



**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA  
Y CIENCIAS DE LA SALUD**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE  
TECNOLOGÍA MÉDICA  
ÁREA DE LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA  
PATOLÓGICA**

***“EVIDENCIA DE INFECCIÓN POR PHLEBOVIRUS EN  
PACIENTES CON SÍNDROME FEBRIL DE LAS CIUDADES  
DE IQUITOS, YURIMAGUAS Y PUERTO MALDONADO DEL  
AÑO 2010 AL 2012”.***

**KAREN EDITH LENGUA VILLAR**

**Lima – Perú**

**2015**



**FACULTAD DE MEDICINA HUMANA  
Y CIENCIAS DE LA SALUD**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE  
TECNOLOGÍA MÉDICA  
ÁREA DE LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA  
PATOLOGICA**

***“EVIDENCIA DE INFECCIÓN POR PHLEBOVIRUS EN  
PACIENTES CON SÍNDROME FEBRIL DE LAS CIUDADES  
DE IQUITOS, YURIMAGUAS Y PUERTO MALDONADO DEL  
AÑO 2010 AL 2012”.***

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE  
TECNOLOGO MEDICO CON MENCIÓN EN LABORATORIO  
CLINICO Y ANATOMIA PATOLOGICA.**

**KAREN EDITH LENGUA VILLAR**

**ASESOR:**

**MG. ROGER CASTILLO ORÉ**

**Lima, Perú**

**2015**

# HOJA DE APROBACION

KAREN EDITH LENGUA VILLAR

**“EVIDENCIA DE INFECCIÓN POR PHLEBOVIRUS EN  
PACIENTES CON SÍNDROME FEBRIL DE LAS CIUDADES  
DE IQUITOS, YURIMAGUAS Y PUERTO MALDONADO DEL  
AÑO 2010 AL 2012”.**

“Esta tesis fue evaluada y aprobada para la obtención del título de  
Licenciada en Tecnología Médica con mención en Laboratorio Clínico y  
Anatomía Patológica por la Universidad Alas Peruanas”

---

---

---

LIMA – PERÚ

2015

Se dedica este trabajo:

A mi Madre, por su constante esfuerzo por lograr enriquecerme de valores y virtudes así como su esmero por hacer de mí una mejor persona y profesional de la salud.

A mi hijo, que llego al mundo para darle sentido y felicidad a mi vida.

Se agradece por su contribución para el desarrollo de esta tesis a:

El Centro de Investigaciones de Medicina Tropical de la Marina de Guerra de los Estados Unidos NAMRU-6 y al cuerpo de profesionales que integran su institución por la asesoría y el apoyo constante para hacer posible el presente estudio.

## RESUMEN

Los *Phlebovirus* pertenecientes a la familia *Bunyaviridae*, son Arbovirus que en América, utilizan como vectores a los flebótomos del género *Luzomyia spp.* para infectar a los humanos causando la denominada fiebre del flebótomo cuyos síndromes clínicos van desde un breve cuadro febril hasta meningoencefalitis. Las regiones potenciales y de donde se ha logrado aislar a los diferentes virus del Género *Phlebovirus* corresponden a la selva Peruana (Cuzco y Madre de Dios).

El presente trabajo estandarizó la prueba inmunoenzimática Indirecta (ELISA) para detectar anticuerpos IgG e IgM contra los *Phlebovirus*: Candiru, Echarate, Maldonado y Punta Toro en sueros en etapa convaleciente y aguda con la finalidad de determinar la evidencia de anticuerpos en personas procedentes de las ciudades de Iquitos, Yurimaguas y Puerto Maldonado. La confirmación de los casos positivos se realizó mediante la prueba de neutralización por reducción de placas (PRNT).

Se analizaron en total 2026 sueros de pacientes (1917 de Iquitos, 585 Yurimaguas y 302 de Puerto Maldonado) por el ensayo de ELISA Indirecta IgG y MAC-ELISA IgM con la finalidad de detectar seroconversión y la presencia de anticuerpos que evidenciaran la presencia de los *Phlebovirus* en los años 2010 al 2012, se obtuvo una especificidad del 99.82% y una sensibilidad del 66.67%. Los ELISA desarrollados para los *Phlebovirus* son aplicables para realizar estudios de prevalencia. La prueba "Gold Standard" PRNT dio como resultado dos sueros humanos positivos, tanto en etapa aguda como convaleciente, lo que confirma la circulación de los *Phlebovirus*, Maldonado y Echarate en la amazonia peruana.

Palabras claves: *Phlebovirus*, *Luzomyia spp.*, Fiebre del Flebótomo, ELISA, PRNT.

## ABSTRACT

The *Phlebovirus* belonging to the Bunyaviridae family are Arbovirus that in America are used as vectors sandflies of the genus *Luzomyia spp.* to infect humans causing the called sandfly fever, with clinical syndromes ranging from a brief febrile illness still meningoencephalitis. Potential regions where it has been isolated different virus of the gender *Phlebovirus* correspond to the Peruvian jungle (Cuzco and Madre de Dios).

This study had standardized the indirect immune sorbent assay (ELISA) to detect IgG and IgM against the *Phlebovirus*: Candiru, Echarate, Maldonado and Punta Toro. Were analyzed acute and convalescent sera stages, in order to determine the evidence of antibodies in people from the cities Iquitos, Yurimaguas and Puerto Maldonado. Confirmation of positive cases was performed by testing plaque reduction neutralization (PRNT).

This study analyzed 2606 sera (1917 Iquitos, 585 Yurimaguas and 302 Puerto Maldonado) by the assay ELISA IgG and MAC-ELISA IgM in order to detect seroconversion and the presence of antibodies which would prove the presence of *Phlebovirus* between the years 2010 to 2012, a specificity of 99.82% and a sensitivity of 66.67% was obtained. The test "Gold Standard" PRNT resulted in two positive human sera in both acute and convalescent stage, confirming the circulation of *Phlebovirus* Maldonado and Echarate in the Peruvian Amazon.

Key words: *Phlebovirus*, *Luzomyia spp.*, sandfly fever, ELISA, PRNT.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA N°1: Fotografía electrónica y composición de los <i>Phlebovirus</i> .....	19
FIGURA N°2: Virus del complejo Candiru.....	21
FIGURA N°3: Esquema de componentes del MAC-ELISA.....	35
FIGURA N°4: Titulación del Antígeno Viral y HMAF.....	48
FIGURA N°5: Distribución de Pre-diluciones para <i>Phlebovirus</i> .....	61
FIGURA N°6: Distribución de muestras y controles en placas de ELISA.....	65
FIGURA N°7: Distribución de la placa control para PRNT.....	76
FIGURA N°8: Distribución de las muestras en las placas de PRNT.....	76
FIGURA N°9: Porcentaje de individuos por ciudad de procedencia.....	78
FIGURA N°10: Número de individuos por ciudad.....	78
FIGURA N°11: Total de positivos por ELISA.....	86
FIGURA N°12: Total de positivos por PRNT.....	87



## LISTA DE TABLAS

TABLA N°1: Resultados de la propagación de las semillas virales IgM.....	42
TABLA N°2: Resultados de la propagación viral de las semillas virales IgG.....	43
TABLA N°3: Resultados de la titulación de la semilla viral para PRNT.....	62
TABLA N°4: Calculo de la dilución de trabajo (W.D) para <i>Phlebovirus</i> .....	74
TABLA N°5: Dilución de las muestras positivas y dilución de trabajo (W.D).....	75
TABLA N°6: Total de positivos por ELISA-Indirecta IgG (Convalecientes).....	79
TABLA N°7: Total de positivos por ELISA-Indirecta IgG (Agudos).....	79
TABLA N°8: Resultados Confirmados por PRNT.....	80
TABLA N°9: Resultados con respecto a la detección de anticuerpos IgG.....	80
TABLA N°10: Resultados por MAC-ELISA.....	81
TABLA N°11: Distribución de la prevalencia por sexo.....	82
TABLA N°12: Distribución de la prevalencia por grupo etario por ELISA.....	83
TABLA N°13: Distribución de la prevalencia por grupo etario por PRNT.....	83
TABLA N°14: Resultados de la prevalencia por Sexo y Grupo etario.....	84
TABLA N°15: Resultados de la prevalencia de <i>Phlebovirus</i> por ciudad.....	85
TABLA N°16: Resultados de la prevalencia de <i>Phlebovirus</i> por Prueba.....	85
TABLA N°17: Análisis de sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA-.....	87
TABLA N°18: Cuadro de Correlación de anticuerpos IgM e IgG.....	81

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO N°1: Curva de aparición de anticuerpos.....	30
GRÁFICO N°2: Dilución de trabajo del antígeno viral y HMAF Candiru.....	49
GRÁFICO N°3: Dilución de trabajo del antígeno viral y HMAF Echarate.....	49
GRÁFICO N°4: Dilución de trabajo del antígeno viral y HMAF Maldonado.....	50
GRÁFICO N°5: Dilución de trabajo del antígeno viral y HMAF Punta Toro.....	50
GRÁFICO N°6: Dilución de trabajo del antígeno lisado Candiru.....	55
GRÁFICO N°7: Dilución de trabajo del antígeno lisado Echarate.....	55
GRÁFICO N°8: Dilución de trabajo del antígeno lisado Maldonado.....	56
GRÁFICO N°9: Dilución de trabajo del antígeno lisado Punta Toro.....	56
GRÁFICO N°10: Titulación del conjugado usado en MAC-ELISA.....	58
GRÁFICO N°11: Titulación del conjugado usado en ELISA Indirecta IgG.....	58
GRÁFICO N°12: Flujograma de trabajo.....	63

## LISTA DE ABREVIATURAS

- E-MEM: Eagle's minimal essential medium.
- SBF: Suero Bovino Fetal.
- ECP: Efecto Citopático.
- IFA: Inmunofluorescencia indirecta.
- "X" días: número de días en observación.
- BEI: Etilenimina binaria.
- H2Odd: Agua Bi-destilada.
- C.S.P: Cantidad suficiente para.
- Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Tiosulfato de sodio.
- IgM: Inmunoglobulina M.
- "X" antígeno: Antígeno específico preparado en cultivo celular Vero.
- Control de antígeno: Cultivo celular Vero, no infectada.
- HMAF: Fluido ascítico hiperinmune de ratón.
- HRP: Peroxidasa de rábano picante.
- ABTS: Sustrato peroxidasa 2,2' Azino-di (3-ethyl-benzthiazoline-6-sulfonate).
- ELISA: Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas.
- MAC-ELISA: (Del inglés "M" antibody capture enzyme-linked immune sorbent assay).
- Cut off: Valor de corte.
- PBS: Tampón Fosfato Salino.
- DO405: Densidad Óptica leída en espectrofotómetro a 405 nanómetros.
- BE H 22511: Código de la semilla viral Candiru usada para la propagación.
- OBS 6528: Código de la semilla viral Echarate usada para la propagación.
- FMD0077: Código de la semilla viral Maldonado usada para la propagación.
- R12931: Código de la semilla viral Punta Toro usada para la propagación.
- IQE3673: Muestra positiva para IgM Candiru en fase clínica aguda.
- FPI03673: Muestra positiva para IgM Echarate en fase clínica aguda.
- FPI03410: Muestra positiva para IgM Maldonado en fase clínica aguda.
- IQT1604: Muestra positiva para IgM Punta Toro en fase clínica aguda.

## INTRODUCCIÓN

Los Arbovirus, debido a su amplia distribución y a su naturaleza variable tanto ecológica como genética, tienen gran potencial para surgir a partir de nichos ecológicos previamente alterados, y producir enfermedades humanas y animales significativas. Estos virus aparecieron no como resultado de la mutación, sino más bien como consecuencia de cambios notables en los hábitos de vida y las prácticas de los seres humanos. El término Arbovirus que deriva del inglés arthropod-borne virus (virus transmitido por artrópodos), fue acuñado cuando se agruparon taxonómicamente a todos los virus transmitidos al ser humano (huésped accidental) por mosquitos, garrapatas, moscas y otros insectos artrópodos hematófagos.

El objetivo de la presente tesis es determinar la prevalencia de anticuerpos IgM e IgG contra *Phlebovirus* en pacientes con síndrome febril, para lo cual será necesario estandarizar las pruebas de ELISA y la confirmación de la evidencia serológica de infección y circulación de los *Phlebovirus* en las ciudades de Iquitos, Yurimaguas y Puerto Maldonado mediante la prueba de PRNT.

Durante el desarrollo del estudio, se tomarán medidas de bioseguridad de nivel 2 y se utilizarán técnicas de cultivo celular.

## INDICE

CARATULA.....	01
HOJA DE APROBACIÓN.....	02
DEDICATORIA.....	03
AGRADECIMIENTO.....	04
RESUMEN.....	05
ABSTRACT.....	06
LISTA DE FIGURAS.....	07
LISTA DE TABLAS.....	08
LISTA DE GRÁFICOS.....	09
LISTA DE ABREVIATURAS.....	10
INTRODUCCIÓN.....	11

### CAPITULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. Planteamiento del Problema.....	15
1.2. Formulación del Problema.....	15
1.2.1. Problema General.....	15
1.2.2. Problema Especifico.....	15
1.3. Objetivos.....	15
1.3.1. Objetivo General.....	15
1.3.2. Objetivo Especifico.....	15
1.4. Justificación.....	16

### CAPITULO II: MARCO TEÓRICO

2.2. Antecedentes.....	17
2.2.1. Generalidades.....	17
2.2.1.1. Bunyavirus.....	17
2.2.1.2. Sandfly Fever.....	18
2.2.1.3. Historia.....	18
2.2.1.4. Taxonomía.....	19
2.2.2. Genero <i>Phlebovirus</i> .....	20
2.2.2.1. Complejo serológico Candiru.....	20
2.2.2.2. Patología, patogenia y diagnóstico clínico.....	22
2.2.2.3. Diagnostico serológico de <i>Phlebovirus</i> .....	24
2.2.2.4. Ciclo de transmisión del <i>Phlebovirus</i> .....	24
2.2.2.5. Especies vectores.....	25
2.2.2.6. Reservorios.....	27
2.2.2.7. Profilaxis y control de la fiebre de Flebótomo.....	28
2.2.2.8. Importancia y factores de riesgo.....	28
2.2.2.9. Respuesta inmunitaria adaptativa.....	29

2.3.	Bases Teóricas.....	32
2.3.1.	Seroconversión.....	32
2.3.2.	Ensayo de ELISA.....	32
2.3.3.	Prueba de neutralización por reducción de placas.....	35

### **CAPITULO III: METODOLOGÍA**

3.1.	Diseño del Estudio.....	37
3.3.1.	Tipo de investigación.....	37
3.2.	Población.....	37
3.3.2.	Criterios de Inclusión.....	37
3.3.3.	Criterios de Exclusión.....	37
3.3.	Muestra.....	37
3.3.4.	Aislamiento de la semilla viral en suero humano.....	37
3.3.5.	Control positivo.....	38
3.3.6.	Controles negativo.....	39
3.4.	Operacionalización de Variables.....	39
3.5.	Procedimientos y Técnicas.....	40
3.5.1.	Métodos.....	40
3.5.1.1.	Propagación viral.....	40
3.5.1.2.	Inactivación viral con BEI (Binary ethyleneimine).....	44
3.5.1.3.	Preparación del antígeno viral IgM.....	44
3.5.1.4.	Titulación y estandarización del antígeno viral IgM.....	45
3.5.1.5.	Preparación de antígeno lisado IgG.....	51
3.5.1.6.	Titulación y estandarización del antígeno lisado IgG.....	52
3.5.1.7.	Conjugado.....	57
3.5.1.8.	Titulación de la semilla viral para la prueba de PRNT.....	59
3.5.2.	Procedimientos.....	63
3.5.2.1.	Obtención de la muestra.....	64
3.5.2.2.	Áreas de estudio.....	64
3.5.2.3.	Screening de las muestras por ensayo ELISA.....	64
3.5.2.4.	Detección de anticuerpos IgM por MAC-ELISA.....	66
3.5.2.5.	Detección de anticuerpos IgG por ELISA indirecta.....	68
3.5.2.6.	Valor de absorbancia.....	70
3.5.2.7.	Confirmación de las muestras por PRNT.....	71
3.6.	Plan de Análisis de Datos.....	77

### **CAPITULO IV: RESULTADOS ESTADÍSTICOS**

4.4.	Resultados.....	78
------	-----------------	----

4.4.1. Detección de anticuerpos IgG.....	79
4.4.2. Detección de anticuerpos IgM.....	81
4.4.3. Prevalencia por sexo.....	82
4.4.4. Prevalencia por grupo etario.....	82
4.4.5. Prevalencia por sexo y grupo etario.....	84
4.4.6. Prevalencia por <i>Phlebovirus</i> .....	84
4.5. Discusiones de resultados.....	89
4.6. Conclusiones.....	92
4.7. Recomendaciones.....	93
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>94</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>100</b>

## **CAPITULO I: PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

### **1.1. Planteamiento del Problema**

En América del sur existen diversas especies de Arbovirus circulando en la selva amazónica. Los síndromes clínicos causados varían desde fiebres agudas indiferenciadas hasta casos más graves que pueden complicarse con hemorragias, encefalitis, hepatitis o nefritis, según el virus infectante. Entre los principales Arbovirus circulantes tenemos miembros de las familias *Flaviviridae*: Dengue, Fiebre Amarilla, Ilheus; *Togaviridae*: Encefalitis Equina Venezolana, Mayaro y *Bunyaviridae*: Oropouche, Grupo C y el grupo *Phlebotomus fever*.

En el Perú se han logrado aislar Bunyavirus del género *Phlebovirus* específicamente el complejo Candiru, virus denominados como Echarate (aislado en Cuzco en el año 1998) y Maldonado (aislado en Puerto Maldonado en el año 2004). Estas evidencias generan la necesidad de evaluar el riesgo presente en la población.

### **1.2. Formulación del Problema**

#### 1.2.1. Problema General

Cuál es la prevalencia de anticuerpos inmunoglobulina M o inmunoglobulina G contra los *Phlebovirus* en pacientes con síndrome febril.

#### 1.2.2. Problema Especifico

Cuáles son las ciudades con evidencia de infección por *Phlebovirus*, grupo etario y sexo afectado.

Presencia de nueva evidencia de anticuerpos inmunoglobulina M o inmunoglobulina G contra el virus Punta Toro y Candiru, no aislados anteriormente en el Perú.

### **1.3. Objetivos**

#### 1.3.1. Objetivo general

Determinar la evidencia de anticuerpos inmunoglobulina M e inmunoglobulina G contra *Phlebovirus* en pacientes con síndrome febril.

#### 1.3.2. Objetivo específico.



Identificar las ciudades y/o departamentos donde circularon o circulan los virus de complejo Candiru y Punta Toro.

#### **1.4. Justificación.**

La finalidad de la investigación es conocer el porcentaje de pacientes con presencia de anticuerpos inmunoglobulina M e inmunoglobulina G en las ciudades de Iquitos, Yurimaguas y Puerto Maldonado y así confirmar la existencia de riesgo presente y la circulación viral en la población de la selva Peruana, formar parte de la base de datos del centro de investigaciones NAMRU-6, contribuir con la publicación de los resultados adquiridos e impulsar el estudio posterior de temas relacionados y así disminuir el impacto en salud pública.

## CAPITULO II: MARCO TEÓRICO

### 2.2. Antecedentes

#### 2.2.1. Generalidades

##### 2.2.1.1. Bunyavirus.

La familia *Bunyaviridae* integrada por cinco géneros (*Orthobunyavirus*, *Phlebovirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus* y *Tospovirus*), está constituida por más de 350 virus con características estructurales similares. Incluye agentes que causan patología en el hombre y los animales aunque en su mayoría no son patógenos (1,2).

Los virus pertenecientes a la familia *Bunyaviridae* se caracterizan por su genoma ARN de cadena simple segmentado en tres partes, la parte larga (L) codifica para la proteína larga, la cual es ARN polimerasa viral, la parte media (M) codifica para dos glicoproteínas (G1 y G2) y la parte pequeña (S) codifica para una proteína de Nucleocápside y N (la parte más inmunogénica) y la proteína no estructural (NSs) en algunos géneros entre ellos *Phlebovirus* y *Tospovirus* (3,4).

Generalmente, no se produce la transmisión entre humanos y se mantienen en la naturaleza en un ciclo entre animales salvajes y artrópodos hematófagos, los cuales quedan infectados de por vida. La infección en el huésped vertebrado, generalmente, es aguda con una viremia corta (5).

La forma de transmisión de diferentes géneros de Bunyavirus es diversa, sin embargo son semejantes dentro de cada uno de ellos. Miembros del género *Bunyavirus*, *Phlebovirus* y *Nairovirus* son transmitidos por artrópodos y se mantienen en un ciclo vector-vertebrado; el género *Tospovirus* también son transmitidos por artrópodos, pero mantienen un ciclo vector-planta; pero el género *Hantavirus* es mantenido exclusivamente en un ciclo animal-animal (6).

Los Arbovirus están implicados en enfermedades virales emergentes y re-emergentes debido a cambios en los patrones eco-epidemiológicos o fallas en los programas de control (ejemplo: América, con el Dengue y Fiebre Amarilla).

Dentro de la familia *Bunyaviridae* se encuentra el generó *Phlebovirus*, subdividido en dos grupos antigénicos: Sandlyfever (Fiebre de flebotómos) y el grupo Uukuniemi. (7). La principal diferencia entre ambos grupos son los agentes vectores comprobados, en el primer caso son mosquitos y flebotómos mientras que el segundo son virus transmitidos por garrapatas (3).

#### 2.2.1.2. Sandfly fever (fiebre de flebotómos).

Son enfermedades febriles agudas indiferenciadas y auto limitadas causadas por virus *Phlebovirus* y cuyos vectores potenciales o incriminados son flebotómos del viejo mundo (*Phlebotomus spp.*) o del nuevo Mundo (*Lutzomyia spp*), dípteros pertenecientes a la familia *Psychodidae*, subfamilia *Phlebotominae* (3,6).

#### 2.2.1.3. Historia.

La enfermedad denominada fiebre del flebotómo fue inicialmente descrita en 1909 en Australia. Posteriormente, durante la II Guerra Mundial, la fiebre de flebotómo constituyo un serio problema de salud pública para las fuerzas militares en India, Paquistán, Palestina, las tropas Británicas, Americanas, Alemanas, del norte de Arica y el Mediterráneo.

Investigaciones virológicas llevadas a cabo en Armenia, Moldavia, Turkmenia y Uzbekistán establecieron líneas locales de *Phlebovirus* y su rol como agente etiológico del cuadro febril, los brotes de fiebre del flebotómo ocurrieron repetidamente en la Unión Soviética durante el periodo de 1945-1950 (8,9).

Es a partir de un estudio epidemiológico iniciado en el año 1976 en Irán que se incrimino a *Phlebotomus papatasi* como el vector natural, los cual fue confirmado más tarde. Adicionalmente, se observó prevalencia en humanos y gerbos para varios aislados del virus ya conocido, completando así las primeras observaciones del posible ciclo epidemiológico del virus.

Los estudios en el viejo mundo condujeron a un numero de aislados virales diferentes, provenientes de flebotómos y que aumentaban al intensificarse dichas

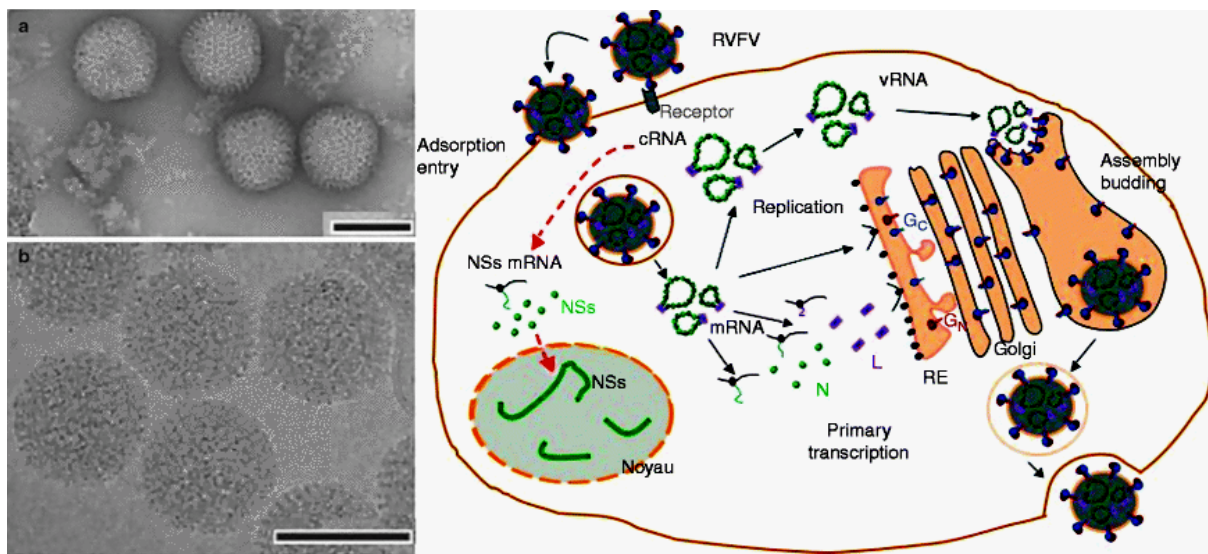
investigaciones, alcanzando 37 serotipos aceptados para el año 1986. Para entonces, siete de los virus descritos habían sido asociados a enfermedades humanas y ya se incluían los virus aislados en la región Americana con vectores presumibles pertenecientes al género *Lutzomyia* (3).

