



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA
FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS
UNAN - LEON**



**TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE
LICENCIATURA EN BIONÁLISIS CLÍNICO
TEMA**

**SUBTIPIFICACION DEL VIRUS DENGUE SEROTIPO 1 QUE HA
CIRCULADO EN MANAGUA, NICARAGUA ENTRE LOS AÑOS 2003 –
2005 POR MEDIO DE RESTRICCIÓN DEL SITIO ESPECÍFICO
REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RSS – PCR)**

AUTOR:

Bra. MARIA JOSÉ VARGAS DÁVILA.

TUTOR:

Dr. ANGEL BALMASEDA

Responsable Área Virología CNDR - MINSA

ASESORES:

Lic. Filemon Bucardo

Lic. Orlando Mayorga

Profesores Titulares del Depto. de Microbiología UNAN – LEON

Mayo de 2006

AGRADECIMIENTOS

De una manera muy especial quiero agradecer a todas las personas que colaboraron en la realización de este estudio:

Dr. Ángel Balmaseda, por su valiosa tutoría, dedicación, su apoyo científico técnico y por haberme facilitado los recursos y el tiempo necesario para la realización de este estudio

Lic. Filemon Bucardo (amigo y maestro), por su constante dedicación a mi formación científica durante toda mi carrera universitaria y por su valioso aporte en el diseño de este trabajo.

Lic. Orlando Mayorga, quien con sus constantes enseñanzas en Metodología de la investigación contribuyo de manera fundamental en la elaboración de este trabajo.

A MIS COMPAÑEROS DEL DEPARTAMENTO DE VIROLOGIA:

Lic. Leonel Pérez y Lic. Celia Machado, quienes me facilitaron las cepas de Dengue y han hecho posible mi entrenamiento en aislamiento viral.

Lic. Yolanda Téllez, por su colaboración en la realización del RSS – PCR.

Ing. Douglas Elizondo, por su aporte en la foto documentación de este estudio.

A los licenciados Juan Carlos Matute, Juan Carlos Mercado, Yara Soborio, Luis Williams, y a Ing. Andrea Núñez, que me brindaron su apoyo moral y el entusiasmo para continuar mi trabajo



DEDICATORIA

QUIERO DEDICAR ESTE TRABAJO PRIMERAMENTE A DIOS PADRE ETERNO QUIEN ME HA CONCEDIDO LA OPORTUNIDAD DE VIVIR Y LA SABIDURIA NECESARIA PARA CULMINAR MIS ESTUDIOS UNIVERSITARIOS.

A MIS ABUELOS FRANCISCO DAVILA (Q. E. P. D.) Y JOSEFA JIRON DE DAVILA QUIENES DESDE MUY PEQUEÑA ME ENSEÑARON LA IMPORTANCIA DEL CONOCIMIENTO ***“UNA PERSONA ES LO QUE SABE Y VALE POR LO QUE LOGRA”***. (A ELLOS, GRACIAS)

A MIS PADRES QUE CON SU ENTREGA Y DEDICACION ME HAN IMPULSADO DESDE NIÑA EN EL CAMINO DE SABER Y CON SU AMOR Y ESFUERZO INCONDICIONAL HAN HECHO POSIBLE MI FORMACION COMO PROFESIONAL.

A MIS HERMANOS POR SU APOYO Y SU CONSTANTE PREOCUPACION POR LA CULMINACION DE MI CARRERA UNIVERSITARIA.



INDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS.....	4
MARCO TEÓRICO.....	5
MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
RESULTADOS	40
DISCUSION.....	44
CONCLUSIONES.....	46
RECOMENDACIONES.....	47
REFERENCIAS.....	48
ANEXOS.....	55



RESUMEN

El presente trabajo es un estudio descriptivo de corte transversal con el objetivo principal de subtipificar el serotipo 1 del DENGUE (DENV 1) que ha circulado en Managua, Nicaragua desde el año 2003 – 2005.

La subtipificación fue basada en el método de biología molecular RSS – PCR (Restricción del sitio específico PCR) que usa oligonucleótidos que reconocen los sitios de restricción de las endonucleasas en la región E del genoma viral.

Se analizaron un total de 13 cepas de DENV 1 que formaban parte del banco de cepas de referencia del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CENDR) – MINSA y que fueron recolectadas en Managua en el periodo de 2003 al 2005. Los resultados obtenidos muestran que los subtipos de DENV 1 que han circulado en Managua son el A2 y B de origen asiático, y que es muy probable que este circulando un subtipo aun no ha sido reportado en estudios previos.



INTRODUCCION

El virus del dengue consta de una cadena simple de ARN y pertenece a la familia de flavivirus; tradicionalmente se le ha clasificado en cuatro serotipos, designados DENV1, DENV 2, DENV 3, y DENV 4, basándose en características antigénicas. Numerosos métodos moleculares incluyendo RNasa T1, oligonucleótidos fingerprinting [69], secuenciación genómica [65,64], Chemical Cleavage y análisis con enzimas de restricción [70], han demostrado variaciones en la cadena genética de cada serotipo dividiéndoles en distintos subtipos genéticos. [4,5]

Cada serotipo consta de diferentes subtipos genéticos, así el DENV 1 esta formado por cuatro variantes designadas **A1** y **A2** (Patrón asiático), **B** (Patrón Tailandés) y **C** (Patrón Americano) [5]. El serotipo DENV 2 posee las variantes **A**, Cepas de caribe (1981), Jamaica (1981-1983), Puerto Rico (1984-1986) y Republica Dominicana (1986). **B**, Tailandia (1964-1985), dividido en 2 subgrupos. **C**, Contiene 3 cepas de Trinidad (1978-1982). **D**, 14 cepas de filipinas (1981-1984). **E**, Dividido en 3 patrones: Sri Lanka (1982-1985) Indonesia (1975-1985) Filipinas (1982-1985). **F**, Pacifico sur asiático (Tahiti1971-1972) Tonga (1974), y Fiji (1971) así como cepas aisladas antes de (1981) de Puerto Rico (1969-1977). **G**, Dos cepas de África de la Republica de Guinea (1981) y Senegal (1970). DENV 3 comprende los subtipos **A**, Indonesia y Filipinas (1976-1984) **B**, Tailandia (1973 - 1985) y Filipinas. **C**, Sri Lanka (1981-1985), Centro América: Nicaragua (1995-1998), Guatemala (1997), El Salvador (1998). Y DENV 4 esta divididas en A1 y A2 (Tailandia 1977- 1984, 1988) y B (México y Caribe) [5]. Técnicas de biología molecular como el RSS – PCR identifican estos subtipos usando oligonucleotidos diseñados en base al sitio de restricción de enzimas en una región del genoma viral.

En Nicaragua entre los años de 1985 a 1990 se notificaron un promedio anual de 3,838 casos de dengue y dengue hemorrágico; del 2001 al 2002 se reportaron cerca de



3,065 casos [1]. En el año 2003 los casos reportados fueron de 2797. Durante este año se dio la circulación del serotipo DENV 1, que no había circulado en el país desde hace 15 años. En el año 2004 los casos confirmados por dengue se redujeron a menos de 1000. La cantidad de casos reportados aumento considerablemente en el año 2005 reportándose 5 casos de muerte por Dengue, confirmadas por laboratorio. [55]

Los métodos de diagnóstico para dengue en el laboratorio juegan un papel fundamental en el monitoreo epidemiológico de la enfermedad ya que estos permiten establecer programas de vigilancia epidemiológica y detectar los diferentes serotipos de virus de dengue que circulan en una región determinada. [3]

Entre los principales métodos para el diagnóstico del dengue están: métodos serológicos, los métodos virológicos y métodos moleculares todos ellos completados con la evaluación clínica.

|

El movimiento de los 4 serotipos entre regiones geográficas diferentes es un elemento muy importante en la epidemiología de la enfermedad, los brotes frecuentemente son seguidos de la introducción de nuevos genotipos de serotipos en las áreas donde la inmunidad a este serotipo es baja. En la región de las Américas se han identificado virus que son genéticamente iguales a virus de otras partes del mundo. Por consiguiente, es importante supervisar la distribución y movimiento de estas cepas y determinar si uno o más de los subtipos están asociados con la enfermedad severa. [56]

La subtipificación es una herramienta poderosa para determinar la distribución geográfica y comprender la epidemiología de la enfermedad. En la fiebre por dengue y DH/SCD, en la cual no existen modelos animales apropiados, basados en la población afectada, ésta puede ser utilizada para subtipificar e identificar factores virales que se asocien a la severidad de la enfermedad. [6]



La caracterización de las diferentes cepas, usualmente requiere de una intensa labor que implica costosos procedimientos de tipificación, que son difíciles de ejecutar al mismo tiempo que dura un período epidémico. El RSS – PCR (llamado restricción del sitio específico – PCR) consiste en una sola reverso transcripción y amplificación usando cuatro cebadores que reconocen secuencias polimórficas de los sitio de restricción en la región E del virus, el producto de RT – PCR genera diferentes patrones de bandas electroforéticas para diferentes cepas.

El RSS – PCR es un método rápido y sencillo que requiere de un mínimo equipamiento de laboratorio y de pocos reactivos, lo que lo convierte en una poderosa herramienta epidemiológica para estudiar las variantes genéticas del virus Dengue 1 y su distribución global.[6]

En nuestro medio existen muy pocos datos sobre el uso del RSS – PCR como herramienta epidemiológica. Entre los más importantes podemos citar el trabajo de tipificación molecular del virus de Dengue durante la epidemia de 1998 en Nicaragua realizado por Ángel Balmaseda et al 1998 en el que se subtipificó el virus DENV 2 y DENV 3 [66]. El trabajo más reciente realizado por Harris et al 1999, que demostró la presencia de los diferentes patrones de DENV 1(A1, A2, B, C) en distintas regiones geográficas (Filipinas, Tailandia, Indonesia, México, Brasil, Aruba, Puerto Rico, Sri Lanka, Nigeria y Jamaica) y la presencia del patrón B den DENV 4 en Nicaragua que es la misma cepa que circula en México y Puerto Rico. [5] (*Ver anexo I*)

La ocurrencia de nuevas epidemias del dengue todos los años enfatiza la necesidad de un método sencillo que facilite la caracterización rápida del aislamiento viral.

En este estudio se presenta la aplicación del RSS – PCR que permite hacer un monitoreo del serotipo DENV 1 para conocer el origen del patrón (asiático, americano y/o Tailandés) que ha circulado en nuestro país desde su reaparición en año 2003 hasta el año 2005.



Al mismo tiempo esperamos que este trabajo permita hacer estudios posteriores para asociar la severidad de la enfermedad con el patrón encontrado.

OBJETIVOS

1. Determinar el patrón de los subtipos de DENV 1 que ha circulado en Managua, Nicaragua en los años 2003 –2005.
2. Comprobar la especificidad de los oligonucleotidos de restricción para cepas de DENV 1 aisladas en Managua, Nicaragua.



MARCO TEORICO

DISTRIBUCIÓN

Los primeros relatos históricos sobre el dengue, mencionan la isla de Java en 1779 y Filadelfia (E. U. A) en 1780, como los primeros lugares donde se reconocieron brotes la enfermedad. En América, los relatos sobre esta dolencia datan de más de 200 años.

Después de la Segunda Guerra Mundial, el dengue se expandió rápidamente, debido a la presencia de varios factores: el crecimiento acelerado de la población, la urbanización no planificada, la alta densidad del vector así como el incremento en el comercio y de los viajes a todas partes del mundo, que facilitó el traslado de individuos virémicos de un área a otra. [3]

El síndrome más severo del dengue, la Fiebre hemorrágica del Dengue (FHD), es fundamentalmente un fenómeno de este siglo. Fue reconocida por primera vez como un síndrome distinto en las Filipinas en 1954, a partir de entonces se ha visto un aumento marcado en la incidencia de FHD con respecto al dengue clásico en muchos países. En 1958, Tailandia reportó su primera epidemia documentada de FHD. La enfermedad se expandió más tarde a otras naciones de Asia; al menos 12 países de Asia y el Pacífico reportaron epidemias de FHD y en muchos de ellos la enfermedad ha sido un problema de salud y la causa principal de hospitalización. En las Américas, la incidencia de las infecciones por el virus del dengue se ha incrementado bruscamente a partir de 1960. [3]



En la década de 1980, la FHD comenzó una segunda expansión dentro de Asia, cuando Sri Lanka, la India y las Islas Maldivas reportaron sus primeras epidemias. Después de una ausencia de 35 años, ocurren epidemias en Taiwán y en la República Popular China en 1980. [3]

En Singapur hubo una reaparición de la FD/FHD entre los años 1990-94, después de un programa desarrollado que previno la transmisión de su agente etiológico por más de 20 años. En todos los países de Asia donde la FHD es endémica las epidemias se han agravado en los últimos 15 años. [3]

En el Pacífico, los virus del dengue fueron reintroducidos en los años 70, después de más de 25 años sin notificación de casos confirmados. La actividad epidémica causada por todos los serotipos se ha identificado como la mayor para muchas de estas islas. [3]

A pesar del bajo reporte de dengue en África, las epidemias de FD causadas por todos los serotipos se han incrementado a partir de 1980. Ha habido mucha actividad en el este africano, y se reportó una gran epidemia en Kenya (1982, DENV 2), Mozambique (1985, DENV 3), Djibouti (1991-1992, DENV 2), Somalia (1982-1983, DENV 2) y Arabia Saudita (1994, DENV 2). No se han reportado epidemias en el Norte de África y el Medio Oriente. [3]

La emergencia de la FD/FHD como un problema mayor de salud ha sido más dramático en las Américas. [3]

En un esfuerzo por prevenir la Fiebre Amarilla Urbana, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) organizó una campaña para erradicar el mosquito *Aedes aegypti* de



América Central y del Sur en los años 1959-1960 [14]. Como resultado, ocurrieron esporádicamente epidemias de dengue sólo en algunas islas del Caribe durante ese período. El programa de erradicación del mosquito fue oficialmente descontinuado en 1970. Como consecuencia esta especie de mosquito comenzó a reinfectar países en los cuales había sido erradicado. En 1999, la distribución geográfica del *Aedes aegypti* era mucho más amplia que antes del programa de erradicación. [3]

