

**UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS**

**FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUIMICA**

**Cátedra de Análisis Clínico**

**Estandarización de la prueba de Ensayo Inmunoenzimático para  
la detección de anticuerpos IgG en sueros de humanos para el  
virus Phlebotomus fever**

**TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE QUIMICO FARMACEUTICO**

**Br : CRISTHOPHER DONAT'S CRUZ MALPICA**

**ASESOR : Q.F. EDUARDO FLORES JUAREZ**

**COASESOR : BLG. CAROLINA GUEVARA JIMENEZ**

**Lima Perú**

**2001**

# SUMARIO

- I RESUMEN
- II INTRODUCCIÓN
- III GENERALIDADES
  - III 1. LA FAMILIA BUNYAVIRIDAE
    - III .1.1 GENERO PHLEBOVIRUS
    - II 1.2 SANDFLY FEVER
    - III 1.3 PHLEBOTOMUS FEVER EN AMERICA CENTRAL Y DEL SUR
  - III 2 ENSAYO INMUNOENZIMATICO
    - III 2.1 FUNDAMENTO
    - III 2.2 METODOLOGIA GENERAL:
- IV PARTE EXPERIMENTAL
  - IV 1. ESTANDARIZACION DEL ENSAYO INMUNOENZIMATICO ELISA IgG INDIRECTA.
    - IV 1.1 PREPARACIÓN DEL ANTIGENO LISADO
      - IV 1.1.1 MATERIALES Y EQUIPOS
      - IV 1.1.2 PROCEDIMIENTO
    - IV 1.2 TITULACION DEL ANTIGENO
      - IV 1.2.1 MATERIALES Y EQUIPOS
      - IV 1.2.2 PROCEDIMIENTO

IV 2. ANÁLISIS DE MUESTRAS PROCEDENTES DE IQUITOS.

IV 2.1 OBTENCION DE LAS MUESTRAS

IV 2.2 MATERIALES Y EQUIPOS

IV 2.3 PROCEDIMIENTO

IV 3. CONFIRMACION DE LOS RESULTADOS MEDIANTE LA  
PRUEBA DE NEUTRALIZACIÓN POR REDUCCIÓN EN  
PLACA (PRNT)

V RESULTADOS

V DISCUSION

VII CONCLUSIONES

VIII RECOMENDACIONES

IX BIBLIOGRAFÍA

X ANEXO

## I. SUMMARY

The *Phlebotomus fever* virus is an arbovirus transmitted to humans by the bites of hematofagous flies with limited flight range, which belong to the genus *Phlebotomus*, *Sergentomyia* and *Lutzomyia*. The human infection mainly occurs among people who work and live in the jungle.

An immunoenzymatic indirect assay (ELISA) was standardized in this thesis to detect antibodies IgG against the virus in human serum. This test was applied to determine the antibody seroprevalence against this virus in people coming from Iquitos. The positive case confirmation was performed using the Plaque Reduction for Neutralization Test (PRNT).

The ELISA test was performed in four stages: the antigen fixation, reaction to the serum, addition to the conjugate and reaction to the substrate. During the antigen production, the cell line Vero E-6 was used, obtaining a work dilution of 1:1500. The conjugated used is a purified antibody peroxidase labeled goat antihuman IgG, obtaining a work dilution of 1:8000.

Using the ELISA test, 400 sera from Iquitos were tested, resulting with a seroprevalence of 16.25%. When confirming the results with the PRNT trial, the ELISA test showed a specificity of 83.02% and a sensitivity of 98.24%.

I concluded that the ELISA test developed for the *Phlebotomus fever* virus is applicable to perform prevalence studies.

Key words: *Phlebotomus fever*, ELISA, PRNT.

## I. RESUMEN

El virus *Phlebotomus fever* es un arbovirus cuya transmisión al hombre ocurre por la picadura de moscas hematófagas de vuelo limitado, pertenecientes a los géneros *Phlebotomus*, *Sergentomyia* y *Lutzomyia*. La infección en humanos ocurre principalmente en personas que trabajan o viven en la selva.

En el presente trabajo se estandarizó una prueba inmunoenzimática indirecta (ELISA) para detectar anticuerpos IgG contra el virus en sueros humanos. También se aplicó esta prueba en la determinación de la seroprevalencia de anticuerpos contra dicho virus en personas procedentes de Iquitos. La confirmación de los casos positivos se realizó mediante la Prueba de Neutralización por Reducción de Placa (PRNT).

El ELISA se realizó en cuatro pasos: fijación del antígeno, reacción con el suero, adición del conjugado y reacción con el sustrato. En la producción del antígeno se utilizó la línea celular Vero E-6, siendo la dilución de trabajo 1:1500. El conjugado utilizado es un Anti IgG humano de cabra purificado y marcado con peroxidasa, siendo su dilución de trabajo 1:8 000.

Se analizó con la prueba de ELISA 400 sueros procedentes de Iquitos, encontrándose una seroprevalencia de 16.25%. Al confirmar los resultados con la prueba de PRNT, el ELISA obtuvo una especificidad de 83.02% y una sensibilidad de 98.24%. ELISA desarrollado para el virus *Phlebotomus fever* es aplicable para realizar estudios de prevalencia.

Palabras claves: *Phlebotomus fever*, ELISA, PRNT.

## II. INTRODUCCION

Durante las tres últimas décadas se han reconocido muchos virus patógenos previamente desconocidos. Estos virus aparecieron no como resultado de la mutación, sino más bien como consecuencia de cambios notables en los hábitos de vida y las prácticas de los seres humanos (39).

Los Arbovirus, debido a su amplia distribución y a su naturaleza variable tanto ecológica como genética, tienen gran potencial para surgir a partir de nichos ecológicos previamente no alterados, y producir enfermedades humanas y animales significativas (39). El término arbovirus, que deriva del inglés arthropod-borne virus (virus transmitidos por artrópodos), fue acuñado cuando se agruparon taxonómicamente a todos los virus transmitidos al ser humano (huésped accidental) por mosquitos, garrapatas, moscas y otros insectos artrópodos hematófagos (17, 18, 22, 29, 36, 37, 38, 39, 41).

Los síndromes clínicos causados por arbovirus son variados. La mayoría de virus patógenos causan fiebre aguda indiferenciada que puede complicarse con hemorragias, encefalitis, hepatitis o nefritis, según el virus infectante. Estas manifestaciones severas no son mutuamente excluyentes, algunos virus pueden llegar a producir más de una (22, 29, 36, 38).

En América del Sur existen muchas especies de arbovirus circulando, entre las principales tenemos: dengue, fiebre amarilla, encefalitis equina venezolana, oropouche, mayaro, ilheus, rocío, grupo C y el grupo Phlebotomus fever. (38).

En el Perú se logró aislar un virus perteneciente a la familia *Bunyaviridae* género *Phlebovirus* del suero de un paciente del departamento de Cuzco. Este aislamiento se realizó en el laboratorio de Virología del Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Marina de los Estados Unidos (NMRCDC). Este nuevo aislamiento genera la necesidad de contar con una prueba confiable, sensible, específica para el grupo y con la facilidad de trabajar un gran número de muestras.

El objetivo de la presente tesis es estandarizar una prueba de ensayo inmunoenzimática para la detección de anticuerpos Inmunoglobulina G, conocida como ELISA indirecta no competitiva. También se analizará sueros de personas procedentes del departamento de Iquitos; escogiéndose esta región por sus condiciones climáticas que favorecen el desarrollo de varios artrópodos vectores, entre ellos los flebotomos del género *Lutzomyia*, principales vectores del grupo *Phlebotomus fever* y por ser una zona de gran circulación de arbovirus. Los resultados obtenidos se confirmarán mediante la prueba de Reducción por Neutralización en Placa.

Durante el desarrollo de este proyecto, se tomarán medidas de Bioseguridad de nivel 2 y se utilizarán técnicas de cultivo celular e inoculación en ratones blancos lactantes (cfw, de uno a dos días de nacidos).

### III. GENERALIDADES

#### III 1. LA FAMILIA BUNYAVIRIDAE

La familia *Bunyaviridae* se constituyó en 1975 hasta abarcar un grupo grande de virus transmitidos por artrópodos que comparten propiedades morfológicas, morfogénicas y antigénicas (32). La familia incluye más de 300 miembros serológicamente distintos, divididos en 5 géneros: *Bunyavirus*, *Phlebovirus* (incluyendo el grupo *Uukuniemi*), *Nairovirus*, *Hantavirus*, géneros que infectan animales y el género *Tospovirus* que infectan a más de 400 especies en 50 familias de plantas (27, 31, 32).

La mayoría de los miembros de la familia causan una infección durante toda la vida del insecto vector. Varios tipos de insectos como mosquitos, garrapatas, moscas y otros artrópodos pueden transmitir a los *Bunyavirus*, pero cada virus infecta a un número limitado de especies de insectos y hospederos vertebrados (2, 4, 27 ). Muchos *Bunyavirus* dependen de un animal hospedero para su persistencia en la naturaleza, pero la transmisión de humano a humano generalmente no ocurre, ya que éste es un hospedero accidental ( 21,27, 31, 32).

Muchos de los aislamientos de los virus fueron obtenidos del insecto vector porque éstos tienen una infección permanente (3, 8, 9, 12, 13). El aislamiento en hospederos vertebrados da mejores resultados cuando se obtienen del suero durante el curso del cuadro febril (fase de viremia) o en tejidos, tanto de animales como en humanos recientemente muertos (17, 31).



Los sistemas de aislamiento mayormente usados son: ratones lactantes y cultivo celular. Algunos virus se replican bien en ambos sistemas, pero otros sólo pueden ser aislados en cultivo celular u hospederos vertebrados especiales. La gran mayoría de *Bunyavirus* replican en cultivos celulares como BHK-21 (1), vero E-6 o C6-36, que son frecuentemente usados para aislamiento viral y la preparación de stocks de virus. Muchos de estos virus producen un daño a la monocapa de células de vertebrados o insectos, conocida como efecto citopático (27, 31).

La forma de transmisión de diferentes géneros de *Bunyavirus* es diversa, sin embargo son semejantes dentro de cada uno de ellos (15). Miembros del género *Bunyavirus*, *Phlebovirus* y *Nairovirus* son transmitidos por artrópodos y se mantienen en un ciclo vector-vertebrado; el género *Tospovirus* también son transmitidos por artrópodos, pero mantienen un ciclo vector-planta; pero el género *Hantavirus* es mantenido exclusivamente en un ciclo animal-animal (27, 31).

En general, los factores que afectan a los artrópodos y por ende en la transmisión de un agente patógeno son:

- La capacidad del virus para atravesar el intestino del artrópodo y replicarse en las glándulas salivales, para después infectar al vertebrado.
- El tamaño de la población de artrópodos.
- Los hábitos de picadura (diurnos, nocturnos) y el alcance de vuelo del vector.
- La distribución geográfica y ecológica de cada especie de vector.

- Condiciones climáticas como: temperatura, humedad y lluvias.

Muchos Bunyavirus tienen una forma alternativa de perpetuación, manteniéndose exclusivamente en el artrópodo por transmisión transovárica (17, 28).

### III .1.1 GENERO PHLEBOVIRUS

El género *Phlebovirus* comprende dos serogrupos: *Phlebotomus fever*, y *Uukuvirus*, que originalmente se consideraron separados de este género, pero se incluyó en vista de que su organización genómica es similar (27). Mas de 50 virus están incluidos dentro de este género, separados en complejos antigénicos y que comparten características moleculares distintas a otros géneros. Estos virus son transmitidos por mosquitos o por moscas flebótomos (16). El serogrupo *Phlebotomus fever* es el causante de enfermedades significantes en humanos, y dentro de éste la fiebre del valle del Rift (Rift Valley fever) y la fiebre de moscas de arena (Sandfly fever) son los agentes más importantes médicamente y los más estudiados (8, 13, 16, 18, 19, 22, 25).