#### 2.2.1.4. Taxonomía.

En la actualidad, el género *Phlebovirus* está compuesto de aproximadamente 70 virus, clasificados en función a la relación serológica en dos grupos: el grupo Phlebotomus o fiebre del flebótomo y el grupo *Uukuniemi*. El género *Phlebovirus* no se relacionan antigénicamente con virus de otros géneros, pero muestran diferentes grados de reacciones cruzadas entre ellos. La falta de estudios bioquímicos y genéticos, es la causa de que a la actualidad la taxonomía de los *Phlebovirus* siga siendo en base a su relación antigénica, constando de 9 complejos o especies.

El estudio reciente dado en el 2011 por la sociedad Americana de Microbiología presente una detallada descripción de los *Phlebovirus* y sus complejos en base a su secuenciación genética.

**FIGURA N°1:** Fotografía electrónica y composición de los Phlebovirus. A) Microscopia electrónica de viriones purificados teñidos con acetato de Uranilo. B) Esquema representativo de células infectadas por *Phlebovirus* (45).



### **2.2.2. Género *Phlebovirus*.**

#### 2.2.2.1. Complejo serológico Candiru.

Contiene 13 virus de importancia médica, cuenta con tres segmentos de ARN, el segmento largo (L) el segmento (M) que codifica para el ARN polimerasa, el segmento que codifica para las proteínas estructurales (NSm) las glicoproteínas GN y GC, el segmento pequeño (S) el cual codifica para las proteínas de la Nucleocápside (NP). (1)

Los análisis filogenéticos de los segmentos (L) (M) y (S) comprobaron que los miembros pertenecientes al serocomplejo Candiru eran similares a los informes anteriores (1, 4, 10, 11).

**FIGURA N°2.** Virus del complejo Candiru, abreviatura, filtros y/o código asignado por virus, año de aislamiento, fuente de aislamiento y ubicación geográfica (1).

<b>Virus</b>	<b>Abrev.</b>	<b>Filtro</b>	<b>Año de aislamiento</b>	<b>Fuente de aislamiento</b>	<b>Ubicación geográfica</b>
Candiru	CDUV	BeH 22511	1960	Humano	Highway Pará, Brasil
Alenquer	ALEV	BeH 301101	1976	Humano	Alenquer, Pará, Brasil
Itaituba	ITAV	BeAn 213452	1971	<i>Didelphis marsupialis</i>	Itaituba , Pará, Brasil
Jacunda	JCNV	BeAn 428329	1984	<i>Myoprocta acouchy</i>	Tucuruí, Pará, Brasil
Nique	NIQV	Nique 96	1972	<i>Lutzomyia panamensis</i>	Nique, Darien, Panamá
Oriximina	ORXV	BeAr 385309	1980	<i>Lutzomyia spp.</i>	Oriximina, Pará, Brasil
Turuna	TUAX	BeAr 352492	1978	<i>Lutzomyia spp.</i>	Oriximina, Pará, Brasil
Echarate	ESCV	OBS 6528	1998	Human	Cusco, Perú
Mucura	MCRV	BeAr 455230	1985	<i>Anopheles triannulatus</i>	Tucuruí, Pará, Brasil
Serra Norte	SRNV	BeH 505240	1991	Human	Carajas, Pará, Brasil
Morumbi	MRMBV	BeH 475236	1988	Human	Tucuruí, Pará, Brasil
Ariquemes	ARQV	BeAr 485678	1988/1989	<i>Lutzomyia spp.</i>	Ariquemes, Rondonia, Brasil
Maldonado	MLOV	FMD 77	2004	Human	Puerto Maldonado, Madre de Dios, Perú

Siete virus fueron adicionados como parte del complejo Candiru: Ariqueles, Echarate, Jacunda, Morumbi, Mucura, y Serra Norte, dando como resultado 13 virus, Así mismo el complejo Candiru fue subdividido en tres clados, A, B y C. Basados en la similitud en sus segmentos (L) (M) (N) y (NS) (1, 11, 12).

La **FIGURA N°2** da a conocer el aislamiento en muestras humanas de los virus Echarate y Maldonado en las ciudades de Cuzco y Puerto Maldonado en los años 1998 y 2004 respectivamente, dichos aislamientos generan la necesidad de realizar investigaciones a nivel de las regiones propensas a la circulación de los *Phlebovirus* en mención. Cabe mencionar que el estudio realizado por Cruz Malpica et al., 2001 aisló muestras en humanos en la ciudad de Iquitos (6).

El más importante *Phlebovirus* a estudiar en América es el virus Punta Toro, el cual fue aislado por primera vez en Pensilvania en 1966 y repentinamente en Panamá y Colombia, produce cuadros febriles en el hombre, a excepción del virus Rift Valley Fever que puede ser fatal (13,14).

#### 2.2.2.2. Patología, patogenia y diagnóstico clínico de *Phlebovirus*.

El virus luego de penetrar la piel, se deposita directamente en la linfa o sangre, produciendo una diseminación precoz y una posterior multiplicación en células del endotelio vascular, células retículo endoteliales de nódulos linfáticos, fibroblastos y células de Langerhans, para luego, una vez ocurrida la replicación, reintroducirse a través de la linfa en el torrente circulatorio y alcanzar los órganos objetivos.

Se inicia una fase de viremia que en el caso de *Phlebovirus* varía de entre 2 y 3 días, presentándose un bajo título viral en humanos.

El periodo puede ser asintomático, transcurrir como un cuadro gripal con fiebre y malestar general (20% de los infectados) o modificarse a un cuadro más agresivo debido a la afectación del sistema nervioso central.

Si el virus alcanza el sistema nervioso central lo hace a través del endotelio vascular, por transferencia pasiva, por replicación en las células endoteliales o por transporte axonal a través de las neuronas olfativas. Una vez dentro del organismo, los

*Phlebovirus* presentan diferentes grados de patogenicidad, la mayoría de los serotipos ocasionan la conocida fiebre de flebótomo pero virus como el Toscana puede producir un efecto sobre el sistema neurológico en humanos.

Los síntomas más comunes reportados, han sido dolor de cabeza, mialgia, anorexia, dolor en la parte baja de la espalda, siendo los menos comunes: dolor retro-orbital, fotofobia, escalofríos, náuseas, vómitos y vértigo.

Dentro de los signos presentados se encuentran secreciones conjuntivales, congestión palatal, picazón macular, urticaria petequiales, herpes labial, crepitantes finas y tos.

El virus Toscana (TOSV) presenta un caso poco común, ya que la infección por TOSV se manifiesta ocasionalmente provocando cuadros neurológicos, principalmente meningitis, aséptica y escasamente se dan casos de encefalitis o meningoencefalitis. Además de los síntomas clásicos de la fiebre de flebótomos, estos pacientes exhiben rigidez en la nuca, signo de Kerning positivo, la percepción sensorial nublada y temblor. En pacientes con sistema nervioso comprometido se observa pleocitosis, y un elevado contenido de proteínas en el fluido cerebroespinal.

Las manifestaciones clínicas plasmadas en los exámenes hematológicos demuestran una marcada leucopenia con una cuenta media de leucocitos por debajo de 4000 por  $\text{mm}^3$  para el día cinco, esta disminución en los glóbulos blancos comienza durante el periodo de incubación. La leucopenia persiste más allá del periodo febril y se encuentra todavía presente para el octavo día. La cantidad de neutrófilos totales decrece y ocurre un aumento de linfocitos.

La inmunidad causada por la infección viral por *Phlebovirus* implica que los niveles de anticuerpos neutralizantes desarrollados, confiere inmunidad al tipo de virus homólogo y que la falla de la mayoría de estos sueros para neutralizar otros agentes del grupo *Phlebovirus* sugiere que la inmunidad es de tipo específico, aunque existe evidencia de sueros que demostraron actividad neutralizante en contra de otros tipos heterólogos de fiebre de flebótomos (Naples, Arumowot, Karimabad, y Salehabad) inoculados por el virus de Sicilia.



Se han reportado segundos ataques desde 2 a 12 semanas luego del primero en un 15% de los casos dentro de un área de alta inefectividad, un estudio concluyó que una sola infección otorga protección de uno a tres meses y que aproximadamente 20% de los pacientes puede ser re-infectados con la misma epidemia.

#### 2.2.2.3. Diagnóstico serológico de *Phlebovirus*.

Los factores a tener en cuenta para un correcto diagnóstico son de suma importancia:

- La termolabilidad, a mayor tiempo de exposición a temperaturas elevadas por encima de 0° C, hace que la infectividad disminuya (15).
- pH, las condiciones del medio deben fluctuar de entre 4.0 – 10.0, donde se ha demostrado que esencialmente todos los virus se mantuvieron infecciosos luego de 3 horas de incubación a 20° C (15).

Una infección por *Phlebovirus* puede ser detectada por:

- Anticuerpos específicos, por ejemplo anti-CDUV IgM o IgG (ELISA)
- Ensayo de Inmunofluorescencia directa o Indirecta (IFA)
- Fijación del complemento (CF)
- Ensayo de Inhibición - Hemaglutinación (HI)
- Prueba de neutralización por reducción de placa (PRNT)

De estar 5 pruebas usadas, se concluyó que PRNT es la más específica. Idealmente los métodos serológicos se consideran complementarios al diagnóstico directo por cultivos y/o biología molecular.

#### 2.2.2.4. Ciclo de transmisión del *Phlebovirus*.

Debido a la biología del vector, las hembras son las únicas hematófagas, y si se asume el ciclo biológico convencional de los Arbovirus, donde se ve envuelto un reservorio, entonces el aislamiento en machos sugiere una transmisión de parte de las hembras, bien sea transovárica o inclusive sexual.

En vista al limitado rango de vuelo y su relativamente corta vida en adultos, los géneros implicados (*Phlebotomus* y *Lutzomyia*) necesitarían de la transmisión vertical para la supervivencia de los virus, pero aun así es necesaria la presencia de un hospedador vertebrado que amplifique el virus pues solo la transmisión transovárica y la sexual no son suficientes para mantener el virus en circulación. La cantidad de sangre ingerida por *Phlebotomus papatasi* es aprox. 0.0003-0.0005mL de sangre por ingesta, lo cual en teoría significa que un huésped virémico requiere un nivel de virus en sangre al menos de 10<sup>4</sup> unidades formadoras de cepas infecciosas por milímetro para infectar un flebótomo que se alimenta ingiriendo sangre (16,17).

#### 2.2.2.5. Especies vectores.

El vector es sumamente importante por esta relación de especificidad entre el virus y los artrópodos ya que la aparición del virus se encuentra restringida a la presencia del vector y por tanto a sus características de vida las cuales afectan la epidemiología del virus.

De los 39 serotipos reconocidos para 1988, 25 habían sido aislados en el Nuevo Mundo, siendo éste un posible reflejo de la diversidad de flebotominos de América ya que aproximadamente 360 especies diferentes de *Lutzomyia spp* han sido descritas para América, mientras que unas 119 de *Phlebotomus spp* habrían sido reportadas para el Viejo Mundo (18).

Es importante resaltar que de acuerdo a la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1967) (20), para el reconocimiento de un artrópodo como vector de un virus se debe cumplir con:

- Aislamiento de virus de especies colectadas en campo.
- Demostración de habilidades del artrópodo para infectarse por medio de alimentación sobre un hospedador vertebrado virémico o una suspensión artificial de virus.
- Demostración de habilidades del insecto de transmitir biológicamente por picada.

- Acumulación de evidencias de campo confirmando la asociación del artrópodo con el vertebrado en el cual se sospecha que la infección está ocurriendo.

Estas condiciones no se han cumplido en su mayoría debido a restricciones de manejo y mantenimiento de los vectores, por lo cual se ha asumido una relación al cumplirse solo dos o tres de las condiciones.

Los vectores repetidamente incriminados son los flebotomos, invertebrados con más de 800 especies conocidas pertenecientes al *Phylum Arthropoda*, Clase Insecto, Orden Díptera, Familia *Psychodidae*, Géneros *Phlebotomus* y *Lutzomyia*. Estos insectos terrestres tienen un ciclo de vida holometábolo que comienza como huevos, seguido de cuatro estadios larvales terrestres para dar origen a una pupa y por último, la emergencia del adulto. Este ciclo completo toma entre 5-10 semanas dependiendo en gran medida de la especie y la temperatura ambiental. Las larvas se desarrollan alimentándose de materia orgánica en descomposición como hojas muertas y fragmentos de insectos (17).

Se ubican en microhábitats húmedos, sombreados y cálidos como estiércol, madrigueras de animales, cuevas y grietas en rocas. Los flebotominos suelen ser de actividad nocturna y sólo las hembras ingieren sangre, mostrando variación considerable en la preferencia de sus hospedadores. Algunos se alimentan, principalmente, de animales de sangre fría mientras otros se alimentan de mamíferos y/o aves. Ambos sexos de *Lutzomyia* toman azúcares en su dieta alimenticia para la supervivencia, vuelo y reproducción, aun así además de los azúcares, las hembras necesitan de sangre para iniciar el desarrollo ovárico. Las moscas flebotominas habitan diversos biotopos que van desde áreas desérticas hasta los bosques lluviosos tropicales de Sur América. Para sobrevivir en zonas templadas o durante períodos de clima adverso como sequías prolongadas en el trópico húmedo o clima frío, algunas especies diapausan como larva de cuarto, hasta que emergen como adultos una vez que las condiciones óptimas han sido re-establecidas.

Existe una marcada diferencia entre las especies del Viejo Mundo y las del Nuevo Mundo respecto a sus hábitos, los cuales afectan la incidencia de la fiebre de flebotomos. Algunos de los virus comúnmente asociados a humanos en el Viejo Mundo son transmitidos por *Phlebotomus papatasi*, *P. perniciosus*, *P. major* y *P. perfiliewi*. Estas especies de flebotomos son peridomésticas en sus hábitos de crianza, fácilmente entran a las casa para alimentarse y son altamente antropofílicas. En el Nuevo Mundo las especies *Lutzomyia. trapidoi*, *L. ylephiletor*, *L. flaviscutellata*, *L. umbratilis*, *L. panamensis*, *L. sanguinaria* han sido reportadas como vectores de *Phlebovirus*. En contraste, la prevalencia de la infección humana en la mayor parte del llamado Nuevo Mundo es baja, probablemente debido al hecho de que la mayoría de las especies neotropicales son selváticas.

#### 2.2.2.6. Reservorios.

Actualmente, es aceptado que debe existir la figura del vertebrado reservorio del virus dentro del ciclo de los *Phlebovirus*, sin embargo, no se encuentran afirmaciones respecto a la identidad del reservorio, sólo se hallan diferentes especies de vertebrados casi en su totalidad roedores, donde se han conseguido anticuerpos contra *Phlebovirus*. La evidencia de circulación de anticuerpos en roedores capturados en la naturaleza sugiere que éstos albergan el virus. En una revisión sero-epidemiológica realizada en Paquistán se encontraron anticuerpos contra Flebovirus (Sicilian, Naples, Karimabad y Salehabad) en nueve especies diferentes de roedores, vacas, búfalos, ovejas y cabras. Tanto en Brasil (21), como en Trinidad, el virus *Pacui* fue obtenido de pequeños roedores, así como de *L. flaviscutellata*, capturada en los bosques de Brasil. Fueron recuperadas siete cepas del virus *Urucuri*, todas ellas provenientes de ratas espinosas del género *Proechimys*, obteniendo, una mayor prevalencia en roedores (18).

Estos resultados serológicos ya son un indicio del papel que juegan los roedores en la ecología del agente infeccioso. De los animales examinados durante un estudio epidemiológico en Irán en 1977, los gerbos (*Rhombomys optimus*) y las ovejas fueron los únicos en los que se encontró evidencia de infección por *Phlebovirus* (46).

Por otro lado, se ha comprobado que *Didelphis opossum* luego de ser inoculado presenta una viremia. El virus es detectado los primeros cuatro días post inoculación, con el mayor título presentado de las viremias siendo 105 PFU/mL. Este hecho implica que los títulos requeridos para que los flebótomos adquieran el virus dada la cantidad de su ingesta sanguínea, son posibles de obtener, al menos experimentalmente. Existe la posible participación de otro animal, el murciélago de la especie *Pipistrellus kuhli* ya que se realizó el aislamiento de TOSV del cerebro de un ejemplar, aunque no hay evidencia adicional (21,22).

#### 2.2.2.7. Profilaxis y control de la fiebre de Flebótomo.

El control general utilizado para Arbovirosis consiste en imposibilitar la cría del vector modificando (ejemplo: uso de larvicida) o erradicando los sitios de crías del mismo, así como la eliminación del adulto (OPS, 2001) (23,24).

Sin embargo, los sitios de crías de flebótomos son poco conocidos por lo que se prefiere el uso de insecticidas intradomiciliarios.

La prevención se basa en la utilización de medidas que minimicen el riesgo de exposición a posibles vectores en zonas de riesgo, entre ellas, las más adecuadas son el uso de repelentes de mosquitos y ropas adecuadas que cubran la mayor superficie corporal posible, evitar salidas al exterior en las horas de la tarde, utilizar mosquiteros para dormir y telas metálicas en puertas y ventanas.

El único tratamiento hasta ahora reportado son analgésicos para los fuertes dolores de cabeza que presentan algunos de los individuos infectados a causa de la encefalitis (25,26).

#### 2.2.2.8. Importancia y factores de riesgo.

La importancia del estudio del género *Phlebovirus* reside en el incremento de Arbovirosis que se creían controladas durante las últimas décadas, así como la aparición de distintas cepas virales en áreas geográficas antes no reportadas. Factores como:

- La incursión humana.

- Perturbación en ecosistemas terrestres.
- La movilidad de la población sin control sanitario.
- Cambios climáticos.

Los cuales han favorecido la aparición de enfermedades Arbovirales originadas por *Phlebovirus*, considerando la modificación del hábitat natural, la ecología de los vectores y la eco-epidemiología de la enfermedad que, en el caso de América, consiste básicamente en la deforestación y cambio de uso de la tierra de ambientes terrestres-boscosos.

Existen a su vez, factores que afectan a los artrópodos y por ende en la transmisión de un agente patógeno:

- La capacidad del virus para travesar el intestino del artrópodo y replicarse en las glándulas salivales, para después infectar al vertebrado.
- El tamaño de la población de artrópodos
- Los hábitos de picadura (diurnos, nocturnos) y el alcance de vuelo del vector
- La distribución geográfica y ecológica de cada especie de vector.
- Condiciones climáticas como: temperatura, humedad y lluvias (3,6).

#### 2.2.2.9. Respuesta inmunitaria adaptativa frente a virus (IgG e IgM).

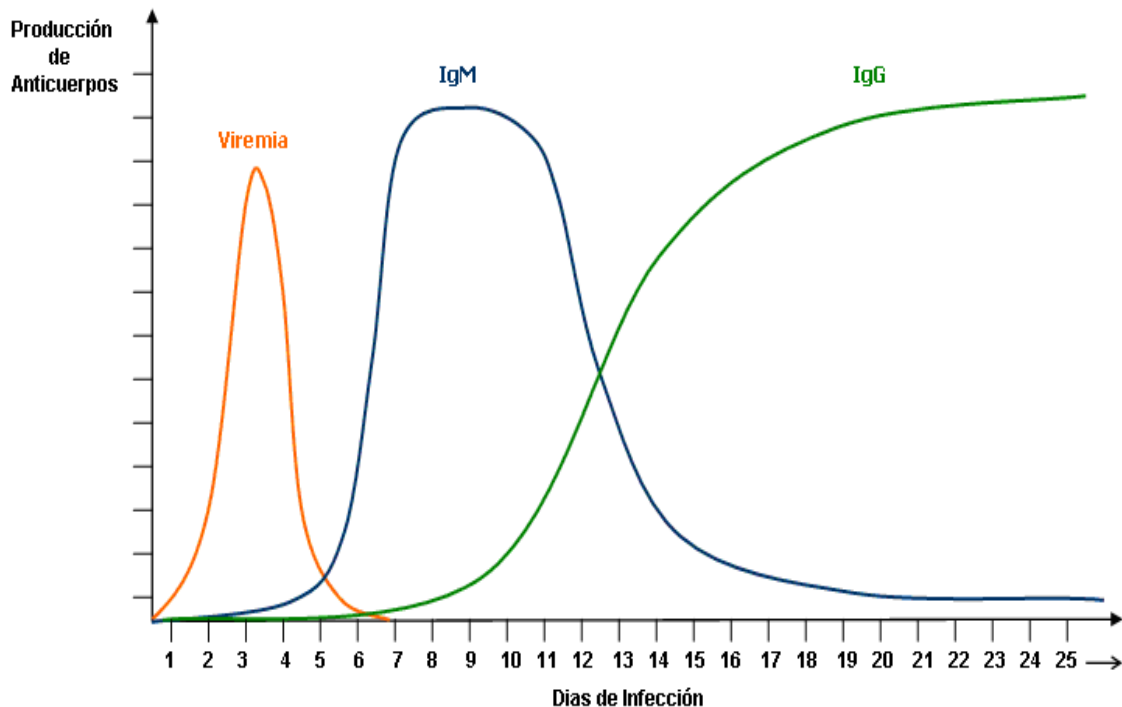
La inmunidad adaptativa frente a infecciones virales depende de los anticuerpos que bloquean la unión del virus a la célula huésped y su entrada en ella; y de los linfocitos T citotóxicos, que combaten la infección mediante la destrucción de las células infectadas. Los anticuerpos antivíricos actúan fundamentalmente como neutralizantes para evitar la fijación del virus y su penetración en las células huésped. Estos anticuerpos neutralizantes se unen a los antígenos de la envoltura o cápside del virus.

Dependiendo del virus y del hospedero, las manifestaciones clínicas varían; sin embargo, la respuesta inmune humana a los virus suele seguir un mismo patrón por lo tanto, se pueden hacer algunas generalizaciones. Cuando el virus ingresa al organismo de un hospedero inmunitariamente competente es detectado y se genera

una respuesta inmune, dentro de ésta se puede encontrar la respuesta mediada por células y la mediada por anticuerpos. El virus interactúa con las células susceptibles e ingresa al citoplasma, donde comienza a replicarse en asociación estrecha con el aparato de Golgi (27,28).

El hospedero vertebrado sintetiza anticuerpos como respuesta a la exposición de un antígeno viral. La primera respuesta del organismo es la fase de viremia o fase febril, donde se presentan los síntomas de la infección es gracias a la cual se desencadena una respuesta inmune. La fiebre suele ser alta ( $>38^{\circ}\text{C}$ ) y se mantiene por breves días. La viremia se va extinguiendo a partir del primer momento en el que los anticuerpos comienzan a alcanzar concentraciones detectables en sangre. La primera respuesta es predominantemente por anticuerpos de tipo IgM. El anticuerpo IgM puede ser detectado principalmente en suero por una prueba de captura de anticuerpos ligada a enzimas llamada Mac-ELISA (del inglés "M" antibody capture enzyme-linked-immunosorbent-assay), generalmente dentro de la primera semana posterior a la fase de viremia. **GRÁFICO N°1.**

**GRÁFICO N°1.** Curva de aparición de anticuerpos (29).



La producción del anticuerpo IgM aumenta dentro de las dos primeras semanas de infección. En algunos casos, dependiendo del virus y del hospedero esto puede durar de 30 a 120 días en la mayoría de las personas o de por vida en otras personas; sin embargo, estos casos son aislados y los anticuerpos se encuentran en concentraciones muy bajas (30, 31, 32).

