

UNIVERSIDAD RICARDO PALMA
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



“Titulación de anticuerpos al virus Chikungunya
mediante la técnica de neutralización por reducción
de placas”

Tesis para optar el Título Profesional de
Licenciada en Biología

Elizabeth Noelia Ubillus Borja

Blgo. Miguel Cobos Zelada
Director de la tesis

Lima – Perú
2016

**“Titulación de anticuerpos al virus
Chikungunya mediante la técnica de
neutralización por reducción de placas”**

Por:

Bachiller en Biología
Elizabeth Noelia Ubillus Borja

Tesis presentada como
requisito para optar el Título
Profesional de Licenciada en
Biología

DEDICATORIA

A la persona que me dio su amor y apoyo incondicional en cada etapa de mi vida. Me enseñó a trazarme objetivos y cumplirlos. Me orienta a seguir superándome. Mi mamá Noemí Borja.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mis agradecimientos al Instituto Nacional de Salud por brindarme las instalaciones y material de laboratorio para realizar este proyecto de investigación.

Al Blgo. Miguel Cobos, por asesorarme en todas las etapas de la tesis brindándome sus críticas constructivas, comentarios y sugerencias que fueron bien recibidas.

Al Blgo. Marco Coáguila, por enseñarme la técnica de neutralización por reducción en placas aplicada a arbovirus, e incentivar-me a continuar investigando en el área de la salud pública.

Al Tec. Med. Benjamín Varillas y al Tec. Med. Diego Moreno, por su amistad y apoyo durante la implementación de la metodología y la realización de los ensayos.

Al Med. Vet. Alberto Cisneros, por su colaboración en la preparación de las líneas celulares a utilizar.

A todo el personal de Metaxénicas Virales, porque directa o indirectamente me orientaron a continuar con la tesis.

Asimismo, quisiera agradecer a mis padres, Néstor y Noemí, por la confianza brindada, a mis hermanos por los momentos anecdóticos, a Christian por su paciencia, a mis amigos, compañeros y futuros colegas Alejandro y Diana.

INDICE

DEDICATORIA	4
AGRADECIMIENTOS.....	5
INDICE.....	6
RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	10
INTRODUCCIÓN.....	11
Problema de investigación.....	11
Planteamiento del problema	11
Formulación del problema.....	12
Justificación de la investigación	12
ANTECEDENTES.....	13
Estructura y clasificación del virus	13
Epidemiología de la enfermedad	14
Transmisión de la enfermedad	15
Síntomas de la enfermedad	16
Pruebas de diagnóstico.....	17
Investigaciones recientes.....	19
OBJETIVOS.....	20
Obj. General:.....	20

Obj. Específicos:	20
HIPÓTESIS.....	20
LUGAR DONDE SE REALIZÓ.....	21
MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
Diseño metodológico	21
Población y muestra	22
Procedimiento.....	22
Producción de antígenos.....	22
Titulación viral.....	23
Titulación de anticuerpos neutralizantes.....	24
Procesamiento de la información	26
Aspecto ético	26
RESULTADOS.....	27
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIONES	33
RECOMENDACIONES.....	34
REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA	35
ANEXOS	39
Anexo 1. Preparación de reactivos y soluciones.....	39
1. Colorante de plaqueo	39
2. PBS 20X – 1 litro	39

3. Medio Overlay.....	40
4. Carboximetilcelulosa 3%.....	40
Anexo 2. Producción de antígeno	41
Anexo 3. Observación mediante microscopio invertido.....	41
Anexo 4. Titulación de anticuerpos	42
Anexo 5. Tabla cruzada de la dilución de anticuerpos con los días de síntomas	43
Anexo 6. Correlación de Pearson entre el título de anticuerpos neutralizantes y los días de síntomas.....	43

RESUMEN

El presente trabajo de tesis tuvo como objetivo titular anticuerpos neutralizantes contra una cepa endémica del virus Chikungunya que circula en la costa norte peruana. Para desarrollar esta investigación, se empleó la prueba de neutralización por reducción en placas (PRNT), la cual se realizó en el Instituto Nacional de Salud (INS)– Laboratorio de Aislamiento y Cultivo Celular perteneciente al área de Metaxénicas Virales.

La justificación de la investigación se basa en la necesidad de comprobar que los anticuerpos detectados por la prueba de ELISA son neutralizantes y logran inhibir la dispersión del CHIKV en el cuerpo humano. Además, la prueba es necesaria para evaluar drogas antivirales y futuras vacunas que lleguen al Perú.

El diseño metodológico utilizado fue analítico y experimental. La cepa y las muestras fueron proporcionadas por el INS y provinieron del departamento de Tumbes. Las muestras positivas fueron previamente diagnosticadas con ELISA utilizando IgM e IgG y las muestras negativas fueron de individuos sanos sin contacto previo con arbovirus. La prueba de PRNT se realizó en 24 horas usando la línea celular VERO CCL-81 en monocapa. La valoración de la prueba se realizó al 50% de neutralización.

Se obtuvo como resultado títulos de anticuerpos en el rango de 1/8 y 1/16. Ésta variación responde a una relación inversa con el inicio de los días de síntomas. Por lo tanto, se concluye que la población de la costa norte del Perú sí está desarrollando anticuerpos neutralizantes para contrarrestar el virus Chikungunya endémico en la región.

Palabras clave

Chikungunya, virus, neutralización, anticuerpos, PRNT, Vero CCL-81

ABSTRACT

The present thesis aims to titrate neutralizing antibodies against an endemic strain of the Chikungunya virus that circulates in the northern coast of Peru. In order to develop this research, the plaque reduction neutralization test (PRNT) has been used, which has been carried out at the National Institutes of Health (INS) - Isolation and Cell Culture Laboratory belonging to the Viral Metaxenics area.

The justification of the investigation is based on the need to verify that the antibodies detected by the ELISA test are neutralizing and manage to inhibit the dispersion of CHIKV in the human body. In addition, the test is necessary to evaluate antiviral drugs and future vaccines that arrive in Peru.

The methodological design used was analytical and experimental. The strain and samples were provided by the INS. The strain is endemic to the department of Tumbes. The positive samples were previously diagnosed with ELISA using IgM and IgG and the negative samples were from individuals that had not had contact with any arbovirus. The PRNT test was performed in 24 hours using the VERO CCL-81 cell line in monolayer. The titration of the test was performed at 50% neutralization.

Antibody titres were obtained in the range of 1/8 and 1/16. This variation responds to an inverse relationship with the onset of symptom days. Therefore, it is concluded that the population of the northern coast of Peru is developing neutralizing antibodies to counteract the endemic Chikungunya virus in the region.

Key words

Chikungunya, virus, neutralization, antibodies, PRNT, Vero CCL-81

INTRODUCCIÓN

La fiebre chikungunya es una enfermedad ocasionada por el virus Chikungunya (CHIKV). Este virus pertenece al género *Alfavirus*, familia *Togaviridae*. Es un virus envuelto de 60 nm de diámetro con genoma ARN positivo de una sola cadena que codifica cuatro proteínas no estructurales (NSP1-4) y cinco proteínas estructurales: la cápside (C), las glicoproteínas de membrana (E1, E2 y E3) y un pequeño polipéptido 6K. ¹

La transmisión del virus es a través de la picadura de mosquitos infectados del género *Aedes*, el mismo que transmite el dengue y la fiebre amarilla. Después de un periodo de incubación, las personas infectadas presentan sintomatología clínica como poliartalgias, artritis, fiebre, mialgias y cefalea principalmente. En raras ocasiones, pueden ocurrir formas graves de la enfermedad con manifestaciones atípicas. ²

Actualmente, el virus Chikungunya ha afectado a millones de personas y sigue causando epidemias en muchos países. A finales del 2013, se documentó la primera transmisión autóctona en las Américas y a partir de junio del 2015 se han confirmado la transmisión local en la costa norte del Perú. ³

Problema de investigación

Planteamiento del problema

Para la población peruana, este virus plantea un problema, ya que no se tienen investigaciones *in situ* sobre su comportamiento al nivel de laboratorio ni cómo afectará a personas no inmunizadas.

