



**Universidad
Norbert Wiener**

**UNIVERSIDAD PRIVADA NORBERT WIENER
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE TECNOLOGIA
MÉDICA**

**“EVALUACIÓN DE LA INFECTIVIDAD DEL VIRUS ZIKA EN LAS
LÍNEAS CELULARES C6/36 HT Y BHK-21”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE LICENCIADO EN
TECNOLOGÍA MÉDICA EN LABORATORIO CLÍNICO Y ANATOMÍA
PATOLÓGICA**

Presentado por:

**Bachilleres: MEDRANO CONTRERAS, JOHANNA KAROLAINE
VARILLAS EGUIZABAL, BENJAMÍN LEVY**

LIMA – PERÚ

2018

DEDICATORIA

El presente trabajo de investigación va dedicado a nuestros padres quienes nos dieron todo su amor, trabajo y confianza, por su apoyo incondicional en todo momento e inculcarnos principios y valores para ser buenos profesionales. Gracias a ustedes hemos logrado llegar hasta aquí y convertirnos en lo que somos.

A nuestros hermanos por estar siempre presentes, acompañándonos, por el apoyo moral y cariño, que nos brindaron a lo largo de esta etapa de nuestras vidas.

AGRADECIMIENTO

Agradecemos al Lic. TM. Olivo López José María por apoyo, consejos y aporte científico, por guiarnos para poder desarrollar esta investigación y que con esfuerzo desarrollar un área importante de la Virología plasmada en esta tesis.

Agradecemos a los docentes; Dr. Miguel Sandoval Vegas, Mg. Juan Carlos Benites Azabache y Lic. Enrique Fuentes Vera de la Universidad Norbert Wiener, que con su sabiduría, conocimiento y apoyo en estos años nos, motivaron a desarrollarnos como persona y profesionales.

ASESOR

LIC. T.M. Olivo López José María

JURADO

Presidente: Dr. Benites Azabache, Juan Carlos

Secretario: Dra. Arispe Alburqueque, Claudia Milagros

Vocal: Dr. Casimiro Urcos, Javier Francisco

INDICE

RESUMEN	13
CAPITULO I: EL PROBLEMA.....	15
1.1. Planteamiento del problema.....	15
1.2. Formulación del problema.....	17
1.3. Justificación.....	18
1.4. Objetivo.....	19
1.4.1. General	19
1.4.2. Específicos.....	19
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	20
2.1. Antecedentes	20
2.2. Base teórica	23
2.2.2. Diagnóstico laboratorial.....	32
b) Diagnóstico serológico	36
2.2.3. Cultivos celulares	39
2.2.4 Líneas celulares	40
a) Línea celular C6\36 HT:	43
b) Línea celular BHK-21 (C-13) (Baby Hamster Kidney)	44
2.2.5. Cultivo de virus en el laboratorio	45
2.2.6. Efecto citopático	46

2.2.7. Identificación del virus por Inmunofluorescencia directa (IF).....	47
2.2.8. Ensayo de placas para Titulación Viral	48
2.3. Terminología Básica.....	49
2.4. Hipótesis	51
2.4.1 Hipótesis General.....	51
2.5. Variables e indicadores	51
Variable independiente:.....	51
2.5.1 Cuadro de operacionalización de la variable.....	51
CAPÍTULO III: DISEÑO METODOLÓGICO	52
3.1. Tipo y nivel de investigación	53
3.2. Población y muestra.....	53
3.3. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	54
3.3.1 Técnica de recolección de datos	54
3.3.2 Instrumento de recolección de datos.....	54
3.3.3 Metodología	55
a) Adaptación del virus Zika a la línea celular Vero CCL – 81 ATCC.....	55
b) Titulación del virus zika en línea celular vero	55
c) Obtención del título viral de la cepa	61
d) Título viral de trabajo.....	62
e) Inoculación en la línea celular BHK -21 y C6/36HT CRL 1660 ATCC.....	63

f) Preparación del sustrato antigénico para la inmunofluorescencia de las líneas celulares	65
g) Procedimiento para la Inmunofluorescencia indirecta	66
3.4. Procesamiento de datos y análisis estadístico.	67
3.5. Aspectos éticos	67
CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	68
4.1. Resultados.	68
4.1.3 Inmunofluorescencia Indirecta en la línea celular BHK-21	84
4.1.4 Inmunofluorescencia Indirecta en la línea celular C6/36 HT	84
4.2. Discusión.....	93
CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	96
5.1. Conclusiones.....	97
5.2. Recomendaciones.....	97
REFERENCIAS.....	98
ANEXOS	104
FIGURAS	110

ÍNDICE DE TABLAS / GRÁFICOS

Tabla 1. Virus del Zika, Proteínas y sus funciones.....	26
Tabla 2. Titulación del virus Zika en línea celular vero.....	62
Tabla 3 . Cálculo de títulos de trabajo.....	63
Tabla 4. Adaptación del virus Zika en la línea celular vero.....	70
Tabla 5. Descripción del efecto citopático del título 400 UFP/mL en células BHK -21 y C6 /36 HT.....	71
Tabla 6. Descripción del efecto citopático del título 400 UFP/mL en células BHK -21 y C6 /36 HT.....	72
Tabla 7. Descripción del efecto citopático del título 200 UFP/mL en células BHK -21 y C6 /36 HT.....	74
Tabla 8. Descripción del efecto citopático del título 200 UFP/mL en células BHK -21 y C6 /36 HT.....	75
Tabla 9. Descripción del efecto citopático del título 120 UFP/mL en células BHK -21 y C6 /36 HT.....	77
Tabla 10. Descripción del efecto citopático del título 120 UFP/mL en células	

BHK -21 y C6 /36 HT.....	78
Tabla 11. Descripción del efecto citopático del título 55 UFP/mL en células	
BHK -21 y C6 /36 HT.....	80
Tabla 12. Descripción del efecto citopático del título 55 UFP/mL en células	
BHK -21 y C6/36HT.....	81
Tabla 13. Estudio estadístico de resultados obtenidos por la técnica de IFI entre la línea celular BHK-21 y C6/36HT (Titulo 400 UFP/mL).....	85
Tabla 14. Estudio estadístico de resultados obtenidos por la técnica de IFI entre la línea celular BHK-21 y C6/36HT (Titulo 200 UFP/mL).....	87
Tabla 15. Estudio estadístico de resultados obtenidos por la técnica de IFI entre la línea celular BHK-21 y C6/36HT (Titulo 120 UFP/mL).....	89
Tabla 16. Estudio estadístico de resultados obtenidos por la técnica de IFI entre la línea celular BHK-21 y C6/36HT (Titulo 55 UFP/mL).....	91
Grafico 1. Distribución del ECP -Título 400 UFP/mL en la línea celular BHK- 21 y C6/36 HT.....	73
Grafico 2. Distribución del ECP -Título 200UFP/mL en la línea celular BHK- 21 y C6/36 HT.....	76

Gráfico 3. Distribución del ECP -Título 120 UFP/mL en la línea celular BHK- 21 y C6/36 HT.....	79
Gráfico 4. Distribución del ECP -Título 55 UFP/mL en la línea celular BHK- 21 y C6/36 HT.....	82
Gráfico 5. IFI en línea celular C6/36 HT y BHK -21 con el título de 400 UFP/mL.....	84
Gráfico 6. IFI en línea celular C6/36 HT y BHK -21 con el Título de 200 UFP/mL.....	86
Gráfico 7. IFI en línea celular C6/36 HT y BHK -21 con el título de 120 UFP/mL.....	88
Gráfico 8. IFI en línea celular C6/36 HT y BHK -21 con el título de 55 UFP/mL.....	90

RESUMEN

En la actualidad el cultivo celular C6/36HT es el principalmente utilizado para el aislamiento, identificación y caracterización de del virus Zika. El objetivo principal del estudio fue evaluar la infectividad del virus Zika en las líneas celulares C6/36 HT y BHK -21. Se realizó un estudio descriptivo, no experimental y longitudinal, para ello se obtuvo cuatro títulos virales (400 UFP/mL, 200 UFP/mL, 120 UFP/mL y 55 UFP/mL) los cuales fueron enfrentados en cada línea celular. Se inoculó en las dos líneas celulares y se observó la presencia de efecto citopático por ocho días. Posteriormente mediante la técnica de inmunofluorescencia se identificó células infectadas. Se evidenció que la línea celular BHK C-21 presentó un ECP desde el tercer día llegando hasta el 100% de células, con diversas alteraciones celulares, en comparación de la línea C6/36HT solo presentó ECP de 25% desde el cuarto día, siendo estadísticamente significativo con $p < 0.05$ en el título de mayor concentración. La inmunofluorescencia evidenció una infectividad celular en 24 horas posinoculación en la línea celular C6/36 HT y en la línea BHK-21 a las 72 horas, sin presentar diferencias estadísticamente significativas en todos los títulos $p > 0.05$. Por lo tanto, se puede concluir que la línea celular BHK presentó un efecto citopático en menor tiempo de inoculación, por otra parte la inmunofluorescencia evidenció células infectadas C6/36HT en menor tiempo que en las células BHK-21 que presento una replicación más lenta pero con elevada lisis celular y alteraciones celulares.

Palabras clave: Virus Zika, Infectividad, Línea celular, Efecto citopático.

SUMMARY

At present, the C6 / 36HT cell culture is mainly used for the isolation, identification and characterization of the Zika virus. The main objective of the study was to evaluate the infectivity of the Zika virus in the cell lines C6 / 36 HT and BHK -21. A descriptive, non-experimental and longitudinal study was carried out, for which four viral titers were obtained (400 PFU / mL, 200 PFU / mL, 120 PFU / mL and 55 PFU / mL) which were faced in each cell line. It was inoculated in the two cell lines and the presence of cytopathic effect was observed for eight days. Subsequently, by means of the immunofluorescence technique, infected cells were identified. It was evidenced that the cell line BHK C-21 presented an ECP from the third day, reaching up to 100% of cells, with diverse cellular alterations, compared to the C6 / 36HT line, it only presented ECP of 25% from the fourth day, being statistically significant with $p < 0.05$ in the highest concentration title. The immunofluorescence showed a cellular infectivity in 24 hours posinoculation in the C6 / 36 HT cell line and in the BHK-21 line at 72 hours, without presenting statistically significant differences in all titers $p > 0.05$. Therefore, it can be concluded that the BHK cell line showed a cytopathic effect in less time of inoculation, on the other hand the immunofluorescence showed C6 / 36HT infected cells in less time than in the BHK-21 cells that showed a slower replication but with high cell lysis and cellular alterations .

Keywords: Zika Virus, Infectivity, Cell line, Cytopathic effect.

CAPITULO I: EL PROBLEMA

1.1. Planteamiento del problema

El virus Zika (ZIKV) es un arbovirus que pertenece al género Flavivirus, con similitud estructural a los virus del dengue, fiebre amarilla, encefalitis japonesa y virus del Nilo Occidental¹. Es una infección vectorial transmitida por mosquitos de la familia Aedes, pero principalmente el *Aedes Aegypti* y *Albopictus*, aunque también ha quedado evidenciada la transmisión vertical en el embarazo y más recientemente su transmisión sexual ^{1,2}.

El ZIKV se ha convertido en una alerta sanitaria mundial por sus graves consecuencias en las gestantes y sus hijos a raíz de la epidemia de Brasil en marzo de 2015 y su posterior extensión a Latinoamérica³. Coincidiendo con la epidemia en las Américas, se ha evidenciado un inusual aumento del síndrome autoinmune de Guillain-Barré en adultos y de microcefalia congénita en los recién nacidos de madres infectadas por ZIKV durante la gestación, con las alteraciones neurológicas graves que se describen asociadas a esta entidad, como retraso intelectual y motor⁴.

Este es sin duda el mayor impacto global en salud pública de la enfermedad por ZIKV, habitualmente conocido por los pediatras como una infección viral congénita, con modelos tan clásicos como la rubeola o el citomegalovirus, y reportada también con fiebre del Nilo y Chikungunya⁵.

En el Perú y en América Latina, desde el 2015 a la fecha, muchos países de las Américas confirmaron casos autóctonos de enfermedad por virus del Zika, según el último reporte epidemiológico de la OPS/OMS del 16 de junio de 2016⁶.

En la actualidad el Laboratorio de Metaxénicas virales del Instituto Nacional de Salud (INS) para el diagnóstico de Zika se utilizan tres tipos principales de pruebas: aislamiento del virus en cultivos celulares: línea celular VERO (riñón de mono verde africano) y línea celular C6/36 HT de glándulas salivales de *Aedes albopictus*; prueba molecular de RT-PCR en tiempo real en muestras de orina y suero, como también la prueba ELISA captura IgM.

Los cultivos celulares derivados de mosquitos han jugado un papel importante en el estudio de los arbovirus, precisamente porque desde hace muchos años se han venido utilizando como sustrato para el aislamiento e identificación de estos agentes patógenos. Tesh diseñó un método efectivo para aislar e identificar los virus del dengue utilizando las líneas celulares AP-61 y AA C6/36, ambas derivadas de mosquitos del género *Aedes*. A pesar de que los cultivos celulares de mosquitos son utilizados corrientemente como sustrato para el aislamiento, identificación y caracterización de arbovirus, no todos estos patógenos infectan a una determinada línea celular de mosquito, algunos lo

pueden hacer y otros no replican, es decir, que en este último caso, las células son refractarias a virus específicos ⁷.

La línea celular BHK-21 C13 se derivó en 1961 de riñones de cinco hámsteres sirios recién nacidos. Como características fundamentales esta línea posee rápido crecimiento, pases ilimitados y alta eficiencia de paqueo como la mayoría de las líneas de células continuas⁸. La línea celular C6\36 HT es un clono obtenido de la línea *Aedes albopictus* que presenta una alta sensibilidad a los virus del dengue y Chikungunya, aunque en estudios realizados (Kuno, 1985) se ha demostrado que resultan menos sensibles en comparación con otras líneas celulares de mosquitos ⁹.

Si bien, los cultivos celulares C6/36 HT y BHK-21 pueden ser utilizados para identificación y caracterización del virus Zika, es necesario evaluar la infectividad del virus en estas dos líneas celulares evaluando el título viral y el tiempo de crecimiento, además observar el efecto citopático en cada línea. Asimismo determinar la línea celular más adecuada para el aislamiento viral, ya que el cultivo viral es indispensable para el diagnóstico e investigación.

1.2. Formulación del problema

¿Cuál de las dos líneas celulares C6/36 HT o BHK-21 permiten obtener mayor infectividad del virus Zika?

1.3. Justificación

La presente investigación un aporte para el conocimiento, investigación y diagnóstico en el laboratorio de virología. En la actualidad, el virus del Zika se aísla en células renales (células Vero) y en las células de las larvas del mosquito *Aedes albopictus* (células C6 /36), sin embargo esta última línea celular el aislamiento suele ser lento y con poca intensidad al presentar efecto citopático.

Este estudio investigará la línea celular BHK-21 como alternativa de aislamiento y propagación del virus Zika, por consiguiente, contribuir al proceso de diagnóstico del laboratorio de cultivo celular. Además, se podrá conocer una línea celular susceptible y que presente un mayor efecto citopático, pues en el laboratorio cultivo celular es la clave para la posterior identificación de la especificidad de un virus. Por otra parte el aislamiento viral suele ser complejo debido a la pérdida de viremia que se presenta en las muestras del paciente, puesto que durante el transporte de muestras hay una ruptura de la cadena de frío afectando la viabilidad del virus, en consecuencia disminuye la concentración viral, por esta razón es necesario evaluar diferentes títulos virales que logren la infectividad en cada línea celular.

Por lo tanto el aislamiento viral además de su interés diagnóstico, permite realizar estudios de caracterización de la cepa viral para la vigilancia del virus y los estudios patogénicos. Además es importante resaltar que este estudio servirá como guía para estudios posteriores en virología y temas afines.

1.4. Objetivo

1.4.1. General

Evaluar la infectividad del virus Zika en las líneas celulares C6/36 HT y BHK -21

1.4.2. Específicos

- Identificar el tiempo de aparición del efecto citopático en la línea celular C6/36 HT.
- Identificar el tiempo de aparición del efecto citopático en la línea celular BHK-21.
- Determinar el tiempo de infectividad del virus Zika mediante IFI en la línea celular C6/36 HT.
- Determinar el tiempo de infectividad del virus Zika mediante IFI en la línea celular BHK-21.
- Comparar la infectividad del virus Zika en diferentes títulos en la línea celular C6/36 HT y BHK-21.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes

Nikolay A.¹⁰ et al. Brasil (2017) en su siguiente trabajo; “Propagación de cepas del virus Zika brasileño en cultivos estáticos y en suspensión utilizando células Vero y BHK”, tuvo como objetivo presentar una plataforma de producción basada en células de suspensión BHK-21 (BHK-21 SUS) para propagar ZIKV brasileño en cantidades mayores en biorreactores de perfusión. Los experimentos de exploración realizados en matraces de cultivo de tejidos utilizando células BHK-21 y Vero adherentes demostraron una permisividad y rendimientos de virus similares para cuatro aislados de ZIKV brasileños diferentes. El aislado ZIKV del estado brasileño de Pernambuco (ZIKV PE) mostró ser el mejor aislamiento para ambas líneas celulares. Sin embargo, el proceso de perfusión en la línea BHK-21 establecido permite proporcionar grandes cantidades de material ZIKV para investigación y es un primer paso hacia el desarrollo de procesos para la fabricación de vacunas ZIKV inactivadas o atenuadas en vivo.

Barreto-Vieira D.¹¹ et al. Brasil (2017) en su estudio “Investigación estructural de C6 / 36 y cultivos de células Vero infectados con un virus de Zika brasileño” el cual se evaluó las células del linaje del mosquito *Aedes albopictus* (células C6 / 36) y las células epiteliales del riñón de mono verde africano (células Vero),

la infección se determinó por tinción de inmunofluorescencia y contraste de fase, microscopía electrónica de transmisión y RT-PCR en tiempo real. La infección se observó en ambos linajes celulares y se observaron partículas de ZIKV dentro de los lisosomas, el retículo endoplásmico rugoso y las estructuras similares al viroplasma. En la línea C6 / 36 y Vero se observó individualización celular, el redondeo y el desprendimiento, así como la citólisis desde las 24 horas posinoculación y fueron más evidentes a las 72 h p.i.. La expresión de la proteína ZIKV-NS1 se observó mediante un ensayo de inmunofluorescencia indirecta en ambos linajes celulares. El mayor número de células infectadas se observó a las 72 h p.i. en células C6 / 36 y a las 24 h p.i. n las células vero. El análisis por microscopía electrónica de fibroblastos primarios de piel infectados con ZIKV mostró la presencia de vesículas de membrana de 70 a 100 nm de tamaño que estaban localizadas en asociación íntima con el RE, lo que indica que la replicación de ZIKV se produce en estrecha asociación con las membranas de la célula huésped.

Chang JF.¹² et al. China (2016) en su estudio “Susceptibilidad diferencial de las líneas celulares a la infección por ZIKV: implicaciones para la patogenia de la enfermedad, transmisión humana, no transmitida por vectores y reservorios de animales” Se caracterizó sistemáticamente la susceptibilidad diferencial de las líneas celulares de 18 líneas celulares humanas y 15 no humanas a dos aislados de ZIKV (humano y primate). ZIKV-PR y ZIKV-U mostraron un tropismo similar al definido por la carga viral, la tinción de antígenos inmunofluorescentes y el CPE. Entre las líneas celulares no humanas, las líneas celulares de primate

no humano (Vero y LLC-MK2), de cerdo (PK-15), de conejo (RK-13), de hámster (BHK21) y de pollo (DF-1) apoyaron la replicación productiva de ZIKV. Estas especies animales pueden ser reservorios importantes y / o modelos animales potenciales para ZIKV. Los hallazgos de nuestro estudio ayudan a explicar el patrón de diseminación viral, la transmisión y la patogenia de la ZIKV de diseminación rápida, y son útiles para optimizar los diagnósticos de laboratorio y los estudios sobre la patogenia y las contramedidas de la ZIKV.

Chenglin D¹³. et.al.China (2016) en su estudio “Aislamiento y caracterización del virus Zika importado a China utilizando células de mosquito C6 / 36”, utilizo células C6 / 36 para aislamiento del virus. El suero fue inoculado directamente en placas de cultivo de 35 mm que contienen células C6 / 36 a 80% de confluencia. Al quinto día posinoculación, el sobrenadante de cultivo se recogió y se pasó a células C6 / 36 sin tratamiento previo.

Se observaron células positivas para IFA tanto en células C6 / 36 como en células Vero infectadas con virus P3 pasados 24 h después de la infección. Para cuantificar el ZIKV aislado, tanto RT-PCR en tiempo real como placa los ensayos se realizaron para P3 pasados ZIKV. Se utilizaron cebadores con diseño interno específicos para ZIKV. El número de copias del ARN genómico en el tercer pasaje fue significativamente mayor que en el primer pasaje, lo que fue consistente con el resultado de un alto título de virus cuantificado por el ensayo de placa (8×10^7 PFU / mL). Sin embargo, la morfología de la placa de ZIKV aislado en células BHK-21 fue ligeramente más pequeño que en las

células Vero. El aislamiento exitoso del virus y, posteriormente, la amplificación eficiente indicaron que este método basado en el cultivo de células C6 / 36 es apropiado para el aislamiento de ZIKV a partir de muestras de carga viral muy baja

2.2. Base teórica

Virus zika

El virus Zika (ZIKV) pertenece al género *Flavivirus* de la familia Flaviviridae. Está relacionado filogenéticamente a otros Flavivirus patógenos transmitidos por vectores mosquitos (Diptera: Culicidae) incluyendo dengue, Chikungunya, Virus del Nilo y virus de la encefalitis japonesa^{14,15}.

