

Obtención de la sublínea celular CLA-HT. Estudio de su sensibilidad para el aislamiento y multiplicación de los virus del dengue

Obtainment of CLA-HT cell subline and study of its susceptibility for the isolation and multiplication of the dengue virus

Lic. Luis Morier Díaz,^I MSc. Dámasa Irene López-Santa Cruz,^{II}
Dra. C. Mayling Álvarez,^I Téc. Yamira Caballero Lorenzo,^I Lic. Daineya
Mendoza Llanes^I

^I Laboratorio de Cultivos Celulares. Departamento de Virología. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). La Habana, Cuba.

^{II} Centro Provincial de Higiene, Epidemiología y Microbiología (CPHEM). La Habana, Cuba.

RESUMEN

Introducción: en el diagnóstico de dengue es importante la determinación del serotipo viral. A pesar de existir otros métodos, el aislamiento viral en cultivos de células y la identificación por la técnica de inmunofluorescencia siguen siendo muy utilizados. Por lo tanto, la búsqueda de sistemas celulares más sensibles ha sido un tema reiterado durante muchos años para el virus dengue y otros agentes.

Objetivo: obtener una sublínea celular a partir del clon CLA-1 (*Aedes pseudoscutellaris*) que crece a 28 °C, capaz de multiplicarse a 33 °C (CLA-HT) y evaluar su utilidad para el aislamiento y la identificación de los virus del dengue.

Métodos: a partir del clono CLA-1 de la línea celular AP-61 (*Aedes pseudoscutellaris*) se obtuvo por selección una cepa o sublínea celular CLA-HT capaz de crecer a 33 °C. Se estudió su sensibilidad para la multiplicación de los 4 serotipos del virus del dengue y su eficiencia para el aislamiento directo de sueros de pacientes en fase aguda de la enfermedad, ambos comparativamente con la línea C6/36HT (*A. albopictus*).

Resultados: la sublínea CLA-HT permitió el crecimiento de los 4 serotipos del virus dengue aunque para algunos requirió más tiempo que la C6/36 HT. Para el aislamiento a partir de muestras de sueros colectadas de individuos en fase aguda, la sublínea CLA-HT detectó el virus en el 40 % de las muestras, mientras que C6/36 detectó el virus en el 50 %.

Discusión: CLA-HT es capaz de detectar todos los serotipos del virus dengue a partir de las 96 horas pos inoculación, por lo que es útil para la investigación como sistema alternativo y su eficiencia de aislamiento directo es buena para aplicar en grandes brotes. Además, la principal ventaja es que es posible utilizarla para proporcionar una respuesta rápida a situaciones emergentes en laboratorios de escasos recursos, ya que no precisa de condiciones de incubación con CO₂.

Conclusiones: se obtuvo una sublínea CLA-HT a partir de la línea CLA-1 capaz de crecer a 33 °C, la cual detecta los 4 serotipos del virus dengue. Su eficiencia de aislamiento es ligeramente menor que la sublínea C6/36 HT, pero se puede utilizar como sistema alternativo para el aislamiento de los virus dengue sobre todo en laboratorios con bajos recursos que no cuenten con condiciones óptimas de incubación.

Palabras clave: virus dengue, sublínea celular, detección viral.

ABSTRACT

Introduction: the identification of viral serotypes is an important issue for dengue diagnosis. Despite the existence of other identification methods, the viral isolation in cell cultures and determination by immunofluorescent technique remain as the most used. Therefore the search for more sensitive cellular systems has been a repeated topic during many years for dengue virus and other agents.

Objective: to obtain a cell subline from CLA-1 clone (*Aedes pseudoscutellaris*), that grows at 28 °C, capable of multiplying at 33 °C (CLA-HT) and to evaluate its usefulness for Dengue virus isolation and identification.

Methods: by using a CLA-1 clone of the AP-61 (*Aedes pseudoscutellaris*) cell line, it was possible to obtain a strain or cell subline CLA-HT capable of growing at 33 oC (CLA-HT) through a temperature selection method. Its sensitivity for the multiplication of the 4 dengue virus serotypes and its efficiency for direct virus isolation from acutely ill patients' sera were studied in comparison to C6/36 HT cell line (*A. albopictus*).

Results: four dengue virus serotypes grew in CLA-HT cell subline but some serotypes were detected later in CLA-HT than in C6/36 HT. For dengue isolation from serum samples taken in acutely ill patients, the CLA-HT subline detected 40 % positive samples whereas C6/36 HT did 50 %.