El diagnóstico por laboratorio de arbovirosis en el Perú, a nivel serológico de rutina, se realiza mediante pruebas de inmunoadsorción ligada a enzimas (ELISA) IgM (Inmunoglobulina M) e IgG (Inmunoglobulina G),

debido a que es una prueba rápida, sencilla y permite analizar varias muestras en simultáneo. Sin embargo, esta prueba no detecta específicamente anticuerpos neutralizantes dando opción a reacciones cruzadas con anticuerpos de otros arbovirus como dengue, fiebre amarilla y mayaro.

Formulación del problema

En relación a lo anteriormente mencionado, se genera la siguiente pregunta de investigación ¿Los anticuerpos detectados por la prueba de ELISA, en la población del norte peruano infectada con virus Chikungunya, son neutralizantes?

Justificación de la investigación

Para confirmar los resultados de la prueba de ELISA, ésta tiene que ser validada por la prueba de neutralización por reducción de placas (PRNT), dado que la PRNT es actualmente calificada como prueba de referencia para caracterizar y cuantificar niveles de anticuerpos neutralizantes de diferentes virus.

La prueba PRNT en el Perú ya ha sido estandarizada para fiebre amarilla y brinda resultados importantes para efectos de vigilancia diagnóstica y estudios epidemiológicos.⁴ El Instituto Nacional de Salud a través de la Red de Laboratorios de Salud Pública al ser responsable del sistema de vigilancia laboratorial, requiere la titulación de anticuerpos mediante la prueba PRNT para comprobar que estos anticuerpos son neutralizantes y logran inhibir la dispersión del CHIKV. Además, la prueba es necesaria para evaluar drogas antivirales y futuras vacunas que lleguen al Perú.

ANTECEDENTES

Estructura y clasificación del virus

La fiebre chikungunya es una enfermedad viral proveniente del continente africano. El virus fue aislado por primera vez en 1952, proveniente de un paciente en Tanzania, África. El CHIKV pertenece al género Alfavirus y a la familia Togaviridae. Los alfavirus son clasificados en base a sus propiedades antigénicas. Estos virus comparten sitios antigénicos en la cápside y en por lo menos una glicoproteína de membrana, sin embargo, los virus pueden diferenciarse por pruebas serológicas, particularmente ensayos de neutralización. El CHIKV pertenece al serogrupo del virus Semliki Forest (SFV), en este grupo también encontramos al virus Mayaro.⁵

El genoma de CHIKV es una ARN de cadena positiva que codifica cuatro proteínas no estructurales (NSP1-4) y cinco proteínas estructurales: la cápside (C), las glicoproteínas de membrana E1, E2 y E3, y un pequeño polipéptido 6K (Fig.1). Sin embargo, en el virión maduro solo se encuentran las proteínas C, E1 y E2. Las proteínas E1 y E2 controlan el ingreso del virus a las células hospederas: E1 media la fusión del virus a la membrana en condiciones de pH bajo, mientras la proteína E2 interactúa como un receptor celular. Estas proteínas median la diseminación del virus, por lo tanto, blancos específicos en estas estructuras serán la llave del desarrollo de estrategias de vacunación.¹

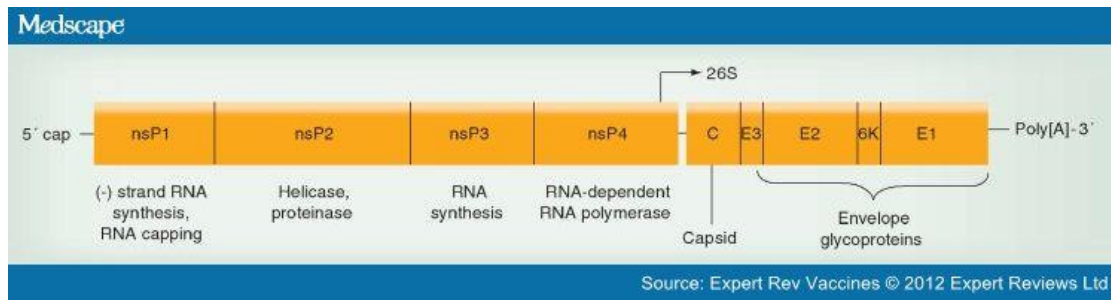


Fig. 1 Organización del genoma del CHIKV. Fuente: Weaver *et al* 2012⁶

Se han reconocido 3 genotipos del virus⁷: el asiático, el africano oeste y el ECSA (Este, centro y sudáfrica). Hasta la actualidad se han documentado múltiples epidemias tanto en África como en el sudeste asiático. En el año 2004 un gran brote en Kenya alcanzó una seroprevalencia de aproximadamente el 75 % de la población. De aquí se diseminó hacia las islas Comoro, Seychelles, Mauricio y Madagascar del Océano Índico y, luego migró hacia la isla Reunión (Francia) donde se detectó en marzo del año 2005 y obtuvo una tasa de ataque de 35 %⁹.

Epidemiología de la enfermedad

El brote en la isla La Reunión fue ocasionado por el genotipo ECSA. Estudios hallaron que en los 90% de aislamientos virales se halló la mutación A226V en la glicoproteína E1. Esta mutación no había estado presente en las fases iniciales del brote, lo que se ha relacionado con la adaptación del virus al mosquito transmisor endémico, el *Aedes albopictus*, incrementando la infectividad⁸. De manera similar la mutación se detectó en India, que unido a la ausencia de inmunidad de la población, ocasionó un fuerte brote. En otras regiones donde el virus no ha tenido la mutación A226V se han controlado más rápidamente los brotes.

A fines del 2013 se documentó la primera transmisión autóctona en el continente americano. Actualmente se reconoce que, en este continente, el genotipo que está predominando es el genotipo asiático, sin embargo, también se ha detectado la introducción del genotipo ECSA en Brasil. En Perú, la cepa autóctona aún no se ha genotipificado.

Los primeros casos importados detectados en Perú se dieron en junio del 2014, todos eran provenientes de países americanos. El primer caso autóctono a nivel nacional se detectó en junio del 2015 y hasta la fecha se sigue reportando transmisión local en la costa norte del Perú.³

El *Aedes aegypti* como vector transmisor del CHIKV está ampliamente distribuido en el Perú, actualmente 20 regiones nacionales han reportado su presencia, los cuales cuentan con una población estimada de 12 millones de habitantes, por lo que cerca del 40% de la población peruana reside en un área de riesgo de transmisión.¹¹

Transmisión de la enfermedad

El ciclo de transmisión inicia cuando el mosquito adquiere el virus al picar a un huésped virémico. Después de un periodo promedio de incubación extrínseca de 10 días, el mosquito es capaz de transmitir el virus a un huésped susceptible. En personas picadas por un mosquito infectado, los síntomas de enfermedad aparecen generalmente después de un período de incubación intrínseca de tres a siete días (rango: 1–12 días) (Fig. 2).²