Es transmitido en un ciclo zoonótico entre especies arbóreas de *Aedes* y primates no humanos en bosques de África y Asia. Este virus se aisló por primera vez en abril de 1947 en los bosques de Zika (Uganda), en un mono Rhesus 766 durante un estudio sobre la transmisión de la fiebre amarilla selvática. Aunque la infección en seres humanos se demostró, por estudios serológicos en 1952 (Uganda y Tanzania), sólo en 1968 se logró aislar el virus a partir de muestras humanas en Nigeria. En 2007, tuvo lugar el primer brote importante por ZIKV en la isla de Yap (Micronesia) en el Pacífico. Se notificaron 185 casos sospechosos, de los cuales 49 fueron confirmados. Esta fue la primera transmisión documentada, fuera de sus áreas endémicas tradicionales

en África y Asia. El 2014 el Zika llega a América¹⁶, la cual en poco tiempo durante el 2015 se ha diseminado de manera importante en gran parte de América , La infección por ZIKV es considerada una enfermedad infecciosa emergente, con el potencial de extenderse a nuevas áreas en las que están presentes las especies de Aedes ¹⁷.

Es un virus ARN monocatenario de polaridad positiva, grupo IV, con dos regiones no codificantes que flanquean regiones conocidas como el 5 'NCR y de la 3' NCR. Contiene 10.794 nucleótidos que codifican 3.419 aminoácidos.

La estructura de ZIKV sigue a la de otros flavivirus. Contiene una nucleocápside aproximadamente de 25-30nm de diámetro rodeado de una bicapa lipídica derivada de la membrana del huésped que contiene proteínas de la envoltura E y M. El virión es de aproximadamente 40 nm de diámetro, con proyecciones superficiales que miden aproximadamente 5 a 10 nm. Las proteínas de la superficie están dispuestas en una simetría de icosaedro. El marco de lectura abierta del virus Zika se lee así: 5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3', y codifica una poliproteína que se escinde posteriormente en la cápside, precursor de membrana (prM), y las proteínas no estructurales (NS).

La proteína E compone la mayor parte de la superficie del virión y está involucrado con los aspectos de la replicación como la fusión de unión y la membrana de la célula huésped. NS1, NS3 y NS5 son grandes, proteínas altamente conservadas, mientras que las proteínas NS2A, NS2B, NS4A y NS4B son, proteínas pequeñas hidrofóbicas. Ubicado en el 3 'NCR hay 428 nucleótidos que pueden desempeñar un papel en la traducción,

empaquetamiento del ARN, ciclado, estabilización del genoma, y reconocimiento. El 3' NCR forma una estructura en forma de bucle y la 5' NCR permite la traducción a través de un nucleótido metilado o una proteína unida al genoma¹⁸.

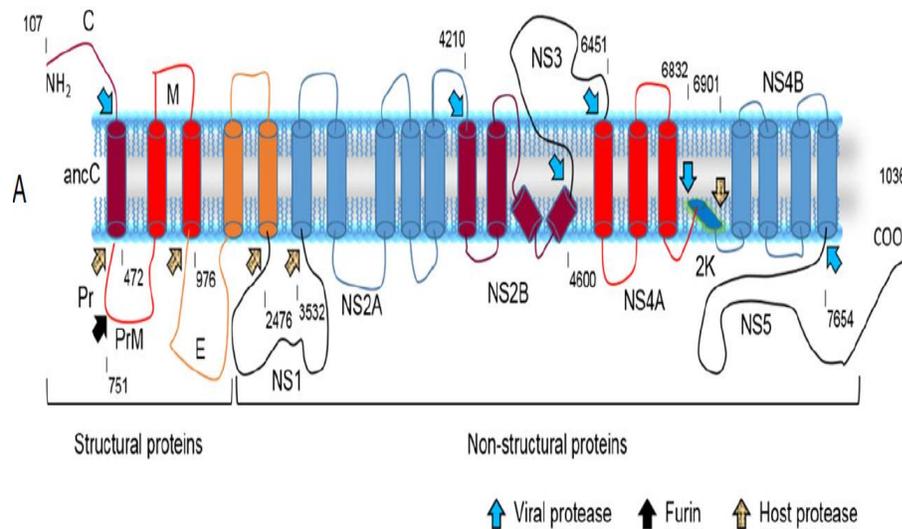


Figura 1. Estructura esquemática del genoma del virus Zika. El genoma ZIKV mostrado se basa en el genoma viral MR766. Cada una de las proteínas virales se basa en la orientación relativa en todo el genoma del ARN. La proteasa viral de ZIKV, la proteasa del hospedador y la proteasa de furina están indicadas por flechas, cada flecha apunta al sitio específico de escisión de proteasa. Los números mostrados arriba de cada producto proteico indican la posición de inicio / final. NS5 codifica Metiltransferasa en su extremo N-terminal y RNA-polimerasa dependiente de ARN en su extremo C-terminal¹⁸.

PROTEÍNA	FUNCIÓN	PROTEÍNA FUNCIÓN EFECTO SOBRE EL HOSPEDERO
C	Unión al ARN para formar la nucleocápside, asistencia	Los Anti- prM incrementa la infectividad del virión inmaduro.

	durante la estabilización, conformación-folding y secreción de la proteína E.	Involucrada en patogénesis de infecciones Dengue Severo secundario.
E	Receptor de adherencia, fusión membrana.	Invasión celular
NS1	Replicación viral	Localiza en la superficie celular y es secretado extracelularmente, modula la señalización del sistema inmune innato, Anti-NS1 median trombocitopenia, daño endotelial, antagoniza C4, INF e induce apoptosis.
NS2A	Síntesis e ARN y ensamblaje viral	Carga viral
NS3	Complejo con NS2B actúa como proteasa de serina. Posee helicasa ARN, actividad triptofatasa	Induce apoptosis celular, modula microRNA en célula infectada, blanco de los Linf CD8+ citotóxicos. Bloquea la señalización del INF-tipo I y los iARN, modula liberación de gránulos de stress de la célula
NS4A	Replicación ARN	Bloquea la señalización del INF-tipo I, induce AUTOFAGIA, protege a la célula para evitar muerte celular
NS4B	Replicación ARN	Bloquea la señalización del INF-tipo I e interferencia ARN. Modula liberación de gránulos de stress de la célula.
NS5	Actividad de Metiltransferasa y guanililtransferasa: capping y síntesis de ARN. Polimerasa de ARN – dependiente de ARN	Bloquea la señalización tipo I mediada por INF

Tabla 1. Virus del Zika, Proteínas y sus funciones ¹⁹.

Transmisión

El virus de Zika se transmite a las personas principalmente a través de la picadura de mosquitos infectados del género *Aedes*, y sobre todo de *Aedes aegypti* en las regiones tropicales sur-Asia pacífico y América. En África *A. luteocephalus*, *A. africanus*, *A. furcifer*, *A. fowleri*, *A. vittatus* y *Ae. Dalzieli*.

Los mosquitos *Aedes* suelen picar durante el día, sobre todo al amanecer y al anochecer, y son los mismos que transmiten el dengue, la fiebre chikungunya y la fiebre amarilla. Asimismo, es posible la transmisión sexual, y se están investigando otros modos de transmisión, como las transfusiones de sangre.

Cadena de transmisión del Virus Zika

El virus del Zika que circula en la sangre de humanos con viremia es ingerido por los mosquitos hembra durante la alimentación. Entonces, el virus infecta el intestino medio del mosquito y, posteriormente, hay propagación sistémica durante un periodo de 10 días. Después de este periodo de incubación extrínseco, el virus se puede transmitir a otros seres humanos durante la picadura y alimentación subsiguiente del mosquito. El periodo de incubación extrínseco está en parte influenciado por las condiciones ambientales, especialmente la temperatura ambiental. El periodo de incubación extrínseco (se produce en el vector) tiene una duración de 10 días. A partir de ese momento el mosquito puede transmitir el virus al picar a un humano susceptible. El

periodo de incubación intrínseco es el que se produce en el humano y tiene una duración promedio de 3 a 7 días (rango de 1 a 12 días).

Vector

Aedes aegypti, es el principal vector de los virus Zika. Es un insecto estrechamente asociado con los seres humanos; sus viviendas, les proporcionan todas las condiciones necesarias para completar su desarrollo; nutrientes obtenidos desde la sangre, agua para sus ciclos biológicos y refugio. El mosquito reposa preferentemente en zonas más frías y oscuras, tales como armarios. *A. aegypti* es muy difícil de controlar o eliminar debido a una serie de adaptaciones biológicas y al medio ambiente que los hacen disponer de una alta capacidad de dispersión y colonizar nuevos hábitats, y la capacidad de recuperar rápidamente la población inicial después de alteraciones derivadas por fenómenos naturales (por ej. ausencia de lluvias por extensos períodos) o intervenciones humanas (por ej. medidas de control). Una de las principales adaptaciones de esta especie invasora, es la capacidad de los huevos para soportar la desecación y, mantenerse viables, durante varios meses. Por ejemplo, si elimináramos de un sitio, todas las larvas, pupas y adultos de *A. aegypti* a la vez, su población se recuperaría dos semanas más tarde como resultado de la eclosión de los huevos después de una lluvia o adición de agua a contenedores que albergan huevos. Es probable que *A. aegypti* esté continuamente adaptándose a los cambios ambientales, por lo cual deben

incluirse estudios entomológicos antes y durante las operaciones de control de vectores¹⁹.

Patogenia

La patogenia de la enfermedad por virus zika es poco conocida, pero se ha descrito que tiene un fuerte tropismo cutáneo (ectodermo). Los componentes celulares del sistema inmune cutáneo son permisivos frente a la infección por zika, por lo que tendrían un rol en su entrada al organismo ²⁰. La entrada del virus zika a la célula hospedera está principalmente mediada por la proteína E, presente en la envoltura viral, que se une a receptores específicos y permite la fijación y fusión de la partícula viral a la célula del huésped. Mediante el proceso de endocitosis, el virión entra en el citoplasma de las células . Las proteínas no estructurales se unen al retículo endoplásmico, donde forman un complejo que permite la replicación del ARN viral. La replicación se produce principalmente en el citoplasma; sin embargo, se ha detectado ARN viral en el núcleo de la célula. Posteriormente, las células se someten a un proceso de apoptosis y autofagia, produciendo la liberación de partículas de virus, el cual llega al sistema linfático y a la sangre, desde donde el virus se disemina, produciendo las manifestaciones clínicas. Se cree que el virus podría tener tropismo neuronal (pantrópico) y de otros órganos, pues se ha encontrado ARN viral en el cerebro, así como en hígado, riñón, corazón y bazo ²¹. La replicación viral desencadena una respuesta inmune antiviral innata con producción de interferón de tipo 1. El

resultado de la infección está dado por la competencia entre la replicación viral y la respuesta inmune del hospedero.

Manifestaciones clínicas

Según los primeros reportes de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y de los posteriores de la comunidad médica brasileña, se trata de una enfermedad viral autolimitada, de leve intensidad y evolución benigna, caracterizada por fiebre, cefalea, erupción cutánea maculopapular pruriginosa, hiperemia conjuntival (conjuntivitis) no pruriginosa y no purulenta, artralgia/artritis (con edema, especialmente de las pequeñas articulaciones de las manos y de los pies), dolor de espalda y manifestaciones digestivas (dolor abdominal, diarrea, estreñimiento); con antecedente de permanencia o viaje a regiones endémicas dentro de los últimos 15 días antes del inicio de síntomas²².

Estudios posteriores por medio de la vigilancia epidemiológica y estudios de exposición temprana en humanos, se sabe que la enfermedad por el virus Zika se caracteriza generalmente por ser leve o inaparente (aproximadamente 75%), similar al dengue, fiebre chikungunya o la influenza. Los pacientes presentan fiebre de grado bajo (con temperaturas que van de 37,7°C a 38,5°C). Raramente, algunos pacientes han comunicado ulceraciones de membranas mucosas (aftas) y manifestaciones neurológicas. La astenia después de la infección parece ser frecuente ²³.

Complicaciones en el sistema nervioso

En diciembre de 2013, durante la epidemia de enfermedad por el virus zika en la Polinesia Francesa, se informó del incremento de casos de síndrome de Guillain Barré, una parálisis neurológica que se vincula a disrupción inmunológica generada por virus, vacunas o/y tóxicos ambientales ²⁴. El síndrome de Guillain Barré (SGB) es una enfermedad inflamatoria y autoinmune del sistema nervioso periférico con parálisis ascendente. Se propone que el mimetismo molecular entre glucolípidos, presentes en las capas de mielina y en el axolemma, y moléculas de superficie de agentes infecciosos puede explicar la mayoría de los casos de SGB precedidos por una infección, mientras que la toxicidad directa de Zika sobre las células neuronales se ha planteado como un mecanismo por el cual Zika induce la microcefalia. Sin embargo no se descarta que dicho mecanismo pueda estar también relacionado con el SGB ²⁵.

En casos raros, el virus de Zika se puede complicar por el síndrome de Guillain-Barré (SGB). Los enfermos raramente requieren hospitalización. Una vez pasada la enfermedad, la inmunidad dura de por vida. Sin embargo, estudios de observación, cohortes y de casos y controles, han indicado que hay una elevada probabilidad de que ZIKV sea una de las causas de la microcefalia, y otros trastornos neurológicos²⁶.

2.2.2. Diagnóstico laboratorial

Está dirigido a aquellos laboratorios que cuentan con capacidad instalada para la detección (molecular, antigénica y/o serológica), y como parte del diagnóstico diferencial para Arbovirus. Para la manipulación de muestras sospechosas, se requiere un nivel de Bioseguridad 2 (BSL-2).

El Laboratorio de Metaxénicas virales del Instituto Nacional de Salud (INS), cuenta con la prueba molecular de RT-PCR en tiempo real, que detecta el genoma viral para el diagnóstico de Zika, así como con la técnica para determinar la secuencia del genoma viral. El RT-PCR en tiempo real correspondiente a Zika, fue estandarizado en el mes de julio del 2015. También dispone de pruebas para aislamiento de virus en cultivos celulares: Línea celular de riñón de mono verde africano y línea celular de glándulas salivales *de Aedes albopictus* [C6 36]. Igualmente dispone con la prueba ELISA de captura de IgM para diagnóstico serológico de Zika en infecciones primarias.

Un caso confirmado de enfermedad por el virus zika es todo caso sospechoso de enfermedad por el virus zika que tenga resultado positivo a una o más de las siguientes pruebas: RT-PCR en tiempo real para ZIKV y/o aislamiento viral en cultivo celular para ZIKV (a partir de muestras de orina, saliva, tejidos o sangre entera); o bien anticuerpos IgM anti-ZIKV positivos y prueba de neutralización por reducción de placa (PRNT90) para ZIKV a títulos ≥ 20 , y cuatro o más veces más alto que para otros flavivirus; y exclusión de otros flavivirus.

En fallecidos, se realiza detección molecular del genoma viral a partir de tejido de autopsia, fresco o en parafina, o detección específica de antígeno viral a partir de tejido de la autopsia mediante prueba inmunohistoquímica²⁷

Para la determinación de ARN mediante el RT-PCR debemos considerar el tiempo de enfermedad, siendo esta prueba aplicable cuando el tiempo de enfermedad desde el inicio de los síntomas es igual o menor a 5 días .Estos periodos de tiempo a considerar, cuando las muestras además de suero corresponden a orina para RT-PCR y suero para determinación de anticuerpos IgM. De otro lado, si el paciente tiene más de 6 días de enfermedad, donde ya no es posible detectar el ARN viral, se puede determinar el IgM y dar una interpretación adecuada²⁸.

Recolección de muestras para cada tipo de método:

- **Muestras para análisis de ácidos nucleicos:** sangre entera, suero recogido en tubo seco y/u orina en pacientes cuyos síntomas hayan empezado hace 7 días o menos.
- **Muestras para diagnóstico serológico:** Usualmente se toman dos muestras de suero: de fase aguda y convaleciente. El suero de fase aguda se extrae durante los primeros 5 días de la enfermedad y el de fase convaleciente de 2-3 semanas más tarde. Para lograr el máximo rendimiento del suero, la sangre colectada se deja a temperatura ambiente por una hora y durante toda

la noche a 4°C (refrigerador) antes de centrifugar ²⁹. Después de la centrifugación (1000 rpm por 10 minutos a 4°C) el suero se transfiere a un tubo previamente rotulado y se almacena preferiblemente en congelación (-20 °C). El envío al laboratorio debe realizarse preferiblemente en congelación (-2°C) o a 4°C. Para la determinación de anticuerpos IgM a dengue se utiliza una muestra de sangre tomada a partir del quinto día de comienzo de los síntomas la que se procesa en forma similar para obtener el suero correspondiente.

- **Muestras para aislamiento viral:** Se debe emplear muestra de suero u orina, y es necesario que haya sido recogida, en general, durante los 5 primeros del comienzo de la enfermedad. Deben colectarse asépticamente 10 ml de sangre total la cual será transferida a tubos estériles libres de aditivos o preservativos. Los tubos que contienen la sangre se colocaran lo más rápido posible en hielo o en el refrigerador (4°C). Para asegurar las óptimas condiciones durante el aislamiento, la separación del suero del coágulo se realizará el mismo día de la toma de la muestra y asépticamente. Los tubos con el suero se congelarán y almacenarán a temperatura de -70°C. El suero debe enviarse lo antes posible al laboratorio realizando el transporte en congelación. En las primeras 24-48 h de colectado el suero, el mismo puede mantenerse a 4°C hasta su envío al laboratorio (a igual temperatura). Para el aislamiento del virus a partir de muestras de vísceras (bazo, hígado, ganglios), deben transportarse también en frío. Se homogeneizan 20g del tejido en 100mL de PBS o medio de cultivo conteniendo suero de ternero (inactivado por calor) al 10% y antibióticos. Posteriormente se centrifugan a 3000 rpm durante 30

minutos a 4°C y se emplea el sobrenadante para el aislamiento. Es conveniente realizar una prueba de esterilidad en cada caso²⁹.

a) Diagnóstico molecular: PCR-RT

La presencia del virus de Zika puede confirmarse con un análisis de ácidos nucleicos, como la PCR-RT (reacción en cadena de la polimerasa con retrotranscriptasa), para detectar secuencias genómicas específicas del virus de Zika. Los laboratorios que utilicen pruebas panflavivíricas combinadas con secuenciación génica u otros métodos moleculares convencionales, como las pruebas múltiples de detección de flavivirus, deben asegurarse de que las secuencias cebadoras internas hayan sido actualizadas para detectar los linajes reciente del virus de Zika. Se han publicado series de cebadores y sondas para pruebas específicas para el virus de Zika.

Dado que se han documentado coinfecciones por el virus de Zika y otros arbovirus y teniendo en cuenta la circulación endémica de flavivirus, los análisis para el virus de Zika deberían realizarse junto con análisis para los virus del dengue y la fiebre chikungunya, de forma secuencial o en paralelo.

En el caso de las personas sintomáticas con infección por el virus del Zika, a veces el ARN del virus del Zika puede detectarse a principios del curso de la enfermedad. La prueba NAT para detección de ARN debería realizarse con especímenes combinados de suero y orina. Para las mujeres embarazadas

sintomáticas con posible exposición al virus del Zika, las pruebas NAT deberían realizarse simultáneamente con pruebas serológicas del IgM. En el caso de las mujeres embarazadas asintomáticas con posible exposición actual al virus del Zika, se recomienda realizar las pruebas NAT tres veces durante el embarazo.

b) Diagnóstico serológico

La serología IgM específica del virus del Zika y los anticuerpos neutralizantes normalmente se desarrollan hacia el final de la primera semana de la enfermedad. Los niveles de IgM son variables, pero por lo general son positivos desde aproximadamente el 4° día a partir de la aparición de los síntomas y durante las siguientes 12 semanas posteriores a la aparición de los síntomas o exposición, aunque pueden persistir por un período más prolongado. En el caso de las mujeres embarazadas sintomáticas, la prueba serológica del IgM se realiza simultáneamente con la prueba NAT. En el caso de las personas sintomáticas que no están embarazadas, las pruebas deberían realizarse con muestras negativas de NAT tomadas <14 días después de la aparición de los síntomas o con muestras tomadas ≥ 14 días luego de la aparición de los síntomas.

- **ELISA Anti Virus del Zika (IgG o IgM)**

El ensayo de inmunoabsorción enzimática del anticuerpo IgM de captura del Zika (MAC-ELISA para el Zika) se usa para la detección cualitativa de los

anticuerpos IgM del virus del Zika en el suero o el líquido cefalorraquídeo; sin embargo, debido a la reacción cruzada con otros flavivirus y la posible reactividad no específica, es posible que los resultados sean difíciles de interpretar. Por consiguiente, las presuntas pruebas positivas, equívocas o no concluyentes deben reenviarse para su confirmación a través de una prueba de neutralización por reducción en placas (PRNT, por sus siglas en inglés) ³⁰.