Discussion: CLA-HT is able to detect all dengue virus serotypes from 96 hours on post inoculation. It makes the new cell line useful for research as an alternative system and the direct isolation efficiency is good to be applied in large outbreaks. The most important advantage of CLA-HT is the possibility of giving rapid answer in emergency situations in low resource laboratories since it does not require special incubation conditions with CO₂.

Conclusions: a CLA-HT subline was obtained from CLA-1 line and it grows at 33 oC and capable of detecting 4 dengue virus serotypes. Its isolation efficiency is slightly lower than that of C6/36 HT subline, but it may be used as an alternative system for dengue virus isolation, mainly in resource-poor laboratories that do not have the optimal conditions for incubation.

Key words: dengue virus, cell subline, viral detection.

INTRODUCCIÓN

El dengue es una arbovirosis asociada a los humanos, producida por una infección con algunos serotipos del virus Dengue (DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4).¹

Teniendo en cuenta que no existen vacunas efectivas ni antivirales contra la infección por el virus dengue, la detección e identificación del agente etiológico continúa siendo de importancia en el control de brotes epidémicos.² Las líneas celulares de mosquitos han demostrado su efectividad para la detección temprana y el aislamiento viral debido a su alta sensibilidad a los arbovirus.³ No obstante el papel del *Aedes Aegypti* en la transmisión del dengue, sólo una línea celular del mismo ha sido estudiada exhaustivamente con resultados exitosos por su alta susceptibilidad y sensibilidad a este agente.⁴

A pesar del gran número de líneas celulares de mosquitos establecidas, muy pocas han encontrado aplicación en virología para el aislamiento y la propagación viral como C6/36 y AP-61.^{5:6}

Recientemente ha comenzado a utilizarse una sublínea del clono C6/36 capaz de multiplicarse a 33 °C. Algunos autores plantean que esta sublínea de crecimiento a alta temperatura (C6/36 HT) resiste sólo varias semanas de mantenimiento bajo estas condiciones y proponen tomar el clono original de 28 °C y readaptarlo a crecer a 34 °C cada vez que el deterioro provocado por una temperatura elevada lo exija. Esta sublínea celular se ha propagado entre los investigadores de la región ya que ha demostrado una mayor eficacia para el aislamiento siendo menor el tiempo de detección viral por inmunofluorescencia directa (IFD) o indirecta (IFI) y aumentar el número de aislamientos.^{7:8}

La sublínea C6/36HT, capaz de crecer a 33 °C, se obtuvo por selección a partir de C6/36, proveniente esta última de la línea de *Aedes albopictus* (AAL).⁹ La línea celular AP-61, se obtuvo de larvas de *A. pseudoscutellaris* en medio artesanal MM/VP-12.⁵ Posteriormente, sus propios autores describieron la pérdida paulatina de la capacidad de la misma para el aislamiento viral directo, siendo útil para la propagación de cepas de laboratorio a partir de los pases 70s. La línea celular AP-61 fue clonada utilizando un medio comercial y se obtuvo la sublínea CLA-1 con buena sensibilidad para el aislamiento de los serotipos de los virus del dengue.⁸

Siguiendo esta misma línea de desarrollo, el presente trabajo se propuso adaptar la línea celular CLA-1 a crecer a 33 °C y demostrar su sensibilidad en la multiplicación de los virus del dengue y su eficiencia para el aislamiento viral. Al mismo tiempo, comparar dichos parámetros con la línea celular C6/36HT por ser la más utilizada universalmente para este fin.

MÉTODOS

Obtención de la sublínea CLA-HT

El clono CLA-1 obtenido de la línea celular AP-61⁸ fue descongelado del banco criopreservado en nitrógeno líquido en el subcultivo 45 en medio L-15 suplementado con 10 % de caldo triptosa fosfato y 10 % de suero fetal bovino. Al completar la monocapa se realizaron los pases paralelamente a 28 y 33 °C,

inicialmente con un "split" o razón de pase de 1:3 semanal. Al segundo pase de las células mantenidas a 33 °C se observaron cambios morfológicos, tornándose las células más fibroblásticas, lográndose la total confluencia en 7 días.