La segunda respuesta humoral de importancia es la que se da mediante anticuerpos IgG. Este tipo de anticuerpos son más específicos en cuanto al antígeno a detectar. Esta respuesta es posterior a la ocurrida por anticuerpos IgM, siendo detectados alrededor de la segunda semana de inicio de la enfermedad y alcanzando un pico en sueros a las 4 ó 6 semanas. Otra característica importante de los anticuerpos IgG es su larga vida media, en algunos casos es capaz de permanecer en sangre por tiempo indefinido. Es por eso, que la detección de anticuerpo IgG de un virus en particular puede ser interpretado como indicador de que la infección con ese o un virus cercanamente relacionado ha ocurrido en algún momento en el pasado. Ya sea que éste intervalo sea de una semana o 20 años, esto no puede ser determinado mediante pruebas de anticuerpos IgG con una muestra única; es necesario probar muestras pareadas de suero de fase aguda y convaleciente para asegurar el agente etiológico de la infección. Encontrar anticuerpo de tipo IgG de un virus en particular en una muestra única de suero no tiene el valor serodiagnóstico, caso contrario es encontrar anticuerpo de tipo IgM bajo las mismas condiciones. Es un hecho, que encontrar anticuerpo de tipo IgM para un virus en particular es más relevante para la enfermedad del paciente que cualquier otro hallazgo en otra prueba serodiagnóstica. Sin embargo la respuesta por anticuerpos IgG se desencadena mucho más rápido en una respuesta secundaria que en la infección primaria, entre 2 a 3 días después de la aparición de los síntomas, además de darse con más potencia que en la infección primaria con títulos muy altos de anticuerpos en sangre.

Los hospederos vertebrados sintetizan anticuerpos policlonales frente a las partículas virales y debido a que los virus dentro de un serogrupo dado pueden compartir muchos epítopes, una prueba puede ser ampliamente reactiva ante un serogrupo dado (útiles para vigilancias serológicas y en situaciones epidémicas)



mientras que otras pueden ser relativamente específicas al tipo de virus. La prueba de neutralización por reducción de placas es bastante específica. De hecho, se usa a veces para distinguir entre infecciones causadas por virus relacionados muy cercanamente (28, 30, 32).

## **2.3. Bases Teóricas**

### 2.3.1. Seroconversión.

Se define como la aparición o el aumento de 4 o más veces el título de anticuerpos entre dos muestras serológicas pareadas; una en etapa aguda y la otra en etapa de convalecencia (30, 33, 34).

La demostración de conversión serológica utiliza un método retrospectivo, los resultados se obtienen usualmente cuando el paciente ya se ha curado, por esta razón solo se utiliza para la confirmación de casos clínicos o para estudios epidemiológicos.

El periodo de seroconversión es el tiempo durante el cual una persona que tiene una infección causa por un agente etiológico, pasa de una respuesta negativa a una positiva por inmunoensayo (30, 33, 34).

Este periodo ocurre antes que el sistema inmunitario produzca la cantidad suficiente de anticuerpos para ser detectada como positiva. Mediante la titulación de un suero positivo, la cual es la dilución máxima a la cual esta muestra puede generar un resultado positivo se podrá obtener información acerca de una posible seroconversión así como una medida cuantitativa de la presencia de anticuerpos en un suero (29).

### 2.3.2. Ensayo de ELISA

La unión covalente de las enzimas a los anticuerpos da lugar a una herramienta inmunológica que posee a la vez una alta especificidad y sensibilidad. La técnica denominada ELISA (del inglés enzyme-linked-immuno-sorbent-assay) utiliza anticuerpos que se unen covalentemente a las enzimas; de este modo se conservan las propiedades catalíticas de las enzimas y la especificidad de los anticuerpos. Las

enzimas de unión típicas utilizadas incluyen peroxidasas, fosfatasa alcalina y  $\beta$ -galactosidasa, que catalizan reacciones cuyos productos son coloreados y pueden medirse en cantidades muy pequeñas (35).

La técnica ELISA se basa en la detección de un antígeno y/o anticuerpo inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción cuyo producto, por ejemplo un colorante, puede ser medido espectrofotométricamente. Este principio tiene muchas de las propiedades de un inmunoensayo ideal: es versátil, robusto, simple en su realización, emplea reactivos económicos y consigue, mediante el uso de la fase sólida, de una separación fácil entre la fracción retenida y la fracción libre. En los últimos años se han desarrollado numerosos métodos de ELISA tanto para la detección de antígenos virales como de anticuerpos específicos. Debido a su rapidez, sensibilidad y especificidad el inmunoanálisis enzimático tipo ELISA se ha convertido en una de las pruebas serológicas más empleadas en diagnóstico, puesto que permite detectar e identificar simultáneamente al virus o al anticuerpo en una misma prueba. Estas características hacen que el uso de ELISA sea ventajoso presentando mayor sensibilidad en comparación con otros inmunoensayos como Inhibición de la Hemaglutinación (HI) y Fijación de Complemento (CF); y similar a la del Radioinmunoensayo (RIA) e Inmunofluorescencia (para virus respiratorios) (35, 36, 37).

Se han desarrollado múltiples variantes de ensayos ELISA que permiten desde la cuantificación de un antígeno en solución, la detección de un anticuerpo en una solución (clonación de anticuerpos monoclonales), o la determinación de la subclase (idiotipo) de un anticuerpo. A continuación se describen los más comunes:

*ELISA directa* (ensayo ELISA simple de dos capas).

Las placas para ELISA se preparan recubriendo los pocillos con las muestras (sangre, orina, heces, etc.) en las que se sospecha se encuentra el antígeno. Se incuban con anticuerpos marcados con enzimas; las cuales después de la adición de un sustrato incoloro, indicaran la presencia de antígeno en la muestra analizada mediante la aparición de color. Es necesario incluir controles negativos que serán

muestras del mismo tipo de las analizadas pero en las que esté ausente el antígeno buscado. Asimismo se incluyen controles positivos (37, 38).

#### ELISA indirecta.

Esta prueba detecta anticuerpos y no antígenos. En esta prueba, se incuban el virus en una solución tampón apropiado, en los pocillos de una placa para ELISA y se adsorben los antígenos a las paredes de los pocillos. Se añade el suero problema, y si existen anticuerpos específicos, se unen al antígeno. Los anticuerpos no unidos se eliminan mediante lavado. Después se añade un anti-anticuerpo unido covalentemente a una enzima. El complejo anticuerpo-enzima se une al anticuerpo problema. Las actividades inmunológicas y enzimáticas del conjugado se conservan, por ello es que constituye un componente primordial en éste inmunoensayo. Una reacción positiva quedará evidenciada por la posterior adición de un cromógeno. Un cromógeno es un sustrato incoloro sobre el que actúa la porción enzimática del ligando para producir un producto de color (28, 37, 38).

#### ELISA sandwich

Se trata de un ensayo muy empleado en el que se recubre el pocillo con un primer anticuerpo anti-antígeno. Después de lavar el exceso de anticuerpo se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno, que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. Después de un segundo lavado que elimina el material no retenido se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado. Así cada molécula de antígeno estará unido a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo, al menos, que lo marca. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo (37).

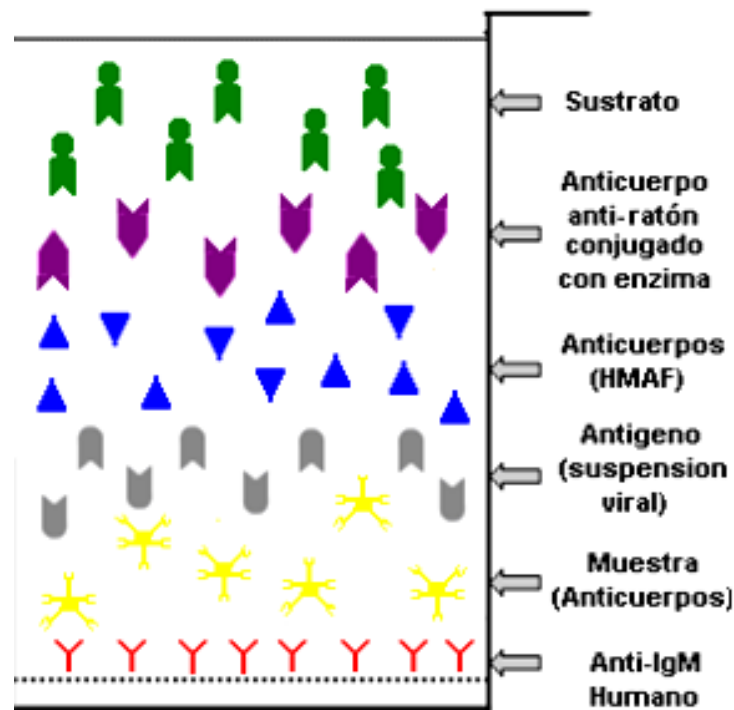
La aplicación del ELISA de tipo indirecto permitirá una mayor especificidad así como una amplificación de la señal debido a la posibilidad de una molécula de ligar a muchas otras moléculas de anticuerpo ligado a enzimas. Los ELISA indirectos tiene la ventaja de ser más sensibles y además de no necesitar un anticuerpo conjugado para cada virus ya que se emplean antisueros no conjugados y luego un antisuero

antiespecie marcado con una enzima, el que permitirá evidenciar un resultado positivo o negativo (36).

El presente trabajo utilizo las pruebas de ELISA indirecta para la detección de anticuerpos de tipo IgG y para la detección de anticuerpos del tipo IgM se usó la prueba Mac-ELISA (del inglés "M" antibody capture enzyme-linked-immuno-sorbent-assay). En ambas pruebas se usaron el mismo tipo de antígeno.

Ambos son métodos de captura de anticuerpos por medio de ELISA indirecta tipo sándwich no competitiva usando una fase sólida. La prueba Mac-ELISA es una prueba indirecta no competitiva con muchas ventajas en la detección de anticuerpos, ya que es capaz de amplificar notablemente la presencia del complejo antígeno-anticuerpo (37, 38, 40).

**FIGURA N°3:** Esquema de componentes del MAC-ELISA (8).



### 2.3.3. Prueba de neutralización por reducción de placas.

La prueba de neutralización por reducción de placas es una mejora de la prueba estándar de neutralización para la detección de anticuerpos originados por virus.

Se ha informado que la prueba de PRNT es 10 veces más sensible que la prueba de neutralización estándar, 60 veces más sensible que la prueba de inhibición de la hemaglutinación, 200 veces más sensible que la prueba de fijación del complemento y más sensible y específico que el método de EIA para detectar anticuerpos. La prueba de PRNT es considerada como la técnica más fiable para la detección de anticuerpos de tipo IgG e IgM contra diferentes virus, entre ellos el Dengue, Sarampión, Fiebre Amarilla, entre otros (40).

El diseño básico de la prueba de PRNT permite la interacción Virus-Anticuerpo in vitro o en placas de microtitulación y luego la medición del efecto e los anticuerpos sobre la muestra o de la infectividad viral mediante la mezcla de células específica, posteriormente las células son recubiertas con un medio sólido, el cual evita la propagación viral. Cada virus que inicie infección producirá una área localizada de infección (una placa) la cual podrá ser detectada de diferentes formas, el presente trabajo utilizara el Colorstain como colorante el cual hará posible el conteo de las placas formadas. Las placas serán contadas y comparadas con la concentración inicial del virus para determinar el porcentaje de reducción total causada por la infección del virus (41).

Para esta prueba los virus pueden ser aislados en cualquier sistema aunque en ocasiones es necesario realizar un pase por una línea de células de mamífero permisiva LLCMK2, Vero y las de mosquitos.

La utilización de células Vero-76 en la técnica de placas, ha brindado resultados satisfactorios y rápidos. La misma es útil no solo para la identificación viral, sino también para la detección de anticuerpos contra los diferentes virus, entre ellos el virus del Dengue (42, 43).

En el presente estudio se utilizó la prueba de neutralización por reducción de placas, como una prueba confirmatoria y “gold standard” de resultados positivos.

## CAPITULO III: METODOLOGÍA

### 3.1. Diseño de la investigación

#### 3.1.1. Tipo de investigación.

Retrospectivo de tipo longitudinal.

### 3.2. Población

Se trabajara con el total de sueros de pacientes con sintomatología febril, tomadas del banco de sueros del NAMRU-6, provenientes de las ciudades de Iquitos, Yurimaguas y Puerto Maldonado, entre los años 2010 al 2012.

<b><i>Tamaño:</i></b>	
<i>Iquitos</i>	<i>1719</i>
<i>Yurimaguas</i>	<i>585</i>
<i>Puerto Maldonado</i>	<i>302</i>
<b><i>Total:</i></b>	<b><i>2606</i></b>

#### 3.2.1. Criterios de Inclusión

- Muestras pareadas tomadas en diferentes fases de la enfermedad:
  - a. Muestra Agudas: Sueros de pacientes febriles (Temperatura mayor a 38°C), tomadas antes de los 5 días empezada la sintomatología.
  - b. Muestras Convalecientes: Tomada 2 semanas posteriores a la muestra (suero) de la fase aguda de la enfermedad.
- Muestras de individuos pertenecientes a las Poblaciones Iquitos, Yurimaguas y Puerto Maldonado.
- Muestras tomadas entre los años 2010 y 2012.

#### 3.2.2. Criterios de Exclusión

- Suero hemolizados.
- Sueros lipémicos

### 3.3. Muestra

#### 3.3.1. Aislamiento de la semilla viral en suero humano.

Las semillas virales utilizadas en el presente estudio fueron:

<b>Semilla Viral</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Aislamiento</b>	<b>Fecha</b>
Candiru: BE H 22511.	Para, Brasil	Humano	1960
Echarate: OBS 6528.	Cuzco, Perú	Humano	1998
Maldonado: FMD 0077.	Puerto Maldonado, Perú	Humano	2004
Punta Toro: R12931.(44)	Pennsylvania	Humano	1966

Los virus Candiru y Punta toro fueron referidos por el ATCC.

Los virus Echarate y Maldonado fueron aislados en Cuzco y Puerto Maldonado, Perú, por el NAMRU-6 en los años 1998 y 2004 respectivamente.

Se hicieron pasajes de las semillas virales iniciales y fueron propagadas en la línea celular Vero-76 para su uso en las pruebas de ELISA y PRNT.

#### 3.3.2. Control positivo.

Para el ensayo MAC-ELISA IgM se utilizaron como controles positivos los siguientes sueros en fase clínica aguda:

<b>ELISA IgM:</b>	<b>Candiru</b>	<b>Echarate</b>	<b>Maldonado</b>	<b>Punta Toro</b>
	IQE3673	FPI03673	FPI03410	IQT1604

Para el ensayo ELISA Indirecta IgG se utilizaron como controles positivos los siguientes fluidos ascíticos de ratón (HMAF), previamente confirmados por ELISA e Inmunofluorescencia:

<b>ELISA IgG:</b>	<b>Candiru</b>	<b>Echarate</b>	<b>Maldonado</b>	<b>Punta Toro</b>
	BE H 22511 Feb-12	OBS 6528 Jul-11	FMD 0077 Jul-11	R12931 Feb-12

Para la prueba de PRNT se utilizaron como controles positivos las siguientes semillas virales previamente tituladas:

<b>PRNT</b>	<b>Candiru</b>	<b>Echarate</b>	<b>Maldonado</b>	<b>Punta Toro</b>
	BE H 22511 Aug-11	OBS6528 Sep-07	FMD0077 Jul-09	R12931 Sep-11

### 3.3.3. Controles negativo.

Se utilizaron como control negativos, sueros procedentes de Lima, fueron consideradas como suero normal humano (SNH) luego de haber sido confirmadas como negativas para los virus Hepatitis B, VIH y tamizadas por el ensayo de ELISA e inmunofluorescencia y obtenido resultados negativos para los Arbovirus: *Dengue*, *Fiebre Amarilla*, *Caraparu*, *Murutucu*, *Mayaro*, *Oropouche*, *SLE (Encephalitis Saint Louis)*, *Ilheus*, *West Night*, *EEE (Eastern equine encephalitis)*, *VEE (Venezuelan Equine Encephalitis)*, *Guaroa*, *Una*, *Andes*, *Alphahuallo*, *Tacaribe*, *Roció*, y *Grupo C*.

### 3.4. Operacionalización de Variables

<b>Nombre de Variable</b>	<b>Sub-Variable</b>	<b>Indicador</b>	<b>Instrumento</b>
Región de Procedencia	Iquitos	Medido en base al porcentaje de resultados positivos o negativos para <i>Phlebovirus</i> por ciudad de procedencia.	Ensayo de ELISA. Prueba de PRNT
	Puerto Maldonado		
	Yurimaguas	Obtenidos de la base de datos del Namru-6	Encuesta
Años incluidos en la investigación	2010	Medido en base al porcentaje de resultados positivos o negativos para	Ensayo de ELISA.



	2011	<i>Phlebovirus</i> por año de procedencia de la muestra.	Prueba de PRNT
	2012	Obtenidos de la base de datos del Namru-6	Encuesta
Seroconversión	Fase Aguda	Medido en base al porcentaje de resultados positivos o negativos para <i>Phlebovirus</i> por presencia de inmunoglobulina M.	Ensayo de ELISA. Prueba de PRNT
		Obtenidos de la base de datos del Namru-6	Encuesta
	Fase convaleciente	Medido en base al porcentaje de resultados positivos o negativos para <i>Phlebovirus</i> por presencia de inmunoglobulina G.	Ensayo de ELISA. Prueba de PRNT
		Obtenidos de la base de datos del Namru-6	Encuesta
Sexo	Femenino	Medido en base al Porcentaje de resultados positivos o negativos para <i>Phlebovirus</i> según sexo.	Ensayo de ELISA. Prueba de PRNT
	Masculino	Obtenidos de la base de datos del Namru-6	Encuesta
Edad	15-25 años	Medido en base al porcentaje de resultados positivos o negativos para <i>Phlebovirus</i> según grupo etario.	Ensayo de ELISA. Prueba de PRNT
	25-35 años		
	35-45 años	Obtenidos de la base de datos del Namru-6	Encuesta
	45-55 años		

### 3.5. Procedimientos y Técnicas

#### 3.5.1. Métodos

##### 3.5.1.1. Propagación viral

El propósito del procedimiento fue de lograr el crecimiento de Arbovirus (*Phlebovirus*) en cultivo celular y producir stock de virus de trabajo para las pruebas posteriores.

Materiales:

- Equipos: Vortex, centrifuga temperada, incubadora a 37°Celcius.

- Suministros: Frascos para cultivo celular, mandil, guantes de nitrilo, bolsas de bioseguridad, gradillas, tubos para centrifuga x 50 mL y 30mL, pipetas, puntillas para pipetas, crioviales x 1mL, paquetes de hielo para mantener cadena de frio, removedor de células.
- Reactivos: Monocapa de células Vero-76, semilla viral, medio E-MEM, alcohol etanol al 70%, lejía, hielo.

Procedimiento:

- Se inició el procedimiento con la formación de la monocapa de células Vero-76 (Crecimiento en monocapa de 3 días), se procedió a decantar el excedente de medio de crecimiento para proceder a la infección de la monocapa de células.
- La infección se lograra inoculando 1 de la semilla viral "X" a una dilución 1/40 con E-MEM al 2% SBF, para obtener un volumen final de 10mL (conservado cadena de frio), se incubo 1 hora a 37° Celsius, pasado el tiempo requerido se procedió a la adición de medio de crecimiento E-MEM al 2% de SBF cuya cantidad dependió de la medida del frasco utilizado, (850cm<sup>2</sup> = 250ml y 175cm<sup>2</sup> = 50ml) y se dejó incubar por "x" días (Dependió del tipo de virus) hasta observar el efecto citopático requerido (IgM = 90% 4+IgG=70% 2+).
- La recuperación viral se logró, removiendo la monocapa de células infectadas, se colocó en tubos para centrifuga y se centrifugo a 5000RPM x 20 minutos a 4°Celsius.
- El pellet fue alicuotado y se confirmó la presencia viral mediante IFA.
- La desinfección se logró usando Hipoclorito de Sodio al 10% antes de desechar los frascos y materiales implicados.

**TABLA N°1:** Resultados de la propagación de las semillas virales de *Phlebovirus* para el ensayo MAC-ELISA IgM.

SEMILLA VIRAL CANDIRU BE H 22511 VR 408 VERO-3 09/15/2011 Antígeno Viral MAC-ELISA IgM	
Días de incubación:	Crecimiento en cruces:
1	0
2	1+
3	3+

SEMILLA VIRAL ECHARATE PHLEBOVIRUS OBS6528 SMB- 1 Vero-6 07/16/2009 Antígeno Viral MAC-ELISA IgM	
Días de incubación:	Crecimiento en cruces:
1	0
2	1+
3	3+

SEMILLA VIRAL MALDONADO PHLEBOVIRUS FMD 0077 Vero-4 07/17/2009 Antígeno Viral MAC-ELISA IgM	
Días de incubación:	Crecimiento en cruces:
1	0
2	1+
3	2+
4	3+

SEMILLA VIRAL PUNTA TORO R12931 SMBp13/Vero-3 09/16/2011 Antígeno Viral MAC-ELISA IgM	
Días de incubación:	Crecimiento en cruces:
1	0
2	1+
3	2+
4	4+

**TABLA N°2:** Resultados de la propagación viral de las semillas virales de *Phlebovirus* para el ensayo ELISA Indirecta IgG.

SEMILLA VIRAL CANDIRU BE H 22511 VR 408 VERO-3 09/15/2011 Antígeno Viral ELISA IgG	
Días de incubación:	Crecimiento en cruces:
1	0
2	1+
3	2+

SEMILLA VIRAL ECHARATE PHLEBOVIRUS OBS6528 SMB-1 Vero-6 07/16/2009 Antígeno Viral ELISA IgG	
Días de incubación:	Crecimiento en cruces:
1	0
2	1+
3	3+

SEMILLA VIRAL MALDONADO PHLEBOVIRUS FMD 0077 Vero-4 07/17/2009 Antígeno Viral ELISA IgG	
Días de incubación:	Crecimiento en cruces:
1	0
2	0
3	2+

SEMILLA VIRAL PUNTA TORO R12931 SMBp13/Vero-3 09/16/2011 Antígeno Viral ELISA IgG	
Días de incubación:	Crecimiento en cruces:
1	0
2	0
3	1+
4	2+

### 3.5.1.2. Inactivación viral con BEI (Binary ethyleneimine).

Propósito: se procederá a la inactivación viral utilizando “Etilenimina binaria”, este químico actúa en los ácidos nucleicos del virus y produce efecto en la capacidad inmunogénica propios del revestimiento proteico del virus.

#### Materiales:

- Equipos: Agitador magnético, Cabina de bioseguridad.
- Suministros: tubos cónicos x 50mL, pipetas y puntas para pipeta, desinfectante, crioviales x 2mL a 5mL, paquetes de hielo para mantener cadena de frio, botellas de 100 – 500mL, bolsas de bioseguridad.
- Reactivos: Agua bi-destilada, Etilenimina binaria 0.1 M, Tiosulfato de sodio.

#### Procedimiento:

- Se midió el volumen total de virus a inactivar (frascos de 850cm<sup>2</sup> = 250mL frascos de 175cm<sup>2</sup> = 50ml).
- La concentración adecuada de BEI es de 0.003M, se obtuvo multiplicando el volumen final de *Phlebovirus* “x” a inactivar por 0.031, el volumen resultante de la multiplicación fue el que se agregó para la inactivación.
- Se mantuvo la mezcla a 4° Celsius por 10 días hasta lograr la inactivación moviendo 1 a 2 veces diariamente el frasco con el *Phlebovirus* “x”.
- Luego de la inactivación, los residuos de BEI fueron eliminados adicionando 1M de Tiosulfato de sodio, el volumen adicionado fue calculado multiplicando el volumen total de virus inactivado por 0.02.

La preparación de los reactivos utilizados en la inactivación viral con BEI se detalla en el **ANEXO 2**.

### 3.5.1.3. Preparación del antígeno viral IgM.

#### Materiales:

- Equipos: Cabina de bioseguridad, centrifuga SORVALL RC 6 PLUS temperada 4°Celcius, medidor de pH, balanza.

- Suministros: Tubos cónicos de 15-50mL, reservorios para pesar en gramos.
- Reactivos: Alcohol 70%, lejía, Hidróxido de sodio 1N, Albumina Bovina, Azida de sodio.

Procedimiento:

- Pasado los 10 días de la inactivación del antígeno viral por BEI se procedió a clarificar el antígeno centrifugando a 5000RPM por 10 minutos a 4° Celsius.
- Se colecto el sobrenadante y se analizó el pellet de células para confirmar la presencia viral mediante IFA.
- Se adiciono albumina bovina al 4% del volumen final del antígeno viral, se mesclo y se adiciono Azida de sodio al 0.01% del volumen final del antígeno viral.
- Se ajustó el pH del medio a 7.4 con Hidróxido de sodio 1N.
- Se tituló el antígeno viral obtenido mediante el ensayo de MAC-ELISA para obtener la dilución adecuada de trabajo
- Posteriormente se dispenseo 40mL en tubos rotulados y se almaceno a 4° Celsius hasta su uso.

