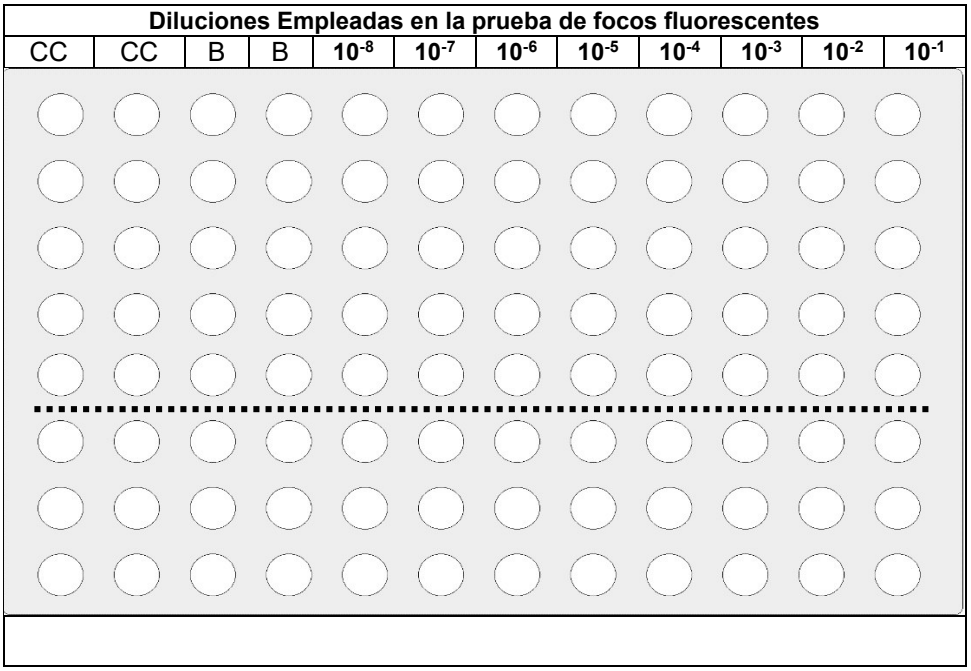


Figura 15: Esquema de la distribución de las diluciones en la prueba de focos fluorescentes realizada. El límite impuesto por la línea punteada indica que en la PFF se trabajó con 5 pozos (repeticiones) para cada prueba realizada (enfrentamiento virus – línea celular).

Durante la etapa de visualización de focos por microscopía de fluorescencia, el Microscopio Leica DM2500 permitía la observación del pozo completo a un aumento de 400X, por lo tanto, los focos podían contarse en su totalidad ajustando la lente a una distancia adecuada.

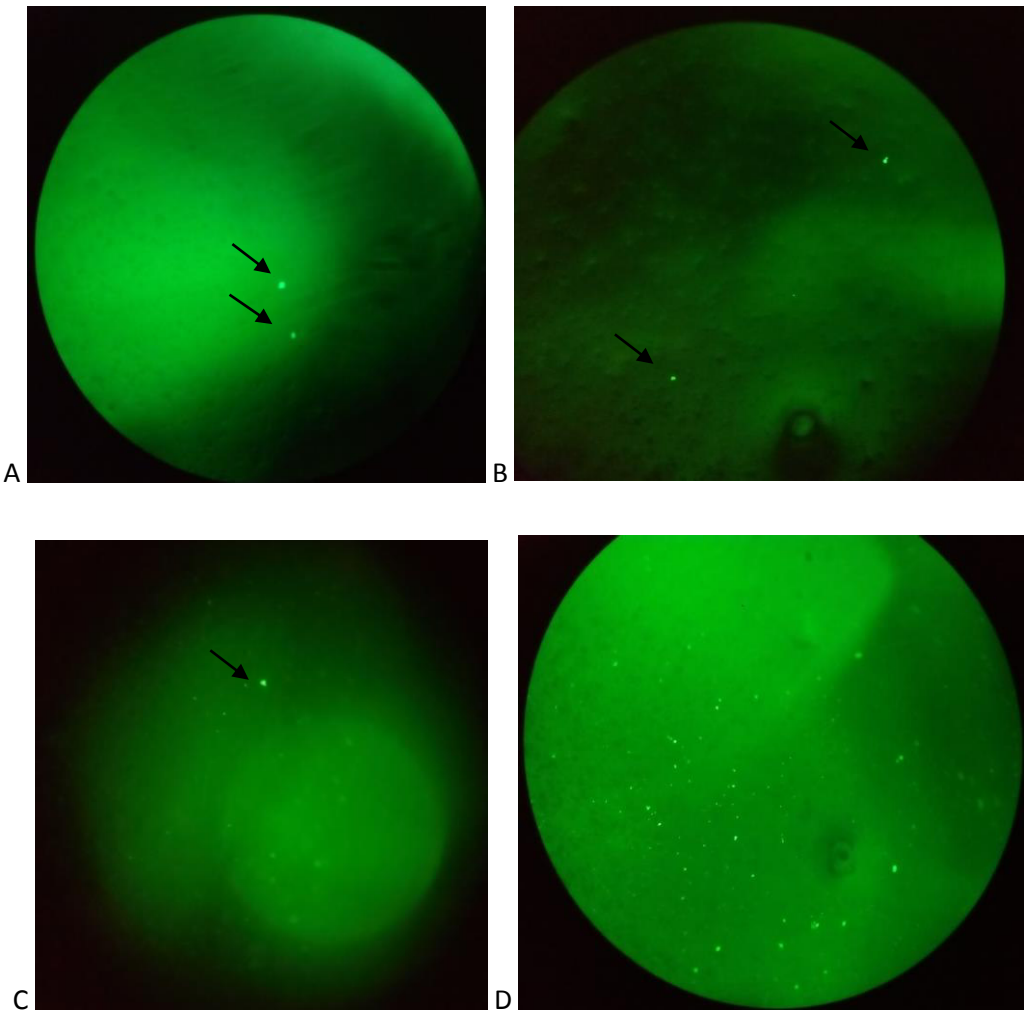


Figura 16: Resultados de la prueba de focos fluorescentes para infección por Virus Zika. Células Vero **(A)**, Células C6/36 **(B)** y Células BHK-21 en dos diluciones consecutivas **(C y D)**. Los campos que mostraron menos de 15 focos fueron contabilizados, la figura A, B y C poseen 2, 2 y 1 focos observables respectivamente (flecha negra), mientras la imagen D, que es una dilución 10 veces mayor al de las otras figuras, posee focos de difícil recuento. Las fotografías fueron tomadas a partir de un Microscopio de Fluorescencia Leica DM2500 a un aumento de 400X.