### III 1.2 SANDFLY FEVER

#### Definición

Sandfly fevers (Pappataci fever, Phlebotomus fever) son enfermedades febriles agudas indiferenciadas y autolimitadas causadas por virus del serogrupo Phlebotomus fever y transmitido por moscas del género *Phlebotomus* (sandflies) (23).

#### Etiología e Historia

Por lo menos 38 virus registrados son agrupados en el serogrupo Phlebotomus fever. De estos, 8 virus han sido recuperados de personas infectadas (Sandfly fever Naples y Sicilian, Chagres, Candiru, Punta toro, Toscana, Alenquer y Rift Valley fever). Algunos de estos virus incluyendo Sandfly fever Naples, Sicilian y Punta toro no producen enfermedades en muchos animales de laboratorio (amenos que se adapten por repetidos pasajes). Los virus Sandfly fever replican bien en cultivos celulares de Vero y BHK-21, siendo más usados para aislamientos primarios y ensayos que los animales de laboratorio (23).

La enfermedad fue conocida como Pappataci fever en Italia y la relación con moscas sandflies fue sugerida por Taussig en 1905. En 1909, una comisión de militares austriacos encabezada por Doerr, Franz y Taussig reproducen la enfermedad por inoculación de sueros procedentes de casos agudos en humanos voluntarios y demostraron que la infección puede ser transmitida por *Phlebotomus papatasi*.

---

En 1937, Moshovsky demostró la transmisión transovarial de insectos infectados a sus descendientes, que pudieron después transmitir la enfermedad a humanos voluntarios (31). El interés por *Phlebotomus fever* se incrementó durante la segunda guerra mundial debido a epidemias ocurridas en las tropas aliadas en Italia en 1943 y 1944. La historia de la fiebre sandfly está circunscrita a campañas militares (23, 31).

### **Ecología y Epidemiología**

La transmisión ocurre por la picadura de unas moscas hematófagas de vuelo limitado pertenecientes a los géneros *Phlebotomus*, *Sergentomyia* y *Lutzomyia*. *Phlebotomus papatasi* y otros *Phlebotomus*, así como especies de *Sergentomyia* son los principales vectores alrededor del Mediterráneo, en el Medio Este y a través de la península arábiga. La transmisión transtadial y transovarial probablemente sirve como un mecanismo alternativo de perpetuación del virus (19). La enfermedad asume gran importancia cuando un número elevado de personas no inmunes (tropas militares, extranjeros, refugiados) entran en áreas epidémicas.

En Centro América y América del Sur, los flebótomos del género *Lutzomyia* son los vectores principales, cuyo hábitat son los bosques. El virus también puede ser perpetuado por transmisión transtadial y transovarial en estos vectores. En América del Sur, la infección en humanos principalmente ocurre en personas que trabajan o viven en la selva (22, 31). Los virus Punta toro y Chagres

vienen siendo aislados de flebótomos panameños, *L. ylephilator* y *Lutzomyia trapidoi* que es una especie altamente antropofílica. El virus Toscana es recuperado de *Phlebotomus perniciosus* (macho y hembra) en Italia y Portugal (23).

### **Enfermedad en Humanos**

La enfermedad aparece en forma abrupta, después del período de incubación (3 a 6 días), incluyendo síntomas como: fiebre, malestar general, cefaleas, dolor retro-orbital, fotofobia, náuseas, vómitos y mialgia. La fiebre aguda dura aproximadamente 3 días, pero puede ser seguida por un periodo de debilitamiento, fatiga y depresión durante una a dos semanas (19, 22).

La inmunidad homóloga es probablemente por toda la vida; sin embargo el título de anticuerpos neutralizantes disminuye significativamente después de 20 años. La infección con el virus de Naples no confiere protección contra el serotipo de Sicilian o viceversa, porque ambas enfermedades ocurren juntas en áreas endémicas (23).

### **Diagnóstico**

Durante la fase aguda de la enfermedad, el virus puede ser aislado de la sangre por inoculación en cultivo de células o en ratones. Un diagnóstico serológico por inhibición de la hemaglutinación, fijación del complemento, ELISA de captura para anticuerpo IgM, o inmunofluorescencia indirecta; es realizado en muestras pareadas (fase aguda y convalescente) (19, 23).

### III 1.3 PHLEBOTOMUS FEVER EN AMERICA CENTRAL Y DEL SUR

En las Américas han sido aislados seis virus *Phlebotomus fever* asociados con enfermedades humanas: cuatro en Brasil (Alenquer, Candiru, Morumbi y Sierra Norte) y dos en Panamá (Chagres y Punta toro) (10).

#### **Etiología**

Estudios con microscopía electrónica de los virus Chagres y Punta toro, revelaron que son esféricos con un diámetro medio de 100nm (2). La replicación en cultivos celulares de mamíferos producen placas o efecto citopático (10).

#### **Epidemiología**

Los seis agentes ocurren sólo en Brasil y Panamá. Se obtuvo aislamientos de cada uno de los cuatro phlebovirus de Brasil, todos de humanos. Los dos virus de Panamá fueron aislados de personas y de mosca flebótomos. Menos del 1% de personas de la región amazónica de Brasil examinadas tuvieron anticuerpos contra Alenquer o Candiru. En Panamá se encontró un alto grado de inmunidad para Chagres y Punta toro, particularmente de este último.

No se conocen los vertebrados hospederos de estos virus. Chagres y Punta toro son repetidamente aislados de hembras *Lutzomyia*, particularmente de *L. trapidoi*, aunque también son recuperados de machos *Lutzomyia* (10).

### **Infección en animales**

No se reportaron enfermedades en animales domésticos o salvajes. Los seis agentes causan una infección en ratones lactantes. Chagres mata a hamsters adultos, y Punta toro causa una infección letal en hámsters recién nacidos; hamsters jóvenes se vuelven virémicos y sobreviven siguientes inoculaciones con el virus Candiru.

### **Infección en humanos**

El cuadro clínico consiste de fiebre, cefalea, escalofrío y mialgia; también pueden estar presentes: dolor retroorbital, náuseas, vómitos y postración (2). Inoculando sueros los virus pueden ser aislados en ratones o en cultivo celular Vero (26).

### **Tratamiento y prevención**

El tratamiento es sintomático. La infección puede ser prevenida mediante vestimentas protectoras apropiadas y repelentes de insectos antes de ingresar a zonas donde el vector infectado pueda estar circulando (26). El uso de insecticidas residuales (DDT) tiene resultados efectivos en el control del vector (19). El impacto en Salud Pública causado por los phlebovirus es desconocido (26).

**Tabla 1. DISTRIBUCION GEOGRAFICA DEL GENERO**

**PHLEBOVIRUS EN AMERICA CENTRAL Y DEL SUR**

COMPLEJO	VIRUS	SUBTIPO	DISTRIBUCION
Bujaru	Bujaru (19)* Munguba (19)*		Brazil Brazil
Rift Valley fever	Rift Valley fever (19)	Rift Valley fever Belterra	Africa Brazil
Candiru	Icoaraci (19)* Candiru (19)* Alenquer (19)* Itaituba (19)*  Nique (19)* Turuna (19)*	Itaituba Oriximina	Brazil Brazil Brazil Brazil Brazil Panama Brazil
Punta Toro	Punta Toro (19)*	Punta Toro Buenaventura	Panama Colombia, Panama
Frijoles	Frijoles (19)* Joa (19)*		Panama Brazil
Chilibre	Chilibre (19)* Cacao (19)*		Panama Panama
No asignados a Complejos	Aguacate (19)* Anhanga (19)* Caimito (19)* Chagres (19)* Pacui (19)* Urucuri (19)* Morumbi (26)* Sierra Norte (26)* Ambe (20)* Ixcanal (20)* Mariquita (20)* Durania (20)* Armero (20)*		Panama Brazil Panama Panama Brazil, Trinidad. Brazil Brazil Brazil Brazil Brazil Brazil Brazil

**\*Citas Bibliográficas**



## **III 2. ENSAYO INMUNOENZIMATICO**

Los inmunoensayos ligados a enzimas (EIAs) están tomando un rol importante en los laboratorios médicos y de investigación, porque brindan una alternativa viable, mediante la cual es posible realizar la identificación de muchos virus a nivel de género. Estas pruebas están reemplazando a los radioinmunoensayos en muchos laboratorios, por su comparable sensibilidad sin los problemas de manejo, eliminación y corto tiempo de vida de los materiales radioactivos (5, 7, 11, 14, 24).

Por su objetividad, facilidad de automatización y posibilidad de trabajar con un gran número de muestras, los ensayos inmunoenzimáticos vienen reemplazando parcialmente a una variedad de técnicas en el laboratorio como son inmunofluorescencia y aglutinación. Como en el EIA el antígeno o el anticuerpo está adsorbido a una fase sólida, este ensayo también es denominado Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas (ELISA) (5, 30, 34, 40).

### **III 2.1. FUNDAMENTO**

La prueba de ELISA se basa en la reacción antígeno-anticuerpo, uno de los cuales debe ser de reactividad conocida. El color se genera por la interacción de un sustrato cromogénico y una enzima que ha sido acoplada al anticuerpo detector. Si debe medirse el anticuerpo, se coloca el antígeno en la fase sólida, como una capa de captura. Después de la reacción del antígeno con el suero del paciente, la capa de detección puede ser un reactivo antiinmunoglobulina clase

específica (IgM o IgG) para detectar respuesta de anticuerpos clase específicos (ver figura 1) (5, 7, 11, 14, 24, 30, 33, 34, 35, 40).

Dentro de los parámetros fisicoquímicos que intervienen en la unión del antígeno con el anticuerpo tenemos:

- Fuerzas de Van der Waals producidas por el movimiento de átomos en la superficie de las moléculas generado por un cambio eléctrico. Son fuerzas débiles presentes cuando la proximidad del Ag y el Ac es grande.
- Fuerzas electrostáticas originadas por la fuerza de atracción entre moléculas de carga iónica opuesta, como sucede con los grupos  $\text{NH}_3^+$  que reaccionan ávidamente con el grupo  $\text{COOH}^-$ .
- Uniones por puentes de hidrógeno son de carga energética baja entre átomos electropositivos de hidrógeno y átomos electronegativos de oxígeno o nitrógeno.

### **III 2.2. METODOLOGIA GENERAL:**

Los métodos de ELISA dependiendo de la actividad enzimática se dividen en dos tipos: competitivos y no competitivos (5).

**ELISA COMPETITIVO:** En este método, el anticuerpo de la muestra va a competir con el conjugado por un número limitado de sitios de unión del antígeno. Habrá ausencia de color en una muestra positiva debido a que el sustrato no encontrará a la enzima porque el conjugado ha sido desplazado por el anticuerpo presente en la muestra.

ELISA NO COMPETITIVO: Consiste en enfrentar la muestra con el antígeno o anticuerpo que está en la fase sólida. Si una muestra es positiva se formará el complejo antígeno-anticuerpo y al agregar el conjugado reaccionará con el respectivo sustrato desarrollando color (7, 11, 14).

Dentro de los no competitivos tenemos, los directos que detectan antígenos y los indirectos que detectan anticuerpos. En la presente investigación se utilizará la modalidad de ELISA no competitiva indirecta.

### **Fijación del Antígeno a la fase sólida:**

La reacción inmunológica tiene lugar en la fase sólida, ésta puede ser de plástico, vidrio o nitrocelulosa. Actualmente los mas usados son los de plástico, dentro de estos los de poliestireno gammairradiados y los de cloruro de polivinilo porque tienen mayor capacidad para formar enlaces estables que los de poliestireno no tratados.

