



32
201

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

PROPIEDADES BIOLÓGICAS DE 23 CEPAS
DE VIRUS DEL DENGUE,
AISLADAS EN MEXICO EN 1984

T E S I S

Para obtener el Título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

p r e s e n t a

MA. DE LOS ANGELES LILIAN MARTINEZ ROMERO

Director de Tesis: Q.B.P. JUDITH MARTINEZ ZAMITIZ

Cuautitlán Izcalli, Estado de México 1986.



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	Pags.
I.- Resumen.	1
II.- Introducción.	3
III.- Objetivos.	14
IV.- Material.	15
V.- Preparación de medios y reactivos.	17
VI.- Métodos.	26
VII.- Resultados.	44
VIII.- Discusión.	50
IX.- Conclusiones.	56
X.- Bibliografía	58

I.- RESUMEN

Dengue es el homónimo castellano del vocablo swahili "dengua" para: calambre súbito (7).

El dengue o fiebre quebranta huesos, es una enfermedad infecciosa transmitida por mosquitos particularmente por el Aedes aegypti que es doméstico y por el Aedes albopictus los cuales se desarrollan en los matorrales y en la selva. Su período de incubación es de 5 a 8 días, pero puede variar de dos días y medio a quince días, lo cual depende de la cantidad de virus que se ha inoculado en el organismo y de su adaptación previa.

Es una enfermedad febril aguda que se caracteriza por un principio brusco, con fiebre que dura unos 5 días, pero rara vez más de 7, cefalea, dolores retroorbitales, erupción, dolores musculares y articulares y linfadenopatías. La erupción aparece por lo común 3 a 4 días después del comienzo de la fiebre y es maculopapular o escarlatiforme, pueden presentarse petequias en los pies, piernas, axilas o paladar en el último día de fiebre o poco después. El restablecimiento puede estar asociado con fatiga o depresión prolongada (1).

Existen 4 tipos serológicos del virus del dengue descritos del 1 al 4, con antígenos detectables por las pruebas de Fijación de Complemento (FC) (6,9), Inhibición de la Hemaglutinación (IH) (9), Neutralización (6), ELISA, Inmunofluorescencia -- Directa (ID) e Inmunoelectroforesis (6).

Las pruebas a nivel de Laboratorio para el diagnóstico del virus del dengue y las más utilizadas son: Inhibición de la Hemaglutinación e Inmunofluorescencia Directa.

El ser humano resulta el huésped más susceptible a la infección por el virus del dengue. En el laboratorio es el ratón el animal de elección para estudiar este virus, aunque es necesario efectuar pases ciegos en los ratones hasta lograr la adaptación de una cepa (6).

Ultimamente se han reportado casos en varios estados de la República Mexicana --- como los son en: Jalisco, Nayarit, Colima, Mérida, Oaxaca y Nuevo León aislandose los serotipos 1, 2 y 4.

Debido al gran número de personas que son infectadas en la República Mexicana y en las áreas tropicales del mundo por dicho virus, la enfermedad del dengue se -- considera un grave problema ya que el único laboratorio de Virología en la República Mexicana que hace el diagnóstico del dengue es el Instituto de Salud y Enfermedades Tropicales (ISET) localizado en la ciudad de México Distrito Federal;

el diagnóstico se basa en dos pruebas: IH e ID, las cuales son las más rápidas - considerando que, la primera de éstas tarda de 10 a 12 días para dar el diagnóstico y la segunda se puede realizar en un sólo día pero, como se aconseja (2,6) trabajar con muestras de sueros pares obtenidos con 14 a 21 días de intervalo, - el diagnóstico tarda más. Esto es considerable, además del tiempo en que tardan en llegar las muestras al laboratorio el cual se encuentra demasiado alejado de - de las áreas donde existe la enfermedad.

Por esta razón el Instituto de Salud y Enfermedades Tropicales pensó en realizar éste trabajo, el cual se basa en demostrar algunas de las propiedades biológicas del virus del dengue como lo son: adaptación del virus a cerebro de ratón lactante, comparación de susceptibilidad en 3 líneas celulares: TRA (de mosquito), LLC-MK₂ (de riñón de mono Rhesus) y VERO (de riñón de mono verde africano) por - Inmunofluorescencia Directa, observación del Efecto Citopático que provoca el -- el virus, identificación del virus por la prueba de inhibición de la hemaglutinación, aumento del título del virus por medio de pases en células LLC-MK₂ y aislamiento e identificación por ensayo de placa en células LLC-MK₂; así como la adaptación de éstos procedimientos para un diagnóstico más rápido y veraz del dengue.

III.- INTRODUCCION

RESEÑA HISTORICA DEL DENGUE.

Por más de dos siglos, el dengue se viene presentando en climas cálidos en todo el mundo. El dengue tipo 1 fué aislado durante la segunda guerra mundial en el norte de Australia, Japón, Nueva Guinea, Fidji y Hawaii, y éste sobrevivió por cerca de 6 años en Fidji antes de que desapareciera. Aunque realmente se le dió importancia en 1950.

El dengue tipo 2 se aisló en Trinidad en 1953, donde fué endémico y sirvió para -- extenderse a otras islas (Ver mapa N° 1).

Los serotipos 3 y 4 del dengue fueron aislados en el sureste de Asia en 1954, --- durante la aparición de la Fiebre Hemorrágica del Dengue (FHD) en las Filipinas. - En 1958 se presentaron los serotipos 1 y 2 durante el primer ataque de FHD en --- Tailandia. Años más tarde en Indonesia fueron reconocidos los serotipos 3 y 4, y - los 4 serotipos se asocian con FHD.

En el año de 1963, en la India (Calcuta) se originó una epidemia del síndrome he-- morrágico. Y en éste mismo año Jamaica experimentó ataques causados por el seroti-- po 3.

En 1964 apareció el dengue tipo 3 en la Polinesia Francesa, donde causó un segundo ataque en 1969. Y en el año de 1968 Jamaica fué atacada por el serotipo 2.

En 1971, el dengue tipo 2 comienza en Fidji y se extiende sobre la Polinesia France-- sa, donde fué afectada la mitad de la población. En 1972, alcanzó, Nueva Britania en Papua Guinea, Nueva Celedonia, Gilbert y las Islas Ellice, Nuevas Hebridas y -- Tonga. En el norte de Colombia, el dengue tipo 2 también causó un gran ataque de - 1971 - 1972, donde resultaron 450,000 casos reportados.

En Puerto Rico se observó la transmisión del dengue en forma esporádica, de 1970 a 1975 con transmisión de los serotipos 2 y 3. En 1975 el dengue tipo 2 causó cerca de 1,300 casos de los cuales 3 fueron considerados como sospechosos de FHD, y en - 1976 se notificaron 1382 casos (12). Posteriormente entre el 8 de Septiembre y el 5 de Octubre de 1977 se presentó un incremento reportandose 5,085 casos en 72 de - los 78 municipios que componen dicho país (11).

En el año de 1977 apareció en Jamaica el dengue tipo 1, que en aquel tiempo resul-- taron más de 60,000 casos y afectó cerca del 10% de la población (12).

Ahora bién el primer brote serio de dengue hemorrágico y síndrome de choque en el hemisferio occidental ocurrió en Cuba en 1981. Durante esta extensa epidemia que -

duró de Mayo a Octubre 344,203 casos fueron reportados, la mayor parte de ellos -- dentro de un período de tres meses.

Hubo 116,143 personas hospitalizadas, estimándose que de ellas 24,000 presentaban la forma hemorrágica. En aproximadamente 10,000 casos de síndrome de choque hubo - 158 muertes. Formas severas de la enfermedad fueron vistas predominantemente en -- niños menores de 15 años. Un gran número de casos ocurrieron en adultos y un ter-- cio de las muertes fueron en estos (13).

DENGUE EN MEXICO.

El dengue tipo 1 fué introducido en Chiapas y en el sur de México a finales de --- 1978; durante 1979 a 1980, la epidemia se extendió a través de muchos estados mexi-- canos (13).

En 1980 se reportaron epidemias en: Chetumal, Carrillo Puerto, Quintana Roo, en la Península de Yucatán y Montemorelos Nuevo León (Ver Mapa N° 1). Los sueros fueron enviados a la ciudad de San Juan de Puerto Rico haciendoles pruebas de inhibición de la hemaglutinación, de los cuales se observaron igualmente afectados en grados de prevalencia de anticuerpos del 70 al 90% en cada una de las ciudades, tipifi-- cándose dengue de los serotipos 1, 2 y 4 (18).

El siguiente año 1981, fué un año relativamente tranquilo, pero en 1982 sobre --- 30,000 casos sospechosos de dengue fueron reportados en México. Las epidemias en - 1982 principiaron en Junio en Veracruz, pero pronto se movieron a través de la ciu-- dad hacia el oeste de la costa donde las principales epidemias ocurrieron por pri-- mera vez en muchos años. Se presume por evidencias obtenidas por autoridades de - salud mexicana y por muestras enviadas al laboratorio de San Juan de Puerto Rico - que las epidemias en 1982 fueron también causadas por el dengue tipo 1 (18).

En Julio y Agosto de 1982 se obtuvieron muestras de suero de 34 pacientes de Cordo-- ba Veracruz, las cuales se enviaron al laboratorio de San Juan de Puerto Rico para aislar el virus haciendoles pruebas serológicas. De los cuales 14 de los 34 pacien-- tes (41%) fueron confirmados como dengue y siendo 7 de los casos aislados del sero-- tipo 1. El dato sugiere que el serotipo 1 fué el predominante transmitido en Vera-- cruz en 1982.

El virus del dengue tipo 4 fué también aislado durante brotes en México en 1983- 1984. En años recientes, la mayor parte de la actividad del dengue ha estado aso-- ciada al dengue tipo 1 y al tipo 4. No obstante el tipo 2 continúa siendo aisla-- do en casos esporádicos. Todos éstos tipos han sido detectados en México en 1984. (13).

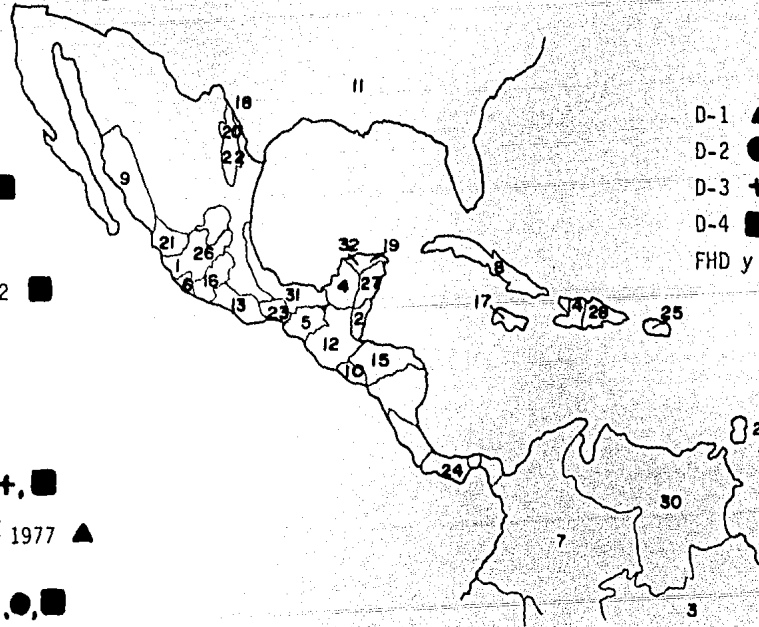
Durante una epidemia de dengue tipo 4 en México en 1984, fueron reportados 5,390 - casos, incluyendo nueve casos de la forma hemorrágica, de los cuales 4 tuvieron -- una evolución fatal (13).

Actualmente en el Instituto de Salud y Enfermedades Tropicales (ISET) se están --- trabajando muestras de la República Mexicana, intentando aislamientos en los casos agudos y la titulación de anticuerpos en muestras de sueros pares, obteniendose -- favorables resultados los cuales son controlados por el Centro de Control de Enfermedades (CDC) de Atlanta.

MAPA N° 1

DISTRIBUCION GEOGRAFICA DEL DENGUE EN AMERICA DEL NORTE, DEL CENTRO, DEL SUR
E ISLAS DEL CARIBE.

- 1.- Apatzingán 1982 ●
- 2.- Belice 1979 ■
- 3.- Brasil 1982 ▲, ●, +, ■
- 4.- Campeche 1979 ▲
- 5.- Chiapas 1978 ▲
- 6.- Colima 1984 ▲
- 7.- Colombia 1971 ● 1982 ■
- 8.- Cuba 1981 *
- 9.- Culiacán 1982 ●
- 10.- El Salvador 1982 ■
- 11.- E.U.A. 1982 ▲, ●, ■
- 12.- Guatemala 1982 ■
- 13.- Guerrero 1979 ●
- 14.- Haití 1982 ▲
- 15.- Honduras 1982 ▲, ●, +, ■
- 16.- Huetamo 1982 ●
- 17.- Jamaica 1968 ▲, ●, ■ 1977 ▲
- 18.- Laredo 1982 ●
- 19.- Mérida 1984 ■
- 20.- Montemorelos 1980 ▲, ●, ■
- 21.- Nayarit 1984 ▲
- 22.- Nuevo León 1984 ▲
- 23.- Oaxaca 1979 y 1984 ▲
- 24.- Panamá 1941-42 ●
- 25.- Puerto Rico 1982 ▲, ●, ■
- 26.- PuertoVallarta 1984 ▲, ●, ■
- 27.- Quintana Roo 1980 ▲, ●, ■
- 28.- Rep. Dominicana 1982 ■
- 29.- Trinidad 1982 ▲, ●, ■
- 30.- Venezuela ▲
- 31.- Veracruz 1982 ▲, ●, ■
- 32.- Yucatán 1980 ▲, ●, ■



- D-1 ▲
 D-2 ●
 D-3 +
 D-4 ■
 FHD y síndrome de choque.*

CARACTERISTICAS DEL VIRUS DEL DENGUE.

