

## COMUNICACIÓN CORTA

# AISLAMIENTO RÁPIDO DEL VIRUS DENGUE 3 POR EL MÉTODO DE SHELL VIAL EN EL BROTE DE DENGUE EN LIMA

Victoria Gutiérrez P<sup>1</sup>, Miryam Palomino R<sup>2</sup>, Marcela Olivares S<sup>1</sup>, Gissella Noroña C<sup>1</sup>.

### RESUMEN

El aislamiento de virus dengue con los métodos tradicionales demora hasta un mes, en situaciones de emergencia como el brote de dengue clásico en el distrito de Comas-Lima entre abril y mayo de 2005, es necesario un diagnóstico precoz. Se procesaron 117 muestras de sueros de pacientes con diagnóstico clínico de dengue clásico en fase virémica procedentes la zona del brote, mediante el método de *shell vial* para el aislamiento del virus dengue en la línea celular C6-36, se identificó el serotipo del virus mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) empleando anticuerpos monoclonales. Se logró el aislamiento del virus DEN-3 al quinto día de cosecha en el 48,7% (57/117) de los sueros. Los resultados sugieren que el método de *shell vial*, por el menor tiempo de aislamiento que el método tradicional, puede ser implementado como método de diagnóstico y usado en la vigilancia epidemiológica del virus dengue.

**Palabras clave:** Virus del dengue; Cultivo de virus; Vigilancia epidemiológica; Brote (fuente: DeCS BIREME).

### ABSTRACT

The isolation of dengue virus with the traditional methods delay up to one month, in emergency situations as a classic dengue outbreak in Comas, Lima between April and May in 2005, an early diagnosis is necessary. We process 117 serum samples of patients with clinical diagnosis of dengue in viremic phase proceeding of the outbreak zone, by shell vial method for the isolation of the dengue virus in c6/36 cellular line. The serotype was identifying means indirect immunofluorescence using monoclonals antibodies. The isolation of the dengue 3 virus was achieved to the fifth day of crop in 48,7%(57/117) of the serums. The results suggest that the method of shell vial, in the minor time of isolation that the traditional method, can be implemented as method of diagnosis and used in the epidemiological surveillance of the dengue virus.

**Key words:** Dengue virus; Virus cultivation ; Epidemiologic surveillance; Outbreak (source: DeCS BIREME).

### INTRODUCCIÓN

El dengue es una de las arbovirosis más importantes asociadas a humanos, producida por la infección con alguno de los cuatro serotipos del virus dengue (DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4), grupo B de los flavivirus. Estos virus mantienen un ciclo que involucra a los humanos y a su principal vector antropofílico de hábitos diurnos, el mosquito *Aedes aegypti*<sup>1</sup>.

Durante las décadas pasadas, el virus dengue ha extendido progresivamente su distribución geográfica tornándose endémico en muchas regiones tropicales y subtropicales del mundo, se calcula que 2,5 billones de personas habitan en áreas donde exista el riesgo de transmisión de la epidemia<sup>2</sup>.

En el Perú, el primer brote de dengue clásico ocurrió entre marzo y julio de 1990 en la Amazonía peruana, causado por los serotipos 1 y 4 del dengue<sup>3</sup>. Durante el transcurso de los años los cuatro serotipos han circulado en el Perú en ciudades de la Amazonía y costa norte, y la expansión de focos epidémicos es alarmante. En el 2000 se notificó la presencia del vector *A. aegypti* en Lima<sup>4</sup>, y durante los siguientes años la presencia de casos importados de dengue, pero en abril del 2005 se reporta un brote de dengue en el distrito de Comas, lo cual constituye un serio problema de salud pública por las condiciones ambientales y sociales<sup>5</sup>.