El antígeno diluido en buffer es adherido a la fase sólida por enlaces electrostáticos entre los sitios activos del plástico y regiones de la proteína responsables de esta interacción. El buffer puede ser carbonato a pH 9.6 o buffer fosfato salino ( PBS 1X ) a pH 7.4.

La estabilidad de los enlaces electrostáticos, el tiempo de incubación y la temperatura son factores importantes a tener en cuenta para evitar pérdidas de las proteínas y que pueden afectar la sensibilidad del ensayo.

### **Reacción con anticuerpo:**

La reacción del antígeno con el anticuerpo se debe realizar en condiciones similares a las fisiológicas pH 7.4, temperatura de 37°C y concentración salina equivalente a 0.15M de NaCl. Estas condiciones pueden variar dentro de un rango razonable sin afectar la reacción. El tiempo puede variar entre 1 a 3 horas.

Moléculas no específicas en solución pueden adherirse a la fase sólida afectando el resultado final del ensayo, para disminuir este riesgo se suele agregar al medio de reacción un exceso (0.1% a 1%) de una proteína inerte para que compita eficientemente por los sitios de unión inespecíficos en la fase sólida. Esta proteína puede ser seroalbúmina bovina, caseína, suero entero, gelatina u otros.

También es necesario añadir al medio tween 20 para evitar uniones inespecíficas de macromolécula. Por este motivo es agregado en los tampones de dilución y de lavado.

### **Adición del conjugado enzimático:**

El conjugado enzimático se prepara por unión covalente de una enzima con el anticuerpo; esta enzima puede ser peroxidasa de rábano (Horseradish peroxidase, HRP), fosfatasa alcalina (Alcaline Phosphatase, AP) o beta-galactosidasa. Los criterios a tomar en cuenta en la selección de la enzima apropiada son su toxicidad, estabilidad, disponibilidad, viabilidad de conjugarla eficazmente con el anticuerpo elegido, sensibilidad y precio.

Las condiciones de reacción entre el conjugado y el complejo formado por la unión antígeno-anticuerpo son similares a las descritas en la etapa anterior.

**Adición del sustrato:**

La elección del sustrato va de acuerdo con el tipo de enzima presente en el conjugado. El sistema AP hidroliza al p-nitrofenil fosfato o p-nitrofenol generando un producto soluble de color amarillo. El sistema HRP reduce al sustrato peróxido de hidrógeno produciendo oxígeno que oxida a otros compuestos cromógenos tales como:

Tetrametilbenzidina (TMB), cuya oxidación genera un producto de color azul oscuro.

o-phenylene diamine (OPD), que es oxidado a un producto coloreado que varía del naranja al pardo oscuro.

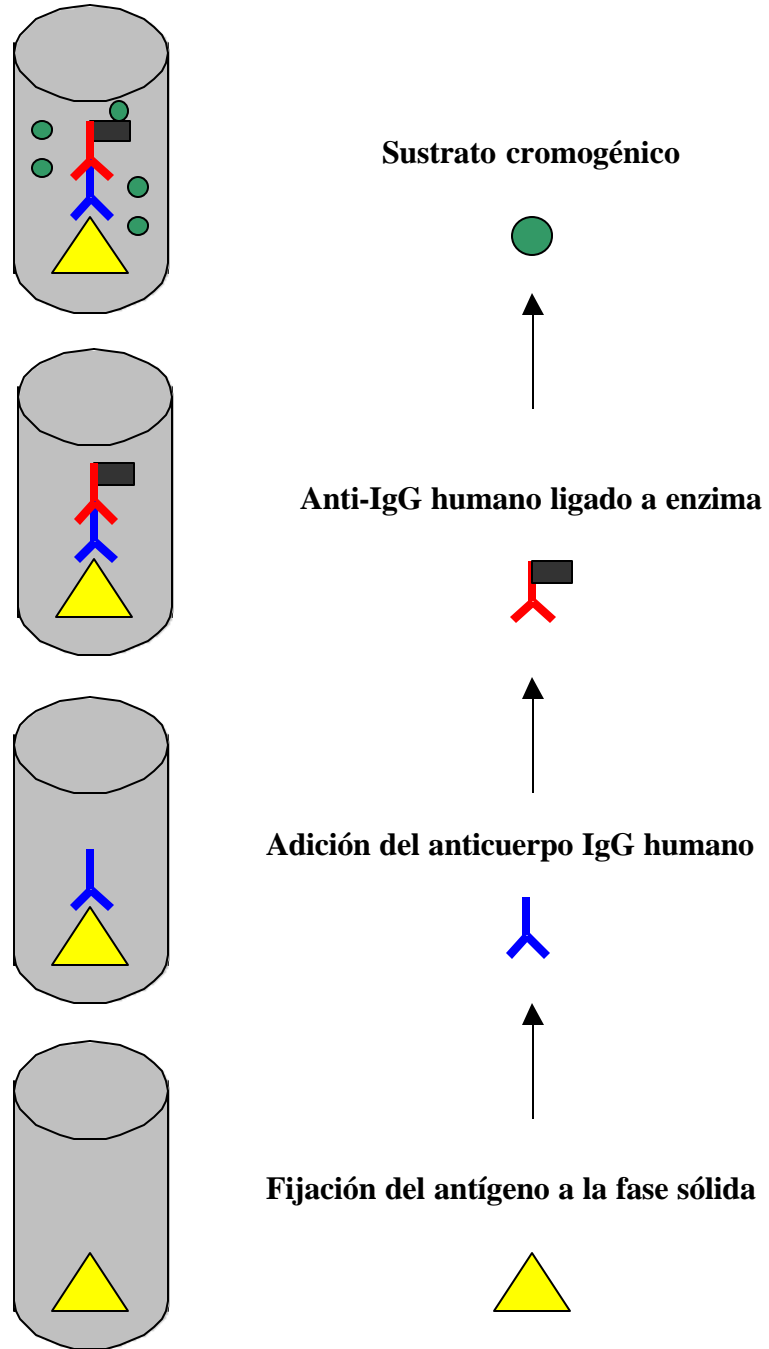
Acido azino-(3-etil)-benzo-sulfónico (ABTS), cuya oxidación genera un producto que va del verde al azul.

La intensidad del color desarrollado es de acuerdo con la cantidad de enzima presente en la reacción.

La lectura se realiza en un espectrofotómetro a 405 nanómetros (7,11, 24).

Figura 1. INMUNOENSAYO ENZIMATICO PARA ANTICUERPOS IgG

METODO NO COMPETITIVO INDIRECTO



## IV PARTE EXPERIMENTAL

### IV 1. ESTANDARIZACION DEL ENSAYO INMUNOENZIMATICO ELISA IgG INDIRECTA.

#### IV 1.1. PREPARACION DE ANTIGENO LISADO

##### IV 1.1.1 MATERIALES Y EQUIPOS

1. Suero OBS 6528 ( muestra de brote epidémico).
2. Ratones lactantes de 1 o 2 días de nacidos (cepa CFW-Charles River).
3. Cultivo celular de línea VERO E-6 (riñon de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*).
4. Medio de crecimiento: E-MEM (calidad biológica) con 10% de suero bovino fetal (Sigma).
5. Medio de mantenimiento: E-MEM (calidad biológica) con 2% de suero bovino fetal (Sigma).
6. Solución de Borato salino pH 9.0.
7. Guantes de Látex.
8. Frascos para cultivo celular de 250ml.
9. Pipetas serológicas de 1, 5, 10, 25ml.
10. Tubos de centrifuga Oakridge de polipropileno de 50ml.
11. Crio – viales NUNC™ de 1.8ml.
12. Incubadora de 37°C (Forma Scientific- Modelo 3315).
13. Pipeteador electrónico (Drummond).
14. Centrifuga refrigerada (International Equipment Company IEC-B 22M).

15. Cabina de flujo laminar (Bellco Glass Inc., Modelo 8001-76000).
16. Sonicador (Virsonic 300 cell Disrupter Virtis Company).
17. Congeladora de -70°C Harris Ultra low.
18. Hielo.

#### **IV 1.1.2 PROCEDIMIENTO**

##### **1. Preparación de semilla viral :**

Esta etapa se realizó con el fin de incrementar la carga viral en ratones lactantes a partir del suero OBS 6528.

- 1.1. Se realizó una dilución 1 en 5 del suero y se inoculó 20ul por vía intracraneal a 7 camadas de ratones, empleando una jeringa de 1ml. con una aguja N°27 3/8".
- 1.2. Se observó los ratones diariamente. Cuando éstos, presentaron signos de morbilidad (ausencia de leche en su estómago, coloración oscura, delgados, descoordinación de movimientos, temblores y postración), se procedió a aplicar la eutanasia, colocándolos en una bolsa, que se saturó con CO<sub>2</sub> y mantuvo cerrada durante 30min.
- 1.3. Se extrajo el cerebro de los ratones con una jeringa de 10ml. y aguja N°18 1.5", colocándolos en frascos estériles puestos en baño de hielo; luego se procedió a ser triturados. Toda esta operación se realizó dentro de la cabina de flujo laminar.



- 1.4. Con el volumen de cerebro obtenido se preparó una suspensión al 10% v/v en H-MEM con 2% de suero bovino fetal (FBS), luego se centrifugó a 10 000 rpm por 10min. a 4°C.
- 1.5. El sobrenadante se repartió en viales de 1.8ml. conservándolos a una temperatura de -70°C.

## **2. Preparación del Antígeno lisado :**

- 2.1. Se utilizó 10 frascos en “T” para cultivo celular de 250cm<sup>2</sup> conteniendo una monocapa de células Vero E-6 de 3 a 4 días de cultivo.
- 2.2. Se decantó el medio de crecimiento (E-MEM con 10% de FBS) de los frascos, quedando sólo la monocapa de células adheridas a la superficie del frasco.
- 2.3. En 5 frascos se inoculó 1ml. de medio de mantenimiento (E-MEM con 2% de FBS) a cada uno, los cuales servirán para obtener el control sin virus de antígeno.
- 2.4. En los 5 frascos restantes se inoculó 1ml. por frasco del antígeno viral obtenido en cerebro de ratón.
- 2.5. Se incubó los frascos a 37°C por 1 hora, mover cada frasco suavemente cada 15min. con la finalidad de distribuir uniformemente el inóculo.
- 2.6. Se agregó a cada uno de los 10 frascos, 50ml. de medio de mantenimiento (E-MEM con 2% FBS).

- 2.7. Se observó diariamente los 5 frascos inoculados con el virus mediante un microscopio invertido; cuando se observó un efecto citopático (ECP) producido en la monocapa celular de 50% a 75% se procedió a cosechar desprendiendo totalmente la monocapa con la ayuda de una espátula estéril. Se procedió de la misma forma con los 5 frascos controles.
- 2.8. Se verificó la presencia del virus en la línea celular mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta.
- 2.9. Se trasvasó el barrido de células a tubos de centrifuga Oakridge de 50ml., luego se centrifugó a 10 000rpm por 30min. a 4°C.
- 2.10. Se descartó el líquido sobrenadante y lavó el pellet con 3ml. de borato salino a pH 9, después se centrifugó como en el paso anterior. Se repitió este procedimiento 2 veces, en la tercera juntar los pellet de las células infectadas en un tubo de centrifuga y los pellet de las células control en otro.
- 2.11. Se resuspendió el pellet lavado, con 5ml /tubo. de borato salino pH 9 (1ml. por frasco de 250cm<sup>2</sup> cosechado) conteniendo 1% de triton 100X.
- 2.12. Se inactivó la suspensión adicionando tris 1M a una concentración final de 0.1M, luego se agregó  $\beta$ -propiolactona a una concentración final de 0.2%. La suspensión final se dejó a 4°C durante 72 horas agitando cada cierto tiempo.