6.8 Resultados de titulación de DENV-2 por ensayo de placas en las líneas celulares Vero-76 y BHK-21

Resultados de titulación de DENV-2 Log_{10}UFP/ml		
	Vero-76	BHK-21
Repetición 1	6.74	7.02
Repetición 2	6.62	7.17
Repetición 3	6.52	7.23
Repetición 4	6.76	7.11
Repetición 5	6.53	7.18
Promedio:	**6.634±0.1**	**7.14±0.08**

Tabla 7: Resultados de titulación de DENV-2 por EP en las líneas celulares Vero-76 y BHK-21. La comparación de medias por la prueba *t* indicó que se obtuvieron títulos mayores en BHK-21 que en Vero-76 (p<0.0001)

6.9 Resultados de titulación de ZIKV por ensayo de placas en las líneas celulares Vero-76 y BHK-21

Resultados de titulación de ZIKV Log_{10}UFP/ml		
	Vero-76	BHK-21
Repetición 1	5.32	5.40
Repetición 2	5.53	5.46
Repetición 3	5.28	5.64
Repetición 4	5.43	5.58
Repetición 5	5.61	5.11
Promedio:	**5.43±0.13**	**5.45±0.2**

Tabla 8: Resultados de titulación de ZIKV por EP en las líneas celulares Vero-76 y BHK-21. La comparación de medias por la prueba *t* indicó que se obtuvieron títulos similares en BHK-21 y Vero-76 (p=0.9722)

6.10 Resultados de titulación de YFV por ensayo de placas en las líneas celulares Vero-76 y BHK-21

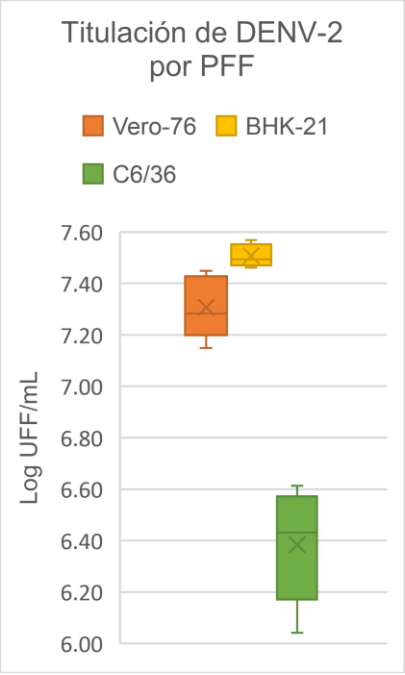
Resultados de titulación de YFV Log_{10}UFP/ml		
	Vero-76	BHK-21
Repetición 1	7.23	7.54
Repetición 2	7.04	7.69
Repetición 3	7.32	7.82
Repetición 4	6.85	7.45
Repetición 5	7.53	7.71
Promedio:	**7.19±0.26**	**7.64±0.14**

Tabla 9: Resultados de titulación de YFV por EP en las líneas celulares Vero-76 y BHK-21. La comparación de medias por la prueba *t* indicó que se obtuvieron títulos mayores en BHK-21 que en Vero-76 (p<0.01).

6.11 Resultados de titulación de DENV-2 por prueba de focos fluorescentes en las líneas celulares Vero-76, BHK-21 y C6/36

Resultados de titulación de DENV-2 Log_{10}UFF/ml			
	Vero-76	BHK-21	C6/36
Repetición 1	7.25	7.49	6.04
Repetición 2	7.28	7.46	6.53
Repetición 3	7.45	7.54	6.43
Repetición 4	7.15	7.48	6.30
Repetición 5	7.41	7.57	6.61
Promedio:	**7.308±0.12**	**7.508±0.04**	**6.382±0.22**

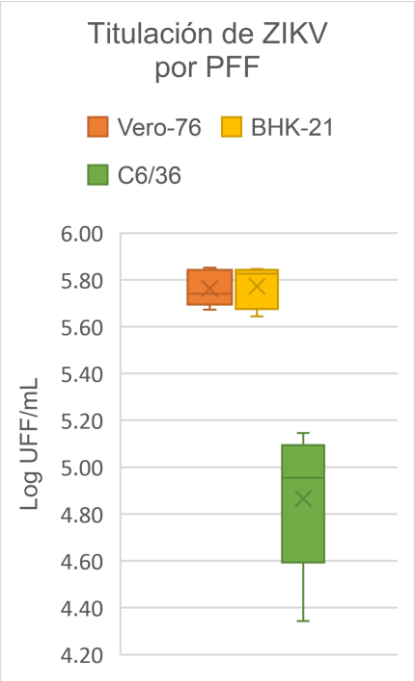
Tabla 10: Resultados de titulación de DENV-2 por PFF en las líneas celulares Vero-76, BHK-21 y C6/36. La comparación de medias por la prueba *t* indicó que se obtuvieron títulos mayores en BHK-21 que en Vero-76 (p = 0.0089), mientras C6/36 mostró títulos menores a las dos líneas antes mencionadas (p<0.001 en ambos casos). A la derecha se observa la distribución de valores en un diagrama de cajas.