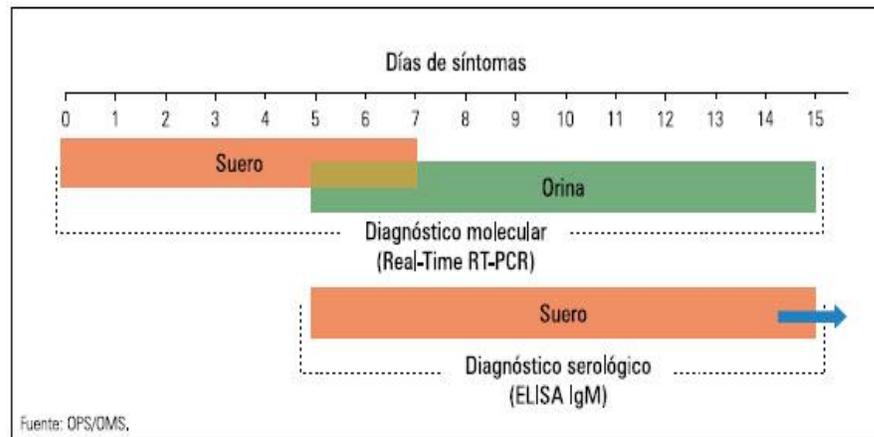


Figura 2. .Indicaciones para el diagnóstico, según día de inicio de los síntomas y tipo de muestra.

Tiempo de enfermedad y su relación para la determinación del ARN DEL ZIKV en RT-PCR en suero, orina y de IgM en suero mediante ELISA ³⁰.

c) Diagnostico virológico

Aislamiento del virus

El aislamiento en el laboratorio a partir de las muestras clínicas se puede realizar mediante técnicas de cultivo celular en los laboratorios con instalaciones de seguridad biológica adecuados para el virus requiere disponer de un laboratorio de nivel 3 de bioseguridad. Sin embargo, la manipulación de

muestras clínicas que no implique la replicación de los virus se puede realizar en un laboratorio de nivel 2 de bioseguridad, con prácticas adecuadas.

El aislamiento del virus del Zika procedente de suero humano, depende de varios factores: de la forma en que el suero fue manipulado y almacenado y del nivel de viremia que varía considerablemente dependiendo de los días de evolución de la enfermedad. La viremia usualmente tiene un pico corto antes del inicio de la enfermedad y puede ser detectable en promedio entre los días 4-5, conforme aumentan los títulos de IgM, el virus tiende a desaparecer.

En nuestro país, el cultivo viral se realiza en el Instituto nacional de salud (INS), en la línea celular C6/36 HT y células Vero, se evalúan hasta en siete días, hasta evidenciar en efecto citopático presente en las células infectadas, los antígenos virales dentro de las células o en superficie son detectables mediante un proceso denominado inmunofluorescencia.

Identificación viral

El método de elección para la identificación del virus del zika es prueba de inmunofluorescencia (IF). La inmunofluorescencia es un método rápido basado en la unión inmunológica de anticuerpos monoclonales IgG seroespecíficos marcados con fluorocromo unida a la región Fc, a su antígeno homólogo. Estos anticuerpos son producidos en cultivos tisulares o líquido ascítico de ratones, El

fluorocromo de más aplicación es el Isotiocianato de Fluoresceína (FITC). Esta prueba es fácilmente realizada en cultivos celulares infectados, generalmente se usan tejidos fijados que se preparan sobre un portaobjeto. Los anticuerpos que no se unieron se eliminan mediante lavado y la muestra se observa en microscopio de inmunofluorescencia. La identificación viral puede realizarse por el método directo o indirecto, siendo éste último más sensible porque permite trabajar con variedades de anticuerpos primarios.

2.2.3. Cultivos celulares

Cultivo celular primario

Es el tipo de cultivo más utilizado. Se puede obtener a partir de explantes primarios o de suspensiones de células disgregadas. Las células presentan el mismo cariotipo (características cromosómicas específicas de un individuo o especie) del tejido que le dio origen.

La disgregación celular se realiza por métodos enzimáticos o mecánicos. En estos cultivos se pierden las interacciones célula-célula y las interacciones de la célula con la matriz extracelular. Sin embargo, las células son capaces de proliferar y la población celular crece notablemente. Cuando las células ocupan toda la superficie disponible se dice que han alcanzado la confluencia. En esta etapa, las células establecen contactos entre ellas que inhiben su proliferación

y el crecimiento se detiene. Por eso, al cabo de un tiempo hay que transplantar las células a un nuevo soporte, esta operación se denomina subcultivo o pase³¹.

Cultivos Secundarios

Son cultivos celulares que se mantienen in vitro por pasajes sucesivos, pueden ser diploides (75% de las células tienen el mismo cariotipo del tejido original) o heterodiploides (25% de células con igual cariotipo del tejido original) con un potencial de sub-cultivos indefinidos³¹.

Tipos de crecimiento celular

- **Cultivos en monocapa:** las células crecen adheridas sobre un soporte sólido (plástico o vidrio). El anclaje al sustrato es un prerrequisito para la proliferación celular. Es el método utilizado para la mayoría de las células excepto para las hematopoyéticas.

- **Cultivos en suspensión:** las células se encuentran dispersas en el medio de cultivo. Su crecimiento no depende del anclaje. Este tipo de cultivo se restringe a las células hematopoyéticas, células madre, líneas celulares transformadas y células tumorales. Alcanzan la confluencia cuando el número de células es grande y los nutrientes son insuficientes

2.2.4 Líneas celulares

Las células del cultivo primario en monocapa se dispersan por métodos enzimáticos y se pasan a un nuevo frasco de cultivo. En el caso de células en suspensión, sencillamente se diluyen en medio fresco. Los sucesivos cultivos así formados se denominan una línea celular. La formación de una línea celular a partir de un cultivo primario implica que:

- Aumenta el número de células obtenidas
- Acaban predominando uno o dos tipos celulares: los que tienen mayor tasa de crecimiento la población celular se hace uniforme y homogénea.
- Sus características se conservan durante las sucesivas generaciones y, si se conservan en nitrógeno líquido, de forma indefinida.

Normalmente, las líneas celulares tienen una vida finita que, según el tipo de célula, se puede prolongar entre 20 y 100 generaciones. Superado ese límite, las células entran en una etapa que se denomina senescencia en la que pierden su capacidad de proliferar (supuestamente por el acortamiento de los telómeros) y mueren. Sin embargo, algunas células (como las de roedores y las tumorales) evitan la senescencia y dan lugar a líneas celulares continuas, que crecen indefinidamente. Estas células pueden surgir de forma espontánea (exposición a radiaciones ionizantes o a carcinógenos químicos) o inducida (infección vírica o transfección de ADN) y son el resultado de un cambio genotípico denominado transformación.

Las células transformadas se caracterizan porque:

- **Son inmortales:** crecen indefinidamente.
- **Su crecimiento es aberrante:** se pierde la inhibición por contacto, la limitación de la densidad celular durante la proliferación y la dependencia del anclaje.
- **Son malignas:** invaden tejidos y dan lugar al crecimiento de tumores.
- **Son genéticamente inestables:** son heteroploides (varía el número de cromosomas) y presentan aberraciones cromosómicas.

Líneas celulares para estudios de Arbovirosis

Dentro de cada línea celular pueden establecerse clones celulares, que son poblaciones derivadas de una sola célula de esa línea celular. En los últimos años se han desarrollado una serie de líneas celulares de mosquitos, que han resultado ser mucho más sensibles que las líneas celulares producidas de mamíferos, para los estudios de Arbovirosis ³¹.

- **Línea celular C6/36 HT:** Es un clono obtenido de la línea *Aedes albopictus* adaptada a crecer a 33° C.
- **Línea celular TRA-284-SF:** Es una sublínea de la TRA-284, obtenida del mosquito *Toxorhynchites amboinensis*
- **Línea celular AP-61:** La línea celular AP-61 obtenida de mosquito *Aedes pseudoscutellaris*

- **Línea celular BHK-21 (13):**Procedente de riñón normal de *Mesocricetus auratus* (hamster, Syrian golden)
- **VERO:** Línea celular obtenida de riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*
- **LLCMK2:** Línea celular obtenida de riñón de mono *Rhesus Macaca mulatta*.

a) Línea celular C6\36 HT:

La línea celular C6\36 (Igarachi, 1978) es un clono obtenido de la línea *Aedes albopictus* de Singh (1967), es útil para la replicación de flavivirus y según se informa puede usarse para replicar virus de Dengue a títulos altos. Las células de mosquito se cultivan tradicionalmente a 28°C, sin embargo Zhu y cols., demostraron que el clono C6\36 podía adaptarse a crecer a 36°C pero bajo esas condiciones las células dejan de multiplicarse cuando la temperatura sobrepasa los 35°C. Así, Kuno y Oliver (1989) enuncian que las líneas de células de insectos, altamente sensibles y acostumbrada a crecer a 28°C al adaptarse a temperaturas más elevadas mejoran su capacidad para la replicación viral (siempre que la temperatura no exceda los 35°C). Esta sublínea C6\36 HT (High temperature), está adaptada a crecer a 34°C por Kuno y cols. Exhiben el mismo ECP que las C6\36 originales aunque éste se manifiesta más rápidamente y se obtienen mayores títulos virales que a 28°C.

ATCC Number: **CRL-1660**™
Designation: **Aedes albopictus clone C6/36**

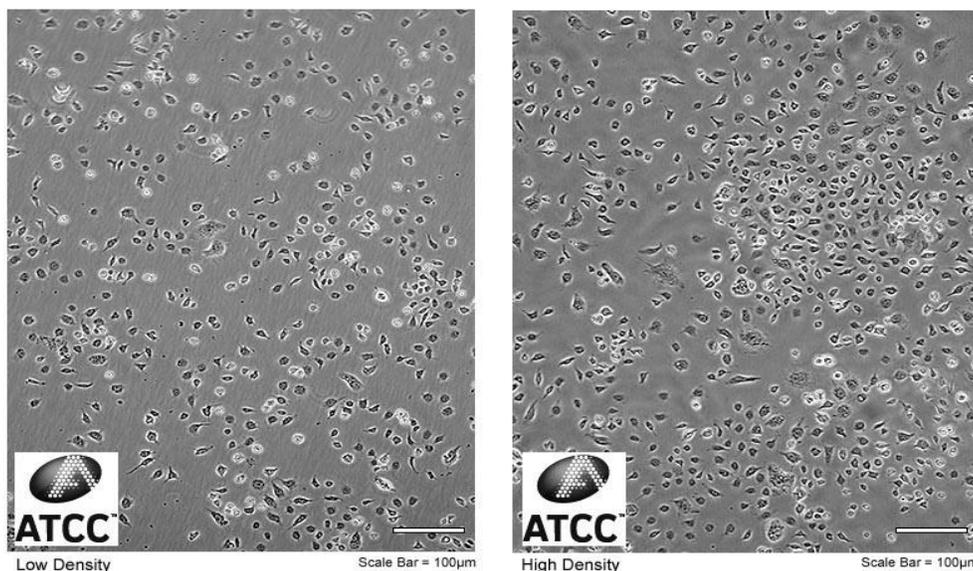


Figura 3. Línea celular C6/36

Fuente: <https://www.atcc.org/Products/All/CRL-1660.aspx#characteristics>

b) Línea celular BHK-21 (C-13) (Baby Hamster Kidney)

La línea madre de BHK-21 (C-13) se derivó de riñones de cinco hamsters no sexados, de 1 día de edad, en marzo de 1961, por I.A. Macpherson y M.G.P. Fogonero. Después de 84 días de cultivo continuo, interrumpido sólo por una conservación de 8 días por congelación, el clon 13 se inició por aislamiento de una sola célula. Esta línea celular es transcriptasa inversa negativa, una línea pseudodiploide con tetraploidía que ocurre al 4%. Está constituida por células pseudo fribroblásticas y es una línea pseudodiploide con tetraploidia al 4% ($2n=44$). El cariotipo es $44, XY, -6, -15, 6q+, 15q+$ en la mayoría de las células. La BHK-21 es un excelente sustrato para la producción de varios virus como el adenovirus, vaccinia, herpes simplex, estomatitis vesicular y rabia, entre otros

ATCC Number: **CCL-10**
Designation: **BHK-21**

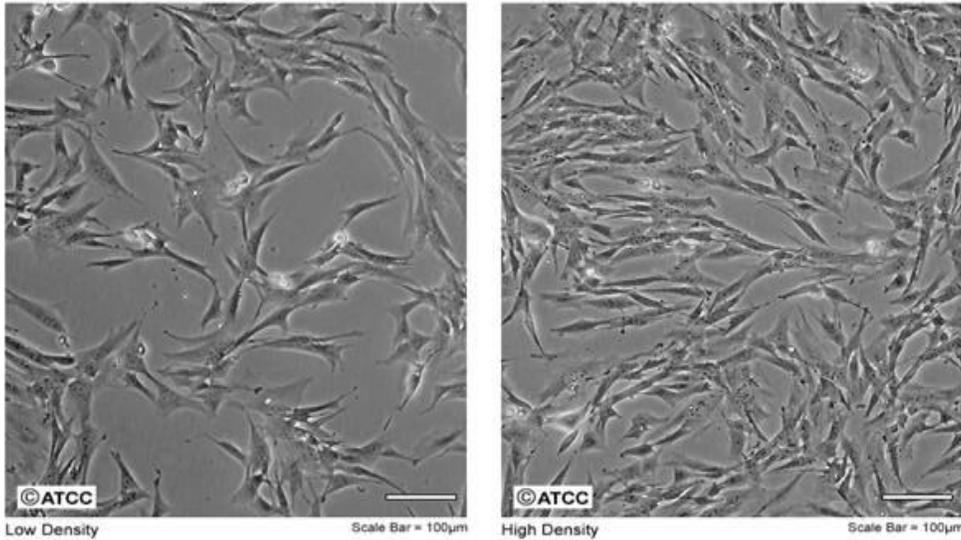


Figura 4. Línea celular BHK-21

Fuente: <https://www.atcc.org/Products/All/CCL-10.aspx#characteristics>

2.2.5. Cultivo de virus en el laboratorio

Los virus pueden crecer en un sistema huésped, como animales, huevos embrionarios o cultivos de tejidos (células). Algunos virus solo desarrollan en animales .los ratones. Las ratas algodóneras, los conejos y los cobayos se usan con frecuencia para cultivo de virus. El desarrollo de los virus en animales es muy costoso .Por lo tanto, cuando es posible, el método preferido es el cultivo celular. Los cultivos celulares proporcionan el método más versátil para desarrollar y estudiar los virus.

2.2.6. Efecto citopático

El crecimiento viral es determinado por los cambios o alteraciones morfológicas que aparecen en las células en cultivo, lo que se conoce como efecto citopático **(EPC o CPE por cytopathic effect)** que se deben a la infección viral, los efectos citopáticos como la formación de cuerpos de inclusión y la hemadsorción, son muy comunes y se usan para reconocer las células infectadas por virus en un cultivo.

Los efectos citopático inducidos por el virus se pueden examinar con un microscopio de luz invertida de baja potencia .Se buscan redondamiento y contracción de las células, aumento de la refractibilidad, fusión o formación de sincitios, agregación, pérdida de la adherencia y lisis o muerte celular³².

Los efectos citopáticos se producen como resultado de:

- Ingreso del virus a la célula huésped (paso a través de la membrana plasmática.
- Inhibición de la transcripción celular o estimulación de la actividad de RNA polimerasa celular.
- Interacción es del virus con las vías de procesamiento del RNA.
- Respuesta del huésped a la infección viral.

Si bien puede ser característico de un tipo viral, puede corresponder también a varios agentes virales y no es específico para ciertas familias virales. Por otro lado, no siempre la partícula viral va a ocasionar efecto citopático y la presencia del virus se determina en forma indirecta por medio de técnicas de hemoaglutinación o hemoadsorción, inmunofluorescencia o mediante fenómenos de interferencia viral, usando partículas virales con efecto citopático conocido sobre cada línea celular ³³.

2.2.7. Identificación del virus por Inmunofluorescencia directa (IF)

Es el método más sencillo para identificar un aislamiento nuevo de virus mediante la tinción con anticuerpos fluorescentes, puede proporcionar un diagnóstico definitivo en aproximadamente una hora después de haber obtenido el primer signo citopático (Fenner y col., 1992). La IF directa detecta la presencia directa del antígeno, los anticuerpos marcados con isotiocianato de fluoresceína identifican al antígeno específico presente en la monocapa en cubreobjetos infectada, y después se lava para eliminar el conjugado no unido al antígeno ³⁰. Al observar a través del microscopio de fluorescencia de haz de luz ultravioleta, las partículas antigénicas unidas al anticuerpo se observan brillantes y fluorescentes (Tizar, 1996). La prueba indirecta de anticuerpos fluorescentes es utilizada para la detección de anticuerpos antivirales. La unión del antígeno es reconocida por fluoresceína conjugada a una anti inmunoglobulina (un segundo anticuerpo) (Murphy et al., 1999).

2.2.8. Ensayo de placas para Titulación Viral

El ensayo de placas es un ensayo cuantitativo que permite determinar la cantidad de virus presente en una muestra dada. Se usa para cuantificar el número de virus en una reserva viral o, en los experimentos de crecimiento de un paso, la cantidad de virus que hay en un momento determinado. Se infectan las monocapas celulares con diluciones seriadas de potencia 10 de un virus. Cuando la partícula viral infecta una célula, se replica y la destruye, lo cual origina una placa. La monocapa de células infectadas generalmente es cubierta con agarosa para restringir el movimiento de los virus nuevos que se liberan. De tal modo, durante la replicación, los virus nuevos solo pueden infectar a las células circundantes, las cuales también son destruidas. Al cabo de varios ciclos de replicación, se forma un área o placa de células muertas.

Las placas se visualizan mediante la tinción de las células con colorantes como rojo neutro, naftol blue-black o cristal violeta. Teóricamente, cada virus en el inocula original genera un área clara (placa) o una unidad formadora de placa (UFP). El ensayo de placas mide la infectividad. Sin embargo, es posible que las partículas virales presentes en la muestra dada no sean infecciosas. Entonces, más específicamente, un ensayo de placas mide solo el número de partículas infecciosas en una muestra, no el número total de partículas.



Figura 5. Ensayo de placas .Cuantificación de una reserva de virus, la monocapa de células teñidas con cristal violeta y etanol .Las áreas claras (células infectadas) representan placas. Las diluciones seriadas se agregaron a una monocapa de células confluentes ³².

2.3. Terminología Básica

Virus Zika: es un virus del género Flavivirus, de la familia Flaviviridae, grupo IV del orden sin clasificar que se transmite por la picadura de mosquitos vectores del género Aedes.

Arbovirus: Los arbovirus es el nombre mnemónico que se la ha dado a un conjunto de virus transmitidos todos por artrópodos.

Línea celular: El cultivo celular es el proceso mediante el que células, ya sean células procariotas o eucariotas, pueden cultivarse en condiciones controladas.

Células C6 /36 HT: Línea celular obtenida a partir de células de *Aedes albopictus*, adaptada a crecer a 33°C por Kuno y colaboradores, mejorando su capacidad para la replicación viral.

Efecto citopático: Cambios bioquímicos y moleculares, morfológicos y de viabilidad celular, visibles a microscopía óptica, causados durante el ciclo de replicación viral.

Inmunofluorescencia indirecta: Se utiliza un conjunto de anti –inmunoglobulina marcada con fluoróculo para detectar los anticuerpos específicos unidos al antígeno. Se utiliza en el diagnóstico de muchas enfermedades infecciosas y parasitarias.

Infectividad: Se denomina infectividad en epidemiología a la capacidad de una agente patógeno (bacterias, virus...) para invadir un organismo y provocar en él una infección.

Cepa viral: un conjunto de microorganismos, que comparten rasgos comunes su virulencia, su expansión, sus mutaciones o su resistencia hacia algún agente.

2.4. Hipótesis

2.4.1 Hipótesis General

La línea celular BHK-21 permite una mayor infectividad del virus Zika.

2.5. Variables e indicadores

Variable independiente:

Infectividad del virus Zika en las líneas celulares C6 /36HT y BHK -21.

2.5.1 Cuadro de operacionalización de la variable

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES
----------	--------------------------	---------------------------	-------------	-------------

INFECTIVIDAD DEL VIRUS ZIKA EN LA LÍNEA CELULAR C6 /36HT Y BHK-21	La capacidad del virus para invadir e infectar una célula.	Es la capacidad del virus zika para infectar la línea celular C6/36 HT y BHK-21, evidenciando por las alteraciones celulares y la inmunofluorescencia.	Tiempo de replicación viral	1 Día 2 Días 3 Días 8 Días
			Efecto citopático	-Porcentaje de células cambios y alteraciones morfológicas celulares.
			Efecto Citopático	Porcentaje de células infectadas fluorescentes.

CAPÍTULO III: DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. Tipo y nivel de investigación

La investigación es de enfoque cuantitativo y descriptivo. Diseño no experimental de tipo longitudinal.

3.2. Población y muestra

La cepa del virus ZIKA fue proporcionada por el laboratorio de virología y ambas líneas celulares C6/36 HT Y BHK -21 suministradas por el área de Cultivo de Celular de un laboratorio de referencia.