En los primeros 4 pases a 33 °C, el crecimiento fue más lento y en los espacios formados por el alargamiento de las células, comenzó a aparecer una subpoblación de células más pequeñas en forma de colonias. A los 7 días del pase se repuso el medio exhausto por medio fresco para estimular el desarrollo de alguna de las poblaciones celulares observadas. Así durante un mes se realizaron dos pases (uno quincenal) a una razón de pase reducida a 1:1 y dos cambios de medio cada semana. En el octavo pase, cuando la nueva subpoblación se hizo mayoritaria, se restableció la razón de pase y se eliminaron los cambios de medio intrasemanales. Se continuaron los pases de las células a 33 °C, en el mismo medio de crecimiento que las de 28 °C y empleando la misma forma mecánica de dispersión de la monocapa con policía de goma.

Líneas celulares

Se utilizó la línea celular C6/36 HT a 33 °C en subcultivo 80-85 crecidas en Medio Esencial Mínimo que contiene glutamina (2mM) y aminoácidos no esenciales (MEMgaane) con 5 % de CO₂ las cuales fueron pasadas por método mecánico golpeando el frasco vigorosamente para desprender la monocapa.

La sublínea celular CLA-HT a 33 °C fue utilizada entre los subcultivos 13 y 17 creciendo solamente en una atmósfera de 90 a 95 % de humedad relativa sin CO₂. Se empleó el medio comercial L-15 suplementado con 10 % de solución de caldo triptosa fosfato (TPB). La forma de pase también fue mecánica con policía de goma. Los medios de ambas líneas se suplementaron con 10 % de suero fetal bovino (SFBI) inactivado a 56 °C durante 30 min.

Virus

Se emplearon cepas de referencia de la Organización Mundial de la Salud (OMS): virus dengue serotipo 1 (DEN1 WP74 Vero 3 4P C6/36 HT), virus dengue serotipo 2 (DEN2 SP 16803 4P C6/36 HT), virus dengue serotipo 3 (DEN3 CH 53489 4P C6/36 HT), virus dengue serotipo 4 (DEN4 TVP- 360 4P C6/36 HT) con un título viral similar en todos los serotipos de 10⁵ UFP/ml en diluciones de 10⁻¹ a 10⁻⁴. Posteriormente se realizó la técnica de centrifugación rápida (shell vial)^{10; 11} y la identificación viral mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI).¹²

Sueros

Para la comparación de la sublínea celular CLA-HT con la C6/36 HT de la sensibilidad para el aislamiento de los virus del dengue se utilizaron 10 muestras de sueros de individuos sospechosos de dengue en fase aguda de la enfermedad, las cuales fueron inoculadas paralelamente sobre monocapas semiconfluentes de ambas líneas celulares de 24 horas de sembradas en sus medios respectivos e incubadas con las condiciones respectivas. La positividad fue detectada por IFI al séptimo día de inoculadas.

RESULTADOS

Se obtuvo una nueva sublínea celular denominada CLA-HT cuya morfología es heterogénea, observándose un predominio de células pequeñas de crecimiento desordenado y otra subpoblación de células alargadas. La forma de pase siguió siendo mecánica como la línea CLA-1 y el split 1:3. El medio de crecimiento se mantuvo idéntico al original y la temperatura óptima quedó establecida a 33 °C. Luego de una fase de crisis (caracterizada por cambios morfológicos, enlentecimiento del crecimiento y muerte de algunas células) que se hizo severa en el subcultivo 8, la sublínea CLA-HT estabilizó su crecimiento en el subcultivo 12 bajo las condiciones descritas y fueron preparados los bancos maestro y de trabajo en los subcultivos 13 y 17 respectivamente ([figura 1](#)).

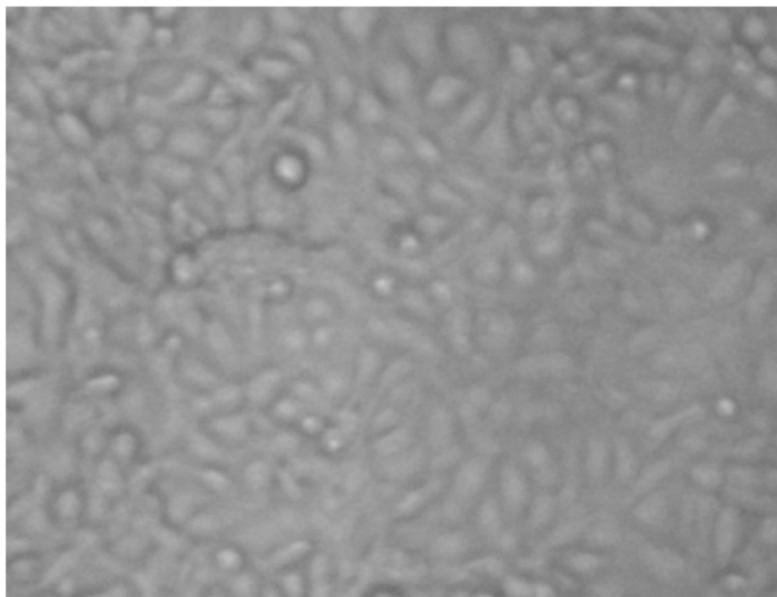


Fig. 1. Sublínea CLA-HT obtenida a partir de la línea CLA-1.