El virus del dengue pertenece a la familia Togaviridae del Grupo B (Flavivirus) de los Arbovirus (6) y comparte antígenos con los virus de la Fiebre Amarilla y los de las Encefalitis Japonesa y de San Luis (7).

A.- Tamaño: el diámetro es aproximadamente de 50 nm. con un centro de 25 nm.

B.- Reacción a los agentes físicos y químicos: son estables en estado de congelación a -70°C y al estado de liofilización a 5°C .

C.- Propiedades físicas y químicas:

- Contiene un genoma ARN de tira única el cual es infeccioso y de polaridad positiva.
- Su virión es esférico.
- Su simetría es icosaédrica (6).
- Peso molecular 4.2×10^6 daltons (19).
- Posee una cubierta de lípidos sensibles al éter.
- Contiene carbohidratos y proteínas.
- Se multiplica en el citoplasma y madura por gemación.
- Su coeficiente de sedimentación es de 17S - 218S.
- Estable a pH 8 y se degrada a pH 6.
- Se inactiva con radiaciones ultravioleta, rayos X y a temperatura de 56°C . - por 30 minutos (6).

D.- Configuración química: el virus del dengue como otros Flavivirus producen 3 -- proteínas estructurales y 5 no estructurales. Las 3 proteínas estructurales -- son:

- La principal o mayor (E ó V_3), glucósido, proteína de envoltura con PM de -- 53,000 - 59,000 daltons.
- La media (C ó V_2), monoglucósido de nucleocapside con PM de 13,500 daltons.
- La menor (M ó V_1), monoglucósido de envoltura con PM de 5,700 daltons.

La proteína principal E ó V_3 contiene la mayoría de los antígenos (Ags.) involucrados en las reacciones inmunológicas, y está asociada a la hemaglutinina y a la actividad neutralizante, la cual contiene por lo menos 3 determinantes antigénicos: -- a) serotipo específico, b) complejo (sub-grupo específico) y c) flavi grupo reactivo (14, 19).

E.- Susceptibilidad de animales: los ratones inoculados con suero humano que contienen virus del dengue rara vez muestran signos de enfermedad pero se han adaptado varias cepas para que produzcan parálisis en los ratones lactantes inocu-

lados (6).

- F.- Crecimiento en células: el virus del dengue se desarrolla en gran escala en -- diversos cultivos de células, produciendo cambios citopáticos difíciles de --- observar. El aislamiento primario del virus del dengue ha sido reportado usando cultivos de A. albopictus produciendo poco o ningún efecto citopático. (6)
- G.- Inmunidad.- Las infecciones por virus del dengue de los tipos 1 y 2 están asociadas con las cifras más altas de Acs. En estas condiciones pueden existir -- suficientes Acs. que reaccionen cruzadamente e impidan la infección con los -- tipos 3 o 4. Las personas previamente vacunadas contra la Fiebre Amarilla o infectadas con otro grupo de virus B dan una amplia respuesta anamnéstica de Acs. con la inmunización experimental con virus atenuados del dengue (6).
- H.- Formación de placas: las cepas de dengue producen "placas" bajo agar en una -- línea celular continua de riñón de mono (LLC-MK₂); este sistema fué adaptado - para detectar y recuperar virus del dengue (21). Las experiencias con aisla---mientos de dengue a partir de sueros colectados en el Caribe en 1977 demostra---ron que el virus que es cultivado en células LLC-MK₂ sobre medio líquido, in---crementa el número de partículas, detectado por el procedimiento de ensayo de placas (5, 12).

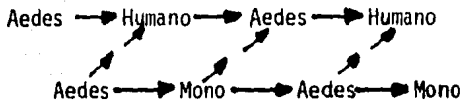
La técnica directa de Formación de Placas es más sensible a la formación de -- placas por Arbovirus que en fibroblastos de embrión de pollo (10); las células LLC-MK₂ fueron empleadas para examinar la capacidad de formación de placas y - para aislar el virus del dengue en Malasia (15).

Desde que se presentaron los serotipos 2 y 3 del virus del dengue se requirieron medios precisos para la diferenciación de serotipos virales. Una combinación de la amplificación del virus en cultivo de células, ensayo de placa, y - por reducción de formación de placa resulta útil, altamente específica y con---fiable para la identificación de los serotipos (12, 16).

EPIDEMIOLOGIA.

En la actualidad la distribución geográfica de los virus del dengue comprenden a - la India, el Lejano Oriente y las Islas Hawaii y del Caribe, en México y en Australia, además regiones tropicales y subtropicales del mundo, donde existen los vecto---res Aedes y que se han transformado en la actualidad en áreas endémicas.

Ciclo Infectante.



Las epidemias a menudo comienzan durante la estación de lluvias, cuando el mosquito vector Aedes aegypti abunda (6).

En el año de 1963-67 se presentaron epidemias por el serotipo 3 en Venezuela y el Caribe.

En 1968-69 ocurrieron epidemias por los serotipos 2 y 3 en Venezuela y el Caribe.

En los años 1971-72 y 1976-77 ocurrieron epidemias en Colombia dadas por los serotipos 2 y 3 con 450,000 y 200,000 casos reportados respectivamente.

En el Caribe, América del norte y del sur, centro América, México y E.U.A. se presentaron epidemias en el año de 1977-80 por el serotipo 1 con 700,000 casos reportados.

En Cuba se presentaron las epidemias en 1981 por el serotipo 2 con 344,203 casos reportados.

Y en los años de 1981-84 se presentaron epidemias dadas por los serotipos 1, 2 y 4 en el Caribe, América del norte, del centro y del sur, y en México con 120,000 --- casos reportados (13).

El A. aegypti es un vector muy eficiente; uno infectado entre 100 es suficiente -- para iniciar un brote epidémico importante.

El mosquito es antropófilo estricto y debido a su limitada capacidad de vuelo, --- tanto horizontal como vertical, se han adaptado a vivir en áreas y resulta un mosquito doméstico. Las hembras mantienen el ciclo infectante y sus hábitos de alimentación son diurnos. (7).

El A. aegypti necesita de temperaturas templadas o tibias y depósitos de agua limpia para el desarrollo de los huevos.

Las condiciones de vida en sociedades urbanas marginadas con desperdicio e incuria de recipientes vacíos, i.e.: latas vacías de alimentos y bebidas, cestos para flores, macetas abandonadas, llantas desechadas que acumulan agua de lluvia, son suficientes para proveer el habitat adecuado para el desarrollo de los huevos (7).

El clima, la baja economía, la diferente susceptibilidad de varias cepas de A. aegypti de diferentes áreas geográficas y los factores sociológicos pueden afectar la probabilidad de contacto entre el hombre y el mosquito vector, la respuesta inmunológica a la infección del dengue es otro factor epidemiológico considerable: una persona que es infectada con cierto serotipo es protegida por un largo tiempo contra una infección homotípica y por muy pocos meses contra otro serotipo, por lo cual todos estos factores son considerables para el desarrollo de las epidemias -- (12).

FISIOPATOLOGIA.

La viremia se presenta al iniciarse la fiebre y puede persistir durante 3 días. -- Los virus inoculados en la piel por los mosquitos, deben parasitar células mononucleares fagocíticas para su replicación. Se ha demostrado que los monocitos circulantes en la sangre, los macrófagos alveolares, tímicos, esplénicos, glomerulares, las células de Kupffer y los histiocitos de los órganos linfoides, albergan virus o antígenos virales (7).

Los anticuerpos (Acs.) generados, neutralizan a los virus circulantes y la activación de los macrófagos infectados destruye a los virus intracelulares. La infección primaria se resuelve en una semana y los pacientes quedan inmunes contra una ulterior infección por cualquiera de los 4 serotipos durante un lapso de 3-6 semanas. Posteriormente, la inmunidad residual es serotipo específica permanente más no heterotípica. Si ocurre una nueva infección por otro serotipo y en especial el serotipo 2, el cuadro clínico puede adoptar un curso mucho más grave que el inicial y llegar a presentar el dengue hemorrágico con o sin síndrome de choque. Se postula que si la secuencia infectante es 1-2, 3-2, ó 4-2, se presenta el fenómeno de acrecentamiento inmunológico de la infección (7).

El dengue clásico ocurre clínicamente en los mayores de 15 años en tanto que el -- dengue hemorrágico casi siempre aparece como resultado de una infección secundaria, alcanza su máximo de incidencia en los primeros 5 años de la vida y coincide con la presencia de Acs. neutralizantes. En algunos casos la infección secundaria no conduce el dengue hemorrágico tales condiciones; son un intervalo mayor de 5 años entre los 2 episodios infectantes; una secuencia infectante que no termine en serotipo 2 i.e.: 1-3, 1-4, 3-4, 4-3, o bien la concurrencia de varios serotipos durante el brote epidémico. Sin embargo hay casos auténticos de dengue hemorrágico en el curso de una infección primaria (7). Ver diagrama N° 1.

El Dengue Hemorrágico.- La variante clínica grave del dengue fué reconocida desde 1954 por pediatras filipinos. El inicio de la enfermedad es como en la forma clási

ca del dengue, con fiebre muy elevada y que al remitir, el estado general de los niños se agrava bruscamente. Los pacientes primero inquietos, entran en letargo, la perfusión tisular periférica es muy deficiente, hay taquicardia y después hipotensión. El estado de choque y las hemorragias en el tubo digestivo y piel se hacen aparentes.

En ausencia de atención médica la evolución puede terminar en la muerte en un lapso no mayor de 4 a 5 horas, en un 40% de los casos. La organización Mundial de la Salud (OMS) ha propuesto que el diagnóstico del dengue hemorrágico y su variante más grave, el síndrome de choque se establezca en presencia de las siguientes manifestaciones:

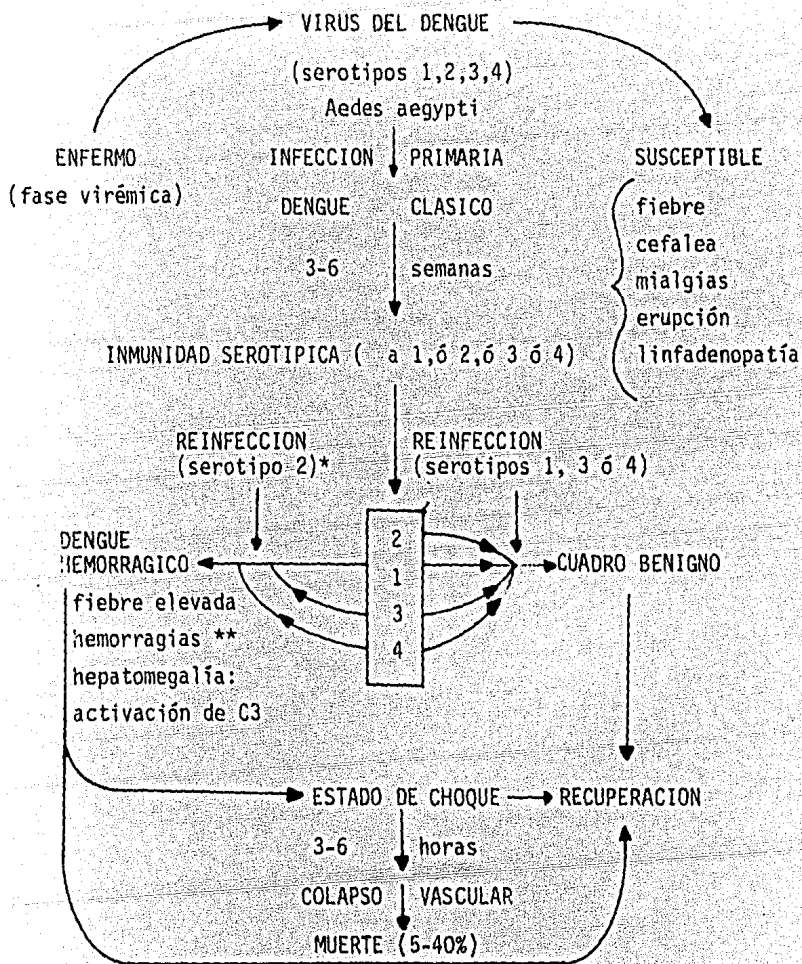
- 1.- Fiebre elevada, continua y con duración de 2 a 7 días.
- 2.- Manifestaciones hemorrágicas que incluyen, por lo menos una prueba del torniquete positiva y cualquiera de los siguientes signos: petequias, equimosis, -- epistaxis, hematemesis ó melena.
- 3.- Hepatomegalía en más de 90% de los casos de adultos y 60% en los niños.
- 4.- Estado de choque, con inquietud, extremidades frías, pulso rápido y presión -- diferencial menor de 20 mm. de Hg.
- 5.- En la biometría hemática, hematocrito elevado en por lo menos un 20% y menos -- de 100,000 plaquetas/mm³.