#### 3.5.1.4. Titulación y estandarización del antígeno viral IgM.

- Titulación del antígeno viral IgM:

Propósito: se describe la obtención de la titulación óptima de trabajo del antígeno viral preparado anteriormente para luego ser utilizarlo en el ensayo de MAC-ELISA.

Se procederá a la titulación del antígeno *Phlebovirus* "x" mediante un ensayo de MAC-ELISA convencional contra anticuerpos de tipo IgM.

- Estandarización del antígeno viral IgM:

*Propósito: este procedimiento describe la detección de antígenos humanos de tipo IgM reactivos a un Phlebovirus específico.*

El ensayo utiliza anti-anticuerpos humanos ligados a la fase sólida, los cuales capturan a los anticuerpos específicos inmunoglobulina "M" en la muestra del

paciente en análisis, mediante la adición del antígeno viral, el HMAF y el conjugado HRP se podrá lograr la visualización de la reacción positiva al concluir el ensayo usando el ABTS sustrato. Los resultados cuantitativos serán calculados con un Lector de ELISA.

Para la estandarización de la prueba, se procedió a la titulación del antígeno viral *Phlebovirus* “x” previamente preparado y a la búsqueda de la dilución óptima de trabajo del HMAF (Fluido Ascítico hiperinmune de ratón).

#### Materiales:

- Equipos: Lavador de ELISA, Lector de ELISA, incubadora 37°C, Cabina de bioseguridad, refrigeradora, congeladora -80°C, vortex, pipetas multicanal de 0-20µl, 50-300µl, pipetas simples de 0-20µl, 0-200µl, 0-1000µl.
- Suministros: Placas flexibles para ELISA fondo en “U”, tubos para centrifuga x 15mL y 50mL, pipetas serológicas 1mL a 25mL, reservorios para uso de pipetas multicanal, bolsas de bioseguridad, puntillas para pipetas 1-200µl, placas flexibles de polivinilo con 96 pocillos, crioviales, papel aluminio, tubos de ensayo para titulación, gradillas, paquetes de hielo para mantener cadena de frío.
- Reactivos: Anti-anticuerpos humanos producidos en cabra de tipo IgM, Antígeno viral para el *Phlebovirus* “x”, control de antígeno, HMAF para el *Phlebovirus* “x”, buffer diluyente de muestras, buffer diluyente para ELISA IgM, buffer de lavado, PBS 7.4 pH, HRP marcado con anti-anticuerpos de ratón G+M (Alta y baja densidad) producidos en cabra, ABTS sustrato.

#### Procedimiento:

##### *Fase sólida, revestimiento de la placa.*

- Se diluyó los anti-anticuerpos humanos producidos en cabra de tipo IgM 1:1000 en PBS, se preparó cantidad suficiente para utilizar 100µl de la dilución, en los 96 pocillos de cada placa flexible nueva.
- Se dejó las placas preparadas toda la noche a 4°C, luego se lavó cada placa en el Lavador de ELISA, 5 veces utilizando 300µl de Buffer de lavado y se

removió el exceso de buffer de lavado golpeando suavemente contra un papel absorbente.

#### *El ensayo MAC-ELISA IgM.*

- En las placas de 96 pocillos se consideró dos partes: Sección de antígeno viral preparado para *Phlebovirus*, (columna 1 a 6) y la sección de Control de Antígeno (Columna 7 a 12).
- Se adiciono 100µl de control positivo específico para cada *Phlebovirus* en cada pocillo de la placa de 96, a una dilución 1/100 utilizando el buffer diluyente para MAC-ELISA IgM.
- a) Se envolvió las placas en papel aluminio y se incubo por 1 hora a 37°C, pasado el tiempo estimado, se lavó las placas en el Lavador de ELISA, 5 veces utilizando 300µl de buffer de lavado y se eliminó el excedente del buffer de lavado golpeando suavemente contra un papel absorbente.
- Se adiciono 100µl del antígeno viral preparado para cada *Phlebovirus* al 2% de suero humano normal en las siguientes diluciones: Puro, 1/2, 1/3. Se repitió el paso a).
- A continuación se adiciono 100µl del HMAF (Específico para cada *Phlebovirus*) diluido 1/500 y 1/1000 en buffer diluyente para ELISA. Se repitió el paso a).
- Se agregó 100µl de conjugado HRP marcado con anti-anticuerpos de ratón G+M (Alta y baja densidad) a una dilución 1/4000 con buffer diluyente para MAC-ELISA IgM, se repitió el paso a).
- Se echó 100µl del sustrato ABTS a cada pocillo y se incubo por 30 minutos a 37°C.
- Se procedió a la lectura y análisis de las placas en el espectrofotómetro a 405nanómetros.

#### *Análisis.*

- Se realizó la lectura de las placas a la densidad óptica de 405nanómetros, en el lector de ELISA el cual realizara el cálculo automáticamente (sustracción de



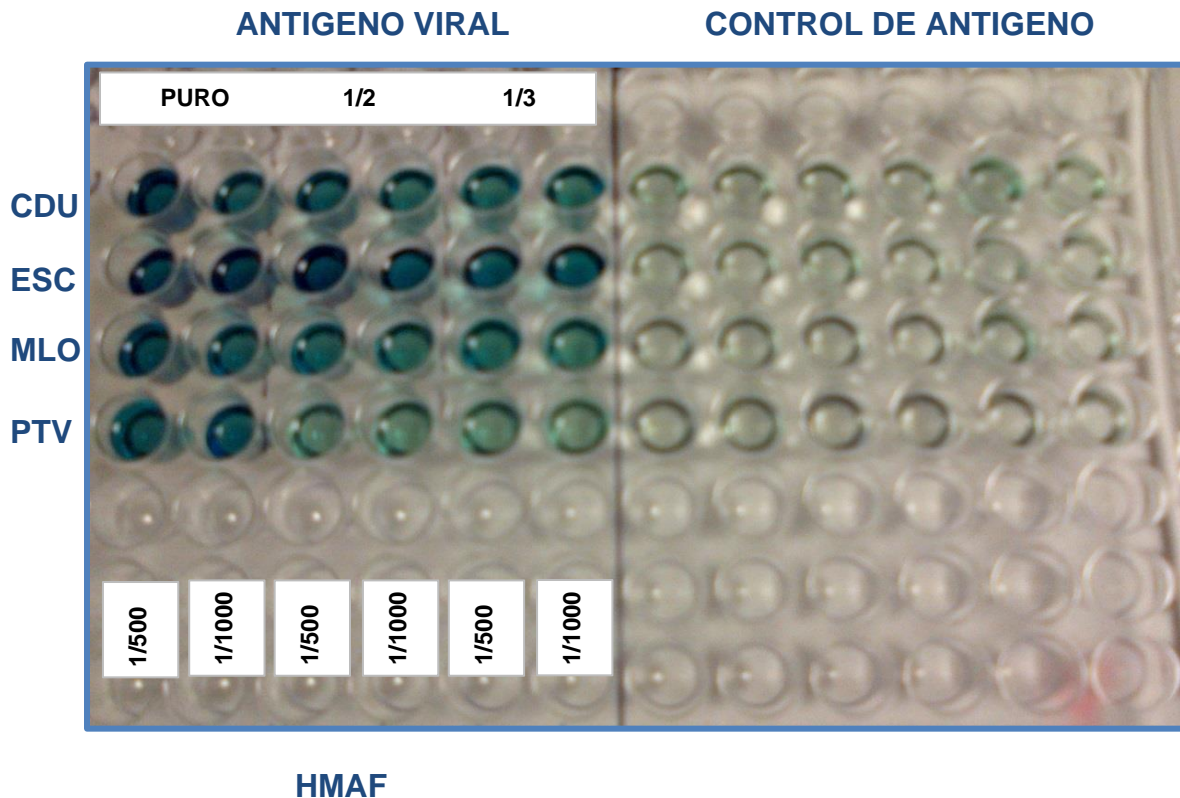
la densidad óptica del blanco con las muestras, sustracción de la densidad óptica del control de antígeno y la densidad de las muestras analizadas).

- Para obtener el cut off, se calculó la media de los controles negativos y se le sumo el valor de 0.200 al resultado.
- Los valores iguales o por encima del valor de cut off fueron considerados como positivos, valores menores al valor del cur off fueron considerados como negativos.
- Para cada muestra, la última dilución con título positivo, fue considerado como título de la muestra (Antígeno viral y HMAF).

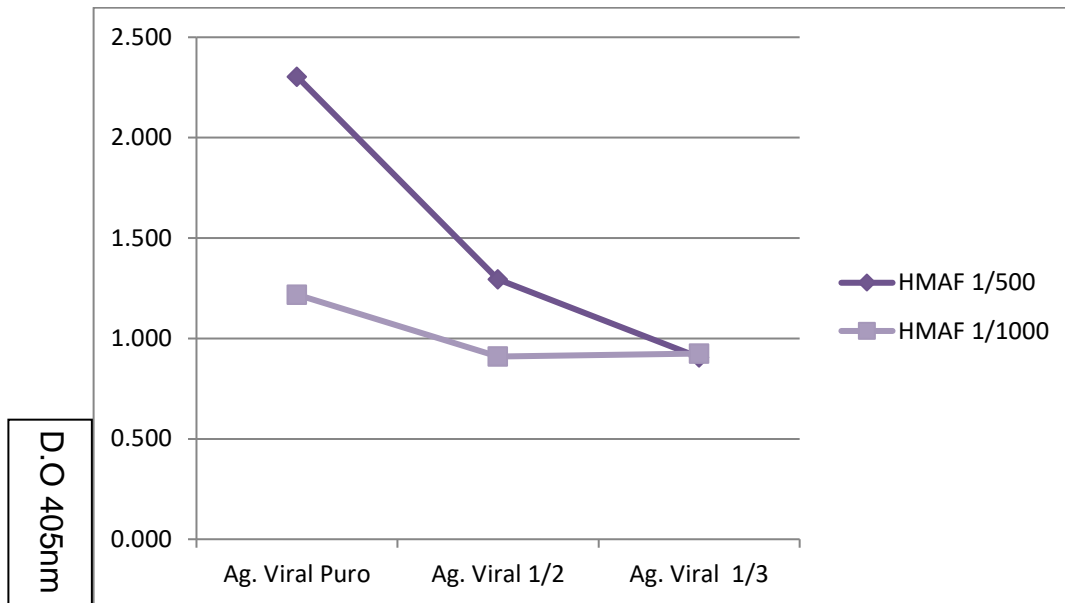
Los esquemas de la preparación de los buffers utilizados en los ensayos de ELISA se describen en el **ANEXO 3**.

El flujograma de la preparación del HMAF para *Phlebovirus* se detalla en el **ANEXO4**.

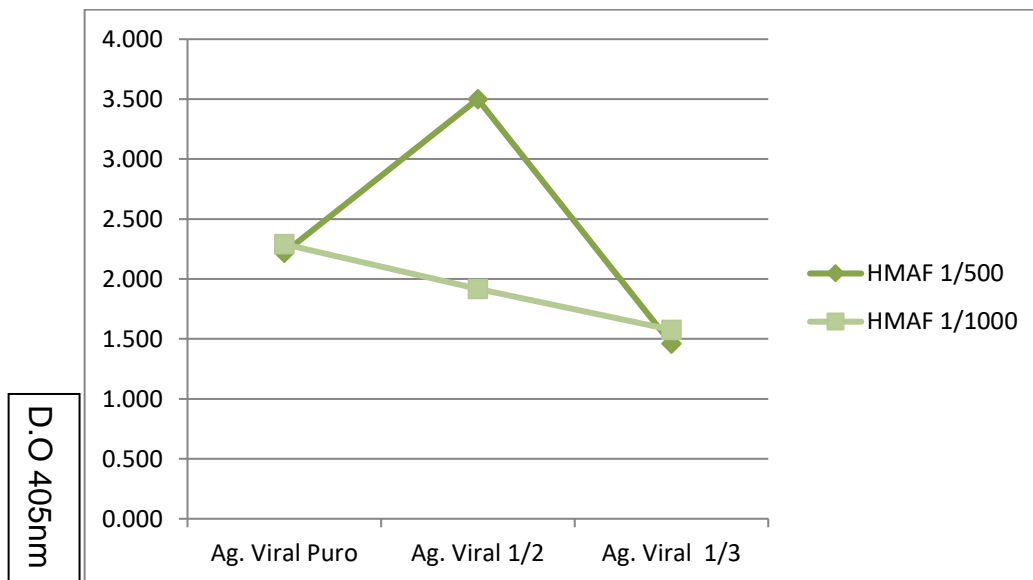
**FIGURA N°4.** Titulación del Antígeno Viral y HMAF.



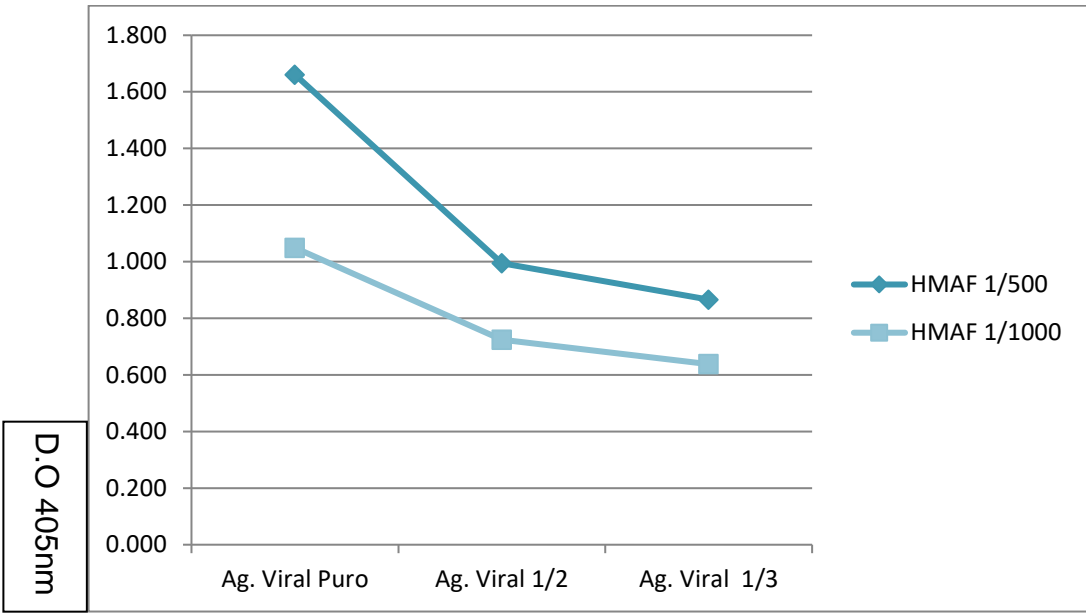
**GRÁFICO N°2:** Dilución de trabajo del antígeno viral y HMAF Candiru.



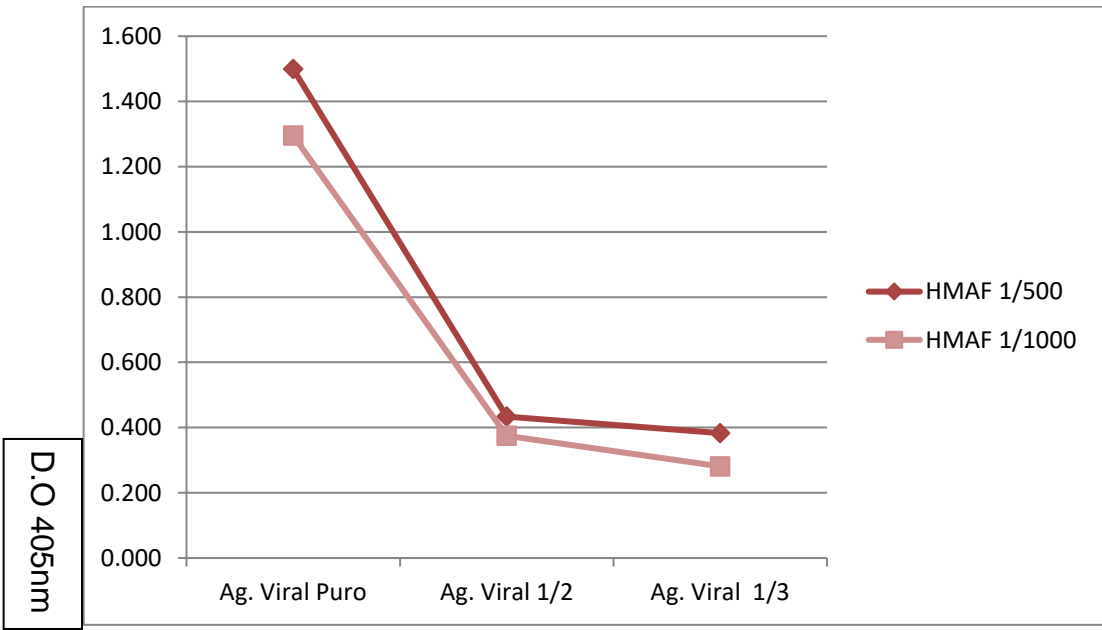
**GRÁFICO N°3:** Dilución de trabajo del antígeno viral y HMAF Echarate.



**GRÁFICO N°4:** Dilución de trabajo del antígeno viral y HMAF Maldonado.



**GRÁFICO N°5:** Dilución de trabajo del antígeno viral y HMAF Punta Toro.



Para la prueba de MAS-ELISA IgM, se obtuvo las siguientes diluciones óptimas de trabajo:

Antígeno viral CDU, ESC:	1/2
Antígeno viral MLO, PTV:	Sin diluir
HMAF CDU, ESC, MLO, PTV:	1/500

#### 3.5.1.5. Preparación de antígeno lisado IgG.

El propósito del presente procedimiento es la preparación del antígeno lisado a partir de la propagación viral en la línea celular Vero-76 (CPE 2+ 50%). Este antígeno será usado para la detección de anticuerpos humanos de tipo IgG contra determinado *Phlebovirus* mediante la prueba de ELISA Indirecta.

#### Materiales:

- Equipos: Cabina de bioseguridad, centrifuga temperada 4°Celcius, pipeteador automático, pipetas simples de 0-20µl, 0-200µl, 0-1000µl, sonicador.
- Suministros: Tubos cónicos para centrifuga x 50mL, pipetas serológicas, tips para pipetas, raspadores celulares, bolsas de bioseguridad, crioviales x 1mL, frascos estériles de 500 a 100mL.
- Reactivos: Alcohol etanol 70%, lejía, hielo, buffer borato salino pH 9.0, Triton X100.

#### Procedimiento:

- Se retiró la monocapa de células Vero-76 de los frascos de 175cm<sup>2</sup> utilizando el raspador celular, previa visualización del efecto citopático por microscopio invertido (CPE 2+ 50%).
- Se calculó el volumen total del antígeno obtenido, se dispense en tubos para centrifuga x 250mL y se centrifugo a 7000 RPM por 15 minutos a 4°Celcius.
- Se decantó el sobrenadante en frascos con desinfectante y se envió una muestra del pellet para ser analizado por IFA y confirmar la presencia de *Phlebovirus*.

- Se re-suspendió el pellet en suficiente solución de borato salino, pH 9.0 para cubrir y lavar el pellet, se centrifugo a 7000 RPM por 15 minutos a 4°C.
- Se decantó el sobrenadante en frascos con desinfectante al 10%.
- Se re-suspendió el pellet en suficiente solución de borato salino, se trabajó con todos los pellets recuperados en un solo tubo para centrifuga y se centrifugo a 7000 RPM por 15 minutos a 4°C.
- El pellet obtenido fue re-suspendido con solución Borato Salina al volumen final de 1mL por cada 80 cm<sup>2</sup> del área de la monocapa, (frascos por 175 cm<sup>2</sup>= 2mL), se mesclo y se adiciono Triton X-100 al 1% del volumen final.
- Se sónico el pellet a 4.5 de potencia por 25 segundos, se usó hielo durante el proceso de sonicado.
- Se centrifugara el producto sonicado por 10 minutos a 7000 RPM a 4°C.
- Se alicuoto en crioviales de 1mL, y se refrigero a -20°Celsius hasta el día de su uso.
- El control de antígeno lisado, fue preparado mediante el mismo procedimiento descrito anteriormente utilizando células Vero-76 sin infectar.
- Para la correcta interpretación de resultados positivos se deberá hacer la titulación del antígeno lisado preparado mediante la prueba de ELISA indirecta

La preparación de los reactivos utilizados en la preparación del antígeno lisado se detalla en el **ANEXO 5**.

#### 3.5.1.6. Titulación y estandarización del antígeno lisado IgG.

- Titulación del antígeno lisado IgG:

Este procedimiento describe la obtención del título óptimo de trabajo del antígeno lisado preparado anteriormente para luego ser utilizarlo en el ensayo de ELISA indirecta IgG.

Se procederá a la titulación del antígeno lisado *Phlebovirus* "x" mediante un ensayo de ELISA Indirecta convencional contra anticuerpos de tipo IgG.

- Estandarización del antígeno lisado IgG:

Se describe la prueba de ELISA Indirecta para la detección de anticuerpos de tipo IgG en contra de un *Phlebovirus* específico, el ensayo utiliza antígenos lisados preparados en la línea celular Vero-76, la reacción antígeno-anticuerpo será visualizada por el color, usando anti-anticuerpos humano IgG producidos en cabra, conjugados con el sustrato ABTS.

Para la estandarización de la prueba, se procedió a la titulación del antígeno lisado preparado para *Phlebovirus*.

Materiales:

- Equipos: Lavador de ELISA, Lector de ELISA, incubadora 37°Celcius, Cabina de bioseguridad, refrigeradora, congeladora -80°Celcius, vortex, pipetas multicanal de 0-20µl, 50-300µl, pipetas simples de 0-20µl, 0-200µl, 0-1000µl.
- Suministros: Placas Rígidas para ELISA fondo en "U", Tubos para centrifuga x 15mL y 50mL, pipetas serológicas 1mL a 25mL, reservorios para uso de pipetas multicanal, bolsas de bioseguridad, puntillas para pipetas 1-200µl, placas flexibles de polivinilo con 96 pocillos, crioviales, papel aluminio, tubos de ensayo para titulación, gradillas.
- Reactivos: Antígeno viral lisado para *Phlebovirus*, control de antígeno lisado, buffer diluyente de muestras, buffer diluyente para ELISA IgG, buffer de lavado, PBS 7.4 pH, KLP HRP marcado con anti-anticuerpos humanos de tipo IgG producidos en cabra, ABTS sustrato, HMAF de los diferentes *Phlebovirus* utilizados como muestra.

Procedimiento

*Fase sólida, revestimiento de la placa:*

- Se preparó el antígeno lisado y el control de antígeno lisado diluido 1/250, 1/500; 1/1000, 1/2000, con suficiente solución PBS 1x.
- La distribución de la placa de 96 pocillos, fue la siguiente: columnas 1 a 6, antígeno lisado y columnas 7 a 12, control de antígeno.
- Se dejó las placas preparadas toda la noche a 4°Celsius

- Se lavó las placas en el Lavador de ELISA, 5 veces utilizando 300µl de buffer de lavado y se eliminó el excedente del buffer de lavado golpeando suavemente contra un papel absorbente.

