

INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL "PEDRO KOURÍ"

Normalización de la técnica de neutralización por placas en las células Vero para los virus del dengue

Mayling Álvarez Vera,¹ Annabel González Rodríguez,² Danay Díaz Morejón,³ Luis Morier Díaz⁴ y María G. Guzmán Tirado⁵

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: la técnica de neutralización por reducción del número de placas ha sido realizada en las células BHK-21 en Cuba desde hace más de 2 décadas, para la determinación de los anticuerpos neutralizantes a dengue. A finales de 2007, la OMS inició un programa para armonizar esta técnica en todos los laboratorios al nivel mundial. **OBJETIVOS:** en el presente estudio se trazó como objetivo principal la normalización de la técnica de neutralización, por reducción del número de placas en las células Vero procedentes del Laboratorio de Cultivo del Instituto de Medicina "Pedro Kourí". **MÉTODOS:** se emplearon las cepas virales propuestas por la OMS y las cepas del Banco de cepas del Laboratorio de Arbovirus, y un panel de sueros humanos de pacientes sospechosos de dengue con más de 5 d del comienzo de los síntomas. **RESULTADOS:** se demuestra que con las células Vero sembradas en suspensión se obtiene una mayor capacidad y calidad de plaqueo. Se obtuvieron resultados similares con las cepas del Banco de Arbovirus y con las cepas de referencia de la OMS. **CONCLUSIONES:** se logró normalizar la técnica de neutralización en las células Vero con resultados reproducibles a los obtenidos en BHK-21, pero con el consumo de un número mayor de días. La normalización de esta técnica permitirá relacionar los resultados de neutralización de los estudios epidemiológicos y de vacuna con los obtenidos por otros laboratorios al nivel internacional.

Palabras clave: neutralización por placas, dengue, células Vero, células C636 HT.

INTRODUCCIÓN

El dengue (DEN) se considera una enfermedad emergente en la actualidad y es una de las principales enfermedades virales transmitidas por artrópodos en términos de morbilidad y mortalidad. Se estima que anualmente ocurren entre 50 y 100 millones de infecciones. Esta enfermedad es la causa de 300 000 a 500 000 hospitalizaciones anuales con una tasa de letalidad de 1 a 5 %.^{1,2}

El diagnóstico serológico de los virus del DEN es complicado, por la existencia de determinantes

antigénicos de reactividad cruzada compartidos por los 4 serotipos virales y otros flavivirus.³

Una variedad de pruebas serológicas han sido utilizadas para determinar los anticuerpos anti-flavivirus: inhibición de la hemaglutinación (IH), fijación del complemento (FC), inmunofluorescencia (IF), ensayos inmunoenzimáticos (ELISA), y la prueba de neutralización por reducción del número de placas (NRNP). Cada uno de los principios de estos ensayos se basa en una propiedad diferente de los anticuerpos, pero solamente la NRNP proporciona el parámetro biológico de la neutrali-

¹ Doctora en Ciencias de la Salud. Licenciada en Microbiología. Investigadora Titular. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). Ciudad de La Habana, Cuba.

² Licenciada en Microbiología. Máster en Virología. LABIOFAM. Ciudad de La Habana, Cuba.

³ Especialista de I Grado en Microbiología. IPK. Ciudad de La Habana, Cuba.

⁴ Licenciado en Microbiología. Investigador Auxiliar. Profesor Auxiliar. IPK. Ciudad de La Habana, Cuba.

⁵ Doctora en Ciencias. Investigadora de Mérito. Profesora Titular. IPK. Ciudad de La Habana, Cuba.

zación del virus *in vitro*. Además es la prueba serológica más específica entre los flavivirus, y serotipo-específica entre los virus del DEN, que correlaciona los niveles de protección del suero frente a la infección.⁴

En el caso de la infección por dengue no existe un modelo animal que reproduzca la enfermedad, esto hace difícil la evaluación de las capacidades protectoras de los candidatos vacunales y su correlación con la protección *in vivo*. Estudios realizados a lo largo de estos años han mostrado que la protección en ratones y en primates a la infección por dengue se ha correlacionado con los niveles de anticuerpos neutralizantes, por lo que, hasta el momento, la NRNP es la técnica más aceptada para medir los anticuerpos neutralizantes al virus.⁴ Sin embargo, no existe una normalización de esta técnica que permita la comparación de los niveles de anticuerpos neutralizantes en el suero de los vacunados, o de los individuos inmunes en los diferentes laboratorios internacionales.

