

Aplicación de la técnica de inmunoperoxidasa para la titulación de cepas del virus Dengue 1

Alicia Aguilar¹, Nevis Amin¹, Luis Morier², Arturo Talavera¹, Ela María Pérez¹.

1 Instituto Finlay. Centro de Investigación Producción de Vacunas y Sueros. Ciudad de La Habana, Cuba.

E-mail: aaguilar@finlay.edu.cu

2 Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). Ciudad de La Habana, Cuba.

La aplicación de la técnica de inmunoperoxidasa para titular virus Dengue ha permitido eliminar algunas de las desventajas que presenta, para este mismo fin, la técnica de formación de placas en cultivos celulares, catalogada como un método fastidioso debido a los múltiples factores que influyen en la formación de las placas. En la literatura consultada se reporta la disminución del tiempo para la obtención de los resultados como la principal ventaja de la primera, pero no datos sobre su precisión. Teniendo esto en cuenta nos propusimos aplicar dicha técnica para titular virus Dengue 1. Se siguió el procedimiento descrito para realizar la inmunoperoxidasa modificando el tiempo de fijación de las células infectadas de 5, 7 y 10 días y el bloqueo con TSF-Tween 20- SAB 1% durante una hora. La dilución de trabajo para el suero humano utilizado fue de 1/500 y para el líquido ascítico hiperinmune de ratón, contra Dengue 1 fue de 1/100; para los conjugados peroxidasa anti humano y anti ratón empleados, resultaron útiles diluciones de 1/100 y 1/200 para el primero y 1/500 y 1/1000 para el segundo. Se evidenciaron los focos de infección viral, al 7° y 10° días, pero no al 5°. Los títulos virales obtenidos por dos operadores presentaron un Coeficiente de Variación < 30%. Se seleccionó el 7° día para titular el virus, lográndose reducir el tiempo requerido para obtener los resultados con la técnica de placas. No hubo diferencias significativas entre los títulos virales calculados por ambas técnicas.

Palabras claves: Dengue, inmunoperoxidasa.

Introducción

El virus Dengue es un flavivirus transmitido por artrópodos (Arbovirus) del cual existen cuatro serotipos (1, 2, 3 y 4). Las infecciones en humanos por este virus pueden ser asintomáticas o causar la Fiebre del Dengue (FD), así como la Fiebre Hemorrágica del Dengue (FHD)/ Síndrome de Choque por Dengue (SCD) e incluso la muerte de la persona infectada (1).

La técnica de inmunoperoxidasa es un método inmunoenzimático que ha permitido definir la respuesta de anticuerpos contra este virus (2), evidenciar la presencia del mismo (3) y también ha sido ampliamente utilizada para titularlo (4,5,6,7). Su aplicación para este último fin ha permitido eliminar algunas de las desventajas que presenta la técnica de formación de placas en cultivos celulares, la que ha sido catalogada como un método fastidioso debido a los múltiples factores que influyen en la formación de las placas (8, 9) y al largo tiempo requerido para la obtención de los resultados (4).

En la literatura consultada (4, 5, 6, 7) se reporta la aplicación de la técnica de inmunoperoxidasa para la titulación de cepas del virus Dengue y la disminución del tiempo de incubación que se requiere para poder

detectar el virus en el sustrato celular infectado como la principal ventaja que ofrece ésta sobre el método de placas, pero no datos sobre la precisión de la misma.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto nos propusimos ensayar en nuestro laboratorio la técnica de inmunoperoxidasa para cuantificar el virus Dengue 1 por un método más rápido y menos inestable que la técnica de placas.

Materiales y Métodos

Células

La línea celular C6/36 HT proveniente de mosquitos *Aedes albopictus* empleada para el cultivo de la cepa viral, fue multiplicada en medio Esencial Mínimo Eagle (MEM) (ICN-Flow) suplementado con 0,2 mM de aminoácidos no esenciales (Gibco), glutamina (SIGMA) (1%) y 10% de Suero Bovino Fetal (SBF) (SIGMA). El medio de mantenimiento utilizado para estas células fue el mismo pero con 2% de SBF.