En 1970, en las Américas únicamente estaba presente el DENV 2, a pesar de que el DENV 3 tenía una distribución focal en Colombia y Puerto Rico. En 1977 se introduce el DENV 1, lo que tuvo como consecuencia una pandemia en la región durante un período de 16 años. En 1981 se introduce el DENV 4, causando igualmente epidemias, principalmente en el Caribe [15]. En 1981, una cepa de DENV 2 proveniente del Sudeste asiático provocó la primera gran epidemia de FHD en las Américas. Una cepa, también de origen asiático, se expandió rápidamente por la región y causó brotes epidémicos de FHD, 8 años después de la primera epidemia de FHD, en Venezuela, Colombia, Brasil, Guyana Francesa, Surinam y Puerto Rico. Para 1997, 18 países de América habían reportado casos confirmados de FHD, que ahora es endémica en muchos de esos países. [3]

El virus DENV 3 reapareció recientemente en las Américas, después de una ausencia de 17 años. Este serotipo fue el primero que se detectó asociado con epidemias de Dengue/FHD en Nicaragua, en 1994. Casi simultáneamente, el DENV 3 fue confirmado en Panamá y en 1995 en Costa Rica. En Nicaragua hubo un número considerable de casos asociados con la epidemia, los cuales fueron causados aparentemente por DENV 3. En Panamá y Costa Rica, los casos fueron de dengue clásico. [3]

Considerando que el serotipo DENV 3 estuvo ausente de esta región desde 1977, y que la introducción de una nueva cepa está relacionada con la ocurrencia de casos y epidemias de FHD/SCD, la situación en el área se vuelve más seria si se tiene en



cuenta que en las Américas la mayoría de la población, particularmente aquella por debajo de 17 años, es susceptible a este serotipo. Luego de hacer la caracterización genética de la cepa aislada, Guzmán y col, reportan su clasificación como perteneciente al grupo de cepas de dengue 3 aisladas en el sudeste asiático, y que se han asociado a casos de dengue hemorrágico. [3]

Ya en 1997, el dengue se había convertido en la enfermedad viral de mayor importancia transmitida por mosquitos, que afecta a humanos, con una distribución global comparable con la malaria, y se estima que 2,5 mil millones de personas viven en áreas de riesgo para la transmisión de epidemias. [3]

CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL VIRUS

En 1984, el género de los flavivirus, previamente relacionados con la familia Togaviridae, fue separado para formar la familia Flaviviridae por diferencia en la estructura de su virión, secuencia de genes y estrategia de replicación. [2]

El virus del Dengue, pertenece a uno de los 66 miembros del género flavivirus de la familia flaviviridae de los cuales 29 son clasificadas como patógenas para el hombre. [8, 9]

Existen cuatro serotipos claramente definidos (1, 2, 3, 4) basado en la prueba de neutralización por reducción del número de placas, utilizando anticuerpos obtenidos de monos infectados. Estos cuatro serotipos son antigénicamente muy semejantes entre si y la infección por un serotipo produce inmunidad de por vida para el mismo e inmunidad temporal para los otros serotipos. [10]

Shlesinger en su estudio morfológico del virus del dengue observó que los viriones son partículas esféricas, de aproximadamente 40 – 50 nm de diámetro, contiene una cubierta lipídica que presenta proyecciones en forma de botón. El núcleo central de



aproximadamente 20 nm de diámetro, es transversalmente hexagonal y contiene una nucleocápside de simetría icosaédrica. [7, 8, 20] (*Ver anexo VI*)

ORGANIZACIÓN DEL GENOMA

El genoma de RNA simple y de sentido positivo no necesita transcribirse. [7]

El extremo 5' del ARN está cubierto por una caperuza, y el extremo 3' carece de cola de poliA. En ambos extremos del genoma están presentes secuencias no codificadoras necesarias para los procesos de replicación, transcripción y traducción y a las cuales se asocia la posible estructura secundaria del genoma. El codón de iniciación se corresponde con AUG, que da inicio a un marco de lectura abierto ininterrumpido de aproximadamente 10.250 nucleótidos, en los que están codificadas 10 proteínas virales. Las proteínas estructurales se localizan hacia la porción 5' Terminal y el segmento restante abarca las proteínas no estructurales. [11]

PROTEÍNAS VIRALES

Todas las proteínas del virión se derivan de una poliproteína precursora de gran tamaño, por procesamiento proteolítico cotraduccional y postraduccional.

El virión maduro contiene 3 proteínas estructurales (*Ver anexo V*):

C: La proteína de la nucleocápside o núcleo.

M: La proteína asociada a la membrana.

E: La proteína de la envoltura.

El virus inmaduro intracelular contiene una proteína llamada PreM, precursor de la M. La **proteína C** es el primer polipéptido viral sintetizado. Es altamente básico, y esta característica se cree que influye en su interacción con el ARN. [12]



El precursor glicosilado PreM da lugar a M durante la etapa de maduración viral. Este evento parece ser crucial y Terminal para la morfogénesis del virión. El segmento Pre del amino Terminal es secretado al medio extracelular. El corte proteolítico ocurre un poco antes o coincidiendo con la liberación del virión, pues PreM y M se encuentran en viriones intracelulares y extracelulares, respectivamente. El segmento de Pre del amino Terminal es predominantemente hidrofílico, y contiene de uno a tres sitios de glicosilación y seis residuos de cisteína conservados, que participan en los puentes disulfuros intramoleculares. La proteína M, localizada en la porción carbono Terminal de la Pre M, se presenta en los viriones maduros, y contiene un ectodominio acortado (41aa), seguido por dos dominios potenciales extendidos sobre la membrana. Los anticuerpos contra Pre M pueden mediar la inmunidad protectora, quizás por neutralización de los viriones liberados que contiene proteínas Pre M no procesadas. [12,13]

La glicoproteína E constituye la proteína más grande del virión, y es el componente principal de las proyecciones de la superficie del mismo. Se ha propuesto un modelo estructural para esta proteína. Según este modelo, la proteína E consiste en 3 dominios antigénicos no superpuestos, designados A, B y C, los cuales están compuestos por al menos 16 epítopes. Los dominios funcionales están relacionados con la neutralización de los viriones, la hemaglutinación de los eritrocitos de ganso, la fusión intraendosomal a pH ácido y la unión a los receptores celulares específicos situados en la superficie celular [68]. Otro modelo antigénico de la proteína E lo constituyen 3 dominios reconocidos en la cadena polipeptídica que conforma el fragmento soluble de la proteína E, distinguidos como dominios I, II y III, en los cuales predomina la hoja plegada como estructura secundaria. [14,15]

Se plantea como característica inusual de la proteína E, que es una de sus actividades funcionales, la fusión a la membrana; esta unión está regulada por la interacción con la proteína Pre M. Se cree que la asociación de E con Pre M estabiliza ciertos epítopes sensibles a pH que están sobre la proteína E; por tanto, previenen los cambios



conformacionales que normalmente ocurren a pH ácido mediante los cuales se produce la actividad fusogénica de la proteína E [14,15] La proteína Pre M, además de su papel normal en el ensamblaje de los virus, ha sido incluida en una formulación recombinante novedosa, en la cual está generalmente coexpresada con la proteína E. Los complejos resultantes E - Pre M han mostrado ser inmunogénicos y protectores en vacunas frente al reto con varios flavivirus, incluyendo el virus de la encefalitis japonesa (VEJ), el virus de la fiebre amarilla (VFA), los virus del dengue y los virus de las encefalitis transmitidas por garrapatas (ETG), proteína E que puede ser liberada con tripsina. [16, 17, 18,19]

SE HAN IDENTIFICADO Y MAPEADO 7 PROTEÍNAS NO ESTRUCTURALES DEL ARN VIRAL.

La glicoproteína **NS1** presenta un mosaico de determinantes antigénicos específicos de serotipo y también algunos de reactividad cruzada, de complejo y de grupo. Se cree que intervenga en el ensamblaje del virión. Esta proteína existe asociada a la célula, en su superficie o en formas no víricas extracelulares. Se ha observado protección, al ocurrir lisis mediada por anticuerpos, de células infectadas con el virus que expresan la proteína NS1 en la superficie celular. [20]

La proteína **NS2** está constituida por 2 proteínas, la NS2A y la NS2B. La primera interviene en el procesamiento proteolítico. A pesar de la importancia de los complejos E - PreM en la biología y el estudio de las vacunas contra los flavivirus, su estructura y biosíntesis permanecen aún poco conocidas, sobre todo en relación a la infección por los virus del dengue. En 1999, Wang y colaboradores demostraron una rápida inter asociación de estas proteínas, cuyos complejos progresaron de simples heterómeros a estructuras multiméricas, las cuales se ensamblan intracelularmente formando subunidades E - PreM dentro de una estructura enrejada encontrada en las partículas virales. El tratamiento de estas unidades con tripsina liberó un fragmento de 45 kda de la proteína E, que impidió la actividad de unión a la célula. Los resultados de estos investigadores sugieren que las interacciones E - PreM en las partículas virales están



en gran parte mediadas por los dominios en el anclaje del carboxi-Terminal de E, mientras que la actividad de unión a la célula es prevenida por un ectodominio de la NS1 y la segunda es capaz de mediar la ruptura proteolítica del precursor E – PreM - C. [21, 22]

La proteína **NS3** se sugiere que sea una proteasa viral activa en el procesamiento postraducciona de la poliproteína, o un componente de la polimerasa viral de ARN o una proteína con ambas actividades enzimáticas. Esta proteasa específica de serina procesa el precursor de poliproteína en proteínas maduras, junto con la peptidasa señal del hospedero, y requiere de NS2B como cofactor. [23]

Recientemente se ha descrito su estructura cristalina, la cual, combinada con los sustratos peptídicos de su sitio activo, ha sugerido que residuos están involucrados en el reconocimiento del sustrato, así como la base estructural para explicar los efectos de mutaciones sobre la actividad enzimática, lo cual es útil para el desarrollo de inhibidores específicos como terapéutica contra el dengue y otras proteasas de los flavivirus. [23]

La proteína **NS4** se deriva de dos proteínas: NS4a y NS4b. Se piensa que estas unidades sean cofactores del complejo enzimático de replicación del ARN. [13]

La proteína **NS5** se piensa que es la polimerasa viral de ARN dependiente de ARN. [13]

La composición lipídica del virus es poco conocida, refleja la composición de las membranas de la célula hospedera, a través de las cuales ocurre la gemación y que probablemente sean membranas intracelulares del retículo endoplasmático. Los lípidos totales constituyen 7 % del peso seco del virión; de ellos 90% son fosfolípidos, 7% esfingomielina, y el resto colesterol y lípidos neutros. [24]



FUSION Y PENETRACION DEL VIRUS EN LA CELULA

El virus se ancla a las células susceptibles por dos mecanismos: En el primer caso, el complejo virus – AC (no neutralizantes tipo IgG) se une al receptor Fc de los macrófagos y monocitos; el otro mecanismo de unión a los monocitos ocurre por la vía de un receptor viral sensible a la tripsina. [25]

La penetración a la célula huésped se puede hacer por dos mecanismos: La envoltura viral se puede fusionar con la membrana celular, con la deposición inmediata de la nucleocápside dentro del citoplasma. El otro mecanismo consiste en que la membrana plasmática se invagina y forma endosomas alrededor del virus todavía envuelto. [25]

Independientemente del tipo de interacción virus-célula, ocurre la internalización de los mismos, formándose el endosoma, y es en ese compartimiento ácido donde probablemente se desencadena la fusión entre la envoltura viral y la membrana celular, liberándose la nucleocápside en el citoplasma. El virus también puede unirse a la célula a través de un receptor específico para la proteína E, del cual se desconoce su composición y estructura; sólo se sabe que es sensible a la tripsina.

FORMACION DE LOS VIRIONES

Los flavivirus contienen una cadena de ARN sentido positivo que codifica aproximadamente ocho proteínas, esta molécula de ARN contiene dos cadenas de comienzo AUG sin ser procesadas, el ARN viral es usado como ARNm del cual una poliproteína (poliproteína I) es traducida al iniciarse la síntesis de AUG – 1, el codón de comienzo más cercano a la terminación 5'. [25]



La poliproteína I es procesada para producir las proteínas necesarias para la replicación del ARN, tanto proteínas estructurales como no estructurales. Estas proteínas de replicación son utilizadas para la síntesis de una cadena de sentido Negativo del ARN viral. [23]

ESTA CADENA DE SENTIDO NEGATIVO TIENE DOS FUNCIONES:

1. Sirve como templado (molde) para la síntesis de más cadenas de sentido positivo.
2. Sirve como templado (molde) para la formación de una molécula corta de ARN mensajero (ARN m II), el cual contiene el AUG – 2 de cadena de comienzo pero no el codón AUG – 1.

A través de una de las proteínas procesadas de la poliproteína I es posible la producción de ARNmII. [26]

Hasta el momento no se conoce el mecanismo en el cual el ARNmII es procesado en una cadena de sentido positivo intacta de ARNI o si la síntesis de este fragmento es iniciado a un sitio especial interno de replicación.

El ARNmII es traducido para producir la poliproteína II la cual es procesada para producir la proteína C, PE2 y E1.

La proteína PE2 es procesada para generar E2 y E3. Las proteínas C, E, E2 y E3 se ensamblan para formar la cápside, dentro de la cual el ARN es empaquetado.

Una copia de ARN viral es usada inicialmente para hacer las proteínas catalíticas necesarias en pequeñas concentraciones y la síntesis de las proteínas estructurales del ARNmII es retrasada hasta que la formación de las proteínas estructurales es



necesaria. Las proteínas estructurales son hechas en mayor cantidad porque existen muchas moléculas de ARNmII. [26]

Similar a otros virus envueltos, la fusión de la envoltura del virus con las membranas de la célula parece ser dependiente del pH. Las condiciones ácidas activan la fusión de la proteína E tras sufrir ésta determinados cambios conformacionales, lo cual permite la penetración de la nucleocápside al citoplasma. El tratamiento de las células infectadas con bases débiles inhibe la replicación de los flavivirus en ciertas células y causa la acumulación de viriones en el endosoma.