La evaluación de la gravedad clínica se califica en grados:

- I.- Es un cuadro de dengue con prueba del torniquete positiva.
- II.- Hay sangrado espontáneo.
- III.- Aparece el estado de choque con presión diferencial menor de 20 mm. de Hg.
- IV.- El colapso vascular es profundo sin presión arterial medible (7,20).

CUADROS CLINICOS.

La iniciación de la fiebre puede ser brusca, o bien pueden presentarse síntomas -- prodrómicos tales como malestar, escalosfríos y dolor de cabeza. La temperatura se normaliza después de 5 a 6 días, o puede bajar alrededor del tercer día para volver a subir aproximadamente de 5 a 8 días después de la iniciación. Los ganglios linfáticos a menudo están aumentados de tamaño; se presenta regularmente leucopenia con linfocitosis relativa. Especialmente en lactantes, el dengue primario puede aparecer como enfermedad febril leve que dura de 1 a 3 días.



- * acrecentamiento inmunológico
- ** equimosis, petequias, púrpura, hematemesis, melena.

DIAGRAMA Nº 1

CUADROS CLINICOS DEL DENGUE HEMORRAGICO Y CLASICO.

DIAGNOSTICO DE LABORATOIO.

El aislamiento del virus es difícil. Hasta que sea completamente valorado el uso de los cultivos de células de Aedes para el aislamiento primario, se pueden hacer las siguientes pruebas diagnósticas.

A.- Prueba presuntiva.- Se inocular un grupo de ratones con suero recientemente --- obtenido y correspondiente a la fase aguda, en tanto que otro grupo es inoculado con el suero previamente calentado (56°C por 30 min.). Un mes más tarde se inoculan ambos grupos de ratones con dosis de 100 DL₅₀ de una cepa conocida de virus del dengue adaptada al ratón. Si los ratones inoculados con el suero --- fresco resisten esta inoculación, en tanto que los que recibieron el suero calentado sucumben, puede entonces pensarse que el suero del paciente contenía - virus del dengue.

B.- Serología.- Después de la infección los Acs. neutralizantes e inhibitorios de hemaglutinación aparecen dentro de los primeros 7 días a partir de la iniciación de la enfermedad, y los Acs. fijadores de complemento aparecen de 7 a 14 días después. En todas las pruebas, los Acs. homotípicos tienden a alcanzar tí tulos más elevados que los Acs. heterotípicos.

Las infecciones por virus del dengue de tipos 1 y 2 están asociadas con las -- cifras más altas de Acs., en estas condiciones pueden existir suficientes Acs. que reaccionen cruzadamente (6).

III.- OBJETIVOS

- 1.- Adaptación del virus del dengue a cerebro de ratón lactante señalando los síntomas presentados en los mismos.
- 2.- Comparación de susceptibilidad del virus del dengue en 3 -- diferentes líneas celulares: *Toxorhynchitis amboinensis* -- (TRA, de mosquito), LLC-MK₂ (de riñón de mono Rhesus) y -- VERO (de riñón de mono verde africano) por Imunofluorescencia Directa.
- 3.- Observación del efecto citopático (ECP) en las líneas celulares: VERO y LLC-MK₂.
- 4.- Identificación del virus del dengue por la prueba de inhibición de la Hemaglutinación.
- 5.- Amplificación del virus por pases en células LLC-MK₂.
- 6.- Aislamiento o identificación del virus del dengue por ensayo de placa en células LLC-MK₂.
- 7.- Adaptación de estos procedimientos al diagnóstico rutinario del dengue.

IV.- MATERIAL

IV.- MATERIAL

MATERIAL BIOLÓGICO.

- 1.- Antígenos: Dengue-1, Dengue-2, Dengue-3, Dengue-4 (de referencia proporcionados por el centro de control de enfermedades (CDC) de Puerto Rico.
- 2.- Células LLC-MK₂ (derivadas de riñón de mono Rhesus)
- 3.- Células TRA (derivadas de mosquito)
- 4.- Células VERO (derivadas de riñón de mono verde africano).
- 5.- Hematíes de ganso macho
- 6.- Conjugado de Flavivirus (proporcionado por el CDC de Puerto Rico).
- 7.- Ratones blancos adultos
- 8.- Ratones blancos lactantes
- 9.- Suero fetal de ternera inactivado (SFTI) in vitro.
- 10.- 23 cepas de virus del dengue tipos 1,2 y 4 aisladas en México en el Instituto de Salud y Enfermedades Tropicales.

MATERIAL DE VIDRIO.

- 1.- Cubreobjetos de 24 X 50 mm. Fisher Scientific C.O.
- 2.- Jeringa automática B.D. Corwall de 5 ml.
- 3.- Láminas (portaobjetos) con teflón para inmunofluorescencia
- 4.- Matraces Erlenmayer.
- 5.- Pipetas graduadas.
- 6.- Probetas.
- 7.- Tubos de centrifuga de 30 y 50 ml., fondo redondo.
- 8.- Tubos de 13 X 100 mm.
- 9.- Viales pequeños con rosca.

SOLUCIONES.

- 1.- Acido bórico.
- 2.- Albúmina bovina al 0.4% y en solución salina boratada.
- 3.- Bicarbonato de sodio al 7.5%.
- 4.- Caldo Triptosa Fosfato (TPB)
- 5.- Cloruro de sodio (NaCl) 1.5 M.
- 6.- DEADE dextrán solución balanceada de Hank's.
- 7.- Dextrosa-gelatina-veronal (DGV)
- 8.- Fosfato de sodio dibásico y monobásico 2.0 M.
- 9.- Solución Buffer de fosfatos pH 7.5 (PBS).

- 10.- Solución salina boratada pH 9.0
- 11.- Tripsina 1:250
- 12.- Verceno 0.05%
- 13.- Vitaminas (100X)

MEDIOS DE CULTIVO

- 1.- Medio Leibovitz 1 X, con L-glutamina, sin antibiótico (L-15)
- 2.- Medio 199 (10 X) con sales de Hanks, sin bicarbonato, con L- glutamina (M-199)
- 3.- Medio 199 (M-199)
- 4.- Medio Mínimo Esencial EAGLE (MEM), con sales EARLES, con glutamina, sin bicarbonato.

OTROS.

- 1.- Equipo de microtítulo: (MA Bioproducts)
 - a) Placas U desechables, vinilo flexible, sin número ni letras. La hema
glutinación se observa mejor en las placas U que en las V. Además, -
en las primeras el deslizamiento de la hemaglutinación disminuye un
poco. También se pueden usar las placas de plástico rígido.
 - b) Goteros pipeta:
 - pipetas para uso repetido 0.025 ml.
 - pipetas para uso repetido 0.05 ml.
 - c) Microdilutores:
 - 0.025 ml.
 - 0.05 ml.
 - d) Base para los dilutores.
- 2.- Botellas Falcon para cultivo de tejido de 25 cm².
- 3.- Jeringas de 1 ml. desechables.
- 4.- Morteros.
- 5.- Agar purificado.
- 6.- Azul de tripano al 0.05%
- 7.- Rojo neutro 1:300
- 8.- Estreptomicina 1,000,000 unidades.
- 9.- Penicilina 1,000,000 unidades.

Nota: Todo el material se utiliza estéril.

V.- PREPARACION DE MEDIOS
Y
REACTIVOS

PREPARACION DE MEDIO Y REACTIVOS.

I.1) Medio de crecimiento 199 a 10% de Suero Fetal de Ternera.

Medio 199 Salt's Hank's 10 X	100 ml.
SFTI	100 ml.
NaHCO ₃ 7.5%	20 ml.
Penicilina G (10 ⁶ U) -	
Estreptomina 1 gr.	10 ml.
H ₂ O desionizada c.b.p.	1900 ml.

Se adiciona glutamina cuando el medio comercial no trae, (10 ml. a 3%).
Esterilizar por filtración.

I.2) Bicarbonato de sodio al 7.5%.

Disolver 75 g. de bicarbonato de sodio en 1000 ml. de agua destilada. Filtrar a través de filtro millipore (0.22 micras).

I.3) Bicarbonato de sodio al 4.4%

Disolver 44 g. de bicarbonato de sodio en 100 ml. de agua destilada. Filtrar a través de filtro millipore (0.22 micras).

I.4) Solución Penicilina - Estreptomina.

Penicilina G. (sal de sodio) 10 ⁶ U	10,000,000
Sulfato de estreptomina (dihidro) 1 g.	10 g.
Agua desionizada	500 ml.

Disolver los antibióticos de uno en uno y mezclarlos, envasarlos en frascos - estériles. Este proceso se deberá efectuar en condiciones estériles, de lo -- contrario se tendrá que esterilizar con filtro millipore. Se almacena a temperatura del refrigerador durante una semana o se puede congelar.

I.5) Medio L-15

Comercialmente viene preparado.
Esterilizar por filtración.

I.6) Caldo Triptosa fosfato (TPB)

Mezclar 29.5 g. de TPB en 1000 ml. de agua destilada.
Esterilizar a 15 lb. por 15 min.

I.7) Tripsina - Verceno.

EDTA-Tripsin 0.25%

Mezclar 0.4 g. de EDTA (verceno) en 330 ml. de PBS.

Filtrar el EDTA-PBS a través de un filtro de 0.22 micras.

Una vez filtrada se le adiciona los siguientes materiales:

Tripsina 0.05% 45 ml.

NaHCO₃ 7.5% 25 ml.

Penicilina, Estreptomicina 1 ml.
(1000,000 U)

Rojo de fenol 0.5% 1 ml.

pH 8.3, volúmen total 400 ml.

I.8) Solución de Rojo de Fenol al 0.5%.

Fórmula: (100 ml.)

Rojo de fenol 0.5 g.

NaOH 1 N. 3.0 ml.

Agua destilada aforar a 100 ml.

Preparación: Añadir 570 ml. de agua y 30 ml. de NaOH 1 N. y el rojo de fenol (agregarlo lentamente para evitar la formación de grumos). Agitar con magneto de 1 a 2 hs. a temperatura ambiente. Después añadir otros 400 ml. de agua. -- Filtrar a través de un papel filtro en botellas de vidrio ambar. Esterilizar en autoclave a 110°C durante 20 min. Almacenar a temperatura ambiente hasta por 1 mes en la obscuridad. Descartar cuando se forme un precipitado. Esto es para preparar 1000 ml., para la fórmula de 100 se siguen las mismas indicaciones.

I.9) PBS pH 7.5%

Disolver Na₂HPO₄ 1.2 g.

Disolver NaHPO₄ 0.2 g.

" en H₂O 1000 ml.
destilada.

Esterilizar en autoclave a 15 lb. por 15 min.

I.10) Medio de montaje.

Mezclar glicerol 90 ml.

PBS 10 ml.

I.11) Medio de Mantenimiento 199 (sin glutamina).

Medio 199 10 X	100 ml.
NaHCO ₃ 7.5%	20 ml.
Penicilina-Estreptomicina	10 ml.
Agua desionizada c.b.p.	1000 ml.

Esterilizar por filtración

I.12) Solución de Hidróxido de sodio.

NaOH	4 g.
Agua destilada	100 ml.

Esterilizar
Almacenar a temperatura ambiente un mes.
Esta solución se utiliza para alcalinizar el medio 199.

I.13) HCl 1 N.

HCl	3.6 ml.
H ₂ O	100 ml.

Esterilizar
Esta solución se utiliza para ajustar el pH del medio.

A) Suspensión de hematíes de ganso.

I.14) Solución de Alsever.

- Dextrosa	20.50 g.
- NaCl	4.20 g.
- Acido cítrico (H ₃ C ₆ H ₅ O ₇ · H ₂ O)	0.55 g.
- Citrato de sodio (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ · 2H ₂ O)	8.00 g.
- Agua destilada c.b.p.	1,000 ml.

Esterilizar en autoclave a 10 lbs. por 10 minutos.

I.15) Dextrosa - gelatina - veronal (DGV).

- Veronal (barbital)	0.58 g.
- Gelatina	0.68 g.
- Veronal sódico (barbital sódico)	0.38 g.
- CaCl ₂ (anhídrido)	0.02 g.
- MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0.12 g.
- NaCl	8.50 g.
- Dextrosa	10.00 g.
- Agua destilada c.b.p.	1,000 ml.

El veronal y la gelatina se disuelven en 250 ml. de agua caliente. Esta solución se combina con los otros reactivos. Esterilizar en autoclave a --- 10 lbs. por 10 minutos.

Si el pH no está entre 7.0 y 7.6, desechar el lote y preparar otro.

Todos los reactivos se guardan y se usan a 4°C.

B) Diluyentes ajustadores para las suspensiones de hemafes.

Soluciones concentradas:

I.16) Cloruro de sodio 1.5 M

- NaCl 17.535 g.
- Agua destilada c.b.p. 200.00 ml.

I.17) Fosfato de sodio dibásico 2.0 M.

- Na_2HPO_4 (anhidrido) 283.96 g.
- Agua destilada c.b.p. 1,000 ml.

I.18) Fosfato de sodio monobásico 2.0 M.

- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 276.02 g.
- Agua destilada c.b.p. 1,000 ml.