Teniendo en cuenta lo antes planteado en 2007, la Organización Mundial de la Salud (OMS) inició un programa a nivel mundial, para armonizar los procedimientos de la NRNP en todos los laboratorios mediante la realización de unas guías para el desarrollo de la técnica. En estas se recogen las recomendaciones mínimas para el desarrollo del protocolo de la técnica, en relación con las cepas, células empleadas y metodología. Esto permitiría en un futuro la definición de valores en el título de

anticuerpos neutralizantes que se correlacionen con la protección *in vivo*.⁴

Teniendo en cuenta que solo las células Vero han sido obtenidas de manera tal que puedan ser usadas para la producción de vacunas vivas atenuadas y como un primer acercamiento en la normalización de este protocolo en las condiciones cubanas; se evaluó la técnica de NRNP en las células Vero, mantenidas en el Laboratorio de Cultivos Celulares del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” (IPK), con las cepas de referencia de la OMS y las cepas del Laboratorio de Arbovirus.

MÉTODOS

LÍNEAS CELULARES

Para el estudio se utilizaron las líneas celulares siguientes, las cuales se mantienen en el Laboratorio de Cultivo de Células del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”: la línea celular C6/36HT (*Aedes albopictus*,⁵ cepa celular del clono C6/36, (ATCC CRL 1660) donada por el doctor Javier Díaz (Laboratorio Departamental de Medellín, Colombia), la línea celular BHK21 clono 15 (riñón de hámster recién nacido), gentilmente donada por el profesor S. B. Halstead, Director Científico de la Iniciativa de una Vacuna Pediátrica para Dengue y la línea de células Vero proveniente de riñón de mono verde africano (ATCC, CCL-81).⁵

TABLA 1. Características de las cepas del laboratorio del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” y de la Organización Mundial de la Salud utilizadas en la titulación viral y en la detección de anticuerpos neutralizantes por el método de placas

Cepas virales	Historia de pases	Lugar de aislamiento	Año de aislamiento
DEN 1 Angola*	5P C6/36 HT	Angola	1988
<i>DEN 1 WP74</i>	5P C6/36 HT	Naurú	1974
DEN 2 A15	2 PR 2P C6/36 HT	Cuba	1981
<i>DEN 2 SP16803</i>	4P C6/36 HT	Tailandia	NC**
DEN 3 116/00	5P C6/36 HT	Cuba	2000
<i>DEN 3 CH53489</i>	3P C6/36 HT	Tailandia	NC
DEN 4 Dominica *	4P C6/36	Dominica	1981
<i>DEN 4 TVP360</i>	3P C6/36	Caribe	NC

P: pase; R: ratón; *Cepas donadas gentilmente por el doctor Robert Shope (ya fallecido) de la Universidad de Texas, EE. UU.; **NC: no se conoce su año de aislamiento. En cursiva o itálica aparecen las cepas de referencia de los 4 serotipos del dengue recomendadas por la OMS, las que fueron donadas gentilmente por su Departamento de Inmunizaciones, Vacunas y Biológicos

CEPAS VIRALES

Las características de las cepas empleadas en el estudio se muestran en la tabla 1.

MUESTRAS SEROLÓGICAS

Se emplearon 29 sueros humanos de pacientes sospechosos de dengue procedentes de las provincias de: Granma/Matanzas (9), Santiago de Cuba (10) y Ciudad de La Habana (10), recibidos a través del Sistema Nacional de Vigilancia de Dengue con más de 5 d del comienzo de los síntomas.

ESTUDIOS SEROLÓGICOS

Titulación de las cepas

Se realizaron diluciones seriadas de cada una de las cepas (desde 1:10 hasta 1: 1000) en medio mínimo esencial (MEM) suplementado con 2 % de suero fetal bovino inactivado por 30 min a 56 °C. Se inocularon por triplicado en placas de 24 pocillos que contenían las células BHK21 clono 15 o células Vero. Las placas se incubaron en 5 % de CO₂ a 37 °C por 5-9 d, para ser teñidas con *naftol blue black*. Las placas se contaron para calcular los títulos virales y se expresaron en UFP/mL.^{6,7}

Optimización de diferentes parámetros para la realización de la técnica de placas en las células Vero