6.12 Resultados de titulación de ZIKV por prueba de focos fluorescentes en las líneas celulares Vero-76, BHK-21 y C6/36

Resultados de titulación de ZIKV Log_{10}UFF/ml			
	Vero-76	BHK-21	C6/36
Repetición 1	5.67	5.71	5.04
Repetición 2	5.72	5.84	5.15
Repetición 3	5.83	5.64	4.85
Repetición 4	5.85	5.85	4.34
Repetición 5	5.74	5.83	4.95
Promedio:	**5.762±0.08**	**5.774±0.09**	**4.866±0.31**

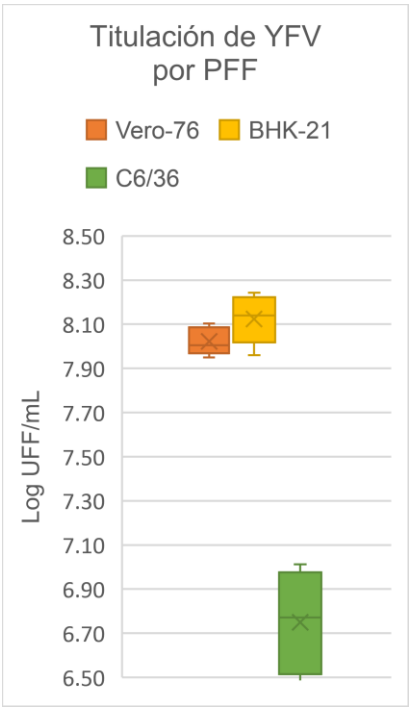
Tabla 11: Resultados de titulación de ZIKV por PFF en las líneas celulares Vero-76, BHK-21 y C6/36. La comparación de medias por la prueba *t* indicó que se obtuvieron títulos similares en BHK-21 y Vero-76 (p = 0.8298), mientras C6/36 mostró títulos menores a las dos líneas antes mencionadas (p<0.001 en ambos casos). A la derecha se observa la distribución de valores en un diagrama de cajas.



6.13 Resultados de titulación de YFV por prueba de focos fluorescentes en las líneas celulares Vero-76, BHK-21 y C6/36

Resultados de titulación de YFV Log_{10}UFF/ml			
	Vero-76	BHK-21	C6/36
Repetición 1	7.99	7.96	6.61
Repetición 2	8.07	8.08	6.94
Repetición 3	7.95	8.20	7.01
Repetición 4	8.10	8.14	6.77
Repetición 5	8.00	8.24	6.41
Promedio:	**8.022±0.06**	**8.124±0.11**	**6.748±0.24**

Tabla 12: Resultados de titulación de YFV por PFF en las líneas celulares Vero-76, BHK-21 y C6/36. La comparación de medias por la prueba *t* indicó que se obtuvieron títulos similares en BHK-21 y Vero-76 (p = 0.1076), mientras C6/36 mostró títulos menores a las dos líneas antes mencionadas (p<0.001). A la derecha se observa la distribución de valores en un diagrama de cajas.



6.14 Comparación entre la PFF y EP para titulación de DENV-2 en la línea celular Vero-76:

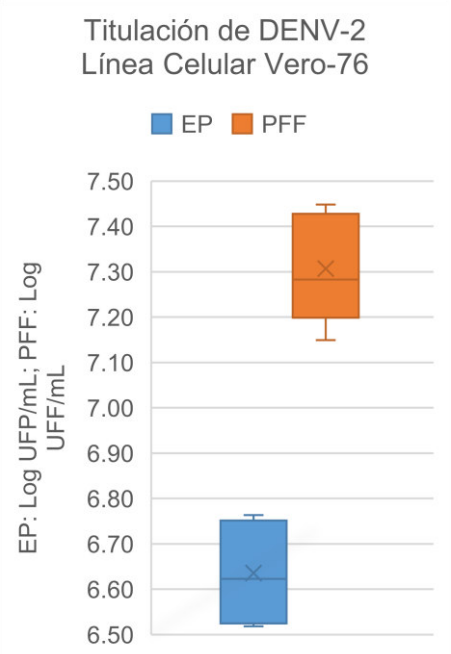


Figura 17: Gráfico de cajas y bigotes para la comparación entre la titulación por PFF y EP de DENV-2 en la línea celular Vero-76. La comparación de medias por la prueba *t* indicó que la PFF obtuvo títulos significativamente mayores (p<0.01)

6.15 Comparación entre la PFF y EP para titulación de DENV-2 en la línea celular BHK-21:

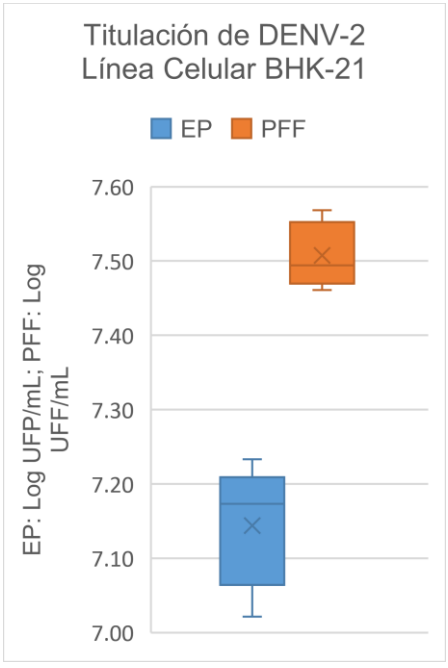


Figura 18: Gráfico de cajas y bigotes para la comparación entre la titulación por PFF y EP de DENV-2 en la línea celular BHK-21. La comparación de medias por la prueba *t* indicó que la PFF obtuvo títulos significativamente mayores (p<0.001)

6.16 Comparación entre la PFF y EP para titulación de ZIKV en la línea celular Vero-76:

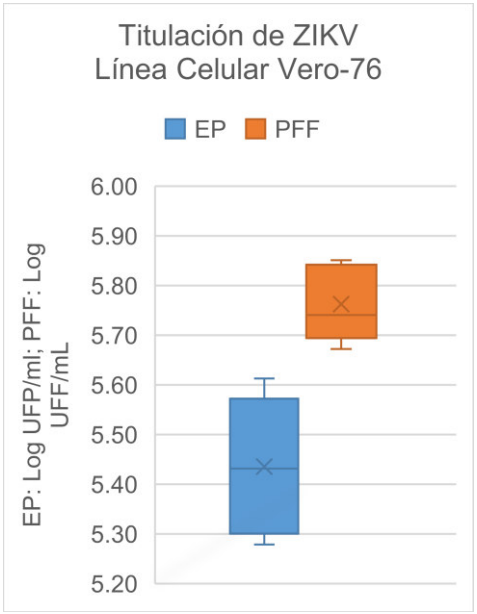


Figura 19: Gráfico de cajas y bigotes para la comparación entre la titulación por PFF y EP de ZIKV en la línea celular Vero-76. La comparación de medias por la prueba *t* indicó que la PFF obtuvo títulos significativamente mayores ($p<0.01$)

