

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**E. A. P. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Detección de anticuerpos neutralizantes contra los  
virus Rocío, Ilheus y Oeste del Nilo en una población  
humana de Iquitos entre los años 2003-2007**

**TESIS**

para optar al título profesional de biólogo con mención en Biología Celular  
y Genética

**AUTORA**

Diana Stephanie Juárez Espinoza

**ASESORA**

Libertad Alzamora

**Lima-Perú**

**2009**

**ASESORA**

Dra. Libertad Alzamora  
Profesora principal a D.E.

Esta tesis fue llevada a cabo gracias al soporte económico brindado por el Centro de Investigaciones de Enfermedades Tropicales de la Marina de los Estados Unidos de Norteamérica (NMRCDC) Lima - Perú.

## AGRADECIMIENTOS

Al PhD. **Tadeus Kochel** por la oportunidad de la realización de la tesis

A la Mg. **Carolina Guevara** por su confianza, paciencia, amistad y por las oportunidades que deposita siempre en mí y que me han abierto las puertas en esta nueva etapa de mi vida.

A **Roger Castillo** por sus conocimientos, por su tiempo, paciencia, dedicación y especialmente por su amistad.

Al Sr. **Alfredo Huamán** por su compartir su experiencia en el área de serología y sus consejos.

Y a todo el personal del departamento de Virología que colaboraron de una u otra manera conmigo en todo momento: Roxana Cáceda, Juan Sulca, Christian Albuja, Cecilia Rivera, Cristopher Cruz, Vidal Felices, Zonia Rios y Angélica Espinoza.

## DEDICATORIA

A mis padres **José y Estefanía** quienes me dieron la vida y sus vidas para hacer de mi la persona que hoy soy.

Y a mi hermanito **Nicolás**, para que siempre siga adelante persiguiendo sus ideales.

## CONTENIDO

I	ÍNDICE DE TABLAS	1
II	ÍNDICE DE FIGURAS	3
III	ABREVIACIONES	5
IV	RESUMEN	7
V	ABSTRACT	9
VI	INTRODUCCIÓN	11
VII	ANTECEDENTES	14
VIII	MATERIALES Y MÉTODOS	26

### 8.1 DETERMINACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ESPECÍFICOS IgG

#### 8.1.1 Producción de stock de semilla viral

27

#### 8.1.2 Demostración de la pureza de la semilla viral

28

8.1.3 Estandarización del Plaqueo y titulación de las semillas virales.	30
8.1.4 Inactivación de antígeno	33
8.1.5 Preparación del antígeno viral	34
8.1.6 Prueba de ELISA IgG indirecta	38
8.2 CONFIRMACIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS IgG POR MICRONEUTRALIZACIÓN	40
IX. RESULTADOS	47
X. DISCUSIÓN	51
XI. CONCLUSIONES	60
XII. RECOMENDACIONES	62
XIII. TABLAS	64
XIV. FIGURAS	75
XV. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96



# I ÍNDICE DE TABLAS



<b>Tabla 1</b>	Estandarización del Plaqueo.
<b>Tabla 2</b>	Inactivación del virus Rocío.
<b>Tabla 3</b>	Inactivación del virus Ilheus.
<b>Tabla 4</b>	Inactivación del virus Oeste del Nilo.
<b>Tabla 5</b>	Estandarización de la microneutralización.
<b>Tabla 6</b>	Titulación del virus Rocío – microneutralización.
<b>Tabla 7</b>	Titulación del virus Ilheus – microneutralización.
<b>Tabla 8</b>	Titulación del virus Oeste del Nilo – microneutralización.
<b>Tabla 9</b>	Positivos por microneutralización para el virus Rocío.
<b>Tabla 10</b>	Positivos por microneutralización para el virus Ilheus.

# I ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Curva de disociación (PCR en tiempo real).
<b>Figura 2</b>	Estandarización del Plaqueo (Virus Rocío).
<b>Figura 3</b>	Estandarización del Plaqueo (Virus Rocío).
<b>Figura 4</b>	Estandarización del Plaqueo (Virus Rocío).
<b>Figura 5</b>	Estandarización del Plaqueo (Virus Ilheus).
<b>Figura 6</b>	Estandarización del Plaqueo (Virus Ilheus).
<b>Figura 7</b>	Estandarización del Plaqueo (Virus Ilheus).
<b>Figura 8</b>	Estandarización del Plaqueo (Virus Oeste del Nilo).
<b>Figura 9</b>	Estandarización del Plaqueo (Virus Oeste del Nilo).
<b>Figura 10</b>	Estandarización del Plaqueo (Virus Oeste del Nilo).

<b>Figura 11</b>	Titulación del antígeno Rocío para ELISA.
<b>Figura 12</b>	Titulación del antígeno Ilheus para ELISA.
<b>Figura 13</b>	Titulación del antígeno Oeste del Nilo para ELISA.
<b>Figura 14</b>	Resultados de ELISA IgG.
<b>Figura 15</b>	Resultados de reacción cruzada en ELISA IgG.
<b>Figura 16</b>	Microneutralización virus Rocío.
<b>Figura 17</b>	Microneutralización virus Ilheus.
<b>Figura 18</b>	Resumen de los resultados.

### III ABREVIACIONES

<b>Arbovirus</b>	del inglés <i>artropod borned virus</i> - "Virus transmitidos por artrópodos"
<b>Kd</b>	Kilodalton
<b>nm</b>	Nanómetro
<b>ORF</b>	del inglés <i>open ride frame</i> - "Marco de lectura abierta"
<b>NS</b>	del inglés <i>non estructural</i> - "Regiones no estructurales"
<b>Tm</b>	del inglés <i>temperature of melting</i> - "Temperatura de fusión"
<b>Ct</b>	del inglés <i>threshold cycle</i> - "Ciclo umbral"
<b>E-MEM</b>	del inglés <i>Earle's minimum essential medium</i> - "medio mínimo esencial de Earle"

<b>SBF</b>	Suero bovino fetal
<b>RT- PCR</b>	del inglés <i>Retro transcriptase polimerase chain reaction</i> "Retro transcriptasa - Reacción en cadena de la polimerasa"
<b>AVL</b>	Buffer de lisis y carrier (transportador) de RNA
<b>AW1</b>	Buffer de lavado 1
<b>AW2</b>	Buffer de lavado 2
<b>AVE</b>	Buffer de elución
<b>UFP</b>	Unidades formadoras de placa
<b>TCID<sub>50</sub></b>	del inglés <i>Tissue Culture Infection Dose</i> - "50% de la dosis infectiva en cultivo de tejidos"
<b>HRP</b>	del inglés <i>Horseradish peroxidase</i> - "Peroxidasa de rábano picante"
<b>ABTS</b>	Azino-dietilbenzotiazol-sulfonato - "Sustrato para peroxidasa"
<b>CDC</b>	del inglés <i>Center of disease control y prevention</i> - "Centros para el control y prevención de enfermedades"
<b>PRNT</b>	del inglés <i>Plaque reduction neutralization test</i> - "Test de neutralización por reducción de placas"

## **IV RESUMEN**

Los flavivirus se encuentran distribuidos en las principales zonas tropicales del mundo, nuestra Amazonía es endémica para virus como el dengue; sin embargo, alberga también otros virus que aún no han sido estudiados.

El objetivo fue determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes contra los virus Rocío, Ilheus y Oeste del Nilo; utilizando la técnica del ELISA como tamizaje para la detección de muestras positivas y la microneutralización como prueba confirmatoria.

Se analizaron un total de 400 sueros por ELISA IgG de personas en fase convaleciente de la localidad de Iquitos entre los años 2003 y 2007. 152 sueros fueron negativos y 248 dieron positivo por ELISA IgG, de las cuales se confirmó mediante microneutralización 23 sueros positivos para el virus Ilheus y 7 sueros positivos para el virus Rocío. El valor de reacción cruzada para la prueba de ELISA fue de 87%.

Los resultados indican la existencia de anticuerpos neutralizantes contra el virus Ilheus en un 5.75% de los sueros analizados y también la presencia de anticuerpos neutralizantes contra el virus Rocío en un



1.75% de los sueros, afortunadamente las infecciones por estos virus en la localidad de Iquitos no es significativa con respecto a la observada para el virus dengue (34.7%).

## **V ABSTRACT**

The flavivirus are distributed in major tropical areas around the world, our Amazonia is endemic to viruses such as dengue, but also houses many others which have not yet been studied.

The aim was to evaluate the presence of neutralizing antibodies against Rocio, Ilheus and West Niles viruses using the technique of ELISA as screening for the detection of positive samples and the microneutralization as confirmatory test.

Were analyzed a total of 400 sera by Elisa IgG from people in convalescent phase of the city of Iquitos during the years 2003 - 2007. 152 were negative and 248 were positive by Elisa IgG, of which was confirmed by microneutralization 23 sera positive for the virus Ilheus and 7 sera positive for the virus Rocio. The value of cross-reactivity for the ELISA was 87%.

The results indicate the existence of neutralizing antibodies against the Ilheus virus in 5.75% of the sera analyzed and the presence of

neutralizing antibodies against the Rocio virus in 1.75% of the sera. Fortunately the presence of these viruses in the city of Iquitos is not significant compared to that observed for the dengue virus (34.7%).

## **VI INTRODUCCIÓN**

En la mayoría de los casos la evolución natural de las enfermedades por flavivirus se caracterizan por presentar síndromes febriles inespecíficos. En el Perú la enfermedad infecciosa causada por flavivirus más importante en la salud pública es el dengue (Cabezas, 2005); sin embargo, existen evidencias de la presencia de otros flavivirus en Sudamérica tales como el virus del Oeste del Nilo (Komar y Clark, 2006), el virus Ilheus (Turrel *et al.*, 2005) y el virus Rocío (Lopes *et al.*, 1978); virus que aún no han sido estudiados ampliamente en nuestro país (Leelarasamee *et al.*, 2004).

Los flavivirus presentan sitios antigénicos comunes que dificultan lograr un correcto diagnóstico debido a la existencia de amplia reactividad cruzada en la mayoría de técnicas serológicas (Calisher *et al.*, 1989), para ello se hace necesario contar con técnicas específicas, sensibles y reproducibles para cada virus (Mattar *et al.*, 2005), que ayuden a poner de manifiesto la respuesta inmune

mediada por anticuerpos, para estos casos el ELISA es utilizada como una prueba de tamizaje y la neutralización como prueba confirmatoria.

El Perú al poseer una amplia variedad de climas, flora y fauna, especialmente en la selva amazónica, favorece un ambiente adecuado para albergar numerosas especies, entre ellos vectores y reservorios de muchos flavivirus. Estudios de seroprevalencia en mosquitos, aves, equinos y humanos en Sudamérica registran la actividad de diversos flavivirus, como por ejemplo Rocío, Ilheus y Oeste del Nilo, en países como Brasil, Ecuador y Argentina.

Numerosas muestras provenientes de la vigilancia de síndromes febriles inespecíficos en la ciudad de Iquitos, quedan sin diagnóstico final, por lo cual se propuso la investigación de dichas muestras, considerando a otros flavivirus como causales de dichos casos clínicos.

El objetivo general es determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes contra los virus Rocío, Ilheus y Oeste del Nilo en una población humana de Iquitos entre los años 2003-2007.

Y como objetivos específicos

- Estandarizar el plaqueo de los virus Rocío, Ilheus y Oeste del Nilo con la técnica semilíquida.
- Determinar el tiempo necesario para la inactivación de los virus Rocío, Ilheus y Virus del Oeste del Nilo.
- Evaluar la prueba de ELISA IgG indirecto para los virus Rocío, Ilheus y Oeste del Nilo.
- Estandarizar la prueba de microneutralización para los virus Rocío, Ilheus y Oeste del Nilo.

## **VII ANTECEDENTES**

Los arbovirus, pertenecen a un grupo de virus taxonómicamente heterogéneo, ampliamente distribuido en todo el mundo y especialmente abundante en las regiones tropicales y subtropicales; comprenden 534 virus que tienen en común ser transmitidos por vectores (Tsai y Chandler, 2003).

Entre las familias más representativas de arbovirus encontramos Togaviridae, Bunyaviridae y Flaviridae, esta última comprende más de 70 virus, la mitad de los cuales están asociados a enfermedades humanas (Morales y Enria, 2005).

Los flavivirus son virus icosaédricos, su nucleocápside está compuesta por un genoma de RNA y una única proteína de la cápside, la proteína C. Su diámetro varía de 40 – 60 nm, son virus envueltos y ésta bicapa lipídica que rodea la nucleocápside está compuesta además por dos proteínas: la proteína M, de 7 - 8 Kd, sintetizada a partir de su precursor glicosilado prM y la proteína E, de 51 - 60 Kd, que define la diversidad de los flavivirus. La composición química en general de los flavivirus es de 6% de RNA, 66% proteínas, 17% lípidos y 9% carbohidratos (Fields y Knipe, 1990).

Su genoma, como se mencionó de RNA, es de cadena simple y polaridad positiva de aproximadamente 10.7 kb; poseen un capuchón de 7 metil guanosina “cap”, en el extremo 5´, por lo que funciona por si solo como un RNA mensajero en la célula hospedera, carece de una cola de poliA en el extremo 3´ y su único ORF se traduce en una poliproteína de aproximadamente 3 388 aminoácidos que codifica para diez proteínas, tres estructurales: la proteína de la nucleocápside (C), la proteína asociada a la membrana (prM) y la proteína de la envoltura (E) y siete proteínas no estructurales: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 (Shu *et al.*, 2003).



Los flavivirus se unen a receptores de membrana de la célula hospedera, por medio de un proceso endocítico; la acidificación del medio provoca un cambio conformacional en la proteína E (Modis *et al.*, 2004), lo que facilita la fusión de la envoltura viral con la membrana endosómica, liberándose así la nucleocápside hacia el citoplasma. Una vez dentro, el virus aprovecha la maquinaria de traducción de la célula y puede en primera instancia sintetizar su hebra negativa complementaria, la que utiliza como molde para la producción de nuevas moléculas de RNA positivo, las cuales actúan como RNAs mensajeros para la traducción de la poliproteína, o bien como molde para la síntesis de la hebra negativa o simplemente para ser encapsidada dentro del virión (Rice, 1996).

El ensamblaje del virión se inicia en el lumen del retículo endoplasmático, cuando el genoma del RNA positivo se asocia con la proteína C para formar la nucleocápside, adquiriendo la envoltura del retículo de la célula en la cual se encuentra. Inicialmente se forman partículas virales inmaduras no infecciosas formadas por heterodímeros de las proteínas E y prM, una porción de la proteína prM cubre a la proteína E, previniendo una fusión prematura de los heterodímeros mientras atraviesan el medio

ambiente ácido del *trans*-golgi, finalmente la ruptura proteolítica de la proteína prM, induce un cambio conformacional en la proteína E, haciendo madurar la partícula viral, es decir volviéndola infecciosa para ser liberada por exocitosis (Diamond, 2003).

Los vectores de los flavivirus, en su mayoría mosquitos, infectan a los humanos los cuales son huéspedes finales de la infección pues la viremia que se alcanza en ellos no es suficiente para seguir contaminando otros mosquitos y el ciclo se detiene. Cuando un insecto inyecta por medio de una picadura al flavivirus, los primeros ciclos de replicación viral ocurren a nivel de la piel, las células dendríticas de Langerhans, las cuales activadas por los antígenos virales, migran hacia el nódulo linfático, para infectar a otras células, activar linfocitos T e inducir producción de citoquinas y quimioquinas (Libraty *et al.*, 2001). El virus realiza una segunda ronda de replicación viral en el tejido linfático y es llevado hasta la circulación sanguínea, llegando a órganos como el hígado, riñones, bazo y aquellos flavivirus neurotrópicos como el virus Oeste de Nilo, Rocío o San Luis, alcanzan el encéfalo por tres mecanismos principales: El primero, es el transporte pasivo a través del endotelio; el segundo, es la replicación en las células endoteliales de la barrera

hematoencefálica y el tercero, es la utilización de células inflamatorias como vehículos (Diamond, 2003).

Las enfermedades causadas por flavivirus se presentan generalmente como infecciones asintomáticas, síndromes virales inespecíficos y cuadros febriles benignos de duración limitada a cuadros más severos de encefalitis o fiebres hemorrágicas virales (Jaramillo, 2000). Sin embargo, las manifestaciones clínicas solo ocurren en un pequeño porcentaje de los individuos infectados, las razones aún no se conocen, pero se sugiere que involucran factores genéticos del hospedero así como otros factores como la edad, sexo o estado nutricional del individuo (Pradaarismendy y Castellanos, 2006).

En ratones se han identificado cepas susceptibles y cepas resistentes a la infección por algunos flavivirus. Estudios de Lynch y Hughes en 1937 identificaron a la cepa de ratones *Det* como resistente a la infección por virus de fiebre amarilla. Webster en 1937 identificó dos cepas de ratón resistentes a la infección con virus de San Luis; estos trabajos aportaron la primera evidencia experimental que la constitución genética del hospedero podía determinar la

resistencia o susceptibilidad a la infección. En 1952, Sabin también hizo experimentos de cruces y retrocruces de prueba que permitieron determinar que el rasgo de resistencia se heredaba con un patrón autosómico dominante. El gen de resistencia se denominó Flv<sup>r</sup>, mientras que el alelo que confería susceptibilidad se denominó Flv<sup>s</sup>. Recientemente para el virus Oeste del Nilo se ha mapeado al gen responsable de la resistencia a en el cromosoma 5 (gen de la oligoadenilato sintetasa 1b), que codifica una proteína que sintetiza oligómeros de adenina que activan la RNasaL, que a su vez degrada los RNAs virales.

En humanos, se identificó un polimorfismo asociado con susceptibilidad a infección por virus Oeste del Nilo en el gen de OasL. Sin embargo, el mecanismo bioquímico y molecular exacto por el cual se produce la susceptibilidad no ha sido completamente dilucidado (Pradaarismendy y Castellanos, 2006).

El diagnóstico de confirmación de una infección por flavivirus se basa en la detección del virus por ampliación genómica (RT-PCR) o el aislamiento del virus en cultivo celular o en ratones lactantes mayormente a partir de muestras de suero tomadas durante la fase

aguda de la enfermedad, es decir dentro de los primeros días de presentar los síntomas de la infección, para evitar o disminuir en lo posible la presencia de anticuerpos que impidan el aislamiento del virus. En el caso de flavivirus como el dengue, se han logrado aislamientos más allá de este tiempo, mientras que para otros flavivirus como San Luis o Rocío, rara vez se ha logrado aislar a partir de suero de los pacientes, en estos casos los aislamientos se han obtenido a partir de fluidos cerebroespinal o cerebros colectados *post mortem* (Schmidt, Emmons, 1979).

También se encuentran disponibles técnicas serológicas para la detección de anticuerpos IgM (fase aguda) o IgG (fase convaleciente). Sin embargo, existe una alta reactividad cruzada en la respuesta mediada por anticuerpos debido a los epítopes comunes que presentan los flavivirus en su envoltura, esto representa un verdadero problema en los diagnósticos serológicos en áreas donde más de un flavivirus circula (Calisher *et al.*, 1989), o en áreas donde la población ha recibido previamente inmunización contra otros flavivirus, como por ejemplo, para la fiebre amarilla. Por ello son necesarios ensayos más específicos que el ELISA, como los de neutralización.

Los ensayos de neutralización de un virus han sido usados ampliamente en Virología más que otros procedimientos serológicos, estos se basan en la interacción antígeno–anticuerpo y la pérdida de la infectividad del primero, estos ensayos *in vitro* responden a la capacidad que tienen los virus de producir un efecto citopático en cultivos celulares y para aquellos que no lo producen, a su habilidad de formar placas en cultivos celulares inmovilizados por ejemplo con agar, agarosa o almidón (Porterfield, 1960). Las monocapas celulares, se pueden colorear y las placas virales se visualizan como aéreas no coloreadas de células infectadas, que no toman el colorante vital incorporado en el medio de mantenimiento, siendo un foco localizado de infección viral en cultivo celular. La enumeración de estos focos es un método cuantitativo para ensayar la infectividad viral y demostrar que una reducción en el número de placas provee una medida sensible para medir la capacidad neutralizante de un anticuerpo.