La línea celular BHK 21 clono 15 de riñón de hámster se multiplicó en medio MEM (ICN- Flow) con aminoácidos no esenciales al 1%, glutamina al 1% y 10% SBF (SIGMA) y se empleó en la titulación viral.

Ambas líneas celulares fueron suministradas por el laboratorio de Cultivo de Células del Instituto Pedro Kourí (IPK).

Virus

Se empleó una cepa de Dengue 1 con historia de cinco pases en células C6/36 HT, obtenida a partir de la inoculación, en monocapas confluentes de células C6/36 HT, del pase anterior a este y posterior incubación a 34 °C.

Se realizó observación diaria de las células inoculadas hasta la aparición de los sincitios característicos que provoca el virus (tres días pos inoculación), procediéndose a realizar tres ciclos de congelación-descongelación a -70 °C, se colectó el virus y se mantuvo congelado a -70 °C hasta el momento de su procesamiento.

Titulación viral mediante la técnica de formación de placas

Como técnica de referencia para la titulación viral se empleó la formación de placas en células BHK 21 clono 15 (10). La titulación se realizó cuatro veces.

Titulación viral por detección de focos mediante la técnica de inmunoperoxidasa

A partir de monocapas confluentes de células BHK 21 clono 15, se preparó una suspensión celular de 5 X 10⁵ cel/mL en medio de crecimiento. Se realizó una mezcla volumen-volumen con la suspensión celular y el virus puro y sus diluciones en base 5 y 10, se distribuyeron 100 µL de la misma en placas de 96 pocillos con 6 réplicas por cada dilución viral; posteriormente se incubó a 37 °C y 5% de CO₂ durante cuatro horas, después de las cuales se añadió el medio que contenía carboximetilcelulosa al 1,5% y se incubó a la misma temperatura y porcentaje de CO₂ durante 5, 7 y 10 días. Al cabo de este tiempo se siguió el procedimiento descrito por Okuno (4) para el montaje de la peroxidasa. Como modificación a esta técnica se realizó el bloqueo de reacciones inespecíficas con TFS - Tween 20 (0,05%) - SBA (1%) durante una hora después de fijar las células. La técnica se realizó tres veces por dos operadores diferentes y el título viral se calculó a partir de los focos contados por cada uno de ellos.

Sueros y conjugados

Para la realización de la técnica de inmunoperoxidasa se utilizaron un suero humano positivo a Dengue 1 y Dengue 2 procedente de un individuo que sufrió FHD y cuyo título por ELISA de inhibición es 1:160, diluido 1/100, 1/200, 1/400 y 1/500 y un conjugado anti-IgG

humano marcado con peroxidasa (SAPU), en diluciones 1/100, 1/200, 1/300 y 1/500 con el objetivo de determinar la dilución de trabajo.

Con el mismo fin se utilizaron, diluciones de 1/50, 1/100 y 1/200 del líquido ascítico hiperinmune (LAH) contra Dengue 1, que mostró un título de 1/640 por la técnica de inhibición de la hemaglutinación, y de 1/250, 1/500 y 1/1000 de un conjugado anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa (SIGMA).

Procesamiento estadístico

Fue seleccionada la prueba t de Student para muestras no pareadas para determinar la existencia de diferencias en el título viral calculado por detección de focos mediante la técnica de inmunoperoxidasa con respecto a los días de incubación, lecturas de los operarios, diluciones de conjugados empleadas, y títulos calculados por la técnica de formación de placas. Se consideraron diferencias significativas para valores de $p < 0,05$.

Se calculó además el coeficiente de variación (C.V.) de los títulos virales obtenidos por ambas técnicas.

Se realizó transformación logarítmica de los datos.