En este contexto el diagnóstico de laboratorio es una de las herramientas de vigilancia, indispensable para

<sup>1</sup> Centro Nacional de Salud Pública, Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

<sup>2</sup> Escuela de Biología, Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas, Universidad Nacional Federico Villarreal. Lima, Perú.

la prevención y control de la enfermedad. La confirmación de la enfermedad se realiza mediante la determinación del serotipo del virus dengue mediante el aislamiento del virus en cultivo de células, seguido de la identificación con anticuerpos monoclonales y por técnicas moleculares que detectan el genoma viral como el RT-PCR<sup>6</sup>.

El aislamiento viral por el método convencional de cultivo en tubo, tiene el inconveniente de requerir un tiempo prolongado de dos a tres semanas, por lo cual se hace necesario un método alternativo de aislamiento como el *shell vial*, que ha sido usado satisfactoriamente en el aislamiento de otros virus, y requiere sólo de algunos días<sup>7-9</sup>.

### TEXTO DE LA COMUNICACIÓN

Se realizó un estudio transversal para evaluar el método de cultivo *shell vial* o centrifugación en placa en el diagnóstico virológico del brote de dengue ocurrido en Lima en abril del 2005.

Durante las acciones de control y vigilancia del brote de dengue clásico en Lima entre abril y mayo del 2005, a todos los pacientes que reunían la definición de caso probable de dengue clásico se les tomó una muestra de sangre en condiciones de asepsia en tubo al vacío sin anticoagulante las cuales fueron centrifugadas, el suero obtenido se distribuyó en crioviales, y fue transportado el mismo día en condiciones de cadena de frío (paquetes de hielo), adjuntando la ficha clínico-epidemiológica del paciente al Instituto Nacional de Salud para la confirmación diagnóstica.

Aquellos sueros obtenidos durante la fase virémica (hasta con cinco días de tiempo de enfermedad), fueron enviados al Laboratorio de Cultivo Celular de Arbovirus del INS, de este grupo se incluyeron al azar 117 muestras para esta investigación.

Se utilizó la línea celular C6/36, clone HT (*High Temperature* - células adaptadas para su desarrollo a 33 °C), proveniente de las glándulas salivales del mosquito *Aedes albopictus*; en medio de cultivo E-MEM (Minimun Essential Medium Eagle) con Hepes modificado, suplementado con sales de Earles, 1% L-glutamina, 1% aminoácidos no esenciales, 0,08% bicarbonato de sodio, 1% antibiótico y antimicótico (penicilina y estreptomycin) y suero bovino fetal al 10% para crecimiento y al 2% para mantenimiento.

Los sueros se diluyeron 1:10 en medio de mantenimiento E-MEM, durante este proceso se trabajó en re-

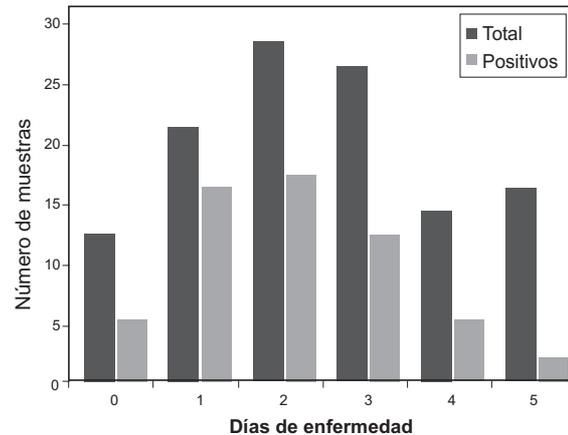


Figura 1. Número de aislamientos del virus dengue con *shell vial* según tiempo de enfermedad.

cipiente con hielo, permitiendo conservar la calidad de la muestra, luego se inocularon 200 µL a la monocapa celular formada en las placas de 24 pozos, seguidamente se centrifugaron a 1600 rpm/30 minutos, luego se agregó 1 mL de medio mantenimiento, incubándose por cinco días a 33 °C, después se realizó la cosecha de células. Paralelamente se siguió la misma metodología con cepas dengue como control positivo y sólo medio de mantenimiento como control negativo.