La manera como los flavivirus se transmiten en forma natural, es mediante ciclos enzoóticos que incluyen mosquitos como vectores principales, entre ellos podemos citar a los siguientes géneros: *Aedes*

*sp.* y *Psorophora ferox* a partir de los cuales se han aislado los virus Rocío, Ilheus y Oeste del Nilo; y el género *Culex spp.* a partir del cual se ha aislado el virus Oeste del Nilo. Los reservorios varían de acuerdo a los hábitos alimenticios de los vectores; por ejemplo, para los mosquitos del género *Culex*, son mayormente ornitófilos, siendo las aves su reservorio principal, entre otros tenemos a pequeños mamíferos, murciélagos, equinos, macacos y los humanos que son hospederos accidentales - finales que no contribuyen al ciclo de transmisión (Campbell *et al.*, 2002); sin embargo, durante el brote ocurrido en el 2002 en New York por el virus Oeste del Nilo, se halló que este virus se pudo transmitir entre seres humanos a través de órganos trasplantados o derivados de la sangre, otros reportes registran que el virus de la Encefalitis Japonesa puede ser transmitido a través de la placenta.

El virus **Rocío** es uno de los últimos flavivirus descubiertos, aislado del sistema nervioso central de un paciente que murió durante una epidemia de encefalitis en las costas de Sao Paulo, Brasil 1975 (Lopes *et al.*, 1978). En los siguientes años se diagnosticaron 1021 casos y se realizaron diversos aislamientos del virus, especialmente en hombres jóvenes agricultores. Aunque los brotes que se registran de este virus

se dan esporádicamente, se ha reportado la presencia de anticuerpos neutralizantes en las personas que viven en las áreas rurales del sureste y noreste del Brasil (Figueireido et al, 1986) (Straatmann et al, 1997).

Este virus, se mantiene en un ciclo en el cual las aves silvestres y migratorias son los reservorios; los mosquitos *Aedes* y *Psorophora* son los vectores (Figueiredo y Tadeu, 2007), en el Perú se tienen están presentes estos vectores en nuestra Amazonía, aunque aún no se han registrado reportes de la circulación de este flavivirus.

Las infecciones causadas por el virus Rocío se caracterizan por presentar dolores de cabeza, fiebre, vómitos, debilidad, distensión abdominal, mialgias, fotofobia; mientras que los casos de encefalitis incluyen inflamación de las meninges, pérdida de los reflejos y convulsiones (Iversson, 2005). Después de la epidemia producida en el Brasil en el año 1975, que causó numerosas muertes por encefalitis, este virus ha desaparecido temporalmente, no obstante la presencia de anticuerpos neutralizantes en la población del noreste y sureste del Brasil, indicaría que el virus sigue circulando y podría reemerger, lo que no deja de ser un tema de cuidado (Coimbra *et al.*, 2008).



El virus **Ilheus**, se encuentra antigénicamente relacionado con el virus Rocío, sin embargo, los anticuerpos producidos durante una infección por Ilheus, reaccionan también con otros flavivirus. Este virus fue originalmente clasificado en el complejo antigénico de las Encefalitis Japonesa, actualmente es ubicado juntamente con el virus Rocío en el complejo antigénico Ntaya, este virus no ha sido asociado con epidemias, sólo aislado esporádicamente en humanos. El espectro clínico causado por este virus varía desde infecciones asintomáticas hasta cuadros graves de encefalitis, la mayoría de los casos se caracterizan por un cuadro febril súbito con fiebre moderada que es acompañada por cefaleas, escalofríos, fotofobia, artralgias, mialgias y astenias. Este cuadro evoluciona favorablemente en 3 días y se registra una recuperación completa y sin secuelas (Johnson *et al.*, 2007).

El virus Ilheus fue aislado por primera vez en Ilheus, Bahía del Brasil en 1944, a partir de mosquitos y se encuentra distribuido ampliamente en América del Sur (Nonato, 1997). En Panamá, 1967; se realizó el primer aislamiento del virus en humanos, así como la detección de anticuerpos neutralizantes en los pobladores de la

zona (Srihongse y Johnson, 1967); en Colombia, también se realizó un aislamiento en humanos (Príaz-Landínez *et al.*, 1968). En 1982 en Argentina, se confirmó que el aislamiento realizado años atrás, correspondía al virus Ilheus y no a una cepa del virus que produce la fiebre hemorrágica Argentina (Mettler y Casals, 1982). En el Brasil también se han realizado aislamiento a partir de aves y detectado anticuerpos neutralizantes en ellas (Pereira, 2001). Recientemente en el 2004 se realizó el primer aislamiento del virus en humanos en el Ecuador (Johnson *et al.*, 2007), en el Perú se han logrado aislar el virus a partir de mosquitos de los géneros *Psorophora ferox* y *Culex Melanoconion* capturados en Loreto-Perú (Turrel *et al.*, 2005).

El **virus Oeste del Nilo**, flavivirus miembro del complejo antigénico de la Encefalitis Japonesa se encuentra ampliamente distribuido en las Américas, la infección es por lo general asintomática en un 80% de los casos y un 20% desarrolla la fiebre del oeste del Nilo que se caracteriza por procesos febriles, dolor de cabeza, erupción, mialgias y fatiga, síntomas que desaparecen en 3 a 6 días (Whitley, 2003). Sin embargo, la infección puede evolucionar hasta producir encefalitis (1 de cada 150 casos) en lo que se denomina Meningitis del Oeste del Nilo, con síntomas como dolor de cabeza, fiebre, rigidez del

cuello, estupor, desorientación, debilidad muscular, parálisis y coma, llevando incluso al paciente a la muerte mayormente en personas mayores de 50 años. La producción de anticuerpos dirigidos frente a epítomos de la proteína E confieren una protección duradera, a veces de por vida, frente a futuras reinfecciones (Price and Thind, 1971).

El virus del oeste del Nilo identificado por primera vez en Uganda en 1937, posteriormente en 1999 en Norteamérica durante un brote epidémico de encefalitis en New York, desde allí se ha venido expandiendo rápidamente hacia el sur afectando a México, América Central (Komar y Clark., 2006), para ser reportada por primera vez en el 2005 la presencia de anticuerpos neutralizantes contra este virus en Colombia (Mattar *et al.*, 2005) y recientemente aislado en Argentina del cerebro de dos caballos con encefalitis (Morales *et al.*, 2006), en el Perú no hay trabajo que reporten la presencia de este virus.

## **VIII MATERIALES Y MÉTODOS**

Las semillas virales fueron proporcionadas por el Laboratorio de Virología del Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales (NMRCDC): Virus Rocío cepa VR-70, virus Ilheus cepa TRVL 5800 y el virus del Oeste del Nilo cepa NY99.

Se evaluaron 400 muestras de suero en fase convaleciente procedentes de la ciudad de Iquitos, que fueron obtenidas entre los años 2003-2007 de pacientes con síndromes febriles sin diagnóstico confirmatorio por medio de aislamiento viral.

## **8.1 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS IgG**

### **8.1.1 Producción de stock de semilla viral**

A partir de un stock viral almacenado a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se procedió a propagar el virus inoculando 1ml de cada cepa viral en frascos de  $225\text{ cm}^2$  con monocapa confluyente de células VERO-76 (células epiteliales de riñón del mono verde africano *Cercopithecus aethiops*) para permitir la absorción viral, se dejó incubando por 60 minutos a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ . Luego de este periodo se adicionó 50 ml del medio de mantenimiento E-MEM con 2% de SBF y se dejó incubando en las condiciones mencionadas anteriormente hasta observar un efecto citopático en el 75% del frasco momento en el cual se procedió a congelar y descongelar el frasco para asegurar la homogeneidad del virus en la suspensión. Finalmente se centrifugó la suspensión viral a 2000 rpm por 10 minutos, se colectó el sobrenadante y se alicuotó en viales de 1ml para ser guardados a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

### **8.1.2 Demostración de la pureza de las semillas virales**

Se procedió a realizar la extracción del RNA utilizando el kit de extracción *QIAmp viral RNA*; se tomó suspensiones virales de cada cepa, se colocó 560  $\mu\text{l}$  del buffer AVL en un tubo de microcentrifuga de 1.5ml, se añadió 140  $\mu\text{l}$  de la semilla viral, se mezcló con ayuda de

un vortex por 15 segundos, se dejó incubando a temperatura ambiente por 10 minutos, se añadió 560 µl de etanol 96-100% y mezcló con ayuda de un vortex por 15 segundos. Se aplicó 630 µl de la mezcla en la columna *QIAamp Mini spin*, con un tubo para colector de 2 ml, se cerró la tapa y se centrifugó 8000 rpm por un minuto, se cambió el tubo de colección por uno nuevo y se descartó primer tubo que contenía el filtrado, se volvió a cargar 630 µl y se repitió el procedimiento descrito, seguidamente se añadió 500 µl del buffer AW1 y se centrifugó a 8000 rpm por un minuto, descartando el filtrado. Se añadió 500 µl del buffer AW2 y se centrifugó a 14 000 rpm por 3 minutos; se eliminó nuevamente el filtrado, se adicionó finalmente 60 µl del buffer AVE a la columna, se centrifugó a 8000 rpm por un minuto, se recuperó el filtrado y almacenó a -20 °C.

Para la prueba de PCR en tiempo real, se siguió los procedimientos establecidos en el laboratorio para la detección de flavivirus, se utilizó el equipo *Gene Amp 5700 Sequence Detection System*, los cebadores fueron: *Forward Primer* (5' TAC AAC ATG ATG GGA AAG AGA GAG AA) y *Reverse Primer* (5' GTG TCC CAG CCG GCG GTG TCA TCA GC), los cuales alinean con el fragmento NS5 del genoma de los flavivirus.

La preparación de la reacción para el SYBR PCR fue como sigue: en un tubo eppendorf de 1.5 ml se mezcló considerando por cada muestra lo siguiente, 25  $\mu$ l de 2X SYBR-green PCR master mix; 0.25 multiscribe RT (50 U/ $\mu$ l); 1.00  $\mu$ l de inhibidor de RNAsa (20U/ $\mu$ l); 0.5  $\mu$ l de cada primer (100 $\mu$ M) y 17.75  $\mu$ l de agua para tener en total un volumen de 45  $\mu$ l (las concentraciones finales de cada reactivo fueron 1X para el *master mix*, 0.25U/ $\mu$ l para la enzima, 0.4U/ $\mu$ l del inhibidor de RNAsa, 1  $\mu$ M para cada primer. Se dispensó 45  $\mu$ l del *master mix* en tubos y se le adicionó 5  $\mu$ l de RNA de la muestra. El protocolo de amplificación fue como sigue: 48 °C por 30 minutos seguido de 95 °C por 10 min; y 45 ciclos de 95 °C por 15 segundos seguido de 55 °C por 1 minuto. Se analizaron luego los gráficos de amplificación (curvas de disociación); la Tm (temperatura en el que el 50% del DNA se encuentra desnaturalizado) y el Ct (el N° de ciclos necesarios para que se produzca un aumento de la fluorescencia significativo con respecto a la señal de base y las curvas de disociación).

### **8.1.3 Estandarización del Plaqueo y titulación de las semillas virales**



Para poder determinar el título viral, fue necesario estandarizar el plaqueo utilizando la técnica semi-líquida, se probaron tres diferentes líneas celulares VERO-76 (derivadas de las células epiteliales del riñón del mono africano verde *Cercopithecus aethiops*), BHK 21-clon15 (células derivadas del riñón de hámster bebé *Mesocricetus auratus*) y LLCMK2 (células derivadas del riñón del mono Rhesus *Macaca mulata*). El tiempo de coloración varió de 3, 4, 5 y 6 días.

Se eliminó el medio de cultivo de un frasco de 225 cm<sup>2</sup> conteniendo una monocapa confluyente de células Vero, se lavó la monocapa con 10 ml de medio básico conteniendo 1% de antibiótico-antimicótico, luego se adicionó 5 ml de Tripsina-EDTA 10X y se incubó por unos minutos a temperatura ambiente hasta que se observó un ligero desprendimiento de las células, momento en el cual se eliminó la tripsina y se incubó por 10 minutos más a 37 °C. Las células liberadas de su anclaje por medios enzimáticos se resuspendieron en 10 ml de medio de crecimiento, se homogenizaron con la ayuda de una pipeta y se diluyeron con azul de tripan para proceder con el conteo usando la cámara de Neubauer se ajustó la concentración celular a  $3 \times 10^5$  células/ml utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen final de la suspensión (ml)} = \frac{\bar{x} \times 10^4 \times 10 \times 10}{3 \times 10^5}$$

Donde:

$\bar{x}$  = Promedio de células de los cuatro cuadrantes de la cámara de *Neubauer*.

$10^4$  = Constante obtenida en función al factor de la cámara de *Neubauer*.

10 = Volumen del medio de crecimiento inicial adicionado al frasco de células

10 = Dilución 1:10 con el azul de tripan

$3 \times 10^5$  = Concentración final de las células.

Para titular el virus, se agregó 0.5 ml por pocillo de las células preparadas en placas de poliestireno de 24 pozos, luego se inoculó 0.05 ml por pocillo de las diluciones del virus en E-MEM al 2% de SBF, cada dilución se inoculó por duplicado. Después de 3 horas de incubación a 37 °C en atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub> se adicionó 0.5ml/pocillo del medio de soporte (ver anexo), se incubaron

nuevamente las placas a 37 °C con una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 3, 4, 5 y 6 días, periodo en los cuales se precedió a eliminar el medio y agregarles 0.5ml/pocillo de una solución de fijado (azul de naftol en ácido acético) por una hora. Se eliminó este colorante y se enjuagó para realizar el conteo de las placas virales formadas.

Aquella dilución en la que se lograron contar un promedio de 10 a 15 placas se eligió para poder hallar el título viral, que se expresó en unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/ml), usando la siguiente fórmula:

$\text{Título del virus (UFP/ml)} = \bar{x} \text{ placas} \times 20 \times \text{inversa de la dilución viral}$
--

Donde:

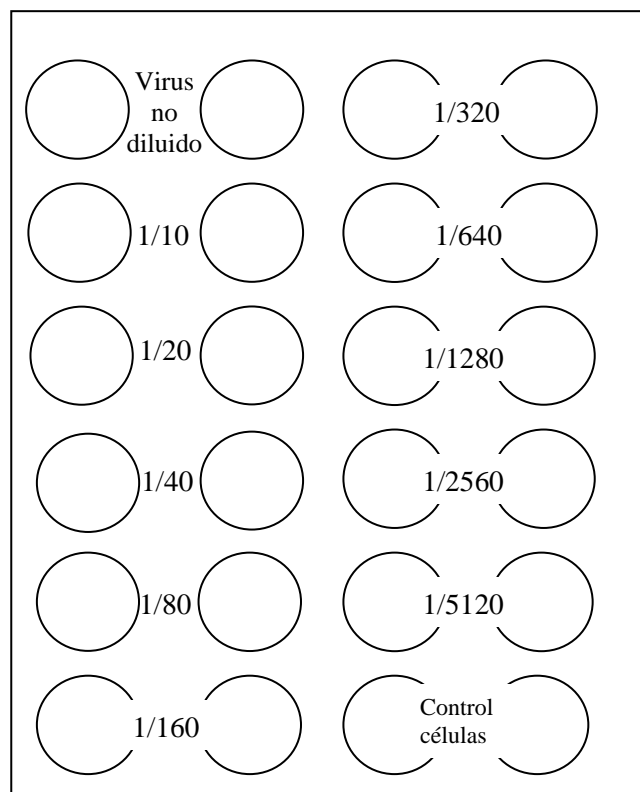
$\bar{x}$  = Promedio de placas contadas en los pocillos

20 = Constante obtenida a razón de los volúmenes usados en el pocillo\*

\*0.05ml del inóculo viral/ 0.5 ml de suspensión celular + 0.5 ml del medio de soporte = 0.05/1 = 20.

Se compararon los resultados obtenidos en la titulación de los virus en las diferentes líneas celulares usadas, considerando el tamaño y la

claridad de las placas formadas en cada línea y en cada día de coloración.



**Titulación de las semillas virales por plaqueo:** Esquema seguido para la titulación de los virus en placas de 24 pocillos, cada dilución del virus en E-MEM al 2% de SBF se inoculó por duplicado empezando por el virus sin diluir y a continuación las diluciones al doble, dependiendo del título del virus se procedieron en algunos casos a realizar diluciones más allá de 1/5120. En todas las placas se considero un par de pozos como control de células a los cuales solo se inoculó medio.

#### **8.1.4 Inactivación de antígeno**

Previamente a la preparación de los antígenos a usar para la prueba de ELISA se hizo necesario determinar las condiciones necesarias para lograr una correcta inactivación de los virus a trabajar. Para ello se preparó el Bromoetilamine Binario (BEI) a partir de la mezcla de 2-Bromoetilamine hidrobromide 1M en NaOH 0.2N, en agitación constante a 37 °C por una hora.

A 20 ml de suspensión viral se le adicionó 0.62 ml de BEI 1M para llevar así la solución a una concentración final de 0.003M y se repartió en 20 viales (1ml/vial), y fueron almacenados a 5 °C, tomándose un vial a diferentes intervalos de tiempo: 0, 8, 24, 32, 48, 56, 72 y 160 horas a los cuales se le adicionó tiosulfato de sodio 1M en cantidad suficiente para llevar la solución final a una concentración de 0.02M, para neutralizar así el efecto del BEI. A todas las alícuotas

inactivadas obtenidas se les tituló. Los resultados finales se expresarán en  $\text{Log}_{10} \text{ UFP/ml.h}^{-1}$ , es decir las UFP totales presentes en la suspensión viral por mililitro y el tiempo necesario en horas para su completa inactivación con bromoetilamina a 4 °C.

#### **8.1.5 Preparación del antígeno**

Se inocularon las semillas virales en 6 frascos de 175 cm<sup>2</sup> (ver cultivo de virus). Se observaron los frascos diariamente con ayuda de un microscopio invertido, la cosecha viral se realizó cuando el efecto citopático (ECP) alcanzó el 75% del frasco, momento en el cual se procedió a congelar - descongelar los frascos, luego el medio y las células fueron transferidas a tubos de 500 ml y centrifugados a 7000 rpm por 10 minutos a 4 °C, el sobrenadante recuperado se inactivó usando BEI (ver inactivación de antígeno). A la suspensión viral inactivada se le agregó 2.3% de NaCl (2.3 gr de NaCl por cada 100 ml de suspensión) y 7% de polietilenglicol X-8000 (7 gr de PEG por cada 100 ml de suspensión), se dejó a 4 °C por 24 horas en agitación para ayudar a la precipitación de las partículas virales, se centrifugó todo el contenido a 8 000 rpm por 20 minutos, el sobrenadante se eliminó y el pellet se resuspendió en borato salino pH 9, en un

volumen veinte veces menor a la suspensión viral original, se hizo alícuotas y almacenó a -20 °C. Para producir el control de antígeno se siguió el mismo procedimiento, utilizando cultivo de células sin infectar.

El antígeno producido se tituló por la prueba de ELISA para su uso, se usaron como controles negativos: sueros humanos normales (muestras séricas provenientes de personas sanas de lugares sin antecedentes de presencia de flavivirus y sin vacuna contra fiebre amarilla), y como control positivos: fluidos ascíticos hiperinmunes producidos en ratón, específicos para cada flavivirus.

Se preparó las siguientes diluciones de los antígenos y del control de antígeno: 1/10, 1/50, 1/100, 1/500, 1/1000, 1/2000 y 1/4000 en PBS 1X, pH 7.4 con las cuales se sensibilizaron las placas de ELISA.

A cada pozo se le agregó 100 µl de la dilución correspondiente con la ayuda de una pipeta multicanal, empezando por el control de antígeno de la dilución menos concentrada a la más concentrada, seguidamente se realizó el mismo procedimiento con

el antígeno a trabajar. La placa se envolvió en papel aluminio y se dejó incubando toda la noche a 4 °C.