• **Cepa del virus Zika:** Las cepa empleada para el estudio fue proporcionado por el Instituto Nacional de Salud del área de virología. Se trabajó con cuatro títulos virales:

- T 1:400 UFP/mL
- T 2:200 UFP/mL
- T3 :120 UFP/mL
- T4: 55 UFP/mL

• **Línea celular C6/36 HT CRL 1660 ATCC:** La línea celular C6/36HT es un clono obtenido de las glándulas salivales del mosquito *Aedes albopictus.*, 5 cepa celular del clono C6/36, (ATCC CRL 1660).

• **Línea celular BHK-21 (C-13) ATCC CCL-10:** Línea celular de riñón de hamster bebe normal de *Mesocricetus auratus* (hamster, Syrian golden). Morfología: Fibroblastos, cultivo a 37° C

3.3. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.3.1 Técnica de recolección de datos

La técnica utilizada para este trabajo será la observación.

3.3.2 Instrumento de recolección de datos

La recolección de datos requiere de las siguientes actividades: selección de instrumentos, aplicación del mismo y las observaciones, registros y mediciones obtenidas para que se analicen. Es necesario que el instrumento de recolección cumpla con dos requisitos indispensables, los cuales son: confiabilidad y validez.

Para esta investigación se utilizará tres instrumentos de recolección de datos.

Se diseñó fichas en las cuales se evaluó lo siguiente:

- Ficha de obtención de la cepa viral
- Ficha de titulación viral
- Ficha de infectividad viral

Ver anexos 1, 2 y 3.

3.3.3 Metodología

a) Adaptación del virus Zika a la línea celular Vero CCL – 81 ATCC

Se realizó una dilución 1/10 de la cepa viral, se añadió 50 µL de cepa viral y 950 µL de medio de mantenimiento, se inoculó en un frasco de cultivo de 75 cm² con monocapa confluyente de 4×10^6 células de la línea celular Vero CCL – 81 ATCC. Se incubó por 30 min a 37 °C y se añadió 10ml de medio de mantenimiento de suero fetal bovino inactivado (SFBI) al 2%. Se observó y dio lectura diaria presentándose replicación viral a las 72 horas.

Al presentarse efecto citopático (ECP), se realizó la lisis celular por medio físico en el cual se procedió a congelar a -80° C y descongelar el frasco por única vez para asegurar la homogeneidad del virus en la suspensión ,posteriormente se transfirió el contenido a un tubo cónico y se centrifugó a 1000 r.p.m. por 10 minutos a 4 °C. Finalmente se alicuotó 500 µL en crioviales y se almacenó en -80 °C para los posteriores trabajos.

b) Titulación del virus zika en línea celular vero

Para titular el virus a partir de un frasco de cultivo con monocapa confluyente se calculó el número de células necesarias para una concentración de $2,5 \times 10^5$ células/mL x 0,5 mL/pozo x 24 pozos x placa. Se distribuyó 500 μ L de la suspensión celular a todos los pozos de la placa e incubó a 37° C con CO₂ al 5%.
Figura 6. Posteriormente se descongeló el virus a titular y se conservó a 4°C.

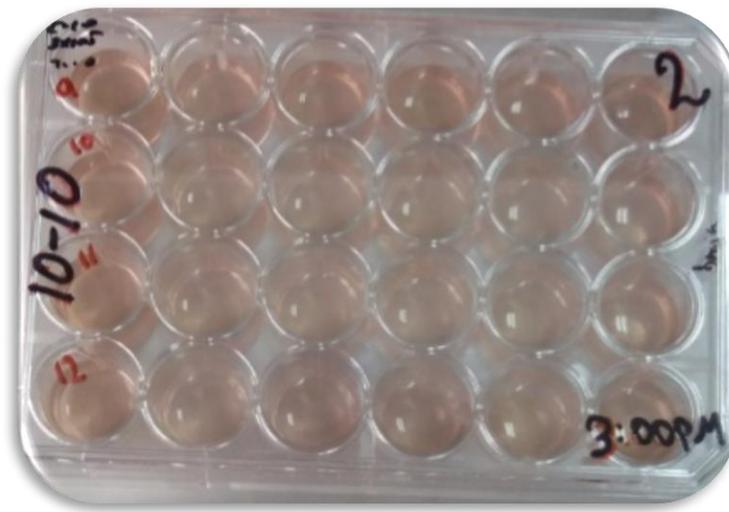


Figura 6. Dispensación de $2,5 \times 10^5$ cell/mL x 0,5 mL/pozo x 24 pozos x placa.

Se realizó diluciones seriadas en base 10 desde 10^{-1} hasta 10^{-10} , para ello se distribuyó 900 μ L de medio de mantenimiento (MEM) a todos los tubos rotulados, desde 10^{-1} a 10^{-10} ; manteniéndolos en recipientes con hielo y se agregó 100 μ L de virus al tubo 10^{-1} y homogenizó, luego se transfirió con una nueva pipeta 100 μ L del tubo 10^{-1} al siguiente tubo y así sucesivamente. Ver Figura 7

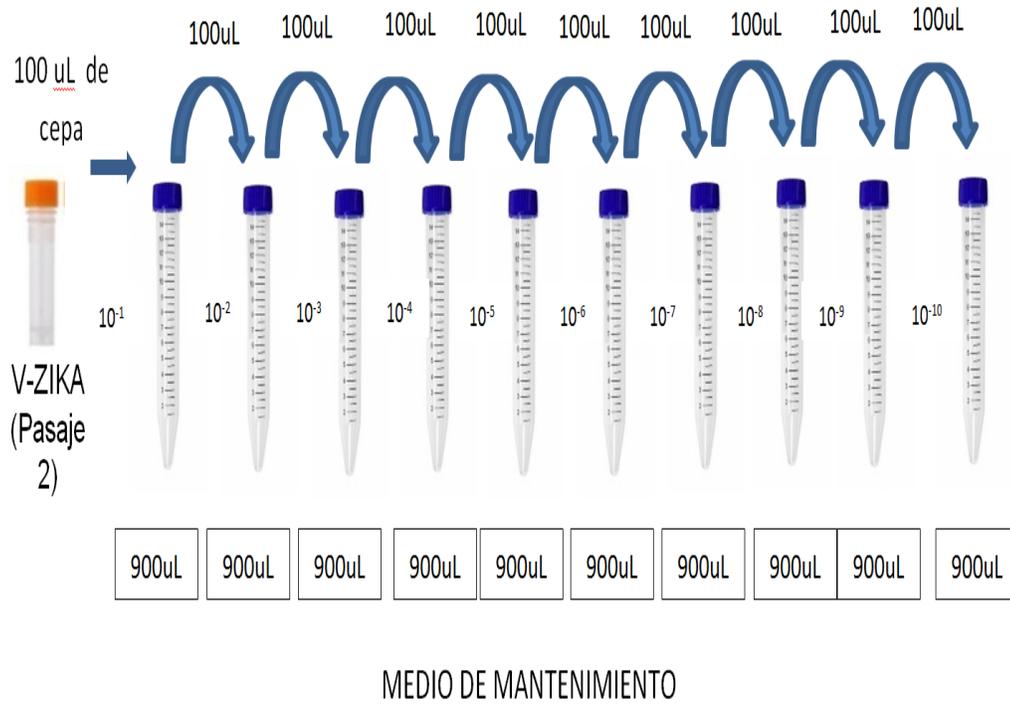
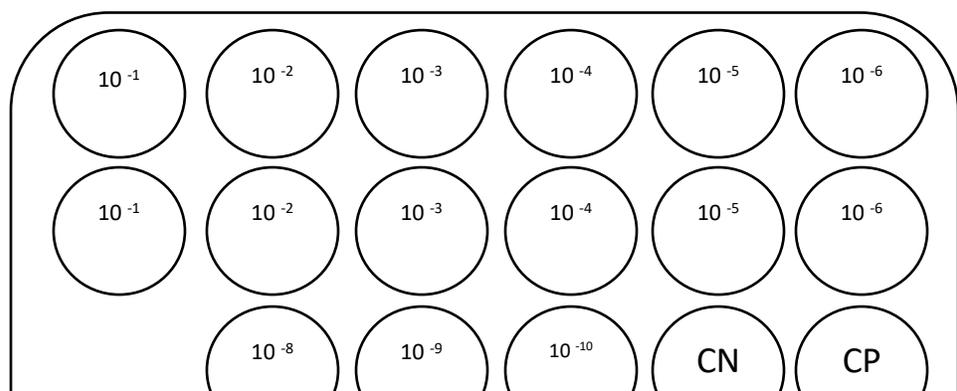


Figura 7. Preparación de diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-10} para la titulación de la cepa del virus Zika.

-Inoculación viral

Se rotuló la placa con monocapa celular (2 pozos por cada dilución). Se inoculó 200 μ L de cada dilución viral a los pozos correspondientes e incubó a 37° C con CO₂ por 1 hora. Ver Figura 8



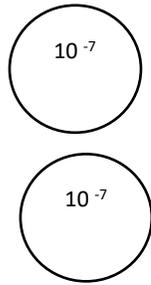


Figura 8. Placa de 24 pozos inoculados con las diluciones 10^{-1} a 10^{-10} realizados por duplicado.

Se lavó dos veces con buffer fosfato salino (PBS) 1x y se agregó 500 μ L de medio Medio Carboximetilcelulosa (CMC), se incubó a 37°C con CO₂ al 5%, se observó y dio lectura diaria por 3 días.

Posteriormente para evidenciar las Unidad Formadora de Placa (UFP) se agregó 1ml de formol al 10% por una hora, se descartó el medio y se coloreó las células con Naphthol Blue Black (NBB), adicionando 500 μ L por pozo y dejó en incubación a temperatura ambiente por 2 horas. Finalmente se lavó suavemente con agua corriente y se dejó secar. Figura 9.

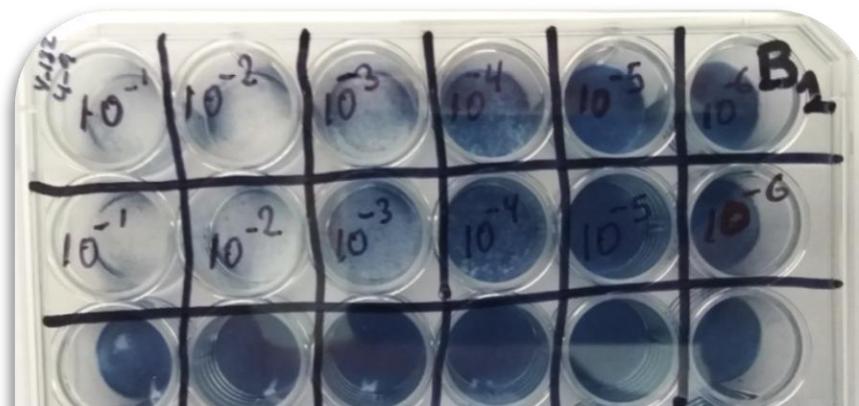


Figura 9. Evidencia de las Unidad Formadora de Placa coloreada con Naphthol Blue Black (NBB).

Se contó las placas (puntos no coloreados por el NBB visibles en el fondo de cada pozo). Cada placa formada se conoce como Unidad Formadora de Placa (UFP). Para conocer el título viral se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{UFP/mL} = \frac{\text{P} \times \text{FD}}{\text{V}}$$

P = Promedio del número de placas obtenido donde se realizó el conteo.

FD = Dilución en que se contaron las placas (Factor de dilución)

V= Volumen del inóculo expresado en ml

En nuestro estudio se utilizó 0.2 ml de inóculo en cada pozuelo, quedando la fórmula de la siguiente manera:

$$\text{Título UFP/mL} = \text{P} \times \text{FD} \times 5$$

Luego de este procedimiento se evidenció que entre la dilución 10^{-4} se obtuvieron UFC incontables y en la 10^{-5} se evidenció escasas UFC como se muestra en la figura 10.



Figura 10. Placa de cultivo con diluciones entre 10^{-4} a 10^{-5} . Se muestra UFP incontables en la dilución 10^{-4} , y UFP escasas en la dilución 10^{-5} .

Con el objetivo de optimizar las diluciones de trabajo se realizó una segunda dilución seriada al medio para obtener diluciones más pequeñas entre 10^{-4} a 10^{-5} , de esta manera se halló el título viral deseado para la investigación. Para ello se preparó diluciones logarítmicas seriadas de $1/2$ hasta $1/131072$, se distribuyó 2ml de medio de mantenimiento a 17 tubos, luego se agregó al primer tubo 2ml de cepa viral y se homogenizó, seguidamente se transfirió 2ml del primer tubo al siguiente tubo y así sucesivamente hasta el tubo 17, obteniéndose los

títulos virales adecuados para el estudio. Finalmente se realizó el procedimiento de inoculación viral ya descrito anteriormente. Figura 11.

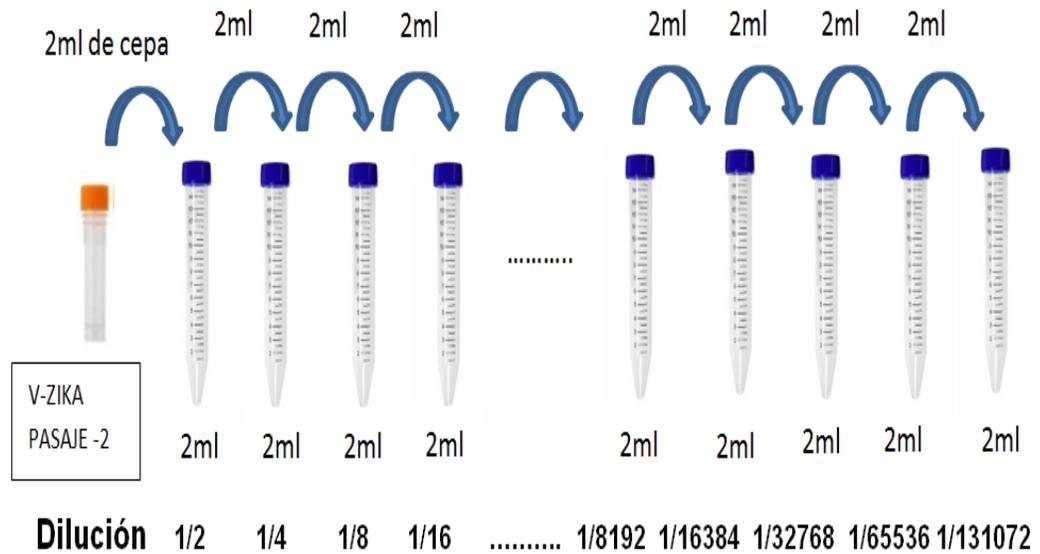


Figura 11.Preparación de diluciones seriadas al medio del virus Zika desde 1/2 a 1/131072 para obtener diluciones menos concentradas

c) Obtención del título viral de la cepa

Para conocer el título viral, se tomó la dilución donde se mostró el número menor de placas, luego mediante la fórmula se calculó el título viral, se eligió las diluciones 1/4096, 1/8192, 1/16384, 1/32768 las cuales presentaron UFP aisladas (Figura 12) ,obteniéndose los títulos adecuados para la investigación . (Tabla 3).

Dilución	Número de placas	Promedio
----------	------------------	----------

1/1024	NC	NC	NC
1/2048	NC	NC	NC
1/4096	91	102	97
1/8192	38	42	40
1/16384	22	25	24
1/32768	10	12	11
<u>1/65536</u>	<u>6</u>	<u>5</u>	<u>5</u>
1/131072	0	0	0

TITULO VIRAL : 5 x 65536 x 5 = 1.63 X10⁶ UFP/mL

NC: No contable

Tabla 2.- Titulación del virus zika en línea celular vero. Se evidencio que las diluciones 1/4096, 1/8192, 1/16384, 1/32768 eran adecuadas para el estudio ya que se encontraron UFP aisladas en cada pocillo.

d) Título viral de trabajo

Para obtener los cuatro títulos de la investigación se tomó las cuatro diluciones que presentaron las UFP contables, Tabla 4. Para hallar los títulos de las diluciones se dividió el título viral de la cepa entre el factor de dilución.

Título viral de trabajo: $\frac{1.63 \times 10^6 \text{ UFP/mL}}{\text{FACTOR DE DILUCION}}$

DILUCIONES	TITULO VIRAL DE TRABAJO
1/4096	T ₁ : 400 UFP/mL
1/8192	T ₂ : 200 UFP/mL
1/16384	T ₃ : 120 UFP/mL
1/32768	T ₄ : 55 UFP/mL

Tabla 3 .Cálculo de títulos de trabajo .Realizando el cálculo se obtuvo los siguientes títulos de trabajo; 400 UFP/mL, 200 UFP/mL,120 UFP/mL y 55 UFP/mL.

e) Inoculación en la línea celular BHK -21 y C6/36HT CRL 1660 ATCC

Para el estudio se emplearon cuatro títulos 400 UFP/mL, 200 UFP/mL, 120 UFP/mL y 55 UFP/mL, asimismo se inoculó en las dos líneas celulares. Para ello se utilizó dos placas de cultivo de la línea celular C6 /36 HT (3×10^5 células /ml x 1 ml / pozuelo x 24 pozuelos x placa), paralelamente se utilizó 2 placas de la línea celular BHK-21(2×10^5 células /ml x 1 ml/pozuelo x 24 pozuelos x placa).Se inoculo 200ul del título 400 UFP/mL a la línea celular C6/36HT toda la primera fila (A1-A4) dejando el pozuelo A5 (control negativo) y pozuelo A6(control positivo), el mismo procedimiento se realizó en la segunda fila con el título 200 UFP/mL, la tercera con la dilución título 120 UFP/mL y cuarta fila con título 55 UFP/mL, repitiendo la inoculación en una segunda placa. Lo descrito anteriormente

también se realizó en la línea celular BHK -21(Figura 13).Se incubo a 33°C la línea C6 36HT y 37 °C la línea BHK-21.

Finalmente las células BHK-21 y C6 36 HT fueron cosechadas cada 24 horas por ocho días posinoculación, las placas infectadas fueron observadas con microscopio óptico invertido, para evidenciar cambios morfológicos o efecto citopático

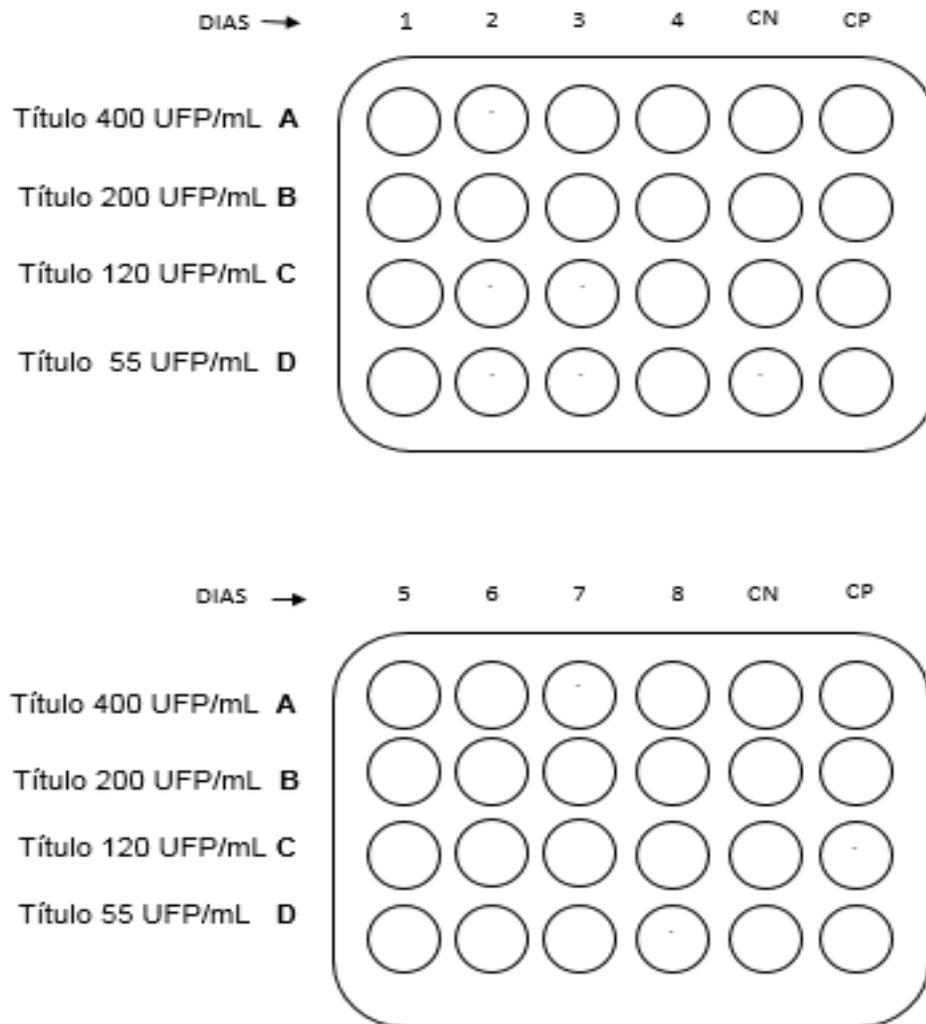


Figura 13.-Inoculación de las diluciones en la línea celular C6 36 y BHK-21. Se distribuyó los cuatro títulos en dos placas para la lectura cada 24hr por ocho días.

f) Preparación del sustrato antigénico para la inmunofluorescencia de las líneas celulares

Para la preparación del sustrato se realizó la lectura de placas en un microscopio invertido cada 24 horas por 8 días registrando la presencia o ausencia de efecto citopático. Posteriormente de cada lectura diaria se procedió a eliminar el sobrenadante del cultivo y la monocapa celular se lavó con 1 ml de PBS 1x, evitando desprender las células.