2.13. Se sonicó la suspensión 3 veces durante 15 segundos para lisar las células que deben estar en un recipiente con hielo.

2.14. Se centrifugó a 5 000rpm. durante 30min, luego se dispensó en criotubos de 1.8ml y rotuló.

#### **IV 1.2 TITULACION DEL ANTIGENO**

El antígeno lisado de *Phlebotomus fever* se somete a esta prueba con el objetivo de determinar la óptima concentración para ser usada en la prueba de ELISA IgG indirecta.

##### **IV 1.2.1 MATERIALES Y EQUIPOS**

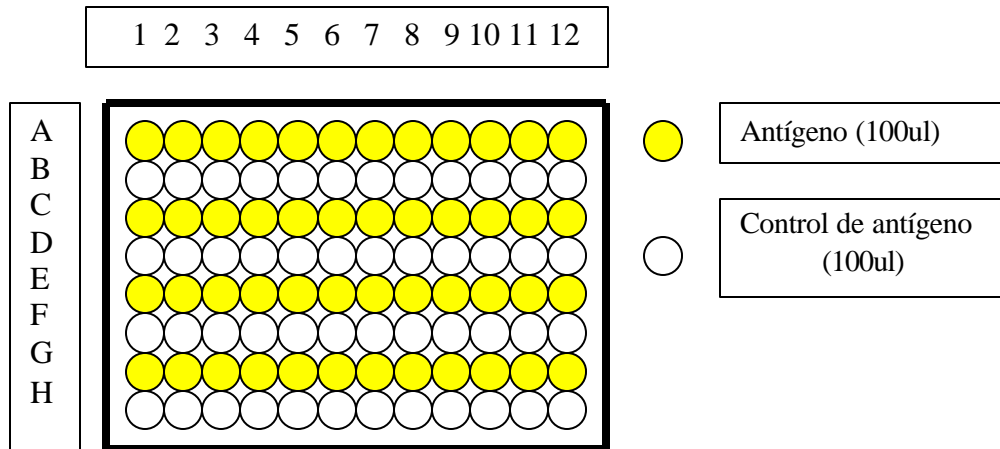
1. Tubos de centrifuga:
2. Pipetas serológicas de 10, 5 y 1ml.
3. Pipeta multicanal de 10 - 100ul.
4. Micropipetas de 0,5 - 20ul, 10 – 100ul y 100 – 1000ul.
5. Puntas de pipetas (tips).
6. Placa flexible fondo en U (Dinex).
7. Antígeno lisado.
8. Fluido ascítico hiperinmune de ratón (HMAF); liofilizado.
9. Buffer de dilución (pH 7.4) : Leche descremada al 5% en buffer fosfato salino (PBS 1X) y tween 20 al 0.5%.
10. Medio Esencial Mínimo con sales de Hank conteniendo 1% de antibiótico (H-MEM 1% Ab).

11. Buffer de lavado: PBS 1X y Tween 20 al 1%
12. Conjugado IgG: Anti IgG humano de cabra purificado y marcado con peroxidasa.
13. Sustrato ABTS: 2.2'-azino-di [3-etil-benzotiazolin sulfonato (6)].
14. Lavador de placas para ELISA (Dynatech Ultra Wash-II).
15. Lectora de placas para ELISA (DYNEX MRX Revelation).

#### **IV 1.2.2. PROCEDIMIENTO**

1. Se preparó diluciones de 1:500, 1:1000, 1:1500, 1:2000, 1:3000 y 1:6000 del antígeno, utilizando PBS 1X como diluyente (ver cuadro 1).
2. Se colocó 100ul/pozo de cada dilución en las placas para ELISA de 96 pozos. El antígeno se coloca en las filas A, C, E y G; mientras que el control de antígeno en las filas B, D, F y H. Empleándose dos filas por cada dilución, una para el antígeno y otra para el control. (Ver esquema 1.)
3. Se cubrió las placas con papel aluminio e incubar a 4°C por toda la noche.
4. Al día siguiente se lavó las placas por un ciclo (5 lavados), usando 250ul/pozo de buffer de lavado por vez.

**ESQUEMA 1. PLACA DE ELISA CON DISPOSICION DEL ANTIGENO Y CONTROL DE ANTIGENO**



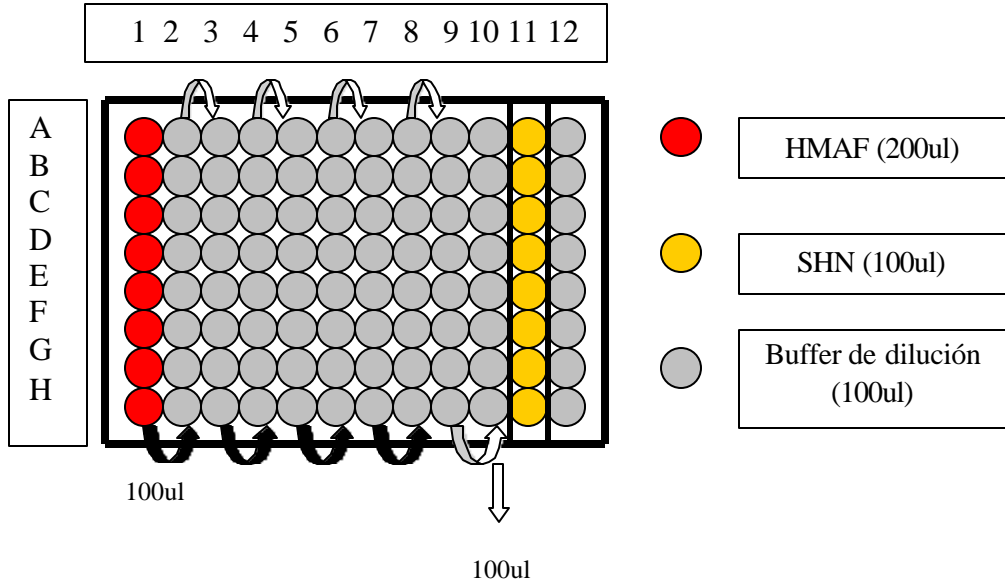
**CUADRO 1. PREPARACION DE LAS DILUCIONES DEL ANTIGENO**

	<b>1:500</b>	<b>1:1 000</b>	<b>1:1 500</b>	<b>1:2 000</b>	<b>1:3 000</b>	<b>1:6 000</b>
<b>PBS 1X</b>	6 986 ul	2 000 ul	2 000 ul	3 000 ul	2 000 ul	2 000 ul
<b>ANTIGENO LISADO</b>	14 ul (puro)	2 000 ul (1:500)	1 000 ul (1:500)	1 000 ul (1:500)	1 000 ul (1:1 000)	1 000 ul (1:2 000)
<b>VOLUMEN FINAL</b>	7 000 ul	4 000 ul	3 000 ul	4 000 ul	3 000 ul	3 000 ul

NOTA: 1 El control de antígeno se trabaja a las mismas diluciones.  
 2 El volumen final es suficiente para sensibilizar dos placas.

5. Después de cada lavado se removió el exceso de buffer, golpeando la placa sobre un papel absorbente.
6. Se colocó 100ul/pozo de buffer de dilución en las columnas 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 12; en la columna 1 se colocó 200ul/pozo de una dilución 1:100 del fluido ascítico hiperinmune (HMAF) con buffer de dilución y en la columna 11 se agregó 100ul/pozo de suero humano normal (SHN) como control negativo diluido 1:100 con buffer de dilución. (Ver esquema 2.)
7. Usando una pipeta de 8 canales se mezcló y transfirió 100ul de la columna 1 a la 2, luego se continuó mezclando y transfiriendo de la misma forma hasta la columna 10, eliminando los 100ul sobrantes. (Ver esquema 2.)
8. Se cubrió las placas con papel aluminio e incubó a 37°C por una hora.
9. Se lavó las placas y secó como en los pasos 5 y 6.
10. Se agregó 100ul/pozo de conjugado diluido 1:8000.
11. Se procedió como se describe en los pasos 8, 5 y 6 sucesivamente.
12. Se agregó 100ul/pozo de sustrato.

**ESQUEMA 2. PLACA DE ELISA CON DISPOSICION DEL FLUIDO ASCITICO HIPERINMUNE (HMAF), SUERO HUMANO NORMAL (SHN) Y BUFFER DE DILUCION**



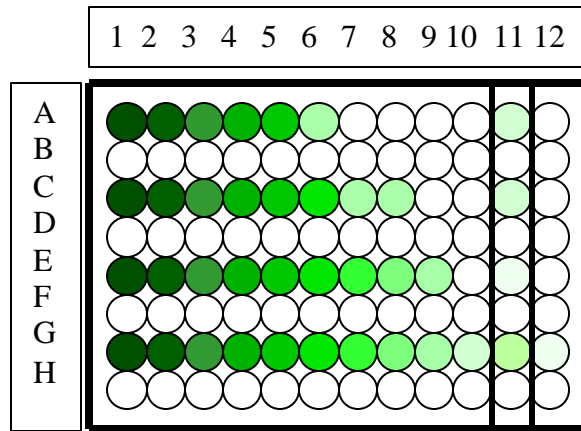
**CUADRO 2. DILUCIONES SERIADAS DEL HMAF**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	N	O
D	0	0	0	0	0	0	0	8	6	2	S	A
E	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	H	N
F	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512		C
G					1	1	1	1	1	1		B
H												L

13. Se incubó cubriendo las placas con papel aluminio a 37°C por 30 minutos.
14. Luego se procedió a leer las placas en un espectrofotómetro a 405 nm.
15. El título óptimo está dado por la concentración de antígeno que proporciona el título más alto con el fluido ascítico hiperimmune (HMAF); y que de una lectura baja para el control negativo y para el blanco (Ver esquema 3).  
  
La lectura de la primera dilución del HMAF (1:100) debe estar entre 1.5 - 3.0 de O.D. y las lecturas de las siguientes diluciones deben bajar gradualmente, describiendo una curva.



**ESQUEMA 3. RESULTADO DE LA TITULACION**



- Se escoge la dilución del antígeno con el título mas alto, además que a la vez tenga los valores mas bajos para el control negativo y para el blanco.

## **IV 2. PRUEBA INMUNOENZIMATICA ELISA IgG INDIRECTA**

### **IV 2.1. OBTENCION DE LAS MUESTRAS :**

Los 400 sueros analizados en la prueba inmunoenzimática fueron proporcionados por el Instituto de Investigación de Enfermedades Tropicales NMRC. Muestras procedentes de Iquitos de los años 95 al 98.

Los criterios de inclusión son: Pacientes con fiebre mayor de 38°C. Y que posteriormente a las tres semanas de iniciada la enfermedad se requirió una segunda toma de muestra

### **IV 2.2. MATERIALES Y EQUIPOS**

1. Tubos de centrifuga:
2. Pipetas serológicas de 10, 5 y 1ml.
3. Pipeta multicanal de 10 - 100ul.
4. Micropipetas de 0,5 - 20ul, 10 – 100ul y 100 – 1000ul.
5. Puntas de pipetas (tips).
6. Placa flexible fondo en U de 96 pozos (12x8) (Dinex).
7. Lavador de placas para ELISA (Dynatech Ultra Wash-II).
8. Lectora de placas para ELISA (DYNEX MRX Revelation).
9. Antígeno lisado.
10. Sueros controles positivo y negativo.