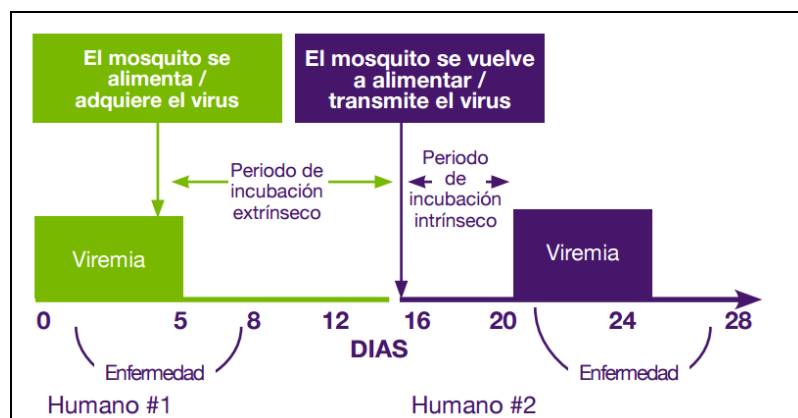


Fig. 2 Ciclo de transmisión del virus CHIKV. Fuente: Organización Panamericana de la Salud ²

Síntomas de la enfermedad

El CHIKV puede causar enfermedad aguda, subaguda y crónica. La enfermedad aguda generalmente se caracteriza por inicio súbito de fiebre alta (típicamente superior a 39°C) y dolor articular severo. Otros signos y síntomas pueden incluir cefalea, dolor de espalda difuso, mialgias, náuseas, vómitos, poliartritis, rash y conjuntivitis. La fase aguda dura entre 3 y 10 días. Se considera que las muertes relacionadas con infección por CHIKV son raras. Sin embargo, se reportó un aumento en las tasas brutas de mortalidad durante las epidemias de 2004–2008 en la India y la isla Mauricio. ²

Según el Plan Nacional de Preparación y Respuesta frente a la Fiebre de Chikungunya – Perú, elaborado en el 2014, la agresividad del genotipo africano este-central-sur (ECSA) como principal agente de brotes, la susceptibilidad y abundancia del vector *Aedes aegypti* sumado a la falta de inmunidad de la población peruana serían factores relevantes en la propagación del virus. ¹⁰

Pruebas de diagnóstico

Según la Organización Panamericana de la Salud el diagnóstico por laboratorio se realiza mediante RT-PCR, pruebas serológicas IgM e IgG, aislamiento viral y cultivo celular. En los primeros tres días de la enfermedad se realiza el aislamiento viral y RT-PCR. Los anticuerpos IgM se hacen positivos entre los días cuatro y ocho. Luego se pueden detectar anticuerpos IgG a partir del día ocho. ²

Días desde el inicio de la enfermedad	Pruebas virológicas	Pruebas serológicas
Día 1-3	RT-PCR = Positivo Aislamiento = Positivo	IgM = Negativo PRNT = Negativo
Día 4-8	RT-PCR = Positivo Aislamiento = Negativo	IgM = Positivo PRNT = Negativo
>Día 8	RT-PCR = Negativo Aislamiento = Negativo	IgM = Positivo PRNT = Positivo

Fig. 3 Resultados de muestras analizadas en distintos días después de la infección por el virus CHIKV. Fuente: Organización Panamericana de la Salud ²

Dentro de las pruebas serológicas que detectan anticuerpos se encuentra la PRNT (Fig. 3). Esta técnica permite la titulación tanto de la cepa viral como de los anticuerpos neutralizantes. El uso de esta prueba sirve para confirmar los resultados de la prueba de ELISA, ya que se ha reportado reactividad cruzada con algunos miembros del serogrupo del SFV. La prueba de PRNT, ya sea usada para confirmar los resultados de la prueba de ELISA o para demostrar un aumento el aumento y/o disminución de anticuerpos en muestras agudas y convalecientes, deberá incluir siempre otros virus del serogrupo SFV (por ej., virus Mayaro) para validar la especificidad de la reactividad. ²

En arbovirus, la técnica PRNT es utilizada en dos líneas celulares de mamíferos, células VERO y células LLC-MK2. Cada uno de estos tipos de células tienen ventajas, sin embargo, solo las células VERO son usadas para la producción de vacunas vivas atenuadas y, por lo tanto, es recomendable su uso para la PRNT. La monocapa de células VERO debe ser preparada de dos a tres días antes de su uso para que se encuentre en estado de confluencia y así evitar cualquier alteración o pérdida de células durante el curso del ensayo. La calidad de la monocapa celular es crítica para el desarrollo de las placas y por lo tanto para generar resultados confiables.¹²

En el Perú, el Instituto Nacional de Salud ha reportado el uso de la PRNT como prueba de confirmación serológica y para estudios de investigación epidemiológica de fiebre amarilla.⁴ Actualmente se espera reportar la estandarización de la prueba hacia otros arbovirus como DENV, CHIKV y Mayaro.

Otras importancias de la prueba PRNT radican en su utilidad para evaluar vacunas y drogas antivirales. Actualmente, la terapia para CHIKV consiste en la administración de analgésicos, antipiréticos y antiinflamatorios. Sin embargo, se están realizando investigaciones de moléculas que inhiben la replicación, entre ellas encontramos la cloroquina, el arbidol y la ribavirina.¹³ Asimismo, existen investigaciones para la producción de vacunas vivas atenuadas que hasta el momento están siendo probadas en ratones y primates, pero próximamente serán testeadas en humanos¹⁴.

Investigaciones recientes

La Universidad de Mahidol ²⁵, ha realizado una investigación sobre la neutralización por reducción de placas del virus Chikungunya en la línea celular VERO CCL-81 en un tiempo de 24 horas. Sus resultados reportan vacuolización citoplasmática, redondeo de las células y desprendimiento celular del sustrato.

Según Li *et al* 2013 ²⁶, al comparar el efecto citopático producido en la línea celular VERO y C6/36, se obtuvo como resultado que la infección por Chikungunya induce un mayor efecto citopático en células VERO. Asimismo, se confirmó que la proteína viral E2 de CHIKV, a las 24 horas ya se encontraba en el 80% de las células infectadas.

Según Huang *et al* 2015 ²³, la presencia de virus contaminantes puede interferir en la realización de la neutralización por reducción de placas (PRNT) conduciendo a la aparición de un número más alto de placas y subsecuentes resultados falsos negativos. Sus resultados comprueban que la inactivación al calor de 56°C por 30 minutos, que es el estándar para la PRNT, es insuficiente para inactivar viriones de CHIKV y recomiendan ampliar el tiempo a 120 minutos. Asimismo, Park *et al* 2016 ²⁴, asegura que la inactivación incompleta de los virus contaminantes es un riesgo a la bioseguridad. En sus resultados comprobaron que existe una alta variación en la termoestabilidad de los virus pertenecientes al serocomplejo Semliki Forest y por lo tanto, se requiere mayor investigación en este tipo de alfavirus.

OBJETIVOS

Obj. General:

- Titular anticuerpos neutralizantes contra una cepa endémica de CHIKV por la prueba PRNT.

Obj. Específicos:

1. Producir antígenos de una cepa endémica del CHIKV en células VERO CCL-81.
2. Titular la cepa endémica del CHIKV por PRNT.
3. Titular anticuerpos neutralizantes a la cepa endémica de CHIKV por PRNT.
4. Correlacionar los días de inicio de síntomas y la concentración de anticuerpos neutralizantes de los sueros.

HIPÓTESIS

Los sueros de pacientes, con muestras pareadas IgM e IgG, diagnosticados positivos para CHIKV por la técnica de ELISA presentan anticuerpos que neutralizan al virus.