Luego se añadió a la monocapa 1ml de PBS y se desprendió las células utilizando cell scraper en las células C6 36 y para el desprendimiento de las células en la línea celular BHK se utilizó tripsina -EDTA 1x(0.25%). Se agregó 10uL de la suspensión celular obtenida sobre la lámina porta objeto de inmunofluorescencia y se observó al microscopio óptico la concentración celular, que no deben ser muy baja (pocas células), ni muy alta (muchas células que se superponen y dificultan la observación).

Después de ajustada la concentración adecuada de células por adición de PBS, el sustrato antigénico se distribuye sobre las láminas y estas se dejan secar a temperatura ambiente. Ya secas las muestras, los portaobjetos se colocaron en un vaso koplín y se añadió acetona a 4°C durante 15 minutos. Se eliminó la acetona y se dejó secar a temperatura ambiente por 5 minutos.

g) Procedimiento para la Inmunofluorescencia indirecta

Sobre el sustrato antigénico se agregó anticuerpo policlonal de ratón IgG e incubo en cámara húmeda a 37°C por 30 minutos. Se colocó las láminas en koplín y se lavó 3 veces con PBS 1X empleando agitador magnético por 10 minutos cambiando de PBS 1X en cada lavada. Posteriormente se sacó las láminas y se dejó secar. Luego se agregó 10 µL de conjugado -FITC antiratón a concentración óptima + azul de Evan's 1:1000 y se incubó en cámara húmeda a 37°C por 45 minutos. Transcurrido el tiempo se lavó 3 veces con PBS 1X cambiando el PBS en cada lavada. Asimismo se secó cuidadosamente las láminas, agregó glicerina bufferada y se colocó una laminilla.

Por último todas las muestras fueron observadas con microscopio de fluorescencia de luz por incidencia y filtro incorporado, aumento (20 x, 10x y 4x).

Se consideraron como positivas aquellas muestras que evidenciaron antígeno viral en una o más células. Se clasificó de acuerdo al porcentaje de células fluorescentes en:

- **Negativa** : Ausencia de células fluorescentes
- **1+** 1-25 % de células infectadas
- **2++** 25-50% % de células infectadas
- **3+++** 50-75 % de células infectadas
- **4++++** Más de 75 % de células infectadas

3.4. Procesamiento de datos y análisis estadístico.

El análisis de datos estadísticos se procedió a realizar usando el paquete estadístico SPSS versión 22, frecuencias simples y porcentuales y Excel para la realización de los gráficos de líneas, tablas univariadas y bivariadas las cuales evaluaron el tiempo y título viral.

Se comprobó la distribución de los datos a través del estadístico Shapiro Wilk y la homogeneidad de varianzas mediante el test de Levene. Tras conocer la distribución de los datos, se realizó la prueba paramétrica T Student para muestras independientes, se comparó la infectividad viral de cada línea celular según el título viral.

Para evaluar el efecto citopático y título viral entre las líneas celulares, se aplicó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney para 2 muestras independientes, con un nivel de confianza de 95% y significancia de $p < 0.05$.

3.5. Aspectos éticos

Los autores del proyecto de investigación declaran conocer los lineamientos generales de Helsinki, y las normas éticas del colegio médico. Están comprometidos por velar la confidencialidad de los datos.

CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

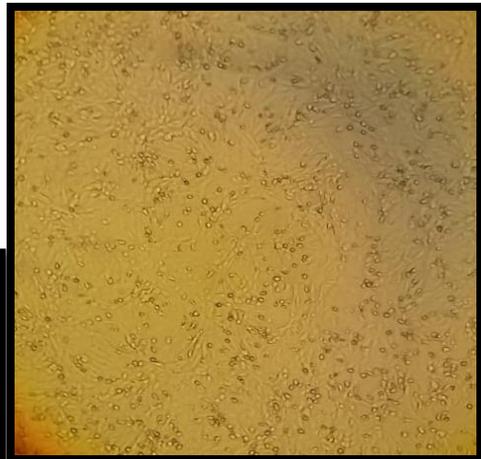
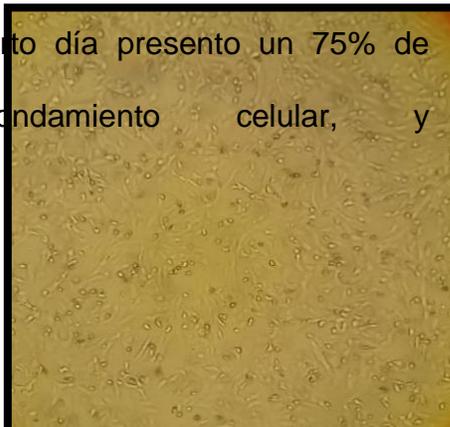
4.1. Resultados.

4.1.1 Adaptación del virus Zika en la línea celular vero

A las 24 horas posinoculación se observó en microscopio invertido y se evidencio que la línea celular no presento efecto citopático .Pasado las 48 horas se observó una ligera pérdida de adherencia en un 25 % de la totalidad de la monocapa. Luego de las 72 horas se evidenció un ECP pronunciado en un 50 % de las células presentándose perdida de adherencia,agregación celular,

contracción celular y redondamiento celular

(Figura14).Posteriormente el cuarto día presento un 75% de redondamiento celular, y



contracción celular tal como se muestra en la tabla 4.

Figura 14 .Efecto citopático causado por la replicación del virus dengue en células Vero. Células infectadas a las 72 horas con el virus, se observa redondamiento celular, pérdida de adherencia 2++ (10X)

Efecto citopático	DIA DE INCUBACION			
	1er día	2do día	3er día	4to día
Redondamiento celular		1+	2+	3+
Contracción celular		1+	2+	3+
Lisis celular		1+	2+	3+
Agregación celular			2+	2+
Formación de sincitios			2+	3+
Perdida de adherencia			2+	2+

Tabla 4. Adaptación del virus Zika en la línea celular vero. Se observa las mayores alteraciones celulares en el cuarto día posinoculación, con un 75% de redondamiento, contracción celular y formación de sincitios.

4.1.2. Efecto Citopático en la línea celular BHK-21 y C6/36 HT CRL 1660

ATCC

En la inoculación del título viral 400 UFP/mL en la línea celular C6/36 no se evidenció efecto citopático del primer al tercer día, a partir del cuarto día hasta el octavo día posinoculación se presentó un ECP de 1+ con formación de sincitios. Figura 15. En cuanto la línea celular BHK-21 el primer y segundo día no presentó efecto citopático, a partir al tercer día se presentó un ECP de 2+ con un aumento de redondamiento celular y agregación celular, en el cuarto día se presentó un EFC de 3+ con presencia de sincitios, pérdida de adherencia, lisis celular de 2+ además de otras alteraciones, al quinto día se evidenció un ECP de 3+ con diversas alteraciones celulares, la más resaltante fue la lisis celular. Finalmente del sexto hasta el octavo día hubo un ECP de 3+ a 4+, con alteraciones celulares más intensas. Figura 16, Tabla 5 y 6.

Título viral 400 UFP/mL	DIAS DE INOCULACION							
	1 DIA		2 DIA		3 DIA		4 DIA	
	C6/36	BHK	C6/36	BHK	C6/36	BHK	C6/36	BHK
ECP								
SIN ECP	X	X	X	x	X			
ECP1+							X	
ECP2+						X		
ECP3+								X

ECP4+

DESCRIPCION DEL EFECTO CITOPATICO	C6/36	BHK	C6/36	BHK	C6/36	BHK	C6/36	BHK
Redondamiento Celular						1+		2+
Contracción Celular								2+
Formacion de sinticios							1+	2+
Agregacion Celular						1+		1+
Perdida de adherencia								1+
Lisis Celular								2+

Tabla 5.- Descripción del efecto citopático del título 400 UFP/mL en células BHK -21 y C6 /36 HT. Se muestra las alteraciones celulares del primer al cuarto día.

Título viral 400 UFP/mL	DIAS							
	5 DIA		6 DIA		7 DIA		8 DIA	
ECP	C6/36	BHK	C6/36	BHK	C6/36	BHK	C6/36	BHK
SIN ECP								
ECP1+	X		X		X		X	
ECP2+								
ECP3+		X		X				
ECP4+						X		X

DESCRIPCION DEL EFECTO CITOPATICO	C6/36	BHK	C6/36	BHK	C6/36	BHK	C6/36	BHK
Redondamiento Celular		3+		4+		4+		4+
Contracción Celular		3+		4+		4+		4+
Formacion de sinticios	1+	3+	1+	4+	1+	4+	1+	4+
Agregacion Celular		2+		3+		3+		4+
Perdida de adherencia		2+		3+		4+		4+
Lisis Celular		3+		4+		4+		4+

Tabla 6.- Descripción del efecto citopático del título 400 UFP/mL en células BHK -21 y C6 /36 HT. Se muestra las alteraciones celulares del quinto al octavo día.

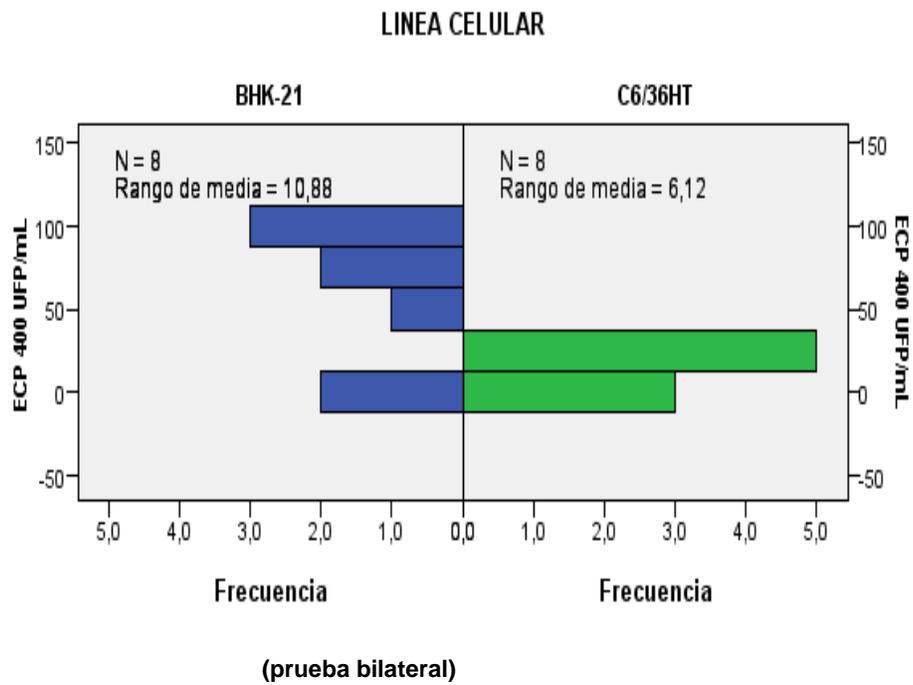


Grafico 1. Distribución del ECP -Título 400 UFP/mL en la línea celular BHK- 21 y C6/36 HT.

La prueba de U de Man -Whitney para 2 muestras independientes indica que hay diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$) del efecto citopático entre línea celular BHK-21 y C6/36HT en el título 400UFP/mL.

En el título viral 200 UFP/mL, se presenció efecto citopático de 1+ en la línea celular c6 36 a partir quinto día con presencia de sincitios 1+ ,en todos los días siguientes. Figura 17. Sin embargo en la línea BHK-21 ,el efecto citopático de 1+ se evidencio desde el cuarto día,aumentando las alteraciones celulares en 2+ y 3+ los días posteriores hasta llegar a 4+ en el setimo día pudiéndose observa con mayor intensidad formación de sincitios perdida de adherencia y lisis celular .
Figura 18, tabla 7 y 8.

Título viral 200 UFP/mL	DIAS DE INOCULACION							
	1 DIA		2 DIA		3 DIA		4 DIA	
	C6/36	BHK	C6/36	BHK	C6/36	BHK	C6/36	BHK
SIN ECP	X	X	X	X	X	X	X	
ECP1+								X
ECP2+								
ECP3+								
ECP4+								
DESCRIPCION DEL EFECTO CITOPATICO	C6/36	BHK	C6/36	BHK	C6/36	BHK	C6/36	BHK
Redondamiento Celular								
Contracción Celular								
Formación de sinticios								
Agregación Celular								
Perdida de adherencia								

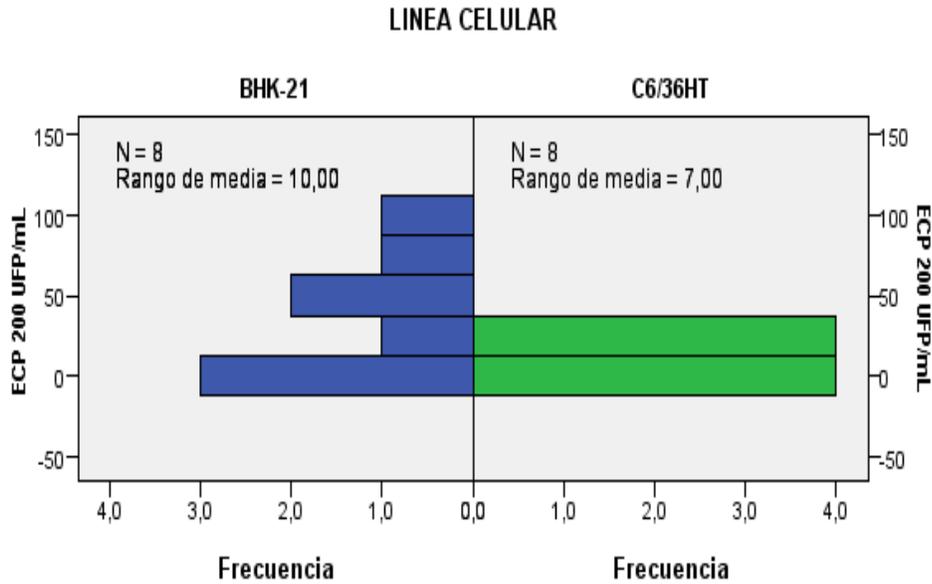
Lisis Celular	1+
---------------	----

Tabla 7. Descripción del efecto citopático del título 200 UFP/mL en células BHK-21 y C6 /36 HT. Se muestra las alteraciones celulares del primer al cuarto día.

Título viral 200 UFP/mL	DIAS DE INOCULACION							
	5 DIA		6 DIA		7 DIA		8 DIA	
ECP	C6/3 6	BH K	C6/36	BHK	C6/3 6	BH K	C6/3 6	BHK

SIN ECP								
ECP1+	X		X		X		X	
ECP2+		X						
ECP3+				X				
ECP4+						X		X
DESCRIPCION DEL EFECTO CITOPATICO	C6/3 6	BH K	C6/36	BHK	C6/3 6	BH K	C6/3 6	BHK
Redondamiento Celular				2+		3+		4+
Contracción Celular				3+		3+		4+
Formación de sinticios	1+		1+	1+	1+	4+	1+	4+
Agregación Celular				3+		2+		3+
Perdida de adherencia		1+		3+		4+		4+
Lisis Celular		2+				4+		4+

Tabla 8. Descripción del efecto citopático del título 200 UFP/mL en células BHK-21 y C6 /36 HT Se muestra las alteraciones celulares del quinto al octavo día.



N total	16
U de Mann- Whitney	20.00
Error estándar	8.967
Significación asintótica (prueba bilateral)	0.181
Significación exacta (prueba bilateral)	0.234

Grafico 2. Distribución del ECP -Título 200 UFP/mL en la línea celular BHK-21 y C6/36 HT.

La prueba de U de Man -Whitney para 2 muestras independientes indica que no hay diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) del efecto citopático entre línea celular BHK-21 y C6/36HT en el título 200UFP/mL.

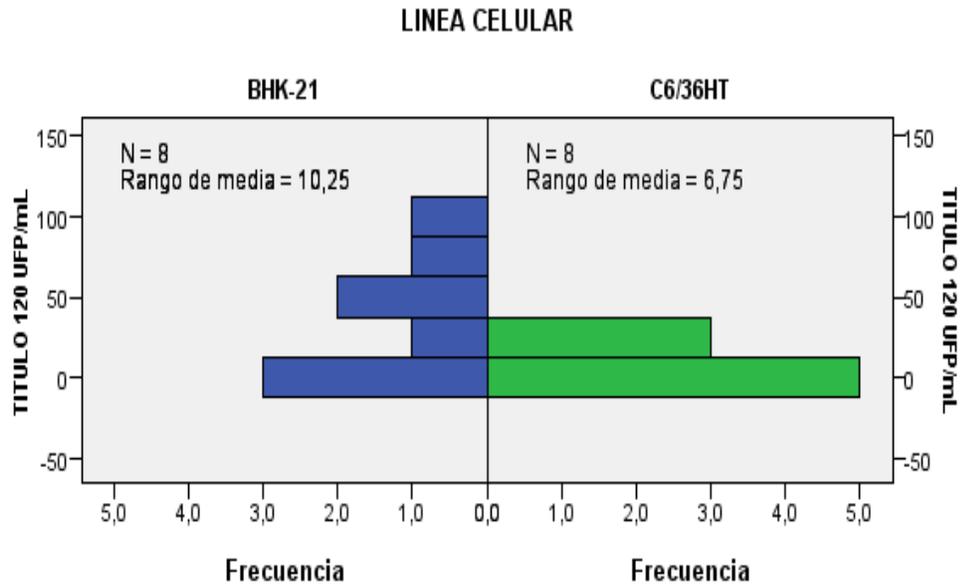
En cuanto el título viral 120 UFP/mL y 55 UFP/mL no se presenciaron diferencias significativas observándose la presencia de efecto citopático en ambas diluciones al sexto día en la línea C6/36, con formación de sincitios 1+, con respecto a la línea BHK hubo efecto citopático al cuarto día con menor intensidad 1+ y aumentando al paso de los días con 3+ y 4+ en el séptimo y octavo día respectivamente. Se evidenció como en las concentraciones anteriores todas las alteraciones celulares, Ver figuras (19 al 22)

Título viral 120 UFP/mL	DIAS DE INOCULACION							
	1 DIA		2 DIA		3 DIA		4 DIA	
	C6/36	BHK	C6/36	BHK	C6/36	BHK	C6/36	BHK
ECP								
SIN ECP	X	X	X	X	X	X	X	
ECP1+								X
ECP2+								
ECP3+								
ECP4+								
DESCRIPCION DEL EFECTO CITOPATICO	C6/36	BHK	C6/36	BHK	C6/36	BHK	C6/36	BHK
Redondamiento Celular								
Contracción Celular								
Formación de sincitios								
Agregación Celular								
Perdida de adherencia								
Lisis Celular								1+

Tabla 9. Descripción del efecto citopático del título 120 UFP/mL en células BHK -21 y C6/36 HT. Se muestra las alteraciones celulares del primer al cuarto día.

Título viral 120 UFP/mL	DIAS DE INOCULACION							
	5 DIA		6 DIA		7 DIA		8 DIA	
	C6/36	BHK	C6/36	BHK	C6/36	BHK	C6/36	BHK
ECP								
SIN ECP	X							
ECP1+			X		X		X	
ECP2+		X		X				
ECP3+						X		
ECP4+								X
DESCRIPCION DEL EFECTO CITOPATICO	C6/36	BHK	C6/36	BHK	C6/36	BHK	C6/36	BHK
Redondamiento Celular				2+		3+		4+
Contracción Celular				2+		3+		4+
Formación de sinticios			1+	3+	1+	4+	1+	4+
Agregación Celular				2+		3+		4+
Perdida de adherencia				1+		4+		4+
Lisis Celular		1+		2+		3+		4+

Tabla 10.-Descripción del efecto citopático del título 120 UFP/mL en células BHK -21 y C6 /36 HT. Se muestra las alteraciones celulares del quinto al octavo día.



N total	16
U de Mann- Whitney	18.00
Error estándar	8.832
Significación asintótica (prueba bilateral)	0.113
Significación exacta (prueba bilateral)	0.161

Grafico 3. Distribución del ECP -Título 120 UFP/mL en la línea celular BHK- 21 y C6/36 HT.

La prueba de la U de Mann-Whitney para 2 muestras independientes indica que no hay diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) del efecto citopático entre línea celular BHK-21 y C6/36HT en el título 120UFP/mL.