11. Buffer de dilución (pH 7.4): Leche descremada al 5% en PBS 1X y Tween-20 al 0.5%.
12. Medio Esencial Mínimo con sales de Hank conteniendo 1% de antibiótico (H-MEM 1% Ab).
13. Buffer de Lavado: PBS 1X y Tween 20 al 1%
14. Conjugado IgG: Anti IgG humana de cabra, purificado y marcado con peroxidasa.
15. Sustrato ABTS : 2.2'-azino-di [ 3 – etil - benzotiazolin sulfonato (6)].

## **IV 2.3. PROCEDIMIENTO**

### **IV 2.3.1. SENSIBILIZACION DE LAS PLACAS:**

1. Se preparó por separado diluciones del antígeno viral y del control de antígeno, a las concentraciones óptimas halladas en la titulación (dilución 1:1 500); utilizando como diluyente PBS 1X.
2. Se colocó 100ul de las diluciones respectivas en filas alternadas empezando con el antígeno en la primera fila.
3. Se cubrió las placas con papel aluminio e incubar a 4°C durante toda la noche.

#### **IV 2.3.2. DILUCION DE LAS MUESTRAS**

1. A todos los sueros, incluyendo los sueros controles positivo y negativo; se les hizo una dilución 1:10, colocando en los microtubos 0.9ml de H-MEM 1% antibiótico con 0.1ml de suero y se almacenaron a -20°C.

#### **IV 2.3.3. EL ENSAYO**

1. Se realizó una segunda dilución 1:10 de los sueros, utilizando como diluyente el buffer de leche al 5% y pH 7.4. Se empleó 450ul de buffer diluyente con 50ul de suero pre-diluido. Siendo 1:100 la dilución final del suero.
2. Se lavó las placas por un ciclo ( 5 veces ) y remover el remanente de buffer de lavado golpeando la placa sobre papel absorbente.
3. Se agregó 100ul de la dilución final de los sueros a los pozos apropiados. En la primera columna, los dos primeros pozos (uno con antígeno viral y otro con control de antígeno) fueron para el suero control positivo y los siguientes seis pozos (tres con antígeno viral y tres con control de antígeno) para el suero control negativo, que se coloca por triplicado.
4. Se incubó por una hora y continuó con los procedimientos descritos en la titulación del antígeno (IV 1.2.2 8-14).
5. Luego se procedió a leer a 405 nm. e interpretó los resultados dando como positivos a aquellos que posean valores de O.D. mayor o igual a 0.200 y como negativos a los que presenten un valor de O.D. menor a 0.200.

### **IV 3. CONFIRMACION DE LOS RESULTADOS MEDIANTE LA PRUEBA DE NEUTRALIZACION POR REDUCCION DE PLACA**

La neutralización de la infectividad viral es el método más específico y sensible para determinar la identidad de un aislamiento y la determinación de anticuerpos específicos presentes en el suero de un paciente (24, 30, 35).

Si hay anticuerpos neutralizantes los virus no pueden unirse a las células y la infectividad resulta bloqueada. Una fracción de virus infectante puede permanecer aún en presencia de anticuerpo específico, de modo que la infección puede estar demorada, más que totalmente bloqueada. Para identificar los aislamientos virales se utilizan anticuerpos de reactividad conocida. Para pruebas serológicas, se utilizan suspensiones de virus de referencia contra los sueros de pacientes (1, 24, 30, 35).

Las células infectadas aparecen como “placas” sin color contra el fondo coloreado de las células viables. La reducción en el número de placas indica neutralización (1, 24).

### IV 3.1. MATERIALES Y EQUIPOS

1. Monocapa completa de células BHK-21 clón 15 (células de riñón de hamster dorado bebe) en frascos de cultivo celular de 225 cm<sup>2</sup>.
2. Sueros que dieron positivo para la prueba de ELISA IgG.
3. Suministro de semillas del virus *Phlebotomus fever* producidas en cerebro de ratones lactantes y en cultivo celular Vero E-6.
4. Suero bovino fetal (SBF) diluido al 2% en E-MEM.
5. Medios: MEM con 10% de SBF y medio para cubierta líquida (liquid Over Layer).
6. Solución de tripsina al 0,75% y colorante para células BHK-21 clón 15 (azul negro de naftol)
7. Microplacas de 96 pozos.
8. Placas para cultivo celular de 12 y de 24 pozos.
9. Tubos de 5ml de capacidad.
10. Micropipetas de 10 a 100 ul y de 2 a 20 ul de capacidad con puntas estériles.
11. Pipetas estériles de 10, 5 y 1ml.
12. Incubadora a 37°C con 5% CO<sub>2</sub>.
13. Hemocitómetro.
14. 0,4% de azul de tripán.

## IV 3.2. PROCEDIMIENTO

### IV 3.2.1 Preparación del cultivo de células BHK-21 clon 15 para PRNT

1. Tripsinizar la monocapa celular BHK21 clón 15 con solución de tripsina, luego se eliminó el medio de crecimiento viejo, lavar la capa de células con solución de tripsina (0.75%) y agregar 3ml de la misma solución dejándolo durante 2 a 5 minutos, eliminar la solución de tripsina y mantenerlas en incubadora a 37<sup>0</sup>C hasta que la capa de células se desprenda de la superficie del frasco.
2. Agregar 10 ml del medio de crecimiento al frasco, agitar manualmente para que las células se desprendan y mezclar la suspensión de células con una pipeta dos o tres veces para romper los acúmulos de células.
3. Contar las células viables en un hemocitómetro utilizando 0,4% de azul de tripán (por lo general hacer una dilución 1:10 de la suspensión de células en azul de tripan).
4. Calcular el total de células que se obtiene: **promedio del conteo celular en 4 cuadrantes x 10<sup>4</sup> x 10 x 10 = X células/10 ml.**
5. Calcular el volumen total de medio que se agregará en la suspensión celular obtenida en el paso 2. para obtener una concentración de 3 x 10<sup>5</sup> células/ml mediante:

$$\text{volumen total} = X \text{ células (4.)} / 3 \times 10^5 = Y \text{ cm}^3$$

6. Agregar la suspensión final en placas de 12 y de 24 pozos, 1ml/pozo y 0.5ml/pozo respectivamente.

#### **IV 3.2.2 Titulación del virus *Phlebotomus fever* (virus replicado en células Vero)**

1. Realizar diluciones del stock de virus comenzando desde la inoculación pura del virus, seguida de una dilución diez veces mayor que la anterior; hasta llegar a cien mil.
2. Inocular 100ul/pozo de cada dilución preparada, en dos pozos para las placas de 12 y 50ul/pozo en cuatro pozos para las placas de 24.( Ver esquema 4.)
3. Incubar la placa a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 2 a 3 horas.
4. Adicionar la cubierta semilíquida ‘liquid Over Layer’ a las placas. En 0.5 ml/pozo a las placas de 24 pozos y 1ml/pozo a las placas de 12 pozos
5. Mantener las placas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>, realizando ensayos para 2, 3, 5 o mas días (se puede observar el efecto citopático bajo el microscopio).
6. Eliminar el medio líquido, lavar la capa de células con agua y colorear agregando 1ml/pozo (placas de 12) y 0.5ml/pozo (placas de 24 pozos) de azul negro de naftol para cubrir la capa de células, dejar a temperatura ambiente por 60 minutos y lavar con agua.



7. Contar las placas y escoger las diluciones que contengan alrededor de 20 ufp para las placas de 12 y 10 ufp para las de 24 pozos. Si es necesario se realizarán diluciones más finas hasta obtener la cantidad de placas deseadas.
8. Realizar la prueba de neutralización con fluido ascítico hiperinmune y con los sueros controles positivo y negativo para ELISA. El HMAF es para asegurarse de que se trata del virus Phlebotomus fever y los controles de ELISA es para verificar de que sean controles verdaderos.

#### **IV 3.2.3. Procedimiento de PRNT**

1. Preparar la dilución de trabajo (DT); esta es la mitad de la dilución de virus que forma 10 placas en un volumen de 0,05 ml. Hacer una dilución 1:10 ( $DT^{-1}$ ) y otra de 1:100 ( $DT^{-2}$ ).
2. Diluir las muestras de suero humano inactivadas ( $56^{\circ}C$  por 30min.) a una concentración de 1:15 y 1:30 en diluyente (H-MEM con 2% de SBF) y agregar 0,06 ml/pozo en placas de 96 pozos.
3. Agregar 0,06 ml de la dilución de trabajo en 0,06 ml de la dilución del suero (dilución final del suero 1:30 y 1:60), incubar la placa a  $4^{\circ}C$  toda la noche, incluir la parte del control DT,  $DT^{-1}$ ,  $DT^{-2}$  (0,06ml con igual volumen de diluyente).

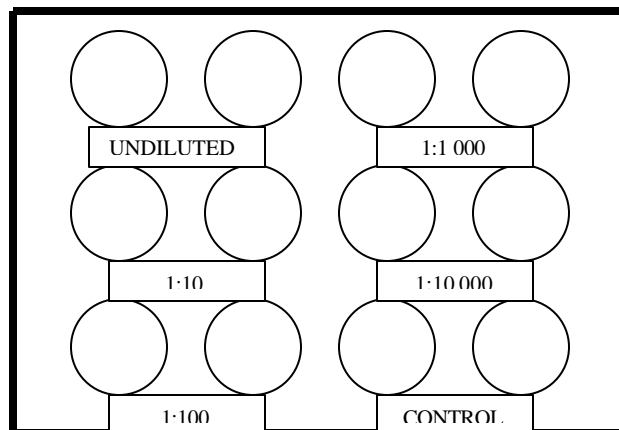
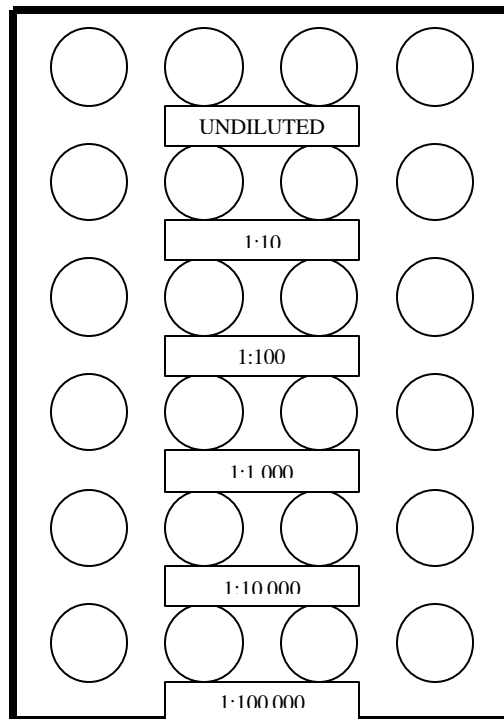
4. Añadir la mezcla obtenida en el paso anterior en una placa de 24 pozos (0,05 ml/pozo), las cuales contengan células BHK21 clón 15 (preparar las placas justo antes de inocular las muestras).
5. Incubar la placa a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 2 a 3 horas.
6. Adicionar la cubierta semilíquida ‘liquid Over Layer’. 0.5 ml/pozo a las placas de 24 pozos.
7. Mantener las placas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub> por 3 días (se puede observar el efecto citopático bajo el microscopio).
8. Eliminar el medio líquido, lavar la capa de células con agua y colorear agregando 0.5ml. de colorante azul negro de naftol para cubrir la capa de células, dejar a temperatura ambiente por 60 minutos y lavar con agua.
9. Contar las placas y calcular el porcentaje de reducción de placas con la fórmula:

$$\% = \frac{\text{N}^\circ \text{ ufp de la dilución de trabajo} - \text{N}^\circ \text{ ufp de la muestra}}{\text{N}^\circ \text{ ufp de la dilución de trabajo}} \times 100\%.$$

**N° de ufp de la dilución de trabajo**

10. Las muestras que presentaron un porcentaje de reducción del 70% en ambas diluciones (1:30 y 1:60) se consideran positivas.