Diluyentes ajustadores (DA), para agregar a las suspensiones de hemafes:

Estos diluyentes contienen NaCl 0.15 M y fosfato 0.2 M; se preparan combinando distintas proporciones de soluciones concentradas de NaCl 0.15 M, --- Na_2HPO_4 0.2 M, con NaCl, con NaCl 0.15 M - NaH_2PO_4 0.2 M, como se indica en la tabla de valores de pH.

TABLA DE VALORES DE pH.

pH final*	NaCl 0.15 M- Na_2HPO_4 0.2 M	NaCl 0.15 M- NaH_2PO_4 0.2 M
5.75	3.0 ml.	97.0
6.0	12.5	87.5
6.2	22.0	78.0
6.4	32.0	68.0
6.6	45.0	55.0
6.8	55.0	45.0
7.0	64.0	36.0
7.2	72.0	28.0
7.4	79.0	21.0

* El pH es el que se obtiene al mezclar volúmenes iguales de solución salina boratada pH 9.0 y de diluyente ajustador. Las soluciones de pH 5.75 a 6.6 se guardan en el refrigerador a 4°C; las de 6.8 hacia arriba se mantienen a temperatura ambiente, pues en el refrigerador se pueden cristalizar.

I.19) NaCl 0.15 M - Na₂HPO₄ 0.2 M.

- NaCl 1.5 M 100 ml.
- Na₂HPO₄ 2.0 M. 100 ml.
- Agua destilada 800 ml.

I.20) NaCl 0.15 M-NaH₂PO₄ 0.2 M.

- NaCl 1.5 M 100 ml.
- NaH₂PO₄ · H₂O 2.0 M. 100 ml.
- Agua destilada 800 ml.

Diluyentes de antígeno y otros reactivos empleados en las pruebas

Soluciones concentradas

I.21) Cloruro de sodio 1.5 M

- NaCl 87.675 g.
- Agua destilada c.b.p. 1,000 ml.

I.22) Acido bórico 0.5 M

- H₃BO₃ 30.92 g.
- Agua destilada caliente 700 ml.
- (disolver y dejar enfriar)
- Agua destilada c.b.p. 1,000 ml.

I.23) Solución salina boratada (SB) pH 9.0

- NaCl 1.5 M 80 ml.
- H₃BO₃ 0.5 M 100 ml.
- NaOH 1.0 N 24 ml.
- Agua destilada c.b.p. 1,000 ml.

(Verificar el pH en el potenciómetro)

La solución boratada no debe usarse después de 30 días de preparada.

I.24) Albúmina bovina al 4% pH 9.0

- Bovalbúmina (fracción V) * 4.00 g.
- Solución salina boratada pH 9.0 90 ml.
(ajustar a pH 9.0 con NaOH 2-N)
- Salina boratada, pH 9.0 100 ml.

Esterilizar filtrando por millipore.

Diluyente para antígeno y para suero:

I.25) Albúmina bovina al 0.4%, en SB pH 9.0

(Debe de prepararse solo lo necesario para una semana)

- Bovalbúmina al 4%, pH 9.0 100 ml.
- Solución salina boratada, pH 9.0 900 ml.

Todas las soluciones se guardan a 4°C

* Armour Pharmaceutical Co. Otras marcas no han sido satisfactorias, mientras que con ésta no ha habido problema.

I.26) Suspensión de caolín (25%) para tratar sueros.

Caolín lavado con ácido, estándar americano.

- (Fisher Scientific Co.) 25 g.
- Salina boratada, pH 9.0 100 ml.

La suspensión se prepara revolviendo mecánicamente de manera continua, ---- durante unas 4 horas, para lograr una suspensión suave. Como en el caolín - comercial suele haber agregados, se acostumbra filtrar la solución por dos capas de gasa. La mezcla se conserva indefinidamente a 4°C. Antes de usarla se mezclará perfectamente, revolviéndola o sacudiéndola por unos minutos.

Nota: Algunos lotes de caolín no son satisfactorios. Si se observa que no - elimina los inhibidores inespecíficos del suero, debe usarse otro lote de - caolín.

I.27) Antígenos: Dengue-1, Dengue-2, Dengue-3, Dengue-4

Estos antígenos no se consiguen comercialmente. Se preparan siguiendo la -- técnica de extracción con sucrosa-acetona de Clarke y Casals (2) y se inactivan con betapropiolactona (BPL). Se pueden obtener cantidades limitadas - de antígenos del Centro de Control de Enfermedades de Atlanta, Georgia --- 30333.

1.28) Preparación de los hematíes de ganso.

Los animales no deben de ser sangrados más de una vez cada seis semanas. No deben usarse gansos hembras pues el ciclo del estro puede producir cambios en los títulos hemaglutinantes.

La sangre de ganso necesaria para una o dos semanas se toma asépticamente - de la yugular o de la vena del ala, con jeringa de 10 ml. provista de aguja calibre 20. La jeringa se emplea cargada con 1.5 ml. de solución de Alsever, por cada 8.5 ml. de sangre.

Filtrar los hematíes por gasa estéril de 2x2 pulgadas.

En un tubo de centrifuga con fondo redondo, lavar 3 veces los hematíes con 3 volúmenes de DGV.

En un tubo de centrifuga cónico y graduado compactar los hematíes, centrifugándolos a 1,000 r.p.m. durante 15 min.

Preparar suspensión de hematíes al 8% en DGV. Dejarlos estabilizar por 24 - hs. antes de estandarizarlos.

Estandarizar los hematíes a 490 nm., de tal manera que cuando se diluyan en el ajustador de pH adecuado tengan una densidad óptica (DO) de 0.75. Generalmente una dilución 1:24 de los hematíes al 8%, de una DO de 0.75 empleando longitud de onda de 490 nm. en el espectrofotómetro Coleman Jr. (2)

$$\text{Volúmen final} = \text{volúmen inicial} \times \frac{\text{DO observada}}{\text{DO deseada.}}$$

Medios para el ensayo de placa.

1.29) Primer paso:

Porción de Agar.	
1.- Difco Agar Purificado	1.0 g.
2.- Agua dos veces destilada	74.0 ml.
Porción de nutrientes.	
1.- Medio 199 (10 X)	10.0 ml.
2.- Suero fetal de bovino	10.0 ml.
3.- Bicarbonato de sodio 7.5%	4.0 ml.
4.- DEADE dextrán solución balanceada de Hank's	1.0 ml.
5.- Vitaminas (100X)	0.5 ml.
6.- Aminoácidos esenciales (100X)	0.5 ml.
7.- Penicilina (100X)	0.1 ml.

Del nutriente N° 3, solo se agrega la mitad de la cantidad indicada.

I.30) Segundo paso:

1.- Agar	1.0 g.
2.- NaCl	0.85 g.
3.- H ₂ O	96.0 ml.
4.- Rojo neutro 1:7500	4.0 ml.

I.29) y I.30) Son para preparar 100 ml.

Indicaciones para preparar los medios:

En el primer paso, se prepara primero la solución de agar más agua y se esteriliza a 15 lb. por 15 min. y se deja enfriar un poco; para posteriormente mezclar los ingredientes de la porción de nutrientes, por orden de lista para evitar la formación de precipitados, una vez hecho esto se combina la porción de agar con la porción de nutrientes a 44°C.

El segundo medio, se prepara de igual manera, primero se mezclan con el --- agua el NaCl y el agar, se esteriliza a 15 lb. por 15 min. y posteriormente se le agrega el rojo neutro.

Una vez hechos estos medios se mantienen en baño maría a 46°C para que no se solidifique el agar.

una vez listo el medio se introduce en el frasco una jeringa Cornwall de -- 5 ml., pues se agregan 4 ml. por botella de cultivo.

El llenado debe ser rápido y uniforme, teniendo una superficie completamente plana para colocar las botellas, el medio debe de ir sin burbujas. El -- llenado de las botellas se hace por la parte lateral de las botellas y en - forma inclinada, se deben de acostar inmediatamente, las botellas de cultivo.

Cuando se agrega el primer medio se deja solidificar y una vez solidificado se invierten las botellas incubandose 7 días a 37°C. Cuando se agrega el -- segundo medio, al solidificar el agar las botellas no se invierten, se mantienen en la misma posición (12).

Notas:

Los sueros bovinos.- a) Todos los sueros bovinos que se usan en medios de - cultivo deben ser libres de microorganismos y virus, antes de usarlos se --

inactivan a temperatura de 56°C. por 30 min. (se inactivan complemento, enzimas y otras sustancias tóxicas). b) El suero fetal de bovino (SFB) es de -- mejor calidad pues contiene pocas gamma globulinas, pero es muy costoso (8).

El rojo neutro.- Es un colorante vital el cual se liga al ácido nucléico - viral, y el virus se vuelve susceptible a la inactivación por la luz. Entonces las células vivas toman el colorante y aparecen las placas como áreas - claras contra un fondo rojo (6) .

El DEAE dextrán.- Algunos agares contienen polisacáridos sulfatados que -- inhiben el crecimiento de algunos virus; estas sustancias inhibitoras pueden, sin embargo ser neutralizadas por la adición de DEAE dextrán al agar - (3).

Conjugado de flavivirus.- El flavivirus se recomienda diluirlo 1:100 en las cantidades que vaya a utilizarse. Congelado puede durar por varios años. -- (8).

Los reactivos 1.4, 1.7, 1.8, 1.10, 1.12 - 1.28 fueron proporcionados ya -- preparados por el personal del ISET.

Cuadro N° 1 REQUERIMIENTOS PARA 3 DIFERENTES LINEAS CELULARES

Derivado	Línea Celular	Medio	SFT	Antibiótico	T°C	NaHCO ₃
Riñón de - mono verde Africano	VERO	M-199	5%	Sí	37	20 ml./L 4.4%
Riñón de mono Rhesus	LLC-MK ₂	M-199	10%	Sí	37	15 ml./L 7.5%
Mosquito	TRA	L-15 + MEM + TPB -	-	-	28	-

VI.- METODOS

A) INOCULACION INTRACEREBRAL EN RATONES LACTANTES.

Diferentes cepas de virus de dengue se adaptan a cerebro de ratón lactante (6).

1. Primero se seleccionan muestras positivas (+) de dengue, las cuales fueron diagnosticadas por el ISET (Instituto de Salud y Enfermedades Tropicales) en cultivo celular de TRA por Inmunofluorescencia Directa.

Las 23 cepas o muestras seleccionadas, provienen de 6 Estados de la República Mexicana (Jalisco, Nayarit, Colima, Mérida, Oaxaca y Nuevo León).

2. Se inocularon 8 ratones con cada cepa Intracerebralmente: Inyectándose 0.2 ml. de inóculo en el cerebro, por arriba del borde de la órbita del ojo. (primer -- pase).

Después de la inoculación los animales son examinados todos los días con mucha minuciosidad, observando si presentan signos de enfermedad.

3. A los 5 días después de la inoculación, 3 ratones de cada cepa son descerebrados congelándose previamente a -70°C . Los 5 ratones restantes se siguen observando por el curso de 21 días.

Los ratones se descerebran (desinfectando previamente el área con Iodo y alcohol) con pinzas de bisturí estériles, quitando la piel que cubre la cabeza, se introducen las pinzas sacando la masa cefálica de cada ratón, las 3 masas cefálicas se trituran en un mortero con Medio 199 (I.1) (3 ml.) una vez realizado esto se pasa la mezcla a un vial previamente etiquetado (Nº de cepa, tipo de dengue, Nº de pase) y se mantiene en refrigeración hasta su uso.

4. Se procede a realizar un segundo pase inoculando nuevamente a 8 ratones lactantes con la mezcla de cada cepa. Y así sucesivamente se repite el mismo paso --- hasta llegar a un quinto pase.

B) COMPARACION DE SUSCEPTIBILIDAD DEL VIRUS DEL DENGUE EN 3 DIFERENTES LINEAS CELULARES: TRA, LLC-MK₂, Y VERO POR INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA (Ac. F)

El tipo de cultivo celular usado para el cultivo viral depende de la sensibilidad de las células a dicho virus en particular (6).

Para la realización de este punto se siguió el siguiente diagrama:

Virus Natural * -----> Tubos con -----> Ac. F.
 (suero del paciente) inocular células TRA (+)
 (1er. pase)

* -----> Tubos con células ----->
 inocular VERO incubar
 (20. pase) 37°C Ac. F

* -----> Tubos con células ----->
 inocular LLC-MK₂ incubar
 (20. pase) 37°C

Virus Natural -----> Tubos con células ----->
 (suero del paciente) inocular VERO incubar
 (1er. Pase) 37°C Ac. F

-----> Tubos con células ----->
 inocular LLC-MK₂ incubar
 (1er. Pase) 37°C

B-1) Elaboración de tubos con células TRA.

- 1.1 Se selecciona una botella de células TRA, (42 cm.² de superficie de crecimiento con un 100% de confluencia).
- 1.2 Eliminar el medio de cultivo.
- 1.3 Agregar 3 ml. de medio (1.5), despegar con un hisopo totalmente las células homogenizando la suspensión, se afora a 20 ml. más de medio. Cada tubo debe prepararse con 3 millones de células. Para esto se hace la cuenta celular:
 - a) En un tubo se colocan 1.5 ml. de medio (1.5) y 0.5 de las células disgregadas. Agitar bien.
 - b) Agregar 0.02 ml. de colorante azul de tripano al 0,05% en solución salina.
 - c) Se agita y se coloca una gota en la Cámara de New Bawer colocando el cubreobjeto.
 - d) Se observa al microscopio y se cuentan las células vivas. Ejem:

de células contadas en 8 cuadrantes =

2

$$N^{\circ} \text{ de células} = \frac{780}{2} = 390 \times 10^{-4} = 3,900,000$$

$$3,900,000 \text{ cél.} \times \text{c.c.} = \text{ml.}$$

Esta cantidad se multiplica por la cantidad de ml. iniciales que se --
tienen en suspensión = 60 ml. (c.c.)