6.17 Comparación entre la PFF y EP para titulación de ZIKV en la línea celular BHK-21:

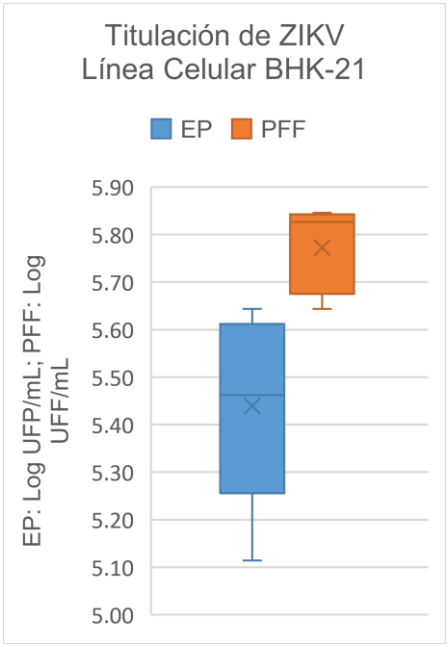


Figura 20: Gráfico de cajas y bigotes para la comparación entre la titulación por PFF y EP de ZIKV en la línea celular bhk-21. La comparación de medias por la prueba *t* indicó que la PFF obtuvo títulos similares al EP ($p=0.11$).

6.18 Comparación entre la PFF y EP para titulación de YFV en la línea celular Vero-76:

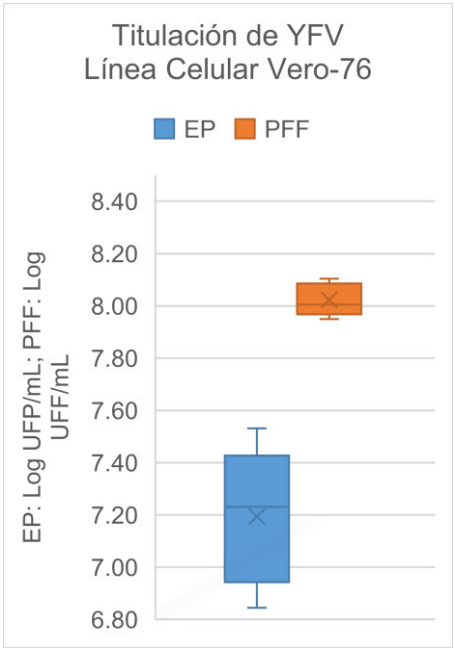


Figura 21: Gráfico de cajas y bigotes para la comparación entre la titulación por PFF y EP de YFV en la línea celular Vero-76. La comparación de medias por la prueba *t* indicó que la PFF obtuvo títulos significativamente mayores (p<0.001)

6.19 Comparación entre la PFF y EP para titulación de YFV en la línea celular BHK-21:

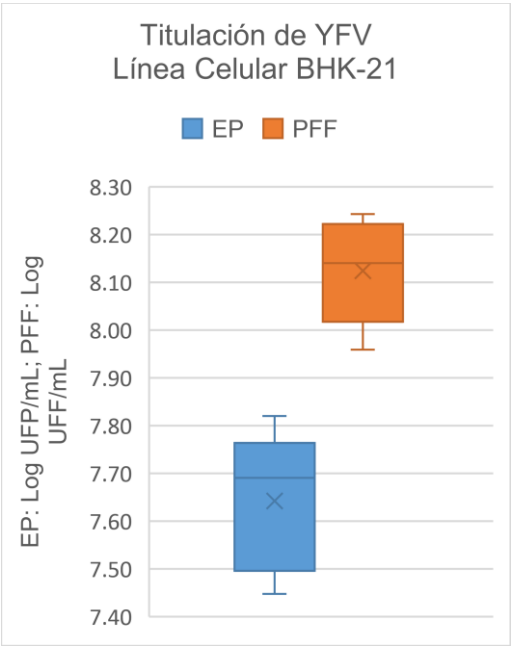


Figura 22: Gráfico de cajas y bigotes para la comparación entre la titulación por PFF y EP de YFV en la línea celular BHK-21. La comparación de medias por la prueba *t* indicó que la PFF obtuvo títulos significativamente mayores (p<0.01)

7. DISCUSIÓN

Los flavivirus son agentes zoonóticos altamente letales de fiebres hemorrágicas virales que son motivo de preocupación como agentes patógenos emergentes y posibles agentes de amenaza biológica (NIAID, 2008). No hay vacunas o terapias disponibles aprobadas por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) para el tratamiento de infecciones por algunos flavivirus (Collins & Metz, 2017), por lo que existen esfuerzos continuos en el descubrimiento de fármacos para protegernos de estos virus globalmente distribuidos. La mayoría de estos esfuerzos se sostiene en técnicas de titulación de partículas virales infectivas como el ensayo de placa, el cual puede ser aplicado en estudios preclínicos en la formulación de terapias o vacunas, cuyos resultados de cuantificación son comparados y compartidos entre los diversos institutos o centros de estudios. Esta técnica permite calcular cargas virales para estudios de neutralización de la infección por agentes antivirales, estudios de evaluación de vacunas y sueros, estudios de desarrollo de la infección a nivel celular y sistémico, entre otros, siendo considerado hasta ahora el *estándar de oro* para la cuantificación del título viral, a pesar de su desarrollo en la década de 1950 (Dulbecco y Vogt, 1953). Sorprendentemente, el método de contar placas a través de la visualización manual todavía se usa ampliamente a pesar que el conteo puede ser subjetivo para el analista y en algunos casos diferente a la apreciación de otro.