Con el objetivo de definir varios parámetros como el tiempo de incubación, la forma de sembrar las células, el día de tinción, así como la capacidad y calidad del plaqueo, se emplearon las células Vero sembradas en monocapa y en suspensión. Para ello se realizó la titulación de las cepas de dengue de los 4 serotipos (las de nuestro Banco de Cepas y las donadas gentilmente por el Departamento de Inmunizaciones, Vacunas y Biológicos de la OMS) (tabla 1). Se realizaron diluciones seriadas en base 10. Cada cepa fue titulada a la vez en las células Vero sembradas en suspensión y en monocapa. Se realizaron los títulos de cada

cepa en 9 placas diferentes con el objetivo de realizar la tinción de 5 a 13 d posinoculación.

Paralelamente se realizó la titulación de cada cepa empleada en las células BHK-21, la tinción se hizo en los días previamente establecidos para cada serotipo.^{6,7}

Evaluación del empleo de las cepas de referencia de la OMS para determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes a dengue en las células BHK-21

Se realizó la evaluación de las cepas de referencia de la OMS mediante la determinación de los anticuerpos neutralizantes en las 29 muestras de sueros previamente descritos, empleando para ello las células BHK-21. Para la determinación de la presencia de anticuerpos neutralizantes a cada serotipo del virus dengue se utilizaron las cepas descritas en la tabla 1. Se preparó una dilución 1/30 de cada suero. Esta dilución de cada suero se mezcló con igual volumen de la dilución de trabajo del virus, que consistió en 40 UFP/50 uL. Las mezclas de virus más suero o virus más medio se incubaron durante 1 h a 37 °C a 5 % de CO₂. Posteriormente se inocularon 50 uL de esta mezcla en las células BHK21 y se incubó de forma similar a lo realizado para la titulación de las cepas según los protocolos de *Morens* y otros, así como *Álvarez* y otros.^{6,7}

Evaluación del empleo de la técnica de placas en las células Vero sembradas en suspensión para la determinación de la presencia de anticuerpos neutralizantes a dengue

Después de optimizar el empleo de las células Vero en suspensión y de validar el uso de las cepas de referencia de la OMS en las células BHK21, se evaluó la realización de la NRNP en las células Vero y BHK-21 en paralelo. Para ello se determinó la presencia de anticuerpos neutralizantes a los 4 serotipos virales, con el mismo panel de sueros de individuos procedentes de las 3 regiones del país en las 2 líneas celulares. Para el desarrollo de este objetivo se utilizaron las cepas descritas en la tabla 1 y se siguió el protocolo descrito brevemente en el acápite de evaluación del empleo de las cepas de referencia de la OMS.^{6,7}

Análisis de los resultados

Este trabajo es descriptivo y no se realizó ningún tipo de análisis estadístico.

RESULTADOS

Optimización de diferentes parámetros para la realización de la técnica de placas en las células Vero

En relación con la forma de sembrar las células Vero, los resultados mejores de la titulación viral se obtuvieron en las células sembradas en suspensión, como se muestra en la tabla 2 para todas las cepas empleadas. Algunas cepas no fueron capaces de formar placas en las células Vero sembradas en monocapa. Estas cepas fueron las 2 cepas de DEN-1 (DEN 1 Angola y DEN 1 WP74) y las 2 cepas de DEN-4 (DEN 4 Dominica y DEN 4 TVP360). En cuanto a los días de tinción, al emplear las células Vero sembradas en suspensión, las cepas de DEN-2 tuvieron placas más visibles

y más nítidas a los 7 d posinoculación. Para las cepas de DEN-3 las placas se observaron más nítidas a los 10 d mientras que para las cepas de DEN-4 a los 8 y 10 d, respectivamente. El DEN-1 fue el serotipo que presentó más dificultad para plaquear en las células Vero necesitando un mayor tiempo de incubación (11 d), para lograr una mejor calidad de las placas. En la figura 1 se muestra la formación de placas de las cepas de referencia de los 4 serotipos de DEN en las células BHK-21 y en las células Vero sembradas en suspensión y en monocapa.

Evaluación de las cepas de referencia de la OMS para determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes a dengue en las células BHK-21

Los resultados obtenidos para el panel de sueros en relación con la presencia o no de anticuerpos neutralizantes fueron similares, tanto para las cepas cubanas de los 4 serotipos como para las cepas de referencia de la OMS en las células BHK 21 (Fig. 2).