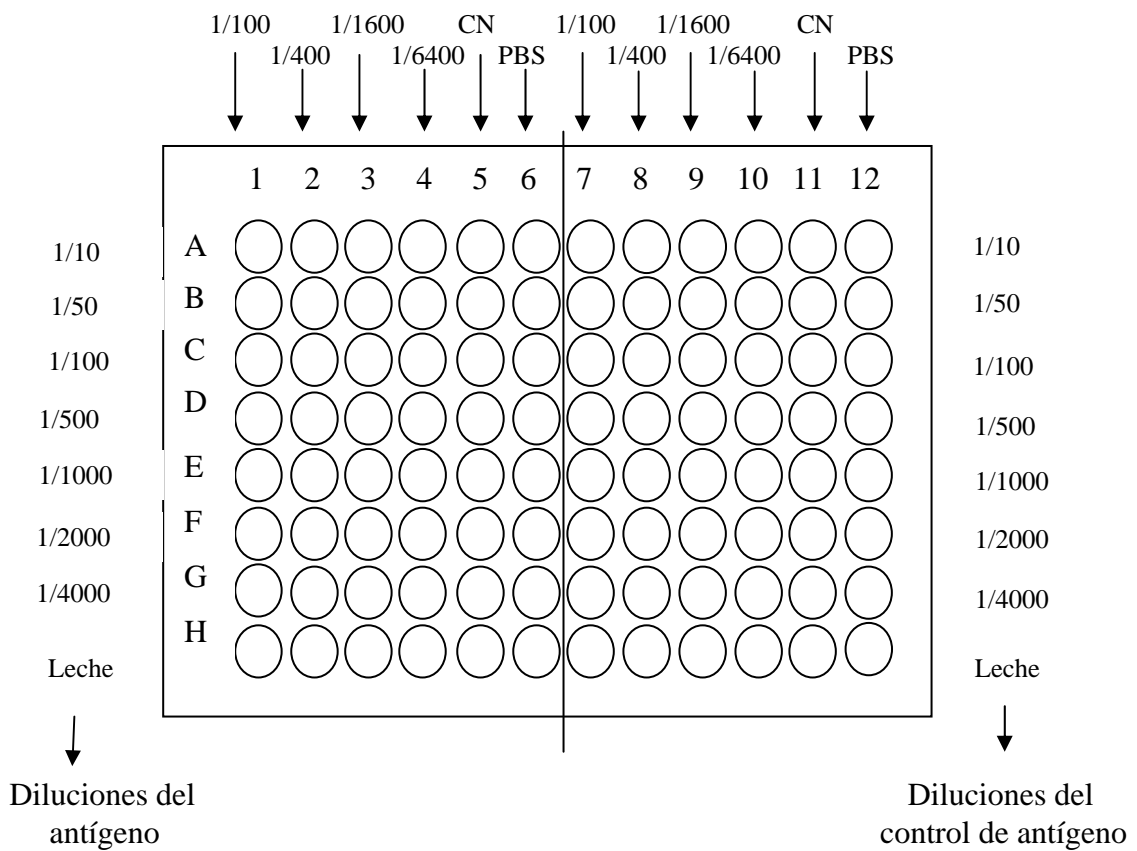
Las placas sensibilizadas, se lavaron usando el lavador de placas Dynatech Ultrawash II, pre programado para lavar 5 veces usando 250 µl buffer de lavado por vez. Después de cada lavado se removió el exceso de buffer de lavado invirtiendo la placa sobre papel toalla.

Se prepararon las siguientes diluciones: 1/100, 1/400, 1/1600, 1/6400 del fluido ascítico hiperinmune (control positivo), usando buffer de dilución (leche descremada al 5% en PBS 1X - tween al 0.05%) y se dispensaron 100 µl de las mismas en las columnas 1, 2, 3 y 4 respectivamente (ver figura titulación del antígeno), adicionalmente en la columna 5 se agregó control negativo diluido 1/100 y a la columna 6 solamente buffer diluyente, esta distribución se repite en la otra mitad de la placa, sensibilizada con el control de antígeno. Se incubaron las placas por una hora a 37 °C y se lavó 5 veces, se añadió 100 µl del conjugado (anti ratón IgG) diluido 1/8000 en buffer diluyente a todos los pozos de la placa y se incubó por una hora a 37 °C, se agregó 100 µl del sustrato ABTS a todos los pozos de la placa y se incubó por 30 minutos a 37 °C. La placa se leyó en un



espectrofotometro (Dynex Revelation 4.25) a una longitud de onda de 405 nm con filtro de referencia 630 nm. El título de antígeno a usarse se determinó tomando los valores más altos de los positivos y los más bajos de los negativos.

### Diluciones del fluido ascítico



**Titulación del antígeno** Distribución de las diluciones del antígeno en la placa de poliestireno de 96 pocillos, la mitad de la placa se sensibilizó con el antígeno y la otra mitad con el control de antígeno. Seguidamente se añadió las muestras control (fluido ascítico de ratón hiperinmune) en las diluciones 1/100, 1/400.

1/1600 y 1/6400 además del control negativo (CN) y finalmente PBS.

#### **8.1.6 Prueba de ELISA IgG indirecta**

Se sensibilizó las placas de cloruro de polivinilo con el antígeno Rocío, diluido 1/50 en PBS 1X, el antígeno Ilheus diluido 1/50 en PBS 1X y el antígeno Oeste del Nilo diluido 1/500 en PBS 1X, se agregó 100 ml de las diluciones en cada pozo usando una pipeta multicanal. Las placas se guardaron toda la noche a 4 °C, al día siguiente las placas sensibilizadas se lavaron.

Se analizaron 400 muestras pre-diluidas 1/10 en EMEM al 2% FBS (0.9 ml del medio y 0.1 ml del suero) y se almacenó estas diluciones a -20 °C hasta su uso, para realizar una segunda dilución de los sueros se utilizó 450 µl del buffer de dilución y 50 µl del suero pre-diluido obteniendo finalmente una dilución 1/100. Estas diluciones se colocaron por duplicado en las placas marcadas una al lado del antígeno y la otra al lado del control de antígeno, por cada placa de 96 pozos se usó un pocillo de control positivo (A1) y 7 pocillos de control negativo (B1 - H1), se incubó por una hora a 37 °C, se lavaron las placas y se le agregó el conjugado anti IgG humana diluido 1/4000, se incubaron las placas por una hora a 37 °C, se lavaron y se

agregó el sustrato para incubarse por 30 minutos, finalmente fueron leídos a 405 nm en el lector de placas. Las placas fueron leídas de inmediato ya que el color verde desarrollado en los pozos, que indican una reacción positiva, va en aumento aún en los controles negativos con el paso de las horas.

Los resultados obtenidos se expresan numéricamente en densidad óptica para cada muestra. Es considerado como válida la prueba cuando el control positivo tiene un D.O.  $\geq$  a 1.00 y los controles negativos tienen un D.O.  $\leq$  a 0.2, cada muestra será positiva cuando tenga valores superiores al valor de corte. El valor de corte es el promedio de los negativos más tres veces su desviación estándar.

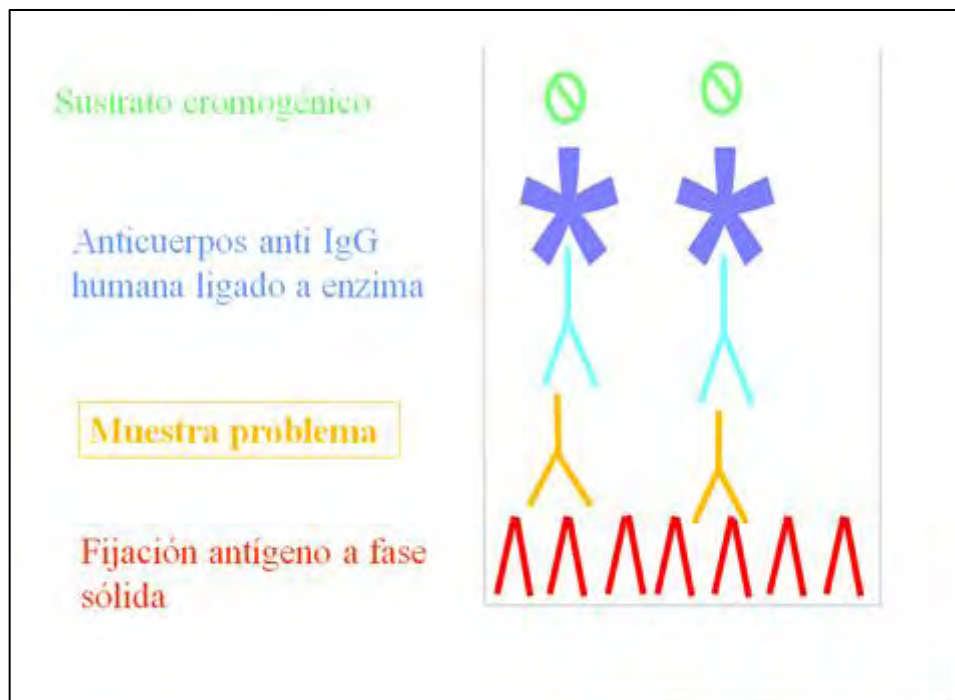
$$VC = \bar{X}_N + 3(DS)$$

Donde:

VC = Valor de corte

$\bar{X}_N$  = Es el promedio de la densidad óptica de los controles negativos.

DS = Desviación estándar



**Esquema del ELISA IgG indirecto** La placa fue sensibilizada con el antígeno preparado utilizando PEG X-8000, la detección de anticuerpos se llevó a cabo usando un conjugado a-human IgG marcado con HRP y ABTS como sustrato.

## 8.2 CONFIRMACIÓN DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS POR MICRONEUTRALIZACIÓN

Se estandarizó la prueba de microneutralización por sus ventajas en procesar mayor cantidad de muestras, su bajo costo en relación a la neutralización clásica y se determinó la dilución óptima para cada semilla viral y el tiempo de coloración. Para determinar el título viral se toma en cuenta el valor de TCID<sub>50</sub> (dilución en la cual el stock viral es capaz de infectar el 50% de los pozos). Se realizaron diluciones logarítmicas seriadas 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup>, 10<sup>-7</sup>, 10<sup>-8</sup>, 10<sup>-9</sup>, 10<sup>-10</sup>, 10<sup>-11</sup> y 10<sup>-12</sup>, se usó como diluyente medio EMEM con 2% SBF y conteniendo 1% de antibiótico. Se repartió 100 µl de cada dilución en los pozos (6 pozos por dilución), dejando las dos últimas filas a las cuales se le agregó solamente medio de dilución como control de células.

Para esta prueba se necesitó contar con una suspensión celular de 5x10<sup>5</sup> cel/ml el procedimiento que se siguió fue el descrito en cultivo y titulación de virus, con la diferencia que al momento de aplicar la fórmula se debe considerar el factor 5x10<sup>5</sup> cel/ml en el

denominador, y el medio en el cual se resuspendieron las células contenía EMEM con 4% de SBF. Se añadieron 100 µl de la suspensión celular preparada a toda la placa y se incubó por 3, 4, 5 y 6 días a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>, después de los tiempos establecidos se coloreó invirtiendo la placa y golpeando suavemente para eliminar el medio, se lavaron los pocillos suavemente con ayuda de una pipeta multicanal para terminar de eliminar el medio y se agregó la solución de azul de naftol y ácido acético en cada pocillo con cuidado de no desprender la monocapa formada, se dejó coloreando por una hora, se enjuagó y se calculó la dilución en la cual se trabajará el virus, es decir 100 TCID<sub>50</sub> (100 veces el TCID<sub>50</sub>).

Una vez que se determinó la línea celular en la cual se va a trabajar cada virus, el día óptimo de coloración y la dilución del virus a usar (100 TCID<sub>50</sub>), se procedió a trabajar con todas las muestras positivas por ELISA para cada flavivirus. Se preparó la dilución del virus y se mantuvo durante todo el procedimiento a 4 °C. Se hicieron diluciones del suero 1:20, 1:40, 1:80 y 1:160 en EMEM con 1% de antibiótico, se añadieron 95 µl de diluyente a toda la primera fila (A1-A12) y a la quinta fila (E1-E12) de la placa de 96 pozos, y 50 µl al resto de pozos, seguidamente se agregaron 5 µl de muestra a cada

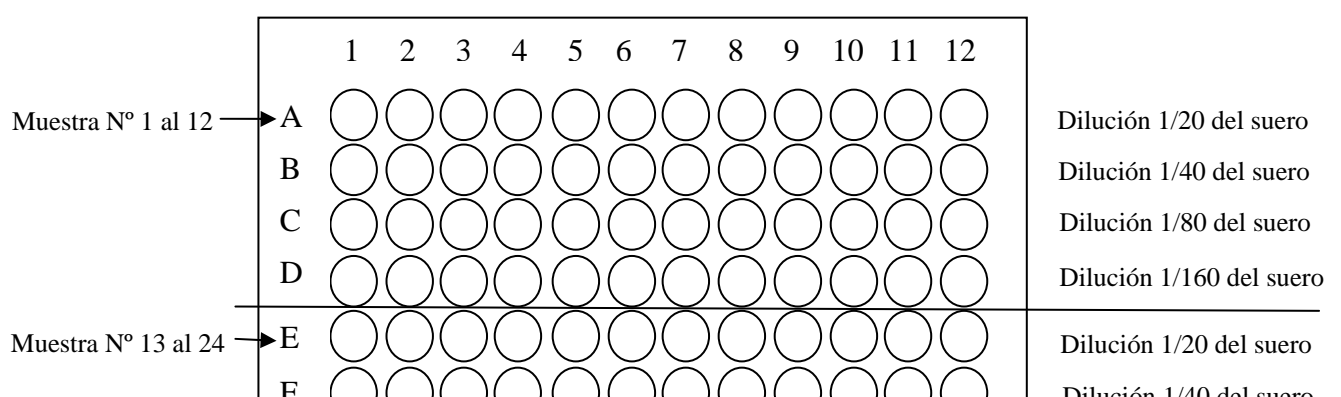
pocillo (A1- A12, E1-E12); en total por placa de 96 pozos se corrieron 24 muestras. Con ayuda de una pipeta multicanal, se procedió a realizar las diluciones seriadas mezclando y tomando 50 µl de la primera fila (A1-A12) y transfiriéndolos a la segunda fila (B1-B12), de la segunda a la tercera (C1-C12) y de ésta última a la cuarta fila (D1-D12), eliminando los 50 µl finales; el mismo procedimiento se realizó para las muestras que se encontraron en la fila E1-E12. Una vez realizadas las diluciones, se procedió a agregar 50 µl de la dilución del virus a trabajar a todos los pocillos de la placa y llevarlos a incubación por 60 minutos a 37 °C, después del tiempo de incubación se agregó 100 µl de la suspensión celular correspondiente al virus con el que se trabajó a una concentración de  $5 \times 10^5$  /ml en E-MEM al 4% FBS.

Seguidamente se incubó las placas de 96 pozos por el tiempo requerido para cada virus a 37 °C en una atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>. Transcurrido el tiempo necesario, se procedió a colorear las placas; se descartó el contenido de la placa invirtiéndola suavemente y presionándola sobre una superficie absorbente, seguidamente se lavó cada pocillo con 100 µl de agua y se añadió 100 µl de

colorante. Después de una hora de coloración, se lavaron las placas con 100 µl de agua para la interpretación final.

Se incluyó además una placa conteniendo los controles positivos y negativos para la prueba, el tratamiento que se siguió fue el mismo como si fueran una muestra de suero, es decir los controles tuvieron las mismas diluciones, para cada virus con el que se trabajó, se utilizó como control negativo el fluido ascítico de ratón normal y como control positivo el fluido ascítico de ratón correspondiente al virus procesado, adicionalmente en cada caso se utilizó también los fluidos ascíticos de todos los flavivirus restantes evaluados en este estudio para determinar si existe reacción cruzada entre ellos.

En otra placa se añadió 50 µl de medio / 50 µl de la dilución del virus y 100 µl de suspensión celular como control de la dilución del virus, así como pocillos que sólo contienen 100 µl de medio y 100 µl de suspensión celular como control de células.





**Procesamiento de muestra** Por placa se procesaron un total de 24 muestras con 4 diluciones por muestra, con las respectivas diluciones que se detallan en la figura.

Para hallar el título de virus a trabajar se busca la dilución capaz de infectar el 50% de los pocillos, esto se calcula inmediatamente de la lectura de la placa, si el valor corresponde exactamente a un 50% de pocillos infectados, en caso contrario se utiliza el Método de Reed y Muench para calcular la distancia proporcional exacta entre dos diluciones, en la cual se encuentran el punto final de 50% y se obtiene en este ejemplo:

Dilución del virus	Proporción	Pocillos infectados	Pocillos sin infectar	Valores acumulados			
				Pocillos Infectados	Pocillos sin infectar	Infección	
						Proporción	%
10 <sup>-1</sup>	6/6	6	0	47	0	47/47	100
10 <sup>-2</sup>	6/6	6	0	41	0	41/41	100
10 <sup>-3</sup>	6/6	6	0	35	0	35/35	100
10 <sup>-4</sup>	6/6	6	0	29	0	29/29	100
10 <sup>-5</sup>	6/6	6	0	23	0	23/23	100
10 <sup>-6</sup>	6/6	6	0	17	0	17/17	100
10 <sup>-7</sup>	4/6	6	2	11	0	11/11	100
10 <sup>-8</sup>	1/6	4	5	5	2	5/7	71.4
10 <sup>-9</sup>	0/6	1	6	1	7	1/8	12.5
10 <sup>-10</sup>	0/6	0	6	0	13	0/13	0
10 <sup>-11</sup>	0/6	0	6	0	19	0/19	0
10 <sup>-12</sup>	0/6	0	6	0	25	0/25	0

La dilución capaz de infectar el 50% de los pocillos, para este caso se encuentra entre las diluciones 10<sup>-8</sup> y 10<sup>-9</sup>.

Factor proporcional de distancia (PDF):

$$(A) - (50\%) / (A) - (B)$$

A: % de pocillos infectados en la dilución próxima  $\geq 50\%$

B: % de pocillos infectados en la dilución próxima  $\leq 50\%$

Para el ejemplo:  $(71 - 50) / (71 - 13) = 21 / 58 = 0.36 (0.4)$

Como el valor del logaritmo es negativo, el resultado se expresa así: La suma del logaritmo negativo de la dilución más próxima por encima del 50% de mortalidad más el PDF corregido si fuera el caso.

$(-8.0) + (-0.4) (\log 10) = -8.4$ , es decir la dilución adecuada para encontrar un 50% de infección sería:  $10^{-8.4}$ , pero para las pruebas de neutralización se utiliza el valor de 100 TCID<sub>50</sub>

$$\text{Título Log TICD}_{50} + 2 = \text{Log dilución del virus conteniendo } 100 \text{ TICD}_{50}$$

$(-8.4) + (2) = -6.4$ , es decir la dilución que contiene 100 TICD<sub>50</sub> =  $10^{-6.4}$

## **IX RESULTADOS**

## **Producción de stock de semilla viral**

1. La semilla del virus **Rocío** fue cosechada por primera vez al 7mo día, teniendo en cuenta que presentó poco efecto citopático (50% de efecto citopático del total de la monocapa), se reinoculó el pasaje cosechado con la finalidad de incrementar el título viral, el segundo pasaje se cosechó al 6to día con un efecto citopático del 75% del total de la monocapa.

2. La semilla del virus **Ilheus** fue cosechada al cuarto día presentado un efecto citopático del 75% del total de la monocapa.

3. La semilla del virus del **Oeste del Nilo** al igual que la semilla del virus Ilheus, fue cosechada al tercer día de inoculada, presentando un efecto citopático del 75% del total de la monocapa.

## **Demostración de la pureza de las semillas virales**

4. Las tres semillas virales (Rocío, Ilheus y Oeste del Nilo) dieron curvas de disociación independientes (Figura 1). Los valores de Ct fueron: 12.58, 8.73 y 8.56 y los valores de Tm de 80.7, 81.1 y 83.0 respectivamente.

