

ARTÍCULOS ORIGINALES

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Normalización de la técnica de reducción de placas para diferenciar una infección por dengue de una infección por fiebre amarilla

Lic. Mayling Álvarez Vera,¹ Téc. Danay Valdés Palacios,² Lic. Susana Vázquez Ramudo,³ Lic. Iselys Delgado Hernández,⁴ Téc. Serafina García Infante,⁵ Lic. Luis Morier Díaz⁶ y Dra. María Guadalupe Guzmán Tirado⁷

RESUMEN

Se normalizó la técnica de neutralización por reducción de placas para diferenciar una infección por dengue de una infección por fiebre amarilla. Para ello se utilizaron muestras de suero de donantes cubanos en los que el antecedente previo de vacunación o no con fiebre amarilla era conocido y de pacientes costarricenses con un cuadro clínico de dengue sin antecedentes de vacunación con fiebre amarilla. El día óptimo de coloración de las placas fue el 5 y la menor dilución de suero capaz de diferenciar entre una infección por dengue de una por fiebre amarilla fue de 1/5. Dada la elevada especificidad de la técnica normalizada, se podrán realizar estudios de factores de riesgo de dengue hemorrágico en individuos vacunados por fiebre amarilla, tema de gran actualidad e importancia.

Descriptores DeCS: TESTS DE NEUTRALIZACIÓN/normas; DENGUE/diagnóstico; FIEBRE AMARILLA/diagnóstico.

La fiebre amarilla (FA) se ha mantenido como un problema importante de salud en las áreas selváticas y rurales de las Américas y en África. Las epidemias han involucrado a cientos de miles de casos en las últimas décadas a pesar de existir una campaña masiva de inmunización en la que se emplea la vacuna de virus vivo-atenuado de la cepa 17D.^{1,2}

Se conocen 2 formas epidemiológicas principales, la FA urbana que se transmite de persona a persona a través de la picadura del mosquito *Aedes aegypti*, y la FA selvática que se encuentra generalmente en los monos y

se transmite de mono a mono a través de la picadura de mosquitos del género *Haemagogus* en América y de la especie *Aedes africanus* en África.

El diagnóstico específico de esta entidad depende de estudios histopatológicos, del aislamiento del virus, de la demostración del antígeno viral y de la respuesta específica de anticuerpos.

No se conoce si la vacunación por fiebre amarilla (FA) sería capaz de proteger frente a una infección por dengue o de lo contrario actuar sensibilizando frente a una infección por este agente. Además, existen pocos

¹ Master en Virología. Licenciada en Microbiología. Aspirante a Investigadora.

² Técnica en Procesos Biológicos.

³ Doctora en Ciencias Médicas. Licenciada en Bioquímica. Investigadora Auxiliar.

⁴ Licenciada en Microbiología.

⁵ Técnica en Microbiología.

⁶ Licenciado en Microbiología. Investigador Auxiliar.

⁷ Doctora en Ciencias Médicas. Especialista de II Grado en Microbiología. Profesora e Investigadora Titular.

estudios al respecto, principalmente porque las áreas endémicas de ambas enfermedades no coincidían. Con el aumento de los casos de dengue y de fiebre hemorrágica del dengue (FHD) en nuestra región esta situación ha cambiado y existen áreas endémicas de dengue donde la vacunación por FA es frecuente debido a la existencia de FA selvática.

Teniendo en cuenta lo anterior se hace necesario desarrollar estudios que permitan determinar las consecuencias positivas (protección) o negativas (inmunoamplificación) de la vacunación con FA en relación con el dengue.³⁻⁵ Para esto es indispensable contar con ensayos suficientemente específicos que permitan determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes al virus de la FA.

En este trabajo se presenta la normalización de la técnica de neutralización por reducción de placas para la FA y se determina, frente a un grupo de sueros humanos de reactividad diferente para dengue y FA, la menor dilución del suero capaz de diferenciar entre una infección por dengue y una infección por FA.

MÉTODOS

CULTIVOS CELULARES

Células de línea de riñón de mono verde africano, Vero, utilizadas para el crecimiento del virus. Las células Vero (ATCC) fueron crecidas en medio 199 con 10 % de suero fetal bovino inactivado (SFBI) a 56 °C durante 30 min a una razón de pase semanal de 1/8 e incubadas a 37 °C. El medio de mantenimiento de dichas células consistió en el medio de crecimiento pero suplementado con SFBI al 2 %.