*El ensayo ELISA Indirecta IgG:*

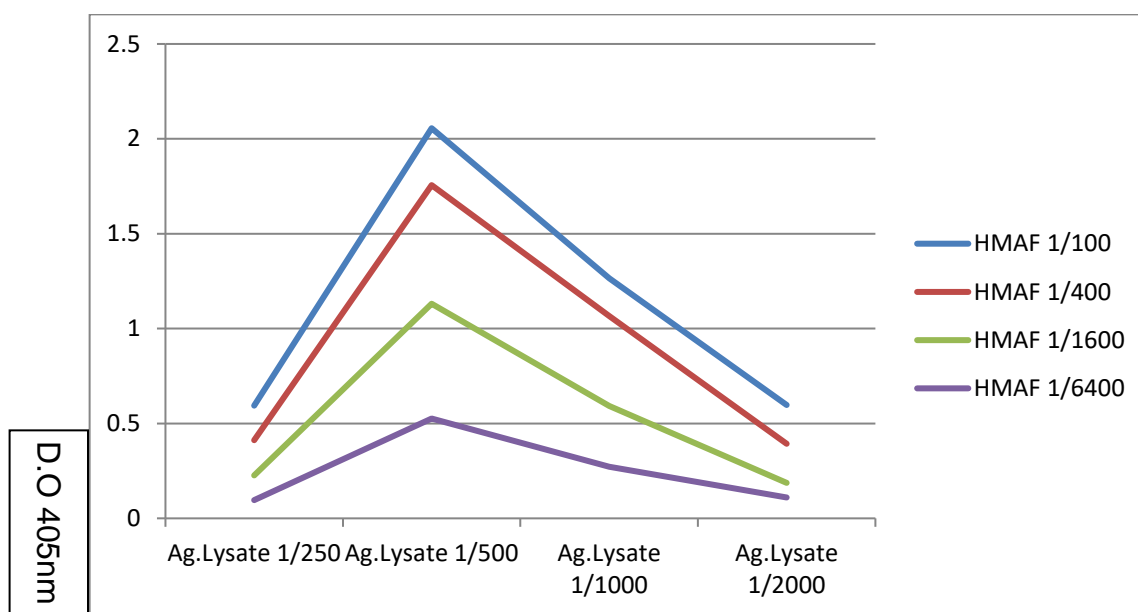
- Se adiciono 100µl de HMAF (específico para cada *Phlebovirus*) diluido 1/100, 1/400, 1/1600, 1/6400 en buffer diluyente para ELISA en cada pocillo de las placas marcadas anteriormente.
- a) Se envolvió las placas en papel aluminio y se incubo por 1 hora a 37°C, pasado el tiempo estimado, se lavó las placas en el Lavador de ELISA, 5 veces utilizando 300µl de buffer de lavado y se eliminó el excedente del buffer de lavado golpeando suavemente contra un papel absorbente.
- Se adicionara 100µl del conjugado HRP marcado con anti-anticuerpos de ratón G+M (Alta y baja densidad) a la dilución optima de 1/4000. Se repitió el paso a).
- Se agregó 100µl del sustrato ABTS a cada pocillo, se cubrió la placa con papel aluminio y se incubo por 30 minutos a 37°Celcius.
- Se procedió a la lectura y análisis de las placas en el espectrofotómetro a 405 nanómetros.

*Análisis:*

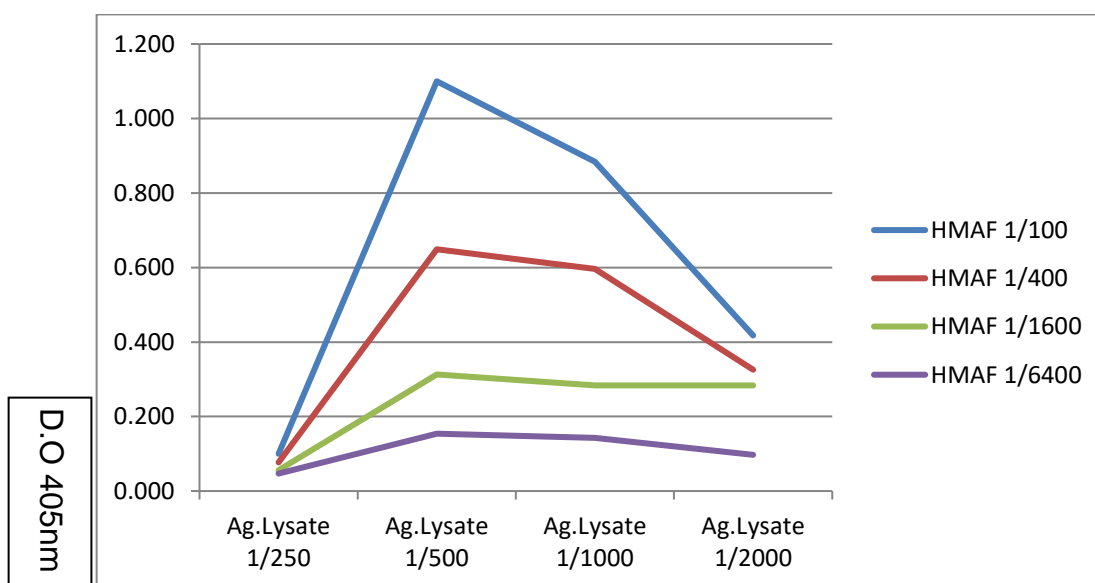
- La lectura de las placas se realizó a la densidad óptica de 405 nanómetros, en el lector de ELISA el cual realizo el cálculo automáticamente
- La Densidad óptica final se calculó con la sustracción de la D.O del control de antígeno y la D.O del antígeno lisado.
- Para obtener el cut off, se calculó el promedio de los controles negativos y se le adiciono el valor de 0.200 al resultado. Los valores iguales o por encima del valor de cut off fueron considerados como positivos, valores menores al valor del cut off fueron considerados como negativos.
- Para cada muestra (antígeno lisado), la última dilución con título positivo, fue considerado como título de la muestra (HMAF).

Los esquemas de la preparación de los buffers utilizados en los ensayos de ELISA se describen en el **ANEXO 3**.

**GRÁFICO N°6:** Dilución de trabajo del antígeno lisado Candiru.

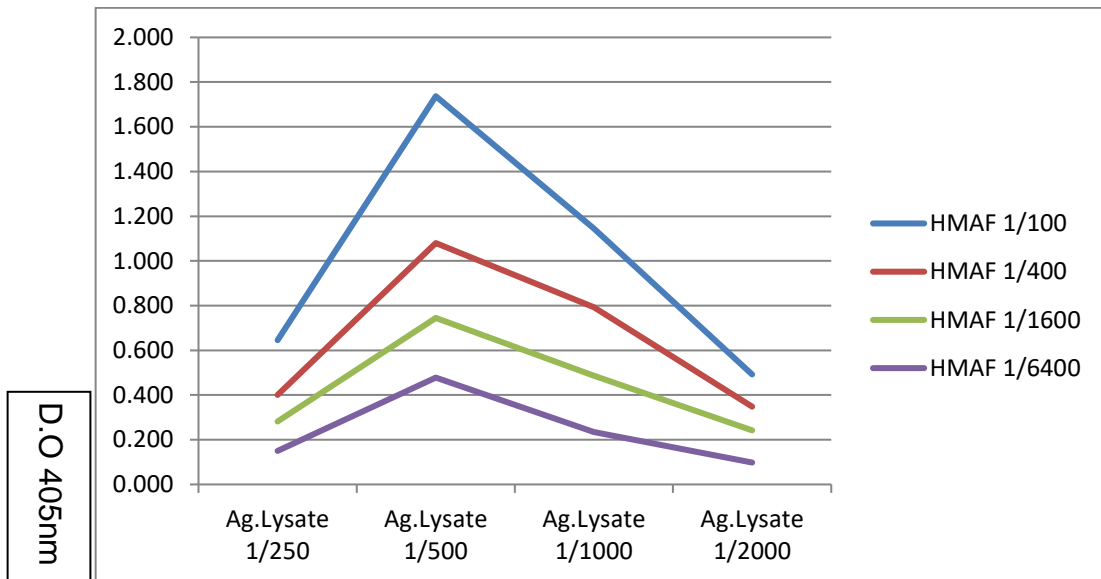


**GRÁFICO N°7:** Dilución de trabajo del antígeno lisado Echarate.

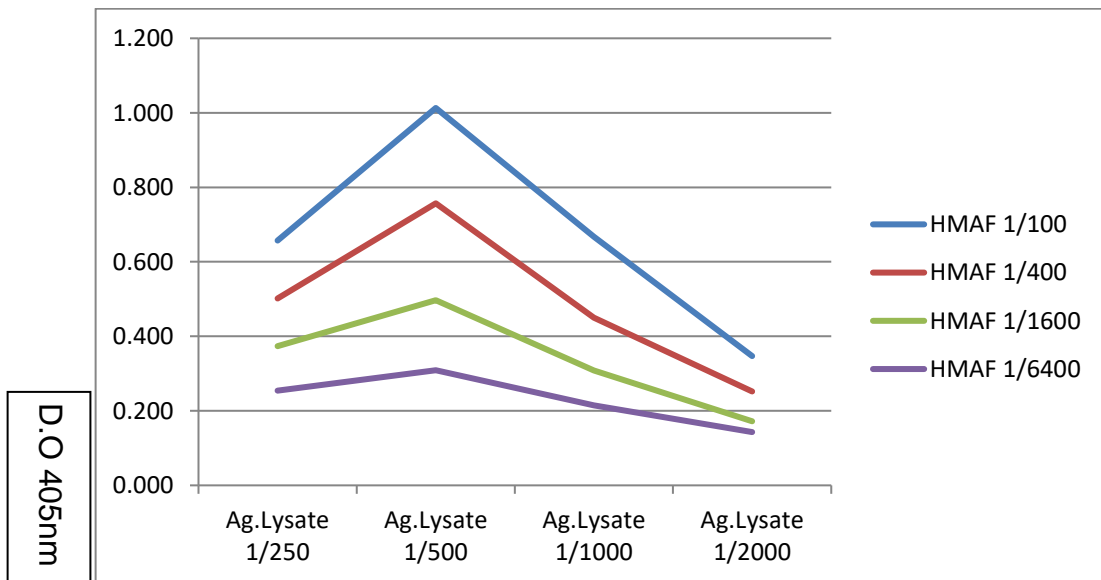




**GRÁFICO N°8:** Dilución de trabajo del antígeno lisado Maldonado.



**GRÁFICO N°9:** Dilución de trabajo del antígeno lisado Punta Toro.



Con los resultados obtenidos en la titulación de los componentes usados en la prueba de ELISA IgG indirecta se obtuvo como diluciones óptimas de trabajo:

Antígeno Lisado CDU, ESC, MLO, PTV	1/500
HMAF: CDU, MLO, como control positivo	1/200
HMAF: ESC, PTV, como control positivo	1/100

### 3.5.1.7. Conjugado.

Propósito: comprobar el correcto funcionamiento del conjugado utilizado en el ensayo de MAC-ELISA y ELISA Indirecta.

Los conjugados que se utilizaron en el ensayo de ELISA fueron:

- MAC-ELISA IgM: THERMO Scientific #31446 lot. MJ1463943 Goat anti Mouse IgG+M Peroxidase Labeled 50%Glicerol.
- ELISA IgG Indirecta: KPL Affinity Purified Antibody Peroxidase Labeled Goat anti - human IgG 1.0mg Cat. No. 074-1002 lot. No. VC050

Materiales:

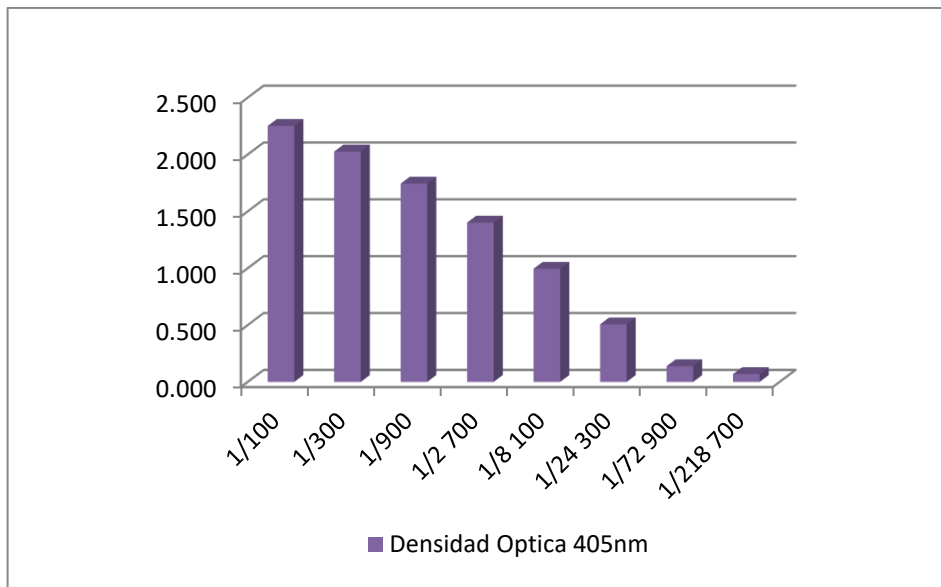
- Equipos: Lavador de ELISA, Lector de ELISA, incubadora 37°Celcius, Cabina de bioseguridad, refrigeradora, congeladora -80°Celcius, vortex, pipetas multicanal de 0-20µl, 50-300µl, pipetas simples de 0-20µl, 0-200µl, 0-1000µl.
- Suministros: Placas flexibles para ELISA fondo en "U", tubos para centrifuga x 15mL y 50mL, pipetas serológicas 1mL a 25mL, reservorios para uso de pipetas multicanal, bolsas de bioseguridad, puntillas para pipetas 1-200µl, placas flexibles de polivinilo con 96 pocillos, crioviales, papel aluminio, tubos de ensayo para titulación, gradillas.
- Reactivos: PBS 7.4 pH, ABTS sustrato.

Procedimiento:

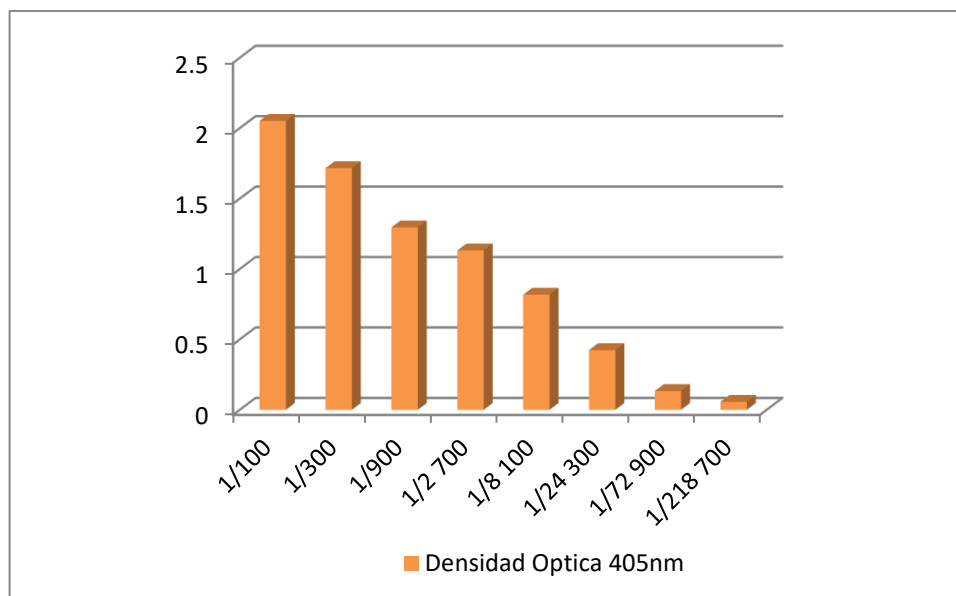
- Para probar el correcto funcionamiento de los conjugados se prepararon diluciones seriadas con PBS 1x: 1/100, 1/300, 1/900, 1/2700, 1/8100, 1/24300, 1/72900, 1/218700.

- Se utilizaron placas flexibles con fondo en “U” para ELISA por 96 pocillos.
- Se procedió a incubar el conjugado diluido en PBS por 1 hora a 37° C. Luego de lavar las placas 5 veces en el lavador de ELISA, se dispenseo 100µl de sustrato y se incubo por 30 minutos a 37° C.
- Se procedió a la lectura de las placas en el lector de ELISA a 405nm.

**GRÁFICO N°10:** Titulación del conjugado usado en MAC-ELISA.



**GRÁFICO N°11:** Titulación del conjugado usado en ELISA Indirecta IgG.



Los resultados obtenidos confirmaron el correcto funcionamiento de ambos conjugados.

#### 3.5.1.8. Titulación de la semilla viral para la prueba de PRNT.

El propósito del siguiente procedimiento fue el de estandarizar:

- La dilución óptima de trabajo para los diferentes *Phlebovirus*.
- La línea celular adecuada para el crecimiento de los diferentes *Phlebovirus*.
- El tiempo estimado que tardaron los diferentes *Phlebovirus* en dar una correcta reacción positiva según la cantidad y la calidad de las placas formadas.

Materiales:

- Equipos: Cabina biológica de bioseguridad clase II, Incubadoras de 37°C, al 5% de CO<sub>2</sub>, congelador de -70°C y -20°C, Refrigerador de 4°C, Baño María 56°Celcius, vortex.
- Suministros: Pipetas mecánicas 2-20µl, 20-100µ, 100-1000µl y 50µl, pipetas multicanal 5-50µl, 30-300µl, 20-200µl, pipetas serológicas estériles 50, 25, 10, 5, y 1mL, Puntillas para pipetas 200µl, 1000µl, reservorios por 100mL, placas para cultivo celular por 24 pocillos, tubos estériles por 5mL, 15mL y 50mL, Botellas estériles por 250mL y 500mL, racks.
- Reactivos: Medio E-MEM al 2% SBF, medio Agarosa, solución Colorstain, células Vero-76, células BHK-21, Semilla viral para los diferentes *Phlebovirus*: CDU, ESC, MLO, PTV.

Procedimiento.

*Pre-dilución de la semilla viral:*

- Se prepararon diluciones seriadas por cada *Phlebovirus* en tubos rotulados y tomando en cuenta no perder la cadena de frío.

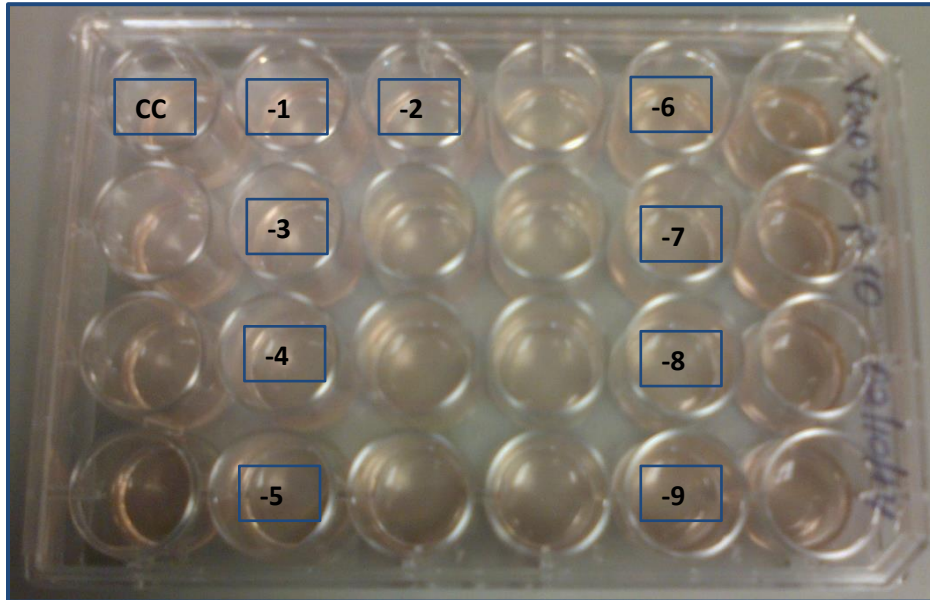
0.5mL semilla Viral = Sin diluir.	
0.5mL Semilla viral + 4.5mL E-MEM 2%SBF = Dilución 1/10	1x10 <sup>1</sup>
0.5mL Dilución 1/10 + 4.5mL E-MEM 2%SBF = Dilución 1/100	1x10 <sup>2</sup>
0.5mL Dilución 1/100 + 4.5mL E-MEM 2%SBF = Dilución 1/1 000	1x10 <sup>3</sup>
0.5mL Dilución 1/1 000 + 4.5mL E-MEM 2%SBF = Dilución 1/10 000	1x10 <sup>4</sup>
0.5mL Dilución 1/10 000 + 4.5mL E-MEM 2%SBF = Dilución 1/100 000	1x10 <sup>5</sup>
0.5mL Dilución 1/100 000 + 4.5mL E-MEM 2%SBF = Dilución 1/1 000 000	1x10 <sup>6</sup>
0.5mL Dilución 1/1 000 000 + 4.5mL E-MEM 2%SBF = Dilución 1/10 000 000	1x10 <sup>7</sup>
0.5mL Dilución 1/10 000 000 + 4.5mL E-MEM 2%SBF = Dilución 1/100 000 000	1x10 <sup>8</sup>
0.5mL Dilución 1/100 000 000 + 4.5mL E-MEM 2%SBF = Dilución 1/1 000 000 000	1x10 <sup>9</sup>

- Se preparó suficiente cantidad de las diferentes diluciones en base al número de placas de 24 pocillos, teniendo cuenta el dispensado de 50µl de cada dilución por pocillo y *Phlebovirus*.
- Se mantuvo refrigerado a 4°C hasta el momento de la infección.

*Infección de la semilla viral en cultivo celular:*

- La infección se realizó en dos líneas celulares: Vero-76 y BHK-21 previamente preparadas a una suspensión de 3x10<sup>5</sup> células por mililitro e inoculando 1mL de dicha suspensión en cada pocillo de las placas por 24 pocillos a utilizar.
- La infección se realizó al tercer día de la formación de la monocapa de células y se mantuvo a 37° C y al 5% de CO<sub>2</sub>.
- Se inoculo 0.05mL de las diferentes diluciones preparadas previamente en cada pocillo de las placas por 24 pocillos, previa eliminación del medio E-MEM 2% SBF restante en la monocapa celular.
- Se incubo 30 minutos a 37° C y al 5% de CO<sub>2</sub>.

**FIGURA N°5:** Distribución de Pre-diluciones para *Phlebovirus*.



Donde **CC** = Control de células,

**-1** = 1/10

**-2** = 1/100

**-3** = 1/1 000

**-4** = 1/10 000

**-5** = 1/100 000

**-6** = 1/1 000 000

**-7** = 1/10 000 000

**-8** = 1/100 000 000

**-9** = 1/1 000 000 000

**TABLA N°3:** Resultados de la titulación de la semilla viral para PRNT.

Semilla Viral	Dilución/ N° de placas											Titulo Virus	W.D	Línea celular	Día
	CC	Sin diluir	-1	-2	-3	-4	-5	-6	-7	-8	-9				
Candiru	0	NC	NC	NC	20.3	4.3	1.5	0	0	0	0	8.6 x10 <sup>5</sup>	1/5000	Vero- 76	5
Echarate	0	NC	NC	NC	NC	13.6	1.6	0	0	0	0	2.7 x 10 <sup>6</sup>	1/4500	Vero- 76	5
Maldonado	0	NC	NC	NC	20.6	7.6	1	0	0	0	0	1.5 x 10 <sup>6</sup>	1/2000	Vero- 76	5
Punta Toro	0	NC	NC	NC	25.3	2.67	1	0	0	0	0	5.3 x 10 <sup>5</sup>	1/1000	Vero- 76	5

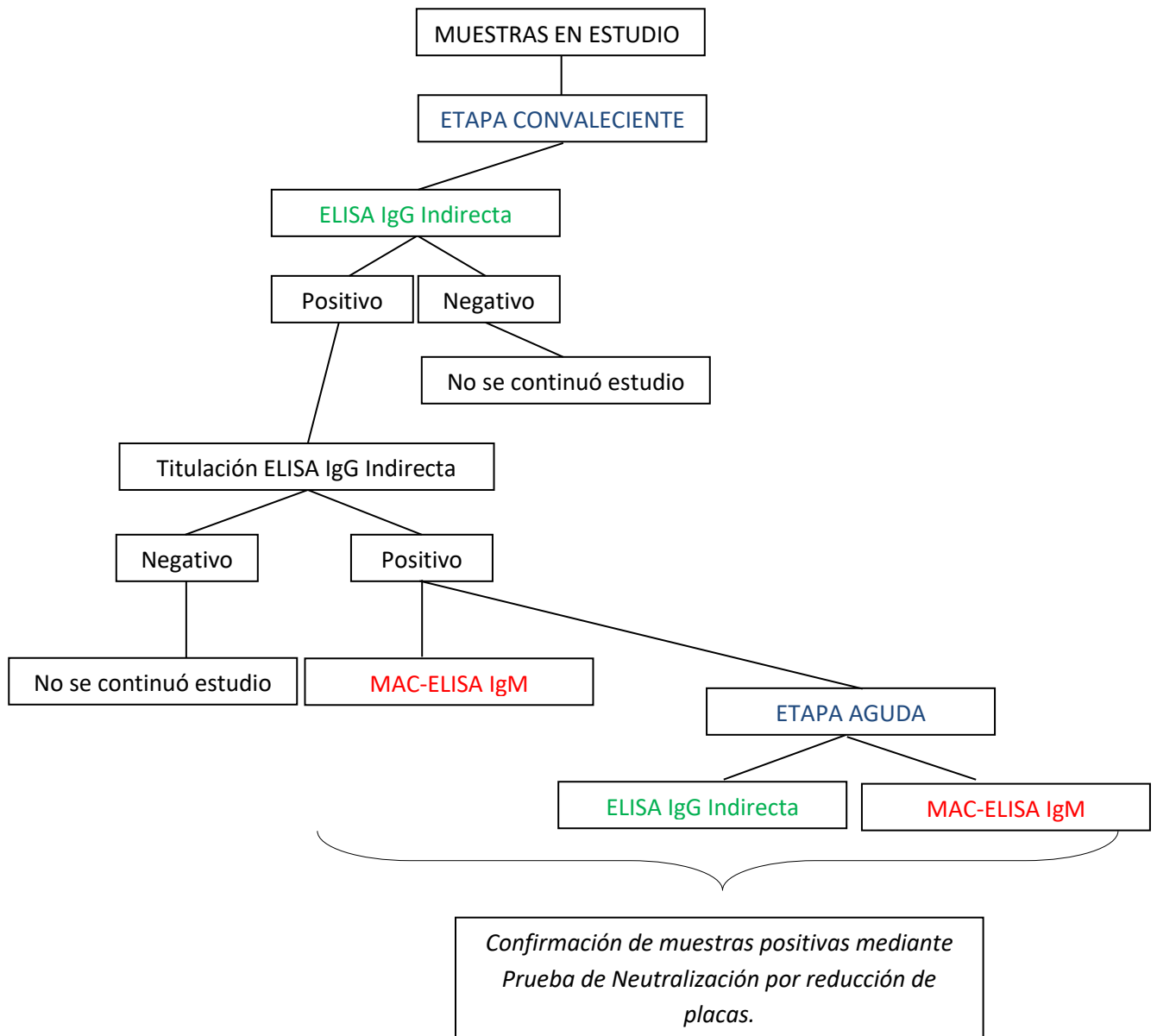
Donde CC: Células Control, NC: No es posible realizar el conteo, W.D: Se refiere a la dilución de trabajo establecida anteriormente, "Work Dilution".