## **Estandarización del plaqueo y titulación de las semillas virales**

5. Para el virus **Rocío**, la línea celular óptima es Vero-76 y el tiempo de coloración de las placas fue al 6to día, el virus **Ilheus** también se observa mejor en la línea celular Vero-76 pero el día de coloración óptimo es el 3er día, en tanto que para el virus **Oeste del Nilo**, la mejor línea celular ensayada fue LLMCK<sub>2</sub> y el tiempo de coloración óptimo el 4to día (Tabla 1 y Figuras 2 al 10)

### **Inactivación de antígeno**

6. La inactivación con BEI 3mM a 4 °C, dieron los siguientes valores expresados en el número total de horas para su completa inactivación y su respectiva tasa de inactivación: Para los  $1.06 \times 10^5$  UFP/ml, el virus **Rocío** necesitó 157.5 horas, con una tasa de inactivación de  $0.032 \text{ Log}_{10}\text{UFP/ml.H}^{-1}$  (Tabla 2). Para los  $4.5 \times 10^6$  UFP/ml, el virus **Ilheus** necesitó 167.3 horas, con una tasa de inactivación de  $0.034 \text{ Log}_{10}\text{UFP/ml.H}^{-1}$  (Tabla 3). Y para los  $1.1 \times 10^7$  UFP/ml, el virus **Oeste del Nilo** necesitó 191.2 horas, y su tasa de inactivación de  $0.036 \text{ Log}_{10}\text{UFP/ml.H}^{-1}$  (Tabla 4).

### **Preparación del antígeno**

7. La dilución de trabajo para la prueba de ELISA IgG, para los antígenos de los virus **Rocío** e **Ilheus** inactivados con BEI 3mM y tratados

con polietilenglicol, fue de 1/50 y para el antígeno del Virus **Oeste del Nilo** fue de 1/500 (Figuras 11 al 13).

### **Prueba de ELISA IgG indirecta**

9. Se procesaron un total de 400 sueros en fase convaleciente para ELISA IgG, 248 sueros dieron una lectura positiva al menos para uno de los tres flavivirus evaluados y 152 sueros fueron negativos (Figura 14). 153 sueros dieron reacción positiva para tres flavivirus a la vez, 71 sueros dieron reacción positiva para dos flavivirus a la vez y 24 sueros dieron reacción positiva para un solo flavivirus (Figura 15). El valor de reacción cruzada que presentó la prueba de ELISA IgG fue de un 87%.

### **Microneutralización**

10. Se determinaron los valores de las diluciones de trabajo; para el virus **Rocío**:  $10^{-3.17}$  (al 7mo día de cultivo en Vero 76), para el virus **Ilheus**:  $10^{-4.36}$  (al 4to día de cultivo en Vero 76). Y para el virus del **Oeste del Nilo**:  $10^{-4.22}$  (al 5to día de cultivo en LLMCK<sub>2</sub>). (Tablas 6 al 8).

11. La prueba confirmatoria por microneutralización realizada a los 248 sueros positivos permitió determinar que 23 de ellos eran positivos para el virus **Ilheus**; 27% (seis sueros) con anticuerpos neutralizantes

hasta la dilución 1/160 y 73% (diecisiete sueros) con anticuerpos neutralizantes hasta la dilución 1/320. Además se encontró 7 sueros positivos para el virus **Rocío**, 29% (dos sueros) con anticuerpos neutralizantes hasta la dilución 1/160 y 71% (cinco sueros) con anticuerpos neutralizantes hasta la dilución 1/320 (Figuras 16 al 18).

## X DISCUSIÓN



En el presente trabajo se estudiaron los flavivirus Rocío, Ilheus y Oeste del Nilo, todos con características muy similares tanto en estructura de los viriones, particularidades en su replicación como en su infección y sintomatología que se presentan cuando accidentalmente infectan a humanos, pese a ello se encontró que presentan algunas diferencias en cuanto a su cultivo mostrando selectividad por una línea celular, en las cuales son capaces de producir un efecto citopático definido y cuantificable, adaptándose así al plaqueo utilizando la técnica semi-líquida (Morens *et al.*, 1985) que resulta ser más rápida, sencilla y evita el uso de una doble capa de agarosa y coloración con rojo neutro (Earley *et al.*, 1967) . Entre las líneas celulares más utilizadas para los estudios en virología se encuentran aquellas que derivan de riñón de mono adulto verde africano (LLCMK2, Vero 76 y BS-C-1), y las derivadas del riñón de hámster bebe (BHK-21); las cuales muestran

diferente grado de susceptibilidad frente a los diferentes virus (Schmidt y Emmons, 1989).

Los resultados aquí obtenidos para el virus **Rocío** coinciden con Mitchell, quien utilizó la línea celular Vero en sus estudios con el virus Rocío y sus vectores (Mitchell *et al.*, 1986). Esta línea celular permite visualizar y cuantificar las placas producidas por el virus Rocío gracias a su tamaño (1mm de diámetro) y definición, lo que no sucedió con las en la línea LLCMK<sub>2</sub>, donde las placas producidas son más pequeñas (0.5mm de diámetro) y no muy definidas; o en BHK-21 donde se aprecia que las placas a pocos días de cultivo (3 días) ya presentan placas grandes de 2mm de diámetro haciendo que se fusionen y por lo tanto dificultando su cuantificación.

Para el virus **Ilheus**, la línea celular Vero 76 también resultó ser la más adecuada, de esta manera se coincide con Rojas quien en el 2001 utilizó la misma línea al estandarizar el mismo procedimiento con el virus Ilheus, con la diferencia que para optimizar aún más este método se logró adaptar el plaqueo al sistema semi-líquido. La eficiencia del cultivo sobre LLCMK<sub>2</sub>, fueron similares a las encontradas con el virus

Rocío, es decir un tamaño de placa y definición que dificultan la cuantificación.

El virus del **Oeste del Nilo** presentó un efecto citopático muy agresivo sobre la línea celular Vero-76, por lo que no es la adecuada para este virus. La línea celular LLMCK<sub>2</sub> reunió las características de tamaño y definición para realizar el plaqueo de este virus.

Los resultados obtenidos sobre la línea **BHK-21** fueron similares para los tres virus, sugiriendo que esta línea es muy permisible para su desarrollo, lo que se evidencia en la formación de placas de gran tamaño ( $\geq 2\text{mm}$  de diámetro) en pocos días de cultivo (3 días). La línea celular **VERO 76** puede ser considerada lo suficientemente permisible para lograr las lecturas adecuadas en los virus Rocío e Ilheus con placas de tamaño promedio de 1mm de diámetro. Finalmente la línea celular **LLMCK<sub>2</sub>** resultó ser la menos permisible para Rocío e Ilheus, pero de útil ayuda para casos como el del virus Oeste del Nilo, que presentó un comportamiento más agresivo, y que se adecuó perfectamente en esta línea.

En general los tiempos de coloración para los tres virus analizados estuvo dentro del rango recomendable (3 a 7 días), seis días para Rocío, tres días para Ilheus, y cuatro días para el virus Oeste del Nilo; ya que menos en menos de tres días aún no se ha formado una monocapa completa y por encima de siete días, las células envejecen, se desprenden y mueren por los mismos productos tóxicos liberados al medio.

Otro punto importante al estudiar los virus en general, y que se analizó en el presente trabajo, fue la inactivación de los virus no solamente para prevenir la contaminación de las muestras, sino para eliminar la exposición del personal al riesgo biológico. El CDC considera al virus Ilheus como un agente infeccioso para trabajar con un nivel de bioseguridad 2, mientras que para Rocío y Oeste del Nilo en nivel de bioseguridad 3. Previo a realizar la prueba del ELISA, era necesario contar con un antígeno inactivado que mantuviera sus propiedades inmunogénicas de la envoltura viral, esto se logró empleando la etilamina binaria, un miembro del grupo de las aziridinas que actúa a nivel del ácido nucleico y resulta ser menos tóxica y efectiva que ha sido ampliamente usada en la inactivación de virus para la producción

de vacunas (Bahnemann, 1975), dejando de lado otros químicos utilizados como la betapropiolactona.

El tiempo promedio de inactivación para los 3 flavivirus fue de 170 horas (7 días aprox.) a 4 °C y la tasa de inactivación fue similar entre ellos variando sólo en el orden de las centésimas, esto se explica en la gran similaridad que presentan los flavivirus respecto a su estructura, diferenciándose mas bien el tiempo de inactivación por la cantidad de virus presente en la suspensión viral. Ej.: virus del Oeste del Nilo, que obtuvo el valor más alto 0.0036 Log<sub>10</sub> UFP/ml.h<sup>-1</sup>, ya que era el virus con mayor título; en comparación con en el virus Rocío, que tenía el título más bajo.

De las 400 muestras procesadas, 248 dieron reacción positiva para al menos uno de los virus analizados, y de ellas sólo 30 fueron confirmadas por microneutralización, como era de esperarse la prueba de ELISA IgG pierde especificidad, al dar falsos positivos, debido a la alta reacción cruzada que hay entre los flavivirus (Calisher *et al*, 1989), además las IgG virus-específicas constituyen solo una pequeña proporción del total de las IgG presentes en el suero (Schmidt, 1989). Además, coincidiendo con Mattar, quien en el 2005 realizó un estudio

en Colombia (zona endémica para más de un flavivirus), evaluando la presencia de anticuerpos IgG en la población contra el flavivirus Oeste del Nilo. Esta prueba sólo puede utilizarse como un tamizaje para las muestras provenientes de zonas endémicas ya que los valores de reacción cruzada llegan fácilmente de un 62% a un 84% en las ELISAS IgG (Koraka *et al.*, 2002). Para este estudio se obtuvo un valor de 87% de reacción cruzada para la prueba.

Los resultados encontrados por microneutralización, considerada como “*Gold Estándar*” a la prueba de neutralización, permitieron eliminar la reacción cruzada como lo reportó por Álvarez *et al.*, 1998; al lograr diferenciar una infección por dengue de una por fiebre amarilla gracias a las pruebas de neutralización en placa.

La prueba de neutralización en placa más común, es la denominada PRNT, que utiliza placas de cultivo de 6, 12 o 24 pozos y por lo tanto solo se pueden analizar pocas muestras por placa; Timonei *et al.*, 1984 usando el virus Louping evaluó el mismo principio de esta prueba en placas de 96 pozos, en lo que denominó prueba de microneutralización en placa, que a diferencia del PRNT puede procesar un mayor número de muestras, en casos en los que se hace

necesaria la confirmación de numerosas muestras, como sucedió con las muestras analizadas en este estudio. Otra diferencia en este tipo de prueba es que sólo es cualitativa, más no cuantitativa como la prueba de PRNT, justamente porque el tamaño de pozo tan pequeño impide cuantificar el número de placas formadas por acción del virus, y más bien el criterio utilizado para determinar la presencia y/o ausencia de anticuerpos que neutralizan al 100TCID<sub>50</sub> del virus, es la infección y/o no infección del pocillo que se ve reflejada en la calidad de la monocapa formada.

Un total de 23 muestras dieron reacción positiva para el virus **Ilheus** con presencia de anticuerpos neutralizantes hasta las diluciones 1:160 y 1:320. En muestras obtenidas durante los años 1994-1998; Rojas, 2001 reportó por primera vez la presencia de anticuerpos neutralizantes para este virus en Iquitos. Por otro lado, 7 muestras dieron reacción positiva para el virus **Rocío** con anticuerpos neutralizantes hasta las diluciones 1:160 y 1:320, para este virus no se tenía reportes previos de presencia de anticuerpos neutralizantes en poblaciones humanas en nuestra selva. La presencia de estos anticuerpos no es significativa (1.75% para el virus Rocío y 5.75% para el virus Ilheus) comparada con la

encontrada para el virus dengue, 34.7% o el virus de la fiebre amarilla, 42% (INS, 2005).

De ambos casos, se deduce la presencia de estos virus en nuestra Amazonía, sin embargo a pesar que estos sueros contengan una alta concentración de anticuerpos neutralizantes, no es posible determinar si la presencia de los mismos son resultado de la infección que produjo los síntomas que afectaron al paciente al momento de la toma de muestra (viremia), debido a la larga vida media de los anticuerpos IgG en suero; y más por tratarse de una zona endémica para dengue; sin embargo, su presencia indica que estos virus en algún momentos dejaron su ciclo netamente selvático e hicieron en contacto con la población lo que coincide con dos puntos, el primero según Turrel *et al.*, 2005 se han aislado a partir de mosquitos procedentes de la zona de Iquitos diferentes virus como Ilheus, San Luis, Caraparu. Itaquí, Murutucu, entre otros, y que segundo el hecho que en los últimos años en nuestro país se haya observado tanto una expansión de la población hacia las áreas antes no exploradas y/o vírgenes de la selva; así, como el incremento del número de pacientes febriles que acuden a los establecimientos de salud y cuya etiología de la fiebre se sigue ignorando por falta de información sobre otros tipos de virus que podrían ser los causantes y no



necesariamente el virus del dengue que es el más común. Poco a poco y gracias a los estudios seroepidemiológicos se han ido incorporando a las vigilancia activas el estudio de otros virus poco conocidos como Oropuche, Mayaro y EEV (Encefalitis Equina Venezolana) y de los cuales se ha encontrado que también son los causantes de un porcentaje de las infecciones reportadas (INS, 2005). Afortunadamente para otros virus de importancia médica en otros países del continente, como lo es el virus del Oeste del Nilo, aún no se tienen reportes de su posible presencia en el Perú y el presente trabajo lo confirma.

En cuanto al gran número de muestras que dieron falsos positivos por ELISA para el presente estudio, lo más probable es que se trate de personas que al encontrarse en una zona endémica para flavivirus como el Dengue, se hayan infectado al menos una vez por cualquiera de sus cuatros serotipos, y que los anticuerpos neutralizantes que desarrollaron, que permanecen en circulación por tiempos prolongados, se hayan incrementado con una infección secundaria o con el mismo virus Dengue o con otros flavivirus u arbovirus presente en la zona; así como lo refiere Komar en sus estudios con el virus del Oeste del Nilo y San Luis.



## XI CONCLUSIONES

1. Los virus Rocío e Ilheus produjeron efecto citopático cuantificable en Vero-76, en 6 y 3 días de cultivo respectivamente; y el virus Oeste del Nilo en LLMCK<sub>2</sub> en 5 días de cultivo.

2. Los flavivirus estudiados fueron inactivados con Bromoetilamina binaria con un valor promedio de inactivación de 170 horas y un radio de inactivación promedio de 0.034 Log<sub>10</sub> PFU/ml /H<sup>-1</sup>.

3. Mediante la prueba de ELISA se comprobó la existencia de un 87% de reacción cruzada entre flavivirus estudiados.

4. Para la prueba de microneutralización, las líneas celulares que deben emplearse son Vero 76 para Rocío e Ilheus y LLMCK<sub>2</sub> para Oeste del Nilo y los días de coloración 7, 4 y 5 respectivamente.

5. Se detectó la presencia de anticuerpos neutralizantes contra el virus Rocío en 7 muestras de suero (1.75%). 29% positivas hasta la dilución 1/160 y 71% positivas hasta la dilución 1/320.

6. Se detectó la presencia de anticuerpos neutralizantes contra el virus Ilheus en 23 muestras de suero (5.75%). 27% positivas hasta la dilución 1/160 y 73% positivas hasta la dilución 1/320.

## **XII RECOMENDACIONES**

1. Mejorar la especificidad de la prueba del ELISA IgG, mediante el uso de antígenos purificados o recombinantes modificando el tipo de ELISA para hacerlo más específico.

2. Realizar estudios de seroprevalencia en otras áreas y también en reservorios y vectores en la zona, para determinar la posible circulación silenciosa de los flavivirus en la zona.

3. Realizar estudios de seroprevalencia en otros lugares del país, para poder determinar el verdadero impacto que estos virus podrían causar en salud pública.

## **XIII TABLAS**

**TABLA 1 Estandarización del plaqueo de virus usando la técnica semilíquida**

	VERO-76				BHK-12				LLMK2			
	Día3	Día4	Día5	Día6	Día3	Día4	Día5	Día6	Día3	Día4	Día5	Día6
<b>ROCÍO</b>	φ= 0.3mm PND	φ= 0.3mm PND	φ= 0.5mm PD	φ= 1mm PD	φ= 2mm PG	φ= 2mm PG	φ= 2mm PG	φ= 2.5mm PG	PND	PND	PND	PND
<b>ILHEUS</b>	φ= 1mm PD	φ= 2mm PG	φ= 2.5mm PG	φ= 2.5mm PG	φ= 2mm PG	φ= 3mm PG	PG	PG	φ= 0.5mm PND	φ= 0.5mm PND	φ= 1mm PND	φ= 1mm PND
<b>OESTE DEL NILO</b>	PND	PND	PND	PND	φ= 2mm PG	φ= 3mm PG	PG	PG	φ= 0.8mm PND	φ= 1mm PD	φ= 2mm PD	φ= 2mm PD

Legenda:

PND: Placas no definidas

PD: Placas definidas

PG: Placas grandes

NP: No placas



VIRUS ROCÍO	Hora	Dilución	Promedio de placas	Título (UFP/ml)	Log <sub>10</sub> (UFP)
	0	1/640	8	1.06 x 10 <sup>5</sup>	5.03
	8	1/80	15.5	2.5 x 10 <sup>4</sup>	4.4
	24	1/80	9.5	1.5 x 10 <sup>4</sup>	4.18
	32	1/20	9	3.6 x 10 <sup>3</sup>	3.56
	48	1/20	4.5	1.8 x 10 <sup>3</sup>	3.26
	56	1/10	3.5	7.0 x 10 <sup>2</sup>	2.85
	72	1/10	1.5	3.0 x 10 <sup>2</sup>	2.48
	80	1/10	0.5	1.0 x 10 <sup>2</sup>	2.00
160	No diluido	0	0	0	

**Tabla 2 Inactivación del virus Rocío.** Se utilizó bromoetilamina binaria 3mM a 4 °C, se halló el título de cada alícuota a las 0, 8, 24, 32, 48, 56, 72, 80 y 160 horas, expresada en UFP/ml y Log<sub>10</sub> (UFP). A las 0 horas el stock viral contenía 1.06 x 10<sup>5</sup> UFP/ml, los cuales se inactivaron completamente en 157.5 horas.

Tasa de inactivación fue de 0.032 Log<sub>10</sub> PFU/ml /H<sup>-1</sup>.

VIRUS ILHEUS	Horas	Diluciones	Promedio de placas	Título (UFP/ml)	Log <sub>10</sub> (UFP/ml)
	0	1/ 32 000	7	4.5 x 10 <sup>6</sup>	6.65
	8	1/ 2 560	13	6.6 x 10 <sup>5</sup>	5.82
	24	1/ 320	11.5	7.3 x 10 <sup>5</sup>	4.86
	32	1/160	15.5	4.9 x 10 <sup>4</sup>	4.69
	48	1/40	14	1.1 x 10 <sup>4</sup>	4.04
	56	1/40	12	9.6 x 10 <sup>3</sup>	3.98
	72	1/10	7.5	1.5 x 10 <sup>3</sup>	3.18
	80	1/10	5	1.0 x 10 <sup>3</sup>	3.00
	160	No diluido	1.5	3.0 x 10 <sup>1</sup>	1.48

**Tabla 3 Inactivación del virus Ilheus.** Se utilizó Bromoetilamina binaria 3mM a 4°C, se calculó el título de cada alícuota a las 0, 8, 24, 32, 48, 56, 72, 80 y 160 horas, expresada en UFP/ml y Log<sub>10</sub> (UFP). A las 0 horas el stock viral contenía 4.5 x 10<sup>6</sup> UFP/ml, los cuales se inactivaron completamente en 194.4 horas. Tasa de inactivación fue de 0.034 Log<sub>10</sub> PFU/ml /H<sup>-1</sup>.