Después de penetrar al citoplasma ocurre la liberación del ARN, la traducción de las proteínas virales y la síntesis de las nuevas cadenas de ARN que dan origen a las partículas de la progenie viral.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD

La enfermedad varía clínicamente desde una forma benigna, inaparente, de fiebre indiferenciada y autolimitante denominada Dengue Clásico o Fiebre del Dengue hasta formas más severas conocidas como Fiebre Hemorrágica por Dengue y Síndrome de Choque por Dengue. Estas formas clínicas pueden ser producidas por cualquiera de los cuatro serotipos del virus dengue. [27]

La FD se presenta generalmente en niños, jóvenes y adultos. Sin embargo, las características clínicas pueden variar con la edad del paciente. En lactantes y pre-escolares se presentan generalmente una forma indiferenciada, en niños y jóvenes se presentan manifestaciones ligeras y en adultos el cuadro clínico es más acentuado. Luego de la picadura del mosquito y la introducción del virus en la piel del hospedero,



sigue un periodo de incubación viral inaparente que puede variar entre 2 a 7 días. Al cabo de este tiempo la enfermedad comienza a manifestarse abruptamente con fiebre, cefalea y malestar general. Estas manifestaciones pueden pasar desapercibidas o estar acompañada por dolor retro orbital, congestión conjuntival, dolor lumbo - sacro, dolores musculares o articulares, rubor facial, erupción generalizada tipo escarlatiforme, náuseas, vómitos o linfadenopatias. Esta etapa dura entre 3 a 7 días y clínicamente podría ser confundida con influenza, rubéola o malaria; pero a diferencia de éstas, usualmente el cuadro por Dengue es benigno y auto limitante, aunque su convalecencia puede producir gran debilitamiento físico, anorexia, prolongarse por varias semanas y causar depresión, especialmente en adultos. A final del periodo febril pueden presentarse manifestaciones hemorrágicas como epistaxis y petequias. En casos más raros pueden existir hemorragias mayores como hematemesis, vómito de sangre o hematurias. Estas características clínicas asociadas con FD incluyen neutropenia, seguida de linfocitosis. Las enzimas hepáticas, como la alamina- y aspartato-aminotransferasa podrían elevarse en el suero de estos individuos. [27, 28]

La trombocitopenia también es común entre estos pacientes (Martínez, 1998; Gubler, 1998). La FHD y el SCD, son más frecuentes en niños menores de 15 años; pero, también pueden presentarse en adultos. En estos casos el periodo de incubación es más rápido entre 4 a 5 días, el periodo febril dura entre 2 a 7 días y está acompañado de signos y síntomas no específicos. En esta etapa es difícil diferenciar FHD de otras infecciones virales u otra causa. En niños con síntomas respiratorios altos variables se ha considerado que pueden ser debidas a infecciones concurrentes. Sin embargo, el periodo crítico de FHD ocurre cuando la fiebre disminuye y la temperatura se hace subnormal, y empiezan a manifestarse alteraciones en la circulación, linfadenopatía generalizada, hiperestesia cutánea y sensación del gusto alterado (metálico).

Los glóbulos blancos disminuyen, hay granulocitopenía absoluta y trombocitopenia. Un conteo de plaquetas menores a $100,000/\text{mm}^3$ es usualmente encontrado entre el tercer y octavo día de enfermedad. La hemoconcentración, que se manifiesta por una elevación del hematocrito, indica pérdida de plasma y es típico de pacientes con FHD.



pero es más severo en pacientes con SCD. A partir de este momento, la prueba del torniquete puede resultar positiva, apareciendo o empeorando las manifestaciones hemorrágicas que pueden llevar a la muerte del enfermo por choque hipovolémico. Las hemorragias por venipuntura y petequias en piel son las más frecuentes; pero, otras formas de hemorragia como sangrado intestinal y menorragia, pueden estar presentes.

El SCD, es la forma más severa de la enfermedad, se caracteriza por postración e irritabilidad, choque con extremidades frías por insuficiencia vascular periférica, hipotensión creciente hasta hacerse imperceptible, taquicardia, respiración rápida, pulso rápido y débil. La OMS ha propuesto criterios clínicos y de laboratorio importantes para la clasificación de esta enfermedad de acuerdo con los estudios clínicos y epidemiológicos de casos de FHD / SCD en niños del sudeste Asiático. Sin embargo, no pueden ser aplicables a todos los casos en las distintas regiones del mundo. [27,28]

RESPUESTA INMUNOLÓGICA Y PATOGÉNESIS DEL DENGUE

Los mecanismos precisos que permiten la recuperación de un individuo con infección por virus dengue y / o el consecuente desarrollo de FHD / SCD no se conocen con exactitud. Sin embargo, al igual como ocurre con otras infecciones virales, la patogénesis del dengue puede estar relacionada con ciertos factores, como la virulencia del virus, la edad y el estado nutricional, genético e inmunológico del hospedero, y la presencia de otras infecciones recurrentes y concomitantes. [29]

Respecto a la virulencia, Rosen en 1977 estableció que las variaciones genéticas del virus Dengue, con cambios en el genotipo y la virulencia de la cepa, estaban asociadas con epidemias y mayor severidad de la enfermedad en ciertas regiones geográficas; posiblemente debido a la introducción de genotipos más agresivos del virus procedentes de regiones endémicas hacia ecosistemas donde la enfermedad no



ocurría antes, dando como resultado epidemias con mayor número de casos de FHD y el subsiguiente establecimiento de estas cepas en dichas áreas geográficas. [30, 31]

Halstead en 1970, observó que individuos con infecciones secundarias o lactantes con presencia de anticuerpos maternos circulantes eran más propensos a desarrollar cuadros de FHD / SCD y estableció que infecciones sucesivas por diferentes serotipos de virus dengue están asociados con estas formas severas de la enfermedad. Según esta teoría, inmunoglobulinas específicas del tipo IgG en cantidades subneutralizantes no protegen frente a un segundo serotipo distinto al de la primera infección, y por el contrario al reaccionar con el segundo serotipo forman complejos virus-anticuerpo que facilitan la entrada del virus a célula del linaje fagocito mononuclear a través de la unión del fragmento Fc de la inmunoglobulina y el FcR de la célula diana. [32]

Para que ocurra este mecanismo, conocido como ADA, debe existir:

- 1- Anticuerpos de reactividad cruzada subneutralizantes, producidos durante la primera infección que se unen a otra cepa durante la segunda infección.
- 2- Los complejos neutralizados de virus infeccioso-anticuerpos deben unirse a FcR del macrófago (Halstead, 1988).

La línea celular monocito / macrófago constituyen las células dianas para la infección por virus Dengue [33]. En infecciones primarias, el virus se fusiona y penetra en los monocitos y macrófagos a través de receptores específicos en la superficie de estas células. Mientras que en infecciones secundarias, el virus unido a anticuerpos subneutralizantes penetran indirectamente a la célula diana a través de FcR presentes en la superficie celular. Frente a esta agresión, el individuo responde inicialmente con una respuesta inmunológica inespecífica hacia el virus. Se ha encontrado, que células Asesinas Naturales (NK, Natural Killer) presentes en poblaciones de células mononucleares de sangre periférica de individuos infectados con virus Dengue, lisan mayor número de células infectadas que células no infectadas.



En infecciones secundarias, la presencia de anticuerpos anti-Dengue aumenta la lisis celular por células NK a través del mecanismo conocido como Citotoxicidad Celular dependiente de Anticuerpos. Monocitos infectados con virus Dengue o linfocitos nativos DR+ que entran en contacto con estos monocitos infectados, son capaces de producir títulos altos de Interferón alfa (IFN- α .) Y a través de este mecanismo, ésta citocina puede conferir protección a otros monocitos y células no infectadas.

Otras citocinas, como Interleucina 1 (IL-1) y Factor de Necrosis Tumoral (TNF) son también producidas por monocitos y macrófagos infectados o expuestos a proteínas del virus Dengue. Estos mecanismos sugieren que células de respuesta inespecífica como NK y la liberación de ciertas citocinas pueden desempeñar un rol importante en el control de la infección primaria por virus Dengue. [34]

La respuesta celular específica frente al virus Dengue se inicia con la activación de LT CD4+ durante la viremia y posteriormente con la activación de LT CD8+. En individuos con FHD por infecciones secundarias, se ha demostrado la presencia de LT CD4+/CD8+ de memoria y LT CD4+/CD8+ citotóxicos (Berríos, 1996; Gagnon et al, 1999; Zivny et al, 1995a, 1995b). Estos linfocitos pueden presentar un patrón de respuesta serotipo - específica o de reactividad cruzada para los 4 serotipos de virus dengue, e incluso para otros flavivirus como virus de la Fiebre Amarilla. Sin embargo, la inducción de LT de reactividad cruzada puede ser diferente entre los individuos que padecen Dengue, debido a las características genéticas de cada persona.

Al igual como ocurre en otras infecciones virales, se ha observado que LTC CD4+ y LTC CD8+ activados por el virus pueden lisar células autólogas monocíticas infectadas con virus dengue. Esta actividad está restringida a diferentes moléculas de histocompatibilidad, moléculas de histocompatibilidad HLA clase II para LTC CD4+ y HLA clase I para LTC CD8+. Estos mecanismos sugieren la importancia de la



presentación del antígeno viral por células monocíticas activadas y la activación de clonas específica de linfocitos T durante la infección por virus dengue. La presencia de LT CD4+ y LT CD8+ de memoria y de reactividad cruzada después de una infección primaria, sustentan la posibilidad de ser activados durante una infección secundaria por un virus de serotipo heterólogo (Mathew et al, 1998). Los LT activados pueden producir citocinas como IFN γ e IL-2 y otros mediadores pro inflamatorio, y podrían regular la liberación de otros mediadores vaso activos involucrados con la severidad de la enfermedad.

La reactividad cruzada de LT para el serotipo puede estar dirigida contra proteínas estructurales (C, PreM, E) y no estructurales (NS1, NS2, NS3, NS4) del genoma viral, las cuales son relativamente homologas entre los distintos serotipos. Algunas proteínas no estructurales como NS1, NS2 y NS3 parecen tener cierta homología estructural con factores de coagulación, plaquetas, integrinas y adhesinas de células endoteliales humanas, permitiendo la activación de clonas LT auto reactivas que participan en la patología del Dengue (Leitmeyer et al, 1999, Marloff et al, 1991; Falconar, 1997; Wang et al, 1995). Además, la activación de Linfocitos de reactividad cruzada o serotipo - específicos pueden llevar a la consecuente formación de anticuerpos de reactividad cruzada, inespecíficos y auto reactivos involucrados con la severidad de la enfermedad, tal como se ha señalado anteriormente al hablar de la respuesta humoral. Kurane y Ennis, han sugerido que la activación de LT de memoria específicos o con reactividad cruzada durante infecciones secundarias pueden jugar un rol crítico en el control de la fase aguda de FD o en el desarrollo de FHD / SCD, ya sea través de la citólisis directa o iniciando la liberación de citocinas y otros mediadores pro inflamatorios que posteriormente pueden llevar a permeabilidad vascular con salida de plasma, disfunción de células del endotelio vascular, problemas de coagulación, hipovolémia y choque.(Kurane y Ennis, 1992; Falconar, 1997; Kurane et al, 1990). No existe un modelo animal apropiado para estudiar la patología del dengue descrita en humanos. Sin embargo, estudios en ratones, estudios clínicos en humanos y ensayos in Vitro, han demostrado la presencia de varias citocinas y otros mediadores pro inflamatorio



que bajo ciertas concentraciones pueden estar involucrados con el control o la exacerbación de la infección por virus dengue.

Las citocinas, como IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL7, IL-8, IFN α , IFN β y IFN γ que participan en la patogénesis del dengue (Kurane y Ennis, 1986,1989 y 1994; Chaturvedi et al 1992,1999, 2000; Berríos et al, 1996) producidos por los LT pueden incrementar la expresión de receptores gamma Fc en la membrana de la célula diana y por lo tanto puede aumentar la infección viral de células monocíticas en presencia de anticuerpos anti-virus dengue a través del mecanismo de ADA (Kontny et al, 1988; Halstead, 1988). Por otro lado, se ha identificado la presencia de una citocina única denominada factor citotóxico (CF) que esta asociada con las formas severas FHD y SCD, la cual puede ser producida en altas concentraciones por células infectadas de ratón y de humanos, y está presente en altas concentraciones en el suero de pacientes con FHD (Khanna y Chaturvedi, 1992; Khanna et al, 1990; Khanna et al, 1989; Shaio et al, 1995; Agarwal et al, 1998). Esta citocina puede ser liberada por LT CD4+ CD8- activados o por macrófagos infectados con virus dengue, denominándose CF1 o CF2 respectivamente (Khare et al, 2003). El FC puede producir la muerte de macrófagos infectados, macrófagos activados, LT CD4+ y mastocitos, mediante un mecanismo apoptótico asociado con el incremento de Ca $^{++}$ y NO intracelulares, pero este mecanismo no afecta a linfocitos B (Mukherjee et al, 1996; Misra et al 1996). Este mecanismo de muerte puede contribuir con la disminución selectiva de poblaciones celulares y la liberación de mediadores pro inflamatoria observados en pacientes con FHD. [35]

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DEL VIRUS DENGUE

En la actualidad el diagnóstico del dengue esta dirigido principalmente a la vigilancia epidemiológica y es una necesidad urgente el contar con métodos que permitan un diagnóstico temprano de la enfermedad y en consecuencia, la toma de medidas terapéuticas adecuadas para el tratamiento y control del paciente. Su utilidad principal actualmente radica en la detección de la circulación de alguno de los serotipos en un



área geográfica determinada, caracterización de las cepas circulantes, estimación de la incidencia de la enfermedad una vez controladas las epidemias, confirmación de los casos de FHD y diagnóstico diferencial con otras entidades. Se necesitan métodos sensibles, específicos, rápidos, tempranos y baratos, que permitan por una parte el diagnóstico etiológico en el paciente y por otra parte brindar un pronóstico de la enfermedad. [35]

MUESTRAS UTILIZADAS EN EL DIAGNÓSTICO.