Estudio comparativo de la capacidad de la sublínea CLA-HT y C6/36 HT para la multiplicación de los virus del dengue utilizando cepas de referencia

Al inocular las sublínea celulares CLA-HT y C6/36 HT con las diluciones virales (10^{-1} - 10^{-4}) de las cepas DEN1 WP 74, DEN 2 SP 16803, DEN 3 CH 53489 y DEN 4 TVP 360; se observó, que a las 24 horas el virus fue detectado por IFI en ambas sublíneas. Los virus DEN 1, DEN 2, DEN 3 fueron detectados en la línea celular C6/36 HT en mayores diluciones: 10^{-2} para DEN 1 y 10^{-3} para los virus DEN 2 y DEN 3 (CLA-HT solo detectó la dilución 10^{-1}), mientras que para el virus DEN 4 la detección fue la misma en ambas células a las 24 horas (10^{-3}).

A las 48 horas, la sublínea CLA-HT detectó DEN 1 en la dilución 10^{-2} , DEN 2 en 10^{-1} , DEN 3 y DEN 4 en 10^{-3} . Mientras que la sublínea C6/36 HT detectó los cuatros serotipos en la dilución de 10^{-4} .

A las 72 horas, las sublínea CLA-HT detectó el virus DEN 1 en la dilución de 10^{-3} , en el caso de DEN2 en 10^{-2} , Den 3 y DEN 4 fueron detectados en la máxima dilución

(10⁴). A partir de las 96 horas ambas sublíneas se comportaron de manera similar, detectando los cuatros serotipos virales a la máxima dilución empleada.

Estudio de comportamiento de la sublíneas CLA-HT y C6/36 HT para el aislamiento de los virus del dengue a partir de muestras clínicas

Luego de siete días de inoculadas, las células fueron fijadas en las láminas, procediéndose a la detección de los virus del Dengue por la técnica de IFI utilizando un anticuerpo policlonal anti-dengue. Al mismo tiempo se utilizaron paralelamente anticuerpos monoclonales para cada uno de los serotipos DEN1 (D2-IFI-3), DEN2 (3H5-1-21), DEN3 (D6-8A1-12) y DEN 4 (I10-6-7) a una dilución de 1/10 en PBS pH 7,2.

De las muestras de sueros humanos de individuos sospechosos clínicamente de dengue en fase aguda de la enfermedad, a los 7 días de inoculadas en C6/36HT cinco fueron positivas para un 50 % por IFI, mientras en la sublínea CLA-HT fueron 4 positivas para un 40 %. (figura 2)

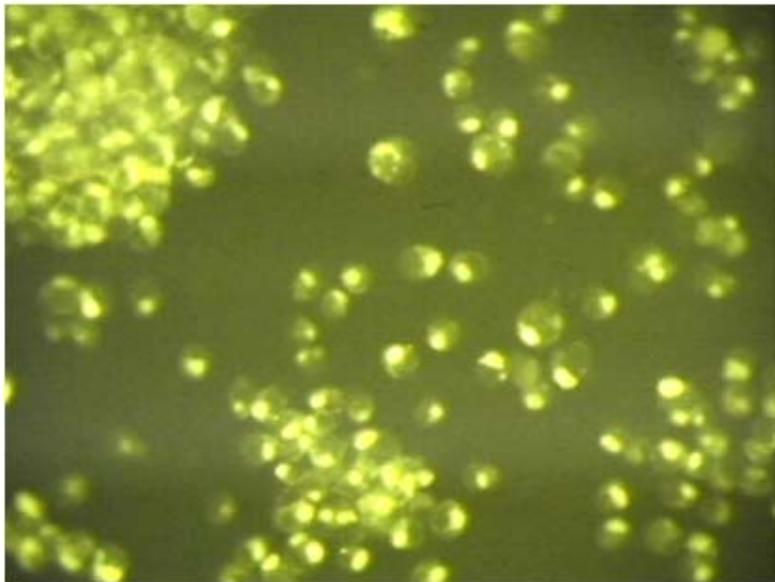


Fig. 2. Inmunofluorescencia indirecta de las sublíneas CLA-HT inoculadas con las muestras clínicas estudiadas.