Resultados y Discusión

En nuestro experimento, de las cuatro veces que se empleó la técnica de placas, sólo en dos ocasiones pudo calcularse el título viral, ya que en dos réplicas no se formaron las placas de lisis. El inverso del título viral promedio fue 2,97 ufp/mL y el C.V. de los datos transformados, entre las dos réplicas que plaquearon, fue 3,27. La no formación de las placas de lisis cuando se utiliza esta técnica para la titulación del virus Dengue ha sido reportada desde 1979 (2). Varios factores como la inestabilidad característica de este virus considerado como uno de los arbovirus más fastidiosos para el trabajo en el laboratorio (3), y ligeras variaciones en el pH del medio de cultivo durante el tiempo de adsorción del virus a las células, así como en el pH y concentraciones de iones Mg²⁺ en el medio empleado para la incubación de las células infectadas por el virus pueden influir tanto en el tamaño, como en la producción de las placas (2).

Al 5º día post inoculación se detectó la presencia viral, aproximadamente en el 100% de las células de la monocapa celular infectada por el virus puro, pero no se observaron focos en las inoculadas con las diluciones del mismo, por lo que no se cuantificó el título viral para este día.

En el 7º y 10º días pos inoculación se hizo patente la infección viral, lográndose el conteo de los focos y la

cuantificación del virus en ambos casos. En la Tabla 1 se muestran los títulos virales y los resultados del C.V. calculados por ambos operadores.

Los resultados de la comparación entre operadores arrojaron que no se obtuvieron diferencias significativas

entre los títulos virales calculados por ambos al 7° y al 10° días frente a las diluciones de los conjugados empleados, lo cual nos indica que el factor operador no influyó en el cálculo del título viral. El Coeficiente de Variación entre los títulos calculados por el Operador 1 y 2, fue menor que el 30% en todos los casos.

Tabla 1. Títulos de la cepa de Dengue 1(uff/mL) calculados por los operadores al 7° y 10° días. Se muestra el título promedio y C.V.

Dilución de Conjugados (anti)	Operador 1				Operador 2				
	7° Día Título viral (log 1/ título)	C.V. (%)	10° Día Título viral (log 1/título)	C.V. (%)	7° Día Título viral (log 1/ título)	C.V. (%)	10° Día Título viral (log 1/ título)	C.V. (%)	
humano	1:100	2,5	6,8	2,3	20,7	2	25	2,2	16,4
	1:200	2,4	9,5	2,1	17,2	1,9	20	2	13
ratón	1:500	2	20,7	2,5	17,1	1,9	18,1	2,5	7,4
	1:1000	2	30	2,6	19,5	2	22,8	2,3	26,2

Las diluciones de trabajo 1/500 para el suero humano y 1/100 para el LAH fueron las que permitieron una mejor visualización de los focos de células infectadas por el virus, el resto de las diluciones para ambos casos no resultaron útiles para este fin ya que diluciones mayores que las seleccionadas no permitieron visualizar los mismos y para las menores se observaron reacciones de fondo inespecíficas aún con la introducción del paso de bloqueo.

No hubo diferencias significativas entre los títulos virales al utilizar el suero humano o el LAH para cualquiera de las diluciones de conjugado utilizadas tanto al 7° como al 10° días. Sólo fue posible evidenciar los focos en las diluciones 1/100 y 1/200 del conjugado anti-IgG humano y 1/500 y 1/1000 del anti-IgG de ratón marcados con peroxidasa.

Al aplicar la prueba t de Student a los títulos virales calculados por cada operador para los pares analizados no se obtuvieron diferencias significativas por lo que decidimos que las diluciones analizadas de cada conjugado pueden ser utilizadas indistintamente en la realización de la técnica, aunque se sugiere la mayor dilución ya que permite un mayor aprovechamiento del conjugado.

La no existencia de diferencias significativas entre los títulos virales obtenidos por detección de focos por inmunoperoxidasa al 7° y 10° días, hizo que se seleccionara el día 7 como el adecuado para realizar la titulación viral, esta disminución en el tiempo de obtención de los resultados ha sido reportado por Okuno y col. (4) y por Després y col. (6) y Marianneau y col. (7) al utilizarla para cuantificar virus Dengue 1 en células AP 61.

Para las condiciones experimentales establecidas, se logró aplicar la técnica de inmunoperoxidasa para cuantificar la cepa analizada, obteniéndose títulos virales con un C.V. < 30% entre ellos y comparables a los calculados por la técnica de placas, no obteniéndose diferencias significativas entre ellos al aplicar la prueba t de Student.