Una vez que el individuo es picado por un mosquito infectado con cualquiera de los 4 serotipos, se produce un periodo de incubación intrínseca alrededor de 7 - 10 días de duración, durante el cual ocurre la replicación viral, que es máxima de 2 – 3 días antes del comienzo de los síntomas y desaparece hacia el 5to – 6to día de la enfermedad. Para la detección del agente se recomienda la toma de muestra de sangre durante el período febril y sobre todo antes del 5to día de comienzo de la enfermedad. [37, 38]

El suero o plasma debe de ser procesado casi inmediatamente o en su defecto almacenado a – 70° C. En los fallecidos deben obtenerse muestras de tejidos (hígado, bazo, nódulos linfáticos, sangre del ventrículo) lo antes posible, las que deben ser enviadas al laboratorio en condiciones de esterilidad donde serán homogenizadas y procesadas o almacenadas a - 70° C hasta su posterior procesamiento. Las muestras de tejidos fijadas en formalina y embebidas en parafina pueden ser utilizadas para la detección de antígenos, con la utilización de métodos inmunohistoquímicos o la detección del genoma viral mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las muestras que se envían para aislamiento del genoma viral deben de ser transportadas a 4° C. [39, 40, 41]

Para el diagnóstico serológico se recomienda la toma de muestra de suero después de 5to día de comienzo de los síntomas, para la determinación de anticuerpos IgM. El



estudio de muestras pareadas de suero (tomadas en los 7 días de comienzo de los síntomas y de 14 a 21 días después) permite determinar el incremento en el título o la seroconversión de anticuerpos IgG.

Varios autores han demostrado la utilidad de las muestras de sangre seca sobre papel filtro tanto para la detección de anticuerpos IgM como IgG [42, 43] Este método se recomienda en estudios serológicos masivos, en la vigilancia serológica y en el estudio de muestras en niños pequeños. Recién se ha demostrado la utilidad de la saliva para la detección de anticuerpos IgM e IgG a dengue, se han observado niveles relativamente comparables a los observados en el suero de los pacientes, además se ha demostrado la utilidad de la detección de anticuerpos IgA para el diagnóstico de infección reciente. [44, 45]

AISLAMIENTO VIRAL

Los dos métodos tradicionales del aislamiento del virus del dengue son la inoculación de ratones recién nacidos y de cultivos celulares. Estos agentes pueden infectar a los ratones por diferentes vías, pero la más sensible es la intracerebral (ic), especialmente en animales de 1 a 2 días de nacidos en los que la infección produce parálisis y otros signos de afectación del sistema nervioso central. Hoy día es considerado el método menos sensible para el aislamiento viral. En general se recomienda inocular por vía ic, 0.02 mL del suero problema. Los animales deben ser observados al menos 21 días. La utilización de otras vías de inoculación, como la subcutánea e intraperitoneal junto a la ic y de 1 o 2 pases ciegos en el mismo sistema, incrementan las posibilidades de aislamiento viral.

Aislamiento en cultivos celulares y mosquitos: la aplicación de los cultivos celulares en el aislamiento del virus dengue ha tenido como consecuencia un incremento en la sensibilidad del aislamiento, aunque hasta el presente no existe un sistema de células de mamífero o mosquito que sea capaz de inducir la producción de efecto citopático



(EPC) de todas las cepas del virus. La línea celular LLCMK2 (riñón de mono) es la más sensible entre las líneas de células de mamífero, aunque esta sensibilidad varía en dependencia del serotipo y de las cepas virales. Otras líneas de células de mamíferos como las Vero (riñón de mono) y BHK21 (riñón de hámster) también han sido utilizadas con algún éxito en el pasado. En general todas requieren de un periodo de adaptación hasta lograr títulos virales aceptables. [40, 41]

La demostración por Singh y Paul 1969 de que los 4 serotipos podían ser multiplicados en una línea celular obtenida a partir de larvas de mosquitos *Aedes albopictus*, representó un paso de avance en el aislamiento de estos agentes. A partir de este hallazgo, otras líneas celulares de mosquitos se han desarrollado como la AP61 (*Aedes pseudoscutellaris*), Tra – 284 (*Toxorynchites amboinensis*), C636 (*Aedes albopictus*). Estas líneas celulares han dado lugar a diferentes clones como AP64 y CLA – 1 (clonos de la línea celular AP61) y la C636 HT (clono de la C636 adaptada a crecer a 33° C) que muestran diferentes grados de susceptibilidad al dengue. [46, 47]

Las células de mosquitos son más sensibles que las de mamífero, relativamente fáciles de cultivar en condiciones de laboratorio e incluso a temperatura ambiente y pueden mantenerse 14 días sin cambio de medio. Pueden a su vez ser utilizadas en condiciones de campo y ser inoculadas directo con el suero de pacientes.

Aunque cepas de los 4 serotipos son capaces de inducir la formación de efecto citopático (ECP), como formación de sincitios, presencia de células gigantes multinucleadas y fagocitosis, su presencia en general es variable. Actualmente, las células de línea de mosquitos son más sensibles y las más utilizadas en el diagnóstico de rutina del dengue. [40, 41,48]

La inoculación de mosquitos es la técnica de mayor sensibilidad y el método de elección para el aislamiento del dengue en muestras de importancia, en especial en



muestras de fallecidos. El *Aedes albopictus* y *Toxorhynchites amboinensis* han demostrado ser de gran utilidad en el aislamiento de estos agentes. La inoculación de mosquitos *Aedes albopictus* es de mayor sensibilidad para la detección del dengue que las células LLCMK2. La utilización de larvas de *Toxorhynchites amboinensis* es el método de aislamiento más rápido y sensible. A pesar de la elevada sensibilidad de los mosquitos como sistema de aislamiento, la inoculación de los cultivos celulares de mosquitos es el método más utilizado en el diagnóstico de rutina del dengue, por su adecuada sensibilidad y la posibilidad de procesar un elevado número de muestras a relativamente bajo costo. La inoculación de mosquitos requiere de facilidades especiales para el establecimiento de las colonias, así como de cierto grado de entrenamiento técnico. [40, 41]

IDENTIFICACIÓN VIRAL

El desarrollo de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales específicos de serotipo ha posibilitado el desarrollo de un método rápido, simple y económico para la identificación de los virus del dengue con la utilización de la técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI), independientemente del sistema biológico utilizado para el aislamiento viral. Henchal y otros, han desarrollado anticuerpo monoclonales específicos de grupo (flavivirus), complejo (dengue), subcomplejo y tipo. Estas cuatro clases de monoclonales, de diferente especificidad, han sido capaces de identificar aislamientos procedentes de diferentes áreas geográficas, tanto por IFI como por la técnica de neutralización por reducción de placas. [49]

En general, el principal problema asociado con la identificación de los virus del dengue en los cultivos celulares con la utilización de anticuerpos monoclonales es la pobre replicación del virus, que resulta en una baja concentración viral en ocasiones. Por tal razón, la identificación en la siembra primaria es en algunos casos imposible, por lo que



se necesitan 1 ó 2 pases en el mismo sistema celular con el objetivo de incrementar la concentración viral.

Para el diagnóstico de rutina se recomienda la inoculación de muestras de suero diluida 1/30 e inoculadas en volúmenes de 0.1 ml en monocapas de células C636/ HT sembradas en tubo. Después de 30 minutos de absorción a 33° C se añade el medio celular de mantenimiento. Las células son observadas diariamente y al día 7 se realiza la cosecha y después la IFI. La utilización de un anticuerpo policlonal (líquido ascítico hiperinmune de ratón o un suero humano de alto título de anticuerpos a dengue) permite realizar un pesquisaje inicial para detectar las muestras positivas. Una segunda inmunofluorescencia, con la utilización de anticuerpos monoclonales a cada uno de los 4 serotipos del virus, permite la tipificación del serotipo. Estudios recientes recomiendan la centrifugación durante 30 minutos a 1500 – 2000 rpm de la muestra, una vez inoculada sobre la monocapa celular, lo que incrementa la rapidez y la frecuencia del aislamiento viral. [50]

DIAGNOSTICO SEROLÓGICO

En el dengue se observan principalmente 2 tipos de respuesta serológica: primaria y secundaria. La primaria se presenta en aquellos individuos que no son inmunes a flavivirus. La respuesta secundaria se observa en aquellos individuos con una infección aguda por dengue, los que han padecido previamente una infección por flavivirus. La inmunidad de un serotipo se considera de larga duración y efectiva frente a una segunda infección por el mismo serotipo. La existencia de 4 serotipos virales posibilita que se produzcan incluso infecciones terciarias y cuaternarias. [38]

En los individuos que sufren su primoinfección, los anticuerpos IgG antidengue comienzan a incrementarse lentamente a partir de 5to – 6to día de comienzo de los síntomas, los cuales son máximos hacia los 15 - 21 días. Después declinan y



permanecen detectables poco más o menos durante toda la vida. En el transcurso de una infección secundaria, los anticuerpos IgG se elevan casi al mismo tiempo del comienzo de los síntomas; permanecen elevados durante varias semanas y luego van declinando. Esta elevación significativa permite el diagnóstico presuntivo en monosueros tomados durante la fase aguda de la enfermedad. [37, 39,51]

Los anticuerpos IgM antidengue que se producen en respuesta a la infección se desarrollan rápidamente hacia el 5to día de la enfermedad la mayoría de los individuos presentan cantidades detectables. En general, estos anticuerpos IgM declinan hacia niveles no detectables entre los 30 – 90 días del comienzo de los síntomas. Se ha observado que un pequeño número de individuos que sufren una infección secundaria por dengue, pueden no presentar niveles de anticuerpos IgM. La concentración, especificidad y duración de los anticuerpos IgM antidengue es variable y depende en gran medida del individuo. [41]

El diagnóstico serológico del dengue es complicado, por causa de los determinantes antigénicos de reactividad cruzada compartidos entre los 4 serotipos y los flavivirus en general. Por otra parte, considerando su presencia y los elevados niveles de anticuerpos observados en los individuos que desarrollan una infección secundaria, el estudio de los monosueros tomados en la fase aguda o en la convaleciente temprana puede ser de utilidad como criterio de caso probable o presuntivo de dengue.

Los virus de dengue son capaces de aglutinar los glóbulos rojos de ganso; esto ha permitido que la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación (IH) sea aplicada en el estudio serológico de monosueros y pares de sueros, con la utilización de antígenos de los 4 serotipos producidos en cerebro de ratón lactante y extraídos mediante el método de sacarosa acetona. Un incremento de 4 veces o más en el título de anticuerpos en un par de sueros es criterio diagnóstico para una infección reciente por flavivirus, por otra parte títulos de anticuerpos IH 1/2560 es el criterio mas ampliamente



utilizado para clasificar un caso como secundario. Por ultimo, títulos elevados (1/1280) en monosueros es criterio de infección probable por dengue. [39]

Dependiendo de la situación epidemiológica en diferentes áreas geográficas, los criterios pueden variar. Kouri y otros demostraron que al menos en las condiciones epidemiológicas de Cuba, en el año 1981, títulos de anticuerpos IH 1/1280 eran criterio de infección secundaria. Por su parte Vásquez y otros demostraron que títulos de anticuerpos totales a dengue de 1/5120 son criterio de infección probable por dengue y títulos 1/10240 criterio de infección secundaria a dengue cuando se utiliza como sistema de detección de los anticuerpos el método de ELISA de Inhibición. [52]

La prueba de neutralización por reducción de placas (PRNT) es un ensayo sensible y específico, que permite la detección de anticuerpos neutralizantes al virus de dengue. Estos anticuerpos son muy estables en el tiempo. Se ha reportado que en un individuo con una infección de tipo secundaria, el título de anticuerpos neutralizantes al primer serotipo que produjo la infección primaria, es anamnesticamente mayor que contra el serotipo infectante durante la segunda infección (“fenómeno del pecado original”). Hace poco otros autores han reportado que la teoría del pecado original no puede aplicarse en su totalidad al serodiagnóstico, porque pueden observarse resultados discrepantes entre la neutralización y el aislamiento viral en individuos donde se conocen los serotipos infectantes de la primera y segunda infección. [53]

El PRNT es considerado de gran utilidad en estudios seroepidemiológicos por su elevada especificidad, lo que permite identificar al serotipo causante de una infección pasada. También ha sido utilizado en la identificación de los virus del dengue. [54]



Tanto IH como PRNT requieren de muestras de suero pareados en los casos sospechosos de la enfermedad, así como destreza de su ejecución. En general son técnicas demoradas en su ejecución.

En los últimos años se han desarrollado diferentes sistemas inmunoenzimáticos (ELISA) para el diagnóstico de dengue. Estos son económicos, rápidos y fáciles de ejecutar. Muestran a su vez elevada sensibilidad y especificidad cruzada, lo que los hace de gran utilidad como pruebas de tamizaje. Diferentes ELISA desarrollados para determinar la presencia de anticuerpos totales antilavivirus han demostrado utilidad en estudios seroepidemiológicos y en el diagnóstico serológico. Vázquez y Fernández, en 1989, desarrollaron un sistema inmunoenzimático que permite la detección y titulación de inmunoglobulinas totales a virus dengue, mediante un sistema de inhibición donde una vez añadido el antígeno, la presencia de color en la reacción dependerá de la presencia o no de anticuerpos a dengue en el suero problema. El enlace al antígeno de los anticuerpos antidengue, presentes en el conjugado, será inhibido si en el suero problema (añadido con anterioridad) están presentes anticuerpos al agente en cuestión. Este sistema permite la detección de anticuerpos en suero y en muestras de sangre colectadas en papel filtro.

El ELISA de captura de IgM se ha constituido en uno de los sistemas más importantes y útiles del diagnóstico y vigilancia del dengue. Los anticuerpos IgM antidengue se producen transitoriamente durante las infecciones primaria y secundaria y su detección indica una infección activa o reciente por dengue. Los anticuerpos se desarrollan con rapidez y al 5to día de la enfermedad en la mayoría de los pacientes se detectan anticuerpos IgM.