Los resultados obtenidos permitieron estandarizar el título y dilución de trabajo, la línea celular y los días necesarios para el correcto crecimiento y posterior confirmación de las muestras positivas por el ensayo de ELISA.

### 3.5.2. Procedimientos

En la realización del presente trabajo se llevó a cabo la siguiente secuencia con respecto al análisis de los sueros en cada una de sus etapas (aguda y convaleciente)

**GRÁFICO N°12:** Flujograma de trabajo.





El flujograma de trabajo mostrado permitirá identificar los casos de seroconversión por causa de los *Phlebovirus* así como a los individuos que presentan infección por este virus en el momento del estudio.

#### 3.5.2.1. Obtención de la muestra

Los 2606 sueros analizados en la prueba inmunoenzimática fueron proporcionados por el banco de sueros del NAMRU-6. Muestras procedentes de Iquitos, Yurimaguas y Puerto Maldonado de los años 2010 al 2012.

*Los criterios de inclusión fueron:*

- Muestra Agudas: Muestras de pacientes con fiebre mayor de 38°C.
- Muestras Convalecientes: muestras tomadas de entre 2 a 3 semanas posteriores a la muestra de la fase aguda de la enfermedad.

#### 3.5.2.2. Áreas de estudio

*Iquitos*, capital del Departamento de Loreto, está rodeado por los ríos Nanay, Itaya y Amazonas. Presenta una población cercana a los 462 000 habitantes. La ciudad está ubicada a 106m.s.n.m posee un clima tropical lluvioso, con temperaturas que van desde los 21°C a 33°C.

Yurimaguas, Capital de la provincia del Alto Amazonas – Departamento de Loreto, está ubicada en la confluencia de los ríos Huallaga y Parapapura. Presenta una población cercana a los 70 000 habitantes. La ciudad está ubicada a 148 m.s.n.m posee un clima tropical lluvioso, con temperaturas que van desde los 26°C a 33°C.

*Puerto Maldonado*, capital del departamento de Madre de Dios, situada a orillas del río Madre de Dios, con una población aproximada de 210 000 habitantes, presenta un clima tropical, cálido, húmedo y con una temperatura promedio de 26°C.

#### 3.5.2.3. Screening de las muestras por ensayo ELISA

La primera parte del estudio corresponde a la realización de las pruebas de ELISA para la detección de anticuerpos IgG e IgM en sueros convalecientes y agudos, donde se siguió la siguiente distribución en la placa:

**FIGURA N°6:** Distribución de muestras y controles en placas de ELISA.

MAC-ELISA IgM.												
VIRUS												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BL	M1	M9	M17	M25	M33	M41	M49	M57	M65	M73	M81
B	BL	M2	M10	M18	M26	M34	M42	M50	M58	M66	M74	M82
C	(+)	M3	M11	M19	M27	M35	M43	M51	M59	M67	M75	M83
D	(-)	M4	M12	M20	M28	M36	M44	M52	M60	M68	M76	M84
E	(-)	M5	M13	M21	M29	M37	M45	M53	M61	M69	M77	M85
F	(-)	M6	M14	M22	M30	M38	M46	M54	M62	M70	M78	M86
G	(-)	M7	M15	M23	M31	M39	M47	M55	M63	M71	M79	M87
H	(-)	M8	M16	M24	M32	M40	M48	M56	M64	M72	M80	M88

ELISA INDIRECTA IgG												
VIRUS							CONTROL					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	(+)	M1	M9	M17	M25	M33	(+)	C1	C9	C17	C25	C33
B	(-)	M2	M10	M18	M26	M34	(-)	C2	C10	C18	C26	C34
C	(-)	M3	M11	M19	M27	M35	(-)	C3	C11	C19	C27	C35
D	(-)	M4	M12	M20	M28	M36	(-)	C4	C12	C20	C28	C36
E	(-)	M5	M13	M21	M29	M37	(-)	C5	C13	C21	C29	C37
F	(-)	M6	M14	M22	M30	M38	(-)	C6	C14	C22	C30	C38
G	(-)	M7	M15	M23	M31	M39	(-)	C7	C15	C23	C31	C39
H	(-)	M8	M16	M24	M32	M40	(-)	C8	C16	C24	C32	C40

Los diagramas muestran la distribución de muestras y el respectivo orden para el antígeno y su control de antígeno (en el caso del ELISA indirecta IgG), (+): Control positivo, (-): Control negativo, M1, M2, etc.: Muestras.

#### 3.5.2.4. Detección de anticuerpos IgM por MAC-ELISA (Screening)

Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, MAC-ELISA y Titulación de muestras positivas por el ensayo de MAC-ELISA.

Se realizó el screening de los sueros analizados para la detección de Inmunoglobulinas de tipo “M” mediante el ensayo MAC-ELISA.

Materiales:

- Equipos: Lavador de ELISA, Lector de ELISA, incubadora 37°Celcius, Cabina de bioseguridad, refrigeradora, congeladora -80°Celcius, vortex, pipetas multicanal de 0-20µl, 50-300µl, pipetas simples de 0-20µl, 0-200µl, 0-1000µl.
- Suministros: Tubos para centrifuga x 15mL y 50mL, pipetas serológicas 1mL a 25mL, reservorios para uso de pipetas multicanal, bolsas de bioseguridad, puntillas para pipetas 1-200µl, placas flexibles de polivinilo con 96 pocillos, crioviales, papel aluminio, tubos de ensayo para titulación, gradillas, paquetes de hielo para mantener cadena de frio.
- Reactivos: Anti-anticuerpos humanos producidos en cabra de tipo IgM, Antígeno viral para el *Phlebovirus* “x”, control de antígeno, HMAF para el *Phlebovirus* “x”, buffer diluyente de muestras, buffer diluyente para ELISA IgM, buffer de lavado, PBS 7.4 pH, HRP marcado con anti-anticuerpos de ratón G+M (Alta y baja densidad) producidos en cabra, ABTS sustrato, suero control positivo y control negativo contra *Phlebovirus*.

Procedimiento.

*Fase sólida, revestimiento de la placa:*

- Se diluyo los anti-anticuerpos humanos producidos en cabra de tipo IgM 1:1000 en PBS, se preparó cantidad suficiente para utilizar 100µl de la dilución, en los 96 pocillos de cada placa flexible nueva.

- Se dejó las placas preparadas toda la noche a 4°C, luego se lavó cada placa en el Lavador de ELISA, 5 veces utilizando 300µl de Buffer de lavado y se removió el exceso de buffer de lavado golpeando suavemente contra un papel absorbente.
- Se podrá usar las placas de inmediato o se podrá guardar a -80°celsius.

*Preparación de la muestra:*

- Dentro de una cabina de bioseguridad y asegurándose de no perder la cadena de frío, se realizó la pre-dilución de las muestras 1/10 en buffer diluyente para muestras, se alicuoto las pre-diluciones y se guardó a 4°C hasta el día de su uso.
- El día del uso se preparó una nueva dilución 1/10 de manera que la dilución final fue de 1/100.

*El ensayo MAC-ELISA:*

- Se echó 100µl de la muestra pre-diluida 1/100 en cada pocillo de la placa previamente revestida con el Anti-anticuerpo humano de tipo IgM.
- En la primera columna, se utilizó 2 blancos, 1 control positivo y 5 controles negativos, los controles fueron tratados igual que la muestra, con una dilución final 1/100.

Para la titulación de muestras positivas:

- Se realizó titulaciones en las siguientes diluciones: 1/100, 1/400, 1/1600, 1/6400, en buffer diluyente para ELISA.
- En las placas de 96 pocillos se consideró dos partes: Sección de antígeno *Phlebovirus* "X" (columna 1 a 6) y la sección de Control de Antígeno (Columna 7 a 12), teniendo cuenta colocar 1 control positivo y 7 controles negativos en la primera columna.
- Se continuó con el ensayo MAC-ELISA.
- a) Se envolvió las placas en papel aluminio y se incubo por 1 hora a 37°C, pasado el tiempo estimado, se lavó las placas en el Lavador de ELISA, 5

veces utilizando 300µl de buffer de lavado y se eliminó el excedente del buffer de lavado golpeando suavemente contra un papel absorbente.

- Se adiciono 100µl del antígeno viral preparado al 2% de suero humano normal, se repitió el paso a).
- A continuación se adiciono 100µl del HMAF específico diluido 1/500 en buffer diluyente para ELISA, se repitió el paso a).
- Se agregó 100µl de conjugado HRP marcado con anti-anticuerpos de ratón G+M (Alta y baja densidad) a una dilución 1/4000 con buffer diluyente para ELISA IgM, se repitió el paso a).
- Se echó 100µl del sustrato ABTS a cada pocillo y se incubo por 30 minutos a 37°C y se procedió a la lectura y análisis de las placas a una longitud de onda ( $\lambda$ ) 405nm.

Los esquemas de la preparación de los buffers utilizados en los ensayos de ELISA se describen en el **ANEXO 3**. El flujograma de la preparación del HMAF para *Phlebovirus* se detalla en el **ANEXO 4**.

#### 3.5.2.5. Detección de anticuerpos IgG por ELISA indirecta (Screening)

Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, para la detección de inmunoglobulinas G, ELISA indirecta y Titulación de muestras positivas por el ensayo de ELISA Indirecta.

Se realizó el screening de los sueros analizados para la detección de Inmunoglobulinas de tipo “G” mediante el ensayo ELISA-Indirecta.

Materiales.

- Equipos: Lavador de ELISA, Lector de ELISA, incubadora 37°C, Cabina de bioseguridad, refrigeradora, congeladora -80°C Celcius, vortex, pipetas multicanal de 0-20µl, 50-300µl, pipetas simples de 0-20µl, 0-200µl, 0-1000µl.
- Suministros: Tubos para centrifuga x 15mL y 50mL, pipetas serológicas 1mL a 25mL, reservorios para uso de pipetas multicanal, bolsas de bioseguridad, puntillas para pipetas 1-200µl, placas flexibles de polivinilo con 96 pocillos,

crioviales, papel aluminio, tubos de ensayo para titulación, gradillas, paquetes de hielo para mantener cadena de frío.

- Reactivos: Antígeno viral lisado, control de antígeno lisado, buffer diluyente de muestras, buffer diluyente para ELISA IgG, buffer de lavado, PBS 7.4 pH, KLP HRP marcado con anti-anticuerpos humanos de tipo IgG producidos en cabra, ABTS sustrato, HMAF de los diferentes *Phlebovirus*,

Procedimiento.

*Fase sólida, revestimiento de la placa:*

- Se preparó antígeno lisado viral para el *Phlebovirus* específico y el control de antígeno lisado, ambos a la correcta dilución (Antígeno lisado CDU, ESC, MLO y PTV = 1/500, Control de antígeno lisado = 1/1000) con suficiente solución PBS 1x.
- La distribución de la placa de 96 pocillos fue la siguiente: columnas 1 a 6 se colocó 100µl del antígeno lisado viral específico para *Phlebovirus*, y columnas 7 a 12 se colocó el control 100µl del antígeno lisado en cada pocillo respectivamente.
- Se dejó en reposo las placas preparadas por 12 horas a 4°C, posteriormente y antes de su uso, se lavó la placa en el lavador de ELISA 5 veces utilizando 300µl de buffer de lavado y se removió el exceso golpeando suavemente contra un papel absorbente.

*Preparación de la muestra:*

- Dentro de una cabina de bioseguridad y asegurándose de no perder la cadena de frío, se realizó la pre-dilución de las muestras 1/10 en buffer diluyente para muestras, se alicuoto las pre-diluciones y se guardó a 4°C hasta el día de su uso.
- El día del uso se preparó una nueva dilución 1/10 de manera que la dilución final fue de 1/100.

*El ensayo ELISA Indirecta:*

- Contando con las placas lavadas y fijadas con el Antígeno y el control de antígeno lisado para el *Phlebovirus* específico, se procedió a depositar 100µl de la dilución final de trabajo previamente preparada.

Para la titulación de muestras positivas:

- Se realizó titulaciones en las siguientes diluciones: 1/100, 1/400, 1/1600, 1/6400, en buffer diluyente para ELISA.
- En las placas de 96 pocillos se consideró dos partes: Sección de antígeno para el *Phlebovirus* específico” (columna 1 a 6) y la sección de Control de Antígeno lisado para el *Phlebovirus* específico (Columna 7 a 12), teniendo cuenta colocar 1 control positivo y 7 controles negativos en la primera columna.
- Se continuó con el ensayo ELISA Indirecta.
- a) Se envolvió las placas en papel aluminio y se incubo por 1 hora a 37°C, pasado el tiempo estimado, se lavó las placas en el Lavador de ELISA, 5 veces utilizando 300µl de buffer de lavado y se eliminó el excedente del buffer de lavado golpeando suavemente contra un papel absorbente.
- Se adiciono 100µl del conjugado KPL HRP marcado con anti-anticuerpos humanos IgG preparados en cabra, a la óptima dilución de 1/8000 en buffer diluyente para ELISA IgG, se repitió el paso a).
- Se echó 100µl del sustrato ABTS a cada pocillo y se incubo por 30 minutos a 37°C.
- Se procedió a la lectura y análisis de las placas a a una longitud de onda ( $\lambda$ ) 405nm.

Los esquemas de la preparación de los buffers utilizados en los ensayos de ELISA se describen en el **ANEXO 3**.

#### 3.5.2.6. Valor de absorbancia.

El valor de la absorbancia de una muestra en la prueba de ELISA se obtiene sustrayendo el valor de Densidad Óptica (D.O) del control negativo. La diferencia es el valor resultante de la muestra.

Muestras con D.O. mayores que el promedio de absorbancia de los negativos más tres desviaciones estándar fueron consideradas positivas.

Este Valor de Corte (VC) se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$VC = \bar{X}_{\text{Controles Negativos}} + 3 (SD_{\text{Controles negativos}})$$

Dónde:

SD = Desviación Estándar

X = Promedio de controles negativos

La llamada “zona gris” en la prueba de ELISA se denomina a los valores de absorbancia cercanos al valor de corte, en el cual el resultado no puede ser diagnosticado al 100% como positivo o negativo. El intervalo en el cual se encuentra la “zona gris” es de + / - 10% del valor de corte.

En el presente estudio se tomó como valor de corte para señalar una muestra como positiva.  $D.O \leq 0.25$ , esto para eliminar la “zona gris” y aumentar la especificidad de los resultados.

- Para cada muestra, la última dilución con título positivo, fue considerado como título de la muestra.
- Control positivo: valores mayores o iguales a D.O 1.000
- Control negativo y blanco: valores menores o iguales a D.O. 0.200

#### 3.5.2.7. Confirmación de las muestras por PRNT.

Se realizó la prueba de PRNT con la finalidad de confirmar las muestras positivas tituladas por la prueba de screening MAC-ELISA y ELISA indirecta.

En el caso de la prueba de PRNT que se realizó en el presente estudio fue necesario estandarizar con anterioridad la dilución del virus a la cual se debe de trabajar, así como el día óptimo para la coloración después de la incubación.



#### Materiales:

- Equipos: Cabina biológica de bioseguridad clase II, Incubadoras de 37°C, al 5% de CO<sub>2</sub>, congelador de -70°C y -20°C, Refrigerador de 4°C, Baño María 56°Celcius, vortex.
- Suministros: Pipetas mecánicas 2-20µl, 20-100µ, 100-1000µl y 50µl, pipetas multicanal 5-50µl, 30-300µl, 20-200µl, pipetas serológicas estériles 50, 25, 10, 5, y 1mL, Puntillas para pipetas 200µl, 1000µl, reservorios por 100mL, placas para cultivo celular por 24 pocillos, tubos estériles por 5mL, 15mL y 50mL, Botellas estériles por 250mL y 500mL, racks, parafilm.
- Reactivos: Medio E-MEM al 2% SBF, medio Agarosa, solución Colorstain, células Vero-76, células BHK-21, Semilla viral para los diferentes *Phlebovirus*, HMAF para los diferentes *Phlebovirus*.

#### Procedimiento.

##### *Inactivación de las muestras positivas:*

- Se dispense 100µl de cada suero en placas de 96 pocillos por *Phlebovirus*.
- Se recubrió con parafilm y se colocó las placas a 56°C en baño maría por 30 minutos para evitar que los componentes del sistema del complemento interfieran con los resultados, ocasionando falsos negativos.

##### *Dilución de las muestras positivas:*

- Dentro de la cabina de bioseguridad se rotulo los sueros según el *Phlebovirus* a confirmar y se realizaron diluciones seriadas desde 1/20 hasta 1/320 con medio diluyente E-MEM al 2%SBF respetando la cadena de frio.
- Se dispense las diluciones en placas de 96 pocillos previamente rotuladas.

##### *Dilución de la semilla viral:*

- En base al número de muestras positivas por confirmar se preparó suficiente dilución de trabajo y se calculó el volumen final según la cantidad de placas de 96 pocillos a utilizar, siendo recomendado el uso de 8mL de la dilución de trabajo por placa.

- Se obtuvo los cálculos del W.D para cada *Phlebovirus* de los resultados de la titulación de las diferentes semillas virales, visto anteriormente.
- Se utilizó suficiente semilla viral como diluyente E-MEM 2%SBF según los cálculos y respetando la cadena de frío. **TABLA N°3.**
- Se dispuso 60µl del W.D en cada pocillo conteniendo las diluciones de las diferentes muestras por confirmar, previamente preparadas en el punto anterior, obteniendo diluciones seriadas finales de 1/40, 1/80, 1/160, 1/320 y 1/640. **TABLA N°5.**

*Controles:*

- Se usó como controles negativos y positivos, fluido ascítico hiperinmune de ratón (HMAF) tratados de la misma forma que las muestras.

**TABLA N°4:** Calculo de la dilución de trabajo (W.D) para *Phlebovirus*.

<b>Semilla viral: Echarate</b>	<b>W.D</b>
0.5mL semilla viral + 4.5mL diluyente E-MEM 2%SBF.	1/10
0.5mL (1/10) + 4.5mL diluyente E-MEM 2%SBF.	1/100
0.5mL (1/100) + 4.5mL diluyente E-MEM 2%SBF.	1/1000
2mL (1/1000) + 7mL diluyente E-MEM 2%SBF.	1/4500
<b>Volumen Final = 9mL</b>	

























<b>Semilla viral: Maldonado</b>	<b>W.D</b>
1mL semilla viral + 9mL diluyente E-MEM 2%SBF.	1/10
1mL (1/10) + 9mL diluyente E-MEM 2%SBF.	1/100
1mL (1/100) + 9mL diluyente E-MEM 2%SBF.	1/1000
6mL (1/1000) + 6mL diluyente E-MEM 2%SBF.	1/2000
<b>Volumen Final = 12mL</b>	

<b>Semilla viral: Punta Toro</b>	<b>W.D</b>
1mL semilla viral + 9mL diluyente E-MEM 2%SBF.	1/10
1mL (1/10) + 9mL diluyente E-MEM 2%SBF.	1/100
2mL (1/100) + 18mL diluyente E-MEM 2%SBF.	1/1000
<b>Volumen Final = 20mL</b>	



**TABLA N°5:** Dilución de las muestras positivas y dilución de trabajo (W.D)

METODO SEMISOLIDO			
FILA		DILUCION DE LA MUESTRA	DILUCION FINAL DE LA MUESTRA (+ 60µl W.D)
1°	6µl Suero + 114µl diluyente	1/20	1/40
2°	60µl (1/20) + 60µl diluyente	1/40	1/80
3°	60µl (1/40) + 60µl diluyente	1/80	1/160
4°	60µl (1/80) + 60µl diluyente	1/160	1/320
5°	60µl (1/160) + 60µl diluyente	1/320	1/640

**FIGURA N°7:** Distribución de la placa control para PRNT.

	CONTROLES						DILUCIONES
	C+		C-		W.D		
A							1/40
B							1/80
C							1/160
D							1/640

**FIGURA N°8:** Distribución de las muestras en las placas de PRNT.

	MUESTRAS						DILUCIONES
	1		2		3		
A							1/40
B							1/80
C							1/160
D							1/640

### *Plaqueo:*

- En una cabina de bioseguridad se utilizó placas de 24 pocillos con monocapa de células Vero-76.
- Se dispense 50µl por duplicado de la mezcla preparada (Muestra + W.D) por cada pocillo, de igual manera se trabajaron los controles negativos y positivos.
- Se incubo las placas por 1 hora a 37°C a una atmosfera del 5% de CO<sub>2</sub>rotándolas cada 15 minutos.
- Se procedió a la preparación del medio solido Overlay y se dispense 0.5mL en cada pocillo y se dejaron las placas en la cabina por 10 minutos para conseguir la solidificación.
- Se incubaron las placas a 37°C a una atmosfera del 5% de CO<sub>2</sub>por cinco días.
- Luego del periodo de incubación se adiciono en cada pocillo 0.5mL-1.0mL del preparado Colorstain y se mantuvo por un mínimo de 6 horas.
- Se retiró cuidadosamente la agarosa de cada pocillo y se realizó el conteo de las placas formadas por pocillo.

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

*Donde Ufp = Unidad Formadora de Placas.*

- Las muestras que presentaron un porcentaje de reducción del 70% en las diluciones se consideraron positivas.

La preparación del Overlay y Colorstain se observa en el **ANEXO 6** y **ANEXO 7** respectivamente.

### **3.6. Plan de Análisis de Datos**

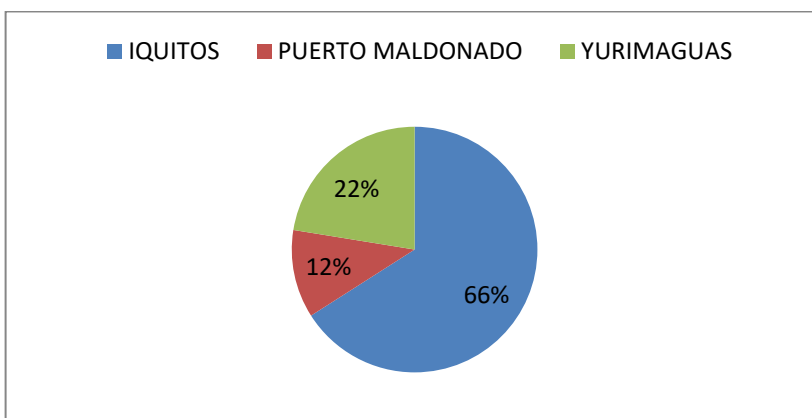
Los datos obtenidos fueron comparados utilizando hojas de cálculos estadísticos en formato Microsoft Office Excel Professional Plus 2010, para luego ser plasmados en cuadros resumidos en el presente trabajo de investigación.