Históricamente, las células Vero y BHK-21 se han utilizado para realizar el ensayo de placa de los flavivirus aquí estudiados. Estas líneas celulares fueron probadas en la cuantificación de partículas virales debido a que resultados anteriores mostraron resultados diferentes en la titulación de distintos flavivirus por ensayo de placas. Por lo tanto, se evaluó la capacidad de las células Vero-76 Y BHK-21 de American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA) para producir focos de infección de DENV-2, ZIKV y YFV adecuados para titulación viral mediante las técnicas de ensayo de placas y la prueba de focos fluorescentes. Las células se sembraron según protocolos de cultivo celular específicos para producir monocapas confluentes de 85% a 100% en el tiempo

planificado. La capacidad para infectar se confirmó mediante la aparición del efecto citopático común de los virus estudiados, en cultivos de células Vero-76 y BHK-21 infectadas, caracterizado por el redondeo y desprendimiento de células. Por otro lado, la línea celular de *Aedes albopictus* clon C6/36 (ATCC CRL-1660) se usa comúnmente para la detección, propagación y análisis de arbovirus. Estas tienen un tiempo de duplicación de población corto y son permisivas para la infección por virus transmitidos por mosquitos, como los miembros de las familias *Togaviridae*, *Flaviviridae* y *Bunyaviridae* (Walker et al. 2014), pero presentan un efecto citopático poco definido que no llega a adaptarse para el ensayo de placas (Payne et al. 2006). En particular, las células C6/36 sí llegan a utilizarse en estudios de virus que representan amenazas significativas para la salud humana, incluidos el Zika, el Dengue y el Chikungunya, incluso guían el desarrollo racional de vacunas y terapias (Lu, 2011).

Las células Vero se consideran la célula modelo estándar en los estudios sobre el dengue debido a su capacidad de infección en respuesta a la infección por Dengue (Kaliwantoro et al. 2016). Sin embargo, los resultados mostraron una diferencia significativa a favor de la línea celular BHK-21 para la titulación de DENV-2 y YFV (Tabla 7 y 9). Esto podría deberse a una adaptación de las cepas virales a la línea BHK-21 donde fueron propagadas. Nikolav y colaboradores (2017), infectaron células Vero y BHK-21 con diferentes aislados brasileños de ZIKV. Compararon ambas líneas celulares; los títulos infecciosos máximos fueron similares, sin embargo, usando células BHK-21 adaptadas en un medio químicamente definido, se lograron títulos de virus más altos cuando se iniciaron infecciones. La cepa viral ZIKV mostró similaridad entre los títulos obtenidos en Vero-76 y BHK-21, lo cual puede deberse a que la cepa viral ZIKV proviene de una propagación anteriormente realizada en Vero-76 (Quispe, 2017) a la propagación aquí realizada en BHK-21.

Aquí se describió un análisis de focos infecciosos superior al ensayo de placa tradicional para identificar y contar focos fluorescentes mediante imágenes capturadas por microscopía. El conteo de focos no solo resultó estadísticamente consistente con el conteo manual de placas, sino que también mejoró la solidez del ensayo al sesgo humano de observación de solapamientos o

superposiciones de placas, obstaculizando su conteo. Estas características se deben a la inmunofluorescencia, la cual se basa en la especificidad de los anticuerpos marcados con fluorescencia contra sus antígenos correspondientes dentro de una célula. En este estudio se empleó la modalidad de Inmunofluorescencia Indirecta, otorgando a los resultados una alta sensibilidad y proporcionando una señal amplificada de los focos infectivos, ya que más de un anticuerpo secundario pudo unirse a cada anticuerpo primario (Odell y Cook, 2013). Esta metodología integró la detección de fluorescencia de las placas no sólo como un medio de aumentar la sensibilidad del ensayo, sino que también logra su extensión a virus que no realizan efecto citopático definido en sustratos celulares, además de reducir la duración del ensayo, ya que la fluorescencia permite la detección más temprana de placas muy pequeñas que normalmente no son visibles a simple vista, pues debe continuar durante varios días para permitir que las placas aumenten a tamaños suficientemente grandes para la identificación manual, pero sin que sean tan grandes como para superponerse unos a otros, ni causar confusión con fusión de radios de infección.

En el caso del ZIKV, se tiene entendido que pasajes sucesivos en células de vertebrados (células Vero) o invertebrados (células C6/36) influyen en el tamaño de las placas, la cinética y la restricción del crecimiento (Moser et al. 2018). Estas complicaciones naturales, causadas por la constante replicación del virus para prácticas de laboratorio, pueden ser mermadas por el ensayo aquí propuesto, pudiendo extenderse a virus provenientes de cualquier institución, el cual podrá ser estudiado y cuantificado con sólo presentar un carácter infeccioso ante cualquiera de las líneas que se tenga a disposición. El ensayo de inmunofluorescencia ya se ha practicado anteriormente para la titulación de Zika en sustrato celular C6/36, en los cuales emplearon 72 horas para revelarlo (Mosimann et al. 2011), en nuestro caso logramos reducir a 48 horas el tiempo de infección previo a la fijación de la placa utilizando nuestra cepa viral en 3 líneas celulares distintas.

El virus de la Fiebre Amarilla que es el flavivirus prototípico, es responsable de la fiebre hemorrágica viral que resulta en hasta un 50% de mortalidad (Monath y Heinz, 1996) y circula en África tropical y América del Sur. La vacuna 17D de

YFV es una de las más exitosas jamás desarrolladas (Pulendran, 2009) y fue objeto de estudio en esta investigación. Esta cepa pudo replicarse en las 3 distintas líneas celulares en estudio, después de haber sido propagada en la línea celular C6/36 y BHK-21 consecutivamente. Las líneas celulares Vero-76 y BHK-21 mostraron mayor susceptibilidad a esta cepa vacunal, mientras que C6/36 presentó un porcentaje reducido de la infección (Tabla 12). Esto puede deberse a la propagación final realizada en la línea BHK-21 antes de ser inoculada en los sustratos celulares previo a la titulación por ambos métodos..