La detección de anticuerpos IgM se ha convertido en una herramienta de incalculable valor para la vigilancia del dengue y de la FHD; resulta el método de elección en la mayoría de los laboratorios. Diferentes Kit han sido desarrollados recientemente con diferentes grados de sensibilidad y especificidad. La mayoría de los sistemas se basan



en un ELISA de captura de anticuerpos IgM que incluyen los 4 serotipos virales, lo que incrementa la sensibilidad al sistema. Un Kit de captura de IgM y un ultramicroanalítico que utiliza solo 2.5 µl de muestra ha sido desarrollado en departamento de Virología del CNDR y es utilizado en el diagnóstico y la vigilancia del dengue en Nicaragua y muestra niveles de sensibilidad y especificidad elevados.

Recientemente se ha desarrollado un sistema visual de tira reactiva (PanBio) que permite la detección de anticuerpos IgM en menos de 5 minutos. El sistema, que se basa en una cromatografía, muestra niveles de sensibilidad y especificidad de 99% y 96% respectivamente.

Talarmin y otros demostraron la utilidad de la detección de anticuerpos IgA para el estudio de la infección reciente de dengue. El sistema mostró 100% de sensibilidad y especificidad al compararlo al ELISA de captura de IgM, aunque esta última se detectó como promedio a 3.8 días de comienzo de los síntomas y la IgA a 4.6 días de comienzo de la enfermedad.

DETECCIÓN MOLECULAR

La hibridización de ácidos nucleicos ha sido aplicada tanto en el diagnóstico como en los estudios epidemiológicos, específicamente el dot/blot con la utilización de ARN extraído de células infectadas con el virus y de pools de mosquitos *Aedes albopictus* infectados con sondas biotiniladas o sondas marcadas con fósforo. La detección mediante sondas biotiniladas es menos sensible que la que utiliza sondas marcadas con isótopos radioactivos y no es de gran utilidad en la identificación directa del virus en muestras clínicas, a menos que se haya realizado una amplificación previa del material genético.



Cebadores específicos de tipo y de complejo han sido utilizados a partir de secuencias consenso localizadas en diferentes genes, como los que codifican para las proteínas de la envoltura (E), NS1, NS2 y NS5, así como los extremos Terminal 3' y 5' no codificantes. Lanciotti y otros (1992) desarrollaron un PCR rápido con la utilización de cebadores consenso localizados en los genes C y PreM. Este primer PCR produce un fragmento de 511pb, y es seguido de un PCR nested donde se utilizan cebadores específicos para cada serotipo. Este método ha demostrado su utilidad en el diagnóstico del dengue, presenta una sensibilidad de hasta 10^3 DICT50 en sueros virémicos y mosquitos infectados.

El PCR es ampliamente utilizado en el diagnóstico del dengue porque permite la detección del agente de forma directa en muestras de suero, células infectadas, sobrenadantes celulares y en larvas infectadas, así como en muestras de tejidos frescos y embebidas en parafina en fallecidos por FHD.

Además de su utilidad como un método de diagnóstico rápido, también ha sido empleado en el estudio genómico de cepas de dengue, lo que permite por medio del análisis mediante enzimas de restricción o secuenciación nucleotídica la clasificación de las cepas en genotipos.

Mediante la utilización del PCR y la secuenciación nucleotídica se pudo determinar el genotipo de las cepas de dengue 1 y 2, aisladas en los brotes ocurridos en Cuba en los años 1977, 1981 y 1997; así como el posible origen geográfico de la cepa de dengue 3 que se reintrodujo en la región de las Américas en 1994.

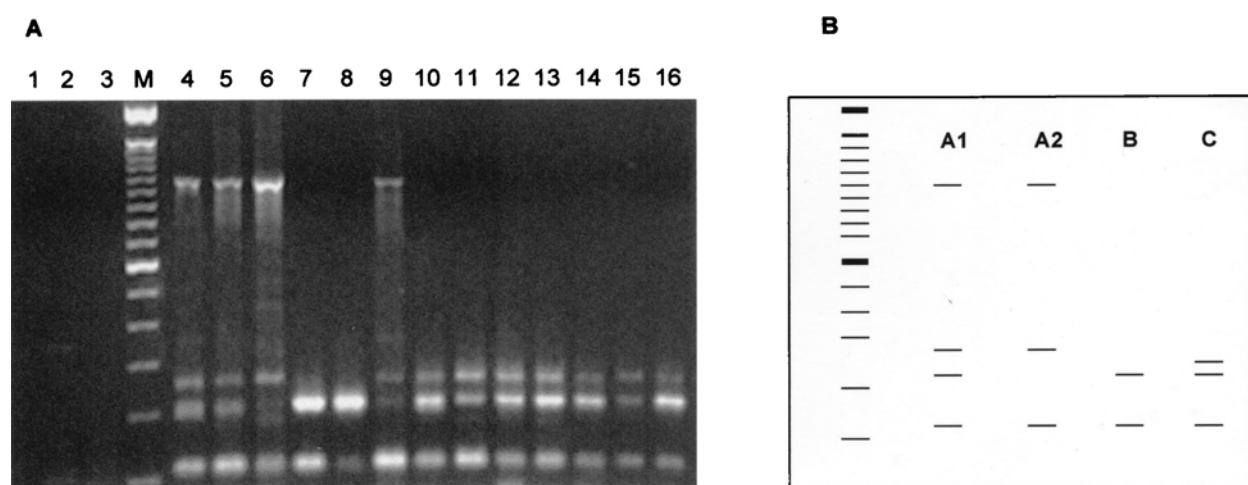
Algunos reportes demuestran la utilidad del PCR en la vigilancia de esta enfermedad, ya sea para detectar con rapidez la introducción de un nuevo serotipo en un área mediante el estudio de muestras de sueros de pacientes y de pools de mosquitos *Aedes*.



Recientemente un nuevo PCR para subtipificar rápidamente el virus de dengue ha sido desarrollado, y consiste de una simple reverso transcripción (RT – PCR) y amplificación usando cuatro oligonucleótidos que reconocen regiones polimórficas de los sitios de restricción de las endonucleasas en la envoltura del gen E.

FIGURA 1.

RSS – PCR PATRONES DE DENGUE 1 DE CEPAS DE DIFERENTES ORIGENES GEOGRAFICOS.



- (A)** Electroforesis en gel de agarosa de los productos de RSS – PCR. Carril 1, dengue 2 Brasil 1998 (64022); carril 2, Indonesia 1989 (430); carril 3, dengue 4 Puerto Rico 1986 (081); carril M, escalera de 100 – bp (Gibco BRL); carril 4 – 16, dengue 1 [carril 4, Indonesia 1977 (407 – 1); carril 5, filipinas 1984 (901); carril 6, Tailandia 1979 (213); carril 7, Tailandia 1973 (735); carril 8, Tailandia 1974 (106); carril 9, Pacifico Oeste 1980; carril 10, Nigeria 1985; carril 11, Sri Lanka 1985; carril 12, México 1982 (086); carril 13, Brasil 1986 (543); carril 14, Brasil RJ 1995 (49217); carril 15, Brasil ES 1998 (60548); carril 16, Brasil BA 1996 (57291)]. Carriles 4, 5 y 9 patrón A1; carril 6, patrón A2; carril 7 a 8 patrón B; carriles del 10 al 16, patrón C.
- (B)** Diagrama esquemático, representando los diferentes patrones por RSS – PCR de DENV -1. [5]



Chow y otros como parte de la vigilancia epidemiológica en Singapur, estudiaron 309 pools de mosquitos de *Aedes aegypti* durante 1 año y demostraron en 20% de estos la presencia de dengue 1. Además de la detección del genoma viral como método de diagnóstico, su cuantificación es de gran importancia como un marcador de severidad de la enfermedad. Recién se han reportado varios estudios que han abierto la posibilidad de cuantificar el ADNc viral. Taiman, Laue y otros aplicaron un protocolo de amplificación automatizado que permitió medir la cantidad de ADNc durante el proceso de amplificación.

DETECCIÓN ANTIGÉNICA

Un método alternativo para el diagnóstico rápido del dengue es la detección directa del antígeno viral en el suero del paciente o en muestras de tejidos de fallecidos, con la utilización de sistemas inmunoenzimáticos y técnicas inmunohistoquímicas. En general los sistemas inmunoenzimáticos muestran baja sensibilidad, sobre todo cuando se estudian muestras procedentes de individuos que sufren una segunda infección por dengue. Recientemente, Malargue y otros han desarrollado un sistema inmunoenzimático que utiliza anticuerpos de ratón antidengue biotinilados y estreptavidina marcada con B galactosidasa. Con la utilización de este sistema para detectar el antígeno viral en muestras de suero de pacientes, se lograron cifras de sensibilidad y especificidad que oscilaron entre 89 – 90 % y 94 – 99%, en dependencia del protocolo utilizado. Varios autores han demostrado que el antígeno viral se detecta con una mayor sensibilidad cuando se utilizan como muestras linfocitos de sangre periférica (53.8%) en lugar de suero (18.9%). Young y otros sugirieron que la detección de la proteína NS1 en suero de los pacientes pudiera servir como un marcador para medir la viremia.

El desarrollo de sistemas inmunohistoquímicos y del PCR ha ocasionado un incremento en la calidad del diagnóstico en los casos fatales de FHD/SCD, aunque ambos sistemas se encuentran disponibles solamente en laboratorios de referencia.



El diagnóstico del dengue puede abordarse mediante el aislamiento viral, la detección del antígeno viral y el genoma viral en muestras de sueros, tejidos y pools de mosquitos; así como por la detección de anticuerpos IgM o IgG que permiten el diagnóstico de una infección reciente o pasada. La aplicación en su conjunto de las diferentes técnicas permite que los laboratorios que asumen el diagnóstico de rutina y la vigilancia puedan brindar un diagnóstico rápido y temprano de la situación epidemiológica presente en sus respectivos países.



MATERIAL Y METODO

TIPO DE ESTUDIO

El presente trabajo es un estudio descriptivo de corte transversal de la sub-tipificación del serotipo 1 del virus dengue que circuló en Managua, Nicaragua desde el año 2003 hasta el 2005. La sub-tipificación se basó en un método de biología molecular que utiliza oligonucleótidos dirigidos a sitios de restricción ubicados en la región E del genoma del virus dengue serotipo DENV 1.

DESCRIPCION DE LA MUESTRA

Las muestras se seleccionaron de La colección de cepas del virus del dengue de los años 2003, 2004 y 2005 del Centro Nacional de Diagnostico y Referencia del MINSA (CNDR-MINSA), la cual estaba compuesta por 48% (42/87) DENV 1, 49% (43/87) DENV 2 y 2% (2/87) DENV 4. El 98% de las cepas DENV 1 fueron recolectadas en Managua en los años 2003 y 2005.

De la colección total de cepas del CNDR se seleccionaron un total un total de 13 cepas DENV1 que cumplieran los siguientes criterios: 1. Pertenecer a la colección de cepas del CNDR del periodo 2003-2005, 2. Haber sido recolectadas en Managua, 3. Ser positivas en el cultivo primario.

PREPARACIÓN DE LAS CÉLULAS C636 HT

Con el objetivo de incrementar la concentración viral para los análisis de RSS – PCR los sueros son inoculados en células C636 HT. Las células C636 HT son conservadas en alícuotas en nitrógeno líquido, para ser inoculadas se descongelan bruscamente y se siembran en frascos para crecimiento celular que contienen medio de crecimiento MEM (Medio Mínimo Esencial) así como glutamina, aminoácidos y 10% de suero fetal bovino (SFB), se incuban a 34° C hasta obtener una monocapa celular confluyente. Regularmente se obtiene una monocapa confluyente en 72 horas y debe realizarse un



cambio de medio a las 24 horas para eliminar el DMSO (Dimetil sulfoxido) que se les adiciona para su crío – preservación (*Ver detalles en anexo II Inciso A*)

INOCULACION DE LAS CEPAS DE DENV 1 DE MANAGUA, NICARAGUA EN CELULAS C636 HT

Una vez obtenida los frascos de 25 cm² con monocapa celular confluyente se inoculan 200 ul de una dilución 1:20 de MEM con suero o sobrenadantes de cultivo primario que contienen las partículas virales. Las células se incuban a 34° C durante 7 días, observando diariamente el efecto citopático (ECP). Cuando la presencia de ECP es igual o mayor al 50% de la monocapa celular, se cosechan las células y se almacenan en alícuotas de 140 ul a -80° C hasta la extracción de ARN viral. Una alícuota de estas células se somete inmediatamente a los análisis de inmunofluorescencia. (*Ver anexo II Inciso B*)

INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

Con el propósito de confirmar la presencia de virus en las células se realizó una IFI. Las células fueron lavadas tres veces con solución fosfato salina (PBS) en los frascos de 25 cm² y resuspendidas en 1 ml de PBS. Se agregan 10 µl de la suspensión de células en las láminas de inmunofluorescencia, verificando al microscopio una concentración celular que permita la formación de una sola capa. Las laminas que contienen la capa celular se secan a temperatura ambiente y se fijan en acetona; posteriormente se agregan anticuerpos monoclonales específicos para cada serotipo, se incuban a 37° C por 30 minutos y después de tres lavados con PBS, se adiciona una solución que contiene un anticuerpo conjugado con un fluoróforo y un medio de contraste (azul de Evans). Se verifica la presencia de partículas virales en el interior de las células mediante la observación con el objetivo 100X del microscopio de inmunofluorescencia. (*Ver anexo II Inciso C*)



INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Una reacción con el anticuerpo monoclonal específico es indicada por la fluorescencia citoplasmática perinuclear. Cada cultivo celular es ensayado independientemente con uno de los monoclonales específicos para cada serotipo y cada ensayo es realizado por duplicado incluyendo control negativo (células sin infectar) y positivo.

EXTRACCION DEL ARN VIRAL

Para la realización del RSS –PCR se extrajo ARN viral de los sobrenadantes de las células inoculadas con virus de DENV 1 y previamente conservadas a -80 C. Se toman 140 ul de sobrenadante celular infectado con el virus y se mezclan con 420 ul de reactivo de Trizol, se adiciona 112 ul de cloroformo y 280 ul de isopropanol. Esta mezcla se centrifuga y se extrae el sobrenadante siguiendo la metodología descrita en el anexo II inciso D. Finalmente se obtienen 20 ul de ARN viral resuspendidos en agua libre de nucleasas, los cuales se congelan a -80 °C hasta su análisis.