Evaluación de la técnica de neutralización por reducción del número de placas empleando células Vero sembradas en suspensión

Al evaluar el empleo de la técnica de NRNP en las células Vero sembradas en suspensión con respecto a las células BHK-21, a una dilución 1/30 del panel de sueros se obtuvo un 100 % de coincidencia de los resultados. En la figura 3 se muestran los resultados similares obtenidos en ambas líneas celulares, en este caso para el DEN-1. No se muestran las figuras para el resto de los serotipos porque mostraron un comportamiento similar. De estas muestras procedentes de Granma y Matanzas 9 tenían solamente anticuerpos a DEN 1, 10 de ellas procedentes de la provincia de Santiago de Cuba tenían anticuerpos a DEN 1, DEN 2 y DEN 3, y en las restantes muestras procedentes de Ciudad de La Habana se encontraron anticuerpos a los 4 serotipos (Fig. 3).

TABLA 2. Título de las cepas de dengue en células BHK-21 y en células Vero sembradas en monocapa y en suspensión

Cepas	Células BHK-21 suspensión	Células Vero suspensión	Células Vero monocapa
DEN 1 Angola	PL* 7	PL 11	NP**
5P C6/36 HT	($0,46 \times 10^4$)	($2,5 \times 10^4$)	
<i>DEN 1 WP74</i>	<i>PL 7</i>	<i>PL 11</i>	<i>NP</i>
5P C6/36 HT	($2,3 \times 10^4$)	($1,6 \times 10^5$)	
DEN 2 A15	PL 5	PL 7	PL 7
2PR 2P C6/36 HT	($3,6 \times 10^4$)	($3,3 \times 10^4$)	($2,7 \times 10^4$)
DEN 2 SP 16803	PL 6	PL 7	PL 7
4P C6/36 HT	($4,5 \times 10^4$)	($3,7 \times 10^4$)	(2×10^4)
DEN 3 116/00	PL 7	PL 10	PL 10
5P C6/36 HT	($4,2 \times 10^4$)	($2,8 \times 10^4$)	($2,13 \times 10^4$)
DEN 3 CH 53489	PL 7	PL 10	PL 10
3P C6/36 HT	($3,2 \times 10^4$)	($1,5 \times 10^4$)	($1,5 \times 10^4$)
DEN 4 Dominica	PL 6	PL 8	NP
4P C6/36 HT	($1,7 \times 10^5$)	($2,3 \times 10^5$)	
DEN 4 TVP360	PL 6	PL 10	NP
3P C6/36 HT	($3,2 \times 10^5$)	($3,7 \times 10^5$)	

P: pase; R: ratón; *PL: plaqueo y día de tinción; **NP: no plaqueo. En cursiva o itálica aparece la cepa DEN 1 WP74, para la cual el título fue ligeramente mayor en las células Vero sembradas en suspensión. Todos los títulos se expresan en unidades formadoras de placas/mL (UFP/mL).