La integración de la tecnología del ensayo de placas con la inmunofluorescencia disminuyó la duración del ensayo en aproximadamente un 50% (de 8 días a 4 días), porque el tamaño de la placa, el ruido causado por el radio de infección y el conteo manual ya no son limitantes. Este ensayo de placa optimizado es sensible, rápido, y robusto y expande el rendimiento y el uso de este método para medir la formación de focos. Las diferencias entre los valores de titulación utilizando distintas líneas celulares pueden ser variables entre distintos laboratorios debido a que cada uno tiene una cantidad de pasajes y adaptaciones virales/celulares. Sin embargo, un protocolo estandarizado para un laboratorio permitirá realizar estudios comparativos sin alterar los resultados generales de naturaleza cuantitativa y cualitativa. La PFF probablemente sea más aplicable a los programas de investigación, cuando se desea la titulación rápida de virus o la cuantificación de UFF viral en células en las que no se forman placas como es el caso de C6/36, hecho que corresponde a lo descrito por Burivong y colaboradores (2004), que indicaron que infecciones persistentes de flavivirus en cultivos de C6/36 son mucho menos graves, y se caracterizaron por un porcentaje reducido de infección y ausencia significativa del efecto citopático. Finalmente se concluye que el éxito del ensayo depende de la infección productiva de la monocapa celular y la detección del virus por un anticuerpo apropiado. La capacidad de usar el ensayo en muestras clínicas depende de estos dos factores.

Realizar estudios de susceptibilidad de líneas celulares a distintas cepas virales, que puedan permitir el aislamiento e identificación viral, la producción de reservas virales y pruebas de candidatos a fármacos y vacunas es de suma

importancia. El presente estudio, basado en la estandarización de la detección de partículas flavivirales que infectaron experimentalmente un sustrato celular, promueve el análisis más profundo del mecanismo de infección de estos virus *in vitro*, dando paso a estudios morfológicos, así como el reconocimiento de la dinámica de la replicación viral, mediante el uso combinado de microscopía de luz de contraste de fase, microscopía electrónica de transmisión, microscopía de fluorescencia y análisis moleculares.

8. REFERENCIAS

Alexander Nikolay, Leda Castilho, Amilcar Tanuri, Udo Reichl e Yvonne Genzel, " Propagation of Brazilian Zika virus strains in static and suspension cultures using Vero and BHK cells " en "Vaccine Technology VI", doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.03.018

Apte-Sengupta S, Sirohi D, Kuhn RJ. Coupling of replication and assembly in flaviviruses. Curr Opin Virol. (2014) 9:134–42. doi: 10.1016/j.coviro.2014.09.020

ATCC Cell Lines and Hibridomas. 8ª Edition. Eds. Hay, RJ, Caputo, J, Macy, ML; ATCC CCl-10. 1994; 10.

Barrett, A.D.; Higgs, S. Yellow fever: A disease that has yet to be conquered. Ann. Rev. Entomol. 2007, 52, 209–229.

Barrett, A.D.; Monath, T.P. Epidemiology and ecology of yellow fever virus. Adv. Virus Res. 2003, 61, 291–315.

Bowen, R.A.; Nemeth, N.M. Experimental infections with West Nile virus. Curr. Opin. Infect. Dis. 2007, 20, 293–297.

Bulich R, Aaskov JG. Nuclear localization of dengue 2 virus core protein detected with monoclonal antibodies. J Gen Virol. 1992;73:2999–3003.

Burivong, P., Pattanakitsakul, S. N., Thongrungkiat, S., Malasit, P., & Flegel, T. W. (2004). Markedly reduced severity of Dengue virus infection in mosquito cell cultures persistently infected with Aedes albopictus densovirus (AalDNV). Virology, 329(2), 261-269.

Calisher, C. H., Karabatsos, N., Dalrymple, J. M., Shope, R. E., Porterfield, J. S., Westaway, E. G. & Brandt, W. E. (1989). Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyvalent antisera. Journal of General Virology 70, 37–43

CDC. Areas with Zika virus, Available online at: http://www.cdc.gov/zika/geo/ (accessed March 15, 2016).

Centers for Disease Control and Prevention (2009) Biosafety in microbiological and biomedical laboratories (BMBL), 5th edn

Collins MH, Metz S W. Progress and works in progress: update on flavivirus vaccine development. Clin Ther. (2017) 9:1519–36. 10.1016/j.clinthera.2017.07.001

Cooper P.D. The plaque assay of animal viruses. Adv. Virus Res. 1961;8:319–378.

Culley, S., Towers, G. J., Selwood, D. L., Henriques, R., & Grove, J. Infection Counter: Automated Quantification of in Vitro Virus Replication by Fluorescence Microscopy. *Viruses*, *8*(7), 201 (2016) doi:10.3390/v8070201

Damen M, Minnaar R, Glasius P, van der Ham A, Koen G, Wertheim P, Beld M. Real-time PCR with an internal control for detection of all known human adenovirus serotypes. J Clin Microbiol. 2008;46(12):3997-4003.

Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specifi city. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1952;46:509–20.

Diretrizes Nacionais para a Prevenção e Controle de Epidemias de Dengue. 1st ed. Brasil: Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica (2009).

Domingo C, Patel P, Yillah J, Weidmann M, Méndez JA, Nakouné ER, Niedrig M. Advanced yellow fever virus genome detection in point-of-care facilities and reference laboratories. J Clin Microbiol. 2012 Dec;50(12):4054-60. doi: 10.1128/JCM.01799-12. Epub 2012 Oct 10. PMID: 23052311; PMCID: PMC3503008.

Dulbecco, R., and Vogt, M. (1953). Some problems of animal virology as studied by the plaque technique. Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol. 18, 273–279.

Durbin, A.P.; Mayer, S.V.; Rossi, S.L.; Amaya-Larios, I.Y.; Ramos-Castaneda, J.; Eong Ooi, E.; Jane Cardosa, M.; Munoz-Jordan, J.L.; Tesh, R.B.; Messer, W.B.; et al. Emergence potential of sylvatic dengue virus type 4 in the urban transmission cycle is restrained by vaccination and homotypic immunity. Virology 2013, 439, 34–41

eMosimann ALP, Bordignon J, Mazzarotto GCA, Motta MCM, Hoffmann F, dos Santos CND. Caracterización genética y biológica de un aislado de densovirus que afecta la infección por el virus del dengue. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011; 106 (3): 285-92.