Células de línea BHK-21 clono 15 (riñón de hámster) utilizadas en la titulación viral. Las células BHK-21 clono 15, gentilmente donadas por el profesor S.B. Halstead, de la Fundación Rockefeller, fueron mantenidas a 37 °C en frascos plásticos de 75 cm² con medio MEM con aminoácidos no esenciales y 10 % de SFBI a una razón de pase semanal de 1/8. El medio de mantenimiento de dichas células consistió en el medio de crecimiento pero suplementado con SFBI al 2 %.

VIRUS

La cepa vacunal 17D de FA, gentilmente donada por la doctora *Evelia Quiroz* del Centro Conmemorativo Gorgas de Panamá, y con 2 pases en células Vero fue pasada en el mismo sustrato celular. En células Vero crecidas en frascos plásticos de 25 cm² con monocapa

confluente fueron inoculados 500 µL del virus. Después de 1 h de incubación a 37 °C se añadió el medio de mantenimiento (199 con 2 % de SFBI) y se incubó durante 4 a 6 d a 37 °C. La cosecha viral se realizó cuando el efecto citopático (ECP) fue máximo. Una vez realizada la cosecha viral, el virus se alicuotó y conservó a -85 °C para su titulación posterior y utilización en las pruebas de neutralización por reducción de placas.

MUESTRAS DE SUERO

Se estudió un total de 20 sueros, 8 procedentes de donantes cubanos sanos, en los que el antecedente previo de vacunación o no con la vacuna 17D era conocido, y 12 procedentes de pacientes costarricenses clínicamente sospechosos de dengue sin antecedentes de vacunación por FA.

TITULACIÓN VIRAL

Para la titulación viral se siguió el método descrito por Morens y otros.⁶ De forma breve, a partir de cultivos de células BHK-21 clono 15 con 7 d de siembra se preparó una suspensión de 2x10⁵ células/mL en el medio de crecimiento de éstas. Para la titulación viral se sembraron 500 µL de la suspensión celular por pocillo, en placas plásticas de poliestireno de 24 pocillos. Después de 1h de incubación a temperatura ambiente, se inocularon 50 µL (por triplicado) de las diluciones en base 10 del virus. El medio de mantenimiento de las células, consistente en 3 % de carboximetilcelulosa viscosidad media en medio MEM con 10 % SFBI, se añadió a razón de 500 µL/pocillo después de 4h de incubación a 37 °C en incubadora de CO₂ al 5 %. Las placas plásticas fueron incubadas en las mismas condiciones durante 5 d. La coloración de las células con una solución de naftol blue-black y ácido acético y el conteo de las placas virales se realizó al quinto día posinoculación.

ESTUDIOS SEROLÓGICOS

Prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH). A cada muestra de suero se le determinó la presencia de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación (IH) al virus dengue 2 utilizando un antígeno preparado en cerebro de ratón lactante y extraído mediante el método de sacarosa acetona según describen *Clarke y Casals*,⁷ adaptado para microtécnica. Todo suero que presentaba títulos de anticuerpos mayores o iguales que 1/20 se consideró como positivo de anticuerpos a dengue. Las muestras de

pacientes que presentaron títulos de anticuerpos $IH \geq 1/1\ 280$ se clasificaron como portadores de una infección secundaria según el criterio establecido en las guías para la prevención y control del dengue en las Américas.⁸

Prueba de neutralización por reducción de placas (PNRP). Se utilizó el método descrito por Morens y otros.⁶ Se realizaron diluciones al doble de cada muestra de suero desde 1/2,5 a 1/80 en medio MEM con SFBI al 2 %. Un volumen de 100 μ L de cada suero fue incubado a 37 °C durante 1 h con 100 μ L de la dilución de trabajo del virus calculado para dar 10-20 ufp/50 μ L en el volumen final de la mezcla virus-suero. Después de la incubación, fueron inoculados por triplicado 50 μ L de la mezcla virus-suero sobre células BHK21 previamente sembradas en placas de poliestireno de 24 pocillos en forma similar a como se describió para la titulación viral. Los pasos siguientes fueron similares a los antes descritos. Para cada suero, se calculó la media del número de placas y su porcentaje de reducción en relación con el virus control. Toda muestra con un porcentaje de reducción del número de placas mayor o igual que 50 % se consideró positiva de anticuerpos.

Elisa de captura de IgM. En los sueros de pacientes clínicamente sospechosos de dengue se determinó la presencia de anticuerpos IgM a los 4 serotipos de dengue mediante un ELISA de captura⁹ con el objetivo de confirmar la infección reciente por estos agentes.