### ESQUEMA 4. TITULACION DEL VIRUS PLHEBOTOMUS FEVER



## V RESULTADOS

### Preparación del antígeno lisado:

1. Los ratones lactantes inoculados con el virus *Phlebotomus fever* presentaron signos de enfermedad al tercer día.

2. Los frascos de cultivo celular (línea Vero E-6) inoculados con *Phlebotomus fever* presentaron efecto citopático: el 40% de las células al segundo día y el 75% al tercer día.

3. En la verificación de la presencia del virus por inmunofluorescencia indirecta; el 50% de las células por campo presentaron fluorescencia para el cultivo cosechado a los dos días y el 80% para el cultivo cosechado a los tres días.

4. El momento óptimo de cosecha para la producción del antígeno lisado en la línea celular Vero es cuando el 75% de las células presentan efecto citopático .

### Titulación del antígeno lisado y análisis de muestras:

5. En la estandarización del ensayo inmunoenzimático la dilución óptima del antígeno es de 1:1500 (ver Gráfico 1) y la dilución del conjugado es de 1:8000.

6. De las cuatrocientas muestras convalecientes analizadas procedentes de Iquitos, sesentaicinco resultaron positivas para Elisa (ver Gráfico 2).

Confirmación de los resultados mediante la prueba de PRNT:

Determinación del título viral a utilizar en la prueba:

7. En la titulación de la prueba de neutralización por reducción en placas, la semilla viral producida en la línea celular Vero tiene una dilución de trabajo 1:5000 (ver cuadro 3 y 4); mientras que la producida en ratones lactantes no alcanzó el número de placas requerido.

8. Los resultados entre las placas de doce y las placas de veinticuatro pozos son semejantes en cuanto a tamaño de la placa formada y su aspecto, eligiéndose estas últimas para la prueba de neutralización.

9. El tiempo requerido para la aparición de las placas en la prueba de PRNT es de tres días, en los siguientes días sólo se incrementa en tamaño.

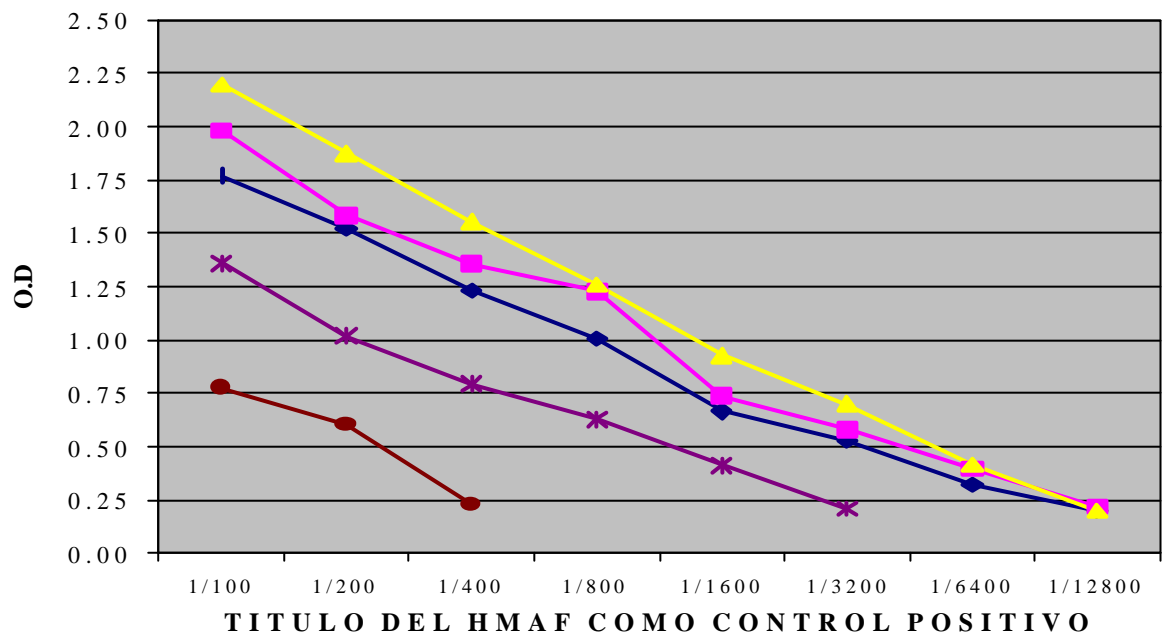
Resultados de la prueba de PRNT:

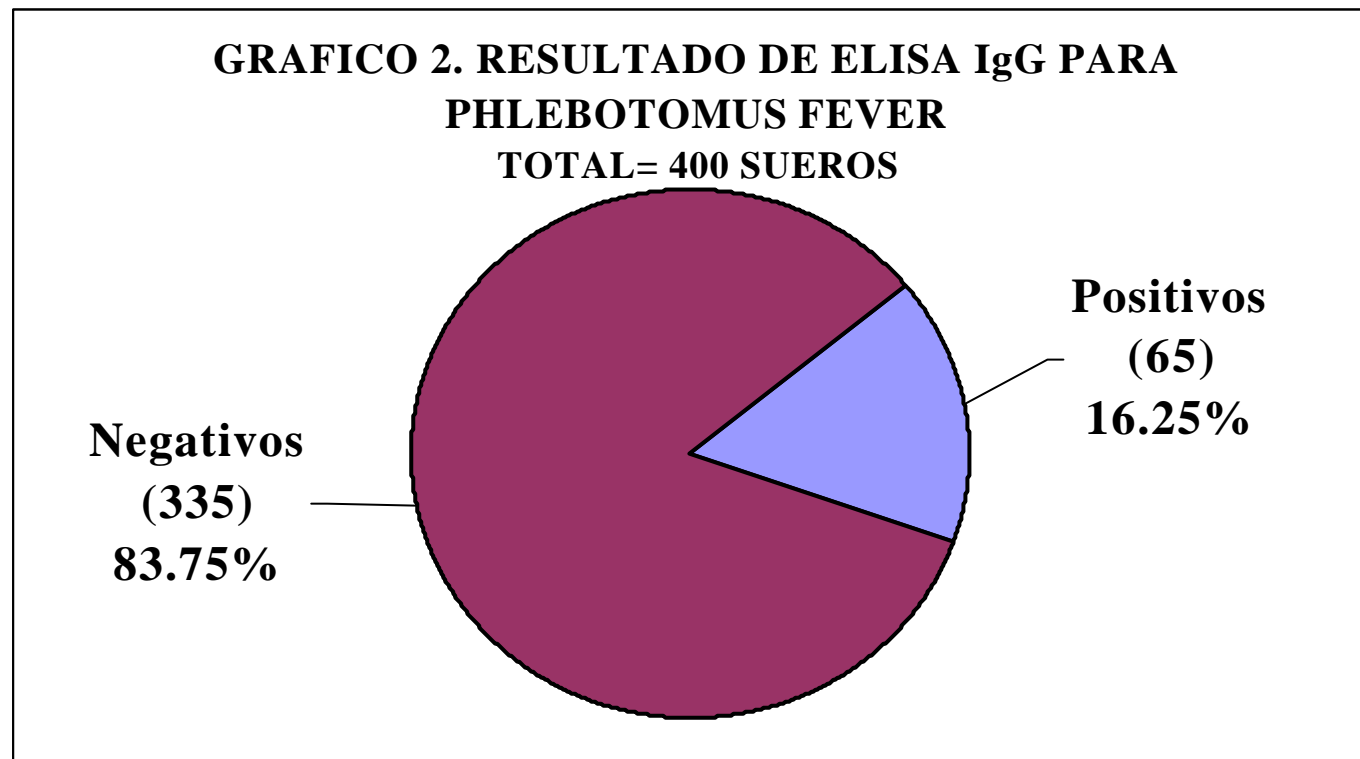
10. De las sesentaicinco muestras positivas para ELISA IgG cincuentiséis (8615%) fueron positivas para PRNT y nueve (13.85%) fueron negativas (ver gráfico 3).

11. La prueba de ELISA tiene una sensibilidad de 98.24% y una especificidad de 83.02% (ver cuadro 5) en relación con la prueba de PRNT.

**GRAFICO 1. TITULACION DEL ANTIGENO DE  
PHLEBOTOMUS FEVER**

◆ 1/500    ■ 1/1000    ▲ 1:1500    \* 1:3000    ● 1:6000





**CUADRO 3. RESULTADOS DE LA PRIMERA TITULACION EN LA PRUEBA DE PLAQUEO**

<b>Dilución del virus</b>	Puro	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	Blanco
<b>Número promedio de placas</b>	mnpc*	mnpc	mnpc	<b>42</b>	<b>5</b>	0

\* mnpc : muchos números de placas para contar.

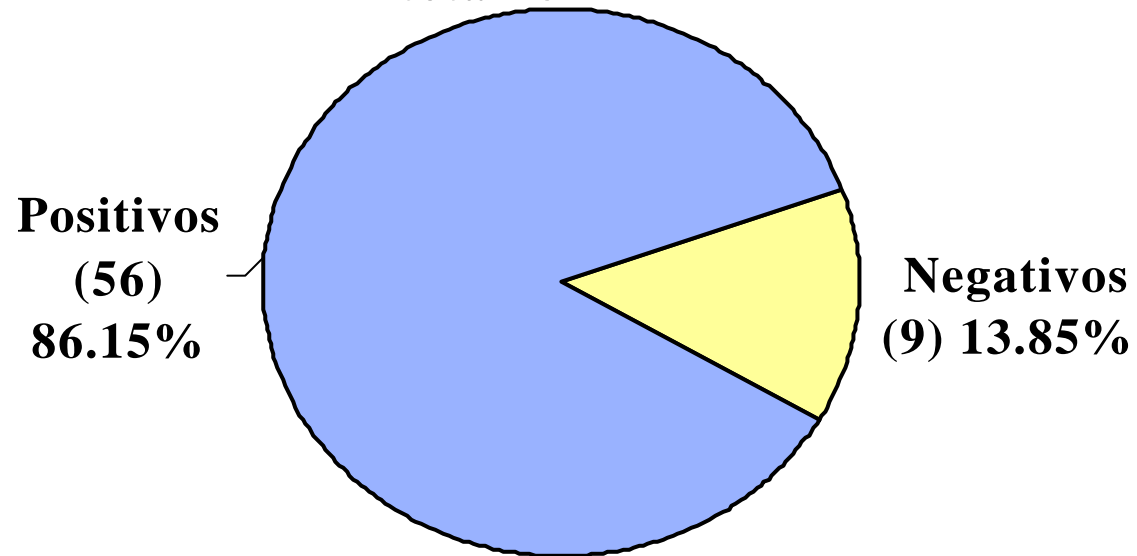
**CUADRO 4. RESULTADOS DE LA SEGUNDA TITULACION EN LA PRUEBA DE PLAQUEO**

<b>Dilución del virus</b>	$2 \times 10^{-3}$	$3 \times 10^{-3}$	$4 \times 10^{-3}$	<b><math>5 \times 10^{-3}</math></b>	$6 \times 10^{-3}$	Blanco
<b>Número promedio de placas</b>	34	20	15	<b>12</b>	8	0



**GRAFICO 3. RESULTADOS DE PRNT PARA  
MUESTRAS POSITIVAS EN ELISA PARA  
PHLEBOTOMUS FEVER**

**total=65 SUEROS**



**CUADRO 5. ESPECIFICIDAD Y SENSIBILIDAD DEL ELISA  
DESARROLLADO PARA PHLEBOTOMUS FEVER**

<b>ELISA</b>	<b>PRNT</b>		
	<b>POSITIVOS</b>	<b>NEGATIVOS</b>	<b>TOTAL</b>
<b>POS (+)</b>	<b>56</b>	<b>9</b>	<b>65</b>
<b>NEG (-)</b>	<b>1</b>	<b>44</b>	<b>45</b>
<b>TOTAL</b>	<b>57</b>	<b>53</b>	<b>110</b>

**SENSIBILIDAD : 98.24%**

**ESPECIFICIDAD : 83.02%**

**VALOR PREDICTIVO POSITIVO : 86.15%**

**VALOR PREDICTIVO NEGATIVO : 97.78%**

## VI DISCUSION

La mayoría de los arbovirus especialmente en los Bunyavirus son aislados mediante cultivos celulares debido a su gran afinidad por éstos; algunas literaturas mencionan la afinidad del virus *Phlebotomus fever* por las líneas Vero y BHK-21(19, 27), pero no mencionan la afinidad con la línea celular C6-36; por lo que se realizó una prueba con las líneas celulares de Vero y C6-36 dando mejores resultados con Vero. El efecto citopático producido en las líneas celulares Vero E-6 y BHK-21 indican su afinidad por éstas.