3.9 (millones/c.c.) X 60 = 234 millones de células en 60 ml.

Esta cantidad se divide entre 3 porque necesitamos 3 millones por cada
tubo = 78, la cantidad se redondea = 80

Se van a preparar 80 tubos.

80 X 3 = 240 ml. de medio.

Si se tienen 60 ml. se agregan 180 ml. de medio para aforar a 240 ml.-
o sea 3 ml. para cada tubo.

- 1.4 Una vez que se tiene el volumen deseado poner 3 ml. de esa suspensión de cé-
lulas en cada tubo.
- 1.5 Se cierran bién los tubos y se guardan en la estufa en posición horizontal
a 28°C.
- 1.6 Observar diariamente los cultivos hasta que formen la monocapa (2 a 4 días).
- B-2) Elaboración de tubos con células VERO.
- 2.1 Se seleccionan 2 botellas (42 cm.² de superficie de crecimiento) con culti-
vo de células VERO.
- 2.2 Eliminar el medio de crecimiento de las dos botellas. Usando el flujo lami-
nar para evitar contaminación.
- 2.3 Adicionar a cada una de las botellas 5 ml. de una solución de tripsina al -
0.05% en verceno al 0.05%, dejar actuar esta solución sobre la capa celular
de 5 a 10 segundo.
- 2.4 Eliminar la tripsina-verceno por el lado opuesto a la capa de células.
- 2.5 Dejar actuar la tripsina-verceno residual al tiempo necesario para disgre--
gar las células del cultivo, aproximadamente de 5 a 10 min. (la botella ---
deberá colocarse horizontalmente en la estufa).
- 2.6 Adicionar 10 ml. de crecimiento M-199 (I.1) a cada botella tratando de ---
bajar todas las células de la pared, homogenizar por pipeteo suave. Agregar
20 ml. más de medio (I.1) a cada botella (total 30 ml.) homogenizar la sus-
pensión celular por pipeteo suave.
- 2.7 Preparar los tubos (16 x 150 m.m.) con tapón de rosca con 2 ml. cada uno, -
de la suspensión celular. Teniendo en cuenta que cada tubo debe de tener 3
millones de células.
- 2.8 Incubar los tubos en posición inclinada (en un ángulo de aproximadamente --

4°) a 37°C, hasta que el cultivo este confluyente.

B-3) Elaboración de tubos con células LLC-MK₂.

3.1 El procedimiento es exactamente igual a la preparación de tubos con células TRA. Solo que se dispersan las células en un volumen de medio con 300,000 - células/ml. y se envasan en volúmenes de 2 ml. para cada tubo.

Cada línea celular celular tiene su medio específico. Ver cuadro N° 1.

Una vez teniendo los tubos con monocapas confluentes se procede a:

B-4) Inoculación de las cepas de virus del Dengue en los tubos con células VERO, LLC-MK₂ y TRA.

4.1 Se inoculan 0.1 ml. de cepa a cada tubo (los tubos se hacen por duplicado). Preparandose tubos controles positivos (+) (D₁) y negativos (-). El inóculo se coloca en el fondo del tubo.

4.2 Una vez cerrados y etiquetados los tubos se incuban a su temperatura correspondiente por 10 días (ver cuadro N° 1).

4.3 Posteriormente se hace la lectura por Inmunofluorescencia Directa.

4.4 Los tubos duplicados se incuban por 15 días y se procede a la lectura de -- Inmunofluorescencia Directa.

Nota: La lectura de los tubos duplicados se incubaron por 15 días, esto se hizo porque algunas cepas de las que se incubaron por 10 días dieron resultados negativos en la prueba de Inmunofluorescencia Directa.

B-5) Lectura de Inmunofluorescencia.

Los anticuerpos (Acs.) (generalmente) o los antígenos (Ags.) pueden ser --- "marcados" por la conjugación con un colorante (fluoresceína) que fluoresce con la excitación por una luz intensa o ultra violeta.

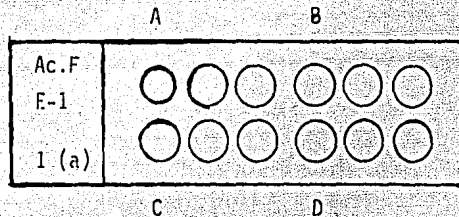
Su sensibilidad (a) de esta pba. es baja; "baja" en el sentido de que la -- prueba es negativa si el suero está muy diluido, pero alta porque un corto número de células infectadas pueden ser fácilmente observadas.

(a).- La sensibilidad de una prueba serológica se refiere a su habilidad -- para descubrir pequeñas cantidades de Acs.

Su especificidad (b) es baja.

(b).- La especificidad de una prueba serológica se refiere a su habilidad - para hacer la distinción entre los serotipos, dentro de un grupo ---- viral (3).

- 5.1 El día anterior de la prueba se marcan los portaobjetos (con teflón) poniendo el número de la prueba y el número de placa como se indica enseguida:



- A = Control (+)
 B = Control (-)
 C = Muestra problema.
 D = Muestra problema.

Ac. F = Anticuerpos fluorescentes.

E = Ensayo.

(a) = indica el número de placa.

- 5.2 En una hoja se anota la localización de las muestras.
- 5.3 Tratamiento de los tubos:
- Passar el medio de cada tubo a otro tubo estéril.
 - Agregar 0.15 ml. de tripsina al 0.25% a las células dejandola actuar de 30 a 60 segundos.
 - Colocar los tubos a 37°C., observando al microscopio invertido el desprendimiento de las células.
 - Una vez desprendidas las células, se les agrega el medio que tenían anteriormente.
 - Centrifugar los tubos a 2000 r.p.m. por 10 min. a 4°C.
 - Se sacan de la centrifuga y se colocan en baño de hielo, se procede a descartar más o menos 1.5 ml. de medio con pipeta Pasteur y se homogenizan las células más o menos 10 veces.
- 5.4 Se toma una porción de suspensión de células y se depositan en los pozos de láminas con teflón, se llenan por capilaridad de manera que cubra el pozo, sin ser demasiado para que seque pronto la gota más o menos en 30 min. en el flujo laminar.
- 5.5 Una vez secas, se fijan en acetona fría dentro del congelador por 10 min. a 4°C.

- 5.6 Se sacan, dejando evaporar toda la acetona.
- 5.7 Las láminas de Ac. F. se colocan en una cámara de humedad y se les agrega una gota de conjugado contra Flavivirus 1:100.
Se incuban 30 min. a 37°C. cerrando la cámara.
- 5.8 Se sacan de la cámara de humedad se enjuagan para quitar el exceso del conjugado en PBS pH 7.5 (1.9).
- 5.9 Se montan las láminas cubriéndolas con cubreobjetos, al cual previamente se le pone dos gotas de medio de montaje (1.10) sin secar las láminas, sino -- que inmediatamente que se saquen del PBS se le pone el cubreobjeto.
- 5.10 Se leen (en el objetivo de 16 mm.) en microscopio de inmunofluorescencia. Anotando los resultados en las hojas de localización de las muestras.
- 5.11 Las muestras positivas se colocan en viales pequeños de rosca, a los que se les agrega 0.5 ml. de SFT, y se congelan a -70°C.
Una vez hecha la lectura de las láminas, las negativas se desechan (8).

C) OBSERVACION DEL EFECTO CITOPATICO EN LAS LINEAS CELULARES VERO Y LLC-MK₂,
EN EL MICROSCOPIO.

La mayoría de los virus, pero no todos, matan a las células en la que se -- multiplican. De ahí que las cepas celulares infectadas, gradualmente de--- sarrollan cambios histológicos de daño celular, cuando los viriones recién formados se diseminan para involucrar cada vez más células en el cultivo.-- Estos cambios se conocen como efectos citopáticos (ECP); se dice que el --- virus es citopatógeno. La mayoría de los ECP pueden ser fácilmente observa- dos aún en cultivos celulares sin fijar ni teñir, con ayuda del microscopio de luz de bajo poder con el condensador bajo y el iris del diafragma par--- cialmente cerrado con el fin de obtener el contraste requerido para ver las células translúcidas (3).

1.1 El diagrama de trabajo desarrollado para este punto fué el mismo que se si- guió para el punto B), solo que en lugar de realizar la prueba de Inmuno--- fluorescencia Directa se observó el ECP.

Para observar el ECP fueron utilizados los mismos tubos de la prueba de com- paración de susceptibilidad del virus del dengue en células VERO y LLC-MK₂, hasta el paso B-4) al inciso 4.2 .

Seguido de la observación de los tubos al microscopio.

Anotando los resultados a los 10 y 15 días de incubación.

D) IDENTIFICACION DEL VIRUS POR LA PRUEBA DE INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION (IH).

Los Acs. inhiben la hemaglutinación viral cubriendo el virus.

La sensibilidad de la prueba es alta y su especificidad también (3).

El dengue es una enfermedad en la que se puede demostrar respuesta de Acs. mediante la prueba de IH. Los 4 tipos serológicos pueden presentar Ags. fijadores de complemento (C¹) y para reacciones de IH (aglutinan glóbulos --- rojos de ganso y de gallina) (6).

D-1) Tratamiento del suero.

Los sueros se tratan para eliminar inhibidores naturales de las hemaglutininas y se adsorben con hematíes para retirar aglutininas inespecíficas. Se recomienda el método de extracción con caolín, que suprime los Acs. IgM.

El suero se obtuvo mediante la extracción de sangre por la cavidad ocular de cada ratón, succionando con pipetas Pasteur. De cada cepa se sangraron 3 ratones adultos a los 21 días después de inoculados (Intraperitoneal --- 0.04 ml).

D-2) Extracción con caolín, absorción con hematíes de ganso.

Utilizando cinta adhesiva, rotular tubos de 13 X 100 mm.

Poner:

2.1 Suero (un volumen)	0.1 ml.
2.2 Salina boratada, pH 9.0 (4 volúmenes)	0.4 ml.
2.3 Suspensión de caolín (5 volúmenes)	0.5 ml.

(Las cantidades pueden ajustarse de acuerdo con el número de antígenos en la prueba)

2.4 Agitar vigorosamente la mezcla.

2.5 Dejar a temperatura ambiente (22°- 27°C) por 30 min.

Se pueden poner los tubos en un sacudidor de vaivén, durante 30 min., vigilando la operación.

2.6 Centrifugar a 2,500 r.p.m. por 30 min.

2.7 El suero tratado con caolín es vertido a un tubo limpio de 13 x 100 mm. al cual también se transfiere el rótulo.

2.8 Colocar la gradilla con los sueros tratados en un baño de hielo y dejar enfriar totalmente.

- 2.9 Agregar a cada tubo una gota (0.1 ml.) de hematíes de ganso compactados (lavados previamente con tres cambios de DGV) y mezclar bien.
- 2.10 Dejar los tubos por 20 min. en el baño de hielo, agitándolos de vez en cuando. Centrifugar en frío a 1,500 r.p.m. por 10 min. Para evitar la hemólisis, se deben conservar los tubos fríos.
- 2.11 Verter el sobrenadante a un tubo limpio de 13 x 100 mm. y transferir el rótulo. El sobrenadante es suero diluido 1:10, listo para ser probado.

D-3) Titulación de hemaglutininas.

- 3.1 Rehidratar los antígenos liofilizados y dejarlos a 4°C., al menos por una hora y de preferencia de un día para otro.
- 3.2 Preparar dilución 1:10 (1 parte + 9 partes) en bovalbúmina al 0.4% en SB, - pH 9.0 mezclar bien y mantener en baño de hielo.
- 3.3 En placas de microtítulo (tipo U), probar diluciones progresivas, de factor 2, a diferentes pHs. Si no se conoce el pH óptimo de un antígeno habrá que probarlo contra todos los pHs.

Este paso D-3) no se realizó; se proporcionaron los antígenos titulados por el personal del ISET.

La titulación se monta como sigue:

Cuadro Nº 2

Cavidad	PLACA U MICROTITULO											
	Dilución del Antígeno.											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	10 ⁰	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	20480
pH												
6.0	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
6.2	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
6.4	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
6.6	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
6.8	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
7.0	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

X = Cavidad.

* Recíproco de la dilución del antígeno.

- 3.4 Agregar 0.1 ml. de dilución 1:10 del antígeno a la primera cavidad.
- 3.5 Agregar 0.05 ml. de bovalbúmina al 0.4% en SB a todas las otras cavidades de la placa.
- 3.6 Usando el dilutor de 0.05 ml., hacer diluciones progresivas de factor 2, de la cavidad 1 a la 2, y así hasta la última cavidad de la placa.
- 3.7 Colocar las placas en el vibrador.

Suspender los hematíes de ganso en las respectivas soluciones ajustadoras - pH (de modo que la DO sea de 0.75 a 490 nm.) antes de agregarlas a cada fila. Agregar la suspensión de hematíes a la fila de pH respectiva mientras se aplica una vibración suave. La placa puede sellarse con cinta adhesiva y someterla a vibración fuerte para que se mezcle bien; pero esto no suele ser indispensable.