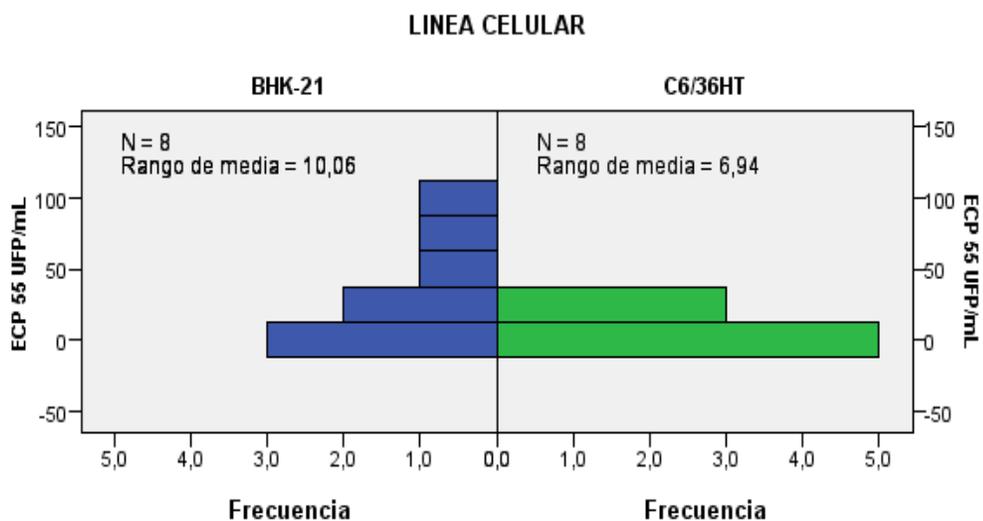
Título viral 55 UFP/mL	DIAS DE INOCULACION							
	1 DIA		2 DIA		3 DIA		4 DIA	
	C6/3 6	BHK	C6/36	BHK	C6/3 6	BHK	C6/3 6	BHK
ECP								
SIN ECP	X	X	X	X	X	X	X	
ECP1+								X
ECP2+								
ECP3+								
ECP4+								
DESCRIPCION DEL EFECTO CITOPATICO	C6/3 6	BHK	C6/36	BHK	C6/3 6	BHK	C6/3 6	BHK
Redondamiento Celular								
Contracción Celular								
Formación de sinticios								
Agregación Celular								
Perdida de adherencia								
Lisis Celular								1+

Tabla 11. Descripción del efecto citopático del título 55 UFP/mL en células BHK-21 y C6 /36 HT. Se muestra las alteraciones celulares del primer al cuarto día.

Título viral 55 UFP/mL	DIAS DE INOCULACION							
	5 DIA		6 DIA		7 DIA		8 DIA	
ECP	C6/36	BHK	C6/36	BHK	C6/36	BHK	C6/36	BHK
SIN ECP	X							
ECP1+		X	X		X		X	
ECP2+				X				
ECP3+						X		
ECP4+								X
DESCRIPCION DEL EFECTO CITOPATICO	C6/36	BHK	C6/36	BHK	C6/36	BHK	C6/36	BHK
Redondamiento Celular				2+		3+		4+
Contracción Celular				1+		2+		4+
Formación de sinticios			1+	2+	1+	4+	1+	4+
Agregación Celular				2+		3+		4+
Perdida de adherencia				1+		4+		4+
Lisis Celular		1+		2+		3+		4+

Tabla 12. Descripción del efecto citopático del título 55 UFP/mL en células BHK -21 y C6 /36 HT.

Se muestra las alteraciones celulares del quinto al octavo día.



N total	16
U de Mann- Whitney	19.500
Error estándar	8.764
Significación asintótica (prueba bilateral)	0.154
Significación exacta (prueba bilateral)	0.195

Grafico 4. Distribución del ECP -Título 55 UFP/mL en la línea celular BHK- 21 y C6/36 HT.

La prueba de la U de Mann-Whitney para 2 muestras independientes indica que no hay diferencias estadísticamente significativas (**p>0.05**) del efecto citopático entre línea celular BHK-21 y C6/36HT en el título 55 UFP/mL.

4.1.3 Inmunofluorescencia Indirecta en la línea celular BHK-21

El primer y segundo día no se observó células infectadas en ningún título sin embargo a partir del tercer día se pudo observar un 1+(25%) fluorescencia específica en todos los títulos ; 400 UFP/mL , 200 UFP/mL,120 UFP/mL y 55 UFP/mL .Al cuarto día posinoculación se evidencio 2+ (50%)de células infectadas en los cuatro títulos virales.

Por ultimo del quinto al octavo día se presentó 75 %(3+) y 100%(4+) de células fluorescentes en todos los títulos .Figura 23.

4.1.4 Inmunofluorescencia Indirecta en la línea celular C6/36 HT

En el primer día posinoculación se observó menos de 25% de células fluorescentes en el título de 400 UFP/mL dando negativo en los demás títulos.

Al segundo día se pudo observar un aumento de células infectadas en el título de mayor concentración llegando a un 25%, además en los títulos 200 UFP/mL, 120 UFP/mL llegaron también a un 25% de células infectadas. En el título 55 UFP/mL se presentó menos de 25% de positividad.

En el tercer día el título 400 UFP/mL ,200 UFP/mL y 120 UFP/mL presentó 50% de células fluorescentes, además el título 55 UFP/mL se observó un 25 % de células infectadas.

Al cuarto día en el título 400 UFP/mL, 200 UFP/mL, 120 UFP/mL se evidencio un 75% de células fluorescentes, en el cuarto título 55 UFP/mL se evidencio un 50%.

Finalmente a partir del quinto día al octavo se observó un 100% de células infectadas en las tres mayores títulos, en cambio un 75% en el título menor, además el menor título presento un 100% a partir del sexto día. Figura del 24 y 25 . Grafico 5,6,7,y 8

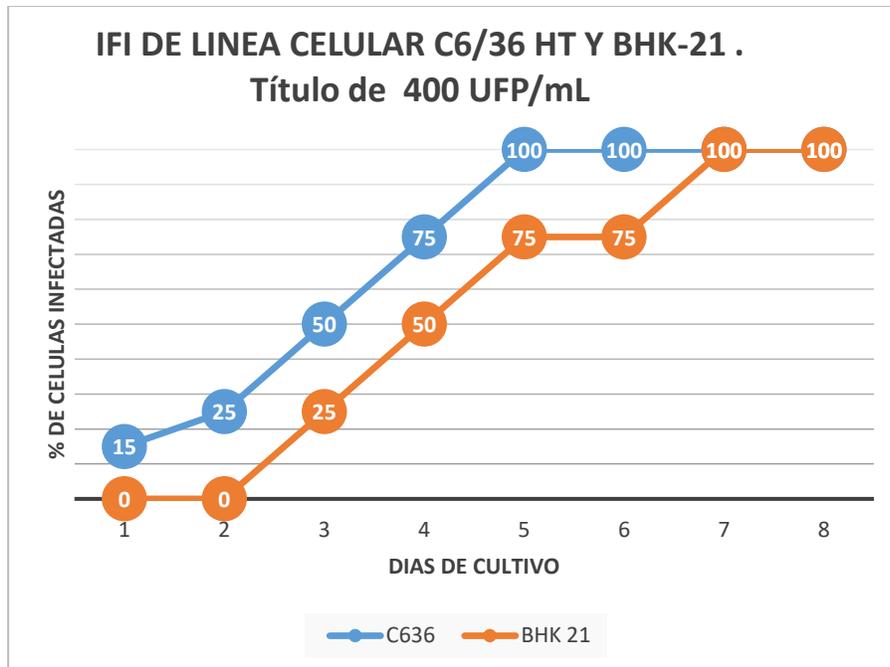


Gráfico 5. IFI en línea celular C6/36 HT y BHK-21 (Título de 400 UFP/mL). Se evidencia positividad de células infectadas en la línea C6 36 desde el primer día, 50% al tercer día, aumentando hasta un 100% en desde el quinto día. Infectividad de las células en la línea BHK 21 desde el tercer día con un 25%, ascendiendo hasta un 75% desde el quinto día posinoculación.

	Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
								Inferior	Superior
IFI TITULO 400 UFP/mL Se asumen varianzas iguales	,214	,651	-,907	14	,380	-17,500	19,304	-58,904	23,904
No se asumen varianzas iguales			-,907	13,765	,380	-17,500	19,304	-58,970	23,970

Prueba t de Student para dos muestras independientes .Significativo: $p < 0.05$

Tabla 13. Estudio estadístico de resultados obtenidos por la técnica de inmunofluorescencia entre la línea celular BHK-21 y C6/36HT (TITULO 400 UFP/mL)

La prueba de Levene indica que el supuesto de homogeneidad de varianzas se cumple en estas poblaciones (**$F=0.030$; $p>0.05$**) .La prueba T de muestras independientes indica que no hay diferencias significativas entre la infectividad entre línea celular BHK-21 y C6/36HT en el título 120 UFP/mL. (**Estadísticos $t=-0.970$; gl 14; $p>0.05$**)

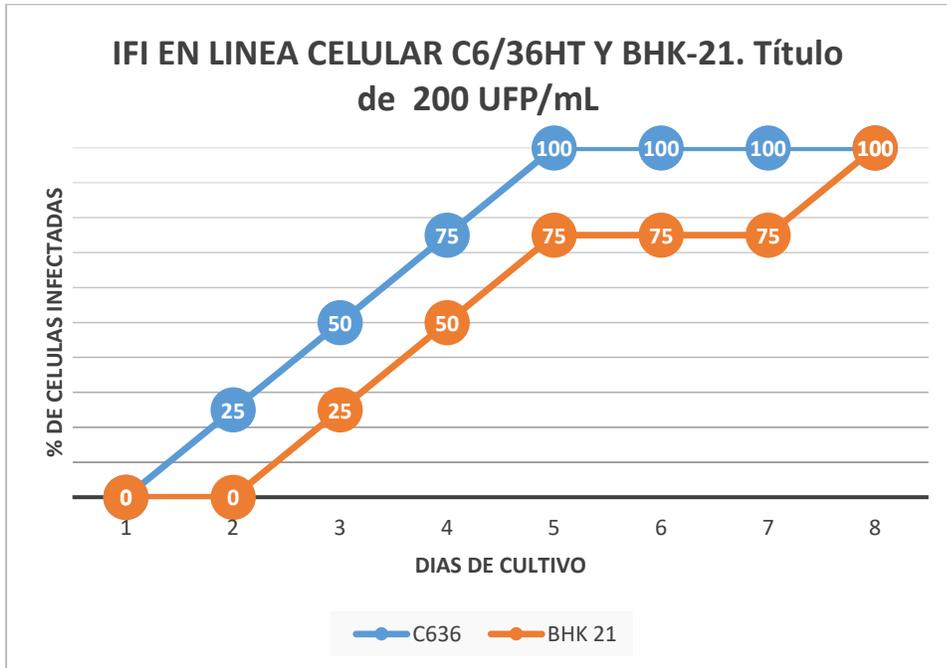


Gráfico 6. IFI en línea celular C6/36 HT y BHK-21 con el Título de 200 UFP/mL. Un 25% de infectividad en el segundo día ,50% de infectividad en el tercer día aumentando al 100% desde el quinto día en la línea celular C6 36 .En la línea BHK 21 se presentó células infectadas desde el tercer día con un 25%, ascendiendo en 50% al cuarto día y 75% desde el quinto día, 100% en el octavo día.

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias							
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia		
								Inferior	Superior	
IFI TITULO 200 UFP/mL	,030	,864	- ,970	14	,349	-18,750	19,336	-60,222	22,722	
Se asumen varianzas iguales										
No se asumen varianzas iguales			- ,970	13,972		-18,750	19,336	-60,230	22,730	

Prueba t de Student para dos muestras independientes .Significativo: $p < 0.05$

Tabla 14. Estudio estadístico de resultados obtenidos por la técnica de inmunofluorescencia entre la línea celular BHK-21 y C6/36HT (TITULO 200 UFP/mL)

La prueba de Levene indica que el supuesto de homogeneidad de varianzas se cumple en estas poblaciones (**F=0.030; $p > 0.05$**) .La prueba T de muestras independientes indica que no hay diferencias significativas entre la infectividad entre línea celular BHK-21 y C6/36HT en el título 120 UFP/mL. (**Estadísticos $t = -0.970$; gl 14; $p > 0.05$**)

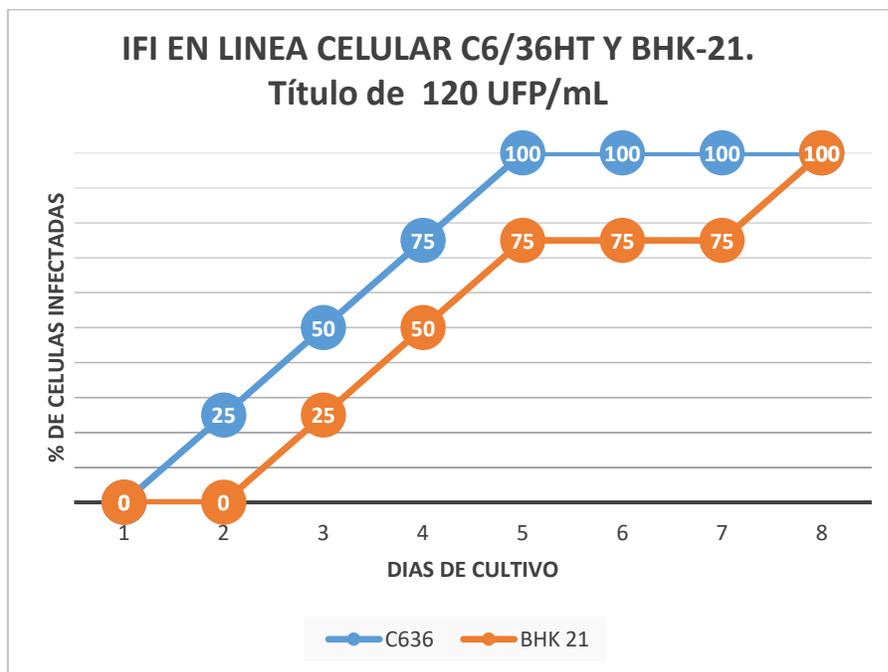


Gráfico 7. IFI en línea celular C6/36 HT y BHK -21 con el título de 120 UFP/mL. Un 25% de infectividad en el segundo día ,50% de infectividad en el tercer día aumentando al 100% desde el quinto día en la línea celular C6 36 .En la línea BHK-21 se presentó células infectadas desde el tercer día con un 25%, ascendiendo en 50% al cuarto día y 75% desde el quinto día hasta llegar al 100% al octavo día.

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias							
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia		
								Inferior	Superior	
IFI TITULO 120 UFP/mL	,030	,864	-.970	14	,349	-18,750	19,336	-60,222	22,722	
Se asumen varianzas iguales										
No se asumen varianzas iguales			-.970	13,972	,349	-18,750	19,336	-60,230	22,730	

Prueba t de Student para dos muestras independientes .Significativo: $p < 0.05$

Tabla 15. Estudio estadístico de los resultados obtenidos por la técnica de inmunofluorescencia entre la línea celular BHK-21 y C6/36HT (TITULO 120 UFP/mL)

La prueba de Levene indica que el supuesto de homogeneidad de varianzas se cumple en estas poblaciones (**F=0.030; $p > 0.05$**). La prueba T de muestras independientes indica que no hay diferencias significativas de la infectividad entre línea celular BHK-21 y C6/36HT en el título 120 UFP/mL. (Estadísticos **t=-0.970; gl 14; $p > 0.05$**).

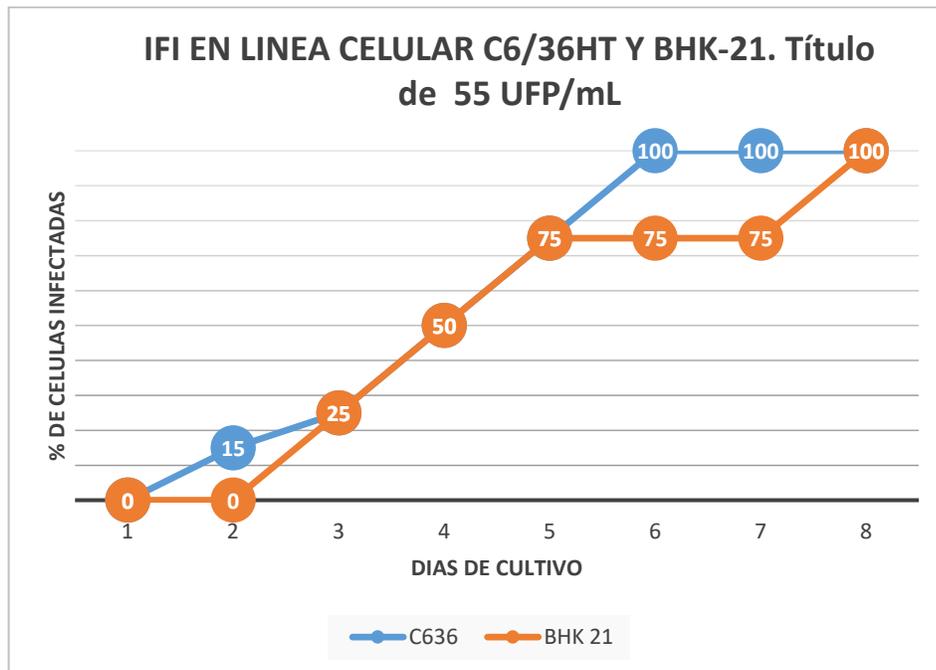


Gráfico 8. IFI en línea celular C6/36 HT y BHK -21 con el título de 55 UFP/mL. Menos de 25% de infectividad en el segundo día ,25% de infectividad en el tercer día, un 50% y 75% al cuarto y quinto día respectivamente, aumentando al 100% desde el quinto día en la línea celular C6 36 .En la línea BHK 21 se presentó células infectadas desde el tercer día con un 25%, ascendiendo en 50% al cuarto día y 75% desde el quinto día.

Prueba de muestras independientes

	Prueba de Levene de calidad de varianzas		prueba t para la igualdad de medias						
	F	Sig.	t	gl	Sig. (bilateral)	Diferencia de medias	Diferencia de error estándar	95% de intervalo de confianza de la diferencia	
								Inferior	Superior
IFI TITULO 55 UFP/mL Se asumen varianzas iguales	,269	,612	-,410	14	,688	-8,125	19,797	-50,585	34,335
No se asumen varianzas iguales			-,410	13,891	,688	-8,125	19,797	-50,616	34,366

Prueba t de Student para dos muestras independientes .Significativo: $p < 0.05$

Tabla 16. Estudio estadístico de resultados obtenidos por la técnica de inmunofluorescencia entre la línea celular BHK-21 y C6/36HT (TITULO 55 UFP/mL)

La prueba de Levene indica que el supuesto de homogeneidad de varianzas se cumple en estas poblaciones (**F=0.269; $p > 0.05$**) .La prueba T de muestras independientes indica que no hay diferencias significativas de la infectividad entre la línea celular BHK-21 y C6/36HT en el título 55UFP/mL. (Estadísticos **t=-0.410; gl 14; $p > 0.05$**)

4.2. Discusión

El virus del zika, que pertenece al género flavivirus semejante al virus dengue y fiebre amarilla, con estructuras proteicas similares, el cual sirve como referencia para el diagnóstico viral. Los protocolos actuales de propagación de ZIKV se basan típicamente en células adherentes Vero y C6 / 36 HT. En este estudio, las células adherentes BHK-21 y C6/36 HT mostraron rendimientos similares para los cuatro títulos estudiados.

Según investigaciones previas, Hamel R. et al., (2015)³⁴ en su estudio “Biología de la infección del virus Zika en células de la piel humana” demostraron que además de las células C6/36, las células inmunitarias de la piel, incluidos los fibroblastos dérmicos, los queratinocitos epidérmicos y las células dendríticas inmaduras, también permitían la infección por ZIKV, pues encontraron ARN viral en el cerebro, hígado, riñón y bazo el cual podría tener tropismo con estas células y plantea preguntas sobre sitios de replicación viral, esto coincide con este estudio ,ya que evidenciamos que las células BHK-21 constituidas de células fibroblásticas de riñón presentaron una buena infectividad y tropismo de estas células con efectos citopático agresivos y cambios celulares altamente visibles .

Nuestro análisis determino mediante la inmunofluorescencia que el virus del Zika tiene buena replicación viral en la línea C6/36 HT, observándose células fluorescentes desde las 24 horas en título de 400 UFP/ML y aumentando de

manera progresiva , sin embargo ,en títulos menores se observaron infectividad a partir de 48 horas, Respecto al ECP en la línea celular C6/36HT en nuestro estudio se presento un ECP con formación de sincitios y muerte celular de 25% manteniéndose en los demás días posinoculación. Resultados semejantes se obtuvo en la investigación de Barreto DF (2017) ³⁶; “ Investigación estructural de C6 / 36 y cultivos de células Vero infectados con un virus de Zika brasileño ” , ya que mediante la IFI se observó un mayor número de células infectadas fluorescentes a las 72 h p.i. en células C6 / 36, y un ECP en la línea C6 / 36 y Vero con individualización celular, redondeo y desprendimiento, así como la citólisis desde las 24 horas posinoculación y fueron más evidentes a las 72 h posinoculación.En la línea celular C6/36HT se puede identificar una mayor concentración de partículas virales debido a que el virus no destruye a su hospedero pudiéndose conservar el virus en la célula, logrando evidenciarlo posteriormente con el método de inmunofluorescencia.