El empleo de la inmunoperoxidasa constituyó una ventaja respecto a la técnica de placas pues se pudo reducir en tres días el tiempo que se requiere para titular el virus mediante esta última, así como evitar el gasto de recursos y tiempo que se derivan de la imposibilidad de titular cuando no se forman las placas de lisis.

Referencias

1. Rigau J, Clark G, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vorndam V. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet*. 1998; 352:971-977.
2. Soliman KA, Watts DM, Salib AW, Shehata AED, Arthur RR, Botros BAM. Application of an immunoperoxidase monolayer assay for the detection of arboviral antibodies. *J. Virol. Meth.* 1997; 65:147-151.
3. Pupo M, Alvarez M, Soto M, Rodríguez H, Rodríguez R, Díaz M, Guzmán MG. Anticuerpos monoclonales al virus dengue 4: espectro de reactividad a los 4 serotipos del dengue. *Rev Cubana Med Trop.* 2000; 52(2):119-125.
4. Okuno Y, Fukunaga T, Tadano M, Okamoto Y, Ohnishi T, Takagi M. Rapid focus reduction neutralization test of Japanese encephalitis virus in microtiter system. *Arch. Virol.* 1985; 86:129-135.
5. Churdboonchart V, Kamsattaya K, Yoksan S, Sinarachatanant P, Bhamarapravati N. An application of peroxidase-antiperoxidase (PAP) staining for detection and localization of dengue-2. I. In an endogenous peroxidase containing cell systems. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health.* 1984; 15(4):547-553.
6. Després Ph, Frenkiel MP, Deubel V. Differences between cell membrane fusion activities of two Dengue type- 1 isolates reflect modifications of viral structure. *Virology.* 1993; 196:209-219.
7. Marianneau Ph, Steffan AM, Royer C, Drouet MT, Kirn A, Deubel V. Differing infection patterns of Dengue and Yellow Fever viruses in a human Hepatoma cell line. *J. Infect. Dis.* 1998; 178:1270-1278.
8. Malewicz B, Jenkin H. Development of Dengue virus plaques under serum-free overlay medium. *J Clin Microbiol.* 1979; 9(5):609-614.
9. Gould EA. Growth, titration and purification of alphaviruses and flaviviruses. En: Mahy BWJ ed. *Virology a practical approach*. England: IRL Press; 1985:43-78.
10. Morens DM, Halstead SB, Repik PM, Ravithat P and Raybourne N. Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semi-micromethods in BHK 21. Comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization. *J. Clin. Microbiology.* 1985:250-254.

Use of the immunoperoxidase technique for the titration of a Dengue 1 virus strain

Abstract

The use of the immunoperoxidase technique for the titration of Dengue virus has eliminated some of the disadvantages of plaque assay in cell culture for titration, which is considered a fastidious method due to the number of factors involved in the plaque formation. The time reduction to obtain results, is the principal advantage of the immunoperoxidase technique reported in the literature, but nothing is said about its precision. Our purpose was to test the immunoperoxidase technique to titrate Dengue 1 virus in our laboratory. The procedure described for this technique was followed, modified by the fixation of infected cells after 5, 7, and 10 days of incubation and by blocking with TSF-Tween 20- SBA 1% during one hour. The working dilution for the positive human sera was 1/500 and for the polyclonal ascitic fluid (AF) against Dengue 1 obtained in mice, 1/100. The useful dilutions for the anti human and anti mouse peroxidase conjugates were 1/100 and 1/200 for the first and 1/500 and 1/1000 for the second. In these conditions, it was possible to evidence the characteristic foci produced by Dengue 1 virus and to quantify it on the 7th and 10th days, but not on the 5th. The Variation Coefficient was < 30%. The 7th day was chosen as optimum to titrate the virus, leading us to titration faster than by the plaque method. Significant differences were not found between the viral titres obtained by both techniques.

Keywords: Dengue, immunoperoxidase.

CENSA CENSA CENSA CENSA

Vacunas

Medios Diagnósticos

Producción de medicamentos

Teléf.: (5364) 63897

Fax: (5364) 63897

E-mail: comercial@censa.edu.cu