- 3.8 Colocar las placas sobre un fondo blanco, (no poner unas encima de otras) y dejarlas quietas a temperatura ambiente (22-27°C).
- 3.9 Esperar a que se produzca la hemaglutinación (una capa delgada de hematíes uniformemente distribuidos), lo cual tardará unos 30-45 minutos. Es importante estar atento al desarrollo de la hemaglutinación, pues el deslizamiento de la capa de hematíes puede producir cambios en el aspecto de la primera.
- 3.10 Registrar los resultados en hojas.

- 3.11 Determinar el título hemaglutinante y el pH óptimo del antígeno. El punto final (título del antígeno) es la dilución más alta que muestra -- hemaglutinación completa. Para la prueba IH se diluye el antígeno de manera que contenga 4-8 unidades en 0.025 ml.

Si suponemos que el título del antígeno es 1:2560, entonces:

1:1280 = 2 unidades/0.05 ml.

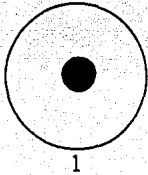
1:640 = 4 unidades/0.05 ml.

1:320 = 8 unidades/0.05 ml., ó
4 unidades/0.025 ml.

1:160 = 16 unidades/0.05 ml.
8 unidades/0.025 ml.

Por lo tanto, se debe poner 1 parte de la dilución 1:10 del antígeno + 31 - partes de diluyente para obtener una dilución que contenga 4 unidades/0.025 ml; o 1 parte de la dilución 1:10 del antígeno + 15 partes de diluyente --- para 8 unidades/0.025 ml.

IMAGENES DE HEMAGLUTINACION EN PLACAS DE MICROTITULO



- 1.- Cuando no hay hemaglutinación, o cuando hay inhibición de la hemaglutinación por anticuerpos homólogos se produce la imagen presentada en la cavidad N° 1. En ella los hematíes se han sedimentado en le fondo formando un punto. Esta imagen se toma como el punto final de la titulación de un suero en la prueba de inhibición de hemaglutinación.
- 2.- La hemaglutinación parcial da el aspecto que se presenta en la cavidad N° 2. Se ve un anillo de hematíes aglutinados alrededor de un centro de hematíes parcialmente sedimentados. Este "positivo con anillo" no se -- toma como punto final ni en la hemaglutinación.
- 3.- La hemaglutinación completa se presenta cuando los hematíes forman un encaje uniformemente distribuido, como se ve en la cavidad N° 3. Esta imagen es el punto final en la titulación de la hemaglutinación por un virus.

D-4) Prueba de inhibición de hemaglutinación.

- 4.1 - Los hematíes de ganso se preparan la víspera de la prueba.
- 4.2 - A partir del antígeno rehidratado mantenido a 4°C, preparar las diluciones 1:10 de los antígenos y proceder a la titulación de hemaglutinina.
- 4.3 - Diluir los antígenos, de manera que haya 4 u 8 unidades por 0.025 ml.
- 4.4 - Los sueros sometidos a prueba se habrán tratado la víspera con caolín. -- También se puede efectuar la operación en el mismo día del tratamiento.
- 4.5 - Marcar las placas con los números de los sueros y el antígeno. Lo mejor -- es emplear una placa por antígeno; así, si se van a probar 8 sueros ---- contra 4 antígenos, serán necesarias 4 placas. La experiencia previa del

Laboratorio con sueros similares de diagnóstico o de encuesta, lo mismo que el tipo de muestras y el propósito de la prueba, indicarán si, los sueros se deben probar en 4, 8 ó 12 diluciones contra cada antígeno. Los sueros pareados de un paciente deben ser tratados y probados simultáneamente. Cada prueba debe incluir controles de sueros homólogos, lo mismo que un control negativo conocido.

- Otro Método consiste en probar los sueros solamente en dilución 1:20 --- contra uno o más antígenos, titulando luego (hasta obtener punto final) los que hayan sido positivos en la dilución 1:20.

El siguiente ejemplo muestra la manera de repartir una placa. (cuadro Nº 3)

En este paso se realizaron los puntos: 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, y el 4.9 a ---- partir de a.1) - e.1)

Cuadro Nº 3

	Diluciones del Suero							
	10	20	40	80	160	320	640	1280
Suero 1								
Suero 2	X	X	X	X	X	X	X	X
Suero 3	X	X	X	X	X	X	X	X
Suero 4	X	X	X	X	X	X	X	X
Suero 5	X	X	X	X	X	X	X	X
Suero 6	X	X	X	X	X	X	X	X
Suero negativo conocido	X	X	X	X	X	X	X	X
Control homólogo	X	X	X	X	X	X	X	X

X = cavidad.

Nota: No es preciso incluir controles positivos y negativos conocidos en -- cada placa; para antígeno bastará un solo grupo de controles.

- 4.6 - Poner 0.05 ml. de suero 1:10 en la primera cavidad. En las demás colocar 0.025 ml. de bovalbúmina al 0.4% en SB, pH 9.0. Con un dilutor de ---- 0.025 ml., a partir del suero 1:10, realizar la serie de diluciones hasta el número deseado. Cubrir la placa con otra para evitar la evaporación.
- 4.7 - Mientras se mantiene la placa en vibración en el aparato, agregar a cada una de las cavidades 0.025 ml. de antígeno (diluido de manera que conten

ga 4 u 8 unidades por 0.025 ml.). Guardar el resto del antígeno diluido - en el refrigerador.

- 4.8 - Incubar de un día para otro a 4°C. Las placas de un mismo antígeno no se apilan unas sobre otras, colocando encima una placa vacía.
- 4.9 - A la mañana siguiente se titula la dilución del antígeno que contiene las 4 u 8 unidades/0.025 ml. para determinar la cantidad real empleada del -- antígeno y el pH óptimo. La titulación se hace a 3 pHs diferentes; por -- ejemplo, si el mejor pH se sabe que es el 6.4, usar entonces, además, --- 6.2 y 6.6. Se procede así: (véase cuadro N° 4).
- a) Agregar a 0.1 ml. de antígeno diluido a la primera cavidad de cada una de 3 filas (una para cada pH).
 - b) Agregar 0.05 ml. de bovalbúmina al 0.4% en SB a las demás cavidades de cada fila.
 - c) A partir de la primera cavidad hacer una serie de diluciones el doble, empleando un dilutor de 0.05 ml.
 - d) Poner las placas en el vibrador a poca velocidad.
 - e) Añadir 0.05 ml. de hematíes de ganso, diluidos en el pH adecuado. Mezclar. Disponer las placas sin apilar, contra un fondo blanco.

Cuadro N° 4

		PRUEBA DE HEMAGLUTINACION. CONTRATITULACION					DILUCIONES DE ANTIGENO.
ANTIGENO	pH	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	
Antígeno 1	6.2	X	X	X	X	X	
	6.4 (ópt)	X	X	X	X	X	
	6.6	X	X	X	X	X	
Antígeno 2	6.2	X	X	X	X	X	
	6.4 (ópt)	X	X	X	X	X	
	6.6	X	X	X	X	X	
Antígeno 3	6.6	X	X	X	X	X	
	6.8 (ópt)	X	X	X	X	X	
	7.0	X	X	X	X	X	
Controles:							
Hematíes en suspen-- sión para cada pH, sin -- antígeno ni suero.							

f) Dejar a temperatura ambiente (22-27°C), observar la formación de hemaglutinación y determinar el pH óptimo para cada antígeno.

Para considerar la prueba satisfactoria, esta titulación debe mostrar que el antígeno que se agregó a la prueba contiene 4 u 8 unidades por 0.025 ml.

Las placas de la prueba (sueros con antígeno) se sacan del refrigerador, --dejándolas que lleguen a la temperatura ambiente (22-27°C). La cantidad --necesaria de cada solución de pH (5 ml. por placa) se pone en un frasco y --se le añaden los hematíes de ganso suspendidos en el pH óptimo para cada --antígeno, antes de agregarlos a la placa.

a.1) Poner las placas en el vibrador a poca velocidad.

b.1) Agregar a cada cavidad 0.05 ml. de la suspensión de hematíes de ganso en el ajustador de pH.

- c.1) Mezclar
- d.1) Mantener a temperatura ambiente y observar la aparición de la hemaglutinación.
- e.1) Como el aspecto de la hemaglutinación puede cambiar con el tiempo, se deben señalar en la placa los puntos finales, tan pronto aparezcan, -- con un marcador de tinta indeleble con punta de fieltro gruesa. Esas - marcas facilitarán el registro exacto de los puntos finales del suero en las fichas del laboratorio.

La inhibición de hemaglutinación (IH) se manifiesta por una reacción negativa, que se ve como un punto de hematíes sedimentados. El título IH se expresa como la dilución más alta del suero que produce inhibición completa o -- casi completa de la hemaglutinación.

Cada prueba incluirá los siguientes controles:

- a) Suero positivo homólogo o líquido ascítico para cada antígeno, diluido - en serie hasta el punto final.
- b) Un suero negativo conocido para cada antígeno.
- c) Control de hematíes para cada suero (suero 1:10 ó 1:20 + hematíes) para detectar hemaglutinación inespecífica.
- d) Control de hematíes, sin suero ni antígeno, para detectar hemaglutina---ción inespecífica de los hematíes en el diluyente.

Los antígenos que se emplean en la prueba deben incluir los tipos de dengue cuya ocurrencia es posible en el área (en las Américas DEN-1, DEN-2, DEN-3, y DEN-4).

INTERPRETACION DE RESULTADOS.

En el caso de pruebas de diagnóstico, los sueros pareados obtenidos con 14 a 21 días de intervalo deben probarse simultáneamente. Una muestra no es útil para el diagnóstico serológico. Los especímenes obtenidos durante la fase - aguda pueden usarse para aislar el virus.

Las interpretaciones siguientes se basan en la experiencia de los laboratorios de San Juan de Puerto Rico con sueros de áreas en donde no había - actividad de otros flavivirus. Debido a las reacciones cruzadas entre los - flavivirus, una positividad serológica no puede constituir nunca una identi

ficación cierta del virus infectante. En todos los brotes es indispensable aislar el (o los) virus involucrados para poder definir específicamente la etiología.

Las respuestas de anticuerpos son de distinto tipo:

1.- Negativa: Ausencia de anticuerpos detectables en ambas muestras.

2.- Positiva:

Respuesta primaria (infección actual)

a) Respuesta monotípica: Cambio cuádruple o mayor en el título de anticuerpos para un solo tipo de dengue, con cambio mínimo o sin cambio para otros antígenos del dengue u otros flavivirus.

b) Respuesta amplia a los flavivirus: Cambio cuádruple o mayor en el título de anticuerpos para más de un tipo de dengue o para uno o más de los otros flavivirus. Ningún título $> 1:320$.

Respuesta secundaria

a) Caso de infección actual: Cambio cuádruple o mayor en los títulos de especímenes pareados, para dos o más tipos de dengue, o para uno o más flavivirus.

Títulos $\geq 1:640$.

b) Caso no necesariamente de infección actual: En los sueros pareados - anticuerpos para dengue y para dos o más de los otros flavivirus. -- Títulos de $\geq 1:640$, al menos en una muestra, pero sin cambio cuádruple.

c) Títulos estables: Los títulos de 1:20 a 1:320 para los antígenos de uno o más flavivirus, sin aumento cuádruple, sugieren infección en alguna época anterior, pero no necesariamente durante el episodio -- actual; por lo tanto se consideran como negativos. Una prueba de FC puede facilitar la interpretación ya que a veces muestra un aumento de valor diagnóstico o títulos $\geq 1:640$ los cuales indican infección actual.

3.- Inconcluyente: Cambio de 1:10 a 1:20 para uno o más antígenos de dengue. En este caso es aconsejable pedir otra muestra convalciente tardía. La prueba de FC puede ayudar a la interpretación ya que a veces muestra un aumento de valor diagnóstico de 1: 8 a 1:16 (2)

E) AMPLIFICACION DEL VIRUS POR PASES EN CELULAS LLC-MK₂.

El virus inicial que es pasado en células LLC-MK₂ sobre medio líquido incrementa el número de virus aislado que posteriormente es detectado por el procedimiento de ensayo de placa. (12).

Amplificación del virus:

- 1.- Se elaboran tubos con células LLC-MK₂
- 2.- Una vez formada la monocapa confluyente de dichas células se deja absorber la muestra original (las 23 cepas problema) 0.2 ml. por 1 a 2 horas a 37°C.
- 3.- Se adiciona M-199 con 2% de SFT, 100 U/ml. de penicilina y 100 mcg/ml. de estreptomicina.
- 4.- Se incuban a 37°C. inclinados.
- 5.- Al cabo de 7 días se congelan y descongelan a -70°C, suspendiéndose en el mismo medio, de éste mismo se vuelve a inocular en una nueva monocapa de células, según tantas veces sean necesarios los pases para la formación de placas. Y se conservan a -70°C hasta que son utilizados para el ensayo de placa en frascos viales (12).

F) AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DEL VIRUS DEL DENGUE POR ENSAYO DE PLACA EN CELULAS LLC-MK₂.