LUGAR DONDE SE REALIZÓ

La investigación se realizó en el Instituto Nacional de Salud, Centro Nacional de Salud Pública, área de Metaxénicas Virales, Laboratorio de Aislamiento y Cultivo Celular – nivel de Bioseguridad II, perteneciente a Biomedicina. La dirección específica del establecimiento es la siguiente: Av. Defensores del Morro 2268 (Ex Huaylas) Chorrillos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño metodológico

El presente trabajo es una investigación analítica y experimental. La cepa y las muestras fueron proporcionadas por el Instituto Nacional de Salud-Laboratorio de Metaxénicas Virales. Se utilizó la línea celular VERO CCL-81 de riñón de mono verde africano como sistema celular para la producción de antígenos, la determinación del título viral y de anticuerpos neutralizantes. Las titulaciones se realizaron por medio de la técnica PRNT en 24 horas. En la titulación viral se determinó las unidades formadoras de placas (UFP) a una determinada concentración. La evaluación del título de anticuerpos neutralizantes se realizó al 50% de las UFP del título viral, es decir, el PRNT₅₀. Se analizó la relación entre los días de inicio de síntomas y el título viral.

Población y muestra

Se evaluaron 20 muestras séricas de pacientes que llegaron al Laboratorio de Metaxénicas Virales del Instituto Nacional de Salud - Salud Pública provenientes de Tumbes. Se tuvo como criterio de inclusión que las muestras fueran pareadas, es decir, que haya dos sueros por paciente: el primero tomado hasta los 8 días de síntomas y se utilizó en la prueba IgM a CHIKV, y el segundo tomado después de los 20 días de síntomas, para la prueba IgG a CHIKV. Sólo fueron consideradas muestras positivas si dieron positivo tanto a IgM como a IgG. Las muestras negativas correspondían a personas sanas sin infección previa con algún arbovirus.

Procedimiento

Producción de antígenos

Se utilizó un frasco de cultivo horizontal, con células VERO CCL-81 en monocapa confluyente, de 30 ml. Se diluyó una cepa aislada del virus CHIKV a una concentración 1/10. En cada frasco de cultivo se inoculó 500 μ l de cepa diluida, seguidamente se procedió a incubar a 37°C con 5% de CO₂ durante 30 minutos. Pasado el tiempo, se agregó 2.5 ml de medio de mantenimiento de Earle (E-MEM). El E-MEM contiene medio mínimo esencial de crecimiento sales de Earles, 2% de suero bovino fetal (SBF) y 1% de antibióticos. Se dejó incubar a 37°C con 5% de CO₂ durante 48 horas. Para cosechar el antígeno se raspó la monocapa de células y se recolectó en crioviales de 2 ml.

Titulación viral

Se utilizaron placas de cultivo de 24 pozos de células VERO CCL- 81 en monocapa confluyente. Se realizaron las siguientes diluciones de la cepa a utilizar: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} . Se inocularon 100 ul de cada dilución en cada pozo por triplicado. Como control negativo se inoculó PBS. La distribución de los pozos se dio de acuerdo al siguiente gráfico:

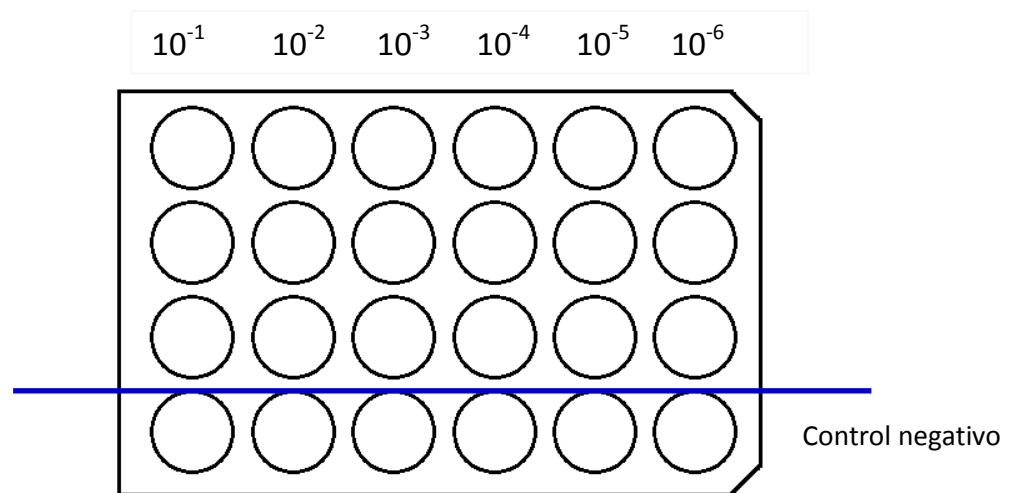


Fig. 4 Esquema de distribución de concentraciones para titulación viral.

Fuente: Elaboración propia

Pasado el tiempo, se lavó dos veces cada pozo con PBS 1X con cuidado de no desprender la monocapa celular. Posteriormente se agregó 0.5 ml de medio Overlay y se dejó incubando a 37°C con CO_2 5% durante 24 horas. Después del tiempo establecido se procedió a eliminar el medio Overlay y lavar una vez cada pozo con PBS 1X, luego se agregó 0.5 ml de colorante de plaqueo y se dejó la tinción durante 30 minutos. El siguiente paso fue eliminar el colorante, lavar las placas con agua corriente y dejar secar.

Cuando las placas de cultivo ya se encontraron secas, con ayuda de un microscopio invertido se procedió a leer las UFP en las diversas concentraciones y se estableció el título viral mediante la ecuación 1 tomada de Davis B. *et al* 1990.¹⁵

$$\text{Título viral } \frac{\text{UFP}}{\text{ml}} = \bar{X} \text{ placas UFP} \times \frac{\text{Volumen del inóculo}}{\text{ml}} \times \text{Inversa de la dilución}$$

Ecuación 1. Título viral UFP/ml

Titulación de anticuerpos neutralizantes

Se utilizaron placas de cultivo de 24 pozos de células VERO CCL-81 en monocapa y confluentes. Las muestras de sueros a titular fueron previamente inactivadas a 56°C por 30 minutos. Se realizaron seis diluciones dobles de los sueros. También se diluyó la cepa viral titulada a la mitad de concentración del título viral. Se combinó 50 ul de la dilución del suero con 50 ul de la dilución de la cepa. Se inoculó 100 ul de la combinación en cada pozo por triplicado. Como control positivo se inoculó PBS, y como control negativo se inoculó el título viral más PBS.

La distribución de los pozos fue de acuerdo al siguiente gráfico:

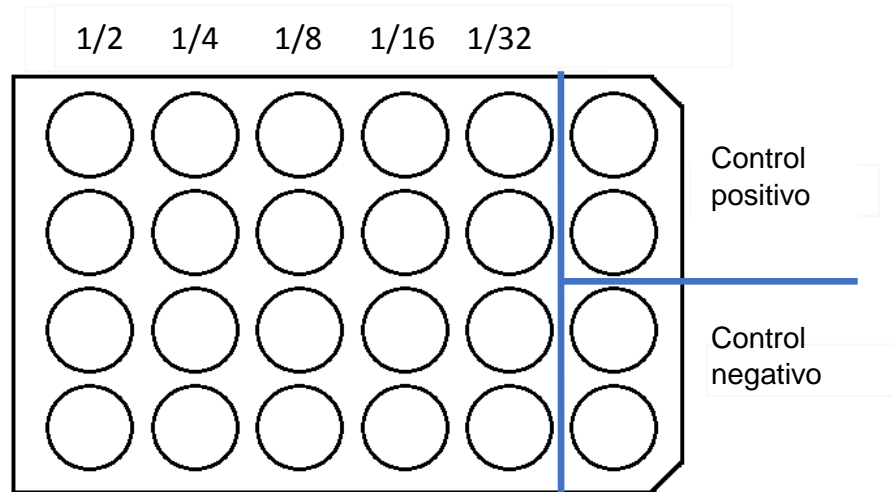


Fig. 5 Esquema de distribución de concentraciones para titulación de anticuerpos neutralizantes a CHIKV. Fuente: Elaboración propia

Cuando las placas ya se encontraron teñidas y secas se realizó el conteo de UFP. El título de anticuerpos fue la dilución que neutralizó el 50% de las UFP del título viral y se expresó en porcentaje de neutralización según la ecuación 2 tomada de Warter, L. *et al* 2014. ¹⁵

$$\text{Porcentaje de neutralización} = \left[1 - \frac{UFP_{\text{por cada dilución de suero}}}{UFP_{\text{control}}} \right] \%$$

Ecuación 2. Porcentaje de neutralización (%)

Procesamiento de la información

Los datos obtenidos fueron organizados en tablas y gráficos. Se documentó el efecto citopático de la cepa de CHIKV. Se halló el título viral de la cepa y los porcentajes de neutralización de los sueros testeados. Asimismo, se realizó un análisis de correlación de Pearson entre los días de inicio de síntomas y la concentración de anticuerpos neutralizantes de los sueros. Todas las pruebas se realizaron utilizando el programa SPSS versión 21 con un nivel de confianza de 95% (p significativa $<0,05$).