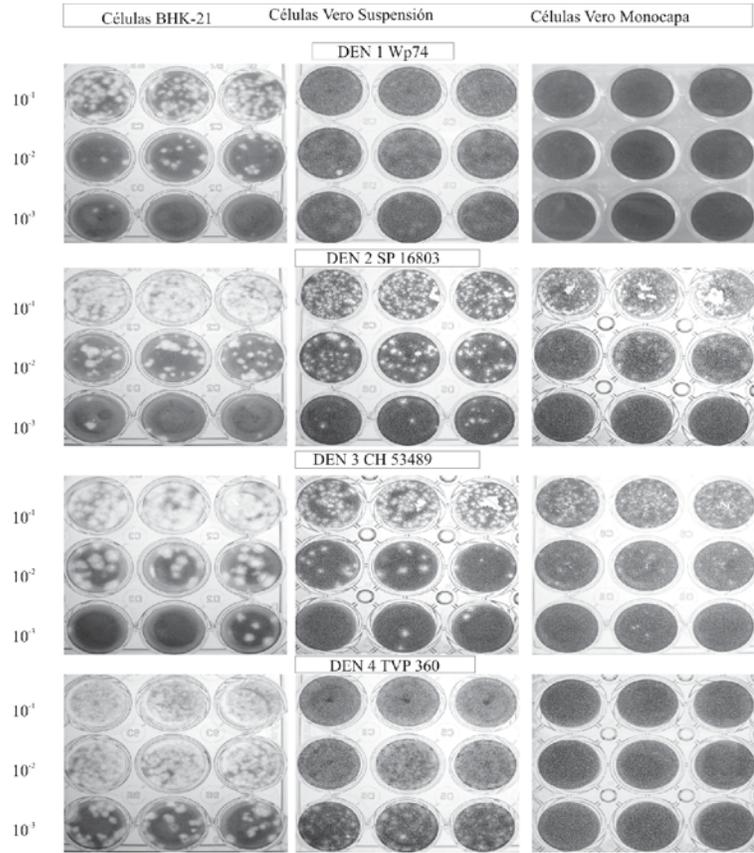
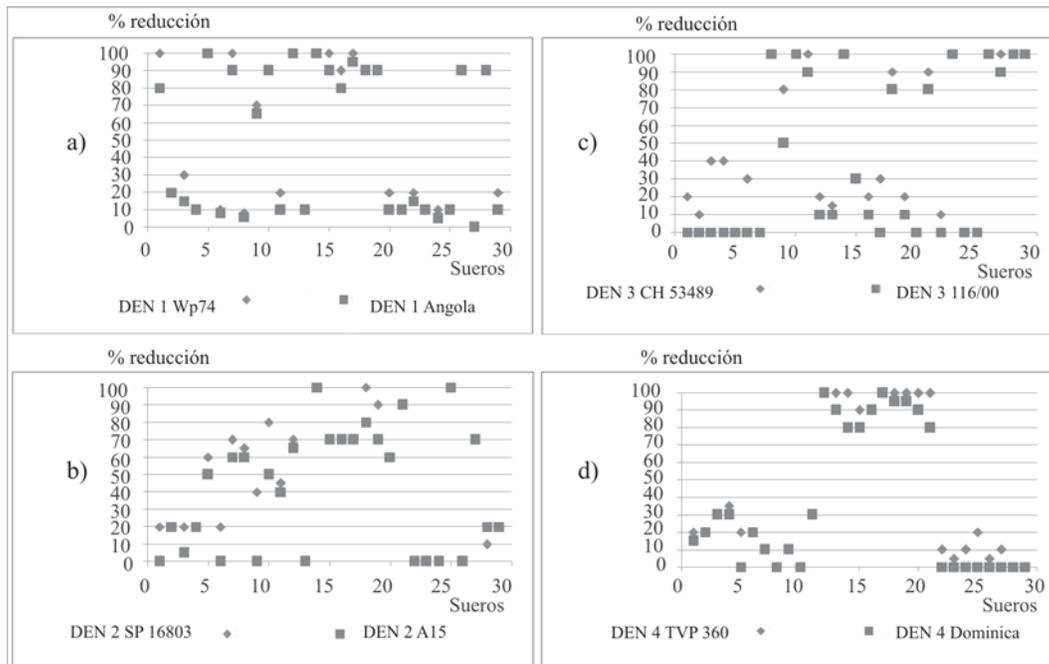


Fig. 1. Titulación de las cepas de referencia: DEN 1 WP74, DEN 2 SP 16803, DEN 3 CH 53489 y DEN 4 TVP360, en las células BHK-21 y en las células Vero sembradas en sus-pensión y en monocapa, en diluciones seriadas en base 10 desde 10⁻¹ hasta 10⁻³.



En las 4 figuras en el eje de las X aparecen los sueros estudiados y en el eje de las Y los porcentajes de reducción del número de placas para las muestras según la cepa empleada para la neutralización. En todos los casos las muestras con un porcentaje de reducción $\geq 50\%$ presentan anticuerpos neutralizantes al serotipo estudiado y las muestras con un porcentaje de reducción $< 50\%$ no presentan anticuerpos neutralizantes.

Fig. 2. a), b), c) y d). Resultados del empleo de las cepas de referencia de la OMS y de las cepas del Banco de Arbovirus del IPK, para la determinación de los anticuerpos neutralizantes a los 4 serotipos del virus DEN, mediante el empleo de una dilución simple del suero (1/30), en las células BHK-21.