RSS – PCR PARA DENGUE SEROTIPO 1

Para la amplificación de los fragmentos de restricción se mezclan 2.5 µl del ARN viral con los componentes descritos en la siguiente tabla:

TABLA 1. COMPONENTES DE LA MEZCLA PARA RSS – PCR DE DENV 1

Reactivos	Conc. Trab 10X	Conc final 1X	µl/vial 2.5
<i>Buffer (10mM de Tris, 50mM de KCL, pH 8.2 – 9 a 25°C, gelatina o BSA y detergente no iónico)</i>			
dNTPs (Deoxinucleotidos trifosfatados)	20Mm	200µM	0.25
RSS 9	10µM	0.5µM	1.25
RSS 10	10µM	0.5µM	1.25
RSS 11	10µM	0.5µM	1.25
RSS 12	10µM	0.5µM	1.25
DTT (DL – Thiotreitol)	100Mm	5Mm	1.25
TMAC (Tetrametil de amonio y cloro)	1M	0.03M	0.75
Betaine	4M	0.5M	3.125
MgCl ₂	25mM	1.5Mm	--
AMV – RT (Transcriptasa Reversa)	1U/µL	0.005U/µL	0.125
Amplitaq	5U/µl	0.025 U/µL	0.125
H ₂ O sigma			9.4

Los oligonucleótidos utilizados fueron diseñados por Harris et. al 1999, utilizando las secuencias del gen E del virus del Dengue que se encuentran el banco de genes del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Las secuencias y las regiones que reconocen estos oligonucleótidos se detallan en la tabla 2.

TABLA 2.

**SECUENCIA Y POSICION DE LOS PRIMERS OLIGONUCLEOTIDOS USADOS
PARA AMPLIFICAR CADENAS DE DENGUE 1.**

Primer	Secuencia	Posición Genómica	Cadena
RSS 9	5'-CTG TTC TAG TGC AGG TTA	1897 – 1914	+
RSS 10	5'-CAT TTT CCC TAT ACT GCT TCC	2124 – 2144	-
RSS 11	5'-GTC ACA AAC CCT GCC GTC CT	1089 – 1108	+
RSS 12	5'-CGC AGC TTC CAT GCT CCA AT	1013 – 1032	-



PARAMETROS DE TERMOCICLAJE.

La mezcla de RSS –PCR se colocó en un termociclador MJ Research, INC y la reverso transcripción se efectuó a 42° C durante 60 min., seguida directamente de 30 ciclos de amplificación de 94° C por 30 seg., 60° C por 1 min., 72° C por 2 min., con una extensión final de 72° C por 5 min. (*Ver anexo III*)

ELECTROFORESIS DE LOS PRODUCTOS DEL RSS – PCR DENV 1

Diez microlitros de los productos de RSS – PCR fueron analizados por electroforesis en gel de Agarosa al 1.5% con TBE 1X (Tris, Acido Bórico, EDTA) y visualizados con tinción de Bromuro de Etidio (0.5 ug/ ml) y luz ultravioleta. Los pesos moleculares de los productos fueron estimados usando un marcador de peso molecular en forma de escalera de 100 pares de base. La documentación de los geles se realizó con una cámara digital CANON Power Shot G6 digital, serie 8714574942100.

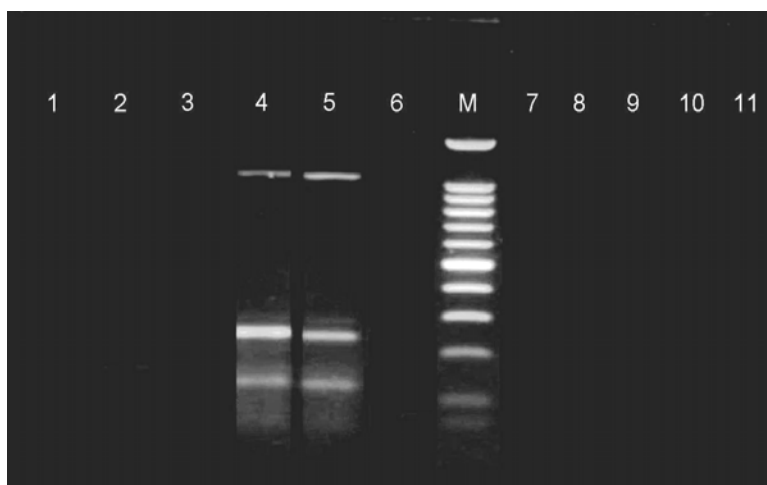


RESULTADOS

DESCRIPCION DE LA ESPECIFICIDAD DE LOS OLIGONUCLEOTIDOS DE RESTRICCION QUE RECONOCEN EL DENV 1

Una de los mecanismos de defensa de los virus ARN es mutar con relativa frecuencia, por tanto los oligonucleótidos que reconocen secuencias específicas en los genes de estos virus con el tiempo tienden a ser inefectivos o tener reacciones inespecíficas. En este estudio hemos determinado la especificidad de los oligonucleótidos de restricción del DENV 1 con cepas de referencia de DENV 1, 2, 3 y 4 (fig. 2)

Figura 2.



En los carriles 1- 3 se colocaron los controles de contaminación de los ambientes cuarto gris, cuarto Blanco y sobrenadante de células no inoculadas, no se observa contaminación en los ambientes y las células no inoculadas muestran los resultados esperados. En los carriles 4 y 5 se colocaron los productos de las cepas de referencia de DENV 1, observándose un patrón de tres bandas típico del serotipo 1. En los carriles 6, 7, 8, 9, 10 y 11 se colocaron los productos de las cepas de referencia de DENV 2, 3 y 4 por duplicado y no se observan patrones de bandas.



RSS – PCR DE CEPAS DE MANAGUA, NICARAGUA

Se analizaron un total de 13 cepas de DENV 1 aisladas en Managua, Nicaragua desde el año 2003 – hasta el año 2005, los patrones resultantes fueron comparados con los patrones de DENV 1 encontrados por Harris y col. en Octubre de 1999.

TABLA 3.

**RESULTADOS DE LA SUBTIPIFICACION DE CEPAS DE DENV 1 RECOLECTADAS
EN MANAGUA DEL 2003-2005**

Código de la cepa	Año de aislamiento	Subtipo de DENV 1
MAN – 208 – 03	2003	A2
MAN – 18 – 03	2003	A2
MAN – 354 – 03	2003	A2
MAN – 39 – 03	2003	A2
MAN – 277 – 03	2003	NO TIPEABLE
MAN – 3112.1A1 – 04	2004	A2
MAN – 3368.1A1 – 04	2004	A2
MAN – 1855.2A1 – 05	2005	B
MAN – 90.1A1 – 05	2005	A2
MAN - 14 – 05	2005	A2
MAN – 1882.2A1 – 05	2005	A2
MAN – 1592.2A1 – 05	2005	B
MAN - 2892.2A1 - 05	2005	A2

Del total de muestras analizadas el 77 % (10/13) corresponden al subtipo A2, mientras que el 15% (2/13) fueron del subtipo B. Una de las muestras analizadas presento un patrón atípico no reportado en ninguna investigación previa por lo que será enviada a la Universidad de Berkely para estudios de secuenciación de nucleótidos. En el año 2003 el subtipo A2 fue el que se encontró en la mayoría de las cepas recolectadas de ese año con un 80% (4/5), igualmente en el 2004 y 2005 hubo circulo el subtipo A2 con un 100% (2/2) y un 77% (4/6) respectivamente. Interesantemente en el año 2005 se observo la presencia del subtipo B el cual no se encontró en los años anteriores.



**RSS – PCR DE CEPAS DE DENV 1
MANAGUA, NICARAGUA 2003 – 2004**

FIGURA 3.

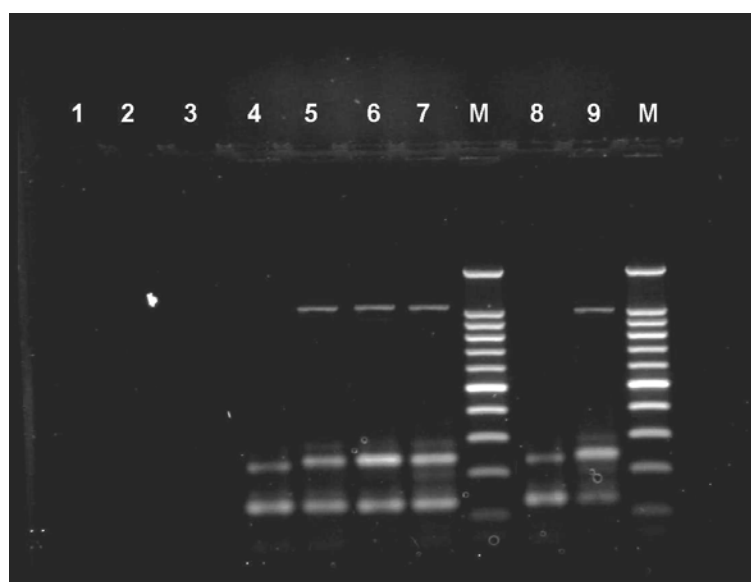


La figura muestra los resultados del análisis por RSS-PCR realizado a 7 cepas de DENV 1 aislada en Managua en los años 2003 y 2004. Los primeros 3 carriles pertenecen a los controles de contaminación y los carriles 4, 5, 6 y 7 pertenecen a cepas recolectadas en el 2003, las cuales muestran un patrón de tres bandas típico del subtipo A2, mientras que en el carril 8 se observa un patrón de bandas atípico, el cual no ha sido reportado en investigaciones previas. En los carriles 9 y 10 se colocaron cepas aisladas en el 2004 las cuales muestran un patrón típico de tres bandas características del subtipo A2 y similares al de las cepas del 2003.



**RSS – PCR DE CEPAS DE DENV 1
MANAGUA, NICARAGUA 2005**

FIGURA 4



Los resultados de los análisis de las cepas recolectadas en el 2005 muestran un patrón típico del subtipo A2 (carriles 5,6, 7 y 9), sin embargo, las cepas de los carriles 4 y 8 muestran un patrón característico del subtipo B del DENV 1. Los carriles 1, 2 y 3 muestran los resultados de los controles de contaminación.



DISCUSION

La vigilancia seroepidemiológica del dengue es realizada principalmente por la detección de IgM específica contra el DENV, mientras que la detección de los serotipos circulantes es hecha tradicionalmente por aislamiento e identificación viral [59, 56]. En los últimos años el RT-PCR ha sido utilizado para la identificación de los serotipos de DENV en sobrenadantes de cultivo de células infectadas y en muestras de suero [57, 58, 60] esta técnica es utilizada para obtener rápidamente información acerca de los serotipos circulantes, sin embargo en la investigación de una epidemia es importante la realización de estudios de epidemiología molecular del DENV. Cada serotipo es a su vez subdividido en subtipos basado en variaciones genéticas, estos subtipos son estudiados para comprender el origen y evolución de las cepas virales e investigar la correlación entre los subtipos de DENV y la severidad de la enfermedad. Para determinar el subtipo, usualmente son secuenciadas regiones del genoma viral y son generados árboles filogenéticos usando sofisticados y costosos métodos de laboratorio [31, 61]. Recientemente un sencillo método de PCR ha sido desarrollado para la identificación de subtipos de DENV llamado RSS-PCR [6].

Los patrones de RSS-PCR DENV 1 son esencialmente similares a los análisis de secuenciación. Un estudio filogenético de 40 cepas de DENV 1 de diferentes regiones geográficas basado en 240 nt de la región E/NS1 definieron 3 importantes genotipos y 2 adicionales representado cada uno por un solo virus [31]. Similarmente otro estudio de 179 nt de la región E de 35 cepas de DENV 1 produjo 3 genotipos [62]. El grupo genotípico más grande de ambos análisis consistió en cepas de DENV 1 de América, África y sudeste asiático correspondiente con el grupo C del RSS-PCR. El segundo genotipo esta compuesto por virus de Filipina, Indonesia, Tailandia y el Pacífico sur, coincide con el grupo A de RSS-PCR y un tercer grupo consistente en virus de Tailandia y Taiwán se corresponde al RSS-PCR tipo B.



En este estudio hemos determinado los subtipos de DENV 1 que circularon en el periodo de 2003 – 2005, se ha observado la presencia del subtipo A2, el cual ha circulado comúnmente en Tailandia y no se reportó su circulación en cepas de algunas regiones de América analizadas por el grupo de Eva Harris en 1999. [5]

Este estudio también revela el subtipo B en el año 2005 que es de origen Asiático, pues este subtipo se encontró en cepas Tailandesas. Es muy probable que en Managua, Nicaragua haya circulado o se encuentre circulando un subtipo que aun no ha sido reportado, ya que hemos encontrado una cepa que presenta un patrón de una sola banda atípico de todos los subtipos descritos hasta este momento o que esta cepa atípica contenga puntos de mutación en los sitios de restricción, que no son reconocidos por los oligonucleótidos que hemos utilizados en este estudio.

Hasta este momento la bibliografía ha descrito que aquellos individuos que han adquirido inmunidad natural frente a un determinado serotipo son susceptibles a desarrollar dengue hemorrágico cuando se infectan con un serotipo distinto al que han sido previamente inmunizados, dado que un serotipo puede presentar diferentes subtipos podría ocurrir que la severidad de la enfermedad este relacionada con subtipos específicos; por tanto la realización de estudios que permitan hacer un seguimiento de los diferentes subtipos que circulan en una determinada región geográfica son de especial importancia porque permiten comprender el comportamiento epidemiológico molecular y la información generada puede asociarse al comportamiento clínico.

La aplicación del RSS-PCR significó un paso de avance en el desarrollo de la Virología en Nicaragua permitió estudiar un número relativamente elevado de cepas en un tiempo corto, si lo comparamos con los análisis de secuenciación, lo que constituye una herramienta mas para mejorar el conocimiento sobre el Dengue en Nicaragua y en la región centroamericana y de esa forma poder establecer programas de intervención o generar información que sea útil para el desarrollo de vacunas.