El análisis más ampliamente usado para el virus infectante es el análisis de placa; se inoculan cepas individuales de células huésped con diluciones adecuadas de virus y, después de la absorción, son recubiertas con medio -- que contiene agar o carboximetil celulosa para prevenir la diseminación --- viral. Después de varios días las células inicialmente infectadas han producido virus que se disemina sólo a las células circunvecinas, produciendo -- una pequeña zona de infección o placa. Bajo condiciones controladas, una -- placa sola, puede originarse de una sola partícula viral infectante, denominándose unidad formadora de placa(UFP) (6,3)

F-1) Método de Ensayo de Placa.

Se realiza en botellas de cultivo de tejido de 25 cm²., conteniendo 15 a 20 millones de células. Se hacen diluciones decimales del virus (10⁻¹ a 10⁻⁶).

- 1.1 0.2 ml. de la muestra (cepa problema. el virus utilizado fué pasado 2 veces en células LLC-MK₂) se deja absorber en la monocapa de células por 1 a 2 -- horas a 37°C.

- 1.2 Se agregan 7 ml. de medio enriquecido conteniendo 1% de agar purificado a -44°C (1.29).
- 1.3 Se incuban por 7 días a 37°C.
- 1.4 En un segundo paso con 4 ml. de solución salina conteniendo 1% de agar purificado y 1:7500 de rojo neutro éstase tiñen (1.30).
- 1.5 Al cabo de 24 horas, las placas se observan a través de una fuente de luz. La cantidad de virus se calcula como el número de unidades formadoras de --placas (UFP) por mililitro (12).

VII.- RESULTADOS

A) Inoculación intracerebral en ratones lactantes

Síntomas presentados en ratones lactantes del 1er. al 5o. pase después de inoculados:

- a) Dificultad de movimientos (demasiado lentos)
- b) Poca sensibilidad (se les picaba la cola) y sus movimientos eran en círculo con dificultad.
- c) Caminaban ladeados.
- d) Enterraban la cabeza.
- e) Temblor de extremidades inferiores y superiores.
- f) Producción de parálisis.

Nota:

En el siguiente cuadro N° 5 en todos los pases el virus solo mata a un ratón, excepto en el 3er. pase cepa N° 3010 que mata a dos ratones.

ADAPTACION DEL VIRUS A CEREBRO DE RATON LACTANTE

Cuadro N° 5

N° de muestra	Origen	Tipo	Mortalidad en días					
			N° de pase					
			1	2	3	4	5	
2377	Puerto Vallarta	D-2						
2388	P.V.	D-2						
2407	P.V.	D-2						
2853	P.V.	D-2						
2408	P.V.	D-1						
2851	P.V.	D-1						
2855	P.V.	D-1						
2859	P.V.	D-1						
2993	Nayarit	D-1			8	5		
2995	Nayarit	D-1						
2999	Nayarit	D-1						
3000	Nayarit	D-1	15					
3002	Nayarit	D-1						
3006	Nayarit	D-1	21					
3010	Nayarit	D-1	5		4			
3011	Nayarit	D-1						
2725	Colima	D-1						
2752	Colima	D-1						
3682	Mérida	D-4						
3683	Mérida	D-4	13	12, 15				
3684	Mérida	D-4						
3207	Oaxaca	D-1						
3292	N. León	D-1						
D-1		D-1		15		21		
D-2		D-2	7, 9	5, 15		6	7	
D-3		D-3	10, 11	7	6	6		
D-4		D-4	14			12, 15	8	

Los cuadros vacíos indican que no hubo mortalidad.

B) COMPARACION DE SUSCEPTIBILIDAD DEL VIRUS DEL DENGUE EN 3 DIFERENTES LINEAS CELULARES POR INMUNOFLORESCENCIA DIRECTA.

Cuadro N° 6

AISLAMIENTO DEL VIRUS DEL DENGUE

46

NUMERO DE MUESTRA	ORIGEN	DIA DE TOMA DE MUESTRA	TIPO	IDENTIFICACION POR I.D.				
				TRA P ₁	VERO P ₂		LLC-MK ₂ P ₂	
				INCUBACION EN DIAS				
				10	10	15	10	15
DENGUE	CONTROL (+)		D-1	+	+	+	+	+
CONTROL (-)				-	-	-	-	-
2733	PUERTO VALLARTA	5	D-2	+	-	-	+	
2388	P.V.	2	D-2	* +	+	+	+	
2407	P.V.	NO HAY DATO	D-2	+	-	+	+	
2853	P.V.	NO HAY DATO	D-2	+	-	+	+	
2408	P.V.	NO HAY DATO	D-1	+	-	+	-	+
2851	P.V.	NO HAY DATO	D-1	+	-	* +	+	
2855	P.V.	NO HAY DATO	D-1	+	-	+	+	
2859	P.V.	NO HAY DATO	D-1	* +	-	+	-	+
2993	NAYARIT	4	D-1	+	-	+	+	
2995	NAYARIT	3	D-1	+	+	+	+	
2999	NAYARIT	3	D-1	* +	* +	* +	* +	
3000	NAYARIT	4	D-1	+	+	Tubo roto	+	
3002	NAYARIT	4	D-1	+	+	+	-	-
3006	NAYARIT	2	D-1	+	+	+	-	+
3010	NAYARIT	NO HAY DATO	D-1	+	+	+	-	-
3011	NAYARIT	NO HAY DATO	D-1	+	+	+	-	+
2725	COLIMA	NO HAY DATO	D-1	+	-	dudoso	-	-
2752	COLIMA	6	D-1	+	+	+	+	
3682	MERIDA	3	D-4	+	-	+	-	+
3683	MERIDA	2	D-4	+	+	-	-	-
3684	MERIDA	2	D-4	+	+	Tubo roto	-	-
3207	OAXACA	5	D-1	+	-	-	-	+
3292	NUEVO LEON	2	D-1	* +	* +	-	* +	

* = células abundantes en todo el campo.

C) OBSERVACION DEL EFECTO CITOPATICO EN LAS LINEAS CELULARES VERO Y LLC-MK₂

Cuadro N° 7

N° de Muestra	EFECTO CITOPATICO			
	VERO P ₂		LLC-MK ₂ P ₂	
	incubación en días.			
	10	15	10	15
2377	N	N	N	N
2388	N	N	N	N
2407	N	N	N	N
2853	N	N	N	N
2408	N	N	N	N
2851	ECP	N	N	N
2855	N	N	N	N
2859	N	N	N	N
2993	ECP	ECP	N	N
2995	N	N	N	N
2999	ECP	ECP	N	N
3000	N	N	N	N
3002	ECP	ECP	N	N
3006	ECP	N	N	N
3010	N	N	N	N
3011	ECP	N	N	N
2725	N	N	N	N
2752	ECP	N	N	N
3682	N	ECP	N	N
3683	ECP	ECP	N	N
3684	N	ECP	N	N
3207	N	ECP	N	N
3292	ECP	ECP	N	N
D-1	N	ECP	ECP	ECP
D-2	N	N	N	N
D-3	N	N	N	N
D-4	N	N	N	N
	36% ECP	36%	4% ECP	4% ECP

N = Células normales

ECP = Efecto citopático (células redondas, enjuntamiento de células, células alargadas, células muertas).

D) Identificación del virus del dengue por la prueba de IH.

- Todas las cepas dieron resultados negativos (-)
Solo los controles (+) dieron IH.

E) Amplificación del virus por pases en células LLC-MK₂

- Pase 1 : la cepa 3000.
- Pase 2 : las cepas: D-1 tipo, 2388, 2853, 2855, 3002, 3006, 3010, 2725, -
2752, 3682 y 3684.
- Pase 3 : las cepas: 2377, 2407, 2408, 2851, 2859, 2993, 2995, 2999, 3011,
3683, 3207 y 3292.

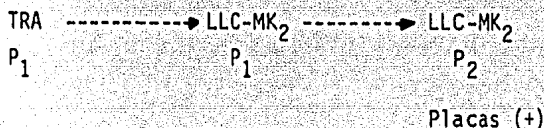
El pase indica cuantas veces fueron pasadas las cepas en las células.

F) Aislamiento e identificación del virus del dengue por ensayo de placa en -
células LLC-MK₂.

El plaqueo se realizó cuando se tenía el primer pase (P₁) en células LLC-MK₂ (amplificación del virus), pero dió resultados negativos.

En el 2º pase (P₂) dió resultados positivos.

Teniendo en cuenta que:



Características del desarrollo de placas de virus de dengue en células LLC-MK₂

- Tamaño de las placas: Aproximadamente de 1 a 2 mm.
- Morfología: Comunmente similares para el mismo serotipo, pero cada tipo muestra ligeramente un grado de variación.
Placas en diluciones de 10^{-1} a 10^{-3} : claras (Halos blancos).
Placas en diluciones de 10^{-4} a 10^{-6} : claras, pero se observan mejor que en las diluciones anteriores.
- Tiempo de aparición de las placas: en 24 horas.

El siguiente cuadro N° 8 nos indica las cepas que se trabajaron:

N° de Muestra	Serotipo	Origen	No. de pase	UFP/ml.
D-1 tipo	D-1		2	incontables
3292	D-1	Nuevo León	2	incontables
2388	D-2	Puerto Vallarta	2	incontables
2684	D-4	Mérida	2	incontables

VIII.- D I S C U S I O N

- Con respecto a los resultados obtenidos en la adaptación del virus a cerebro de ratón lactante se observa la mortalidad en diferentes días y en diferente pase tal vez, se deba a que son diferentes tipos de dengue (1,2 y 4) pero, aún siendo del mismo tipo no mueren el mismo día o simplemente no llegan a morir.

Las observaciones que se obtuvieron fueron las siguientes:

1er. pase. - Los ratones presentan signos de enfermedad del primero al quinto día después de inoculados, otros mueren.

2o. pase - En este pase los ratones presentan más marcados los signos de enfermedad que en el primer pase, en todas las cepas.

3er. pase. - En este pase los ratones presentan signos de enfermedad pero -- mucho más marcados que en los pases anteriores (en todas las -- cepas). De aquí que se esta de acuerdo con Jawetz, Melnick y -- Adelberg (6) los cuales mencionan que el virus del dengue se -- adapta a cerebro de ratón lactante efectuando varios pases, --- aunque a veces es necesario efectuar pases ciegos en los rato-- nes hasta lograr la adaptación de una cepa.

4o. y 5o. pase. - Los ratones presentan ligeramente signos de enfermedad.

De acuerdo a las observaciones correspondientes al cuadro N° 5, se puede -- decir que no hay homogeneidad de comportamiento del virus del dengue, lo cual puede deberse a diferentes factores como, lo son: el día de toma de muestra (período de incubación) el cual puede variar, lo cual depende como cita --- Benenson (1) de la cantidad de virus que se ha inoculado al organismo; al - manejo de la muestra que debe estar refrigerada lo cual lo mencionan Fenner y White (3) y también puede ser a que son de diferente área geográfica, --- pero esto quedó fuera de mi alcance, pero se pueden tomar en cuenta para -- estudios posteriores.

- En la comparación de susceptibilidad del virus en las diferentes líneas - celulares se observaron diferentes variaciones en la lectura de Inmuno--- fluorescencia Directa:

En cultivo celular TRA P₁ (primer pase)

Tiempo de incubación 10 días.

- Da un 100% de positividad, observandose células casi redondas (granulosas) y pequeñas.

En los cultivos celulares de VERO y LLC-MK₂ P₁

- Da 0% de positividad a los 10 y 15 días de incubación.

Estas observaciones están de acuerdo a lo que mencionan Jawetz, Melnick y - Adelberg (6) que el aislamiento primario del virus del dengue ha sido reportado usando cultivos de A. albopictus (células de mosquito) y TRA son --- también de mosquito, en cambio VERO y LLC-MK₂ son células de mamífero.

Línea celular VERO P₂ (2o. pase)

Tiempo de incubación 10 días.

- Se observa fluorescencia solamente en el perímetro de las células (redondas) en forma de racimos o aisladas y un poco más grandes que en TRA.

- Da un 52.6% de positividad.

Línea celular VERO P₂

Tiempo de incubación 15 días.

- Las células se observaron en forma aislada, agrupadas en pares y en racimos en mayor proporción.

- Da un 72.5% de positividad.

Línea celular LLC-MK₂ P₂

Tiempo de incubación 10 días.

- En todas las cepas (+) se observaron bastantes células (un promedio de -- 15 a 20 células por pozo).

- En las cepas No. 2407, 2851, 2853, 29993, 2995 y 3000 se observaron células redondas con pequeñas prolongaciones en forma de cuernos.

En las demás cepas se observan en forma aislada o en pares y en mayor cantidad y más grandes que en las otras 2 líneas (TRA y VERO).

- Da un 52.6% de positividad

Línea celular LLC-MK₂ P₂

Tiempo de incubación 15 días.

- Se observaron células pequeñas y redondas con bastante fluorescencia.

- Da un 54.6% de positividad (sólo de 12 cepas).

Algunas lecturas varían a los 10 y 15 días de incubación esto se debe a que el pH del medio cambia, Fenner y White (3) mencionan que el pH óptimo es de 6.0 a 7.0 y también se puede deber a que los tubos son duplicados, de todo esto se puede poner un término medio de periodo de incubación entre los 10 y 12 días para que las células no mueran y el virus se multiplique favorablemente y puedan dar resultados certeros, esto es útil para dar un buen diagnóstico. Fenner y White (3) mencionan que las técnicas de inmunofluorescencia requieren de cuidadosos estándares de control y personal experimental con lo cual estamos de acuerdo.