Fauquet, C., Stanley, J. Revising the way we conceive and name viruses below the species level: A review of geminivirus taxonomy calls for new standardized isolate descriptors. Arch Virol 150, 2151–2179 (2005).

Febre amarela: Guia para Profissionais da saúde. 1st ed. Brasil: Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde (2017).

Filipe AR, Martins CM, Rocha H. Laboratory infection with Zika virus after vaccination against yellow fever. Arch Gesamte Virusforsch. 1973;43:315–9.

Flint, S.J., Enquist, L.W., Racaniello, V.R., Skalka, A.M., 2004. Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control of Animal Viruses, 2nd ed. ASM Press, Washington, DC.

François, A., Bouzelha, M., Lecomte, E., Broucque, F., Penaud-Budloo, M., Adjali, O., Moullier, P., Blouin, V., and Ayuso, E. (2018). Accurate Titration of Infectious AAV Particles Requires Measurement of Biologically Active Vector Genomes and Suitable Controls. Mol. Ther. Methods Clin. Dev. 10, 223–236.

Grigorov, B., Rabilloud, J., Lawrence, P., and Gerlier, D. (2011). Rapid titration of measles and other viruses: optimization with determination of replication cycle length. PLoS ONE 6, e24135.

Gubler, D.J. The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 2004, 27, 319–330.

Gunathilaka N, Ranathunge T, Udayanga L, Wijegunawardena A, and Abeyewickreme W. “Oviposition preferences of dengue vectors; Aedes aegypti and Aedes albopictus in Sri Lanka under laboratory settings,” Bulletin of Entomological Research, vol. 108, no. 4, pp. 442–450, 2018.

Hogrefe W.R., Moore R, Lape-Nixon M, Wagner M, Prince HE. Performance of immunoglobulin G (IgG) and IgM enzyme-linked immunosorbent assays using a West Nile virus recombinant antigen (preM/E) for detection of West Nile virus- and other flavivirus-specific antibodies. J ClinMicrobiol. 2004;42:4641–4648.

Huang YS, Higgs S, Horne KM, Vanlandingham DL. Flavivirus-Mosquito Interactions. Viruses. 2014;6(11):4703–30.

Igarashi A. Isolation of a Singh’s Aedes albopictus Cell Clone Sensitive to Dengue and Chikungunya Viruses. J Gen Virol. 1978;40(3):531-44

Igarashi, A., & Mantani, M. (1974). Rapid titration of dengue virus type 4 infectivity by counting fluorescent foci. Biken's Journal, 17(3), 87-93.

Igarashi, A., Mantani, M., 1974. Rapid titration of dengue virus type 4 infectivity by counting fluorescent foci. Biken. J. 17, 87–93

Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”. Técnicas de Laboratorio para el Diagnóstico y la Caracterización de los Virus del Dengue. 2009; Ministerio de Salud Pública, Laboratorio de Arbovirus, Departamento de Virología.

Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. Journal of Clinical Microbiology. 2005 Oct;43(10):4977-4983. DOI: 10.1128/jcm.43.10.4977-4983.2005.

Kaliwantoro, Nur & Soesatyo, Marsetyawan & Indarto, Indarto & Juffrie, Mohammad & Dharmastiti, Rini. (2016). Effect of dengue virus infection on the permeability of vero cells line. 1755. 030003. 10.1063/1.4958474.

Karabatsos N. International catalogue of arboviruses including certain other viruses of vertebrates, 3rd ed. (1985) San Antonio: American Society of Tropical Medicine and Hygiene.

Kindhauser MK, Allen T, Frank V, et al. Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. Bull World Health Organ. 2016;94(9):675–86.

Kovats RS, Bouma MJ, Hajat S, Worrall E, Haines A. El Niño and health. Lancet. 2003;362(9394):1481–9.

Lanciotti, R. S., Kosoy, O. L., Laven, J. J., Velez, J. O., Lambert, A. J., Johnson, A. J....Duffy, M. R. (2008). Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. Emerging Infectious Diseases, 14(8), 1232-1239.

Liu CC, Guo MS, Lin FH, Hsiao KN, Chang KH, Chou AH, et al. Purification and characterization of enterovirus 71 viral particles produced from vero cells grown in a serum-free microcarrier bioreactor system. PLoS One. 2011;6(5):1-9.

Lonsdale, R., Pau, M.G., Oerlemans, M., Ophorst, C., Vooys, A., Havenga, M., Goudsmit, J., UytdeHaag, F., Marzio, G., (2003). A rapid method for immunotitration of influenza viruses using flow cytometry. Journal of virological methods, 110(1), 67-71.

Lu Z. PubMed and beyond: a survey of web tools for searching biomedical literature. Database (Oxford). 2011;2011:baq036. doi:10.1093/database/baq036.

Mansfield KL, Horton DL, Johnson N, Li L, Barrett ADT, Smith DJ, et al. Flavivirus-induced antibody cross-reactivity. J Gen Virol. (2011) 92:2821–9. doi: 10.1099/vir.0.031641-0

Masci, Allyson & Menesale, Emily & Chen, Wei-Chiang & Co, Carl & Lu, Xiaohui & Bergelson, Svetlana. (2019). Integration of fluorescence detection and image-based automated counting increases the sensitivity, robustness and speed of plaque assays. Molecular Therapy - Methods & Clinical Development. 14. 10.1016/j.omtm.2019.07.007.

McAteer, J. A., & Douglas, W. H. (1979). [10] Monolayer culture techniques. In Methods in enzymology (Vol. 58, pp. 132-140). Academic Press.

Members of the genus Flavivirus within the family Flaviviridae have been grouped into eight antigenic complexes on the basis of cross-reactivity in neutralization assays (Calisher et al., 1989) ;

Mendez, E., Ruggli, N., Collett, M. S., & Rice, C. M. (1998). Infectious bovine viral diarrhea virus (strain NADL) RNA from stable cDNA clones: a cellular insert determines NS3 production and viral cytopathogenicity. Journal of virology, 72(6), 4737.