Aspecto ético

El presente estudio se realizó utilizando códigos como referencia de identificación de muestras y no se emplearon datos que pudieran revelar la identidad de los pacientes.

RESULTADOS

Se confirmó la presencia de CHIKV en cada placa de cultivo a través del efecto citopático. A las 24 horas de cultivo la monocapa de la línea celular VERO CCL-81 infectada con CHIKV mostró cambios morfológicos de membrana, así como desprendimiento y rotura celular. Después de teñir el cultivo con el colorante de plaqueo cada zona donde hubo daño en la monocapa fue considerada una UFP. Todas las placas contabilizadas presentaron un tamaño pequeño, aproximadamente 0,5 mm de diámetro, con bordes irregulares. Al realizar el conteo de UFP bajo el microscopio invertido, se seleccionó la concentración de 10^{-4} que presentó de 50 a 60 UFP. El título viral hallado fue de $5,8 * 10^{-4}$ UFP/ml.

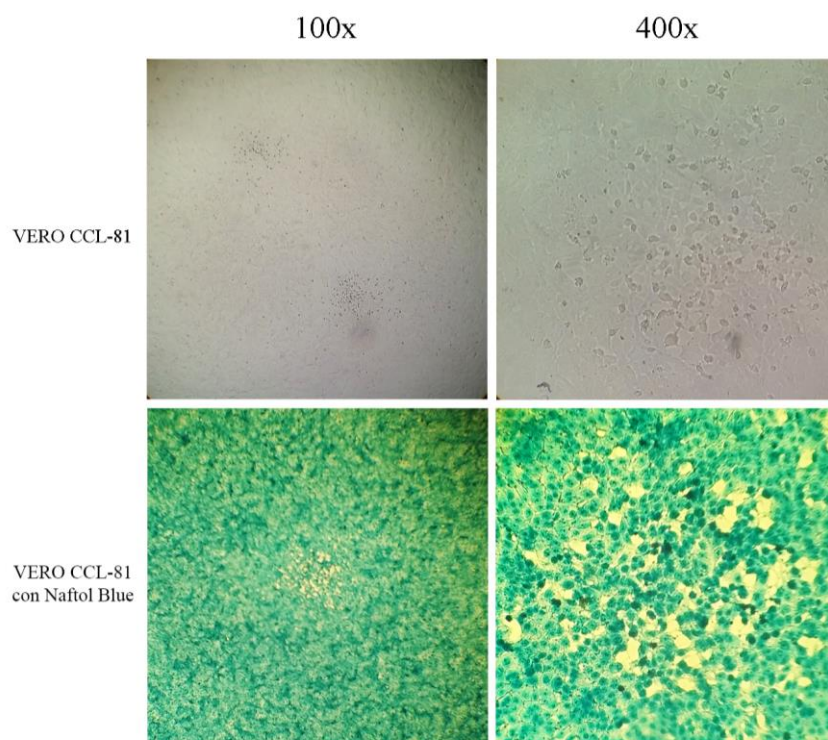


Fig. 6 Efecto citopático en células VERO CCL-81 infectadas con el virus Chikungunya.

Con respecto a la titulación de anticuerpos, de las 20 muestras evaluadas, 10 dieron positivo a la prueba PRNT₅₀ para Chikungunya con títulos que variaron de la dilución 1/8 a 1/16. Además, se observó un efecto citopático con placas de menor tamaño en relación al control.

Muestra	PRNT	Dilución	Días
5	56.90%	1/16	36
7	55.20%	1/16	37
1	56.90%	1/16	40
3	51.70%	1/16	43
9	56.90%	1/8	55
8	53.40%	1/8	57
4	65.50%	1/8	59
6	53.40%	1/8	59
2	55.20%	1/8	77
10	60.30%	1/8	92

Tabla 1. Resultados de la titulación de anticuerpos mediante PRNT₅₀ ordenados en relación al número de días

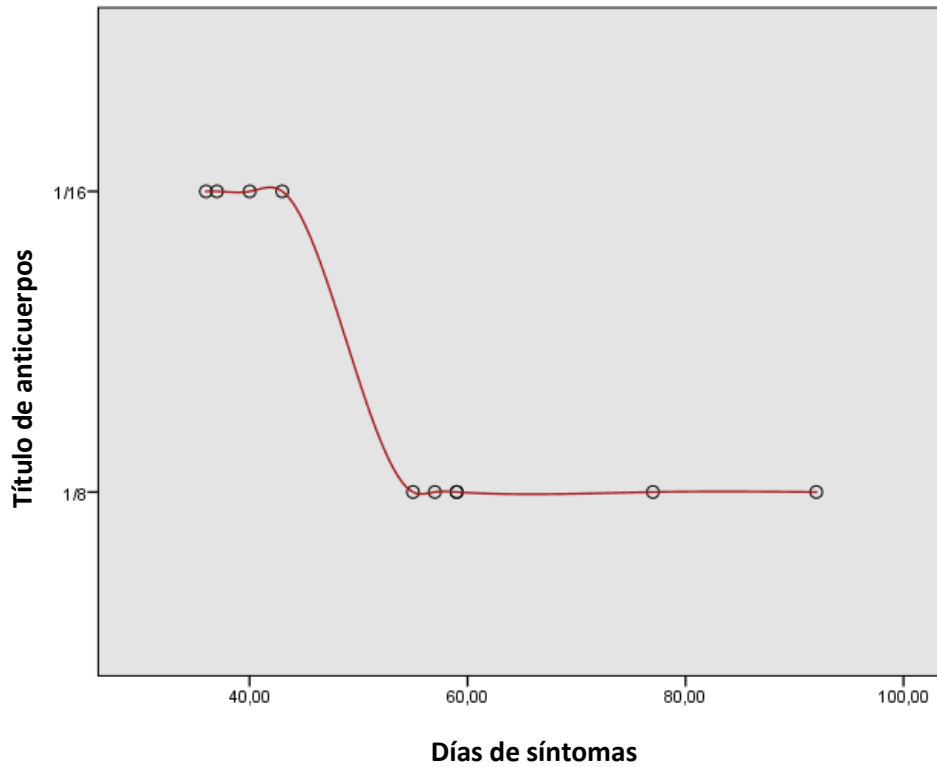


Fig. 7 Gráfico de la relación entre el número de días y la dilución de anticuerpos

A nivel estadístico, se encontró correlación negativa significativa (-0,712), con un nivel de confianza del 95% ($p=0,021$), entre el número de días del inicio de síntomas con la dilución del suero. Siendo la concentración de anticuerpos neutralizantes el recíproco de la dilución del suero, los datos obtenidos evidenciaron que existe una mayor cantidad de anticuerpos neutralizantes a Chikungunya dentro de los primeros 43 días del inicio de síntomas, en comparación a los días posteriores.