## CAPITULO IV: RESULTADOS ESTADÍSTICOS

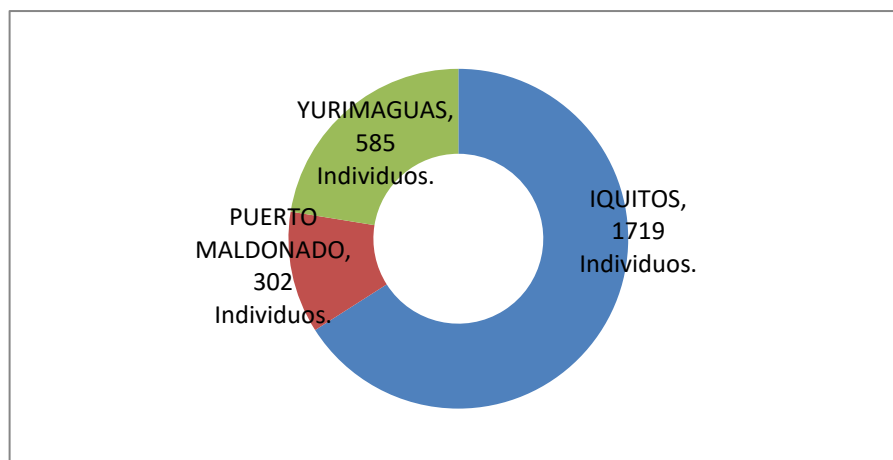
### 4.4. Resultados

En el estudio se analizaron muestras pareadas (etapa aguda y convaleciente) de un total de 2606 individuos, los cuales cumplieron con los criterios de inclusión de muestras, procedentes de Iquitos, Yurimaguas y Puerto Maldonado. La distribución de los individuos según área de procedencia se observa en los siguientes cuadros: Se observa predominancia de muestras febriles en la ciudad de Iquitos y Yurimaguas.

**FIGURA N°9:** Porcentaje de individuos por ciudad de procedencia.



**FIGURA N°10:** Número de individuos por ciudad.



#### 4.4.1. Detección de anticuerpos IgG.

De acuerdo al flujograma presentado anteriormente en el **GRAFICO N°12** como primer paso se analizaron mediante la prueba de ELISA Indirecta para la detección de anticuerpos de tipo IgG (ELISA-Indirecta IgG) los sueros con síndrome febril en la etapa convaleciente del total de muestras pareadas seleccionadas. Se obtuvieron los siguientes resultados:

**TABLA N°6:** Total de positivos por ELISA-Indirecta IgG (Convalecientes)

	<b>TOTAL POSITIVOS</b>		
	Total	Numero	%
IQUITOS	1719	5	0.29%
YURIMAGUAS	585	0	0%
PUERTO MALDONADO	302	1	0.33%
	<b>2606</b>	<b>6</b>	<b>0.23%</b>

De las muestras en etapa convaleciente que resultaron positivas, se seleccionó su respectiva muestra en etapa aguda para ser analizada por ELISA-Indirecta IgG, obteniendo los siguientes resultados:

**TABLA N°7:** Total de positivos por ELISA-Indirecta IgG (agudos)

	<b>TOTAL POSITIVOS</b>		
	Total	Numero	%
IQUITOS	1719	5	0.29%
YURIMAGUAS	585	0	0%
PUERTO MALDONADO	302	1	0.33%
	<b>2606</b>	<b>6</b>	<b>0.23%</b>

Siguiendo con el flujograma propuesto se llevó a cabo la confirmación de las muestras tanto agudas como convalecientes, con resultado positivo en la detección



de anticuerpos IgG. Esta confirmación se llevó a cabo mediante la prueba de PRNT con los siguientes resultados:

**TABLA N°8:** Resultados Confirmados por PRNT.

	MUESTRA			
	Convalecientes		Agudas	
	ELISA	PRNT	ELISA	PRNT
Iquitos	5	1	5	1
Yurimaguas	0	0	0	0
Puerto Maldonado	1	1	1	1
<b>Total</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>6</b>	<b>2</b>

De los resultados obtenidos tanto en las muestras convalecientes y agudas confirmadas por PRNT, se determinó la cantidad de individuos que presentan y no presentan seroconversión, por ambos criterios (aparición o el aumento de 4 o más veces del título de anticuerpos entre dos muestras pareadas). Además, de la cantidad total de individuos que presentan anticuerpos del tipo IgG contra *Phlebovirus*.

**TABLA N°9:** Resultados con respecto a la detección de anticuerpos IgG.

	Total individuos	Sin seroconversión		Con seroconversión		Total prevalencia	
		n°	%	n°	%	n°	%
Iquitos	1719	4	0.23	1	0.06	5	0.29
Yurimaguas	585	0	0	0	0	0	0
Puerto Maldonado	302	0	0	1	0.33	1	0.33

<b>Total</b>	<b>2606</b>	<b>4</b>	<b>0.15</b>	<b>2</b>	<b>0.07</b>	<b>6</b>	<b>0.23</b>
--------------	-------------	----------	-------------	----------	-------------	----------	-------------

En resumen, se obtuvo una prevalencia total del 0.23% (6 individuos) de los cuales 2 individuos que presentan el 5.5% de la prevalencia total y el 0.08 de la población estudiada. Cabe tener en cuenta que la mayor tasa de prevalencia y seroconversión se dio en Puerto Maldonado y que ninguna tasa fue evidenciada en Yurimaguas.

#### 4.4.2. Detección de anticuerpos IgM.

Se analizaron por ELISA para la detección de anticuerpos IgM (Mac-ELISA) las muestras que resultaron positivas por ELISA Indirecta IgG y su respectiva muestra aguda sin obtenerse resultados positivos. En el siguiente cuadro se observan los resultados obtenidos de las muestras pareadas que obtuvieron resultados positivos por ELISA Indirecta IgG.

**TABLA N°10:** Resultados por MAC-ELISA.

			ELISA Indirecta IgG		MAC-ELISA		PRNT		
		CODIGO	D.O <sub>405</sub>	Result.	D.O <sub>405</sub>	Result.	%	Result.	
IQUITOS	AGUDA	FPI02389	0.597	P	0.113	N	74	1/180	
	CONVAL.	FPI02470	1.000	P	0.104	N	87	1/180	
	AGUDA	FPI02356	0.315	P	0.045	N	-	N	
	CONVAL.	FPI02481	0.455	P	0.036	N	-	N	
	AGUDA	FPI02490	0.402	P	0.078	N	-	N	
	CONVAL.	FPI02538	0.347	P	0.066	N	-	N	
	AGUDA	FPI02735	0.701	P	0.056	N	-	N	
	CONVAL.	FPI02783	1.842	P	0.042	N	-	N	
	AGUDA	FPI00096	0.401	P	0.026	N	-	N	
	CONVAL.	FPI00200	0.367	P	0.008	N	-	N	
	PUERTO MALDONADO	AGUDA	FPM00059	0.500	P	0.065	N	92	1/640
		CONVAL.	FPM00085	0.693	P	0.021	N	86	1/640

D.O<sub>405</sub>: Densidad Óptica a 405nm, N: negativo, P: positivo, %: Porcentaje de reducción.

Con todos los datos obtenidos después de realizar las pruebas de ELISA y su posterior confirmación mediante PRNT se procedió a realizar la distribución de los mismos por sexo y grupo etario.

**TABLA N°18:** Cuadro de Correlación de anticuerpos IgM (MAC-ELISA) e IgG (ELISA INDIRECTA)

IgG		IgM		INTERPRETACION
D.O <sub>405</sub>	Result.	D.O <sub>405</sub>	Result.	
0.597	POSITIVO	0.113	NEGATIVO	Sintomatología febril no fue a causa de <i>Phlebovirus</i> por negatividad <b>IgM</b> , Anticuerpos de memoria <b>IgG</b> , señalan enfermedad pasada a la toma de la muestra.
1.000	POSITIVO	0.104	NEGATIVO	
0.315	POSITIVO	0.045	NEGATIVO	
0.455	POSITIVO	0.036	NEGATIVO	
0.402	POSITIVO	0.078	NEGATIVO	
0.347	POSITIVO	0.066	NEGATIVO	
0.701	POSITIVO	0.056	NEGATIVO	
1.842	POSITIVO	0.042	NEGATIVO	
0.401	POSITIVO	0.026	NEGATIVO	
0.367	POSITIVO	0.008	NEGATIVO	
0.5	POSITIVO	0.065	NEGATIVO	
0.693	POSITIVO	0.021	NEGATIVO	

#### 4.4.3. Prevalencia por sexo.

**TABLA N°11:** Distribución de la prevalencia por sexo.

	<b>SEXO</b>									
			Masculino				Femenino			
	TOTAL		ELISA IgG		PRNT		ELISA IgG		PRNT	
	ELISA	PRNT	n°	%	n°	%	n°	%	n°	%
Iquitos	5	1	1	20	0	0	4	80	1	100
Puerto Maldonado	1	1	0	0	0	0	1	100	1	100
<b>Total:</b>	<b>6</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>16.6</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>83.3</b>	<b>2</b>	<b>100</b>

Tomando en cuenta la prevalencia total de positivos, se presenta mayor cantidad de individuos de sexo femenino (4 – 80% por ELISA IgG y 1 – 100% por PRNT) que el sexo masculino (1 – 20% por ELISA IgG y ninguno por PRNT) en la ciudad de Iquitos, existiendo diferencia significativa entre ellos.

Con respecto a la ciudad de Puerto Maldonado el 100% del resultado positivo por ELISA IgG y PRNT fue del sexo femenino (1 – 100% por ELISA IgG y 1- 100% por PRNT) donde ambas muestras se trataron del mismo paciente.

#### 4.4.4. Prevalencia por grupo etario.

**TABLA N°12:** Distribución de la prevalencia por grupo etario por prueba de ELISA.

	TOTAL POR ELISA	GRUPOS ETARIOS							
		15 - 25 años		25 - 35 años		35 - 45 años		45 - 55 años	
		n°	%	n°	%	n°	%	n°	%
Iquitos	5	1	20	0	0	0	0	4	80
Puerto Maldonado	1	0	0	1	100	0	0	0	0
<b>Total:</b>	<b>6</b>	<b>1</b>	<b>16.6</b>	<b>1</b>	<b>16.6</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>4</b>	<b>66.6</b>

Tomando en cuenta el global de los resultados positivos obtenidos por ELISA:

La distribución de la prevalencia obtenida, con respecto al grupo etario muestra un mayor porcentaje en Iquitos, en el grupo etario de 45 – 55 años (80% de las 5 muestras positivas por ELISA IgG), seguido por el grupo etario 15 – 25 años (20% de las 5 muestras positivas por ELISA IgG). En Puerto Maldonado solo se obtuvo 1 muestra positiva en el grupo etario 25 – 35 años (considerado como el 100% por ensayo de ELISA IgG).

**TABLA N°13:** Distribución de la prevalencia por grupo etario por confirmación PRNT.

	TOTAL POR PRNT	GRUPOS ETARIOS							
		15 - 25 años		25 - 35 años		35 - 45 años		45 - 55 años	
		n°	%	n°	%	n°	%	n°	%
Iquitos	1	0	0	0	0	0	0	1	100
Puerto Maldonado	1	0	0	1	100	0	0	0	0
<b>Total:</b>	<b>2</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>50</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>	<b>50</b>

Tomando en cuenta el global de los resultados positivos obtenidos por PRNT:

La distribución de la prevalencia obtenida, con respecto al grupo etario muestra un único resultado positivo en Iquitos dentro del grupo etario 45 – 55 años, de igual manera para la ciudad de Puerto Maldonado se obtuvo un único resultado positivo dentro del grupo etario 25 – 35 años (Ambos resultados obtenidos por la prueba de confirmación PRNT).

4.4.5. Prevalencia por sexo y grupo etario.

**TABLA N°14:** Resultados de la prevalencia por Sexo y Grupo etario.

	MASCULINO		FEMENINO	
	T.P	T.P	T.P	T.P
	ELISA	PRNT	ELISA	PRNT
<b>15 - 25 años</b>	0	0	1	0
<b>25 - 35 años</b>	0	0	1	1
<b>35 - 45 años</b>	0	0	0	0
<b>45 - 55 años</b>	1	0	3	1
	<b>%</b>		<b>50</b>	<b>100</b>

T.P ELISA = Total Positivos por ELISA

T.P PRNT = Total Positivos por PRNT

Se determinó la prevalencia por grupo etario y sexo tomando los datos globales de los individuos positivos por ELISA IgG y PRNT. La mayor prevalencia se presenta en los individuos de sexo femenino > 45 años.

4.4.6. Prevalencia por *Phlebovirus*.

**TABLA N°15:** Resultados de la prevalencia de *Phlebovirus* por ciudad.

	TOTAL SUEROS	ESC		MLO		CDU		PTV	
		n°	%	n°	%	n°	%	n°	%
IQUITOS	1719	0	0	5	0.29	0	0	0	0
YURIMAGUAS	585	0	0	0	0	0	0	0	0
PUERTO MALDONADO	302	1	0.33	0	0	0	0	0	0
<b>TOTAL:</b>	<b>2606</b>	<b>1</b>	<b>0.04</b>	<b>5</b>	<b>0.19</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

ESC = Echarate Virus, MLO = Maldonado Virus, CDU = Candiru  
Virus, PTV = Punta Toro Virus

Los resultados fueron tomados del total de las muestras estudiadas por ciudad, en Iquitos, se obtuvo la mayor cantidad de sueros positivos para el virus Maldonado (0.29% del total de las muestras estudiadas incluidas en el estudio en los años 2010 al 2012), pero mayor prevalencia para el virus Echarate (0.33% del total de las muestras estudiadas incluidas en el estudio en los años 2010 al 2012). En el caso de la ciudad de Yurimaguas no se encontró ningún suero positivo para *Phlebovirus*.



**TABLA N°16:** Resultados de la prevalencia de *Phlebovirus* por Prueba.

<b>Virus</b>	<b>T.P ELISA</b>	<b>T.P PRNT</b>
ESC	1	1
MLO	5	1
CDU	0	0
PTV	0	0
<b>Total:</b>	<b>6</b>	<b>2</b>

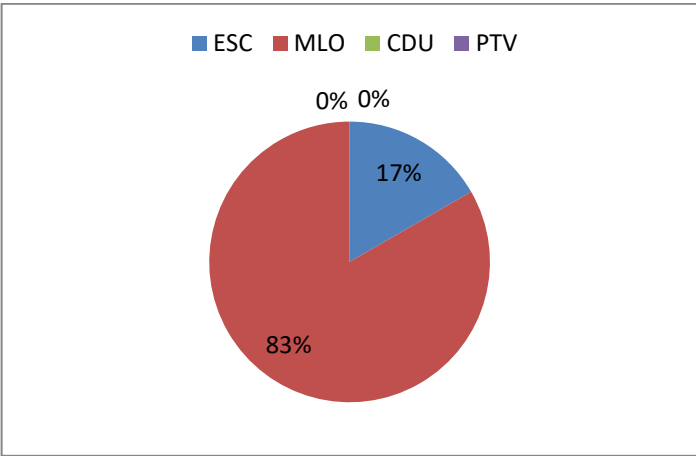
T.P PRNT = Total de pruebas positivos  
por ELISA.

T.P PRNT = Total de pruebas positivos  
por PRNT.

Se obtuvieron los resultados en base al total de sueros positivos por el ensayo de ELISA IgG y la prueba de PRNT.

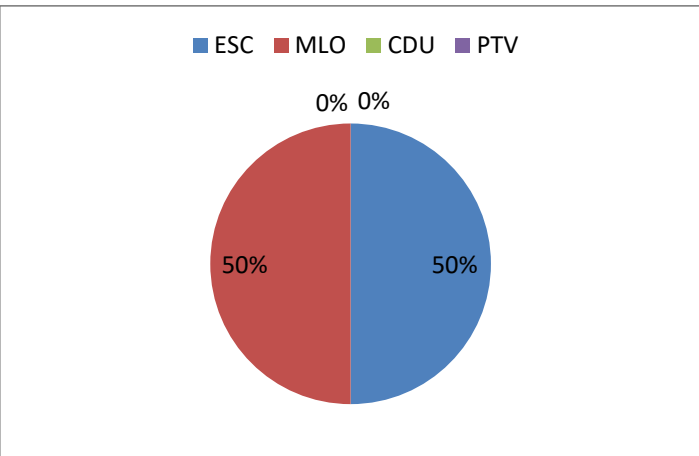
Para el virus Echarate, se obtuvo un solo resultado positivo (muestra aguda y convaleciente) por ensayo de ELISA IgG y posterior confirmación por PRNT. Para el virus Maldonado, se obtuvo en la primera fase del estudio 5 sueros positivos por el ensayo de ELISA IgG (muestra aguda y convaleciente) y en su posterior confirmación por la prueba de PRNT, solo se obtuvo un resultado positivo. No se encontró reacción positiva para los *Phlebovirus* Candiru y Punta Toro.

**FIGURA N°11:** Total de positivos por ELISA.



Con respecto al total de los sueros que dieron reacción positiva por ensayo de ELISA IgG los porcentajes fueron del 17% para el virus Echarate y el 83% para el virus Maldonado.

**FIGURA N°12:** Total de positivos por PRNT.



Con respecto al total de los sueros que dieron reacción positiva por la prueba de PRNT los porcentajes fueron iguales: 50% para el virus Echarate y 50% para el virus Maldonado.

**TABLA N°17:** Análisis de sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA

ELISA	PRNT "Gold Standard"		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	2	3	5
Negativo	1	1718	1719
Total	3	1721	1724

Estudio en base a tabla de contingencia 2x2.

Una vez estandarizada la prueba de ELISA Indirecta IgG se comparó los resultados obtenidos por grupo de 1724 sueros seleccionados de la ciudad de Iquitos, con su confirmación por la prueba de PRNT "gold standard". Se realizó el análisis para hallar la sensibilidad y especificidad de la prueba, utilizando una tabla de contingencia 2x2 para la evaluación de una prueba diagnóstica. Los resultados obtenidos fueron de:

Sensibilidad: 66.67%

Especificidad: 99.82%

Además de hallar la sensibilidad y especificidad de la prueba se halló la concordancia de los resultados, mediante la determinación de índice kappa, el cual nos ofrece una estimación del grado de acuerdo debido al azar, a partir de la proporción de acuerdo observado (Po) y la proporción de acuerdo esperado (Pe).

$K = 0.50$

Grado de concordancia = Moderado

#### 4.4.7. Discusión de resultados

El estudio de Cruz Malpica et al., 2001, es el mejor precedente en este estudio. Se encontró una diferencia significativa en las muestras de Iquitos publicado por Cruz Malpica [16.25%] a diferencia de nuestro estudio con [0.29%] teniendo en cuenta que el número de individuos incluidos en el primer estudio es de 400, cantidad mucho menor al utilizado en el presente estudio (1719) solo en la ciudad de Iquitos. Con respecto a la ciudad de Yurimaguas (585) y Puerto Maldonado (302) la prevalencia total obtenida fue de 0% y 0.33% respectivamente siendo el presente el primer estudio realizado en las ciudades en mención.

A diferencia del primer estudio realizado por Cruz Malpica et al., 2001, donde los resultados fueron del 13.85% de positividad por PRNT, el actual estudio obtuvo que la prevalencia del 0.29% (Iquitos) correspondía al *Phlebovirus* Maldonado original de la ciudad de Puerto Maldonado y la prevalencia del 0.33% (Puerto Maldonado) correspondía al *Phlebovirus* Echarate original de la ciudad de Cuzco, Mientras que el primer estudio en el 2001 realizó un estudio general para *Phlebovirus* indistintamente del complejo serológico u especie. (3).

En nuestro estudio realizado los datos que están relacionados al sexo y grupo etario mostró una mayor prevalencia que se presenta en los individuos de sexo femenino mayores de 45 años.

La geografía posee condiciones que permiten al virus estar en ese hábitat presentándose una mayor prevalencia en climas tropicales (Iquitos, Yurimaguas y Puerto Maldonado), es en estas latitudes donde encontramos los reservorios (roedores) y vectores (*Lutzomyia spp*).

En nuestro país no se han reportados casos de infección por *Phlebovirus* ni se han realizado estudios amplios en Roedores. Aunque existe la posibilidad de infección de estos animales, no se descarta que el virus esté presente en nuestro país. En el presente estudio se ha comprobado la existencia de infección en humanos por seroconversión de anticuerpos IgG.

Las búsquedas empleando el test de ELISA fueron realizadas inicialmente con las muestras tomadas en la fase convaleciente de la infección. Los pacientes que resultaron positivos al primer ensayo, fueron evaluados empleando sueros obtenidos en fase aguda de la infección con el fin de confirmar la seroconversión. Todos los sueros positivos por ensayo de ELISA (agudos y convalecientes) fueron comparados con un patrón referencial o “gold standard” (PRNT) prueba que permite evaluar la actividad neutralizante de los anticuerpos específicos contra los diferentes *Phlebovirus* analizados.

Es importante mencionar que a diferencia de los virus propagados en las células utilizadas para los ensayos de ELISA IgG e IgM, el virus utilizado para la prueba de PRNT no fue inactivado por BEI. Todos los sueros fueron a su vez inactivados por calor (56°C) por 30 minutos, con el fin de eliminar sustancias neutralizantes inespecíficas (complemento y otros factores lábiles inespecíficos) capaces de afectar los resultados, de forma que se aprecie la actividad neutralizante de los anticuerpos sin interferencia alguna.

Con respecto a la sensibilidad y especificidad de la prueba de ELISA IgG utilizada en este estudio se aplicó una tabla de contingencia 2x2 para la evaluación de una prueba diagnóstica. Esta tabla permite hallar mediante la cantidad de los resultados confirmados por una prueba “gold standard”, prueba de PRNT; la sensibilidad y especificidad de una manera sencilla y precisa. Obteniéndose una sensibilidad de 66.67% y una especificidad del 99.82%. **ANEXO 8.**

La prueba de ELISA posee una elevada sensibilidad (del 60% hasta 100%), sin embargo ocasionalmente reporta falsos positivos, por esta razón es importante la comparación de sus resultados con el patrón de referencia, dado que se requiere una alta especificidad de los anticuerpos para poseer actividad neutralizante. Se determinó el grado de acuerdo a la prueba de ELISA y la de PRNT mediante al índice significativo de Kappa ( $\kappa = 0.50$ ) teniendo en cuenta que la máxima concordancia posible corresponde a  $\kappa = 1$  y el mínimo valor  $\kappa = 0$  que se obtiene cuando la concordancia observada es precisamente la que se espera a causa exclusivamente del azar.

Al encontrar anticuerpos contra *Phlebovirus* (MLO y ESC), en los sueros de los pacientes estudiados podemos inferir que los *Phlebovirus* están presentes en las localidades incluidas en el estudio, sin embargo a pesar de que estos sueros contengan una alta concentración de anticuerpos, esto no afirma que la infección que produjo los síntomas que afectaron al paciente al momento de la toma de la muestra (Viremia) haya sido producida necesariamente por *Phlebovirus*.

Debido a una larga vida media de los anticuerpos IgG en sangre no es posible determinar mediante una sola muestra de suero si el paciente tuvo contacto con el virus, ya sea antes o después en el tiempo en el momento que se tomó la muestra.

Debido a esto es importante que los pacientes incluidos en estudios similares o como en nuestro caso, tengan una muestra de suero en la fase aguda de la enfermedad y otra en la fase convaleciente.

Esto permitirá comparar los resultados de ELISA IgG entre las dos muestras, si la muestra tomada en la fase aguda fue negativa y la convaleciente positiva o simplemente se encontró un aumento de mínimo cuatro títulos entre ambas, podremos considerar que el agente causante de la respuesta inmunológica por anticuerpos IgG fue por *Phlebovirus* en este caso Maldonado o Echarate. Por ser los hallados en el estudio.

La prueba de MAC-ELISA proporciona información adicional debido a la corta vida media de estos anticuerpos IgM en sangre, estos anticuerpos aparecen dentro de la primera semana, siendo los primeros en actuar en la respuesta humoral y permaneciendo en concentraciones detectables en sangre aproximadamente dos semanas desde el inicio de la infección. El no encontrar positividad por el ensayo de MAC-ELISA en las muestras analizadas permite asumir que la viremia presentada por los pacientes al momento de la toma de la muestra no fue a causa de los *Phlebovirus*. Un total de 2 muestras positivas para los serotipos Maldonado y Echarate por test de ELISA indirecto IgG y PRNT entre 2010 y 2012 confirman que los *Phlebovirus* Maldonado y Echarate estuvieron presentes en Iquitos y Puerto Maldonado respectivamente.

#### 4.5. Conclusiones

1. Se ha demostrado la presencia de los *Phlebovirus*; Maldonado y Echarate en nuestro país.
2. La prevalencia de anticuerpos neutralizantes contra los *Phlebovirus* es de 0.23% con mayor predominancia en la amazonia peruana (Iquitos y Puerto Maldonado).
3. Se desarrollaron satisfactoriamente y fueron válidas las pruebas de ELISA para la detección de anticuerpos IgG e IgM contra los *Phlebovirus* Echarate y Maldonado, teniendo en cuenta que el “gold standard” fue la prueba de PRNT.
4. El presente estudio obtuvo una sensibilidad de 66.67% y una especificidad del 99.82% para la prueba de ELISA, lo que comprueba su utilidad en el diagnóstico.