La preparación del antígeno viral para la prueba de ELISA es un proceso complejo porque involucra determinar en qué línea celular se adapta mejor y en qué tiempo se debe cosechar para obtener una buena cantidad de antígeno, esto significa conocer su efecto citopático óptimo para su procesamiento.

El ELISA tiene que realizarse bajo las mismas condiciones de temperatura de incubación ( 37°C), número de lavados (5 veces por ciclo) y tiempo de desarrollo del color antes de la lectura (30 min), para garantizar la reproducibilidad de la prueba. Una incubación prolongada, una elevada temperatura, un menor número de lavados, afectaría los resultados de O.D. dando valores más altos de los reales. En condiciones opuestas a lo anterior darán como resultado una disminución en los valores de O.D.

Los resultados de especificidad y sensibilidad en relación con la prueba de PRNT fueron mayores a 80%, indicando una buena elaboración y estandarización de esta prueba. Purificando el antígeno mejoraremos la unión específica del anticuerpo IgG al antígeno viral y aumentaremos los valores antes mencionados.

Con la prueba inmunoenzimática se obtuvo una seroprevalencia de 16.25% para el virus *Phlebotomus fever*. Estos datos no pueden ser comparados con trabajos anteriores debido a que no hay estudios previos que demuestren la seroprevalencia de la infección.

En la estandarización de la prueba de PRNT, para la titulación se ensayo con la semilla viral obtenida en cerebro de ratones lactantes y con la obtenida en la línea celular Vero; notándose una gran diferencia en el título viral entre ambas semillas, dando mejor resultado la semilla viral de Vero E-6. Esto puede ser debido a que el virus *Phlebotomus fever*, no presenta una buena afinidad frente a las células de cerebro de ratón.

Debido a que crecieron muy pocas placas en la semilla obtenida en ratones lactantes, es necesario realizar pasajes sucesivos para incrementar el título del virus. En algunos trabajos se menciona más de veinte pasajes en ratones lactantes para utilizar la semilla viral en la prueba de PRNT (1.) estos pasajes sucesivos permiten que el virus en estudio logre adaptarse mejor en éste tipo de células.

En la determinación de la dilución óptima de trabajo para el virus en la prueba de PRNT, es de vital importancia realizar diluciones máximas, ya que pueden aparecer placas superpuestas y contarlas como una, por efecto de “over lap”. Para esto, en todas las pruebas de PRNT se incluyen dos diluciones, 1:10 y 1:100 de la dilución de trabajo; con el fin de demostrar que no hay “over lap” y que la dilución de trabajo es la correcta.

## VII CONCLUSIONES

1. La prueba inmunoenzimática para la detección de anticuerpos contra el virus *Phlebotomus fever* tuvo una especificidad de 83.02% y una sensibilidad de 98.24% en relación con la prueba de Neutralización por Reducción de Placas (PRNT).
2. La seroprevalencia encontrada en el presente trabajo fue de 16.25% para la población de Iquitos.
3. En la estandarización de la prueba de PRNT dio mejor resultado la semilla viral obtenida de las células Vero E-6 en comparación con la obtenida de cerebro de ratón lactante.

## VIII RECOMENDACIONES

1. Realizar investigaciones orientadas a determinar qué otros miembros de la familia *Bunyaviridae* pueden presentar reacción cruzada en la prueba serológica de ELISA.

2. Debido a la gran variedad de virus pertenecientes al grupo *Phlebotomus* es necesario realizar estudios para determinar qué virus circulan en nuestro país.

3. Es necesario realizar estudios para determinar vectores relacionados con este virus y posibles huéspedes animales, con la finalidad de tomar medidas de control para prevenir infecciones en humanos.

4. Recomendamos realizar investigaciones que nos permitan conocer la distribución del virus en nuestro país y que ayuden a determinar el real impacto en Salud Pública.

## IX BIBLIOGRAFIA

- 1 Salim A.R. Neutralization of a Phlebotomus (Sandfly) fever virus in Baby Hamster Kidney (BHK-21) tissue culture. In: Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 1967; 61 pg. 259- 264.
- 2 Murphy F.A., Harrinson A.K., Whitfield S.G. Bunyaviridae: Morphologic and Morphogenetic similarities of Bunyamwera Serologic Supergroup viruses, and Several other artropod-borne viruses, Intervirology. 1973. pg.
- 3 Davies F.G. Observations on the Epidemiology of Rift Valley fever in Kenya. Journal. Hygiene (Camb) 1975; 75, pg. 219–230.
- 4 Porterfield J.S., Casal J., Chumakov M.P. Bunyaviruses and Bunyaviridae. Intervirology. 1975/76; 6. pg. 13-24.
- 5 Voller A., Bidwell D.E., Bartlett A. The Enzyme linked Immunosorbent Assay (ELISA). Flowline publications. 1977. pg 3-21.
- 6 Bishop D.H.L., Calisher C.H., Casals J. Bunyaviridae. Intervirology. 1980; 14, pg. 125-143.
- 7 Engvall Eva. Enzyme Immunoassay ELISA and EMIT. In: Vunakis Helen V., Langone John J.. Immunochemical Techniques. Methodos in Enzymology. A.P. Academic Press. 1980; Vol 70. pg. 419-439.
- 8 Rice R.M., Erlick B.J., Rosato R.R., Eddy G.A., Mohanty S.B.. Biochemical Characterization of Rift Valley fever virus. Virology. 1980; 105, pg. 256-260.



- 9 Calisher C.H., Monath T.P., Karabatsos N., Trent D.W. Arbovirus subtyping: Applications to Epidemiologic studies, Availability of reagents, and Testing services. *Am. J. Epidemiol.* 1981; 114, pg. 619-630.
- 10 Pinheiro F.P. Arboviral Zoonoses in South America. In: Beran G.W., Steele J.H. *Handbook Series in Zoonoses; Section B: Viral Zoonoses.* CRC Press. 1981; vol 1. pg. 159-160.
- 11 Clark Brian R., Engvall Eva. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA): Theoretical and practical aspects. In: Maggio Edward T. *Enzyme-immunoassay.* CRC Press. 1985. pg. 167-178.
- 12 Davies F.G., Linthicum K.J., James A.D. Rainfall and Epizootic Rift Valley fever. *Bull WHO.* 1985; 63. pg. 941-943.
- 13 Linthicum K.J. Davies F.G., Kairo A., Bailey C.L. Rift Valley fever virus (Family Bunyaviridae genus Phlebovirus). Isolations from Diptera collected during an inter epizootic period in Kenya. *Journal Hygiene (Camb).* 1985; 95, pg. 197-209.
- 14 Shekarchi I.C., Sever J.L. Enzyme Immunoassay. In: Specter S., Lanez G.J. *Clinical Virology Manual.* Elsevier Science Publishing Company. 1986. pg. 133-144.
- 15 Calisher C.H., Shope R.E. Bunyaviridae: The Bunyaviruses. In: Balows A., Hausler W.J., Lennette E.H. *Laboratory Diagnosis of infectious Diseases: Principles and Practice.* S.J. Springer-Verlag 1988. pg. 626-633.

- 16 Tesh R.B.. The Genus Phlebovirus and Its Vectors. Annu. Rev. Entomol. 1988; 33, pg. 169-181.
- 17 Calisher C.H., Karabatsos N. Arbovirus Serogroups: Definition and Geographic Distribution. In: Monath T.P.. The Arboviruses: Epidemiology and Ecology. CRC Press; 1989. vol 1. pg. 19-40.
- 18 Meegan J.M, Bailey Ch. L. Rift Valley fever. In : Monath T.P. The Arboviruses: Epidemiology and Ecology. CRC Press; 1989. vol 4. pg. 51-72.
- 19 Tesh R.B. Phlebotomus fever. In: Monath T.P. The Arboviruses: Epidemiology and Ecology. CRC Press; 1989. vol 4. pg. 15-28.
- 20 Tesh R.B., Boschell J., Young D.G.. Characterization of Five New Phleboviruses Recently Isolated From Sand Flies in Tropical America. Am. J. Trop. Med. Hyg. 1989; (40); pg. 529-533.
- 21 Benenson A. S. Control of Comunicable Diseases in Man. American Public Health Association. 1990; 15<sup>th</sup> edition. pg. 44-46.
- 22 Tesh R.B.. Undifferentiated Arboviral Fever. In: Warren K.S. Tropical and Geographical Medicine. DNLM / DLC. 1990; 2<sup>nd</sup> edition. pg. 685-688.
- 23 Strickland G. T. Hunter`s Tropical Medicine DNLM / DLC. 1991; 7<sup>th</sup> edition. pg. 214-217.

- 24 Koneman EW, Allen SD, Dowell VR, Janda WM, Sommers HM, Winn WC. Diagnóstico microbiológico Editorial Médica Panamericana. 1992; 3 edición. pg. 808-831.
- 25 Peters C.J., Linthicum K.J.. Rift Valley fever. In: Beran G.W., Steele J.H. Handbook of Zoonoses; Section B: Viral. CRC Press. 1994; 2<sup>nd</sup> edition. Pg. 125-137.
- 26 Pinheiro F.P., Travassos da Rosa A.P.A. Phlebotomus fever. In: Beran G.W., Steele J.H. Handbook of Zoonoses; Section B: Viral. CRC Press. 1994; 2<sup>nd</sup> edition.pg. 219-220.
- 27 Webster Robert G., Granoff A.. Encyclopedia of Virology. Academic Press. 1994; Vol 1, pg. 186-196.
- 28 Acha Pedro N., Szyfres Boris. Zoonoses and Comunicable Diseases Common to Man and Animals. Scientific Publication N° 503 PAHO. 1995; 2<sup>nd</sup> edition. pg. 449-453.
- 29 Beaty B., Calisher C.H., Shope R.E. Arboviruses. In: Lennette E.H., Lennette D.A., Lennette E.T. Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial, and Chlamydial Infections. American Public Health Association. 1995; 7<sup>th</sup> edition. pg. 189-209.