DISCUSIÓN

Desde la confirmación de la circulación autóctona de CHIKV en Perú, se han implementado pruebas rápidas de confirmación de la enfermedad. El test de ELISA IgM e IgG, al ser una prueba serológica de sencilla implementación, se utiliza con mayor frecuencia. Sin embargo, en múltiples publicaciones internacionales ^{18, 19, 20}, se ha reportado reacción cruzada entre virus pertenecientes al serocomplejo Semliki Forest. En Perú, la presencia de Mayaro y Encefalitis Venezolana ²⁰, genera un riesgo en la veracidad de los resultados de laboratorio. Por tal motivo, la Organización Panamericana de la Salud indica que se requiere realizar la prueba PRNT para confirmar los resultados de las pruebas de ELISA. ²

La metodología empleada en esta tesis para la titulación de anticuerpos a CHIKV incluyó la utilización de células VERO CCL-81. Según Wikan *et al* 2012 ²¹, ésta línea celular ha demostrado una alta tasa de infección y apoptosis provocada por CHIKV en comparación a la línea celular C6/36, donde hay una alta tasa de infección más no de apoptosis. Para la prueba PRNT, un alto porcentaje de apoptosis ocasionado por el virus, es necesario para que las placas reflejen el título real ²². Además, ésta misma publicación hace referencia que las placas obtenidas en la línea celular VERO CCL-81 se caracterizan por ser irregulares y de tamaño variable. Los resultados obtenidos concuerdan en las placas de bordes irregulares.

Como resultado de las 24 horas de tiempo de replicación viral en las células VERO CCL-81, se observó a través del microscopio invertido, cambios morfológicos de membrana, desprendimiento y rotura celular. Estos resultados son semejantes a los hallados por la Universidad de Mahidol ²⁵, donde se reportó vacuolización citoplasmática, redondeo de las células y desprendimiento celular del sustrato. Además, según Li *et al* 2013 ²⁶ se

confirmó que la proteína viral E2 de CHIKV, a las 24 horas ya se encontraba en el 80% de las células infectadas. Por lo tanto, utilizar este tiempo de ensayo podría ser una alternativa rápida para validar resultados serológicos. Sin embargo, se recomienda analizar si ésta variación reduciría significativamente la especificidad y sensibilidad de la PRNT.

Otro factor determinante en la metodología utilizada fue someter las muestras de suero a 56°C por 30 minutos. El libro de Microbiología de Vasanthakumari ²² indica que, a esa temperatura y tiempo se logra la inactivación del complemento, de virus y bacterias que podrían estar presentes en el suero, por consecuente se evita una lisis celular, que podría originar falsas placas. Sin embargo, recientes ensayos ^{23, 24} afirman que para inactivar CHIKV y otros alfavirus se requiere de una exposición al calor más prolongada. Por lo tanto, los resultados obtenidos podrían ser afectados por falsos positivos. Para próximas investigaciones se recomienda realizar pruebas de inactivación de alfavirus previamente, para confirmar la temperatura y tiempo necesario.

Según la Organización Panamericana de la Salud ², el título viral se encuentra en el estado de viremia, en promedio, en la dilución 10^6 , dentro de los dos primeros días de síntomas. Progresivamente esta carga viral se va reduciendo hasta el octavo día de síntomas. El título viral hallado de la cepa endémica de Tumbes estuvo en la dilución de 10^4 , lo que es más bajo que el promedio. Este resultado puede ser debido a que la cepa estuvo congelada a -70°C durante 6 meses antes de ser utilizada, y pudo haberse afectado su fitness viral.

Según Trimbitas *et al* 2014 ²⁷, otras causas que afectan el fitness viral o variabilidad de la carga viral son el genotipo y la cepa del virus. Cabe resaltar que, brotes epidémicos de alta magnitud como los sucedidos en Europa en el 2006 ²⁸ han reportado títulos de hasta 10^9 . Sin embargo, según Turell *et al* 1992 ²⁹, un título viral de 10^4 aún es lo suficientemente alto como para infectar al vector *Aedes aegypti* y dispersar la enfermedad. Si bien aún

no se conoce el genotipo del virus que circula en territorio peruano, el título viral hallado confirma que el CHIKV cuenta con las condiciones internas para seguir replicándose y expandirse a otras zonas.

Según algunos artículos científicos consultados ^{4, 32}, el menor título de anticuerpos catalogado como protector neutralizante para virus se da a la dilución 1:10. En los resultados obtenidos, algunas de las muestras evaluadas presentaron un título de anticuerpos neutralizantes de 1:8, que podría ser considerado inicialmente como no protector. Sin embargo, cabe resaltar que, para poder confirmar esta premisa, se tendría que realizar un nuevo estudio en donde se consideren diluciones entre 1:8 y 1:16 para estas muestras.

La significativa correlación hallada entre el título de anticuerpos neutralizantes a CHIKV y los días de síntomas, es explicable a través de los principios básicos de inmunología. Según Rugeles ³⁰, en su libro *Análisis e intervención del sistema inmune*, en una infección aguda, dentro de los primeros 8 días, se encontrará un alto índice de IgM. Posteriormente, este índice decrecerá y paralelamente la concentración de IgG aumentará hasta llegar a su punto máximo en el día 30 aproximadamente. Asimismo, según Guzmán *et al* 2010 ³¹, los días posteriores a la infección de arbovirus conocidos como la etapa de recuperación o convalecencia del paciente, la IgG se irá reduciendo hasta llegar a una concentración que se mantendrá estable a través de meses e inclusive años, ya que funcionará como memoria inmunológica.

La principal limitación de esta investigación fue la poca cantidad de muestras evaluadas y la falta de discriminación de estas en grupos de riesgo como, la edad de los pacientes o si presentaran alguna comorbilidad que indicaran una respuesta inmunológica disminuida. A pesar de ello, los resultados obtenidos representan una contribución al estudio del virus Chikungunya en el país.

CONCLUSIONES

- Se determinó que la población de la costa norte peruana sí está desarrollando anticuerpos neutralizantes, en un rango de 1/8 a 1/16, a CHIKV frente a la circulación de una cepa endémica de Tumbes.
- Se logró una producción de antígenos con un título viral de $5,8 * 10^{-4}$ UFP/ml a partir de la cepa endémica de la costa norte peruana. Este dato indica que el virus circulante está apto para seguir diseminando la enfermedad.
- Se utilizó la prueba PRNT con una variante a 24 horas para hallar el título de anticuerpos neutralizantes. Ésta variación otorga buenos resultados de manera rápida.
- El título de anticuerpos neutralizantes hallado es inversamente dependiente de los días de síntomas. Siendo a menor días de síntomas el título más alto.

RECOMENDACIONES

- Se recomienda incrementar el número de muestras a evaluar, ampliar el rango de días para hallar la seroconversión, y relacionar datos como el grupo etario y la presencia o no de comorbilidades, con el título de anticuerpos neutralizantes.
- Se recomienda evaluar la temperatura y el tiempo de inactivación de alfavirus presentes en el Perú con el objetivo de evitar falsos resultados en análisis serológicos.
- Se recomienda reevaluar las muestras que obtuvieron título neutralizante 1:8 con el objetivo de confirmar su título protector.
- Se recomienda evaluar las mismas muestras con otros alfavirus para descartar o confirmar reacción cruzada.