DISCUSIÓN

En estudios anteriores se ha planteado la necesidad de obtener otras líneas celulares proveniente de mosquitos como sistemas alternativos para el diagnóstico de los virus del dengue, y que al mismo tiempo se determine sus propiedades respecto a las líneas utilizadas de rutina para este fin como son las líneas C6/36 y la sublínea C6/36HT.

Previamente se ha reportado que la multiplicación de los virus del dengue puede ser detectada por IFI de 24 a 48 horas post inoculación. En nuestro caso, a partir de 48 a 72 horas post inoculación, la detección de las cepas virales en ambos

sistemas celulares tiende a ser similar, lo que coincide con resultados anteriores obtenidos por nuestro grupo utilizando la C6/36 HT para la detección de los cuatro serotipos virales como sistema de comparación de las sublínea celular CLA-HT.^{13;14}

Las sublíneas celulares CLA 1 y CLA-HT se obtuvieron con el objetivo de eliminar las desventajas que presentan C6/36 y C6/36 HT, éstas necesitan de un equipo adicional en los laboratorios tradicionales: incubadora de CO₂. La sublínea CLA-HT y su parental crecen en medio L-15, el cual no utiliza el bicarbonato de sodio como tampón haciendo libre intercambio con la atmósfera.^{7;15}

La sublínea CLA-HT requiere de un mayor tiempo y concentración viral para el aislamiento y multiplicación de los virus de dengue con respecto a la sublínea C6/36 HT; sin embargo, estudios realizados por otros investigadores como Gutiérrez en el 2005, empleando 100 muestras de sueros de pacientes en fase aguda en un brote de dengue 3 obtuvo un 48,7 % de positividad al intentar el aislamiento, lo cual no está muy distante del 40 % obtenido en el presente trabajo. Por tanto, la sublínea celular CLA-HT puede emplearse como una alternativa en laboratorio sin condiciones óptimas, intentando el aislamiento viral durante grandes brotes epidémicos de dengue con alta posibilidad de encontrar casos agudos.

La búsqueda de sistemas celulares más sensibles para el aislamiento viral ha sido tema reiterado por muchos años para los virus del dengue y otros agentes.¹⁶ El dengue es una infección aguda, por tanto, el conocimiento de la cinética de los marcadores de la infección es vital para el diagnóstico. Durante los tres primeros días antes del comienzo de la fiebre y hasta 4 o 5 días después de ésta, el virus puede ser detectado en sangre;¹ así, la detección e identificación del virus por IFI en muestras clínicas de pacientes en fase aguda de la enfermedad es una técnica confirmatoria de la infección por dengue.¹⁷

En cuanto a la eficiencia del aislamiento en la sublínea celular CLA-HT, es posible que al aumentar el número de muestras aumente también la positividad y se asemeje al resultado de la sublínea celular C6/36 HT o al menos al reportado por otros autores en diferentes líneas.¹⁸

En este estudio obtuvimos una sublínea CLA-HT a partir de la línea CLA1 con la que pudimos detectar los 4 serotipos del virus del dengue aunque la eficiencia de aislamiento de ésta fue ligeramente menor que la de la sublínea C6/36HT. Estos resultados nos confirman la factibilidad del empleo de la sublínea CLA-HT como sistema alternativo para los virus del dengue, principalmente en países pobres que no cuenten con laboratorios con condiciones óptimas.

La nueva sublínea CLA-HT, por los resultados obtenidos, forma parte de la batería de sistemas celulares aplicados al diagnóstico por aislamiento del virus, el cual sigue siendo más sensible que los métodos de detección de antígenos y menos costoso, generalmente más adecuado y asequible que los métodos moleculares. Mientras que éstos últimos no se simplifiquen y estén al alcance de todos, los cultivos celulares se mantienen como un método muy útil y adecuado para el diagnóstico de enfermedades virales como el dengue.¹⁹