- 30 Herrman K.I., Erdman D.D. Diagnosis by Serologic Assays, In: Lennette E.H., Lennette D.A., Lennette E.T. Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial, and Chlamydial Infections. American Public Health Association. 1995; 7<sup>th</sup> edition. pg. 121-130.
- 31 Gonzales–Scarano F, Nathanson N. Bunyaviridae. In: Fields B.N., Knipe D.H., Howley P.M.. Fields Virology. Lippincott-Raven Publisher. 1996; 3 edition. Vol. 1. pg. 1473-1494.
- 32 Schmaljohn C.S.. Bunyaviridae: The Viruses and Their Replication. In: Fields B.N., Knipe D.H., Howley P.M.. Fields Virology. Lippincott-Raven Publisher. 1996; 3 edition. Vol. 1. pg. 1447-1465.
- 33 Atmar R.L. and Englund J.A. Laboratory Methods for the Diagnosis of Viral Diseases. In: Evans A.S. and Kaslow R.A. Viral Infections of Humans: Epidemiology and Control. Plenum Publishing Corporation 1997; 4<sup>th</sup> edition. pg. 59-81
- 34 Carpenter A.B. Enzyme-Linked Immunoassay. In: Rose N.R., Conway de Macario E., Folds J.D., Lane H.C., Nakamura R.M.. Manual of Clinical Laboratory Immunology. ASM Press. 1997; 5<sup>th</sup> edition. pg. 20-29.
- 35 Kane K.L., Folds J.D. Infectious disease Serology. In: Rose N.R., Donnenberg D. Handbook of Human Immunology. CRC Press. 1997. pg. 126-138.

- 36 Shope R.E. and Meegan J.M. Arboviruses, In: Evans Alfred S. and Kaslow R.A.. Viral Infections of Humans: Epidemiology and Control. Plenum Publishing Corporation. 1997. 4<sup>th</sup> edition. pg. 151-162.
- 37 Tsai Theodore.F., Kuno Goro. Arboviruses. In: Rose N.R., Conway de Macario E., Folds J.D., Lane H.C., Nakamura R.M.. Manual of Clinical Laboratory Immunology. ASM Press. 1997; 5<sup>th</sup> edition. pg. 729-733.
- 38 Watts Douglas M. Arthropod-Borne Viral Diseases in Perú. In: Travassos de Rosa A., Vasconcelos P.F.C., Travassos da Rosa J.F.S.. An Overview of Arbovirology in Brazil and Neighbouring Countries. Instituto Evandro Chagas. 1998. pg. 193-216.
- 39 Wolfgang K.J., Phil D., Hilda P.W., Bernard A., Catherine M. Wilfert MD. Zinsser Microbiología. Editorial Panamericana 1998 20 ed.
- 40 Mahony J.B. Chernesky M.A. Immunoassay for the Diagnosis of Infectious Diseases. In: Murray P.R. Baron E.J., Pfaller M.A., Tenover F.C., Tenover F.C., Yolken R.H. Manual of Clinical Microbiology. ASM Press. 1999. 7<sup>th</sup> edition. pg. 202-212.
- 41 Tsai Theodore.F. Arboviruses. In: Murray P.R., Baron E.J., Pfaller M.A., Tenover F.C., Yolken R.H. Manual of Clinical Microbiology. ASM Press. 1999. 7<sup>th</sup> edition. pg. 1107-112.

## X ANEXO

### **FLUXOGRAMA 1. PRODUCCION DE ANTIGENO LISADO**

Inocular 1ml de semilla viral en frascos de 250cm<sup>2</sup> que contienen la monocapa de células Vero de 3 a 4 días de cultivo

↓

Observar y cosechar los frascos con efecto citopático de 2+ a 3+

↓

Centrifugación del barrido de células en 10 000 rpm x 30min a 4°C

↓

Lavado de células con buffer borato salino por centrifugación a 10 000rpm x 30min a 4°C (repetir tres veces esta operación)

↓

Resuspender el pellet con borato salino en una relación de 1 a 1.5ml por frasco cosechado conteniendo 1% de triton 100X

↓

Inactivar la suspensión con Tris 1M y β-propiolactona

↓

Sonicar durante 15 segundos 3 veces (realizar este proceso en hielo)

↓

Centrifugar en 5 000rpm x 30min a 4°C y alicuotar

## **FLUXOGRAMA 2. ELISA IgG INDIRECTA PARA PHLEBOTOMUS FEVER EN SUERO HUMANO**

Sensibilizar placas flexibles DINEX (fondo en U) con 100ul. de antígeno lisado diluido (1:1 000) en buffer PBS pH 7.4 y con 100ul. de control de antígeno diluido (1:500) en buffer PBS pH 7.4 en filas intercaladas. Incubar toda la noche a 4°C

*Lavar 5 veces con buffer de lavado*



Diluir los sueros a 1:100 en buffer diluyente (a partir de la predilución 1:10 con H-MEM) y agregar 100ul. a 4 pozos. Emplear un suero control positivo (100ul. a 2 pozos ) y tres controles negativos (100ul. a 2 pozos por control negativo).

Incubar a 37°C por 60 minutos.

*Lavar 5 veces con buffer de lavado*



Agregar 100ul. de conjugado anti-IgG humano diluido (1:8 000) en buffer diluyente e incubar a 37°C por 60 minutos.

*Lavar 5 veces con buffer de lavado*



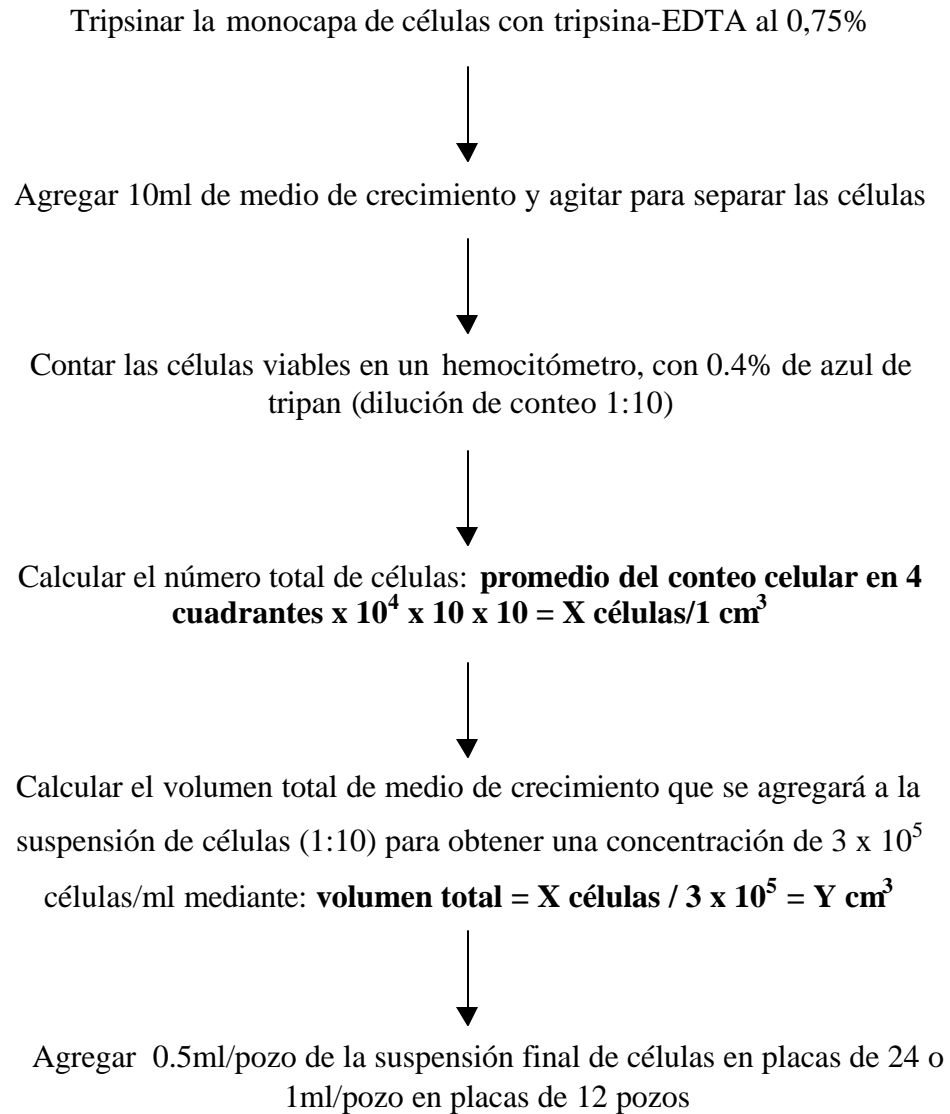
Adicionar 100ul. de sustrato ABTS e incubar a 37°C por 30 minutos



Leer a 410nm. e interpretar los resultados

**FLUXOGRAMA 3. PREPARACION DEL CULTIVO DE CELULAS BHK-**

**21 CLON 15 PARA PRNT**





**SOLUCIONES PREPARADAS EN EN LABORATORIO PARA EL ENSAYO DE ELISA IgG**

**1. BORATO SALINO (SOLUCION STOCK) :**

**Acido bórico 0.5M :**

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	30.92 g.
Agua destilada caliente	700 ml.
Agua destilada c.s.p.	1 000 ml.

**Cloruro de sodio 1.5M :**

NaCl	87.62 g.
Agua destilada c.s.p.	1 000 ml.

**Borato salino a pH 9.0 :**

NaCl 1.5M	80 ml.
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 0.5M	100 ml.
NaOH 1N	24 ml.
Agua destilada c.s.p.	1 000 ml.
Regular el pH hasta 9.0	

**2. BUFFER FOSFATO SALINO ( PBS 10X ) A pH 7.4 :**

NaCl	80 g.
KCl	2 g.
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.4 g.
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9.1 g.
Agua destilada c.s.p.	1 000 ml.

**3. BUFFER DE DILUCION :**

PBS 10X	100 ml.
Leche descremada deshidratada	50 g.
Tween 20	1 ml.
Agua destilada c.s.p.	1 000 ml.

**4. BUFFER DE LAVADO :**

PBS 10X	100 ml.
Tween 20	1 ml.
Agua destilada c.s.p.	1 000 ml.

**SOLUCIONES PREPARADAS EN EL LABORATORIO PARA LA  
PRUEBA DE NEUTRALIZACION POR REDUCCION EN PLACA  
(PRNT)**

**1. CARBOXIMETIL CELULOSA AL 3% (CMC) :**

CMC 3 g.

Agua destilada estéril c.sp. 100 ml.

Utilizar frasco esteril; mezclar con la ayuda de un magneto.

Autoclavar por 30 min.

Conservar a temperatura ambiente.

**2. MEDIO MINIMO ESENCIAL Eagle (10X) :**

E-MEM 10 g.

Agua destilada estéril c.s.p. 100 ml.

Mezclar y filtrar (esterilizar).

Conservar a 4°C.

**3. LIQUID OVERLAYER MEDIUM :**

CMC 3%	100 ml.
MEM (10X) sin rojo fenol	50 ml.
FBS	50 ml.
L-glutamina	5 ml.
Antibiotico	5 ml.
NaHCO <sub>3</sub> al 7.5%	5 ml.
Agua destilada estéril	500 ml.
Conservar a 4°C.	

**4. COLOR STAIN :**

Azul naftol	1 g.
Acetato de sodio	13.6 g.
Agua destilada	940 ml.
Mezclar con magneto por 10 min.	
Acido acético glacial	60 ml.
Mezclar por 30 min	
Mantener a temperatura ambiente.	

## FORMULAS UTILIZADAS

**SENSIBILIDAD:**  $\frac{PV + PF}{PT} \times 100$

**PT**

**ESPECIFICIDAD:**  $\frac{NV + NF}{NT} \times 100$

**NT**

**VALOR PREDICTIVO POSITIVO:**  $\frac{PV}{PT} \times 100$

**PT**

**VALOR PREDICTIVO NEGATIVO:**  $\frac{NV}{NT} \times 100$

**NT**

PT: positivos totales

NT: negativos totales

PV: positivos verdaderos

NV: negativos verdaderos

PF: positivos falsos

NF: negativos falsos