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

1. Lee CY, Kam Y-W, Fric J, Malleret B, Koh EGL, Prakash C. Chikungunya Virus Neutralization Antigens and Direct Cell-to-Cell Transmission Are Revealed by Human Antibody-Escape Mutants. *PLoS Pathog.* 2011; 7(12)
2. Organización Panamericana de la Salud. Preparación y respuesta ante la eventual introducción del virus chikungunya en las Américas. Washington, D.C. LA OPS. 2011. [Acceso 15 de noviembre de 2015]. Disponible en: http://www1.paho.org/hq/dmdocuments/CHIKV_Spanish.pdf
3. Boletín Epidemiológico (Lima) Volumen 24 – Semana Epidemiológica N° 31. [Acceso 29 de setiembre de 2015]. Disponible en: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2015/31.pdf>
4. Acuña M, Castillo R, y García M. Neutralización por reducción en placas como método específico para el Diagnóstico Serológico de Fiebre Amarilla. *Revista Peruana de Medicina Experimental.* 2001; 18: 71-76
5. Schmaljohn A, McClain D. Capítulo 54. Alphaviruses (Togaviridae) and Flaviviruses (Flaviviridae). *Medical Microbiology.* 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7633/>
6. Weaver S, Osorio J, Livengood J, Chen R, Stinchcomb D. Chikungunya Virus and Prospects for a Vaccine. *Expert. Rev. vaccines.* 2012;11(9):1087-1101.
7. Tsetsarkin KA, Chen R, Sherman MB, Weaver S. Chikungunya virus: evolution and genetic determinants of emergence. *Current opinion in virology.* 2011;1(4):310-7

8. Thiboutot M, Kannan S, Kawalekar O, Shedlock D, Khan A, Sarangan G, Srikanth P, Weiner D, Muthumani K. Chikungunya: a potentially emerging epidemic? PLoS Neglected Tropical Diseases. 2010; 4(4):623
9. Burt FJ, Rolph MS, Rulli NE, Mahalingam S, Heise MT. Chikungunya: a reemerging virus. Lancet. 2012; 379 (9816):662-71
10. Dirección General de Epidemiología. Plan Nacional de Preparación y Respuesta frente a la Fiebre de Chikungunya – Perú. [Monografía en Internet]. Ministerio de Salud; 2014 [Acceso 15 de diciembre de 2015]. Disponible en: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/tools/chikungunya/6.PlanNacionalPeru.pdf>
11. Dirección General de Epidemiología. Alerta Epidemiológica. 11 de Junio de 2015. [Acceso 15 de diciembre de 2015]. Disponible en: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/alertas/2015/AE005.pdf>
12. Roehrig J, Hombach J, Barrett D. Guidelines for Plaque-Reduction Neutralization Testing of Human Antibodies to Dengue Viruses. Viral Immunol. 2008; 21(2):123-32.
13. Abdelnabi R, Neyts J, Delang L. Towards antivirals against chikungunya virus. Antiviral Research. 2015; 121: 59–68
14. Plante K, Rossi S, Bergren N, Seymour R, Weaver S. Extended Preclinical Safety, Efficacy and Stability Testing of a Live-attenuated Chikungunya Vaccine Candidate. PLoS Negl Trop Dis. 2015; 9(9)
15. Davis B, Dulbecco R, Eisen H.N, Ginsberg H.S., Microbiology. 4ª edición. J.B. Lippincott Co., Philadelphia. 1990; p.789
16. Warter L, Lee C, Thiagarajan R, Grandadam M, Lebecque S, Lin R, Bertin-Maghit S, Ng L, Abastado J, Despre`s P, Wang C, Nardin A. Chikungunya Virus Envelope-Specific Human Monoclonal Antibodies with Broad Neutralization Potency. 2011; 186(5):3258-64.

17. Porterfield J. Cross-Neutralization Studies with Group A Arthropod-borne Viruses. *Bull. Org. mond. Sante.* 1961, 24:735-741.
18. Calisher C, Kafrawi A, Mahmud M, Travassos Da Rosa A, Bartz C, Brummer-Korvenkontio M, Haksokusodo S, Suharyono W. Complex-Specific Immunoglobulin M Antibody Patterns in Humans Infected with Alphaviruses. *Journal Of Clinical Microbiology.* 1986;155-159
19. Hassing R, Leparc-Goffart I, Tolou H, Van Doornum G, Van Genderen P. Cross-reactivity of antibodies to viruses belonging to the Semliki forest serocomplex. *Euro Surveill.* 2010; 15(23)
20. Estudio Interinstitucional Desarrollado por las Instituciones del Ministerio de Salud Del Perú; en colaboración con el Instituto De Investigación de Enfermedades Tropicales de la Marina de los Estados Unidos; La UNMSM y la UPCH. Perfil etiológico del síndrome febril en áreas de alto riesgo de transmisión de enfermedades infecciosas de impacto en salud pública en el Perú, 2000-2001. *Revista Peruana de Medicina Experimenta salud pública.* 2005, 22(3):165-174
21. Wikan N, Sakoonwatanyoo P, Ubol S, Yoksan S, Smith DR. Chikungunya Virus Infection of Cell Lines: Analysis of the East, Central and South African Lineage. *PLoS One.* 2012; 7(1):1-11.
22. Vasanthakumari R. *Textbook of Microbiology.* India: BI Publications Pvt Ltd; 2007; 123-124.
23. Huang Y, Hsu W, Higgs S, Vanlandingham D. Temperature Tolerance and Inactivation of Chikungunya Virus. *VECTOR-BORNE AND ZOONOTIC DISEASES.* 2015; 15(11):674-677.
24. Park L, Huang Y, Hsu W, Hettenbachb S, Higgs S, Vanlandingham D. Virus-specific thermostability and heat inactivation profiles of alphaviruses. *Journal of Virological Methods.* 2016; 234, 152–155.
25. Mahidol University [sede Web]. Tailandia; [Acceso: 10 de setiembre del 2016]. De Onnome S, Ubol S, Pulmanusahakul R. Effects of vero and

c6/36 cells upon chikv phenotypes. Disponible en:
www.grad.mahidol.ac.th/storage/Internet/.../F-5610169.docx

26. Li Y, Siripanyaphinyo U, Tumkosit U, Noranate N, A-nuegoonpipat A, Tao T, Kurosu T, Ikuta K, Takeda N, Anantapreecha S. Chikungunya virus induces a more moderate cytopathic effect in mosquito cells than in mammalian cells. *Intervirology*. 2013; 56:6–12
27. Trimbilas R, Serghini F, Lazaar F, Baha W, Foulous A, Essalhi M, Malki A, Bellefquih A, Bennani A. The “hidden” epidemic: a snapshot of Moroccan intravenous drug users. *Virology Journal*. 2014; 11(1):43.
28. Panning M, Grywna K, Esbroeck M, Emmerich P, Drosten C. Chikungunya Fever in Travelers Returning to Europe from the Indian Ocean Region 2006. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14(3):416–422.
29. Turell M, Beaman J, Tammariello R. Susceptibility of Selected Strains of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) to Chikungunya Virus. *J Med Entomol*. 1992; 29(1):49-53.
30. Rugeles M, Montoya C. Análisis e intervención del sistema inmune. En: Universidad de Antioquía-España. *Inmunología. Una ciencia activa*. 2º Edición. España; 2009; 487-545.
31. Guzman M, Halstead S, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler D, Hunsperger E, Kroeger A, Margolis H, Martínez E, Nathan M, Pelegriño J, Simmons C, Yoksan S, Peeling R. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol*. 2010; 8(12):7-16.
32. Gómez S, Ocazonez R. Anticuerpos Neutralizantes contra el Virus de la Fiebre Amarilla 17 D en Colombianos Vacunados y no Vacunados con Inmunidad a Dengue. *Revista Salud Pública*. 2008; 10 (5):796-807

ANEXOS

Anexo 1. Preparación de reactivos y soluciones

1. Colorante de plaqueo

- | | |
|---|--------|
| ➤ Naftol Blue Black | 1g |
| ➤ Acetato de Sodio | 13,6g |
| ➤ Agua bidestilada | 940 ml |
| Mezclar 10 minutos con la ayuda de un homogenizador | |
| ➤ Ácido Acético Glacial | 60 ml |

Nota: Agregar el ácido acético glacial en una campana extractora.