El día de elección de toma de muestra para que se dé un resultado certero es al 2o. ó 3er. día de inicio de síntomas de la enfermedad, ya que al hacer la lectura de inmunofluorescencia directa se observan bastantes células en todo el campo (cepas No. 2388, 3292 y 2999).

El virus del dengue (tipos 1, 2 y 4) es más susceptible a la línea celular TRA, en cambio es susceptible a las líneas celulares VERO y LLC-MK₂ pero hasta un segundo pase.

El dengue 1 es más sensible en células VERO a los 10 días de incubación que en LLC-MK₂.

El dengue 2 es más sensible en LLC-MK₂ que en VERO a los 10 días de incubación.

El dengue 4 es más sensible en VERO que en LLC-MK₂ a los 10 días de incubación. De esta manera se está de acuerdo con lo que mencionan Jawetz, Melnick y Adelberg (6) que el tipo de cultivo celular usado para el cultivo viral depende de la sensibilidad de las células a dicho virus en particular.

- De acuerdo al ECP, el virus del dengue produce más ECP en VERO que en LLC-MK₂ ya que en ésta última línea sólo produce ECP en el dengue tipo 1. A los 10 días de incubación se produce el ECP antes no se observa. La observación del ECP se debe de hacer en un término de 10 a 13 días de incubación, pues a los 15 días empiezan a desprenderse las células del tubo y a envejecer.

La diferencia de lecturas en VERO en las cepas 2851, 3006, 3011 y 2752 a los 10 días de incubación es que si hay ECP y a los 15 días no lo hay, esto puede deberse a que los tubos de ésta última lectura eran duplicados y se les agregó más medio para neutralizar el pH y con esto las células sobrevivieran.

Lo mismo pasa en Dengue 1 control (+). Se puede decir que el pH del medio - influye para determinar el ECP que provoca el virus, además de que el tiempo necesario para que los cambios citopáticos comiencen a manifestarse dependerá, en cierta forma, del número de viriones que haya contenido la muestra, pero principalmente de la velocidad de crecimiento del virus en cuestión lo cual también menciona Fenner (3).

No se puede comparar el porcentaje de ECP que provoca el virus en las dos lecturas, ya que no se tratan de los mismos tubos.

Fenner y White (3) mencionan que los ~~Tag~~ virus con frecuencia producen ECP - incompleto (picnosis, enjutmiento y destrucción celular), lo cual es lo que provoca el virus en la línea VERO.

- De acuerdo a los resultados obtenidos en la prueba de inhibición de la hemaglutinación podemos decir, que ésta no se presentó porque los ratones no se crearon anticuerpos contra el virus, y esto puede ser debido a que fué muy poca la cantidad de virus inoculado al organismo de éstos, lo cual cita Benenson (1).

Aunque sabemos que después de la infección los anticuerpos inhibitorios de hemaglutinación aparecen dentro de los primeros 7 días a partir de la iniciación de la enfermedad como lo mencionan Jawetz, Melnick y Adelberg (6).

- En la amplificación del virus se realizó hasta un tercer pase en algunas cepas, en las cepas que se llegó sólo al primer y 2o. pase fué porque se contaminaron, pero ya no fué necesario realizar los otros pases, teniendo en cuenta que el plaqueo salió (+) en el segundo pase y las placas eran incontables, esto demuestra que se tenía un título de virus muy elevado, Hotta S. y Pan American Health Organization (5,12) mencionan que el virus cultivado en células LLC-MK₂ incrementa el número de partículas, -- detectado por el ensayo de placa.

Sólo se realizó el plaqueo de una cepa de cada tipo (1, 2 y 4) más un Dengue tipo 1 (control +), pues no se contaba con el material suficiente.

- En el ensayo de placa no fué posible obtener las unidades formadoras de placas (UFP/ml) ya que éstas eran incontables.

La medida de las placas es aproximada, pues no se pudieron medir con exactitud pero de acuerdo a lo mencionado por Pan American Health Organization -- (12) los serotipos 1 y 3 del virus del dengue comunmente producen pequeñas placas (1-2 mm.) claras con pequeñas variaciones de medida y en el seroti

po 2 se producen placas de 1 - 4 mm. Algunas cepas tipo 1 producen placas de 6 - 8 mm.

Las placas se observaron mejor (separadas y bien formados los halos blancos) en las diluciones 10^{-4} a 10^{-6} o sea que conforme crecen las diluciones (el virus esta más diluido) se ve más claro el plaqueo. Para que se pudieran -- contar las placas se debe diluir más el virus.

Pan American Health Organization (12) menciona que esta prueba ofrece grandes ventajas como lo son: un alto grado de especificidad y confianza más la capacidad de detección de variantes del virus, diferenciación de morfología - en las placas y sensibilidad a cierta temperatura. Pero la principal desven- taja de esta técnica son los requerimientos para el cuidado del cultivo de las células y además un tiempo mínimo de 2 semanas para la identificación - del virus con lo cual se está de acuerdo.

El aislamiento de los virus en los cultivos celulares o la detección de --- anticuerpos específicos en el suero rara vez proporciona una respuesta defi- nitiva en menos de una semana, y cuando esta respuesta llega, puede que no tenga más que un valor académico para el doctor o para el paciente, aunque sea muy útil para el epidemiólogo.

La atención por lo tanto, debe estar concentrada en las técnicas que den -- resultados más rápidos y/o en el desarrollo de nuevas técnicas mediante las cuales se pueda tener un diagnóstico en pocas horas.

La enfermedad es de suma importancia ya que ha invadido a gran parte de la República Mexicana, es por lo tanto que se deben de llevar a cabo medidas - preventivas y de control.

Kumate (7) menciona que las campañas deben concentrarse en la temporada --- fresca de las zonas endémicas cuando la población del vector está en el pun- to mínimo. El agregado de insecticidas contra formas adultas como el ---- Malathión, por aspersión aérea, es muy costoso y no está asequible a la -- economía de los países tropicales que sufren la endemia.

Se debe notificar a las autoridades de salud, hacer encuestas en la locali- dad, dar educación al público sobre medidas personales de protección, tener medidas en caso de epidemias y verificar el cumplimiento de los acuerdos -- internacionales destinados a evitar la propagación de la enfermedad por per- sonas, monos y mosquitos y de su traslado por barco, avión o medios de ---- transporte terrestre, desde las zonas donde existe una epidemia (7).

Las medidas de control deben ser llevadas a cabo en consideración no solo - de los individuos y de las comunidades sino también por la pérdida económica resultante de la enfermedad, principalmente durante las epidemias de --- dengue clásico que afecta principalmente a mayores de 15 años.

IX.- CONCLUSIONES

- 1.- Con los resultados obtenidos en la adaptación del virus en cerebro de -- ratón lactante se concluye que: diferentes cepas de virus del dengue se pueden adaptar a éstos ya que presentan signos de enfermedad y llegan a producirles parálisis.
- 2.- Las cepas tienen diferente comportamiento aún, siendo del mismo tipo de dengue.
- 3.- El virus del dengue es más susceptible a la línea celular TRA (100%) en P_1 en comparación con VERO y LLC-MK₂ (0%) en P_1 .
- 4.- El virus del dengue es susceptible a las líneas celulares VERO y LLC-MK₂ P_2 .
- 5.- La primera línea de elección para el cultivo y diagnóstico del dengue - es TRA, en segundo lugar VERO y en tercer lugar LLC-MK₂. Pero de acuerdo a observaciones en el microscopio de inmunofluorescencia se ven --- mucho mejor, más grandes, en mayor cantidad y mejor delineadas las células en LLC-MK₂ que en VERO P_2 : ahora bien esto sólo se utilizaría para corroborar resultados, porque esto es en el P_2 y por lo tanto el diagnóstico es más tardado.
- 6.- El virus produce ECP más marcado en las células VERO (más sensibles) -- que en las LLC-MK₂.
- 7.- La observación del ECP es una ayuda importante para el diagnóstico virológico cuando se trata de aislar el virus a partir de las muestras -- obtenidas de los pacientes.
- 8.- La prueba de inhibición de la hemaglutinación es sencilla y rápida. -- Es el procedimiento serológico de elección para cualquier virus que --- causa hemaglutinación.
- 9.- La amplificación del título del virus del dengue por el método de pases en células LLC-MK₂ es muy eficaz.
- 10.- El ensayo de placa es una prueba usada con gran éxito tanto para el --- aislamiento como para la identificación del virus del dengue.
- 11.- El pase preliminar (o pases) mejora la habilidad para detectar el virus del dengue en el ensayo de placa por un aumento en la concentración del virus.

- 12.- El virus del dengue se adapta a cultivo celular ya que produce placas - sobre agar en la línea celular LLC-MK₂.
- 13.- La prueba de ensayo de placa puede ser empleada para una precisa identificación del virus aislado, y así servir para estudios epidemiológicos que lo requieran.
- 14.- Para fines de Salud Pública se requiere un rápido y preciso diagnóstico virológico del dengue.
- 15.- Las pruebas rutinarias más utilizadas y certeras para el diagnóstico -- del dengue son: Inmunofluorescencia directa e Inhibición de la hemaglutinación.
- 16.- La adaptación del virus en cerebro de ratón lactante, la observación -- del ECP que provoca éste y el aislamiento e identificación por ensayo de placa son procedimientos útiles y adaptables para un mejor diagnóstico e identificación del virus del dengue.

X.- BIBLIOGRAFIA

- (1) Benenson Abram S.
1975
El control de las enfermedades transmisibles en el hombre.
Editorial Organización Panamericana de la Salud.
Duodécima edición.
- (2) Clarke, D.H. y Casals, J. 1958 Techniques for hemagglutination and ----
Inhibition with Arthropod-borne viruses. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 7: --
561-573.
- (3) Fenner Frank - White David O.
1981.
Virología Médica.
Ediciones científicas La Prensa Mexicana, S.A.
México.
- (4) Gines Navarro Díaz de León
1975.
Control de Enfermedades Transmisibles.
Secretaría de Salubridad y Asistencia.
Segunda edición.
México.
- (5) Hotta S. Propagation of dengue virus in tissue culture.
1959, Acta Trop.: 16-108-50, 151-158.
- (6) Jawetz Ernest, Melnick Joseph L., Adelberg Edward A.
1981.
Manual de Microbiología Médica.
Editorial El Manual Moderno, S.A.
Novena edición.
México 11, D.F.
- (7) Kumate Jesús, Gutiérrez Gonzalo.
1984.
Manual de Infectología.
Editor Francisco Méndez Cervantes.
Décima edición.
México 20, D.F.

- (8) Kuno Goro.
1982.
Manual: Los cultivos celulares para el aislamiento e identificación de -
virus.
Centro de Control de Enfermedades, Estados Unidos.
Sección Dengue división de las enfermedades transmitidas por artrópodos.
E.U.A.
- (9) Nagarkatti. P.S. Nagarkatti: M: 1980, Comparison of hemagglutination -
inhibition (IH) and indirect fluorescent antibody techniques for the --
serological diagnosis of certain flavivirus. J. Trop. Med. Hyg.:83: --
115-117.
- (10) ONGSB. 1971, Plaque formation of dengue viruses in LLC-MK₂ cell cultures.
Southeast Asian J. Trop. Med. Public. Health. 2: 147-50.
- (11) Pan American Health Organization Actualidades. 1978: Dengue en Repúbli-
ca Dominicana y P. Rico. Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana.
84: 82.
- (12) Pan American Health Organization.
1979.
Dengue in the Caribbean, 1977.
Scientific Publication Nº 375. Washington, D.C. 20037
- (13) Pinheiro Francisco P.
1986.
Dengue y Dengue Hemorrágico en las Américas.
Washington, D.C.
- (14) Qureshi A.A; Trent D.W. Grup. B. Arbovirus Structural and Nonstructural
Antigens. III Serological Specificity of solubilized intracelular Viral
Proteins. Infect. Immun.
1973: 8: 993-9.
- (15) Race, M.W., R.A.J. Fortune, C. Agostini and M.G.R. Varna. 1972, Isola--
tion of dengue viruses in mosquito cell cultures underfield conditions.
Lancet (London) 1: 48-49.

- (16) Russell, P.K. and J.M. Mc. Cown. 1972. Comparison of dengue -2 and -- dengue-3 virus strain by neutralization tests and identification of a - subtype of dengue-3. American Journal of Medicine and Hygiene. 21: --- 97-99.
- (17) Russell P.K., D.V. Quy, A. Nisalak, P. Simasathien, T.M. Yuill, and --- D.J. Gould. 1969. Mosquito vectors of dengue viruses in South Vietnam. American Journal of Medicine and Hygiene. 18: 455-459.
- (18) U.S. Department of Health and Human Services.
1983.
Dengue Surveillance, Reference and Research 1982 Report.
Public Health Service.
Center For Disease Control.
San Juan Puerto Rico and Fort Collins, Colorado.
- (19) Westaway E.G.; 1973, Proteins Specified by group B Togaviruses in --- Mammalian cell during productive infections.
Virology 51: 454-465.
- (20) World Health Organization. 1973. Pathogenic mechanisms in dengue ---- haemorrhagic fever: report of an international collaborative study. -- Bulletin of the World Health Organization 48: 117-133.
- (21) Yuill, T.M. Sukhavachana, Pairatona, Nisalak Aranda, and Russell, P.K. 1968. Dengue virus recovery by direct and delayed plaques in LLC-MK₂ -- cells. Am. J. Trop. Med. and Hyg. 17: 441-448.