La identificación viral se realizó mediante la prueba Inmunofluorescencia indirecta (IFI) empleando anticuerpos monoclonales para cada serotipo y un anticuerpo policlonal del grupo B Flavivirus.

De 117 muestras de suero, se obtuvieron 57 (48,7%) aislamientos positivos para el virus DEN-3 realizándose la cosecha de células el quinto día de incubación, los controles positivos fueron específicos al set de monoclonales empleados y los controles negativos no fueron reactivos.

La mayor proporción de aislamiento viral corresponde a pacientes con tiempo de enfermedad hasta el tercer día (Figura 1).

### DISCUSIÓN

El método de *shell vial* resulta útil en el aislamiento del virus dengue a los cinco días de incubación, como lo demostró Rodríguez *et al*<sup>8</sup>. Según el número de aislamientos positivos durante los días de enfermedad, la mayor probabilidad de aislamiento viral se realiza durante los días 1 y 2 que son los días donde los títulos de viremia son mayores; sin embargo, como el número de muestras no ha sido homogénea para cada

día, se atribuye que el número de aislamientos diferente está en razón al número de muestras evaluadas.

El método tradicional de aislamiento de virus dengue (cultivo en tubo) requiere un tiempo de incubación hasta dos semanas y de pasajes para incrementar la concentración viral<sup>10</sup>; si bien el método *shell vial* demuestra reducir el tiempo a un tercio, es necesario realizar la comparación simultánea con el método de cultivo en tubo empleado en el diagnóstico de rutina, para evaluar aspectos de sensibilidad del medio.

En conclusión el método de *shell vial* permite obtener aislamiento de virus dengue en menor tiempo, puede ser implementada como método de diagnóstico virológico y utilizado en la vigilancia epidemiológica de dengue, permitiéndonos además contar con material biológico para estudios genéticos y moleculares.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Organización Panamericana de la Salud.** Dengue y dengue hemorrágico en las Américas: guías para su prevención y control. Washington D.C.: OPS; 1995. p. 110. Publicación Científica N° 548.
2. **Cruz A, Roland-Burger L.** El virus del dengue. Diagnóstico (Perú) 2002; 41(4): 165-72.
3. **Phillips I, Need J, Escamilla E, Colán S, Sánchez E, Rodríguez M, et al.** Primer brote de dengue documentado en la región amazónica del Perú. Bol Oficina Sanit Panam 1993; 114(6):513-19.
4. **Andrade C, Cáceres A, Vaquerizo A, Ibañez-Bernal S, Sulca L.** Reappearance of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Lima, Peru. Mem Inst Oswaldo Cruz 2001; 96(5): 657-58.
5. **Cabezas C.** Reemergencia del dengue en Lima: crónica de una enfermedad anunciada. Rev Peru Med Exp Salud Publica 2005; 22(3): 159-60.
6. **Guzmán M, Vázquez S.** Apuntes sobre el diagnóstico de laboratorio del virus dengue. Rev Cuba Med Trop 2002; 54(3): 180-88.
7. **Fong C, Lee M, Griffith B.** Evaluation of R-Mix fresh cells in shell vials for detection of respiratory viruses. J Clin Microbiol 2000; 38(12): 4660-62.
8. **Rodríguez R, Álvarez M, Guzmán M, Morier L, Kouri G.** Comparison of rapid centrifugation assay with conventional tissue culture method for isolation of dengue 2 virus in C6/36-HT cells. J Clin Microbiol 2000; 38(9): 3508-10.
9. **Gleaves C, Smith T, Shuster E, Pearson G.** Comparison of standard tube and shell vial cell culture techniques for the detection of cytomegalovirus in clinical specimens. J Clin Microbiol 1985; 21(2): 217-21.

---

**Correspondencia:** Miryam Palomino Rodríguez.  
Dirección: San Antonio Mz. I Lt. 6, Ate – Vitarte. Lima, Perú.  
Teléfono: (511) 583-3638 - (511) 9682-0720  
Correo electrónico: miryampalomino@hotmail.com