VIRUS OESTE DEL NILO	Hora	Dilución	Promedio de placas	Título (UFP/ml)	Log <sub>10</sub> (UFP/ml)
	0	1/32000	16	1.1 x 10 <sup>7</sup>	7.04
	8	1/16000	21	6.9 x 10 <sup>5</sup>	5.84
	24	1/320	20	1.3 x 10 <sup>5</sup>	5.11
	32	1/80	10.5	1.7 x 10 <sup>4</sup>	4.23
	48	1/80	7	1.1 x 10 <sup>4</sup>	4.04
	56	1/40	10	8.0 x 10 <sup>3</sup>	3.9
	72	1/40	4	3.2 x 10 <sup>3</sup>	3.51
	80	1/20	4.5	1.8 x 10 <sup>3</sup>	3.26
	160	No diluido	1.5	3.0 x 10 <sup>1</sup>	1.48

**Tabla 4 Inactivación del virus Oeste del Nilo.** Se utilizó Bromoetilamina binaria 3mM a 4°C, se calculó el título de cada alícuota a las 0, 8, 24, 32, 48, 56, 72, 80 y 160 horas, expresada en UFP/ml y Log<sub>10</sub> (UFP). A las 0 horas el stock viral contenía 1.1 x 10<sup>7</sup> UFP/ml, los cuales se inactivaron completamente en 191.2 horas.

Tasa de inactivación fue de 0.036 Log<sub>10</sub> PFU/ml /H<sup>-1</sup>.

Virus	Línea Celular	Día de coloración
Rocío	VERO-76	7
Ilheus	VERO-76	4
Oeste del Nilo	LLCMK2	5

**Tabla 5 Estandarización de la microneutralización** Resumen de los resultados obtenidos en la estandarización de la microneutralización para los virus Rocío, Ilheus y Oeste del Nilo, la tabla muestra la línea celular y el tiempo de coloración óptimos para cada virus.

Titulación del virus Rocío - Microneutralización				Valores acumulados			
Dilución del virus	Proporción	Pocillos infectados	Pocillos sin infectar	Pocillos infectados	Pocillos sin infectar	Mortalidad	
						Proporción	%
10 <sup>-1</sup>	6/6	6	0	28	0	28/28	100
10 <sup>-2</sup>	6/6	6	0	22	0	22/22	100
10 <sup>-3</sup>	6/6	6	0	16	0	16/16	100
10 <sup>-4</sup>	5/6	5	1	10	1	10/11	91
10 <sup>-5</sup>	3/6	3	3	5	4	5/9	56
10 <sup>-6</sup>	2/6	2	4	2	8	2/10	20
10 <sup>-7</sup>	0/6	0	6	0	14	0/14	0
10 <sup>-8</sup>	0/6	0	6	0	20	0/20	0
10 <sup>-9</sup>	0/6	0	6	0	26	0/26	0
10 <sup>-10</sup>	0/6	0	6	0	32	0/13	0
10 <sup>-11</sup>	0/6	0	6	0	38	0/19	0
10 <sup>-12</sup>	0/6	0	6	0	44	0/25	0

**Tabla 6 Titulación del virus Rocío – Microneutralización.** Valores obtenidos en la titulación del antígeno Rocío para la prueba de microneutralización al 7mo día de cultivo. Calculando el valor de la dilución de trabajo tenemos:

$$(56-50) / (56-20) = 0.17; \quad (-5) + (-0.17) = -5.17; \quad (-5.17) + (2) = -3.17.$$

El valor de 100TICD<sub>50</sub>, para el virus Rocío es de 10<sup>-3.17</sup>.

Titulación del virus Ilheus - Microneutralización				Valores acumulados			
Dilución del virus	Proporción	Pocillos infectados	Pocillos sin infectar			Mortalidad	
				Pocillos infectados	Pocillos sin infectar	Proporción	%
10 <sup>-1</sup>	6/6	6	0	35	0	35/35	100
10 <sup>-2</sup>	6/6	6	0	29	0	29/29	100
10 <sup>-3</sup>	6/6	6	0	23	0	23/23	100
10 <sup>-4</sup>	6/6	6	0	17	0	17/17	100
10 <sup>-5</sup>	6/6	6	0	5	0	5/5	100
10 <sup>-6</sup>	4/6	4	2	5	2	5/7	71
10 <sup>-7</sup>	1/6	1	5	1	7	1/8	13
10 <sup>-8</sup>	0/6	0	6	0	13	0/13	0
10 <sup>-9</sup>	0/6	0	6	0	19	0/13	0
10 <sup>-10</sup>	0/6	0	6	0	25	0/25	0
10 <sup>-11</sup>	0/6	0	6	0	31	0/31	0
10 <sup>-12</sup>	0/6	0	6	0	37	0/37	0

**Tabla 7 Titulación del virus Ilheus - Microneutralización** Valores obtenidos en la titulación del antígeno Ilheus para la prueba de microneutralización al 4to día de cultivo. Calculando el valor de la dilución de trabajo tenemos:

$$(71-50) / (71-13) = 0.36 \quad (-6) + (-0.36) = -6.36; \quad (-6.36) + (2) = -4.36.$$

El valor de 100TICD<sub>50</sub>, para el virus Ilheus es de 10<sup>-4.36</sup>.

Titulación del virus Oeste del Nilo - Microneutralización				Valores acumulados			
Dilución del virus	Proporción	Pocillos infectados	Pocillos sin infectar			Mortalidad	
				Pocillos infectados	Pocillos sin infectar	Proporción	%
10 <sup>-1</sup>	6/6	6	0	30	0	30/30	100
10 <sup>-2</sup>	6/6	6	0	24	0	24/24	100
10 <sup>-3</sup>	6/6	6	0	18	0	18/18	100
10 <sup>-4</sup>	5/6	5	1	12	0	12/12	100
10 <sup>-5</sup>	4/6	4	2	5	0	5/5	100
10 <sup>-6</sup>	2/6	2	4	3	4	3/7	43
10 <sup>-7</sup>	1/6	1	5	1	9	1/9	11
10 <sup>-8</sup>	0/6	0	6	0	15	0/15	0
10 <sup>-9</sup>	0/6	0	6	0	21	0/21	0
10 <sup>-10</sup>	0/6	0	6	0	27	0/27	0
10 <sup>-11</sup>	0/6	0	6	0	33	1/33	0
10 <sup>-12</sup>	0/6	0	6	0	39	0/39	0

**Tabla 8 Titulación del virus Oeste del Nilo -  
Microneutralización** Valores obtenidos en la titulación del  
antígeno Oeste del Nilo para la prueba de  
microneutralización al 4to día de cultivo. Calculando el  
valor de la dilución de trabajo tenemos:  
 $(43-50) / (43-11) = 0.22$ ;  $(-6) + (-0.22) = -6.22$ ;  $(-6.22) + (2) = -$   
 $4.22$ .

El valor de  $100TICD_{50}$ , para el virus Oeste del Nilo es de  $10^{-4.22}$ .

Muestras positivas por microneutralización para el virus Rocío				
Nº	Código	Dilución de anticuerpos neutralizantes	Sexo	Edad (años)
1	IQE 2787	1/320	F	64
2	IQE 3081	1/320	M	70
3	IQE 3508	1/320	M	60
4	IQE 3684	1/160	F	27
5	IQE 3736	1/320	F	43
6	IQE 3885	1/320	M	44
7	IQE 4622	1/160	F	36

**Tabla 9 Positivos por microneutralización para el virus Rocío.** La tabla muestra la dilución hasta la cual fueron positivos cada uno de los sueros y algunos datos de los pacientes como sexo y

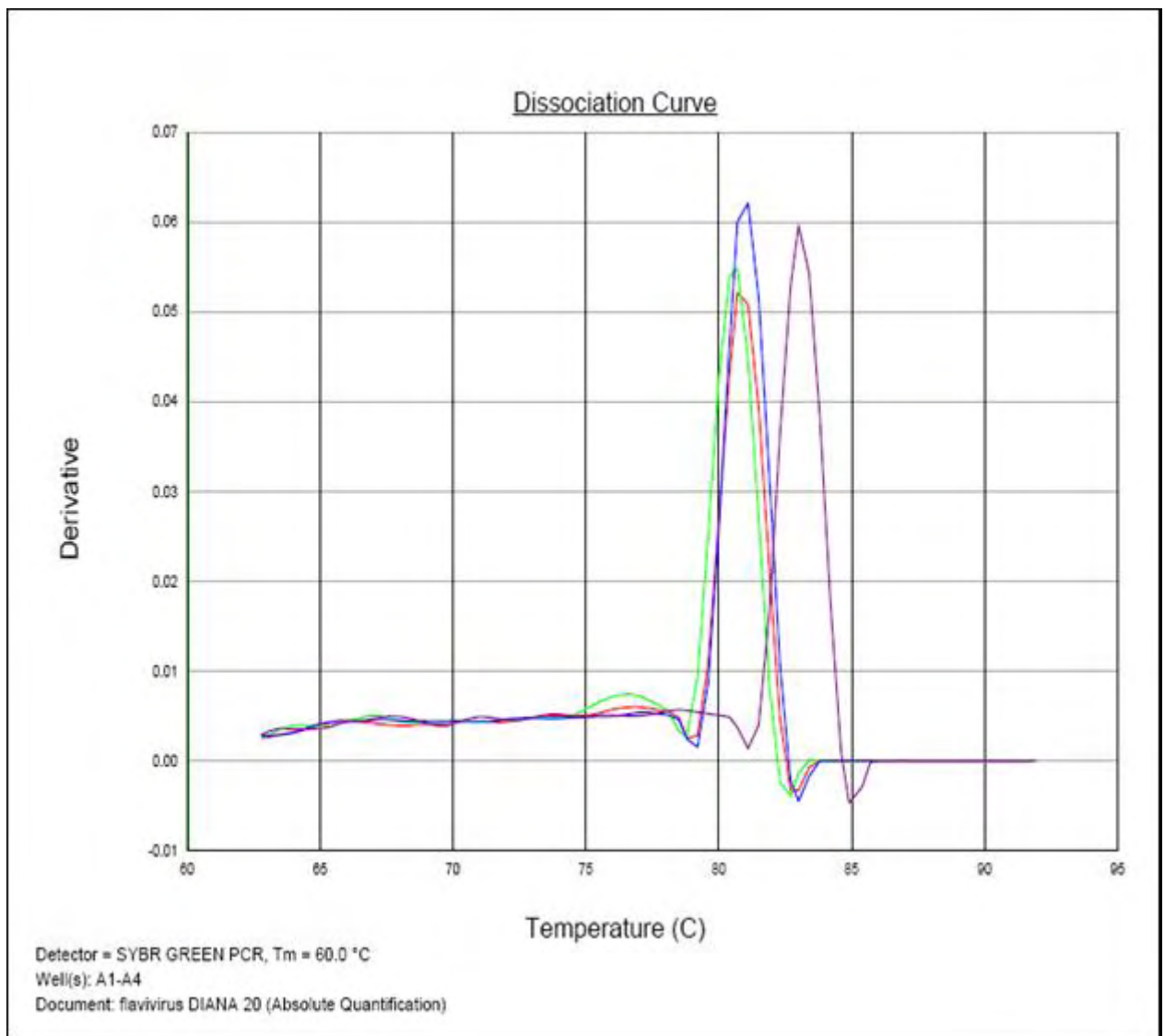


edad para cada una de las 7 muestras de suero  
positivas para el virus Rocío.

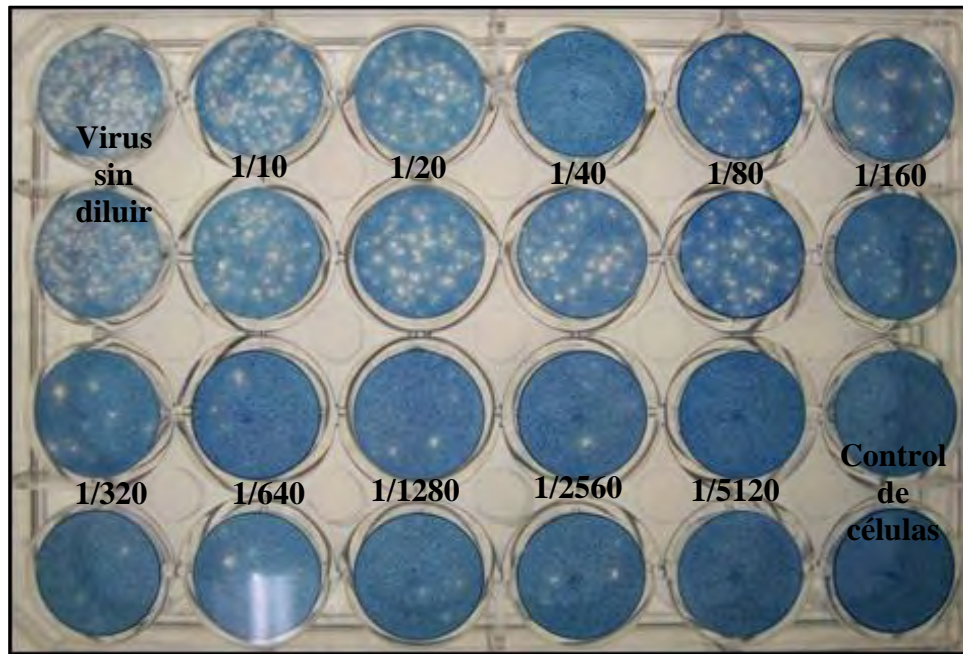
Muestras positivas por microneutralización para el virus Ilheus				
Nº	Código	Dilución de anticuerpos neutralizante	Sexo	Edad (años)
1	IQD 6593	1/320	M	23
2	IQD 6659	1/320	F	25
3	IQD 7047	1/160	F	17
4	IQD 7142	1/160	M	30
5	IQD 7234	1/320	M	21
6	IQD 7273	1/320	M	19
7	IQD 7384	1/320	F	20
8	IQD 7498	1/320	F	24
9	IQD 8077	1/320	M	21
10	IQD 8205	1/160	F	24
11	IQE 0804	1/320	F	52
12	IQE 1262	1/320	F	35
13	IQE 1475	1/320	F	14
14	IQE 1484	1/320	F	52
15	IQE 1604	1/160	F	53
16	IQE 1660	1/320	F	37
17	IQE 1837	1/320	F	40
18	IQE 1871	1/320	M	14
19	IQE 2079	1/320	M	30
20	IQE 2235	1/160	M	21
21	IQE 2492	1/320	F	14
22	IQE 3421	1/160	M	29
23	IQE 3733	1/320	M	19

**Tabla 10 Positivos por microneutralización para el virus Ilheus.** La tabla muestra la dilución hasta la cual fueron positivos cada uno de los sueros y algunos datos de los pacientes como sexo y edad para cada una de las 23 muestras de suero positivas para el virus Ilheus.

## **XIV FIGURAS**



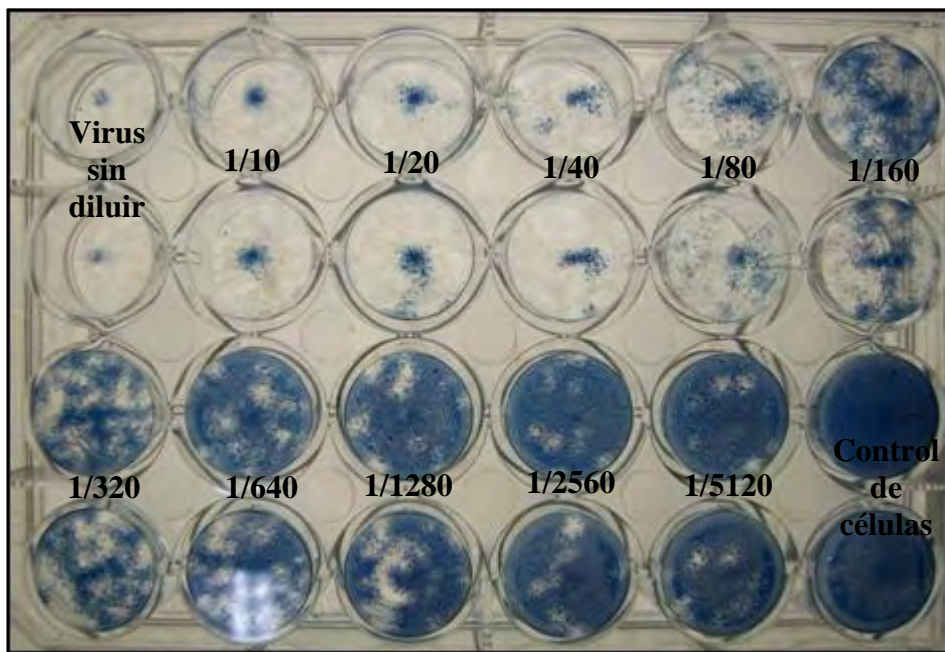
**Figura 1 Curva de disociación.** La prueba PCR en tiempo real usando el fluorocromo Sybr Green para los virus Rocío, Ilheus y Oeste del Nilo estudiados; adicionalmente para esta prueba se trabajó con un cuarto virus, San Luis. Cada línea de diferente color representa la curva de disociación para Rocío (rojo), Ilheus (azul), San Luis (verde) y Oeste del Nilo (morado).



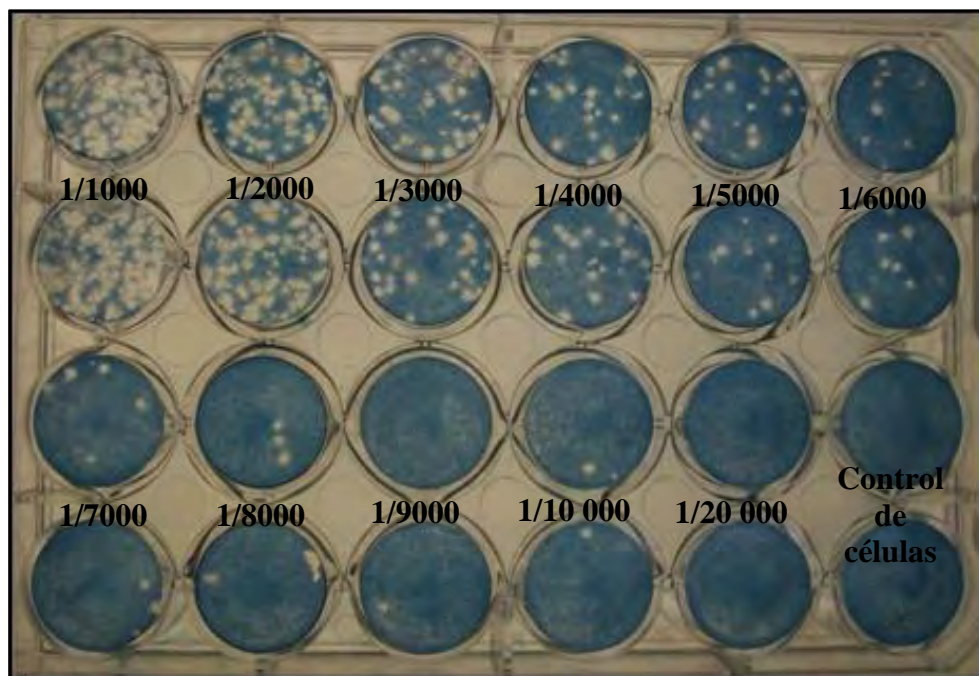
**Figura 2 Estandarización del plaqueo para el virus Rocío.**  
Línea celular: VERO 76. Día de coloración: 6to. Las diluciones fueron inoculadas por duplicado como se muestra en la figura. Las placas producidas por el virus Rocío en la línea celular VERO76, se observan y se pueden cuantificar claramente al 6to día de cultivo.



**Figura 3 Estandarización del plaqueo para el virus Rocío. Línea celular: LLMCK<sub>2</sub>. Día de coloración: 6to.** Las diluciones del virus fueron inoculadas por duplicado como se indica en la figura. Las placas producidas por el virus Rocío en la línea celular LLMCK2 no se logran distinguir bien aún en el 6to día de coloración, aparecen tenues y difíciles de cuantificar.