En cuanto la línea celular BHK-21, en el estudio de Chang JF et.al (2016) titulado “Susceptibilidad diferencial de las líneas celulares a la infección por ZIKV: implicaciones para la patogenia de la enfermedad, transmisión humana, no transmitida por vectores y reservorios de animales” demostró que además de otras líneas celulares humanas y no humanas , la línea celular BHK-21 demuestran una replicación productiva del ZIKV ,en su estudio evaluó el ECP ,presentando negatividad en el primer día y 100% de alteraciones celulares en el tercer y quinto día. Estos resultados corroboran nuestra investigación, dado que observamos ECP de 50% en el tercer día, y llegando al 100% de las célula

infectadas a partir del sétimo día, dando un efecto citopático agresivo con diversas alteraciones celulares. La susceptibilidad de las células BHK-21 al ZIKV también fue ratificado en el estudio de A. Nikolay et al. (2017) “Propagación de cepas del virus del Zika brasileño en cultivos estáticos y en suspensión utilizando células Vero y BHK-21” realizó el método de biorreactor de perfusión y suspensión en la línea BHK-21 para producción de partículas virales de ZIKV en el cual mostraron que BHK-21 adherentes han demostrado una permisividad y rendimientos de virus para cuatro aislados diferentes de ZIKV brasileños, además tiempos de duplicación bajos de 25 h, logrando concentraciones de más de 7×10^6 células / ml en la BHK-21 en cultivos en suspensión, aunque los mejores rendimientos para las células BHK-21 se obtuvieron con ZIKV en biorreactor de perfusión , lo que hace que este sistema de células huésped-virus sea un candidato para la producción de virus . Sin embargo el análisis de Chenglin D et.al (2016) “Aislamiento y caracterización del virus Zika importado a China utilizando células de mosquito C6 / 36”, discrepan con nuestra observación, en este estudio se cuantifico mediante ensayo de placas en células Vero ,BHK-21 y C6/36 , comprobando que en la línea BHK-21 se presento unidades formadoras de placas más pequeñas y menores que en la línea celular C6/36 indicando que la amplificación eficiente en el método de cultivo C6/36 es apropiado para el aislamiento de Zika a partir de carga viral muy baja.

El virus Zika presentó una afinidad en la línea celular C6/36 HT que lo utiliza como un hospedero para su replicación viral detectándose tempranamente en la IFI, pero presenta menor muerte celular, por ello el efecto citopático ante esta línea

celular es mínima, lo cual puede pasar desapercibido ante el investigador, es decir se necesita una preparación mayor y experiencia en el campo. En tanto la línea BHK-21 el virus tiene una mayor capacidad de lisis celular y alteraciones celulares con una diferenciación más pronunciada para el diagnóstico mediante el efecto citopático en cultivo celular.

CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones

- Se evidenció efecto citopático en la línea celular C6/36 HT desde el cuarto día posinoculación manteniéndose estable los demás días, con pocas alteraciones celulares como sincitios y lisis celular. Respecto al efecto citopático en la línea celular BKH 21, presentó una mayor intensidad y rapidez en la aparición de los ECP observándose diversas alteraciones desde el tercer día.
- Con relación a la IFI se observó células infectadas en la línea C6 /36 HT desde las 24 horas en título mayor y desde las 48 horas en los demás títulos. En la línea celular BHK-21 se pudo observar células infectadas a las 72 horas posinoculación en todos los títulos.
- Al comparar las dos líneas celulares respecto a la intensidad de efecto citopático se demostró que existe diferencias estadísticamente significativas solo en el título de mayor concentración de línea celular BHK 21, presentando un efecto ECP en menor tiempo y con mayores alteraciones morfológicas celulares.
- En cuanto la infectividad por IFI entre las dos líneas celulares se demostró que no presentaron diferencias estadísticamente significativas en ningún título, presentando resultados similares.

5.2. Recomendaciones.

- Realizar estudios en la línea celular BHK- 21, para diagnóstico de infección del virus Zika y mejorar la vigilancia epidemiológica en casos sospechosos o brotes, ya que presenta un ECP con mayor intensidad y rapidez, siendo más fácil su identificación, asimismo, presenta un menor tiempo de incubación, lo que ayudaría en reducir el tiempo de diagnóstico.

- Utilizar la línea celular C6/36 HT para investigación y propagación del virus debido a su alta capacidad de multiplicación viral que puede ser empleado en diversos estudios, para fines diagnóstico pueden ser utilizados con personal altamente calificado debido a la poca presencia de ECP.

REFERENCIAS

- 1.** Núñez E, Vásquez M, Beltrán-Luque B, Padgett D. Virus Zika en Centroamérica y sus complicaciones. Acta Med Peru. [Internet]. 2016 [citado 17 Jul 2017] ;33(1):42-9. Disponible en: www.scielo.org.pe/scielo.php?pid=S1728-59172016000100008&script=sci_arttext.
- 2.** Fréour T, Mirallié S, Hubert B, Spingart C, Barriere P, Maquart M, et al. Sexual transmission of Zika virus in an entirely asymptomatic couple returning from a Zika epidemic area. Euro Surveill. 2016; 21(23): 1-3.
- 3.** Brasil P, Pereira JP Jr, Gabaglia CR, Damasceno L, Wakimoto M, Ribeiro Nogueira RM, et al. Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro - preliminary report. N Engl J Med . [Internet]. 2016; [citado 18 Jul 2017] 375:2321-2334 Disponible en <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa1602412#t=article>
- 4.** Zammarchi L, Stella G, Mantella A, Bartolozzi D, Tappe D, Gunther S, et al. Zika virus infection imported to Italy: clinical, immunological and virological findings, and public health implications. J Clin Virol. 2015; 63:32-5.
- 5.** Van den Hurk AF, Hall-Mendelin S, Pyke AT: Vector competence of Australian mosquitoes for chikungunya virus. Published . 2010, 10(5): 489-495.
- 6.** OMS.int. Estados Unidos. [Internet].2016. [actualizado 21 abril 2016; 22 Jul 2017] Disponible en:<http://www.who.int/csr/don/21-april-2016-zika-peru/es/>.
- 7.** Yunker CE. Preparation and Maintenance of Arthropod Cell Cultures: Acari, with Emphasis on Ticks,Publisher [Internet].1988. [citado 20 2017] ;1:35-51. Disponible en: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US880676488>

- 8.** Pardo G, Almora E, Fidalgo O, Zamora A, Rodríguez N, Pérez E. Ensayo in vitro para detectar la presencia de agentes adventicios en un banco de células de trabajo. *Vaccimonitor* [Internet]. 2001 Mar [citado 31 Jul 2017]; 10(1): 17-21. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-028X2001000100004&lng=es.enovirus
- 9.** Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí” .. [Internet]. Cuba,2011. [citado 27 de Jul 2017] . Técnicas de Laboratorio para el Diagnóstico y la caracterización de los Virus del Dengue [aprox.133 pantallas]. Disponible en: [file:///C:/Users/USER/Downloads/2013-cha-tecnicas-laboratorio-dengue-IPK%20\(6\).pdf](file:///C:/Users/USER/Downloads/2013-cha-tecnicas-laboratorio-dengue-IPK%20(6).pdf)
- 10.** Nikolay A, Castilho LR, Reichl U, Genzel Y. Propagation of Brazilian Zika virus strains in static and suspension cultures using Vero and BHK cells. Elsevier. [Internet]. 2016 [citado 17 Jul 2017];33(1):340-345.Disponible en: https://www.clinicalkey.com/service/content/pdf/watermarked/1-s2.0-S0264410X17303249.pdf?locale=en_US.
- 11.** Barreto DF, Jácome FC, Da Silva M, Caldas G, Bispo A, Carvalho P , et al. Investigación estructural de C6 / 36 y cultivos de células Vero infectados con un virus de Zika brasileño. *PLoS ONE* [Internet].2017 [citado 30 Agos 2017]; 12 (9): 0184397. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0184397>
- 12.** Chan JF, Yip C, Tsang J , Tee K, Cai J, Chik K et. Al. Differential cell line susceptibility to the emerging Zika virus: implications for disease pathogenesis, non-vector-borne human transmission and animal reservoirs. *Pub Med* [Internet].2016 [citado 30 Agos 2017]; 5 1 -12.Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27553173>
- 13.** Chenglin D,Liu S,Zhang Q, Xu M, Zhang H,Gu D, et al. Aislamiento y caracterización del virus Zika importado a China utilizando células de mosquito C6

/ 36. Virol Sin [Internet].2016 [citado 30 agos 2017]; 31 (2): 176–179. Disponible en :<https://doi.org/10.1007/s12250-016-3778-5>

14. Zanluca C, Melo VC, Mosimann AL, Santos GI, Santos CN, Luz K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz [Internet]. 2015, [citado 22 Agos 2017], 10(4):569-572. Disponible en: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762015000400569&lng=en&nrm=iso>. Epub June 09, 2015. ISSN 0074-0276. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760150192>.

15. CDC. Center for Disease Control and Prevention. Zika virus [Internet]. Estados Unidos. [actualizado 21 May 2016; 22 Jul 2017]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/zika/about/index.html>

16. Maguiña Ciro, Galán-Rodas Edén. El virus Zika: una revisión de literatura. Acta méd. Peruana [Internet]. 2016 [citado 25 Oct 2017]; 33(1): 35-41. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1728-59172016000100007&lng=es.

17. Instituto de Salud Pública de Chile. Ministerio de Salud Virus Zika .Boletín de Laboratorio y Vigilancia. [Internet] Chile.2016.[citado Jul 30 2017] .Disponible en: <http://www.ispch.cl/sites/default/files/documento/2016/12/BoletinZika.pdf>.

18. Li G, Poulsen M, Fenyvuesvolgyi C, Yashiroda Y, Yoshida M, Simard JM, Gallo RC. et al. Characterization of cytopathic factors through genome-wide analysis of the Zika viral proteins in fission yeast. Pubmed [Internet]. 2017 [citado 29 Jul 2017]; 114(3):376-385 Disponible en : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Characterization+of+cytopathic+factors+through+genome-wide+analysis+of+the+Zi>

- 19.** Vielma S. Virus Zika: No era suficiente con Dengue y Chikungunya. [diapositiva]. Venezuela: Unidad de Diagnóstico de Enfermedades Infecciosas; Laboratorio De Salud Pública del Estado. Marzo 2016 .74 diapositivas [Internet]. 2016 [citado 30 Jul 2017]. Disponible en: http://www.unipamplona.edu.co/unipamplona/portallG/home_148/recursos/seminarios/05042016/noerasuficientecondengueychiku.pdf.
- 20.** CDC. Entomology & Ecology - Dengue Transmission Vectors [Internet]. 2016 [citado Agos 2 2017]. Disponible en: <http://www.cdc.gov/Dengue/entomologyEcology/index.html>
- 21.** Espinoza M. Aspectos clínicos de la infección por el virus zika. An. Fac. med. [Internet]. 2017 [citado 2017 oct 05] ; 78(1): 79-82. Disponible en: http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1025-55832017000100013&lng=es. <http://dx.doi.org/10.15381/anales.v78i1.13026>.
- 22.** OMS: Organización Mundial de la Salud. Pruebas de laboratorio para la infección por el virus de Zika.2016 [Internet]. [citado 2 Agos 2017]Disponible en http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/204898/1/WHO_ZIKV_LAB_16.1_spa.pdf
- 23.** Hajra A, Bandyopadhyay D, Hajra SK. Zika virus: a global threat to humanity: a comprehensive review and current developments. North Am J Med Sci. . [Internet]. 2016. [citado 14 Oct 2017]. 8(3):123-8. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27114968>
- 24.** Betancur L, Bedoya A, Cardona J . Relación Entre Síndrome de GuillainBarré e Infección por el Virus Zika: Revisión Sistemática de la Literatura MedPub [Internet] 2016; [citado 15 Oct 2017];12(3):1-8.Disponible en: <http://www.archivosdemedicina.com/medicina-de-familia/relacioacuten-entre-siacutendrome-de-guillainbarreacute-e-infeccioacuten-por-el-virus-zika-revisioacuten-sistemaacutetica-de-la-li.pdf>

- 25.** Anaya J, Rodríguez Y, Ramírez C, Monsalve D, Vega D. Respuesta Autoinmune en Individuos Infeccionados por el virus Zika (Raiz). Revista Médica. [Internet]. 2016 [citado 12 Oct 2017];40(1) Disponible en: <https://revistamedicina.net/ojsanm/index.php/Medicina/article/view/1282/1536>
- 26.** Oehler E, Watrin L, Larre P, Leparc-Goffart I, Lastère S, Valour F, et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report, French Polynesia. Euro Surveill [Internet]. 2014 [citado 1 Dic 2017]; 19(9):20720. Disponible en: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=07202>
- 27.** OPS. Organización Panamericana de la Salud. Washington, D.C, 2018. 2 [citado 22 abr 2018]. Guía para la vigilancia de la enfermedad por el virus del Zika y sus complicaciones. C Disponible en: http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/28234/9789275318942_spa.pdf?sequence=1&isAllowed=y.
- 28.** Cabezas C, García P. Diagnóstico de la infección por el virus zika An Fac Med [Internet]. 2017. [citado 1 Dic 2017];78(1):89-93. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15381/anales.v78i1.13028>
- 29.** CDC: Centro Para el Control y la Prevención de Enfermedades. Tipos de pruebas de detección del virus del Zika [Internet]. 2017 [citado 29 Jul 2017] Disponible en: <https://espanol.cdc.gov/enes/zika/laboratories/types-of-tests.html>
- 30.** OMS: Organización Mundial de la Salud. Vigilancia del virus Zika (ZIKV) en las Américas: Detección y diagnóstico por laboratorio. [Internet] 2016 [citado 2 Ago 2017] Disponible en: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=30177&Itemid=270.

- 31.** INS: Instituto Nacional de salud. Centro nacional de laboratorios de salud pública .Manual de procedimientos de laboratorio para el diagnóstico de arbovirosis. [Internet] 1996 [citado 25 Agos 2017] Disponible en: http://www.bvs.ins.gob.pe/insprint/salud_publica/nor_tec/16.pdf.
- 32.** Shores Teri ,Virus ; Estudio molecular con orientación clínica. 1ª ed. Buenos Aires:Médica panamericana ;2009.
- 33.** Vargas M. Virología Medica , [Internet] Vol 2 .2da ed.,Colombia. El Manual Moderno Colombia; 2016. [citado ,10 agos 2017] Disponible en: https://books.google.com.pe/books?id=5oS8DgAAQBAJ&pg=PT368&dq=linea+ce+lular+c6+36&hl=es&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=c6%2036&f=false
- 34.** Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. Journal of Virology , [Internet] 2015 [citado ,10 agos 2017] ;89 (17): 8880–8896. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4524089/#!po=72.2222>

ANEXOS

Anexo 1.

FICHA DE OBTENCION DE CEPAS

NOMBRE VIRUS:	DILUCION CEPAS :	LINEA CELULAR:	VOLUMEN FRASCO :	Nº CELULAS:
Nº DE PASAJE:	VOLUMEN MM ³ :	TIPO DE CELULA:	Tº CRECIMIENTO:	% CO2 :

1 DIA	2 DIA	3 DIA	4 DIA	5 DIA
EFEECTO CITOPATICO(ECP) SIN ECP: <input type="checkbox"/> ECP 1 +: <input type="checkbox"/> ECP 2 +: <input type="checkbox"/> ECP 3 +: <input type="checkbox"/> ECP 4 +: <input type="checkbox"/>	EFEECTO CITOPATICO(ECP) SIN ECP: <input type="checkbox"/> ECP 1 +: <input type="checkbox"/> ECP 2 +: <input type="checkbox"/> ECP 3 +: <input type="checkbox"/> ECP 4 +: <input type="checkbox"/>	EFEECTO CITOPATICO(ECP) SIN ECP: <input type="checkbox"/> ECP 1 +: <input type="checkbox"/> ECP 2 +: <input type="checkbox"/> ECP 3 +: <input type="checkbox"/> ECP 4 +: <input type="checkbox"/>	EFEECTO CITOPATICO(ECP) SIN ECP: <input type="checkbox"/> ECP 1 +: <input type="checkbox"/> ECP 2 +: <input type="checkbox"/> ECP 3 +: <input type="checkbox"/> ECP 4 +: <input type="checkbox"/>	EFEECTO CITOPATICO(ECP) SIN ECP: <input type="checkbox"/> ECP 1 +: <input type="checkbox"/> ECP 2 +: <input type="checkbox"/> ECP 3 +: <input type="checkbox"/> ECP 4 +: <input type="checkbox"/>
DESCRIPCION DELECP R.C: <input type="checkbox"/> C.C: <input type="checkbox"/> AUM. REFRACT: <input type="checkbox"/> F.S: <input type="checkbox"/> AGREGACION: <input type="checkbox"/> P. ADHERENCIA: <input type="checkbox"/> LISIS CELULAR: <input type="checkbox"/>	DESCRIPCION DELECP R.C: <input type="checkbox"/> C.C: <input type="checkbox"/> AUM. REFRACT: <input type="checkbox"/> F.S: <input type="checkbox"/> AGREGACION: <input type="checkbox"/> P. ADHERENCIA: <input type="checkbox"/> LISIS CELULAR: <input type="checkbox"/>	DESCRIPCION DELECP R.C: <input type="checkbox"/> C.C: <input type="checkbox"/> AUM. REFRACT: <input type="checkbox"/> F.S: <input type="checkbox"/> AGREGACION: <input type="checkbox"/> P. ADHERENCIA: <input type="checkbox"/> LISIS CELULAR: <input type="checkbox"/>	DESCRIPCION DELECP R.C: <input type="checkbox"/> C.C: <input type="checkbox"/> AUM. REFRACT: <input type="checkbox"/> F.S: <input type="checkbox"/> AGREGACION: <input type="checkbox"/> P. ADHERENCIA: <input type="checkbox"/> LISIS CELULAR: <input type="checkbox"/>	DESCRIPCION DELECP R.C: <input type="checkbox"/> C.C: <input type="checkbox"/> AUM. REFRACT: <input type="checkbox"/> F.S: <input type="checkbox"/> AGREGACION: <input type="checkbox"/> P. ADHERENCIA: <input type="checkbox"/> LISIS CELULAR: <input type="checkbox"/>
OBSERVACIONES:	OBSERVACIONES:	OBSERVACIONES:	OBSERVACIONES:	OBSERVACIONES:

(*) Medio De Mantenimiento/(**)R.C: Redondamiento Celular/(***)C.C: Contracción Celular/(****)AUM. REFRACT: Aumento de la Refractibilidad/(**)Formación de Sinctios/ (**)Perdida de Adherencia

FICHA DE TITULACION VIRAL

NOMBRE VIRUS:		DILUCION CEPA :		LINEA CELULAR:		N° POSOS X PLACAS :		N° CELULAS:	
N° PASAJE :		TIPO DE CELULA:		TIEMPO INCUBACION:		T° CRECIMIENTO:		% CO2 :	

1 PARADA		1 PARADA		1 PARADA		1 PARADA		1 PARADA	
FECHA:	HORA:								
10 ⁻¹									
10 ⁻²									
10 ⁻³									
10 ⁻⁴									
10 ⁻⁵									
10 ⁻⁶									
10 ⁻⁷									
10 ⁻⁸									
10 ⁻⁹									
10 ⁻¹⁰									

DIL. ^(*)	UFFP ^(*)	TITUL. ^(*)	DIL. ^(*)	UFFP ^(*)	TITUL. ^(*)	DIL. ^(*)	UFFP ^(*)	TITUL. ^(*)	DIL. ^(*)	UFFP ^(*)	TITUL. ^(*)
10 ⁻¹											
10 ⁻²			10 ⁻²			10 ⁻²			10 ⁻²		
10 ⁻³			10 ⁻³			10 ⁻³			10 ⁻³		
10 ⁻⁴			10 ⁻⁴			10 ⁻⁴			10 ⁻⁴		
10 ⁻⁵			10 ⁻⁵			10 ⁻⁵			10 ⁻⁵		
10 ⁻⁶			10 ⁻⁶			10 ⁻⁶			10 ⁻⁶		
10 ⁻⁷			10 ⁻⁷			10 ⁻⁷			10 ⁻⁷		
10 ⁻⁸			10 ⁻⁸			10 ⁻⁸			10 ⁻⁸		
10 ⁻⁹			10 ⁻⁹			10 ⁻⁹			10 ⁻⁹		
10 ⁻¹⁰			10 ⁻¹⁰			10 ⁻¹⁰			10 ⁻¹⁰		

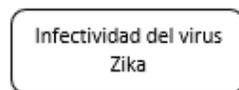
(*) UFP: Unidades Formadoras De Placas/(*) DIL.: Dilución/(*)TITUL.: Titulación./SUFFP: Sin Unidades Formadoras De Placas