RESULTADOS

Para cumplimentar los objetivos propuestos, inicialmente, crecimos la cepa vacunal 17D de la FA en cultivos de células Vero, y observamos la aparición del efecto citopático característico (redondeamiento celular y desprendimiento) al sexto día posinoculación. Para la titulación viral por placas se aplicó el método descrito por Morens y otros⁶ para los virus del dengue, y se obtuvieron títulos infectivos de $2,8 \times 10^5$ ufp/mL. El momento de coloración de las placas se determinó mediante la tinción de las células a intervalos diferentes y se determinó que el quinto día era el óptimo.

Para el montaje de la técnica de neutralización por reducción de placas primero se utilizaron sueros humanos diluidos desde 1/10 hasta 1/80, lo que permitió reconocer títulos variables de anticuerpos principalmente dependientes del tiempo de vacunación. Después, considerando que un gran número de individuos vacunados pueden tener niveles bajos de anticuerpos a FA decidimos utilizar diluciones 1/2,5 y 1/5 siguiendo las recomendaciones de *Poland* y otros, quienes utilizan diluciones de 1/2 y 1/4.¹⁰

En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos en un grupo de sueros de individuos cubanos con antecedentes o no de vacunación por FA y de inmunidad conocida a dengue, y en la tabla 2 se presentan los títulos de anticuerpos neutralizantes a la cepa 17D de la FA en sueros de pacientes clínicamente sospechosos de dengue sin antecedentes de vacunación por FA. Los sueros fueron estudiados a las diluciones 1/2,5; 1/5 y 1/10. Como puede observarse, 7 casos presentaban niveles bajos de anticuerpos a dengue que oscilaron entre 1/20 a 1/40 y 5 eran portadores de una infección de tipo secundaria dado por los niveles de anticuerpos a dengue mayores o iguales que 1/10 240. Algunos sueros mostraron entrecruzamiento antigénico con la FA a diluciones de 1/2,5; pero a diluciones de 1/5 en ninguno se detectó la presencia de anticuerpos neutralizantes (Nt) a FA.

TABLA 1. Determinación de la presencia de anticuerpos neutralizantes a la cepa 17D de la FA en sueros humanos de individuos sanos, inmunes y no inmunes a dengue y FA

No.	Vacunación FA (año)	Anticuerpos IH Dengue 2	Anticuerpos IgG/ELISA Dengue 2	Anticuerpos Nt a FA
1		<1/20	NR	<1/10
2		<1/20	<1/20	<1/10
3		1/20	20	<1/10
4	1990	NR	20	1/40
5	1983	<1/20	<1/20	1/10
6	1983	1/160	1/160	<1/10
7	1983	1/160	1/160	<1/10
8	1986	1/40	1/40	1/20

NR: No realizado.

TABLA 2. Determinación de la presencia de anticuerpos neutralizantes a la cepa 17D de la FA en sueros de pacientes clínicamente sospechosos de dengue sin antecedentes de vacunación por FA

No.	Anticuerpos IgM a dengue	Título de anticuerpos IH (dengue 2)	Tipo de infección por dengue	Título de anticuerpos Nt a FA
1	+	$\geq 1/10\ 240$	Sec.	<1/5
2	+	1/40	Prim.	<1/5
3	+	1/40	Prim.	<1/5
4	+	1/40	Prim.	<1/5
5	+	$\geq 1/10\ 240$	Sec.	<1/5
6	+	$\geq 1/10\ 240$	Sec.	<1/5
7	+	$\geq 1/10\ 240$	Sec.	<1/5
8	+	1/20	Prim.	<1/5
9	+	1/80	Prim.	<1/5
10	+	1/40	Prim.	<1/5
11	+	$\geq 1/10\ 240$	Sec.	<1/5
12	+	1/80	Prim.	<1/5

Prim.: primaria Sec.: secundaria.

DISCUSIÓN

La FA y el dengue son Flavivirus estrechamente relacionados, que comparten en su envoltura antígenos comunes de grupo capaces de inducir la producción de anticuerpos de reactividad cruzada detectables mediante diferentes técnicas serológicas como la IH y los ensayos inmunoenzimáticos.¹¹⁻¹³ Esta estrecha relación ha hecho sugerir a los investigadores que la inmunidad natural o adquirida mediante vacunas para la FA podría tener algún efecto sobre la enfermedad del dengue. Aún más, se ha planteado si una vacuna para el dengue pudiera tener algún efecto sobre la infección por FA o algún otro Flavivirus relacionado como la encefalitis japonesa (EJ).^{5,14} Tres posibles efectos podrían observarse en el primer caso: 1) incremento del riesgo de desarrollo de la FHD debido a la producción del fenómeno de inmuoamplificación dependiente de anticuerpos, 2) efecto protector y 3) no producirían alguna incidencia sobre la enfermedad.