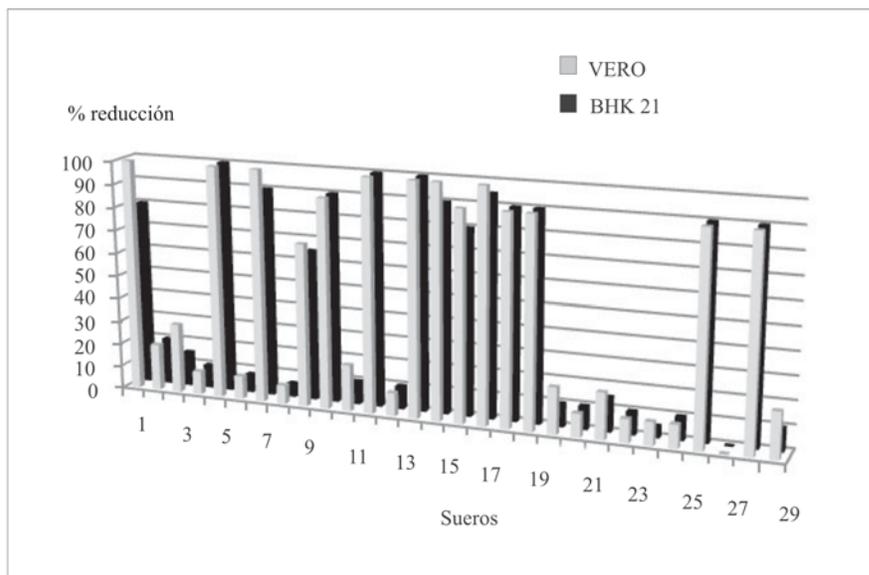


Fig. 3. Resultados de neutralización de los 29 sueros (dilución 1/30), en las células Vero y BHK-21 sembradas en suspensión para el DEN-1. En gris aparecen los resultados al emplear las células Vero (adelante) y en negro al utilizar las células BHK21 (detrás).

DISCUSIÓN

En Cuba, desde la década de los ochenta hasta hoy día, la técnica de NRNP se ha realizado en las células BHK-21. Se ha empleado en estudios seroepidemiológicos, retrospectivos, prospectivos y de casos clínicos de dengue.⁸ Esto ha permitido caracterizar las epidemias cubanas, en relación con el papel de la infección secundaria como factor de riesgo para la FHD, la prevalencia de los anticuerpos neutralizantes y para conocer la incidencia de la infección después de una epidemia.

A partir de 2007, la OMS se trazó como objetivo la normalización de la técnica de NRNP en las células Vero. En el Laboratorio de Arbovirus del Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”, siguiendo las guías propuestas por la OMS, los autores del presente trabajo se propusieron la normalización de esta técnica con las células Vero (ATCC CCL-81) que contaba la institución.

Diferentes laboratorios internacionales han empleado las células Vero sembradas en monocapa,^{9,10} a diferencia de los trabajos informados en las células BHK-21 donde la mayoría emplean las células sembradas en suspensión.^{6,7,11}

En relación con la tinción al emplear las células Vero, la mayoría de los laboratorios realizan la tinción de todos los serotipos al día 7 posinoculación.⁴ Sin embargo, algunos investigadores

realizan la tinción en las células Vero en suspensión, en un período de 5 a 7 d.¹²

Otras células muy empleadas en los laboratorios son las células LLCMK₂. En el Laboratorio de Arbovirus del IPK, al emplear estas se realizó la tinción para todos los serotipos al día 7.⁷

Cuando se trabajó con las células BHK-21 en suspensión, los días de incubación previos a la tinción varían en dependencia del serotipo: DEN-2 (5 d), DEN-4 (6 d) y DEN-1 y DEN-3 (7-9 d).⁷ Otros autores al emplear el mismo tipo de células realizan la tinción en el mismo rango de días.⁶

Existen particularidades y ciertas diferencias en la incubación de las células inoculadas al determinar el título de las cepas virales. En el presente estudio cuando se utilizaron las células BHK-21 y Vero sembradas en suspensión, al añadir la suspensión de células en las placas, estas se dejaron en reposo 1 h a temperatura ambiente. Luego se inoculó el virus y se incubaron las células 4 h a 37 °C, en atmósfera de CO₂ y finalmente se añadió el medio de recubrimiento y se incubaron las células por diferentes días, en dependencia del serotipo inoculado en cada placa.⁷ Otros autores cuando utilizan las células Vero en suspensión (2,5 × 10⁵ células/pozo), las incuban toda la noche después de sembradas. Posteriormente inoculan las diluciones de los virus e incuban las placas 1 h a 37 °C en atmósfera de CO₂, en agitación cada