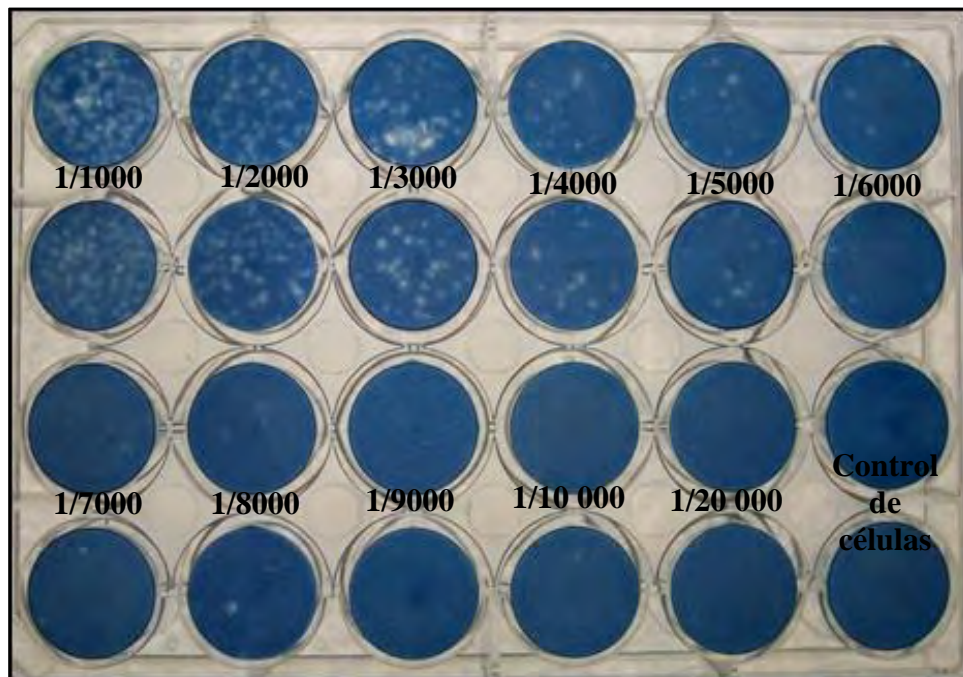
**Figura 4 Estandarización del plaqueo para el virus Rocío.**  
Línea celular: BHK-21 clon 15. Día de coloración: 4to. Se puede apreciar que las placas formadas por el virus Rocío en la línea celular BHK21 son de mayor tamaño con respecto a las formadas en las dos líneas celulares anteriores, se aprecia también los bordes irregulares y la pérdida de la monocapa en las primeras diluciones.



**Figura 5 Estandarización del plaqueo para el virus Ilheus.**  
Línea celular: VERO 76. Día de coloración: 3ero. Las diluciones del virus fueron inoculadas por duplicado como se indica en la figura, se inició en la dilución 1/1000 debido a que en menores diluciones del virus se contaban demasiadas

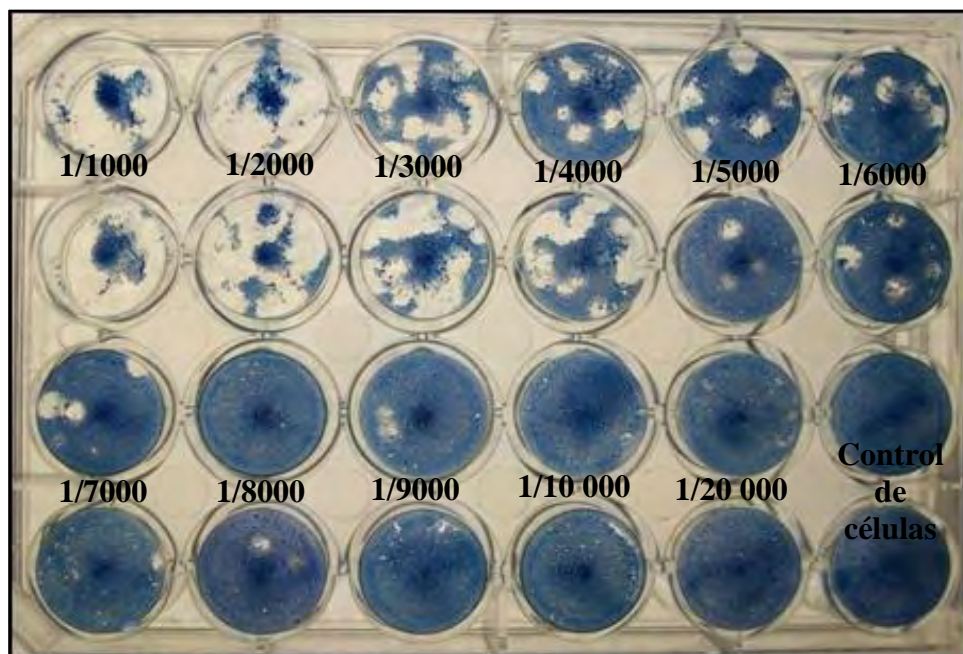


placas. Las placas formadas por el virus Ilheus, se notan claramente en la línea celular VERO76, al 3to día de cultivo.



**Figura 6** Estandarización del plaqueo para el virus Ilheus. Línea celular: LLMCK<sub>2</sub> Día de coloración: 3ero. Las diluciones del virus fueron inoculadas por duplicado como se indica en la figura, se inició en la dilución 1/1000 debido a que en

menores diluciones del virus se contaban demasiadas placas. Las placas formadas por el virus Ilheus al tercer día de cultivo en la línea celular LLMCK<sub>2</sub> pueden observarse menos nítidas que las formadas en la línea celular VERO 76 al mismo día de cultivo.



**Figura 7 Estandarización del plaqueo para el virus Ilheus.**  
Línea celular: BHK-21 clon 15. Día de coloración: 3ero. Las diluciones del virus fueron inoculadas por duplicado como se

indica en la figura, se inició en la dilución 1/1000 debido a que en menores diluciones del virus se contaban demasiadas placas. Las placas producidas por el virus Ilheus en la línea celular BHK 21 clon 15 son más grandes que las producidas en las anteriores líneas, haciendo que se sobrepongan y/o desprendan la monocapa en las primeras diluciones.

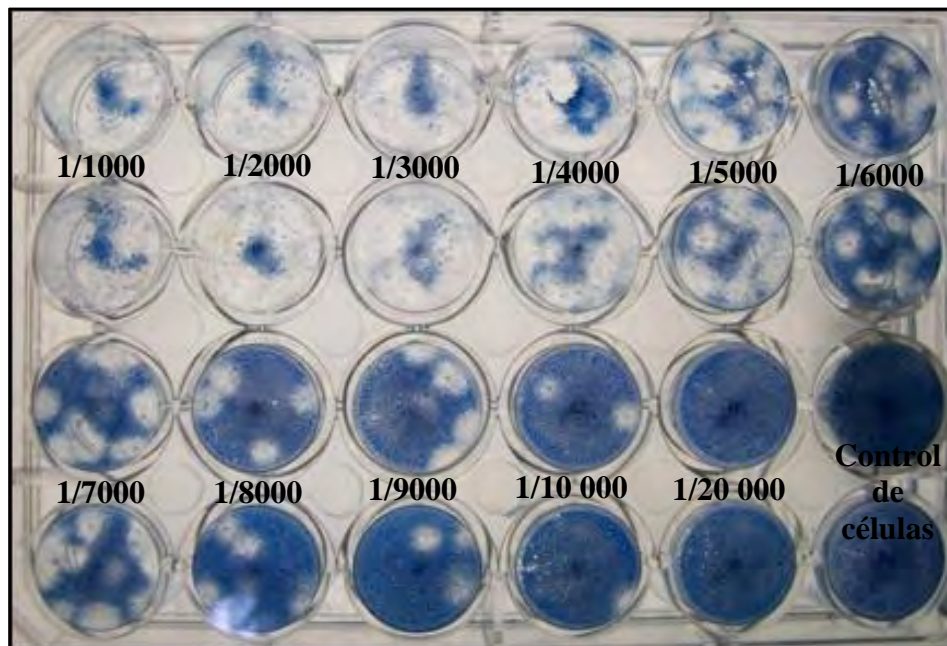
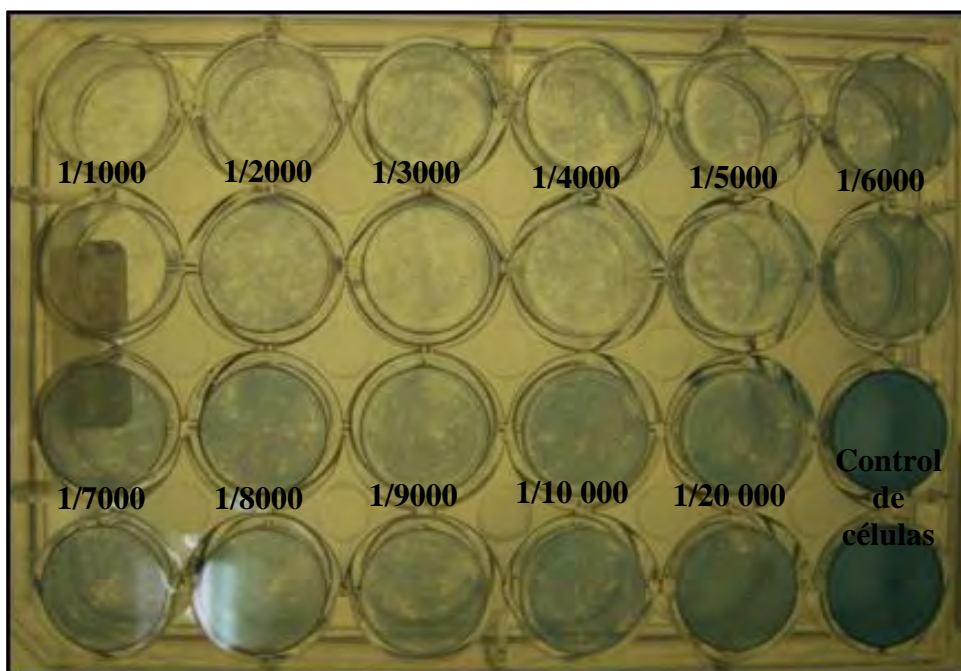
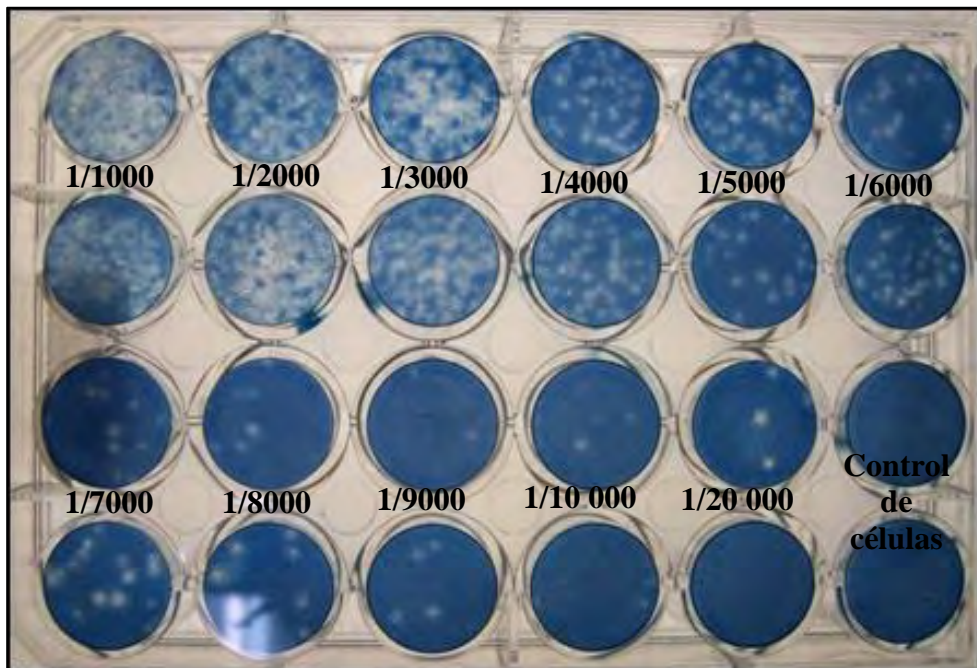


Figura 8 Estandarización del plaqueo para el virus Oeste del Nilo Línea celular: BHK-21 clon 15. Día de coloración: 4to. Las

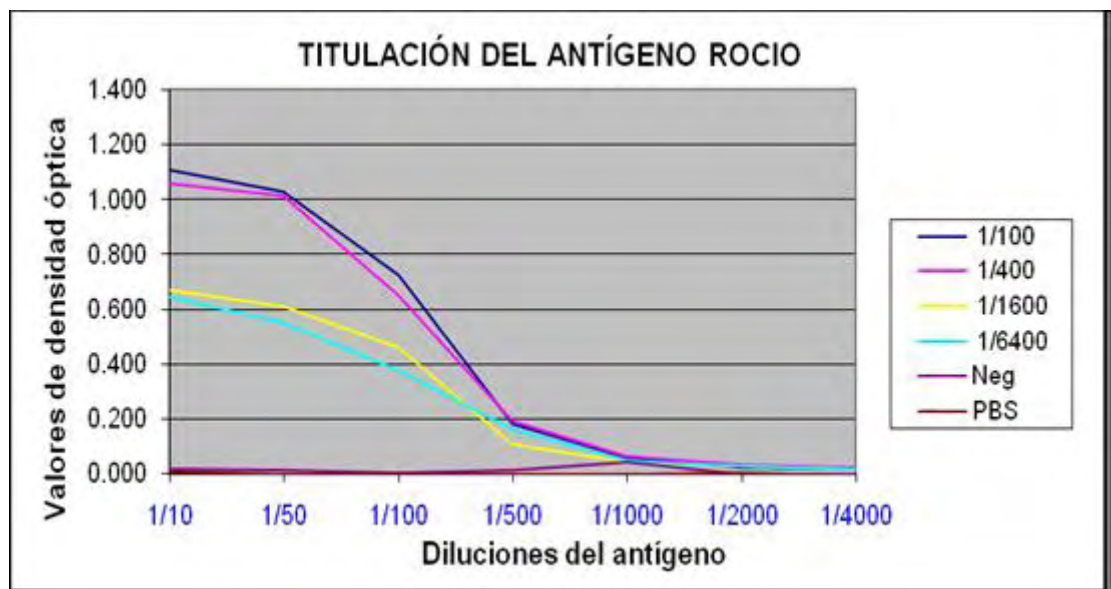
diluciones del virus fueron inoculadas por duplicado como se indica en la figura, se inició en la dilución 1/1000 debido a que en menores diluciones del virus se contaban demasiadas placas. Las placas formadas por el virus Oeste del Nilo en la línea celular BHK 21 clon 15, al igual que los virus Rocío e Ilheus, son de mayor tamaño con respecto a las producidas por los mismos virus en las líneas celulares VERO 76 y LLMCK<sub>2</sub>.



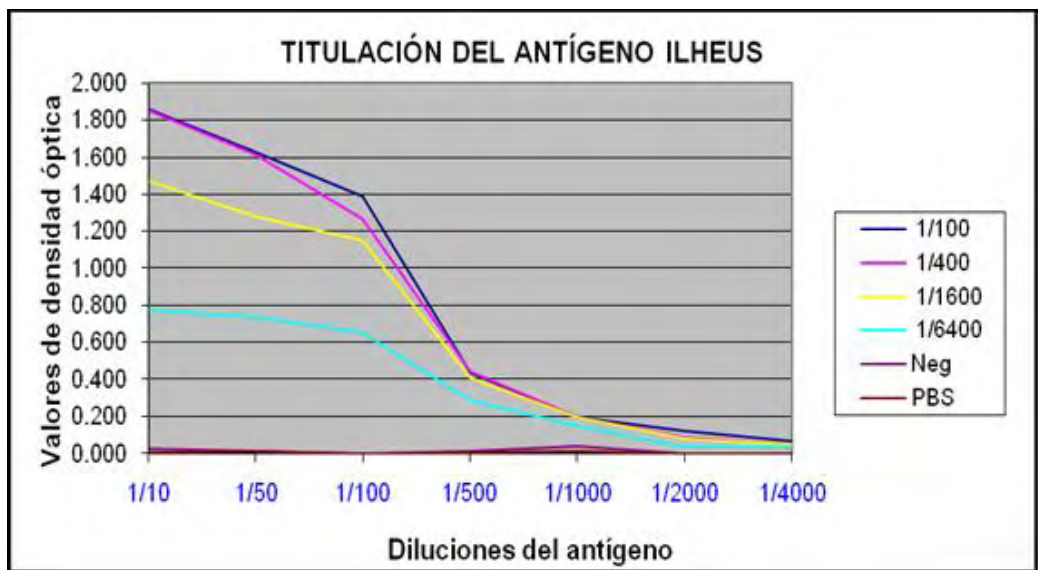
**Figura 9 Estandarización del plaqueo para el virus Oeste del Nilo** Línea celular: VERO 76 Día de coloración: 4to. Las diluciones del virus fueron inoculadas por duplicado como se indica en la figura, se inició en la dilución 1/1000 debido a que en menores diluciones del virus se contaban demasiadas placas. Las placas producidas por el virus Oeste del Nilo en la línea celular VERO 76 no pueden ser distinguidas claramente en la monocapa.



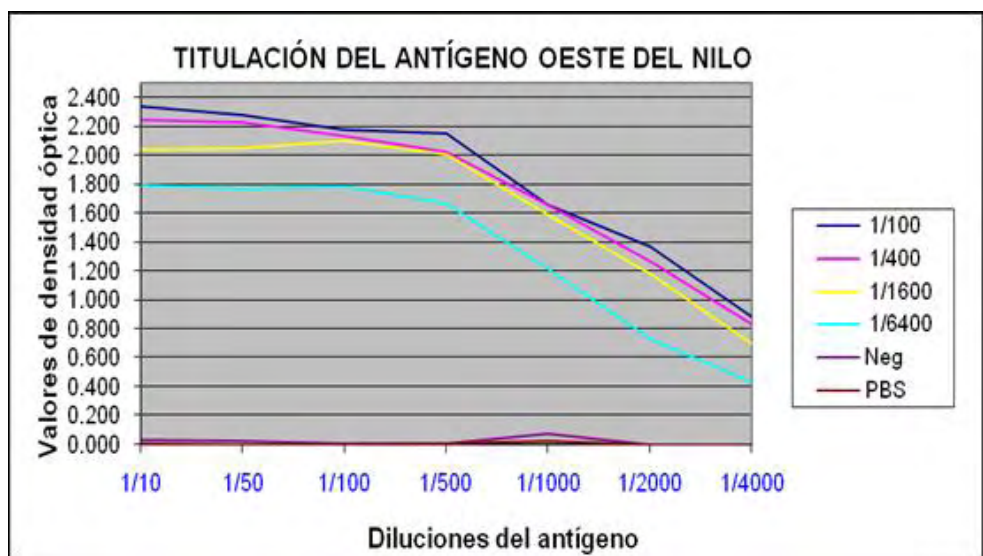
**Figura 10 Estandarización del plaqueo para el virus Oeste del Nilo. Línea celular: LLMCK<sub>2</sub> Día de coloración: 4to.** Las diluciones del virus fueron inoculadas por duplicado como se indica en la figura, se inició en la dilución 1/1000 debido a que en menores diluciones del virus se contaban demasiadas placas. Las placas producidas por el virus Oeste del Nilo en la línea celular LLMCK<sub>2</sub>, se pueden distinguir mejor a diferencia de las dos líneas celulares anteriores al cuarto día de cultivo.