Estudios en voluntarios realizados por *Sabin* parecen sugerir que la presencia de anticuerpos antiFA no resulta en protección cruzada para el dengue.¹⁵ En su lugar, la inmunidad a FA parece aumentar la respuesta inmune a cepas atenuadas de dengue. En este sentido, *Scott y otros*, en 1983, demostraron un aumento en la magnitud y duración de los anticuerpos específicos a dengue en un grupo de voluntarios inmunes a FA frente a otro grupo no inmune.¹⁵ Estos resultados indican aparentemente, que los anticuerpos antiFA "amplificaron" la infectividad de la cepa vacunal PR159/S1 del virus dengue 2 utilizada en el estudio, pudiendo esperarse que la presencia de anticuerpos de reactividad cruzada no neutralizantes para dengue pudieran resultar en infecciones más agresivas.¹⁶ No obstante lo anterior, hasta el momento no se ha atribuido ningún caso de FHD a una secuencia de infección de un Flavivirus no dengue-dengue,⁵ además, las infecciones por dengue en el personal militar norteamericano radicado en Viet Nam fueron muy ligeras¹⁷ y sueros de individuos inmunes a otro Flavivirus, el que produce la EJ, han fallado para amplificar la infección por dengue 2 en líneas celulares de macrófagos.¹⁸

Las regiones endémicas de FA están restringidas a áreas tropicales de Suramérica y África, mientras las de FHD se localizan en el Sudeste Asiático, el Caribe y Centroamérica.^{1,8} Hasta finales de los años 80 las zonas endémicas de FA y FHD habían sido diferentes, lo que explica el por qué este problema ha sido tan poco estudiado. Con el desarrollo de epidemias de FHD en Venezuela, Brasil y Colombia, y de FD en Perú y Bolivia, estas regiones se superponen por primera vez, por lo que surge la disyuntiva de evaluar las ventajas y potenciales

desventajas de la vacunación con FA a la población general de estos países como un problema real. Existen algunas evidencias de una relación directa en el número de casos de FHD asociados con una historia previa de vacunación por FA en la región de Bucaramanga, Colombia (Villar LA. Comunicación personal).

Para realizar cualquier estudio al respecto se hace necesario contar con una técnica serológica con suficiente especificidad que permita determinar la presencia de anticuerpos a FA aun en individuos que han sufrido una o varias infecciones por dengue. Por tal motivo nos propusimos normalizar la técnica de neutralización por reducción de placas para determinar la presencia de anticuerpos a este agente. Varios estudios han demostrado que después de 30 años posvacunación con la cepa 17D de la FA, los anticuerpos neutralizantes están presentes aunque en títulos bajos, por lo que decidimos estudiar también un grupo de sueros de individuos con antecedentes conocidos de vacunación o no por FA y de la presencia de anticuerpos a dengue y determinar la menor dilución de suero capaz de discriminar la presencia de los anticuerpos antiFA.

En los sueros de individuos cubanos se pudo observar 2 casos sin anticuerpos a dengue ni antecedentes de vacunación en los que no se detectó la presencia de anticuerpos Nt a FA en títulos de 1/10. Un caso sin antecedentes de vacunación y con anticuerpos a dengue no presentó anticuerpos Nt a FA como era de esperar. Un caso sin anticuerpos a dengue pero con antecedentes de vacunación demostró la presencia de anticuerpos Nt a FA en títulos de 1/10. De los restantes casos que mostraban anticuerpos a dengue y antecedentes de vacunación por FA, 2 mostraron títulos de anticuerpos antiFA de 1/20 y 1/40. En 2 sueros no se detectaron anticuerpos antiFA, lo que podría deberse a que el título fuera menor que la dilución de suero estudiada. Uno de ellos probado posteriormente mostró títulos de anticuerpos de 1/5.

Para estudiar el posible entrecruzamiento antigénico de los anticuerpos a dengue frente al virus de la FA estudiamos 12 sueros de pacientes de dengue con títulos variables de anticuerpos a éste sin historia previa de vacunación con FA y procedentes de un área geográfica donde este agente no circula (Costa Rica). A la dilución 1/5 del suero no se observó entrecruzamiento antigénico entre ambos agentes. Estos resultados sugieren que la dilución 1/5 es óptima, ya que se mantiene la especificidad de los anticuerpos y permite discriminar la respuesta de anticuerpos específica frente a cada agente.