15 min.¹² Investigadores del Centro de Investigación Médico Naval de Virología, de EE. UU. realizan la determinación del título de las cepas de DEN incubando las células BHK-21 clono 15 en suspensión por 2 h a 37 °C, en atmósfera de CO₂ (Laboratory –based workshop on Dengue Neutralization Test, Univesidad de Mahidol, Tailandia, 2004) Por su parte, el grupo de la Universidad de Medicina de Yale cuando trabajan con las células Vero y LLCMK₂ sembradas en monocapa solo incuban 1 h a 37 °C para que la dilución viral se adsorba en las células.⁹

En el presente trabajo se empleó un total de 8 cepas, las 4 cepas de referencia de la OMS y las 4 cepas del Banco del Laboratorio de Arbovirus del IPK. Los resultados de los títulos virales fueron similares en ambas líneas celulares con la excepción de la cepa DEN 1 WP745P C6/36 HT, para la cual el título fue ligeramente mayor en las células Vero sembradas en suspensión. En un estudio realizado por el grupo de Arbovirus del IPK en las células BHK-21 y LLCMK₂ sembradas en suspensión, se obtuvo para la cepa de DEN-3 116/00 un mayor título en las células LLCMK₂.⁷ Esto está dado por la mayor capacidad de determinadas cepas de formar placas en determinados sistemas celulares.¹³

Según nuestros resultados al emplear las células Vero en suspensión, estas requieren un mayor tiempo de incubación que los obtenidos previamente para las células BHK21 en suspensión.

Por años los laboratorios que realizan la NRNP han empleado cepas de laboratorio bien establecidas, aisladas hace muchos años, las que han sido amplificadas por varios pasajes en mosquitos o en varias líneas celulares. Sin embargo, no existe una medida racional a la hora de seleccionar una u otra cepa. La OMS propone en sus guías que la mejor práctica en la amplificación de las preparaciones virales es el empleo de multiplicidades de infección entre 10⁻² a 10⁻³. Además, plantean que los virus deben ser colectados durante la mitad de la fase exponencial o al final de esta, para así abolir la presencia de partículas inactivadas y que el sobrenadante se debe clarificar con una centrifugación baja y se debe adicionar un crioprotector como el SFBI a 30 % antes de ser alicuotado y almacenado a - 70 °C.⁴

A partir del año 2000 se reportan diferencias en estudios de neutralización de sueros frente a cepas de DEN-2 de diferente genotipo.¹⁴ Más

recientemente se han informado diferencias en la neutralización para cepas de DEN-2¹⁵ y DEN-3 del mismo genotipo.^{15,16} El hecho de obtener resultados similares al emplear ambos grupos de cepas (las nuestras y las de la OMS) es de extraordinaria importancia en la evaluación de la protección a diferentes candidatos vacunales y teniendo en cuenta las diferencias previamente informadas en relación con la respuesta de anticuerpos neutralizantes.

Aunque muchas líneas celulares han sido utilizadas para la NRNP como: las células BHK-21, LLCMK₂, Vero, C6/36 HT y las células de riñón porcino (PS), son escasas las comparaciones publicadas en estos sistemas celulares empleando condiciones optimizadas. Específicamente, en el laboratorio del IPK, se validó el empleo de la NRNP en las células LLCMK₂ y BHK-21, con un panel de 12 muestras colectadas en papel de filtro. En este caso los resultados fueron similares en 100 % de las muestras.⁷

Con este trabajo se ha logrado la normalización de la técnica de placas para dengue en las células Vero en suspensión, con el empleo de las cepas de referencia de la OMS. Esto permitirá relacionar los resultados de neutralización de los estudios de vacuna y epidemiológicos con los obtenidos por otros laboratorios al nivel mundial.