CONCLUSIONES

1. Los oligonucleótidos de DENV 1 fueron específicos para cepas de DENV 1 aisladas en Managua de 2003 – 2005.
2. El subtipo de Dengue 1 que ha circulado en el periodo de 2003 al 2005 en Managua es el A2.
3. En año 2005 se dio circulación del subtipo B del DENV 1.
4. Los subtipos A2 y B de DENV 1 de origen asiático, no habían sido reportado en continente americano.
5. Se encontró un subtipo atípico que será estudiado con métodos de secuenciación.



RECOMENDACIONES

1. Realizar estudios para determinar si existe relación entre los subtipos de DENV y la severidad de la enfermedad.
2. Continuar con la vigilancia epidemiológica molecular de los serotipos del Dengue.
3. Secuenciar las cepas de DENV 1 reportadas en este estudio.



REFERENCIAS

1. Dengue alcanza grado de epidemia. Diario La Prensa. Jueves 24 de octubre de 2002.
2. <http://www.infecto.edu.uy/español/revisiontemas/tema10/#anchor166411en>
12/06/05
3. Montes, Tibaie. Actualización en Dengue. Rev. Soc. Ven. Microbiol. v.21 n.1 Caracas ene. 2001
4. Basualdo, Juan Angel. Microbiología Biomédica. Editorial Atlante. Buenos Aires, Argentina 1996.
5. Harris, Eva. Miagostovich, Marize Gutierrez Milena. Rapid Subtyping of Dengue Virus Serotypes 1 and 4 by Restriction Site – Specific PCR. Journal of Clinical Microbiology, Mar. 2000, p. 1286 – 1289.
6. Harris E, Sandoval E, Johnson M, Xet – Mull AM, Riley LW, 1999. Rapid Subtyping of dengue viruses by restriction site-specific (RSS) – PCR. *Virology* 253: 86 - 95.
7. Lennette, Edwin H. et al. Diagnostic Procedures for Viral Rickettsial, and Chlamydia Infections. 7ma edition 1995
8. Sarria, L. Aspectos Clínicos y Técnicos del Dengue en San Rafael del Sur. Diciembre 1989 – Enero 1990, San Judas.
9. Henchal EA, Putnak JR. 1990. The Dengue viruses, Clin Microb Rev 3 (4):376-396
10. Senado, J. Fiebre Hemorrágica Dengue, patogenia y fisiopatología. Rev Cuba. Med 23:374-382
11. Rice, C, Flaviviridae: The virus and their replication. En: Fields BN, Knipe DM, Howley, et al (eds). Fields Virology. Vol I. Third. Edition. Philadelphia: Lippincott – Raven Publishers: 931 – 958, 1996
12. Heinz, F. X. and Roaerhring, J. T, Immunochemistry of virus. The basis for serodiagnosis and vaccines. 14 ed. II Elsevier Science Publishers B.V. (Biomedical Division); 2899-305, 1990.



13. Osatomi, K. and Sumiyoshi, H.: Complete nucleotide sequence of dengue type 3 genome RNA. *Virology*; 176: 643 – 647, 1990.
14. Heinz, F. X. Allison, S. et al. Recombinant and virion – derives soluble and particulate immunogens for vaccination against dengue virions. *Vaccine*; 13:230-236,1995
15. Allison, S. L.; Schalich, J.; Stianky, K.; Mandl, C. W.; Kunz, L. and Heinz, F. X.: Oligomeric rearrangement of tick – borne encephalitis virus envelope protein induced by acidic pH. *J Virology* 69:695-700, 1995.
16. Mason, P. W.; Pincus, S.; Fournier, M. J.; Masn, T. L. and Shope, R. E.: Japanese encephalitis virus-vaccine recombinants reduce particulate forms of the structural membranes proteins and induce high levels of protection against lethal 180: 294-305, 1991.
17. Pincus, S.; Mason, P. W.; Konishi, E.; Fonseca, B. A. L.; Shope, R. E. and Rice, C. M.: Recombinant vaccine viruses producing the prM and E proteins of yellow fever protects mice from lethal yellow fever encephalitis. *Virology*; 187:290-297, 1992.
18. Fonseca, B. A. L.; Pincus, S.; Shope, R. E.; Rice, C. M.; Konishi, E. and Paoletti, E.: Recombinant vaccine viruses co-expressing dengue 1 glycoprotein's pr M and E induce neutralizing antibodies in mice *Vaccine* 1994; 12: 274-285.
19. Wang, S.; He, R. and Anderson, R.: PrM- and Cell Binding Domains of the Dengue Virus E Protein. *J Virol*; 62:2547-2551, 1999.
20. Schelesinger, J. J.; Brandiss, M. W. and Putnak, J. R.: Cell surface expression of yellow fever virus non – structural glycoprotein NS1: consequences of interaction with antibody. *J Gen Virol*; 71: 593-599, 1990.
21. Young, P. R.: Antigenic analysis of dengue viruses using monoclonal antibodies. *Southeast J Trop Med Hyg*; 21: 646-650, 1990
22. Yamshchikov, F. and Compans, W. R.: Processing of the intracellular form of the West Nile Virus capsid protein by the viral NS2b- NS3 protease: an in vivo study. *J Virol*; 65: 5765-5771, 1994.



23. Krishna, H. M.; Chum, S. and Padmannabhan, R.: Dengue virus NS 3 Serine Protease. *J Biol Chem*; 274: 5573-5580, 1999.
24. Monath, T. P. and Tsai, T.: Flavivirus. In: Richman DD, Whitley RJ, Hayden FG (eds). *Clinical Virology*. New York: Churchill Livinstone Inc; 1133-1185, 1997.
25. Martínez E, 1998 Dengue y Dengue Hemorrágico. Ministerio de Salud pública de Cuba. Laboratorio ELEA, Gallo 238, 1172 Buenos Aires.
26. Friefelder, David. *Molecular Biology, A comprehensive Introduction to prokaryotes and Eukaryotes*. Pag 864.
27. OPS - Organización Panamericana de la Salud. 1995 OPS -. Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guía para su prevención y control. Washington DC: OPS. Publicación científica N° 548.
28. PAHO - Pan American Health Organization. 1997. Re- emergence of Dengue in the Americas. *Epidemiological Bulletin*; 18(2)
29. Bielefeldt-Ohmann H. 1997. Pathogenesis of dengue virus diseases pieces in the jigsaw. *Reviews. Trends in Microbiology* 5: 409-413.
30. Lewis J.A., Qwong-Jen Ch, Lanciotti RS, Kinney RM, Mayer LW, Trent DW 1993. Phylogenetic relationships of dengue-2 viruses. *Virology*; 197: 216-224.
31. Rico-Hesse R. 1990. Molecular evolution and distribution of dengue virus type 1 and 2 in nature. *Virology*; 174: 479 - 493.
32. Halstead AB. 1988. Pathogenesis of Dengue: Challenges to Molecular Biology. *Science*; 239: 476 – 481
33. Kurane I, Kontny U, Janus J, Ennis FA. 1990. Dengue 2 virus infection of human mononuclear cell lines and establishment of persistent infections. *Archives of Virology*; 110: 91-101.
34. Hober D. et al. Enhanced TNF a production by monocytic-like cells exposed to dengue virus antigens *Immunology Letters*; 53:115-120.
35. Chaturvedi UC, Elbishbishi EA, Agarwal R, Raghupathy R, Nagar H, et al. 1999b Sequential production of cytokines by dengue virus-infected human peripheral blood leukocytes cultures. *Journal of Medical Virology* 59: 335-340



36. Guzmán, María. Apuntes sobre el diagnóstico de laboratorio del virus dengue. Rev. Cubana Med. Trop. 2002;54(3):180-88
37. Monath TP, Heinz FX. Flaviviruses. En: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, et al. Editores. Fields Virology. Philadelphia: Lippincott. Raven Publihers; 1996.
38. Halstead SB. Dengue Viruses. En: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow MR Editors. Infectious Diseases; Philadelphia: Sauders.
39. Dengue y dengue hemorrhagic fever in the Americas: Guidelines for Prevention and Control. Washington: Pan American Health Organization; 1994. (Scientific publication No. 548).
40. Guzmán MG, Kuorí G. Dengue diagnosis. Clinic Diagnostic Lab Immunol 1996; 6:621-7.
41. Vorndam V, Kuno G. Laboratory diagnosis of dengue virus infections. En: Gubler DJ, Kuno G editors. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. CAB International, 1997.
42. Vázquez S, Sáenz E, Huelva G, González A, Kourí G, Guzmán MG. Detección de IgM contra el virus del dengue en sangre entera absorbida en papel de filtro. Rev Panam Salud Pub 1998;3:174-8
43. Vázquez S, Fernández R, Llorente C, Utilidad de sangre almacenada en papel filtro para estudios serológicos por ELISA de Inhibición.
44. Cuzzubbo AJ, Vaughn DW, Nisalak A, Suntayakorn S, Aaskov J, Devine PL. Detection of specific antibodies in saliva during dengue infection. J Clin Microbial 1998;36:3737-9
45. Groen J, Velzing J, Copra C, Balentien E, Deubel V, Vorndam V, et al. Diagnostic value of dengue virus specific IgA and IgM serum antibody detection. Micro Infect 1999;1:1085-90
46. Kuno G, Gubler DJ, Vélez M, Oliver A. Comparative sensitivity of three mosquito cell lines of dengue viruses. Bull WHO 1985;63 279-86
47. Morier L, Alemán MR, Castillo A, Pérez V. Estudio Preliminar de la línea celular AP64 para la multiplicación de los virus dengue 1 y 2. Rev Cubana Med. Trop 1991; 156-61.



48. Gubler D, Rosen L. A simple technique for demonstrating transmission of dengue virus by mosquitoes without the use of vertebrate hosts. *Am J Trop Med Hyg* 1976; 25:146-50.
49. Soler, M. Guzmán MG, Morier, Kourí, G. Utilización de los anticuerpos monoclonales para la identificación mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta de varias cepas de dengue aisladas durante la epidemia de fiebre hemorrágica, Cuba, 1981. *Rev Cubana Med Trop* 1985;37:246-51
50. Guzmán, MG. et al. Dengue hemorrhagic fever fatal cases in Cuba, 1997. *Int J Infect Dis* 1999; 3:130-5.
51. Kourí G, Más P, Guzmán MG, Soler M, Goyenechea A, Morier L. Dengue hemorrhagic fever in Cuba, 1981: rapid diagnosis of the etiologic agent. *PAHO Bull* 1983;17:126-32
52. Vásquez S, Bravo J, Pérez AB, Guzmán MG. Elisa de Inhibición: su utilidad para clasificar un caso de dengue. *Rev Cubana Med Trop* 1997;49:108-12
53. Kuno, G et al. Use of original antigenic sin theory to determine the serotypes of previous dengue infections. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 1993; 87:103-5.
54. Guzmán MG. et al. Sequential infection as risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS) during the 1981 dengue hemorrhagic fever Cuban epidemic. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro* 1991; 86:367.
- 55.- Ministerio de Salud Nicaragua. Boletín Epidemiológico. Semana 48,2003.
56. Tesh RE, 1979. A method for isolation and identification of dengue viruses using mosquito cell culture. *Am J Trop Med Hyg* 28: 1053 – 1059
57. Henchal E, Polo S, Vorndam V, Yaemsiri C, Innis B, Hoke C, 1991. Sensitivity and specificity of universal primer set for the rapid diagnosis of dengue virus infections by polymerase chain reaction and nucleic acid hybridization. *Am J Trop Med Hyg* 45: 418 – 428.
58. Harris E, RobertsTG, Smith L, Selle J, Kramer LD, Valle S, Sandoval E, Balmaseda A,1998. Typing of dengue viruses in clinical specimens and mosquitoes by single – tube multiplex reverse transcriptase – PCR. *J Clin Microbiol* 36: 2634 – 2639.



59. Henchal EA, Gentry MK, McCown JM, Brandt WE, 1982. Dengue virus - specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *AM J Trop Med Hyg* 31: 830 – 836.
60. Seah CLK, Chow VTK, Tan HC, Chan YC, 1995. Rapid, single – step RT – PCR typing of dengue viruses using five NS3 gene primers. *J Virol Methods* 51: 193 – 200.
61. Chungue E, Deubel V, Cassar O, Laille M, Martin PMV, 1993. Molecular epidemiology of dengue 3 viruses and genetic relatedness among dengue 3 strains isolated from patients with mild or severe form of dengue fever in French Polynesia. *J Gen Virol* 74: 2765 – 2770.
62. Chungue E, O. Cassar, M. T. Drouet, M. G. Guzman, M. Laille, L. Rosen, and V. Deubel. 1995. Molecular epidemiology of dengue – 1 and dengue – 4 viruses. *J. Gen. Virol* 76: 1877 – 1884.
63. Lanciotti, R. S., J. G. Lewis, D. J. Gubler, and D. W. Trent. 1994. Molecular evolution and epidemiology of dengue – 3 viruses. *J Gen. Virol* 75: 65 – 75.
64. Rico – Hesse, R., L. M. Harrison, A. Nisalak, D. W. Vaughn, S. Kalayanarooj, S. Green, A. L. Rothman and F. A. Ennis. 1998. Molecular evolution of dengue type 2 virus in Thailand. *AM J. Trop Med. Hyg* 58: 96 – 101.
65. Rico – Hesse, R., L. M. Harrison, R. Alba Salas, D. Tovar, A. Nisalak, C. Ramos, J. Boshell, M. T. R. De Mesa, R. M. R. Nogueira, and A. Travassos Da Rosa. 1997. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology* 230: 244 – 251.
66. Balmaseda A, Sandoval E, Pérez L, Gutiérrez M, and Harris E, 1999. Application of molecular typing techniques in the 1998 dengue epidemic in Nicaragua. *AM J. Trop Med. Hyg* 61: 893 – 897.
67. Vorndam V, Kuno G, Rosado N. A PCR – restriction enzyme technique for determining Dengue virus subgroups within serotypes. Division of Vector-Borne Infectious Diseases, National Centers for Infectious Diseases, Center for Disease Control and Prevention, San Juan, Puerto Rico 1994. PubMed, *J Virol Methods*. 1994 Jul; 48(2-3):237-44.