Los resultados obtenidos nos permiten contar con una técnica útil y de gran especificidad para la realización de estudios serológicos que permitan dilucidar la problemática planteada anteriormente.

SUMMARY

The plaque reduction neutralization assay was standardized to differentiate an infection caused by dengue from another infection produced by yellow fever. Serum samples from Cuban donors were used to this end. Information on previous vaccination against yellow fever was available. Samples from Costa Rican patients with a clinical picture of dengue and with no antecedents of vaccination against yellow fever were also utilized. The optimal plaque staining day was the fifth day and the smallest serum dilution capable of differentiating an infection resulting from dengue from another infection caused by yellow fever was of 1/5. According to the high specificity of the standardized technique, risk factor studies of dengue hemorrhagic fever could be made among individuals vaccinated against yellow fever, which is a present and important topic.

Subject headings: NEUTRALIZATION TESTS/standards; DENGUE/diagnosis; YELLOW FEVER/diagnosis.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Monath TP. Yellow fever and dengue—the interactions of virus, vector and host in the reemergence of epidemic disease. *Semin Virol* 1994;5:133-45.
2. Gubler D, Clark G. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis* 1995;1:55-7.
3. Haslstead SB. The pathogenesis of dengue: molecular epidemiology in infectious disease. *Am J Epidemiol* 1981;114:632-48.
4. Kurane I, Ennis FE. Immunity and immunopathology in dengue virus infection. *Semin Immunol* 1994;4:121-7.
5. Halstead SB. Pathophysiology and pathogenesis of dengue haemorrhagic fever. Monograph on dengue/dengue haemorrhagic fever. World Health Organization. Regional Office for South-East Asia, New Delhi. Regional Publication 1993, SEARO, # 22, pps. 80-10.
6. Morens DM, Halstead SB, Repik PM, Putvatana R, Raybourne N. Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semimicro methods in BHK21 cells: comparison of the BHK suspension test with the standard plaque reduction neutralization. *J Clin Microbiol* 1985;22:250-54.
7. Clarke DH, Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1958;7:561-73.
8. Pan American Health Organization. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: Guidelines for prevention and control. Washington, 1994 (Scientific Publication; No. 548).
9. Vázquez S, Saenz E, Huelva G, González A, Kourí G, Guzmán MG. Utilización de muestras de sangre total en papel de filtro para la detección de anticuerpos IgM a virus dengue. 1997 (en prensa).
10. Poland JD, Calisher CH, Monath TP. Persistence of neutralizing antibody to yellow fever virus 30 to 35 years following immunization with 17D yellow fever vaccine: a study of World War II veterans in 1975-1976. *Bull World Health Organ* 1981;59:895-900.
11. Calisher C, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope R, Porterfield JS, Westaway EG, et al. Antigenic relationship between Flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol* 1989;70:37-43.
12. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression and replication. *Annu Rev Microbiol* 1990;44:649-88.
13. Monath TP. Flavivirus. En: Fields BN, Knipe DM, eds. *Virology*. New York: Raven, 1990:763-814.
14. Hoke CH, Malinoski FJ, Eckels KH, Scott RM, Dubois D, Summers PL, et al. Preparation of an attenuated dengue 4 (341750 CARIB) virus vaccine. II Safety and immunogenicity in humans. *Am J Trop Med Hyg* 1990;43:219-26.
15. Scott RM, Eckels KH, Bancroft WH, Summers PL, McCown JM, Anderson JH, et al. Dengue 2 vaccine: dose response in volunteers in relation to yellow fever immune status. *J Infect Dis* 1983;148:1005-60.
16. Bancroft WH, Scott RMc, Eckels KH, Hoke CH, Simms TE, Jesrani KDT, et al. Dengue virus type 2 vaccine: reactogenicity and immunogenicity in soldiers. *J Infect Dis* 1984; 149:1005-10.
17. Deller JJ, Russell PK. An analysis of fevers of unknown origin in American soldiers in Viet Nam. *Ann Int Med* 1967;66:1129-43.
18. Halstead SB, Porterfield JW, O'Rourke EJ. Enhancement of dengue virus infection in monocytes by flavivirus antisera. *Am J Trop Med Hyg* 1980;29:638-42.

Recibido: 18 de enero de 1998. Aprobado: 20 de mayo de 1998.
Lic. *Mayling Álvarez Vera*. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí". Apartado 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba.