



Prueba de microneutralización para la detección de anticuerpos contra el virus dengue serotipo 2

Microneutralization test for detecting antibodies against serotype 2 dengue fever virus

Lucas Sevilla Drozdek^{1,a}, Egma Mayta Huatuco^{1,b,c}, Enrique Mamani Zapana^{1,b,d}, Nora Reyes Puma^{2,e,f}, Karla Vásquez Cajachahua^{1,a}, Bernardo Quispe Bravo^{1,c}, Joe Hermosilla Jara^{1,a}, Adrián Quintana Bedoya^{1,a}, Juan Sulca Herencia^{1,c}

1 Laboratorio de Virología Clínica y Molecular. Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

2 Instituto Nacional Daniel Alcides Carrión, Lima, Perú.

a Biólogo con mención en Microbiología y Parasitología

b Doctor en Ciencias: Área de Microbiología

c Biólogo

d Doctor en Ciencias Biológicas

e Médico cirujano

f Doctor en Medicina

Correspondencia

Lucas Augusto Sevilla Drozdek
lsevilla25@gmail.com

Recibido: 08/01/2023

Arbitrado por pares

Aprobado: 22/06/2023

Citar como: Sevilla-Drozdek L, Mayta E, Mamani E, Reyes N, Vasquez K, Quispe-Bravo B, Hermosilla J, Quintana A y Sulca J. Prueba de microneutralización para la detección de anticuerpos contra el virus dengue serotipo 2. Acta Med Peru. 2023;40(2):104-12. doi: <https://doi.org/10.35663/amp.2023.402.2538>

Este es un artículo Open Access publicado bajo la licencia Creative Commons

Atribución 4.0 Internacional (CC-BY 4.0)



RESUMEN

Objetivo: Optimizar la prueba de microneutralización (MNT) para detección de anticuerpos neutralizantes contra el virus dengue serotipo 2 (DENV-2) en la línea celular Vero-76. **Materiales y métodos:** Se evaluaron diferentes concentraciones celulares (0.6×10^5 cel/mL, 0.9×10^5 cel/mL, 1.2×10^5 cel/mL), porcentajes de 2 %, 3 % y 4 % de suero bovino fetal (SBF), número de pasajes del stock de virus y los días de incubación. La semilla viral se confirmó por RT-qPCR. El DENV-2 se propagó realizando 5 pasajes en células Vero-76, seguidamente se tituló el virus en placas de 96 pozos y se evaluaron 2 métodos de infección celular: monocapa y células en suspensión, además se determinó el día óptimo de coloración de las células. Obtenidos los resultados, se procesaron mediante MNT para DENV-2 las siguientes muestras: 5 sueros negativos a DENV-2 y YFV (Virus de la Fiebre Amarilla), 5 sueros negativos de anticuerpos a DENV-2 y positivos de anticuerpos a YFV y 5 sueros positivos de anticuerpos a DENV-2 seleccionados mediante la prueba de neutralización por reducción de placas (PRNT). **Resultados:** El método óptimo para MNT utilizó células en suspensión (0.9×10^5 cel/mL), 2 % de SBF y semilla viral pasaje 5. La mínima dilución capaz de diferenciar una muestra positiva a DENV-2 fue 1:40 y el tiempo de incubación para la MNT para DENV-2 fue de 10 días. **Conclusión:** La MNT con el método de células en suspensión y medio de cultivo con 2 % de SBF permite detectar anticuerpos neutralizantes IgG contra DENV-2 con resultados confiables, pudiendo analizar un mayor número de muestras con ahorro de materiales.

Palabras claves: Dengue; Serotipo; Neutralización; Optimización; Inmunoglobulina. (Fuente: DeCS-BIREME)

ABSTRACT

Objective: To optimize the microneutralization test (MNT) for the detection of neutralizing antibodies against serotype 2 of dengue fever virus (DENV-2) in a Vero-76 cell line. **Materials and methods:** Different cell concentrations were assessed (0.6×10^5 cells/mL, 0.9×10^5 cells/mL, and 1.2×10^5 cells/mL) with 2%, 3%, and 4% fetal bovine serum, virus stock passage number, and incubation days. Viral particles were confirmed using RT-qPCR. DENV-2 disseminated with 5 passages in Vero-76 cells, then, the virus was titrated in 96-well plaques, and two methods for cell infection were evaluated: single layer, and suspended cells. Also, the optimum day for cell staining was determined. Once results were obtained, the following samples were processed using MNT for DENV-2: five sera negative for DENV-2 and yellow fever virus (YFV), five sera negative for antibodies against DENV-2 and positive for antibodies against YFV, and five sera positive for antibodies against DENV-2 that were selected using the plate reduction neutralization test. **Results:** The optimum method for MNT used suspended cells (0.9×10^5 cells/mL), 2% fetal bovine serum, and viral particles at the 5th passage. The minimal dilution able to differentiate a positive sample for DENV-2 was 1:40, and the MNT incubation time for DENV-2 was ten days. **Conclusion:** MNT with the cell suspension method and a culture medium with 2% fetal bovine serum allows the detection of IgG neutralizing antibodies against DENV-2 with reliable results, so that larger sample sizes may be assessed, saving materials to be used.

Key words: Dengue, Serotype; Neutralization; Optimization; Immunoglobulin. (Source: MeSH-BIREME)

INTRODUCCIÓN

El dengue es la arbovirosis de mayor morbilidad y mortalidad en áreas tropicales y subtropicales del planeta, sobre todo en las zonas urbanas y semiurbanas ^[1]. En Perú, hasta el 2022, 20 departamentos presentan hiperendemicidad a dengue principalmente por el virus dengue serotipo 2 (DENV-2) del genotipo Americano/Asiático ^[2] y genotipo Cosmopolita asociado a los últimos brotes en Puno, Cuzco y Madre de Dios ^[3]. La detección de anticuerpos del tipo IgG son importantes para la confirmación de casos sospechosos a dengue y estudios de prevalencia siendo las pruebas de ELISA las más usadas por su elevada sensibilidad; sin embargo, la baja especificidad debido a las reacciones cruzadas entre los cuatro serotipos del virus dengue (DENV) y los miembros de la familia Flaviviridae puede generar sesgos en sus resultados ^[4,5], por lo cual se requiere la confirmación de las muestras positivas con otras pruebas con mejores niveles de especificidad como la prueba de neutralización por reducción de placas (PRNT) considerada la prueba de oro para la detección de anticuerpos neutralizantes y es utilizada para validar otras pruebas de detección de anticuerpos como las pruebas de ELISA y las pruebas cromatográficas, se usa también para determinar la seroconversión de anticuerpos post vacunación y en estudios epidemiológicos permite la discriminación de muestras falsas positivas que pueden aparecer si se utilizan en el tamizaje inicial pruebas altamente sensibles pero con baja especificidad; sin embargo, la prueba de PRNT es una prueba laboriosa, costosa y difícil de ejecutar, lo cual dificulta su utilización ^[6-8]. Por este motivo es necesario desarrollar pruebas en micrométodos como la microneutralización (MNT), la cual utiliza el mismo principio inmunológico que el PRNT, presenta elevada sensibilidad y especificidad permitiendo procesar un mayor número de muestras séricas con ahorro de materiales ^[9]. La MNT ha sido utilizada para la detección de anticuerpos contra los virus Rocio, Ilheus, Zika y otros ^[10,11], sin embargo su uso en la detección de anticuerpos contra DENV ha presentado dificultades debido a la baja producción de efecto citopático (ECP) de las cepas de DENV en las líneas celulares

siendo necesaria una evaluación metódica de la técnica para su utilización. Por lo cual el objetivo del presente estudio fue optimizar la prueba de microneutralización para la detección de anticuerpos neutralizantes contra DENV-2.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló en el laboratorio de Virología clínica y molecular de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos. La cepa de DENV-2 corresponde a un aislamiento peruano del año 2015. La cepa del virus de fiebre amarilla (YFV) corresponde a una cepa vacunal de STAMARIL (lote: k5338). Las células Vero-76 y las muestras de suero fueron obtenidas del laboratorio de Virología clínica y molecular de la UNMSM, siendo este estudio aprobado por el Comité Institucional de Ética en Investigación del Instituto de Medicina Tropical "Daniel Alcides Carrión" de UNMSM (Constancia de aprobación CIEI-2021-17).

Producción de la semilla viral DENV-2 y evaluación de la pureza viral

Se inoculó 200 μ L de la cepa de DENV-2 diluido 1:10 en un frasco de 25 cm² con monocapa confluyente de células Vero-76, se incubó por 60 min a 37 °C y se adicionó 8 mL de medio de mantenimiento al 2% de suero bovino fetal (SBF), se incubó 9 días para la aparición de ECP, se centrifugó el sobrenadante y se almacenó a -80 °C. Para evaluar la pureza de la semilla se realizó un ensayo de RT-PCR múltiple en tiempo real. La extracción del ARN se realizó usando el kit QIAmp viral RNA (Qiagen), siguiendo las indicaciones de fabricante ^[12]. Para el ensayo de RT-PCR en tiempo real se utilizó el kit Rotor-Gene Multiplex RT-PCR Kit (Qiagen), y el set de cebadores y sondas de hidrólisis TaqMan descritos por Johnson *et al.*, 2005 ^[13]. Se empleó el termociclador Rotor-Gene Q para llevar a cabo el ensayo bajo los siguientes parámetros: Transcripción reversa a 50°C por 15 min, un paso de activación a 95°C por 15 min; 45 ciclos de desnaturalización a 95°C por 15 seg hibridación/extensión a 60° por 15 seg.

Producción de la semilla viral YFV

Se inoculó 200 μL de la cepa vacunal de YFV diluido 1:10 en un frasco de 25 cm^2 con monocapa confluyente de células Vero-76, se incubó por 60 min a 37 °C y se adicionó 8 mL de medio de mantenimiento al 2 % de SBF, se incubó 4 días para la aparición de ECP, se centrifugó el sobrenadante y se almacenó a - 80 °C.

Adaptación de la semilla viral a la línea celular Vero-76

Se propagó la semilla viral inoculando 200 μL del DENV-2 en la dilución 1:25 en frascos de cultivo de 25 cm^2 con monocapa confluyente de células Vero-76. Se incubó a 37°C por 1 h. Se adicionó 8 mL del medio de mantenimiento al 2 % SBF y se incubó hasta la manifestación ECP de 3+. Se centrifugó la suspensión viral a 2000 rpm/10 min y el sobrenadante se preservó a -80°C. Este proceso se realizó 5 veces.

Titulación viral por plaqueo y PRNT₇₀ para DENV-2

El método empleado se basó en el método desarrollado por Alvarez *et al.*, 2010 (14). Para determinar el título viral, se preparó 3 placas de 24 pozos con una suspensión de células de Vero-76 a una concentración de 2.5×10^5 cel/mL. Se inoculó 50 μL /pozo/triplicado de cada dilución (10^{-1} a 10^{-7}) de DENV-2. Después de 4 horas, se adicionó medio de recubrimiento con 6 % de carboximetilcelulosa (CMC), se incubó a 37°C y se coloreó los días 7, 8 y 9 días con azul negro de naftol. Una vez determinado el día óptimo de coloración se realizó la PRNT₇₀ para DENV-2, se inactivó todos los sueros a 56°C x 30 min para los respectivos estudios. Los sueros negativos a anticuerpos para DENV-2 fueron evaluados en las diluciones finales de 1:5; 1:10 y 1:20. Los sueros positivos a anticuerpos para DENV-2 se evaluaron en diluciones finales de 1:160; 1:320 y 1:640. La mezcla DENV-2 y suero de anticuerpos se incubó a 37°C por 1h, se inoculó 50 μL /pozo/duplicado de la mezcla en una suspensión celular de 2.5×10^5 cel/mL, se incubó por 4 horas y se adicionó 500 μL /pozo de medio de recubrimiento, se incubó a 37°C y se coloreó la placa al octavo día.

Titulación viral por plaqueo y PRNT₇₀ para YFV

Se inoculó 50 μL /pozo/triplicado de las diluciones (10^{-1} a 10^{-7}) de la cepa vacuna en una monocapa confluyente de células Vero-76 en placa de 24 pozos, se adicionó medio de recubrimiento al 3 % CMC, se incubó a 37°C hasta el sexto día de tinción. Para seleccionar muestras positivas y negativas a anticuerpos a YFV mediante la PRNT, se realizó la mezcla YFV- suero en la dilución de 1:5 y se incubó a 37°C por 1h, se inoculó 50 μL /pozo/duplicado de la mezcla incubada en placas de 24 pozos con monocapa completa de células Vero-76, se incubó por 3 horas, se adicionó 500 μL /pozo de medio de recubrimiento con 3 % CMC y se coloreó al sexto día la placa ^[15].

Optimización de la MNT para DENV-2

Para la optimización se evaluó el método de monocapa completa recomendada por Roehrig *et al.*, 2008 ^[8] y el método

de suspensión celular en base al método de Juarez, 2009 ^[10] con algunas modificaciones.

Titulación DENV-2 por el método de monocapa completa

Se prepararon 3 placas de 96 pozos, cada placa contenía 3 concentraciones celulares (0.6×10^5 cel/mL, 0.9×10^5 cel/mL, 1.2×10^5 cel/mL) de células Vero-76 en medio de crecimiento al 10 % SBF dispensado en 100 μL /pozo/cuadruplicado. Las placas se incubaron a 37°C / 48 h. Seguidamente se infectó con 100 μL de DENV-2 /pozo de la dilución 10^{-1} hasta 10^{-7} usando controles de células en cada dilución. Los pozos se colorearon a los días 9, 10 y 11 con Azul negro de naftol. Se determinó el TCID₅₀ (Dosis infectiva del 50 % en cultivo de células) mediante el método de Reed y Muench ^[16].

Titulación DENV-2 por el método de suspensión celular

Se prepararon 3 placas de 96 pozos con concentraciones celulares de 0.6×10^5 cel/mL, 0.9×10^5 cel/mL, 1.2×10^5 cel/mL diluidos en medio de mantenimiento al 2 % SBF dispensado en 100 μL /pozo/cuadruplicado. Seguidamente se infectó con 100 μL de DENV-2 /pocillo desde la dilución 10^{-1} hasta 10^{-7} utilizando controles de células en cada dilución. Se colorearon las células a los 9, 10 y 11 días con azul negro de Naftol. Se determinó el TCID₅₀ y posteriormente, una vez obtenida la concentración celular óptima, se evaluó la prueba de plaqueo usando medio de mantenimiento con 3 % y 4 % SBF. Finalmente se reevaluó el grado de infección de los pozos y se determinó el TCID₅₀ mediante el método de Reed y Muench ^[16].

MNT para anticuerpos neutralizantes contra DENV-2

Con los sueros evaluados y seleccionados por PRNT se prepararon diluciones finales de suero negativos a anticuerpos para DENV-2 (1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160) y suero positivo a anticuerpos a DENV-2 (1:5, 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640). Se dispuso 100 μL /pozo de la mezcla virus-suero en la placa de 96 pozos según corresponda la dilución del suero y se incubaron a 37°C por 1 hora. La suspensión celular se preparó a una concentración celular de 0.9×10^5 cel/mL (conteniendo 2 % de SBF), luego se adicionó a razón de 100 μL /pozo. Las placas se incubaron hasta el tiempo óptimo de coloreo a 37°C en condiciones herméticas y se coloreó con 70 μL /pozo de azul negro de Naftol. Se usaron pocillos como control de células, control de virus y control TCID₅₀.

Análisis estadístico

La correlación entre los resultados de los sueros analizados por la PRNT y MNT se realizó mediante el coeficiente de correlación de rangos de Spearman usando SPSS v 20.0.

RESULTADOS

Evaluación de la pureza viral, producción de la semilla viral

La pureza de la semilla viral fue confirmada mediante la RT-PCR multiplex en tiempo real dando como resultado positivo a DENV-2 y negativo a los otros serotipos de DENV.

Adaptación de la semilla viral DENV-2 en la línea celular Vero-76

Se evaluó la adaptación de la semilla viral para cada pasaje mediante la manifestación de ECP en los cultivos celulares y la formación de placas líticas en la prueba de plaqueo de 24 pozos. En el primer y segundo pasaje se observó un ECP débil sobre el 25 % y 50 % de la monocapa (1+ a 2+ respectivamente), además se observó placas líticas tenues no definidas para DENV-2 (mediante PRNT) y en el quinto pasaje se observó ECP sobre el 75 % o más de la monocapa (3+) y placas líticas definidas.

Prueba de Plaqueo y PRNT para DENV-2 y YFV

Mediante la prueba de plaqueo, el título viral de DENV-2 y YFV fueron 1.4×10^6 UFP/mL (Figura 1) y 1.07×10^7 UFP/mL respectivamente. Por PRNT se seleccionó 10 sueros negativos a DENV-2 (de los cuales 5 sueros fueron negativos a YFV y 5 sueros positivos a YFV en las diluciones 1:5 y 1:10) y 5 sueros positivos a DENV-2.

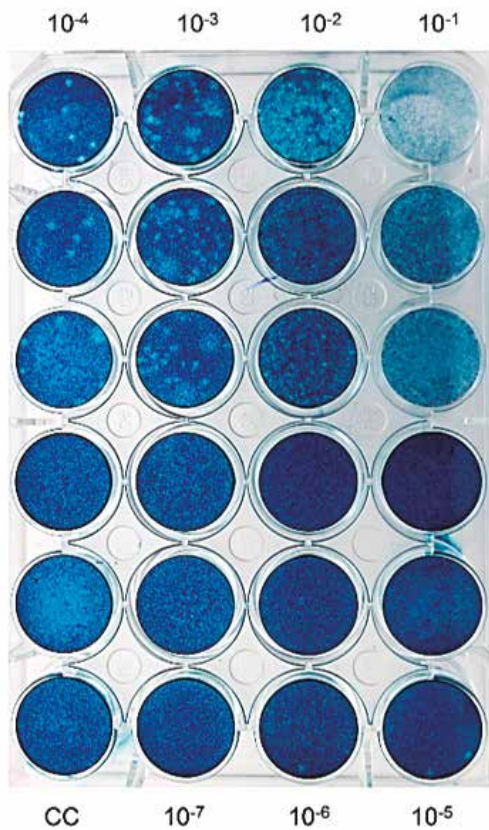


Figura 1: Prueba de plaqueo para DENV-2 por el método semisólido usando células Vero-76 en suspensión y medio de recubrimiento con 6 % CMC.

Prueba de plaqueo y optimización de la MNT para DENV-2

La prueba de plaqueo para DENV-2 por el método con monocapa completa mostró un ECP bajo sin poderse diferenciar las diluciones virales del control de células y por el método de suspensión celular mostró buen ECP y permitió diferenciar las diluciones virales con el control de células. La concentración celular óptima fue 0.9×10^5 cel/mL. La concentración celular de 0.6×10^5 cel/mL mostró monocapa incompleta en el control de células y la concentración celular de 1.2×10^5 cel/mL, mostró monocapa completa en el control de células, pero el efecto citopático de la cepa nativa DENV-2 no fue muy marcado. El medio de mantenimiento con 2 % SBF fue el porcentaje óptimo al evidenciar la formación de monocapa confluyente y una buena manifestación del ECP viral comparado con los otros porcentajes de SBF (Figura 2).

Día óptimo de coloración y determinación del TCID₅₀

El décimo día como fue el día óptimo de coloreo, el control de células presentó monocapa completa al 100% de confluencia y el TCID₅₀ fue $10^{3.48}$ TCID₅₀/mL según el método de Reed and Munch.

Citotoxicidad

En ninguna de las diluciones evaluadas se observó efecto citotóxico.

Evaluación de los resultados obtenidos mediante PRNT y MNT para DENV-2

La tabla 1 indica los resultados de la optimización de la MNT para DENV-2 y las concentraciones usadas en la prueba.

Tabla 1. Comparación entre la PRNT y MNT para DENV-2

	PRNT	MNT
Concentración de células	2.5×10^5 cel/mL	0.9×10^5 cel/mL
Ensayo de muestras por placa (con una dilución)	6 muestra x placa/duplicado	12 muestras x placa/triplicado
Tiempo de obtención de resultados	8 días	10 días
Tiempo de ejecución del ensayo	12 h	5 h
Medio por placa	24 mL (MC + overlay)	9.6 mL (M.M)
SBF/placa	1.2 mL	0.384 mL

Abreviatura: PRNT: Prueba de Neutralización por Reducción de Placas, MNT: Pruebas de Microneutralización, SBF: Suero Bovino Fetal

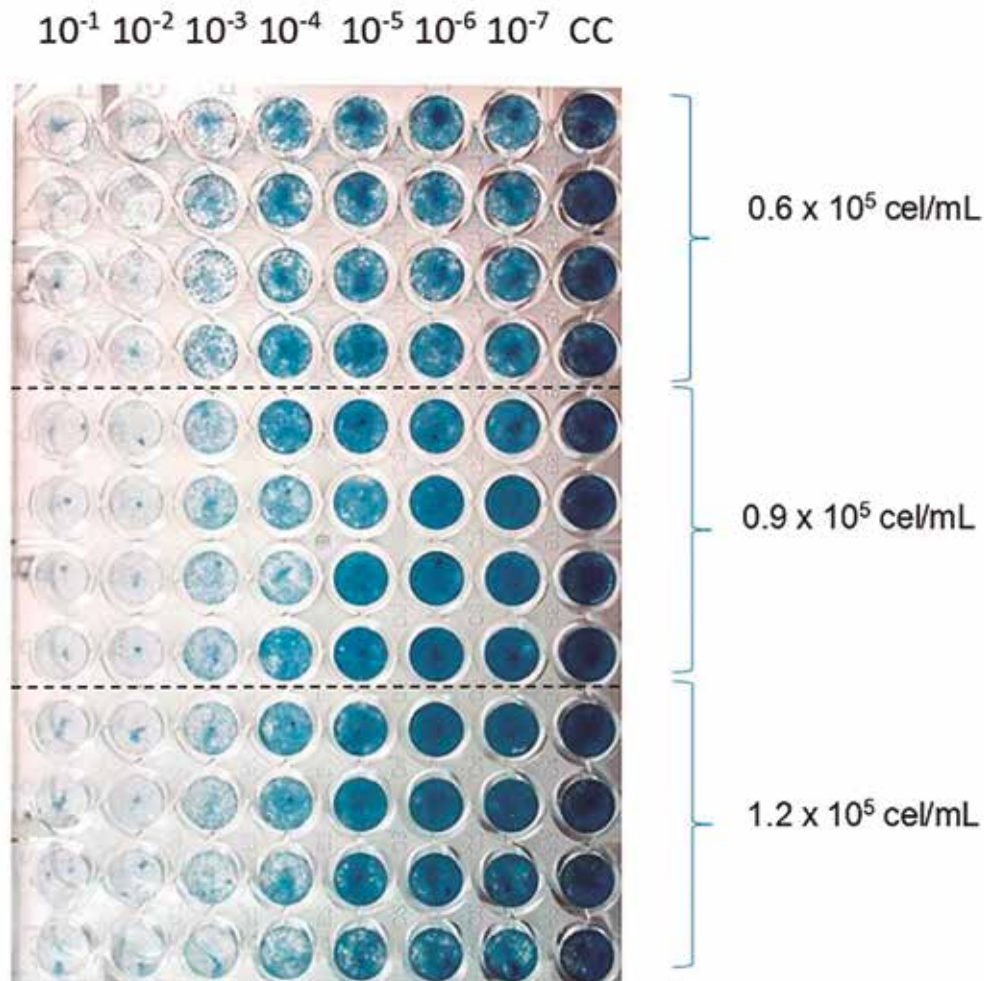


Figura 2: Optimización de la MNT para DENV-2 por el método de suspensión celular evaluando 3 concentraciones celulares suspendidas en medio de mantenimiento al 2 % de SBF.

Títulos de anticuerpos neutralizantes contra DENV-2 obtenidos por PRNT y MNT

Los títulos de anticuerpos neutralizantes de las 15 muestras evaluadas se presentan en la tabla 02.

Evaluación de la reacción cruzada entre YFV y DENV-2 en la MNT para DENV-2

Mediante la MNT, los 5 sueros negativos a la presencia de anticuerpos neutralizantes contra DENV-2 y YFV presentaron la monocapa celular sin ECP, no pudiendo diferenciar entre muestras positivas y negativas contra estos virus en las diluciones 1:5 y 1:10; considerándose como indeterminados. Las muestras negativas a DENV-2 y YFV por PRNT son negativas por MNT a partir de la dilución 1:20.

De los 5 sueros negativos a DENV-2 y positivos a YFV mediante PRNT, 3 sueros mostraron reacción cruzada en la dilución 1:20 y 2 sueros mostraron reacción cruzada en 1:10 (se observó una monocapa celular sin ECP) considerando el resultado como una

reacción cruzada entre el virus DENV-2 y los anticuerpos del YFV. A partir de la dilución 1:40 no se presentó reacción cruzada entre DENV-2 y YFV por MNT.

Los títulos de anticuerpos neutralizantes obtenidos en las muestras positivas a DENV-2 y YFV por MNT fueron menores en comparación con la PRNT en dos muestras, siendo todas las muestras positivas para la presencia de anticuerpos neutralizantes del tipo IgG en ambas pruebas. Al comparar la correlación de los resultados de la MNT y el PRNT por el coeficiente de correlación de rangos de Spearman se encontró un $R = 0,887$ y $p < 0,05$.

DISCUSIÓN

En el presente estudio se realizó 5 pasajes virales y se encontró que en el primer y segundo pasaje de DENV-2 las placas líticas en la prueba de plaqueo no fueron definidas; no obstante, en el quinto pasaje las placas líticas mostraron una mejor

Tabla 2. Evaluación de 5 sueros negativos a DENV-2 y YFV, 5 Sueros negativos a DENV-2 y positivos a YFV y 5 sueros positivos a DENV-2 y YFV; mediante la PRNT y MNT para DENV-2.

Grupo de suero	N° Sueros	Título de anticuerpos neutralizantes contra DENV-2		Título de anticuerpos neutralizantes YFV por PRNT (Título/Resultado)
		PRNT (Título/Resultado)	MNT (Título/Resultado)	
Negativos a anticuerpos contra DENV-2 y YFV	5	<1:5 / Negativo	1:10 / Indeterminado	<1:10 / Negativo
Negativos a anticuerpos contra DENV-2 y positivos a YFV	2	<1:5 / Negativo	1:10 / Rx. Cruzada	1:10 / Positivo
	3	<1:5 / Negativo	1:20 / Rx. Cruzada	1:10 / Positivo
Positivo a anticuerpos contra DENV-2 y YFV	1	1:160 / Positivo	1:40 / Positivo	1:10 / Positivo
	3	≥ 1:640 / Positivo	1:640 / Positivo	1:10 / Positivo
	1	1:320 / Positivo	1:80 / Positivo	1:10 / Positivo

Abreviaturas: DENV-2: Virus del Dengue Serotipo 2, YFV: Virus de la Fiebre Amarilla , PRNT: Prueba de Neutralización por Reducción de Placas , MNT: Pruebas de Microneutralización

definición, siendo necesario estos pasajes virales para adaptar el virus a la línea celular Vero. Teniendo en cuenta la alta tasa de mutación de DENV, es aconsejable mantener los stocks de virus con pasajes bajos y en las líneas celulares como la Vero-76 se sugiere propagar hasta 20 pasajes para prevenir mutaciones en las células que pudieran afectar la replicación viral [17]. Se encontró que el método óptimo para la MNT fue el método que utiliza células en suspensión a una concentración de 0,9 x 10⁵ cel/mL. Esta concentración de células en conjunto con la adecuada concentración de SBF (2 %) permiten la formación de

una monocapa confluyente lo suficientemente densa para permitir la manifestación de un buen ECP y la discriminación de los pozos infectados y no infectados mediante la coloración de las células. El SBF tiene factores de crecimiento, hormonas, minerales, lípidos y otros micronutrientes que ayudan a la proliferación y adhesión celular jugando un rol principal en la formación de la monocapa celular [18] y es uno de los componentes más costosos del medio de cultivo. El porcentaje óptimo de SBF encontrado fue 2 % donde se puede evidenciar la presencia del ECP a diferencia de las concentraciones de 3 % y 4 % donde no se pudo visualizar el ECP

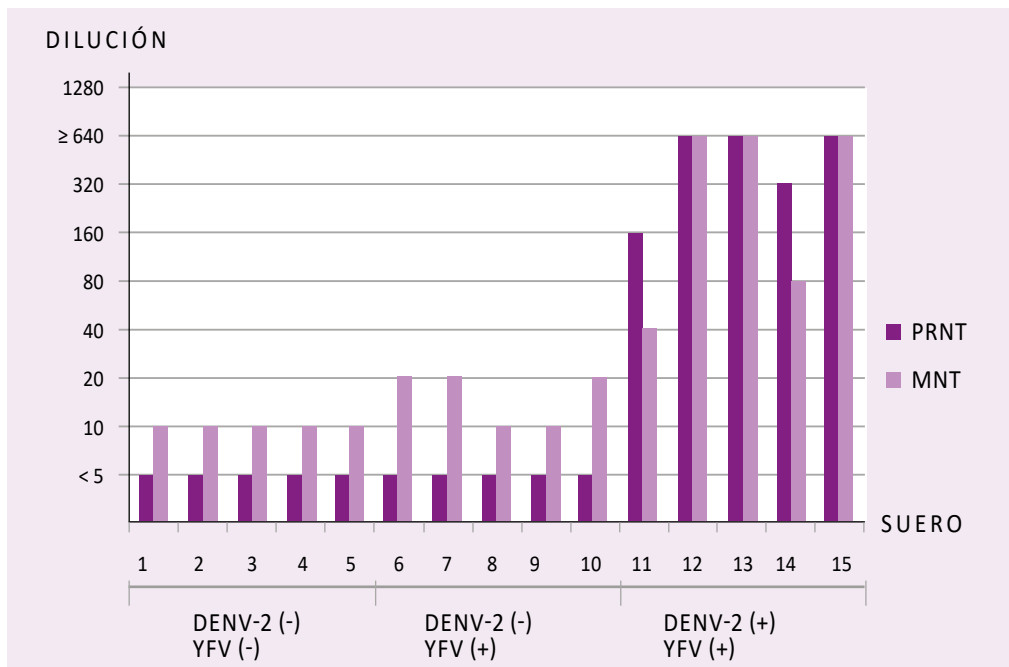


Figura 4: Evaluación de 15 muestras de suero por la prueba de PRNT y MNT para la detección de anticuerpos contra DENV-2.

del DENV-2. El uso de SBF al 2 % permitió reducir los costos en la MNT^[19] y previene el desprendimiento celular en muestras positivas por la neutralización del virus. En este estudio se observó que utilizando una concentración de 0.6×10^5 cel/mL la monocapa celular en el control de células no alcanzó un 100 % de confluencia. Esto podría deberse a que en nuestra metodología la propagación y mantenimiento de los cultivos celulares en frascos y placas se realizó en una incubadora sin inyectar CO_2 . El uso de CO_2 en los cultivos celulares permite mantener el equilibrio carbonato-bicarbonato del medio y estabiliza su pH^[20]. No obstante, los cultivos celulares producen su propio CO_2 y este fue utilizado para mantener el pH del medio de cultivo al emplear frascos y placas selladas. Por otro lado, el medio se utilizó con un pH de 7.1 y estabilizado con buffer HEPES^[8] para evitar la alcalinización en un sistema que no utiliza incubadoras con inyección de CO_2 .

En un estudio realizado para determinar la presencia de anticuerpos contra los virus Rocio y Ilheus, se usó una concentración de células Vero-76 de 5×10^5 cel/mL en medio de mantenimiento al 3 % de SBF empleando el método de suspensión celular^[10], esto posiblemente se deba a que el ECP de estos virus es más fuerte, por lo cual necesita una monocapa más densa lo cual se logra incrementando la concentración de células y de SBF^[18]. Otro estudio evaluó la presencia de anticuerpos contra DENV-2 mediante MNT se usó una concentración de células Vero a 1×10^4 cel/mL con el método de monocapa completa y se infectó con DENV-2 (cepa de Nueva Guinea) incubando toda la noche a 37°C ^[21] la cual es una cepa referencial utilizada en diferentes estudios^[22,23] y en este estudio utilizamos una cepa nativa de DENV-2 (aislamiento peruano del 2015). Las cepas nativas de DENV pueden presentar un ECP débil debido a que aún no están adaptadas a las líneas celulares

El título viral del DENV-2 para MNT por el método de Reed y Muench fue $10^{3.48}$ TCID₅₀/mL. En un estudio realizado por Juárez, 2009 describió que el título del virus Rocio e Ilheus por MNT fue $10^{5.17}$ y $10^{6.36}$ TCID₅₀/mL respectivamente^[10]. Medina *et al.*, 2012 reportó que el DENV no alcanza títulos tan altos como otros virus para uso en ensayos biológicos^[17], lo cual fue corroborado en este estudio. Con respecto a la citotoxicidad de las muestras de sueros, las altas concentraciones de suero podrían desprender la monocapa celular debido a la toxicidad interfiriendo con los resultados de la prueba y pudiendo reportar resultados falsos negativos por MNT^[24], para este estudio no se presentó citotoxicidad en las células Vero-76 a partir de la dilución 1:5; cabe señalar que los 15 sueros fueron inactivados a $56^\circ\text{C} \times 30$ min para inactivar el sistema complemento.

Los 5 sueros negativos a DENV-2 y YFV presentaron monocapa completa en la dilución final 1:10 esto podría deberse a que los sueros aportan nutrientes a las células lo cual podría interpretarse como falsos positivos para la MNT. Para evitar este sesgo se sugiere trabajar las muestras a partir de una dilución de 1:40. Los 5 sueros negativos a DENV-2 y positivos a YFV presentaron reacción cruzada en las diluciones 1:10 y 1:20 para DENV-2, debido a los determinantes antigénicos compartidos entre los serotipos del

DENV y miembros de la familia Flaviviridae^[5]. Para evitar la reacción cruzada entre DENV-2 y YFV en sueros de zonas endémicas es necesario trabajar las muestras a partir de la dilución 1:40 para evitar la reacción cruzada de los anticuerpos de YFV y evitar falsos positivos en la detección de DENV-2. El análisis estadístico de la correlación de los títulos obtenidos por PRNT y MNT para DENV-2 fue estadísticamente significativo ($p < 0,05$), con una correlación considerada como muy buena y directamente proporcional ($R = 0,887$). La prueba de PRNT es considerada la prueba de oro para la detección de anticuerpo neutralizantes y permite trabajar diluciones más bajas que la MNT. En el 2008, Putnak y colaboradores describieron que la PRNT es más sensible que la MNT para DENV^[25]. Existen otras técnicas como la MNT-ELISA la cual usa el principio inmunológico de la MNT y el proceso de coloración de células es remplazado por un revelado mediante una prueba de ELISA. Esta técnica no necesita esperar la aparición del ECP reduciendo el tiempo de incubación de las muestras; sin embargo, utiliza reactivos adicionales como el conjugado, el sustrato y anticuerpos monoclonales o policlonales para la realización del inmunoensayo aumentando los costos de la prueba^[21,6]. La MNT presenta el mismo principio inmunológico que la PRNT y grandes ventajas como el procesamiento de un mayor número de muestras séricas y ahorro de materiales, insumos y tiempo de procesamiento, los cuales reducen los costos de los ensayos, brinda resultados confiables y se convierte en una herramienta útil en los estudios de vigilancia epidemiológica para identificar, medir y analizar problemas de salud que perjudican a la población, tomar decisiones destinadas a promocionar la salud y prevenir enfermedades^[26].

Es importante resaltar que los anticuerpos neutralizantes son anticuerpos de alta especificidad que van a neutralizar al virus viable reconociendo los epítomos virales específicos produciéndose la reacción antígeno - anticuerpo *In vitro*. Ninguna prueba hasta el momento es superior o reemplaza a la PRNT^[25]; no obstante, la microneutralización tiene ventajas en la reducción de costos de los ensayos, reducción de tiempo de incubación y del procesamiento de la prueba.

Agradecimientos: Un agradecimiento muy especial a los docentes y colegas del Laboratorio de Virología Clínica y Molecular de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UNMSM por permitir desarrollar el presente estudio de investigación.

Contribuciones de autoría: Lucas Augusto Sevilla Drozdek (Procesamiento de las muestras séricas y DENV-2, Optimización de las pruebas, Análisis de resultados y redacción del artículo); Enrique Walter Mamani Zapana (Asesor de tesis y revisión del artículo); Egma Marcelina Mayta Huatucu (Asesoría y revisión del artículo); Nora Reyes Puma (Revisión de artículo); Karla Verónica Vásquez Cajachahua (Procesamiento de prueba de YFV y revisión del artículo); Bernardo Esteban Quispe Bravo (Mantenimiento de cultivos celulares y revisión del artículo); Joe Hermosilla Jara (Colaboró en el diagnóstico molecular por qRT-PCR y revisión del artículo); Adrián Quintana Bedoya (Mantenimiento de cultivos celulares y revisión del artículo); Juan Samuel Sulca Herencia (Asesor de tesis, Supervisor del proyecto y co - redactor del artículo)

Fuente de Financiamiento: INNOVATE – Contrato N° 132- FINCyT-IB-2013 – PERÚ

Potencial conflictos de interés: Los autores declaran no tener conflictos de interés.

ORCID

Sevilla Drozdek, Lucas, <https://orcid.org/0000-0002-8086-0523>
 Mayta Huatuco, Egma, <https://orcid.org/0000-0001-8471-1675>
 Mamani Zapana, Enrique, <https://orcid.org/0000-0003-4127-1248>
 Reyes Puma, Nora, <https://orcid.org/0000-0003-1671-5169>
 Vasquez Cajachahua, Karla, <https://orcid.org/0000-0002-2000-3597>
 Quispe-Bravo, Bernarndo, <https://orcid.org/0000-0002-9361-7709>
 Hermosilla Jara, Joe, <https://orcid.org/0000-0001-9017-3324>
 Quintana Bedoya, Adrian, <https://orcid.org/0000-0003-1252-0268>
 Juan Sulca Herencia, Juan, <https://orcid.org/0000-0003-4078-7744>

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- World Health Organization. Dengue and Severe dengue. 2022. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>.
- Ministerio de Salud. Situación del dengue en el Perú (a la SE 21); Boletín epidemiológico Volumen 26 (8): 688 – 691., 2017 Disponible en: <https://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2017/21.pdf>.
- Ministerio de Salud. Situación epidemiológica del dengue y otras arbovirosis; Centro Nacional de Epidemiología, prevención y control de enfermedades. 2021. Disponible en: <https://www.dge.gob.pe/portalnuevo/wp-content/uploads/2021/05/Vigilancia-Epidemiologica-de-dengue-y-otras-arbovirosis.pdf>.
- Cabezas César, Paquita García María, Valle Jorge, Yañez Pamela, Fachin Luis, Sinti Carmen *et al.* Transmisión vertical del virus del dengue en el *Aedes aegypti*, Perú. *Rev. perú. med. exp. salud publica* [Internet]. 2015 Ene [citado 2023 Jul 03]; 32(1): 191-192. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1726-46342015000100028&lng=es.
- Rockstroh A, Barzon L, Pacenti M, Palù G, Niedrig M, Ulbert S. Recombinant Envelope-Proteins with Mutations in the Conserved Fusion Loop Allow Specific Serological Diagnosis of Dengue-Infections. *PLoS Negl Trop Dis* [Internet]. 2015 Nov;9(11):e0004218. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26565964>.
- Sulca Herencia J. Laboratory Tests Used in the Diagnostic and Research of Dengue Virus: Present and Future. *Dengue Fever - a Resilient Threat in the Face of Innovation* [Internet]. 1st ed. London: Jorge Abelardo Falcón-Lezama, Miguel Betancourt-Cravioto and Roberto Tapia-Conyer; 2019 [cited 11 April 2020]. p. 169. Available from: <https://www.intechopen.com/books/dengue-fever-a-resilient-threat-in-the-face-of-innovation/laboratory-tests-used-in-the-diagnostic-and-research-of-dengue-virus-present-and-future>.
- Timiryasova TM, Bonaparte MI, Luo P, Zedar R, Hu BT, Hildreth SW. Optimization and validation of a plaque reduction neutralization test for the detection of neutralizing antibodies to four serotypes of dengue virus used in support of dengue vaccine development. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2013 May;88(5):962–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23458954>.
- Roehrig JT, Hombach J, Barrett ADT. Guidelines for Plaque-Reduction Neutralization Testing of Human Antibodies to Dengue Viruses. *Viral Immunol* [Internet]. 2008 Jun;21(2):123–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18476771>.
- CDC. Laboratory Guidance and Diagnostic Testing. Dengue. 2016. (internet) Disponible en:<http://www.cdc.gov/dengue/clinicalab/laboratory.html>.
- Juarez Espinoza DS.. Detección de anticuerpos neutralizantes contra los virus Rocío, Ilheus y Oeste del Nilo en una población humana de Iquitos entre los años 2003-2007. (Tesis de Título Profesional). Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 2009. <https://hdl.handle.net/20.500.12672/901>.
- Nascimento EJM, Bonaparte MI, Luo P, Vincent TS, Hu B, George JK, et al. Use of a blockade-of-binding ELISA and microneutralization assay to evaluate Zika virus serostatus in dengue-endemic areas. *Am J Trop Med Hyg*. 2019;101(3):708–15. doi: 10.4269/ajtmh.19-0270.
- Qiagen. RNeasy® Mini Handbook. (Fourth edition ed.). [no place]: QUIAGEN; June 2012. <http://www.bea.ki.se/documents/EN-RNeasy%20handbook.pdf>
- Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS. Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2005 Oct;43(10):4977-83. doi: 10.1128/JCM.43.10.4977-4983.2005.
- Álvarez Vera M, González Rodríguez A, Díaz Morejón D, Morier Díaz L, Tirado G, G M. Normalización de la técnica de neutralización por placas en las células Vero para los virus del dengue. *Rev Cubana Med Trop* [Internet]. 2010 Aug [cited 2016 Sep 8];62(2):138–137. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0375-07602010000200009&lng=es&nrm=iso&tln=g=es.
- Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK). Técnicas de laboratorio para el diagnóstico y la caracterización de los virus del dengue. La Habana, Cuba: Ministerio de Salud. 2013. https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2011/Protocolos_Dengue_IPK_2009_I.pdf
- Ramakrishnan MA, Dhanavelu M. Influence of Reed-Muench Median Dose Calculation Method in Virology in the Millennium. 2018;(December). 28(2):16-18. https://www.researchgate.net/publication/329774869_Influence_of_Reed-Muench_Median_Dose_Calculation_Method_in_Virology_in_the_Millennium.
- Medina, F., Medina, J.F., Colón, C., Vergne, E., Santiago, G.A. and Muñoz-Jordán, J.L. Dengue Virus: Isolation, Propagation, Quantification, and Storage. *Current Protocols in Microbiology*, (2012), 27: 15D.2.1-15D.2.24. doi:10.1002/9780471729259.mc15d02s27 Disponible en: <https://currentprotocols.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/9780471729259.mc15d02s27>.
- Escobar LM, Moraantes S, Cordero CP, Aristizabal F. Implementación de estrategias in vitro para evaluar la funcionalidad de un suero fetal bovino colombiano. *Rev Colomb Ciencias Químico-Farmacéuticas* [Internet]. 2011 Jul [cited 2017 Aug 2];40(2):201–21. Available from: <http://revistas.unal.edu.co/index.php/rccquifa/article/view/45583>.
- Lin, Y., Gu, Y., McCauley, J. W. Optimization of a Quantitative Micro-neutralization Assay. *J. Vis. Exp.* (118), e54897, doi:10.3791/54897 (2016).
- Epidemiología Molecular de Enfermedades Infecciosas. La instrumentación del laboratorio de cultivo celular. 2012. Disponible de: <https://epidemiologiamolecular.com/laboratorio-cultivo-celular/>.
- Li J, Hu D, Ding X, Chen Y, Pan Y, Qiu L, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay-format tissue culture infectious dose-50 test for titrating dengue virus. *PLoS One* [Internet]. 2011;6(7):e22553. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21799894>.

22. Côrtes Luzia M de C, Barth Ortrud M, Pantoja Josery R, Alves Carlos R. Comparative immunological recognition of proteins from New Guinea "C" dengue virus type 2 prototype and from a dengue virus type 2 strain isolated in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* [Internet]. 2003 Apr [cited 2020 May 27]; 98(3): 331-334. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762003000300007&lng=en. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000300007>.
23. Pitcher TJ, Gromowski GD, Beasley DWC, Barrett ADT. Conservation of the DENV-2 type-specific and DEN complex-reactive antigenic sites among DENV-2 genotypes. *Virology* [Internet]. Elsevier Inc.; 2012;422(2):386-92. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2011.10.020>.
24. Logan N, McMonagle E, Drew AA, Takahashi E, McDonald M, Baron MD, et al. Efficient generation of vesicular stomatitis virus (VSV)-pseudotypes bearing morbilliviral glycoproteins and their use in quantifying virus neutralising antibodies. *Vaccine* [Internet]. 2016 Feb;34(6):814-22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26706278>.
25. Putnak JR, de la Barrera R, Burgess T, Pardo J, Dessy F, Gheysen D, et al. Comparative evaluation of three assays for measurement of dengue virus neutralizing antibodies. *Am J Trop Med Hyg* [Internet]. 2008 Jul;79(1):115-22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18606774>.
26. Pujol, M. y Limón, E.. *Epidemiología general de las infecciones nosocomiales. Sistemas y programas de vigilancia*. 2013. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, pp. 108-113. ISSN 0213-005X. DOI 10.1016/j.eimc.2013.01.001.