#### **4.6. Recomendaciones**

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

Realizar investigaciones de vigilancia en otras ciudades pertenecientes a la amazonia peruana tomando diferentes rangos de tiempo y así determinar el real impacto en salud pública.



## REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICAS

1. Palacios G, Tesh R, Travassos da Rosa A, Savji N, Sze W, Jain K, Serge R, Guzman H, Guevara C, Nunes MR, Nunes-Neto JP, Kochel T, Hutchison S, Vasconcelos PF, Lipkin WI . Characterization of the Candiru antigenic complex (Bunyaviridae: Phlebovirus), a highly diverse and reassorting group of viruses affecting humans in tropical America. *J Virol.* 2011 Apr;85(8):3811-20.
2. Labuda M. (1991). Arthropod vectors in the evolution of Bunyaviruses. *Acta Virol.* 35: 98-105.
3. Acevedo MA & Arrivillaga J. Eco-Epidemiología de flebovirus (Bunyaviridae, Phlebovirus) transmitidos por flebótomos (Psychodidae, Phlebotominae). *BOLETÍN DE MALARIOLOGÍA Y SALUD AMBIENTAL* 2008; XLVIII (1) Enero-Julio,3-16.
4. Nichol, S. T., et al.2005. Family Bunyaviridae. Elsevier Academic Press, London, England.
5. Alina Llop, Margarita Valdés, Jorge Luis Zuazo. *Microbiología y Parasitología Médica.* La Habana: Ciencias Médicas; 2001.
6. Cruz Malpica CD. Estandarización de la prueba de ensayo inmunoenzimático para la detección de anticuerpos IgG en sueros de humanos para el virus *Phlebotomus fever*. Tesis para obtener grado de Licenciatura de Químico Farmacéutico en la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por Cruz Malpica CD. UNMSM. 2001. Disponible en:  
[http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/tesis/salud/Cruz\\_M\\_C/t\\_completo.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bibvirtualdata/tesis/salud/Cruz_M_C/t_completo.pdf)

7. Isolation of an English uukuvirus (family Bunyaviridae) J. Hyg., Camb. (1984), 93, 313-316.
8. Schwarz T., Gilch S., Pauli C. & Jäger G. (1996). Immunoblot Detection of Antibodies to Toscana Virus. J. Med. Virol. 49: 83-86.
9. Gaidamovich S., Kurakhmedova S. & Melnikova E. (1974). Aetiology of Phlebotomus fever in Ashkhabad studied in retrospect. Acta virol. 18: 508-511.
10. Travassos da Rosa, A. P., R. B. Tesh, F. P. Pinheiro, J. F. Travassos da Rosa, and N. E. Peterson, 1983. Characterization of eight new phlebotomus fever serogroup arboviruses (Bunyaviridae: Phlebovirus) from the Amazon region of Brazil. Am. J. Trop. Med. Hyg. 32:1164–1171.
11. Charrel, R. N., et al. 2009. Massilia virus, a novel Phlebovirus (Bunyaviridae) isolated from sandflies in the Mediterranean. Vector Borne Zoonotic Dis. 9:519–530.
12. Collao, X., et al. 2009. Genetic diversity of Toscana virus. Emerg. Infect. Dis. 15:574–577.
13. Anderson G, Slayter M, Hall W, Peters C. Pathogenesis of a Phleboviral infection in golden Syrian hamsters, 1990. PubMed. 1990;114(3-4):203-12.
14. Perrone LA, Narayanan K, Worthy M, Peters CJ. The S segment of Punta Toro virus (Bunyaviridae, Phlebovirus) is a major determinant of lethality in the Syrian hamster and codes for a type I interferon antagonist. J Virol. 2007 Jan;81(2):884-92.
15. Calisher C., McLean R., Smith G., Szmyd D., Muth D. & Lazuick J. (1977). Rio Grande – A New Phlebotomus Fever Group Virus from South Texas. Am. J. Trop. Med. Hyg. 26: 997-1002.

16. Tesh R., Peralta P., Shope R., Chaniotis B. & Johnson K. (1975). Antigenic Relationships among Phlebotomus fever group arboviruses and their implications for the epidemiology of sandfly fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24: 135-144.
17. Tesh R. (1988). The genus Phlebovirus and its vectors. *Ann. Rev. of Entomol.* 33: 169-181.
18. Liu D. Y., Tesh R., Travassos da Rosa A., Peters C., Yang Z., Guzman H. & Xiao S. (2003). Phylogenetic relationships among members of the genus Phlebovirus (Bunyaviridae) based on partial M segment sequence analyses. *J. Gen. Virol.* 84: 465-473.
19. WHO (1967). Arboviruses and human disease. Report of a WHO scientific group. World Health Organization Technical Report Series. 369: 1-84.
20. Aitken T., Woodall J., De Andrado A., Bensabath G. & Shope R. (1975). Pacui virus, Phlebotomine flies and small mammals in Brazil; an epidemiological study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 24: 358-367.
21. Verani P., Ciufolini M., Caciolli S., Renzi A., Nicoletti L., Sabatinelli G., Bartolozzi D., Volpi G., Amaducci L., Coluzzi M., Paci P. & Balducci M. (1988). Ecology of viruses isolated from sand flies in Italy and characterization of a new Phlebovirus (Arbiavirus). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 38: 433-439.
22. Verani P., Nicoletti L., Ciufolini M. & Balducci M. (1991) Viruses transmitted by sandflies in Italy. *Parassitologia* 33(Suppl. 1): 513-518.
23. OPS (2001). Marco de Referencia. Nueva Generación de Programas de Prevención y Control del Dengue en las Américas. Programa de

- Enfermedades Transmisibles. División de Prevención y Control de Enfermedades. Washington, D.C. Octubre. pp 27.
24. Feliciangeli M. D. (2004). Natural breeding sites of phlebotomine sandflies. *Med. & Vet. Ent.* 18: 71-80.
  25. Bartelloni P. & Tesh R. (1976). Clinical and serologic responses of volunteers infected with *Phlebotomus* fever virus (Sicilian type). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 25: 456-462.
  26. Feigin R. & Cherry J. (1992). Section 17 Viral Infections en: *Textbook of pediatric infectious diseases. Volumen II. Tercera ed.* W. B. Saunders Company. Mexico. pp 1464-1465.
  27. Abbas A.K., & Lichtman A.H., (2004). *Inmunología Celular y Molecular. 5ta Ed.*, Elsevier Science. EE.UU. pp: 192-194, 356-358.
  28. Prescott L., Harley J., & Klein D., (1999). *Microbiología, 4ta Ed.* Mc Graw-Hill. Madrid, España. pp: 348 – 355, 386.
  29. Huamán Torres JA. Investigación inmunoserológica de la presencia del virus Encephalomyocarditis (EMCV) en los Departamentos de Loreto y Cusco. Tesis para obtener grado de Licenciatura en Biología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos por Huamán Torres JA. UNMSM. 2007.
  30. Abbas A.K., & Lichtman A.H., (2004). *Inmunología Celular y Molecular. 5ta Ed.*, Elsevier Science. EE.UU. pp: 192-194, 356-358.



41. World Health Organization. Guidelines for plaque reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses 2007. EE.UU: World Health Organization; 2007. Disponible en:  
[http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/who\\_ivb\\_07.07\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/hq/2007/who_ivb_07.07_eng.pdf)
42. Organización Panamericana de la salud. Manual de procedimientos de técnicas para el diagnóstico del dengue 2002. Nicaragua: Organización Panamericana de la salud; 2002. Disponible en:  
[http://www.bvsde.paho.org/cursoa\\_dengue/e/pdf/dengue\\_oms\\_2009.pdf](http://www.bvsde.paho.org/cursoa_dengue/e/pdf/dengue_oms_2009.pdf)
43. Organización Mundial de la Salud. Dengue Guías para el Diagnóstico, Tratamiento, Prevención y Control. Bolivia. Organización Mundial de la Salud; 2009. Disponible en:  
[http://www.bvsde.paho.org/cursoa\\_dengue/e/pdf/dengue\\_oms\\_2009.pdf](http://www.bvsde.paho.org/cursoa_dengue/e/pdf/dengue_oms_2009.pdf)
44. Mendenhall, Michelle, "Punta Toro Virus Infection in Mice: Strain Differences in Pathogenesis and Regulation of Interferon Response Pathways" (2009). All Graduate Theses and Dissertations. Paper 425. Disponible en:  
<http://digitalcommons.usu.edu/etd/425>
45. Michèle Bouloy Ph.D. *Phlebovirus*. The Springer Index of Viruses. 2011, pp 223-229.
46. Sadegh C., Abbas A., Arash H., Behroz A., Tahmineh J., Sahar K., Norbert N., Jonas S., Nariman S. First Evidence of Hantavirus in Central Iran as an Emerging Viral Disease. *Advances in Infectious Diseases*. SciRe; 2014, 4, 173-177.

## **ANEXOS**

- **ANEXO 1.** MARCAS EQUIPOS Y REACTIVOS:
- **ANEXO 2.** PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA LA INACTIVACIÓN CON BEI (BINARY ETHYLENEIMINE)
- **ANEXO 3.** PREPARACIÓN DE BUFFERS USADOS EN EL ÁREA DE SEROLOGÍA
- **ANEXO 4.** FLUJOGRAMA: PREPARACION DEL HMAF “x”
- **ANEXO 5.** PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA SU USO EN PROCEDIMIENTO DE ANTÍGENO LISADO.
- **ANEXO 6.** FLUJOGRAMA DE LA PREPARACION DEL MEDIO SOLIDO OVERLAY
- **ANEXO 7.** FLUJOGRAMA DE LA PREPARACIÓN DEL COLORSTAIN.
- **ANEXO 8.** TABLA DE CONTINGENCIA 2X2.
- **ANEXO 9.** INDICE kappa.
- **ANEXO 10.** Certificación de validación de cepas utilizadas:
- **ANEXO 11.** Certificado de ética en el uso de soporte biológico.

## **ANEXO 1.**

### **MARCAS EQUIPOS Y REACTIVOS:**

#### **Equipos:**

- Centrifuga SORVALL RC 6 PLUS temperada 4°Celsius
- Sonicador SONICS Vibra Cells TM.
- ELISA WASHER: DYNEX Ultrawash Plus.
- Lector de ELISA: DYNEX MRX<sup>e</sup>.
- Incubadora temperada 37° Celsius: Thermo NAPCO 5400.

#### **Reactivos y Materiales:**

- Hidróxido de sodio (Merck)
- 2-Bromoetilamina Hidrobromuro (Sigma)
- Tiosulfato de sodio (Sigma)
- Albumina Bovina (Sigma)
- Azida de sodio (Merck)
- Conjugado THERMO Scientific #31446 lot. MJ1463943 Goat anti Mouse IgG+M Peroxidase Labeled 50%Glicerol.
- Conjugado KPL Affinity-Purified-Antibody-Peroxidase-Labeled-Goat anti - human IgG 1.0mg Cat.No. 074-1002 lot. No. VC050.
- Placas flexibles ELISA: Thermo "U" Botton Microtiter plates 96 wells.
- Placas rígidas para titulación de ELISAS: Greiner Bio one, 96k U-form.
- Sustrato: ABTS Peroxidase Substrate KPL.



## ANEXO 2.

### PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA LA INACTIVACIÓN CON BEI (BINARY ETHYLENEIMINE)

#### Preparación de hidróxido de sodio 0.2N (NaOH).

NaOH	—————>	0.8g
H <sub>2</sub> O bi-destilada	—————>	100mL

Mesclar hasta lograr la dilución.

#### Preparación de Etilenimina binaria 0.1M. (BEI)

El BEI 0.1M es preparado mediante la ciclación de 0.1M 2-Bromoetilamina Hidrobromuro en 0.2N NaOH a 37° Celsius en la incubadora por 1 hora.

2-Bromoetilamina Hidrobromuro	—————>	2.05g
NaOH 0.2N C.S.P	—————>	100mL

Mesclar en baño María por 1 hora a 37° Celsius, guardar en cuarto temperado.

#### Preparación de solución tiosulfato de sodio 1M.

Es usada para neutralizar actividad cancerígena del BEI

Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	—————>	15.811g
H <sub>2</sub> O dd C.S.P	—————>	100mL

Mesclar hasta lograr dilución, filtrar la dilución usando papel filtro 0.22µm, almacenar a 4° Celsius.

### ANEXO 3.

#### PREPARACIÓN DE BUFFERS USADOS EN EL ÁREA DE SEROLOGÍA

##### Buffer diluyente para muestras.

PBS	1000mL
Rojo Fenol (0.5 %)	3mL
Azida de sodio	1mL

Mesclar los reactivos y ajustar a pH 7.2-7.4 usando NaOH 1N.

##### Hidróxido de sodio 1N (NaOH 1N) 100mL

NaOH	4gr
Completar con H2O Bi-destilada	100mL

Mesclar hasta diluir por completo.

##### Solución de Lavado, WASH BUFFER 1000mL

PBS 10x	1000mL
TWEEN 20 (0.1%)	1MI

Mesclar hasta completar dilución, la solución será estable por 3 días a temperatura ambiente.

##### Buffer diluyente para MAC-ELISA IgM 100mL

PBS	100mL
Skim Milk	5.0g (5.0%)
TWEEN 20	0.1MI (0.1%)

Mesclar hasta completar dilución, ajustar pH a 7.4 usando NaOH 1N.

Buffer diluyente para ELISA Indirecta IgG 100mL

PBS	100mL
Skim Milk	5.0g (5.0%)
TWEEN 20	0.1MI (0.1%)
HMAF normal	2.0mL (2.0%)

Mesclar hasta completar dilución, ajustar pH a 7.4 usando NaOH 1N.

## ANEXO 4.

### FLUJOGRAMA: PREPARACION DEL HMAF "x"

(Fluido Ascítico hiperinmune de ratón)

Cosechar el fluido adictico de las ratonas hembras cuando el abdomen este extendido (sarcoma).



Transferir en tubos para centrifuga y contrapesar.



Centrifugar a 10 000rpm x 30 minutos.



Transferir el sobrenadante en tubos de 50mL.



Titular por ELISA y por la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta.



Alicuotar en viales estériles y almacenar a -20°Celcius.

## ANEXO 5.

### PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA SU USO EN PROCEDIMIENTO DE ANTÍGENO LISADO.

#### Preparación del Buffer Borato Salino pH 9.0

Solución salina 0.85%

NaCl:	8.5g
H <sub>2</sub> O dd C.S.P:	1Lt

#### Ácido Bórico 0.2M

Ácido bórico:	12.4gr
Solución Salina 0.85% C.S.P:	1Lt

#### Borax Salino 0.2M

Borax:	76.3gr
Solución Salina 0.85%:	400mL

Calentar para disolver y completar a 1Lt con Sol. Salina 0.85%

#### Borato Salino pH 9.0

Borax Salino 0.2M:	295mL
Ácido Bórico 0.2M:	250m
Solución Salina 0.85% C.S.P:	1Lt

Se medirá el pH del Borato salino y se llevara a 9.0, se usara Borax salino para subir el pH, y se usara Ácido bórico 0.2M para bajar el pH.

## ANEXO 6.

### FLUJOGRAMA DE LA PREPARACION DEL MEDIO SOLIDO OVERLAY

Mantener cantidad suficiente de E-MEM al 2%SBF a 44°C en baño maría.



Preparar Agarosa al 4% con agua bi-destilada utilizando un microondas para lograr la correcta dilución.



Mesclar la agarosa 4% preparada y el E-MEM a 44°C obteniendo la concentración final de 0.4% (45mL E-MEM 2%SBF + 5mL agarosa 4%)



Se debe preparar la mezcla de 5 a 10 minutos antes de usar, teniendo en cuenta dispensar 0.5mL por pocillo. (0.5mL x 24 pocillos = 12mL por placa).

## ANEXO 7.

### FLUJOGRAMA DE LA PREPARACIÓN DEL COLORSTAIN.

1. Agregar 2 litros de agua destilada en un frasco Erlenmeyer.



2. Agregar 54.4 gramos de Acetato de Sodio Anhidro.



3. Agregar 4 gramos de Naftol negro azul.



4. Mesclar y agregar 240mL de ácido acético glacial.



5. Mesclar con un agitador magnético y agregar agua destilada hasta completar 4Litros.



6. La preparación deberá ser dispensada en frascos de color ámbar.

## ANEXO 8.

TABLA DE CONTINGENCIA 2X2.

ELISA	PRNT "Gold Standard"		
	Positivo	Negativo	Total
Positivo	a Verdadero-positivo	b Falso-positivo	a + b
Negativo	c Falso negativo	d Verdadero-negativo	c + d
Total	a + c Verdadero-positivo	b + d Falso-positivo	a + b + c + d

$$\text{Sensibilidad: } \frac{a}{a + c} \times 100 \%$$

$$\text{Especificidad: } \frac{d}{d + b} \times 100 \%$$



## ANEXO 9.

INDICE *kappa*:

$$\kappa = \frac{Po - Pe}{1 - Pe}$$

$$Po = \frac{a + d}{a + b + c + d}$$

$$Pe = \frac{a^\circ + d^\circ}{a + b + c + d}$$

Donde  $a^\circ = (a+b) \times (a+c) / (a+b+c+d)$

Donde  $d^\circ = (c+d) \times (b+d) / (a+b+c+d)$

<b>Valoración del Índice Kappa</b>	
<b>Valor de <math>\kappa</math></b>	<b>Grado de concordancia</b>
< 0.20	Mala
0.21 – 0.40	Ligera
0.41 – 0.60	Moderada
0.61 – 0.80	Buena

]

ANEXO 10:

Certificación de validación de cepas utilizadas:

<b>Semilla Viral</b>	<b>Procedencia</b>	<b>Aislamiento</b>	<b>Fecha</b>
Candiru: BE H 22511.	Para, Brasil	Humano	1960
Echarate: OBS 6528.	Cuzco, Perú	Humano	1998
Maldonado: FMD 0077.	Puerto Maldonado, Perú	Humano	2004
Punta Toro: R12931.(44)	Pennsylvania	Humano	1966

\*Las Semillas Virales Echarate y Maldonado, fueron obtenidos de los aislamientos previos dados en los años 1998 y 2004 en Cuzco y Puerto Maldonado respectivamente.

559-VR

COLLECTION OF ANIMAL VIRUSES and ANTISERA, CHLAMYDIAE and RICKETTSIAE

Number: ATCC VR-559 ✓

Classification: Bunyaviridae, Phlebovirus.

Agent: Punta Toro.

Strain: Balliet.

Original Source: Blood from young adult male, Pennsylvania, 1966.

Reference: Arbovirus Cat. In: Am. J. Trop. Med. Hyg. 19: 1103, 1970.

Host of Choice: sM (i.c.).

Incubation: 5-7 days.

Effect: Death.

Storage Temperature: -60C or lower.

Host Range: sM, weanling Ha (i.c.), small GP (i.c.), HaK, LLC-MK2 TC.

Comments: No HA produced.

Original Preparation Contributed By: R.E. Shope.

---

(8/94)

KEY TO ABBREVIATIONS USED ON PRODUCT SHEET

BSA, bovine serum albumin  
GP, guinea pig  
Ha, hamster  
HA, hemagglutination  
HaK, hamster kidney  
i.c., intracerebral  
LD[50], median lethal dose  
LLC-MK2, rhesus monkey kidney cells  
PBS, phosphate buffered saline  
sM, suckling mouse  
sMb, suckling mouse brain  
TC, tissue culture  
□

559-VR

COLLECTION OF ANIMAL VIRUSES and ANTISERA, CHLAMYDIAE and RICKETTSIAE

Number: ATCC VR-559 ✓

Classification: Bunyaviridae, Phlebovirus.

Agent: Punta Toro.

Strain: Balliet.

Original Source: Blood from young adult male, Pennsylvania, 1966.

Reference: Arbovirus Cat. In: Am. J. Trop. Med. Hyg. 19: 1103, 1970.

Host of Choice: sM (i.c.).

Incubation: 5-7 days.

Effect: Death.

Storage Temperature: -60C or lower.

Host Range: sM, weanling Ha (i.c.), small GP (i.c.), HaK, LLC-MK2 TC.

Comments: No HA produced.

Original Preparation Contributed By: R.E. Shope.

---

(8/94)

KEY TO ABBREVIATIONS USED ON PRODUCT SHEET

BSA, bovine serum albumin  
GP, guinea pig  
Ha, hamster  
HA, hemagglutination  
HaK, hamster kidney  
i.c., intracerebral  
LD[50], median lethal dose  
LLC-MK2, rhesus monkey kidney cells  
PBS, phosphate buffered saline  
sM, suckling mouse  
sMb, suckling mouse brain  
TC, tissue culture  
□

ANEXO 11:

Certificado de ética en el uso de soporte biológico.



Association for Assessment and Accreditation  
of Laboratory Animal Care International

5283 Corporate Drive, Suite 203  
Frederick, MD 21703-2879

July 7, 2014

Head, Department of Veterinary Services  
U.S. Naval Medical Research Unit No. 6  
3230 Lima Place  
Washington, DC 20521-3230

Dear Sir or Madam:

The Council on Accreditation of the Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC International) has reviewed the report of the recent site visit to the U.S. Naval Medical Research Unit No. Six, Lima, Peru. The Council commends you and the staff for providing and maintaining an exemplary program of laboratory animal care and use. Especially noteworthy were the strong administrative commitment to the program; the conscientious and highly qualified staff; the comprehensive training program; the active and engaged Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC); the well designed disaster plan, which was remarkably comprehensive regarding animal issues; the robust occupational health and safety program; the well managed and documented veterinary care program; the excellent sanitation, housekeeping and orderliness of the animal facility; as well as the intensive husbandry, environmental enrichment, and social housing programs. The Council is pleased to inform you that the program conforms with AAALAC International standards as set forth by the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, NRC 2011 and the *Guide for the Care and Use of Agricultural Animals in Research and Teaching*, FASS 2010. Therefore, **FULL ACCREDITATION** shall continue.

Council acknowledges receipt of the correspondence dated March 26, 2014 detailing actions taken relative to concerns expressed by the site visitors during the exit briefing. Specifically, the items addressed satisfactorily included: providing an updated Program Description, and ensuring the breeding scheme of the Balb/c/CNPB maintains their inbred status and correcting the nomenclature of the colony to accurately reflect its current genetic status.

Council has no further recommendations to offer for improvement of the animal care and use program at this time. We look forward to following your program activities and wish you continued success.

AAALAC International requires an Annual Report detailing changes made during the year in accredited units. In the interim, AAALAC International expects to be apprised in a timely manner of significant programmatic changes or concerns should they occur. Please note that, at your request, AAALAC International will provide your institution with a separate letter simply verifying that your animal care and use program is accredited. Should you also wish to distribute an electronic copy of this letter to program staff, a Portable Document Format (pdf) version will be sent upon request.

Sincerely,

A handwritten signature in black ink that reads "John N. Norton".

John N. Norton, D.V.M., Ph.D.  
President, Council on Accreditation

JNN:cmw  
000874

cc: Carmen Lucas, MSC, Medical Research Scientist, Parasitology Program

tel: 301 696 9626  
fax: 301 696 9627

accredi@aaalac.org  
www.aaalac.org



## DEPARTMENT OF THE NAVY

### Memorandum

**DATE:** November 21<sup>st</sup>, 2012

**FROM:** Josefina Garcia, Chair, Institutional Animal Care and Use Committee

**TO:** Eric Halsey MD, Lt Col USAF, MC, Department of Virology, NAMRU-6

**SUB:** Review of protocol NAMRU-6 13-01 "Production of Virology Diagnostic Reagents and testing for unknown pathogens".

**REF:** (a) IACUC Meeting Minutes, 18<sup>th</sup> October, 2012

1. This is to inform you that your NAMRU-6 13-01 "Production of Virology Diagnostic Reagents and testing for unknown pathogens", has been reviewed and approved by the Institutional Animal Care and Use Committee.
2. As noted in reference (a) above, this protocol is granted full approval by the IACUC. This approval will continue until the protocol expiration date, significant modification or cancellation. Any further changes or modifications to this protocol, such as the addition of personnel or when the study has been modified, stopped or completed, must be forwarded to the IACUC.
3. Please do not hesitate to contact me if you require more information.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Josefina Garcia".

JOSEFINA GARCIA  
IACUC CHAIR

Copy to  
OIC/IO  
Attending Veterinarian  
Protocol File