**Figura 11 Titulación del antígeno Rocío para ELISA.** La dilución escogida para el antígeno de Rocío fue de 1/50, un valor promedio en el cual se puede distinguir una positiva de una negativa, incluso diluida 1/6400, por encima de una D.O. de 0.4



**Figura 12 Titulación del antígeno Ilheus para ELISA.** La dilución escogida para el antígeno de Ilheus fue de 1/50, un valor promedio en el cual se puede distinguir una positiva de una negativa, incluso diluida 1/6400, por encima de una D.O. de 0.7 en promedio





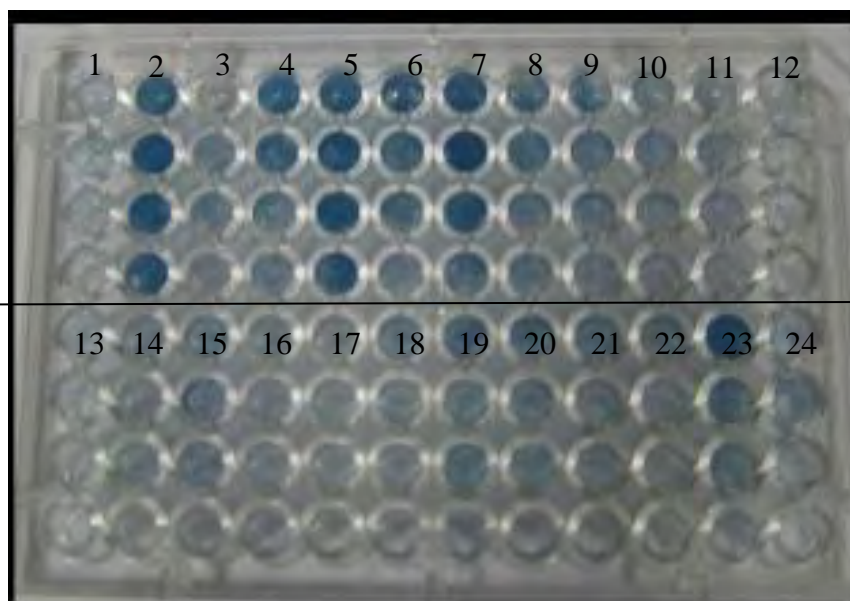
**Figura 13 Titulación del antígeno Oeste del Nilo para ELISA** La dilución escogida para el antígeno de Oeste del Nilo fue de 1/500, un valor promedio en el cual se puede distinguir una positiva de una negativa, incluso diluida 1/6400, por encima de una D.O. de 1.6.



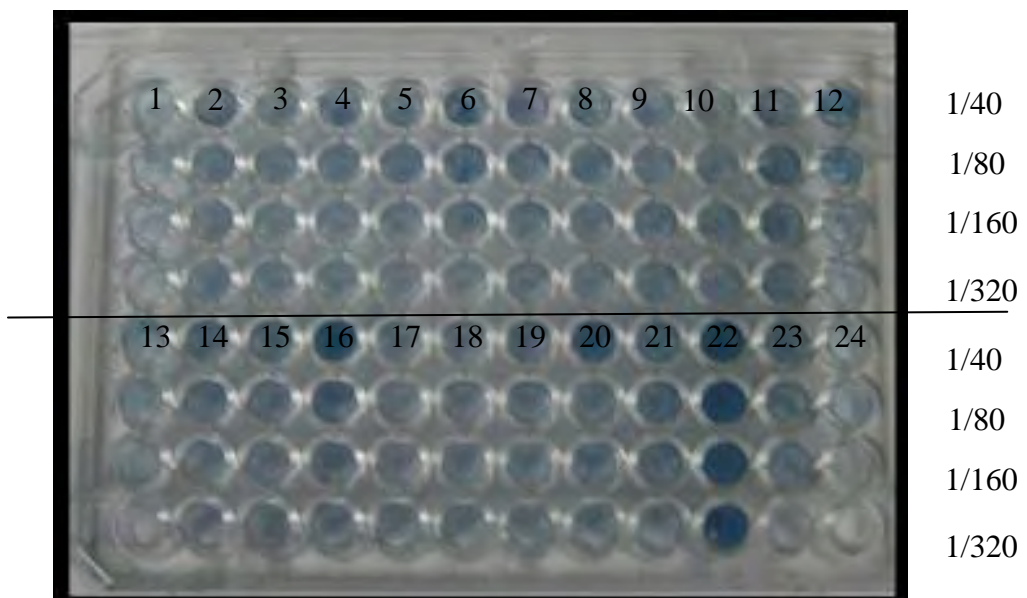
**Figura 14 Resultado de ELISA IgG.** El gráfico representa el número total de muestras positivas y el número de muestras negativas por ELISA IgG para los tres virus Rocío, Ilheus y Oeste del Nilo. Total de muestras analizadas  $n = 400$ .



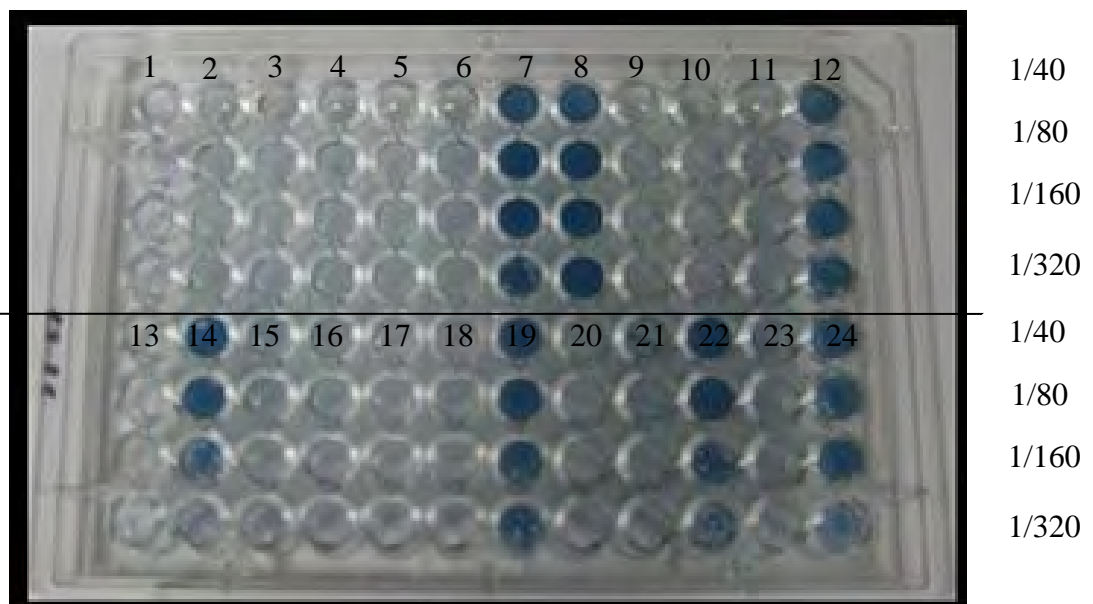
**Figura 15 Resultados de reacción cruzada en ELISA IgG.** De las 248 muestras positivas por ELISA IgG, 153 fueron positivas para los 3 flavivirus, 71 para dos flavivirus como mínimo y 24 muestras sólo para un flavivirus. De todas ellas solo 30 fueron confirmadas por neutralización dando un valor total de 87% de reacción cruzada para estos flavivirus.



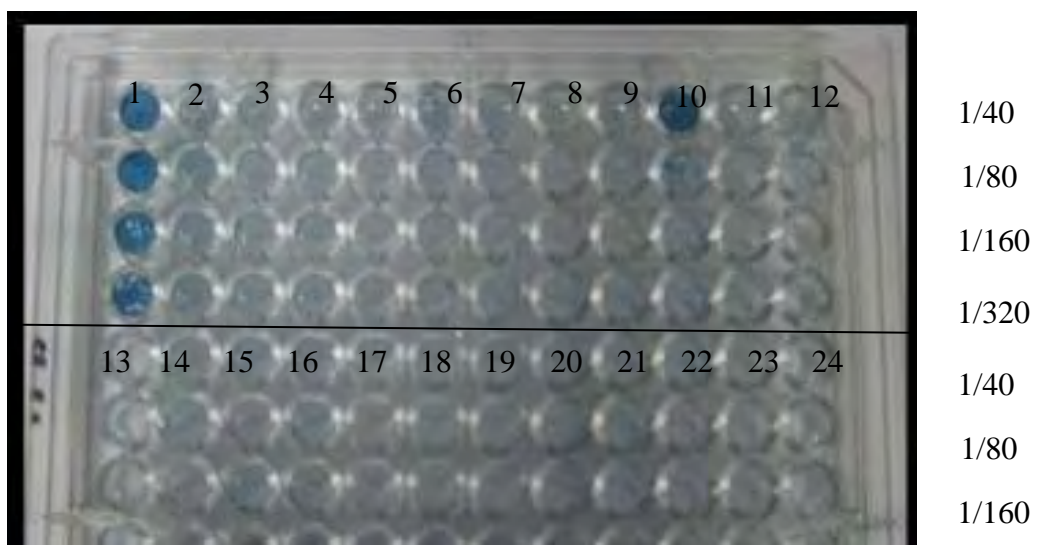
**Figura 16 (A-B) Muestras procesadas por microneutralización para el virus Rocío.** Un total de 24 muestras por placa, en las diluciones 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 y 1/320 se distribuyeron como se muestra en la figura. 2A y 5A muestras positivas hasta la cuarta dilución. 13B control negativo, 14B-17B controles positivos (virus Oeste del Nilo, virus Ilheus, virus Rocío y virus San Luís respectivamente).



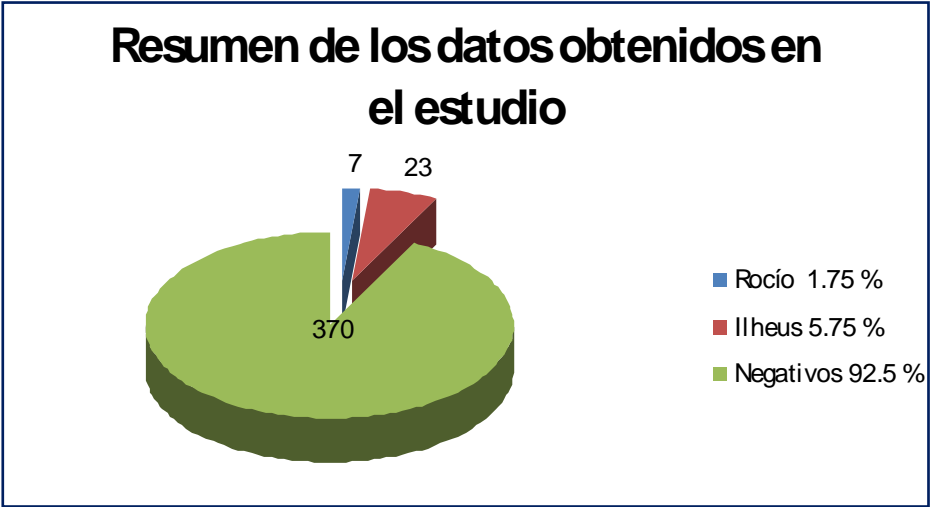
**Figura 16 (C-D) Muestras procesadas por microneutralización para el virus Roció.** Un total de 24 muestras por placa, en las diluciones 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 y 1/320 se distribuyeron como se muestra en la figura. La muestra 22C dio reacción positiva hasta la cuarta dilución, de las muestras 1-12C son ejemplos de muestras negativas. Para cada virus trabajado, se consideró una placa similar a la placa D, conteniendo la dilución de trabajo y un control de células.



**Figura 17 (A-B) Muestras procesadas por microneutralización para el virus Ilheus.** Un total de 24 muestras por placa, en las diluciones 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 y 1/320 se distribuyeron como se muestra en la figura. Las muestras 7A, 8A, 12A y 19A dieron reacción positiva hasta la cuarta dilución, las muestras 14A y 22A sólo hasta la segunda dilución. La muestra 24 A hasta la tercera dilución, en la placa B se observa otro grupo de muestras positivas a diferentes diluciones.



**Figura 17 (A-B) Muestras procesadas por microneutralización para el virus Ilheus.** Un total de 24 muestras por placa, en las diluciones 1/20, 1/40, 1/80, 1/160 y 1/320 se distribuyeron como se muestra en la figura. 13D Control negativo, 14-17D controles positivos (virus Oeste del Nilo, virus Ilheus, virus Rocío y virus San Luis respectivamente).



**Figura 18 Resumen de los resultados.** Positivos por microneutralización del total de las 400 muestras analizadas, 7 muestras positivas para Rocío y 23 muestras para Ilheus y 370 muestras negativas para los virus en estudio Rocío, Ilheus y Oeste del Nilo.



**XV REFERENCIAS**

**BIBLIOGRAFICAS**

1. Álvarez, M.; Palacios, D.; Vázquez, S.; Delgado, I.; García, S.; Morier, L.; Guzmán, M. 1998. Normalización de la técnica de reducción de placa para diferenciar una infección por dengue de una infección por fiebre amarilla. *Revista Cubana de Medicina Tropical* 50: 177-181.
2. Bahnemann, HG. 1975. Binary ethylenimine as an inactivant for footand- mouth disease virus and its application for vaccine production. *Archives of Virology*. 47: 47-56.
3. Cabezas, C. 2005. Dengue en el Perú: Aportes para su diagnóstico y control. *Revista peruana de medicina experimental salud publica* 22(3): 212-228.
4. Calisher, CH.; Karabatsos N.; Dalrymple JM.; Shope RE.; Porterfield JS.; Westaway EG. Brand, W. 1989. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *Journal of Genetic Virology*. 70: 37-43.
5. Campbell, G.; Marfin, A.; Lanciotti, R.; Gubler, D. 2002. West Nile Virus. *Lancet Infection disease* 2(5): 19-29.

6. Coimbra, T.; Raimundo, S.; Petrella, S.; Nagasse-Sugahara, T.; Castrignano S.; Santos, C. 2008. Molecular characterization of two rocio flavivirus strains isolated during the encephalitis epidemic in são paulo state, brazil and the development of a one-step rt-pcr assay for diagnosis. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo.* 50(2): 89-94.
7. Diamond, MS. 2003. Evasion of Innate and Adaptive Immunity by *Flavivirus*. *Immunology Cell Biology.* 81(3): 196-206.
8. Earley, E.; Peralta, P. and Johnson, K. 1967. A plaque neutralization method for Arbovirus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 125 (3): 741-747.
9. Fields, B.; Knipe, M. 1990. *Virology*. Vol. 1 Segunda edición, páginas: 705-707.
10. Figueiredo, L.; Rosa, A.; Fiorillo, AM. 1986. Níveis de anticorpos para arbovírus em indivíduos da Região de Ribeirão Preto, SP (Brasil). *Revista de Saúde Pública* 20: 204-211.

11. Figueredo, L.; Tadeu M. 2007. Emergent arboviruses in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 40 (2): 224-229.
12. INS. 2005. Perfil etiológico del síndrome febril en áreas de alto riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas de Impacto en salud pública en el Perú 2000-2001. *Revista peruana de medicina experimental salud publica* 22(3): 132-137.
13. Iversson, L. 2005. Encefalite por arbovirus Rocio. In: FOCACCIA, R., ed. Veronesi: tratado de infectología. 3. ed. São Paulo, Atheneu. v. 1, p. 373-379.
14. Jaramillo, A. Infecciones por arbovirus. 2000. *MVZ-CORDOBA.* 5(1): 51-56.
15. Johnson, B.; Cruz, C.; Felices, V.; Espinoza, W.; Manock, S.; Guevara, C.; et al. . 2007. Ilheus virus isolate from a human, Ecuador. *Emerging Infection Disease.* 13(6):956-958.
16. Komar, N.; Clark, GG. 2006. West Nile Virus activity in Latin America and the Caribbean. *Revista Panamericana de Salud Pública.* 19(2): 112-117.

17. Koraka, P.; Zeller, H.; Niedrig, M.; Osterhaus, A.; Groen, J. 2002. Reactivity of serum samples from patients with a flavivirus infection measured by immunofluorescence assay and ELISA. *Microbes Infect.* 4(12):1209-1215.
18. Leelarasamee, A.; Chupaprawan, C.; Chechittikul, M.; Udompanthurat, S. 2004. Etiologies of acute indifferntiated febrile illness in Thailand. *Journal of Medical Association of Thailandia.* 87(5): 464-472.
19. Libraty, DH.; Pichyangkul, S.; Ajariyakhajorn, C.; Endy, TP.; Ennis, FA. 2001. Human Dendritic Cells are Activated by Dengue Virus Infection: Enhancement by Gamma Interferon and Implication for Disease Pathogenesis. *Journal of Virology.* 75(8): 3501-3508.
20. Lopes, O.; Terezinha, L.; Coimbra, M.; Sacchetta, L.; Charles, H. 1978 Emergence of a new arbovirus disease in Brazil: I. Isolation and characterization of the etiologic agent, rocio virus *American Journal of Epidemiology.* 107: 444-449.

21. Mattar, S.; Edwards, E.; Laguado, J.; Gonzalez, M.; Alvarez, J.; Komar, N.; 2005. West Nile virus infection in Colombian horses. *Emerging Infections Disease*. 11(9): 1497-1498.
22. Mattar, S.; Parra, M.; Torres, J. 2005. Limitaciones en el serodiagnostico del VON en zonas endémicas del caribe colombiano. *Colombia médica*. 36: 254-262.
23. Mettler, NE.; Casals, J. 1982. Primer aislamiento de virus Ilheus en Argentina. *Rev AMA* 95: 142-145.
24. Mitchell, C.; Monath, T. and Cropp C. 1981. Experimental Transmission of Rocio Virus by Mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30(2): 465-472.
25. Modis, Y.; Ogata, S.; Clements, D.; Harrison, SC. 2004. Structure of the Dengue Virus Envelope Protein After Membrane Fusion. *Nature*. 427(6972): 313-319.
26. Morales, M. y Enria, D. 2005. Boletín Epidemiológico Periódico N° 19 Año 3 Marzo 2005.
27. Morales, M.; Barrandeguy, M.; Fabbri, C.; Garcia, J.; Vissani, A.; Trono, K.; Gutierrez, G.; Pigretti, S.;

- Menchaca, Taylor, N.; Fernandez, S.; Levis, S.; Enría, D. 2006. West Nile Virus Isolation from Equines in Argentina. *Emerging Infectious Diseases*. 12(10): 1559-1561.
28. Morens, D., Halstead, S.; Repik, P.; Putvatana, R.; Raybourne, N. 1985. Simplified plaque reduction neutralization assay for Dengue viruses by semimicro methods in BHK-21 cells: comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization. *J Clin Microbiol* 22(29):250-254.
29. Nonato, R. 1997 Doenças Infecciosas e Parasitárias-Enfoque Amazônico pp. 207-225.
30. Pereira, L.; Suzuki, A.; Coimbra, T.; De Souza, R.; Chamelet, T. 2001. Ilheus arbovirus in wild birds (*Sporohila caerulescens* and *Molothrus bonariensis*). *Revista de Salud pública* 35(2): 119-123.
31. Porterfield, J. 1960. A simple plaque-inhibition test for the study of arthropod-borne viruses. *Bull W.H.O.* 22:373
32. Pradaarismendy, J. y Castellanos, J. 2006. Susceptibility/Resistance Genes to Flavivirus,

Implications on Disease Severity. *Acta biológica Colombiana*. 11 (2): 21-30.

33. Prías-Landínez, E.; Bernal-Cubides, C.; Morales-Alarcón, A. 1968. Isolation of Ilhéus virus from man in Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 17(1): 112-114.

34. Price, W.; Thind, I.; 1971. Protection against West Nile virus induced by a previous injection with dengue virus. *Am J Epidemiol* 94:596-607.

35. Rice C. 1996. Flaviviridae: The viruses and their replication. In: Fields BN, Krieger DM; Howley PM. *Fields Virology*. New York: 3rd Raven Press.

36. Rojas, A.. 2001. Optimización de los métodos de ELISA y neutralización en placa para la identificación del virus Ilhéus en la Ciudad de Iquitos, Perú.

37. Schmidt, N.; Emmons, M. 1989. Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. (6. ed. Washington, American Public Health Association) p. 51-100.