68. Mota J, Ramos – Catañeda J, Rico – Hesse R, Ramos C. Análisis Filogenético del dominio III de la proteína de envoltura del virus dengue 4. *Salud Pública Mex* 2002; 44: 228 – 236. El texto completo en inglés de este artículo también está disponible en: <http://www.insp.mx/salud/index.htm>
69. NOGUEIRA, Rita Maria Ribeiro, MIAGOSTOVICH, Marize Pereira and SCHATZMAYR, Hermann Gonçalves. **Molecular epidemiology of dengue viruses in Brazil.** *Cad. Saúde Pública*. [Online]. Jan
70. /Mar. 2000, vol.16, no.1 [cited 01 March 2006], p.205-211. Available from World Wide Web: <http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2000000100021&lng=en&nrm=iso>. ISSN 0102-311X.
71. MYERS, Michael P.; YANG, Jay; and STAMPE, Per. Visualization and functional analysis of a maxi-K channel (mSlo) fused to green fluorescent protein (GFP). *Electronic Journal of Biotechnology* [online]. 15 December 1999, vol. 2, no. 3 [cited 21 March 2000]. Available from: <http://www.ejbiotechnology.info/content/vol2/issue3/full/3/index.html>. ISSN 0717-3458.



ANEXOS



ANEXO I.

PATRONES DE RSS - PCR DENV 1

SUBGRUPOS DE DENV 1	Patrón de Peso Molecular (aproximado)	Procedencia
A1	110 pb 220 pb 270 pb 1000 pb	Indonesia (1976-1978) Filipinas (1983 – 1984) Pacífico Oeste (1980)
A2	110 pb 270 pb 1000 pb	Tailandia (1975, 1979, 1980)
B	110 pb 220 pb	Tailandia (1973 - 1974)
C	110 pb 220 pb 240 pb	Nigeria (1985) Sri Lanka (1985) México (1982) Brasil (1986, 1995, 1996, 1998)

Eva Harris et al. [5]



ANEXO II.

PROCEDIMIENTOS TECNICOS

INCISO A: MULTIPLICACION DE LAS CELULAS C636 HT.

1. EQUIPOS

- a) Incubadoras de 34° C
- b) Flujo Laminar
- c) Pipet aids

2. MATERIALES

- a) Pipetas serológicas de 1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml.
- b) Beakers
- c) Frascos de cultivos de 25 cm².
- d) Marcador permanente
- e) Guantes

3. REACTIVOS

- a) Medio MEM (Medio Mínimo Esencial) con Suero Bovino Fetal (SBF) al 10%.
- b) Alcohol al 70%.

4. PROCEDIMIENTO

- a) Llevar el medio a temperatura ambiente.
- b) Preparar el flujo laminar limpiándolo con etanol al 70%
- c) Preparar los materiales a utilizar
 - Pipetas estériles
 - Pipet aids
 - Mechero



- Beaker con cloro diluido al 10%
- Frasco de cultivo de células de 25 cm²
- Marcador permanente
- d) Descartar el medio viejo en el beaker con cloro al 10%
- e) Agregar 4 ml de medio a los nuevos frascos y también al frasco que contiene las células (Split 1/5).
- f) Desprender las células.
- g) Mezclar las células en el medio nuevo, utilizando una pipeta serológica.
- h) Añadir de 1 ml de las células desprendidas a los frascos nuevos.
- i) Incubar los frascos en una incubadora de 34° C.

CONGELACION DE LAS CELULAS C636 HT

- a) Adicionar 4 ml de medio de crecimiento y 1 ml de SBF en un frasco de 10 ml rotulado como No 1. Colocarlo en un baño de hielo.
- b) Adicionar 4 ml de medio de crecimiento y 1 ml de dimetilsulfoxido (DMSO) en otro frasco rotulado como No 2. Colocarlo en un baño de hielo.
- c) Decantar el medio de un frasco de 150 cm² con células C636 HT (monocapa confluyente)
- d) Extraer los 5 ml del frasco No 1 y añadirlo al frasco con células.
- e) Desprender las células y adicionar la suspensión celular en el frasco No1.
- f) Adicionar con una pipeta de 5 ml el medio del frasco No 2 al frasco No 1. Añadirlo gota a gota y agitando, siempre en baño de hielo.
- g) Colocar 1 ml de la suspensión celular en los tubos de congelación y mantenerlos en el baño de hielo. Dejar 0.1 ml para prueba de esterilidad.
- h) Guardar los tubos de congelación a –20° C durante 1 hora
- i) Guardar los tubos de congelación a –70° C durante toda la noche.
- j) Pasar los tubos de congelación a nitrógeno líquido.



DESCONGELACION DE CELULAS C636 HT

- a) Sacar la alícuota de células C636 HT del nitrógeno líquido y pasarlo directamente a un baño María a 37° C. Hasta que se descongele su contenido.
- b) Extraer el contenido del tubo con una pipeta de 1 ml y adicionarlo a un frasco de 25 cm² que contenga 5 ml de medio de crecimiento. Incubar a 34° C.
- c) Cambiar el medio de crecimiento a las 24 horas por medio de crecimiento fresco.
- d) Cuando la monocapa este confluyente pasar las células en un split de 1/5.



INCISO B: AISLAMIENTO VIRAL EN CELULAS C636 HT

1. EQUIPOS

- Incubadora de 34° C.
- Flujo laminar
- Mechero
- Pipet aids
- Pipetas automáticas de 20 a 200 ul

2. MATERIALES

- Frascos de 25 cm² con monocapa celular confluyente.
- Pipetas serológicas estériles de 1 ml, 5 ml, 10 ml, 25ml.
- Marcador permanente
- Tubos de microcentrífugas de 1.5 ml estériles
- Toallas de papel
- Guantes
- Hielera

3. REACTIVOS

- Medio MEN con SBF al 2% (medio de mantenimiento)
- Cloro diluido 1/10.
- Etanol al 70%

4. PROCEDIMIENTO

- a. Descongelar las cepas que se van a utilizar, mantenerla sobre hielo.
- b. Preparar el gabinete de seguridad limpiándolo con etanol al 70%.
- c. Preparar todo lo que se va a utilizar
 - Medio de mantenimiento
 - Frasco de 25 cm² con monocapa celular confluyente
 - Tubos de microcentrífuga 1.5 ml
 - Pipetas estériles
 - Pipet aids



- Mechero
 - Beaker con cloro diluido al 10%
 - Marcador permanente
 - Toallas de papel
-
- d. Rotular los frascos de 25 cm² con el código de la muestra a inocular
 - e. Diluir 1/20 las cepas a inocular con el medio de mantenimiento
 - f. Descartar el medio del frasco de cultivo en el beaker con cloro al 10%.
 - g. Agregar lentamente los 200 ul del inóculo sobre la superficie de la monocapa celular
 - h. Incubar el frasco inoculado a 34° C durante 30 minutos.
 - i. Adicionar 5 ml de medio de mantenimiento
 - j. Incubar a 34° C durante 7 días.
 - k. Revisar diariamente los frascos en busca de efecto citopático (ECP). Cuando la presencia de ECP es igual o mayor al 50% de la monocapa celular, se cosechan inmediatamente las células, desprendiéndolas de la pared del frasco y almacenándolas en alícuotas de 140 ul a -80° C.



**INCISO C: IDENTIFICACION VIRAL POR INMUNOFLUORESCENCIA
INDIRECTA (IFI)**

1. EQUIPOS

- Flujo laminar
- Microcentrífuga
- Pipetas automáticas 20 a 1000 ul
- Incubadora de 37° C
- Congelador de –20° C o –70° C.

2. MATERIALES

- Láminas para IFI
- Vasos Koplin
- Puntas de 1 a 200 ul estériles
- Puntas de 200 a 1000 ul estériles
- Tubos de 1.5 ml estériles
- Beaker con cloro al 10%
- Marcadores permanentes
- Lápices
- Cajas para guardar laminas
- Guantes
- Toallas de papel

3. REACTIVOS

- PBS
- Acetona a 20° C



FIJACION DE LAS CELULAS INFECTADAS

- a) Descartar el medio de cultivo del frasco inoculado
- b) Desprender las células del frasco con un golpe en el fondo del frasco.
- c) Resuspender las células en 3 ml de PBS y se trasladan a un tubo centrifuga
- d) Se centrifugan a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- e) El sobrenadante se descarta y el precipitado se resuspende nuevamente en 3 ml de PBS. De esta forma las células se lavan 3 veces con PBS.
- f) Después de la última centrifugación se elimina el sobrenadante y las células se resuspenden en 1 ml de PBS.
- g) Se adiciona 10 a 15 μ l de la suspensión celular a cada pozo de la lámina de fluorescencia.
- h) Secar a temperatura ambiente
- i) Poner las laminas en un vaso koplín y adicionar acetona fría (-20° C).
- j) Dejar con acetona durante 15 minutos
- k) Eliminar la acetona
- l) Conservar las laminas a -20° C o -70° C hasta su uso

IFI

- a) Descongelar las láminas de fluorescencia. Dejarlas secar bien.
- b) Diluir los anticuerpos monoclonales según el título que posean
- c) Adicionar de 10 a 15 μ l de los anticuerpos monoclonales
- d) Incubar las láminas 30 minutos a 37° C.
- e) Colocar las laminas en un vaso koplín añadir PBS de tal manera que cubra toda la lamina, esperar 15 segundos y descartar el PBS. Realizar dos lavados mas con PBS
- f) Dejar sacar las laminas
- g) Agregar de 10 a 15 μ l del conjugado (Inmunoglobulina anti ratón con fluoresceína), diluido según título, en una dilución de azul de Evans 1/20000.



- h) Incubar 30 minutos a 37° C.
- i) Lavar 3 veces con PBS
- j) Dejar secar las laminas
- k) Agregar 3 gotas de glicerina buferada sobre la lamina y cubrirla con un portaobjeto sin hacer burbuja
- l) Observar las láminas en un Microscopio de Fluorescencia.



INCISO D: EXTRACCION EL ARN VIRAL POR EL METODO DE TRIZOL

1. Colocar 140ul de sobrenadante en un tubo eppendorf de 1.5ml.
2. Adicionar 420 µl de trizol. Incubar 5 minutos a temperatura ambiente.
3. Adicionar 112ul de cloroformo y mezclar vigorosamente por 15 segundos.
4. Centrifugar 10 minutos a 4° C a 12000rpm.
5. Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo eppendorf.
6. Adicionar 280ul de isopropanol, mezclar e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
7. Centrifugar 10 minutos a 4° C a 12000rpm.
8. Remover o descartar el sobrenadante.
9. Lavar el pellet con etanol 70% (560ul).
10. Centrifugar 1 minuto.
11. Descartar el sobrenadante cuidadosamente de no mover el pellet.
12. Dejar secar 20 minutos a temperatura ambiente.
13. Resuspender el pellet con 20 ul de agua libre de nucleasas y congelar a -80° C.

Se utiliza como control positivo sobrenadante de cultivos positivos de los serotipos de dengue y control negativo agua libre de nucleasas.



ANEXO III

PROTOCOLO DE TRABAJO DE PCR
MEZCLA DE RSS – PCR PARA DENV 1

Viales	Descripción
1	
2	
3	
4	
5	
6	
7	
8	
9	
10	
11	
12	
13	
14	
15	
16	
17	
18	
19	
20	

Reactivos	Conc. trab	Conc final	µl/vial	# viales
Buffer	10X	1X	2.5	
dNTPs	20mM	200µM	0.25	
RSS 9	10µM	0.5µM	1.25	
RSS 10	10µM	0.5µM	1.25	
RSS 11	10µM	0.5µM	1.25	
RSS 12	10µM	0.5µM	1.25	
DTT	100Mm	5mM	1.25	
TMAC	1M	0.03M	0.75	
Betaine	4M	0.5M	3.125	
MgCl₂	25mM	1.5mM	--	
AMV	1U/µL	0.005U/µL	0.125	
Amplitaq	5U/µl	0.025 U/µL	0.125	
H₂O sigma			9.4	

Volumen mezcla: 22.5 µl
Volumen muestra: 2.5 µl
Total 25 µl

PARAMETROS			
Termociclador			
	Temp	Tiemp	Prog
Rev transcrip.	42°	1h	RSS
Desnaturalización	94°	30s	RSS
Hibridación	55°	1m	RSS
Extensión	72°	2m	RSS
No. de ciclos	30		
Extensión final	72°	5m	RSS

PROTOCOLO ELECTROFORESIS

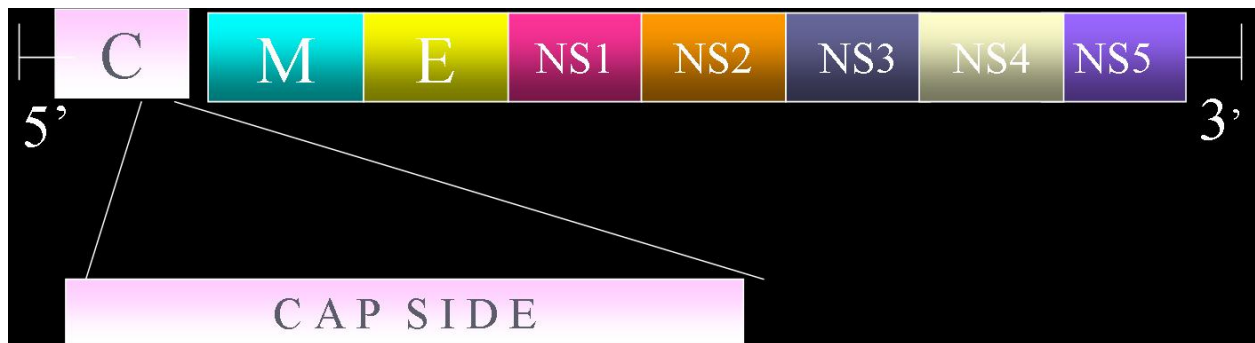
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22

Comentarios: _____



ANEXO V.

ESTRUCTURA DEL GENOMA DE VIRUS DENGUE



ANEXO VI.

REPRESENTACION ESQUEMATICA DE UN VIRION DENGUE