Standarization of the plaque-reduction neutralization technique in Vero cells for dengue virus testing

ABSTRACT

INTRODUCTION: the standard plaque reduction neutralization technique has been performed in BHK-21 cells for more than 20 years in Cuba to determine the neutralizing antibodies to dengue. At the end of 2007, the WHO implemented a program to harmonize this technique at all the laboratories worldwide. **OBJECTIVES:** the present study was aimed at standardizing the plaque-reduction neutralization technique in Vero cells from the Cultural Lab of “Pedro Kourí” Tropical Medicine Institute. **METHODS:** viral strains suggested by Who, strains from the Strain Bank of Arbovirus Laboratory, as well as the panel of human sera from dengue-suspected patients after 5 days of the symptoms. **RESULTS:** it was proved that suspension- cultured Vero cells allow higher plaque capacity and quality. Similar results were reached using Arbovirus Bank strains and WHO reference strains. **CONCLUSIONS:** it was possible to standardize the plaque-reduction neutralization in Vero cells, with results similar to those of BHK-21 but in longer length of time. Standardization of this technique will allow comparing the outcome of neutralization in the epidemiological studies and vaccine research with those of other laboratories worldwide.

Key words: plaque neutralization, dengue, Vero cells, C636 HT cells.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gubler DJ, Clark GG. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis.* 1995;1(2):55-7.
2. Guzman MG, Kouri G. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol.* 2003;27(1):1-13.
3. Monath TP. Early indicators in acute dengue infection. *Lancet.* 1997;350(9093):1719-20.
4. WHO. Guidelines for Plaque-Reduction Neutralization Testing of Human Antibodies to Dengue Viruses. *Viral Immunol.* 2008;21(2):123-32.
5. American Type Culture Collection. Catalogue of cells lines and hybridomas. 7ma ed. Maryland: ATCC; 1992.
6. Morens DM, Halstead SB, Repik PM, Putvatana R, Raybourne N. 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.* 1985;22(2):250-4.
7. Álvarez M, Rodríguez-Roche R, Bernardo L, Morier L, Guzmán G. Improved Dengue Virus Plaque Formation on BHK21 and LLCMK2 Cells: Evaluation of some factors. *Dengue Bulletin.* 2005;29:1-9.
8. Guzman MG, Kouri G, Bravo J, Soler M, Martinez E. Sequential infection as risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) during the 1981 dengue hemorrhagic Cuban epidemic. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1991;86(3):367.
9. Stim TB. Dengue virus plaque development in simian cell systems. II. Agar variables and effect of chemical additives. *Appl Microbiol.* 1970;19(5):757.
10. Putnak JR, Barrera R, Burgess T, Pardo J, Dessy F, Gheysen D, et al. Comparative Evaluation of Three Assays for Measurement of Dengue Virus Neutralizing Antibodies. *Am J Trop Med Hyg.* 2008;79(1):115-22.
11. Russell PK, Nisalak A, Sukhavachana P, Vivona S. A plaque reduction test for dengue virus neutralizing antibodies. *J Immunol.* 1967;99(2):285-90.
12. Lambeth CR, White LJ, Johnston RE, de Silva AM. Flow cytometry-based assay for titrating dengue virus. *J Clin Microbiol.* 2005;43(7):3267-72.
13. Rodríguez-Roche R, Álvarez M, Guzman MG, Morier L, Kouri G. Comparison of rapid centrifugation assay with conventional tissue culture method for isolation of dengue 2 virus in C6/36-HT cells. *J Clin Microbiol.* 2000;38(9):3508-10.
14. Kochel TJ, Watts DM, Halstead SB, Hayes CG, Espinoza A, Felices V, et al. Effect of dengue-1 antibodies on American dengue-2 viral infection and dengue haemorrhagic fever. *Lancet.* 2002;360(9329):310-2.
15. Wong SS, Abd-Jamil J, Abubakar S. Antibody neutralization and viral virulence in recurring dengue virus type 2 outbreaks. *Viral Immunol.* 2007;20(3):359-68.
16. Álvarez M, Pavon-Oro A, Rodríguez-Roche R, Bernardo L, Morier L, Sanchez L, et al. Neutralizing antibody response variation against dengue 3 strains. *J Med Virol.* 2008;80(10):1783-9.

Recibido: 13 de noviembre de 2009. Aprobado: 17 de febrero de 2010.
 Dra. *Mayling Álvarez Vera*. Departamento de Virología. Centro Colaborador de la OMS/OPS para el estudio del Dengue y su Vector. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Autopista Novia del Mediodía y Carretera Central Km 6 1/2. Lisa. AP 601. CP 17100. Ciudad de La Habana, Cuba. Teléf.: 53-7-2020450. Correo electrónico: mayling@ipk.sld.cu