2. PBS 20X – 1 litro

- | | |
|-----------------------------|---------|
| ➤ NaCl | 160 gr |
| ➤ KCl | 4 gr |
| ➤ KH_2PO_4 | 2,8 gr |
| ➤ Na_2HPO_4 | 18,2 gr |

3. Medio Overlay

- Suero Bovino Fetal inactivado por calor 50ml
- L-glutamina 5ml
- Antibiótico 5ml
- E-MEM 500 ml
- Carboximetilcelulosa al 3% estéril 100 ml

Ajustar el pH con bicarbonato de sodio a 7,2-7,4 pH y almacenar a 4°C

4. Carboximetilcelulosa 3%

- Carboximetilcelulosa 6 gr
- Agua bidestilada 200 ml

Anexo 2. Producción de antígeno

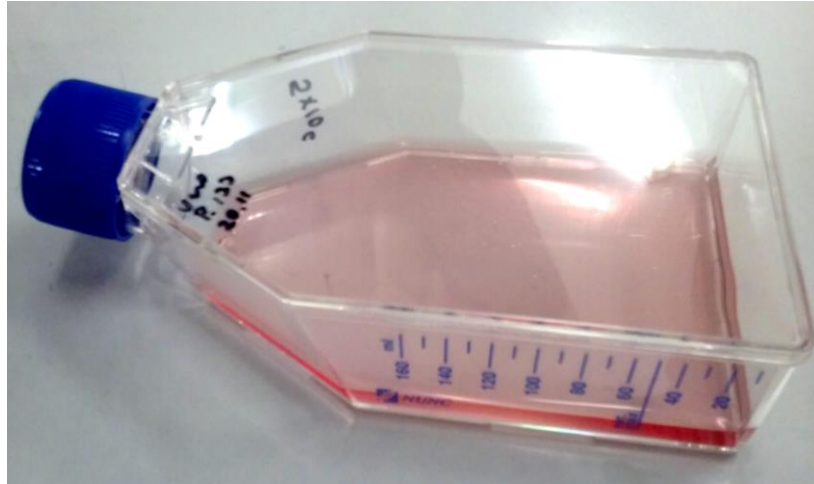


Fig. 8 Frasco de cultivo con monocapa de células VERO CCL-81 infectadas con CHIKV

Anexo 3. Observación mediante microscopio invertido



Fig. 9 Lectura de placas de cultivo para determinar el efecto citopático de CHIKV.

Anexo 4. Titulación de anticuerpos

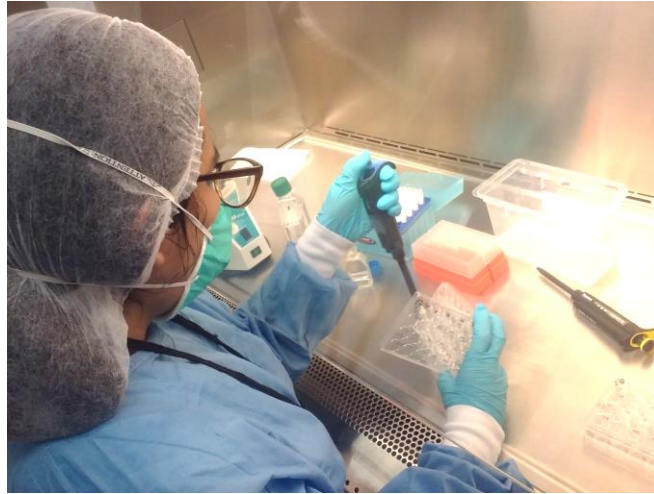


Fig. 10 Proceso de lavado de células después de la incubación del suero con el virus Chikungunya.

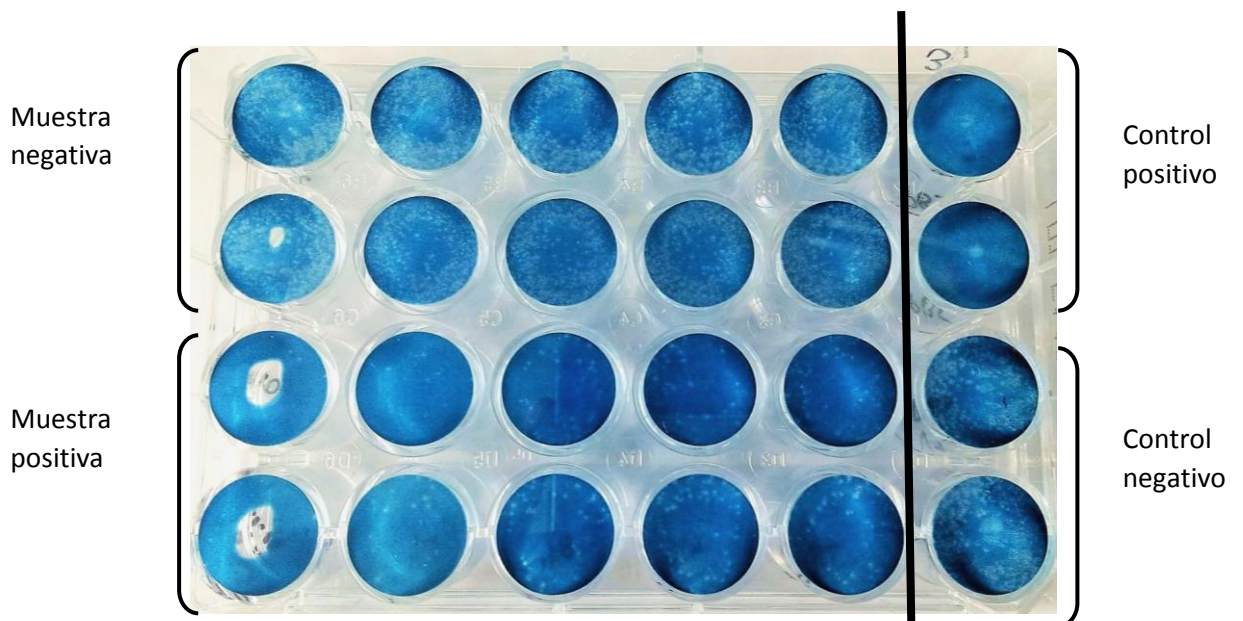


Fig. 11 Resultados positivos y negativos de la PRNT₅₀

Anexo 5. Tabla cruzada de la dilución de anticuerpos con los días de síntomas

		Dilución		Total
		1/16	1/8	
Días	36,00	1	0	1
	37,00	1	0	1
	40,00	1	0	1
	43,00	1	0	1
	55,00	0	1	1
	57,00	0	1	1
	59,00	0	2	2
	77,00	0	1	1
	92,00	0	1	1
Total		4	6	10

Tabla 2. Tabla cruzada entre dilución de anticuerpos y días de síntomas.

Programa SPSS v.21

Anexo 6. Correlación de Pearson entre el título de anticuerpos neutralizantes y los días de síntomas

		título	días
Título de anticuerpos neutralizantes	Correlación de Pearson	1	-,712
	Sig. (bilateral)		,021
	N	10	10
Número de días	Correlación de Pearson	-,712	1
	Sig. (bilateral)	,021	
	N	10	10

*. La correlación es significativa en el nivel 0,05 (2 colas).

Tabla 3. Correlaciones entre el título de anticuerpos neutralizantes y los días de síntomas al 95%