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pan American Health Organization. First noted appearance of dengue virus serotypes in each country of the Americas. [Sitio en Internet]. [citado 13 de junio de 2009]; Division of Disease Prevention and Control. Disponible en: http://www.paho.org/English/HCP/HCT/dengue_firstapp.xls
2. Guzmán MG, Kourí G. Dengue haemorrhagic fever integral hypothesis: confirming observations, 1987-2007. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2008;102(6):522-3.
3. Sing KRK. All culture derived from larvae of *Aedes aegyptis* (L). *Current Science.* 19, Oct. S 1967, p 506-8.
4. Sudeep AB, Parashar D, Jadi Rs, Basu A, Mokaski CH, Arankalle VA, et al. Establishment and characterization of a new *Aedes aegypti* (L) (Diptera: Lulicidae) cell line with special emphasis on virus susceptibility. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal.* 2009;45:491-5.
5. Varma MG, Pudney M, Leake CJ. Cell lines from larvae of *Aedes* (*Stegomyia*) *malayensis* Colless and *Aedes* (*S*) *pseudoscutellaris* (Theobald) and their infection with some arbovirosis. *Trans R. Soc Trop. Med. Hyg.* 1974;68:374-82.
6. Igarashi A. Isolation of a Singh's *Aedes Albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikungunya viruses. *J Gen Virol.* 1978;40:531-44.
7. Metselaar D, Grainger CR, Oei KG, Reynolds DG, Pudney M, Leake CJ, et al. An outbreak of type 2 dengue fever in the Seychelles, probable transmitted by *Aedes albopictus* (Skuse). *Bull World Health Organ.* 1980;58(6):937-43.
8. Morier L, Castillo A, Rodríguez R, Guzmán MG. Utilidad de la línea celular CLA-1 para el aislamiento del virus dengue. *Rev Cubana Med Trop.* 1992;47: 217-8.
9. Sing KRK. A culture derived from larvae of *Aedes aegypti* (L). *Current Science.* 19, Oct. S 1967; p506-8.
10. Caceda E, Kochel T. Application of modified Shell vial culture produces for Arbovirus detection. American Embassy Nacional Medical Research Center Detachment, Lima. Perú. *PLoS ONE*, Oct, 2002(10).
11. Ribas Antúnez M, Girón B, Monsalvez I, Morier L, Acosta G, Tejero Y, et al. Comparison of a modified shell vial culture procedure with conventional mouse inoculation for rabies virus isolation. 2013. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Rio de Janeiro; Vol. 108(2):255-256.
12. Yamagishi H. Modified method for the preparation of antigen for the indirect fluorescent antibody technique with Japanese encephalitis virus. *Kitasato arsh Exp. Med.* 1972;50(3-4):67-78.
13. Morier L, Camacho Daría E, Guzmán MG. Comportamiento biológico de 3 cepas del virus dengue 2 en líneas celulares de mosquitos. *Rev. Cubana Med. Trop.* 2000;52(3):215-9
14. Rodríguez-Roche R, López Matilla L, Alvarez Vera M, Morier Díaz L, Guzmán Tirado MG. Propiedades biológicas de cepas de virus dengue serotipo 2 aisladas durante la epidemia en Santiago de Cuba, 1997. *Rev Cubana Med Trop.* [Internet].

2011 Dic [citado 2014 Abr 14]; 63(3): 211-2190. Disponible en:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602011000300003&lng=es.

15. Morier L, Alemán MR, Castillo A, Pérez V. Estudio preliminar de la línea celular AP-64 (*Aedes pseudoscutellans*) para la multiplicación de los virus dengue 1 y 2. Rev Cubana Med Trop. 1991; 43(3):156-61.

16. Guzmán Tirado MG. Treinta años después de la epidemia cubana de dengue hemorrágico en 1981. Rev Cubana Med Trop. [Internet]. 2012 Abr [citado 2014 Abr 14]; 64(1):5-14. Disponible en:
http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0375-07602012000100001&lng=es.

17. Guzmán MG, Vázquez S. Apuntes sobre el diagnóstico de laboratorio del virus dengue. Rev Cubana Med Trop. 2002; 54(3):180-88.

18. Camacho D, Bracho-Labadie M, Rodríguez F, Morier L, Guzmán MG, Comach G. Propiedades Biológicas de cepas de Dengue 2 aisladas de pacientes con FD y FHD. Rev. Cub Med Trop. 2009; 61(3).

19. Leland DS, Ginocchio C. Role of Cell Culture for Virus Detection in the Age of Technology. Clinical Microbiology Reviews. Jan. 2007;p.49-78.

Recibido: 2 de junio de 2014.

Aprobado: 2 de septiembre de 2014.

Lic. Luis Morier Díaz. Laboratorio de Cultivos Celulares. Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). La Habana, Cuba.
Correo electrónico: morier@ipk.sld.cu