Monath, T. P. & Heinz, F. X.. Flaviviruses. Fields Virology, 3rd edn (1996), pp. 961–1034. Edited by B. N. Fields, D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia : Lippincott–Raven.

Moreira J, Bressan CS, Brasil P, Siqueira AM. Epidemiology of acute febrile illness in Latin America. Clin Microbiol Infect. 2018;24:827–35.

Moser LA, Boylan BT, Moreira FR, Myers LJ, Svenson EL, Fedorova NB, et al. Crecimiento y adaptación del virus Zika en células de mamíferos y mosquitos. PLoS Negl Trop Dis. 2018; 12 (11): e0006880

NIAID. NIAID Category A, B, and C Priority Pathogens. Apr. 13, 2008. 2008. http://www3.niaid.nih.gov/topics/BiodefenseRelated/Biodefense/research/CatA.htm.

Nougairede A, De Fabritus L, Aubry F, Gould EA, Holmes EC, de Lamballerie X. Random Codon Re-encoding Induces Stable Reduction of Replicative Fitness of Chikungunya Virus in Primate and Mosquito Cells. PLoS Pathog. 2013;9(2):1-18.

Odell ID, Cook D. Técnicas de inmunofluorescencia. J Invest Derm. 2013; 133 (1): e4

Osada N, Kohara A, Yamaji T, Hirayama N, Kasai F, Sekizuka T, et al. The Genome Landscape of the African Green Monkey Kidney-Derived Vero Cell Line. DNA Research. 2014;21(6):673-83.

Palma R. Tradiciones Peruanas: Pepe Bandos. 2da edición, tomo I. (1873) Lima: Librería Internacional del Perú S.A. p. 287-93.

Pan American Health Organization/World Health Organization, Evidence and Intelligence for Action in Health Department/Health Analysis, Metrics and Evidence Unit. PLISA Database. Core Indicators 2019: Health Trends in the Americas. Washington, D.C., United States of America, 2019.

Payne AF, Binduga-Gajewska I, Kauffman EB, Kramer LD. Quantitation of flaviviruses by fluorescent focus assay. J Virol Methods. (2006); 134:183–189. doi: 10.1016/ j.jviromet.2006.01.003

Pereira, H. G. (1962). The cytopathic effect of animal viruses. In Advances in virus research (Vol. 8, pp. 245-285). Academic Press.

Perú, Ministerio de Salud. Aprendiendo de la experiencia: lecciones aprendidas para la preparación y respuesta en el control vectorial ante brotes de dengue en el Perú. Lima: MINSA; 2011.

Petersen, L.R.; Marfin, A.A. Shifting epidemiology of Flaviviridae. J. Travel Med. 2005, 12 (Suppl. 1), S3–S11.

Pulendran B. Learning immunology from the yellow fever vaccine: Innate immunity to systems vaccinology. Nat. Rev. Immunol. 2009; 9:741–747. doi: 10.1038/nri2629.

Sarfraz MS, Tripathi NK, Kitamoto A. Near real-time characterisation of urban environments: a holistic approach for monitoring dengue fever risk areas. Int J Digit Earth. 2014; 7(11):916–34.

Saron WAA, Rathore APS, Ting L, Ooi EE, Low J, Abraham SN, et al. Flavivirus serocomplex cross-reactive immunity is protective by activating heterologous memory CD4 T cells. Sci Adv. (2018) 4:eaar4297. doi: 10.1126/sciadv.aar4297

Sessions OM, Barrows NJ, Souza-Neto JA, Robinson TJ, Hershey CL, Rodgers MA, et al. Discovery of insect and human dengue virus host factors. Nature. 2009;458(7241):1047-50.

Sheets R. History and Characterization of the Vero Cell Line. Open session. 2000;1-12

Simpson DI. Zika virus infection in man. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1964;58:335–8.

Singh K. Cell cultures derived from larvae of Aedes albopictus (Skuse) and Aedes aegypti (L.). Curr Sci India. 1967;36(19):506-8

Sirohi D, Chen Z, Sun L, Klose T, Pierson TC, Rossmann MG, et al. The 3.8 A resolution cryo-EM structure of Zika virus. Science (2016) 52:467–70. 10.1126/science.aaf5316

Thiel JF, Smith KO. Fluorescent focus assay of viruses on cell monolayers in plastic Petri plates. Proc Soc Exp Biol Med. 1967 Jul;125(3): 892-5. DOI: 10.3181/00379727-125-32232

Vázquez, A., Sánchez-Seco, M. P., Palacios, G., Molero, F., Reyes, N., Ruiz, S., Aranda, C., Marqués, E., Escosa, R., Moreno, J., Figuerola, J., & Tenorio, A. (2012). Novel flaviviruses detected in different species of mosquitoes in Spain. Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.), 12(3), 223–229.

Velandia M, Castellanos J. Virus del dengue: estructura y ciclo viral. Infectio. 2011; 15(1):33-43.

Walker T, Jeffries CL, Mansfield KL et al. Mosquito cell lines: history, isolation, availability and application to assess the threat of arboviral

transmission in the United Kingdom. Parasit Vectors. 2014; 7:382. doi:10.1186/1756-3305-7-382.

White NJ. The treatment of malaria. N Engl J Med. 1996;335(11): 800-6.

Whitehead SS, Blaney JE, Durbin AP, Murphy BR. Prospects for a dengue virus vaccine. Nat Rev Microbiol. (2007) 5:518–28. doi: 10.1038/nrmicro1690

Young P.R., Hilditch PA, Bletchly C, Halloran W. An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. J ClinMicrobiol. 2000;38:1053–1057.

Zhai W, Ning Zhang D, Mai C, Choy J, Jian G, Sra K, Galinski MS. Comparison of Different Cell Substrates on the Measurement of Human Influenza Virus Neutralizing Antibodies. PLoS One . 2012;7(12):1-13.

Zhang X, Ge P, Yu X, Brannan JM, Bi G, Zhang Q, et al. . Cryo-EM structure of the mature dengue virus at 3.5-A resolution. Nat Struct Mol Biol. (2013) 20:105–10. 10.1038/nsmb.2463