38. Shu P.; Chang S.; Kuo Y.; Yueh Y.; Chien L. , *et al.* 2003.  
Development of Group and Serotype Specific One Step  
SYBR Green I-Based Real-Time Reverse Transcription PCR  
Assay for Dengue Virus. *Journal of Clinical Microbiology*  
41(6): 2408-2416.
39. Srihongse, S.; Johnson C. 1967. The Isolation of Illhéus  
Virus from Man in Panamá. *American Journal of  
Tropical Medicine Hygiene* 16(4): 516-518.
40. Straatmann, A.; Santos-Torres, S.; Vasconcelos, PF.;  
Rosa, APT.; Rodrigues, SG.; Tavares-Neto, J. 1997.  
Serological evidence of the circulation of the Rocio  
arbovirus (Flaviviridae) in Bahia. *Revista da Sociedade  
Brasileira de Medicina Tropical* 30: 511-515.
41. Timoney, P.; Gerghy, V.; Harrington, A.; Dillon, P. 1984.  
Microneutralization Test in PK(15) Cells for Assay of  
Antibodies to Louping Ill Virus. *American Society for  
Microbiology*. 20(1): 128-130.

42. Tsai, TF., Chandler, LJ. 2003. Arbovirus. Manual of Clinical Microbiology, pp 1553-1569. 8th ed. Washington: American Society for Microbiology.
43. Turell, M.; O'guinn, M.; Jones, J.; Sardelis, B.; Dohm, C.; Watts, D.; Fernandez, E.; Travassos da Rosa, D.; Guzman, E.; Tesh, M., Rossi, E.; Ludwig, F.; Mangiafico, F.; Kondig, M., Wasieloski, F.; Pecor J.; Zyzak, D., Schoeler, H.; Mores, D.; Calampa, J.; Lee, K.; Klein, M. 2005. Isolation of Viruses from Mosquitoes (Diptera: Culicidae) Collected in the Amazon Basin Region of Peru. *Journal of Medical Entomology*. 42 (5): 891-898.
44. Whitley, R. 2003. West nile virus clinical overview and prospects for development of therapeutics and a human vaccine. *Programs and abstracts of the 43<sup>rd</sup> Annual ICAAC*. Abstract 1769.

## **XVI ANEXOS**

**SOLUCIONES PREPARADAS EN EL LABORATORIO PARA LA  
PRUEBA DE PLAQUEO**

**1. CARBOXIMETIL CELULOSA AL 3% (CMC)**

CMC ..... 3 g  
Agua destilada estéril c.s.p. .... 100 ml

Mezclar en un frasco estéril con ayuda de un magneto, autoclavar por 30 minutos y conservar a temperatura ambiente.

**2. MEDIO MÍNIMO ESENCIAL (MEM) 10X**

MEM..... 10 g  
Agua destilada estéril c.s.p. .... 100 ml  
Mezclar en un frasco estéril y filtrar, conservar a 4° C.

**3. LIQUID OVERLAYER MEDIUM.**

CMC 3% ..... 150 ml  
MEM (10X) ..... 50 ml  
SBF (suero fetal bovino) ..... 100 ml  
Antibiótico ..... 5 ml  
NHCO<sub>3</sub> al 7.5%..... 5 ml  
Agua destilada estéril c.s.p. .... 500 ml

Mezclar todos los componentes y conservar a 4° C hasta su uso.

**4. COLORANTE**

Azul naftol ..... 1 g  
Acetato de sodio ..... 13.6 g  
Agua destilada ..... 940 ml  
Mezclar por 10 minutos  
Ácido acético glacial ..... 60 ml

Mezclar por 30 minutos y mantener a temperatura ambiente.

### SOLUCIONES PREPARADAS EN EL LABORATORIO PARA LA INACTIVACIÓN DE LOS VIRUS

#### 1. ETILAMINA BINARIA (0.1M)

NaOH .....	0.8 g
H <sub>2</sub> O c.s.p. ....	100 ml
Se mezcla para obtener NaOH 0.2 N.	
2-bromoetilamina hidrobromide .....	2.05 g
NaOH 0.2 N c.s.p. ....	100 ml

Se mezclan a 37° C por una hora y se conserva a temperatura ambiente.

#### 2. TIOSULFATO DE SODIO

Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	15.811 g
H <sub>2</sub> O c.s.p. ....	100 ml
Se mezcla y se mantiene a 4° C.	

### SOLUCIONES PREPARADAS EN EL LABORATORIO PARA EL ENSAYO DE ELISA

#### 1. SOLUCION SALINA (0.85%)

NaCl .....	8.5 g
H <sub>2</sub> O bidestilada c.s.p. ....	1 000 ml

#### 2. BÓRAX SALINO 0.2 M

Bórax .....	76.3 g
Solución salina (0.85%) c.s.p. ....	1000 ml

#### 3. ÁCIDO BÓRICO SALINO 0.2 M

Ácido bórico .....	12.4 g
--------------------	--------

Solución salina (0.85%) c.s.p. .... 1000 ml

**4. BORATO SALINO pH 9**

Bórax salino 0.2M ..... 295 ml

Ácido bórico salino 0.2M ..... 250 ml

Solución salina (0.85%) ..... 400 ml

Se mezcla y ajusta el pH a 9 con borato salino o con ácido bórico salino, completar con solución salina a 1000 ml.

**5. BUFFER FOSFATO SALINO (PBS 10X)**

NaCl ..... 80 g

KCl ..... 2g

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> ..... 1.4 g

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> ..... 9.1 g

H<sub>2</sub>O c.s.p. .... 1 000 ml

**6. BUFER DE DILUCIÓN**

PBS (10X) ..... 100 ml

Leche descremada deshidratada ..... 50 g

Tween 20 ..... 1 ml

Agua destilada c.s.p. .... 1000 ml

**7. BUFER DE LAVADO**

PBS (10X) ..... 100 ml

Tween 20 ..... 1 ml

Agua destil..... 1000 ml



**Cuadro que muestra los valores de densidad óptica (D.O.)  
obtenidos por ELISA IgG para cada una de las 400 muestras**

	ILHEUS	ROCIO	OESTE DEL NILO		ILHEUS	ROCIO	OESTE DEL NILO
1	-0.20	-0.029	0.298	48	0.23	0.399	0.886
2	0.033	0.034	0.178	49	0.573	1.462	1.456
3	0.506	0.584	1.55	50	-0.001	0.059	0.112
4	0.197	0.674	1.443	51	0.475	1.295	1.498
5	-0.017	0.45	0.99	52	0.036	0.002	0.015
6	0.472	1.016	1.178	53	0.673	1.079	1.58
7	0.424	0.658	1.273	54	-0.069	-0.074	0.032
8	0.22	0.445	0.838	55	-0.024	-0.035	0.018
9	0.335	0.082	0.045	56	0.512	0.837	1.612
10	0.118	0.329	0.681	57	0.56	1.266	1.42
11	0.233	0.932	1.699	58	0.368	1.53	1.503
12	1.024	0.057	-0.024	59	0.753	1.566	1.501
13	1.12	0.084	0.004	60	-0.047	0.055	0.051
14	0.61	1.111	1.447	61	0.362	1.278	1.089
15	0.489	0.724	1.485	62	0.089	1.172	1.111
16	0.188	0.167	0.669	63	0.456	0.556	1.169
17	-0.006	-0.014	0.046	64	0.635	1.465	1.4
18	0.408	0.551	0.863	65	0.664	1.288	1.466
19	0.451	0.605	1.482	66	0.004	0.052	0.019
20	0.376	0.455	1.296	67	0.706	1.175	1.429
21	0.217	0.25	1.063	68	-0.003	0.075	0.106
22	-0.047	-0.059	0.018	69	0.585	1.531	1.343
23	0.542	0.652	1.464	70	0.004	-0.001	0
24	0.023	0.023	0.138	71	0.332	0.808	0.561
25	0.451	1.062	1.098	72	0.064	0.064	0.042
26	0.023	0.044	0.135	73	0.722	1.617	1.53
27	0.171	0.061	0.017	74	0.079	0.177	0.075
28	0.362	0.479	1.141	75	0.389	1.212	1.191
29	0.474	0.693	1.486	76	-0.001	0.02	0.038
30	0.544	0.966	1.458	77	0.234	0.632	0.601
31	0.54	0.725	1.591	78	0.58	1.587	1.34
32	-0.016	0.075	0.22	79	0.366	0.648	1.173
33	0.372	0.371	0.361	80	0.454	1.166	1.462
34	0.137	0.074	0.052	81	0.192	0.135	0.056
35	0.726	1.297	1.631	82	0.091	0.136	0.41
36	0.327	0.898	1.366	83	0.342	0.434	1.065
37	0.377	0.347	0.357	84	0.073	0.095	0.151
38	0.012	0.022	0.064	85	0.105	0.133	0.561
39	0.031	1.096	1.146	86	0.493	0.883	1.338
40	0.098	0.113	1.3	87	0.442	0.972	1.049
41	-0.006	-0.035	-0.01	88	0.03	0.092	0.0.22
42	0.017	1.217	1.315	89	1.138	0.802	1.027
43	0.187	0.027	0.01	90	0.673	0.358	0.177
44	0.451	1.146	1.174	91	0.047	0.124	0.066
45	0.047	0.599	0.885	92	0.027	0.009	0.047
46	0.735	1.511	1.674	93	0.826	0.861	0.159
47	0.176	0.527	0.137	94	0.907	1.253	0.696



	ILHEUS	ROCIO	OESTE DEL NILO		ILHEUS	ROCIO	OESTE DEL NILO
95	0.35	0.599	0.327	141	0.078	0.008	0.094
96	0.242	0.274	0.147	142	0.695	1.2	0.21
97	0.062	0.028	0.073	143	0.996	1.137	0.631
98	0.132	0.100	0.174	144	0.068	-0.204	0.043
99	0.98	1.151	0.131	145	0.029	0.053	0.068
100	1.052	1.295	0.831	146	0.614	0.61	0.492
101	0.067	-0.013	0.017	147	0.072	-0.005	0.027
102	-0.141	0.064	0.103	148	0.289	0.163	0.106
103	-0.052	0.124	-0.022	149	0.653	1.154	0.48
104	0.047	0.19	0.038	150	0.719	0.707	0.528
105	0.941	0.555	0.787	151	-0.048	0.001	0.007
106	0.094	0.107	0.042	152	0.004	0.029	0.013
107	0.413	0.297	0.488	153	0.458	1.292	0.222
108	0.03	0.044	0.051	154	0.031	0.037	0.063
109	0.005	0.016	0.023	155	0.452	0.892	0.367
110	0.091	0.157	0.031	156	0.517	0.817	0.371
111	0.01	0.022	0.017	157	0.718	0.184	0.452
112	-0.022	-0.021	0.009	158	0.91	1.152	0.466
113	0.046	0.016	0.129	159	0.15	0.096	0.067
114	-0.002	-0.03	-0.013	160	1.042	1.211	0.716
115	1.069	1.191	0.89	161	0.044	0.13	0.059
116	0.074	0.002	0.069	162	0.956	1.098	0.619
117	0.046	0.048	0.066	163	0.282	0.392	0.283
118	0.15	0.06	0.072	164	0.865	1.334	0.371
119	0.854	0.514	0.504	165	0.595	0.306	0.41
120	0.387	0.168	0.388	166	0.024	0.127	0.167
121	0.011	0.021	0.77	167	-0.003	0.002	-0.007
122	0.829	1.059	0.016	168	0.024	0.059	0.027
123	0.973	0.759	0.739	169	0.098	0.031	0.065
124	0.056	0.091	0.041	170	0.889	0.618	0.633
125	0.578	0.808	0.54	171	0.53	0.307	0.133
126	0.071	0.084	-0.014	172	0.014	0.058	-0.004
127	0.422	0.31	0.129	173	1.176	1.187	0.79
128	0.303	0.37	0.554	174	0.797	1.092	0.392
129	0.897	1.048	0.448	175	0.9	0.88	0.435
130	0.055	0.002	0.026	176	-0.002	0.012	0.044
131	0.4	0.343	0.277	177	0.072	0.079	0.087
132	0.051	0.056	0.049	178	0.043	-0.01	0.088
133	0.055	0.042	0.03	179	0.134	1.138	0.425
134	0.79	0.699	0.569	180	0.684	0.826	0.279
135	1.215	1.352	0.542	181	0.784	0.792	0.367
136	1.239	1.484	0.643	182	0.002	-0.006	-0.021
137	1.001	1.433	0.555	183	0.019	0.025	0.014
138	0.82	0.992	0.515	184	1.073	1.182	0.407
139	0.943	1.202	0.535	185	0.549	0.771	0.191
140	0.427	0.109	0.114	186	0.547	0.757	0.311

	ILHEUS	ROCIO	OESTE DEL NILO		ILHEUS	ROCIO	OESTE DEL NILO
187	0.902	0.998	0.327	233	0.065	0.708	0.523
188	0.032	0.096	0.17	234	0.597	0.661	0.419
189	0.105	0.086	-0.077	235	0.039	0.027	0.042
190	0.953	1.243	0.021	236	1.07	0.096	0.595
191	0.396	0.429	0.092	237	0.488	0.57	0.201
192	0.878	0.896	0.203	238	0.015	0.009	0.019
193	0.039	0.042	0.029	239	0.449	0.552	0.413
194	0.17	0.062	0.142	240	0.939	0.957	0.663
195	0.87	0.836	0.272	241	0.994	0.996	0.405
196	0.349	0.281	0.04	242	0.103	0.175	0.768
197	0.071	0.018	0.093	243	-0.079	-0.052	-0.142
198	0.09	0.064	0.033	244	1.294	1.048	0.795
199	1.058	1.192	0.115	245	0.22	0.1	0.172
200	0.894	0.917	0.329	246	0.023	0.013	0.071
201	0.654	0.958	0.227	247	0.201	0.262	0.206
202	0.196	0.023	0.095	248	0.111	0.926	0.579
203	1.182	1.272	0.496	249	0.02	-0.062	-0.112
204	0.104	0.322	0.044	250	1.002	0.025	0.575
205	1.24	1.163	0.612	251	0.924	1.167	0.501
206	0.032	0.011	0.177	252	-0.008	0	-0.012
207	1.219	1.359	0.12	253	0.176	0.138	0
208	0.119	0.04	0.029	254	1.028	1.108	0.647
209	0.383	0.469	0.209	255	1.105	0.223	0.352
210	-0.025	0.128	0.006	256	0.789	0.451	0.364
211	0.889	1.029	0.196	257	1.015	0.704	0.596
212	0.052	-0.005	-0.004	258	0.601	0.585	0.519
213	0.091	0.113	0.072	259	0.011	0.032	0.043
214	0.998	1.035	0.453	260	1.255	1.283	0.157
215	0.12	0.096	0.195	261	0.032	0.151	0.106
216	0.844	0.928	0.08	262	1.19	0.652	0.664
217	0.525	0.61	0.16	263	0.497	0.234	0.38
218	0.158	0.189	0.128	264	1.07	0.866	0.73
219	0.124	0.124	0.053	265	1.444	1.221	0.718
220	0.542	0.48	0.137	266	0.914	0.68	0.516
221	0.019	0.03	0.037	267	1.047	0.031	0.199
222	-0.167	0.082	-0.077	268	1.011	0.473	0.264
223	0.822	0.975	0.252	269	-0.01	0.02	-0.047
224	0.909	0.615	0.172	270	0	-0.007	0.004
225	0.006	-0.018	0.042	271	0.179	0.357	0.139
226	0.038	-0.005	0.001	272	0.527	0.176	0.189
227	0.03	0.01	-0.01	273	0.147	-0.1	-0.013
228	1.011	0.879	0.189	274	1.046	0.705	0.188
229	1.345	0.997	0.147	275	0.855	0.615	0.416
230	0.057	0.032	0.005	276	0.146	0.052	0.123
231	0.75	0.221	0.319	277	0.101	-0.035	-0.057
232	1.389	1.15	0.576	278	0.96	0.16	0.082

	ILHEUS	ROCIO	OESTE DEL NILO		ILHEUS	ROCIO	OESTE DEL NILO
279	0.146	0.024	-0.089	325	0.062	1.115	1.151
280	0.809	1.178	0.39	326	0.768	0.174	0.906
281	0.892	1.3	0.766	327	0.771	0.976	0.772
282	0.083	0.045	-0.021	328	0.685	0.439	0.863
283	0.082	0.01	0.028	329	-0.003	0.03	-0.007
284	0.339	0.457	0.101	330	1.25	1.334	1.113
285	0.959	0.587	0.354	331	1.032	1.134	0.662
286	0.079	0.029	-0.032	332	0.491	0.809	0.768
287	0.102	0.109	0.015	333	0.883	-0.058	0.307
288	0.17	0.098	0.11	334	0.183	1.303	1.053
289	0.47	0.309	0.392	335	0.084	0.059	0.031
290	0.896	0.752	0.362	336	0.096	0.047	-0.014
291	1.145	0.66	0.748	337	0.351	1.406	0.083
292	0.695	0.421	0.182	338	-0.005	0.06	0.103
293	-0.002	-0.03	-0.013	339	0.84	1.312	1.117
294	0.039	0.029	0.022	340	0.717	1.495	1.146
295	-0.021	-0.013	-0.037	341	0.177	0.425	0.055
296	0.122	0.183	0.234	342	0.335	0.261	0.082
297	0.006	0.015	0.016	343	0.024	-0.062	0.051
298	0.196	0.101	0.059	344	0.022	0.029	0.01
299	1.093	0.882	0.665	345	0.188	0.993	0.783
300	1.077	1.036	0.752	346	0.613	0.798	0.621
301	0.496	0.193	0.172	347	0.517	0.753	0.674
302	0.782	0.463	0.474	348	1.054	0.545	1.088
303	0.342	0.214	0.085	349	0.026	0.019	0.004
304	-0.012	0.014	0.026	350	0.69	1.158	0.811
305	0.112	0.275	0.22	351	0.343	0.438	0.347
306	0.03	0.044	0.051	352	0.958	1.12	0.733
307	0.005	0.016	0.023	353	0.086	-0.015	0.016
308	0.3	0.175	0.281	354	1.008	1.14	0.821
309	0.162	0.079	-0.067	355	0.095	0.048	0.018
310	0.999	0.553	0.193	356	0.62	0.887	0.659
311	0.049	0.05	-0.037	357	0.683	0.143	0.594
312	0.967	0.76	0.691	358	0.065	0.001	0.081
313	1.458	1.279	0.79	359	0.395	0.026	0.296
314	1.044	1.018	0.8	360	0.781	1.276	0.905
315	0.069	0.013	0.003	361	0.026	0.242	0.223
316	0.162	0.973	0.503	362	0.422	0.75	0.167
317	0.079	0.049	0.022	363	0.77	1.274	0.981
318	1.021	0.986	0.791	364	0.726	1.532	1.125
319	0.712	0.685	0.585	365	0.2	0.488	0.47
320	1.018	1.075	0.791	366	0.01	0.013	-0.002
321	0.726	0.734	0.846	367	0.121	0.144	0.118
322	0.906	1.443	1.238	368	0.448	0.645	0.424
323	-0.125	0.019	-0.018	369	1	1.025	0.956
324	0.055	0.097	0.164	370	0.152	0.301	-0.152

	ILHEUS	ROCIO	OESTE DEL NILO
371	0.102	0.607	0.828
372	0.832	1.018	0.886
373	1.064	1.03	0.025
374	0.03	0.054	0.025
375	0.014	0.985	0.703
376	0.657	0.722	0.655
377	1.3	1.307	1.03
378	0.872	0.62	0.508
379	0.228	1.193	0.268
380	1.04	1.002	0.018
381	1.12	1.317	1.014
382	0.382	0.582	0.387
383	0.586	0.593	0.577
384	0.096	-0.003	0.004
385	0.587	0.197	0.998
386	0.077	-0.03	-0.027
387	0.958	1.154	0.906
388	0.547	1.099	0.897
389	0.113	0.335	0.002
390	0.094	0.073	0.113
391	0.037	0.087	0.129
392	0.096	0.13	0.125
393	0.068	0.067	0.05
394	0.147	0.153	0.181
395	0.142	0.048	0.087
396	0.181	0.438	0.416
397	0.343	1.108	0.866
399	0.06	0.023	-0.038
400	0.055	0.092	0.063