FICHA DE INFECTIVIDAD VIRAL																																																																																																			
NOMBRE VIRUS:	DILUCION CEPA :	LINEA CELULAR:	N° POSOS X PLACAS :	N° CELULAS:																																																																																															
N° PASAJE :	TIPO DE CELULA:	TIEMPO INCUBACION:	T° CRECIMIENTO:		% CO2 :																																																																																														
1 COSECHA – UFC	1 COSECHA – UFC	1 COSECHA – UFC	1 COSECHA – UFC	1 COSECHA – UFC																																																																																															
<table border="1" style="width: 100%; height: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 20px; height: 20px;"></td><td style="width: 20px; height: 20px;"></td></tr> <tr><td style="width: 20px; height: 20px;"></td><td style="width: 20px; height: 20px;"></td></tr> <tr><td style="width: 20px; height: 20px;"></td><td style="width: 20px; height: 20px;"></td></tr> <tr><td style="width: 20px; height: 20px;"></td><td style="width: 20px; height: 20px;"></td></tr> </table>																									<table border="1" style="width: 100%; height: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 20px; height: 20px;"></td><td style="width: 20px; height: 20px;"></td></tr> <tr><td style="width: 20px; height: 20px;"></td><td style="width: 20px; height: 20px;"></td></tr> <tr><td style="width: 20px; height: 20px;"></td><td style="width: 20px; height: 20px;"></td></tr> <tr><td style="width: 20px; height: 20px;"></td><td style="width: 20px; height: 20px;"></td></tr> </table>																									<table border="1" style="width: 100%; height: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 20px; height: 20px;"></td><td style="width: 20px; height: 20px;"></td></tr> <tr><td style="width: 20px; height: 20px;"></td><td style="width: 20px; height: 20px;"></td></tr> <tr><td style="width: 20px; height: 20px;"></td><td style="width: 20px; height: 20px;"></td></tr> <tr><td style="width: 20px; height: 20px;"></td><td style="width: 20px; height: 20px;"></td></tr> </table>																									<table border="1" style="width: 100%; height: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr><td style="width: 20px; height: 20px;"></td><td style="width: 20px; height: 20px;"></td></tr> <tr><td style="width: 20px; height: 20px;"></td><td style="width: 20px; height: 20px;"></td></tr> <tr><td style="width: 20px; height: 20px;"></td><td style="width: 20px; height: 20px;"></td></tr> <tr><td style="width: 20px; height: 20px;"></td><td style="width: 20px; height: 20px;"></td></tr> </table>																								
RESULTADO IFI ^(*)	RESULTADO IFI ^(*)	RESULTADO IFI ^(*)	RESULTADO IFI ^(*)	RESULTADO IFI ^(*)																																																																																															
POSITIVO <input style="width: 20px; height: 15px;" type="checkbox"/> NEGATIVO <input style="width: 20px; height: 15px;" type="checkbox"/>	POSITIVO <input style="width: 20px; height: 15px;" type="checkbox"/> NEGATIVO <input style="width: 20px; height: 15px;" type="checkbox"/>	POSITIVO <input style="width: 20px; height: 15px;" type="checkbox"/> NEGATIVO <input style="width: 20px; height: 15px;" type="checkbox"/>	POSITIVO <input style="width: 20px; height: 15px;" type="checkbox"/> NEGATIVO <input style="width: 20px; height: 15px;" type="checkbox"/>	POSITIVO <input style="width: 20px; height: 15px;" type="checkbox"/> NEGATIVO <input style="width: 20px; height: 15px;" type="checkbox"/>																																																																																															
DESCRIPCION IFI	DESCRIPCION IFI	DESCRIPCION IFI	DESCRIPCION IFI	DESCRIPCION IFI																																																																																															
(*) IFI: Inmunofluorescencia Indirecta																																																																																																			

Anexo 4

FLUJOGRAMA DEL CULTIVO CELULAR DEL VIRUS ZIKA EN LA LÍNEA CELULAR BHK-21 Y

C6/36 HT



MATRIZ DE CONSISTENCIA

PROBLEMA	OBJETIVOS	HIPÓTESIS	VARIABLES	METODOLOGÍA	POBLACIÓN
¿Cuál de las dos líneas celulares C6/36 HT o BHK-21 permiten obtener infectividad del virus Zika?	<p>Objetivo General</p> <p>Evaluar la infectividad del virus Zika en las líneas celulares C6/36 HT y BHK -21</p> <p>Objetivos Específicos</p> <ul style="list-style-type: none"> -Identificar el tiempo de aparición del efecto citopático en la línea celular C6/36 HT. -Identificar el tiempo de aparición del efecto citopático en la línea celular BHK-21. -Determinar el tiempo de infectividad del virus Zika mediante IFI en la línea celular C6/36 HT. -Determinar el tiempo de infectividad del virus Zika mediante IFI en la línea celular BHK-21. -Comparar la infectividad del virus Zika en diferentes títulos en la línea celular C6/36 HT y BHK-21. 	<p>Hipótesis General</p> <p>La línea celular BHK-21 permite una mayor infectividad del virus Zika.</p>	<p>Variable independiente</p> <p>Infectividad del virus Zika en las líneas celulares C6/36HT y BHK -21.</p>	<p>Tipo de la investigación</p> <p>Es de enfoque cuantitativo y tipo descriptivo.</p> <p>Metodología</p> <p>El diseño de la investigación es no experimental, de tipo longitudinal.</p> <p>Técnica de recolección de datos</p> <p>La técnica es la observación.</p> <p>Instrumento de recolección de datos</p> <p>Se diseñó fichas en las cuales se evaluó lo siguiente:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Ficha de obtención de la cepa viral -Ficha de titulación viral -Ficha de infectividad viral 	<p>Muestra</p> <p>Cepa del virus Zika.</p> <p>Cuatro títulos:</p> <p>T 1:400 UFP/mL T 2:200 UFP/mL T 3 :120 UFP/mL T4:55 UFP/mL</p> <p>Línea celular C6/36 HT CRL 1660 ATCC</p> <p>Línea celular BHK-21 (C-13) ATCC CCL-10</p>

FIGURAS

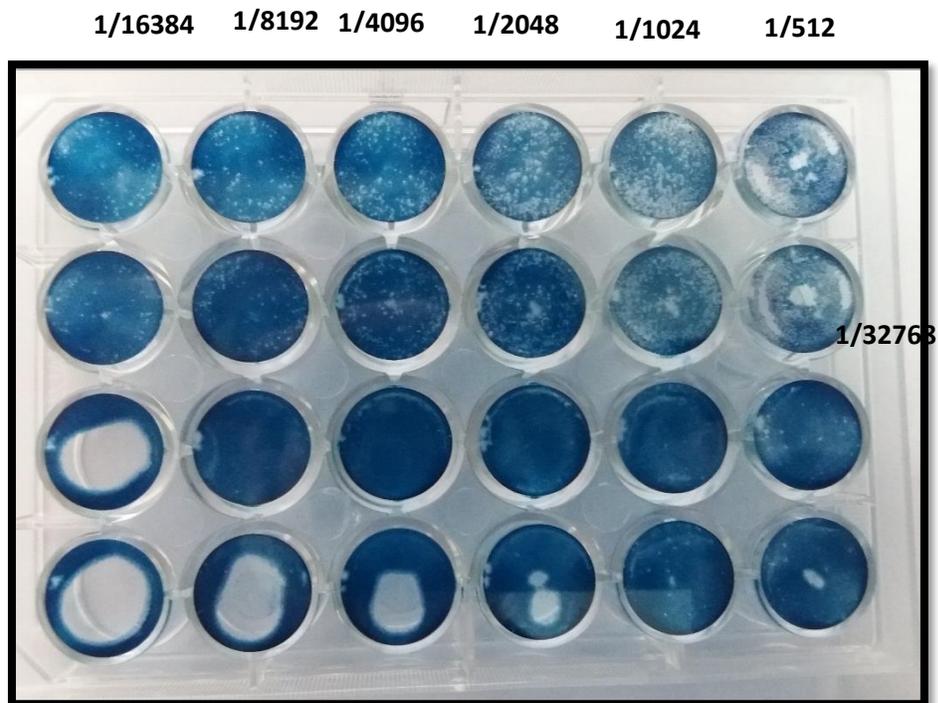


FIGURA 12. TITULACION VIRAL DE LA CEPA ZIKA EN LA LINEA CELULAR VERO, se realizó diluciones seriadas de $\frac{1}{2}$ a $\frac{1}{31072}$, se leyó las placas al tercer día, observando UFP de 97,40,24 y 11 aisladas en las diluciones 1/4096, 1/8192, 1/16384 y 1/32768 respectivamente

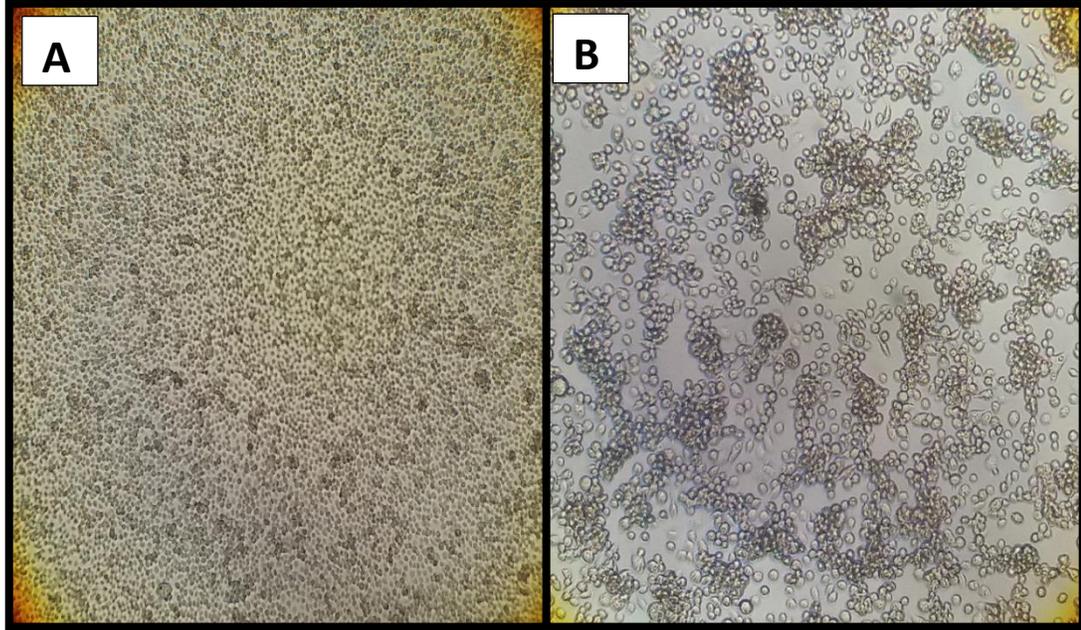


Figura 15. Efecto citopático en monocapa de células C6/36 HT inoculadas con el virus Zika - Título de 400 UFP/mL. A: No se observa ECP de la monocapa celular al tercer día de inoculación (4x).B: Se muestra un efecto citopático de 1+ del virus, con formación de sincitios. (20x)

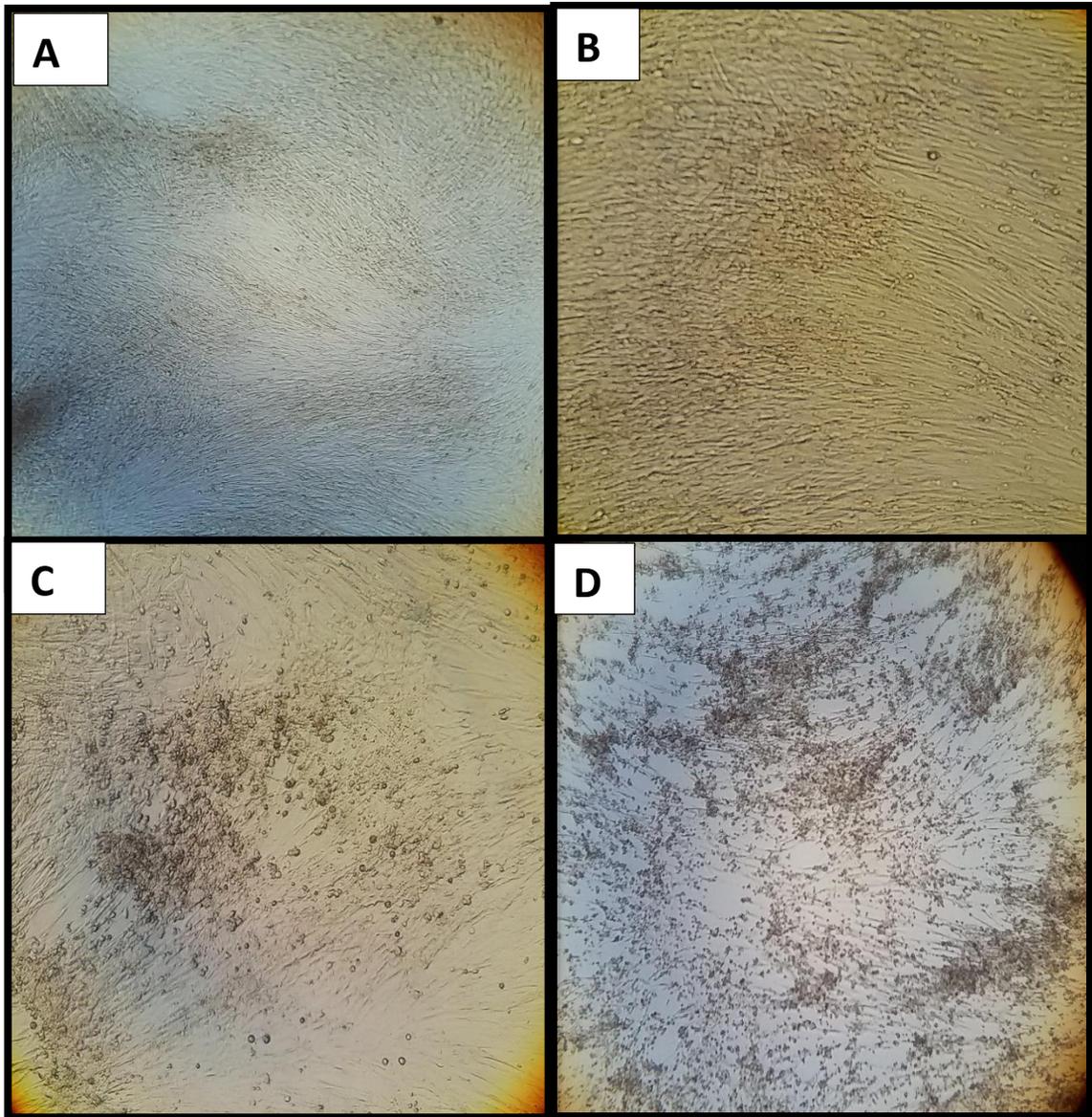


Figura 16. Efecto citopático en línea celular BHK-21 inoculadas con el virus Zika - Título de 400 UFP/ml. A: Segundo día posinoculación viral, no se observa ECP (4x). **B:** Se observa un ECP de 1+ en el tercer día, con redondamiento celular (10x). **C:** Se observa células infectadas con ECP de 3+ en el quinto día posinoculación, con presencia de sincitios, lisis celular y redondamiento celular (10x). **D:** séptimo día posinoculación, se evidencia un ECP de 4+, resaltando la lisis celular, pérdida de adherencia y redondamiento celular (10x).

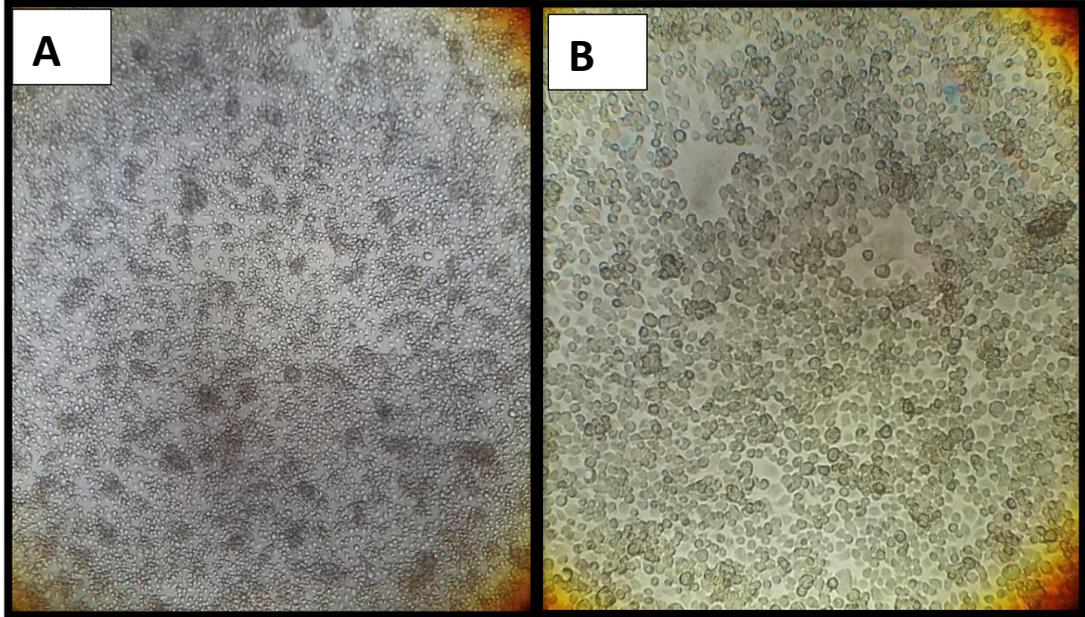


FIGURA 17. . Efecto citopático en monocapa de células C6/36HT inoculadas con el virus Zika - Título de 200 UFP/mL. A: Se observa efecto citopático de 1+ a partir quinto día con presencia de sincitios 1+. (4x).B: Formación de dos sincitios,por muerte celular (20x).

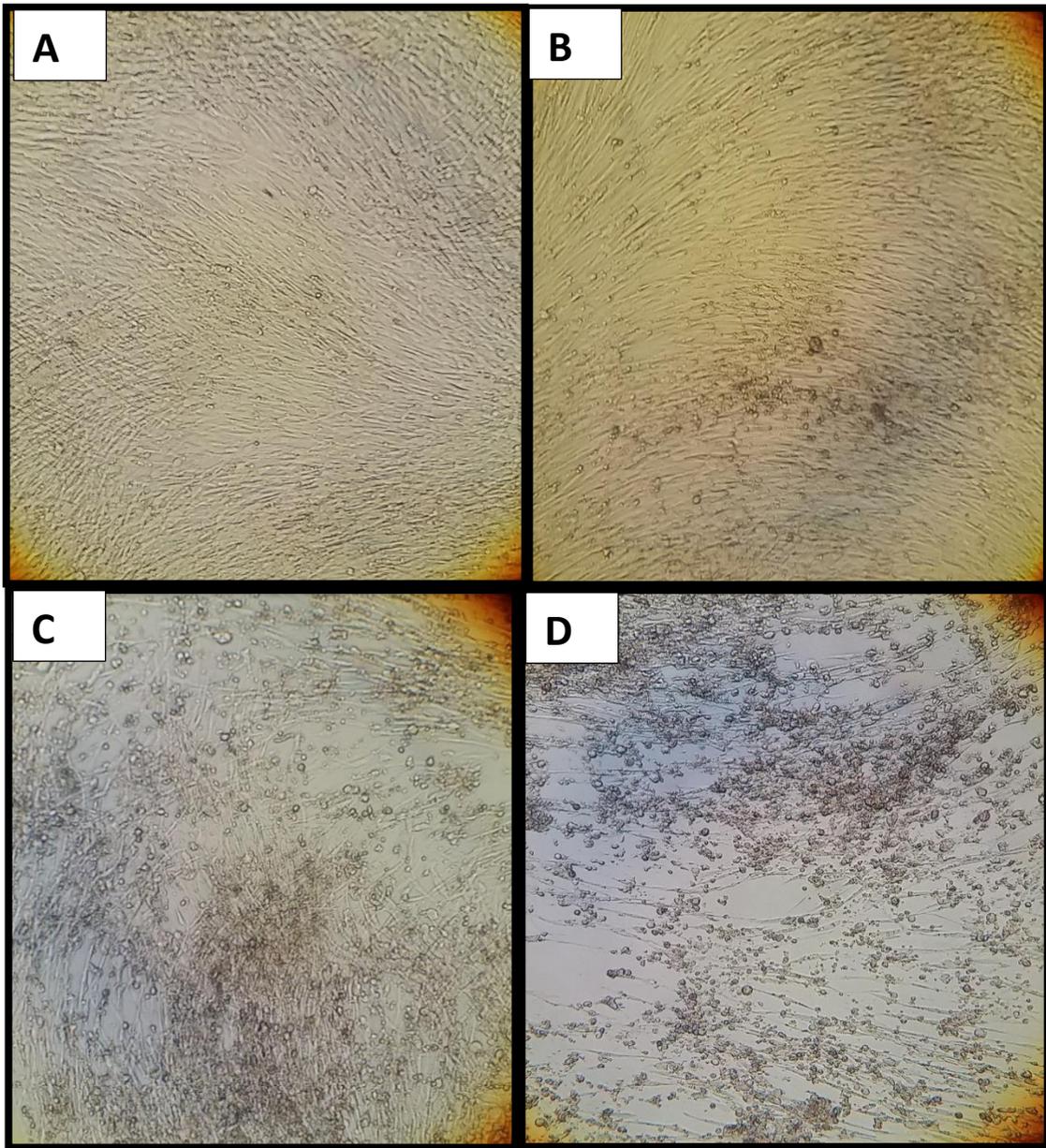


FIGURA 18. . Efecto citopático en línea BHK 21 con el título de 200 UFP/mL. A: Línea celular sin efecto citopático después del tercer día de inoculación (10X). B: Cuarto día de inoculación con un ECP de 1+, observándose lisis celular (10X). C: Sexto día de inoculación pudiéndose observar ECP de 3+ (10X).D:Octavo día de inoculación se evidencia EFC DE 4+ con mayor intensidad formación de sincitios perdida de adherencia y lisis celular (10X).

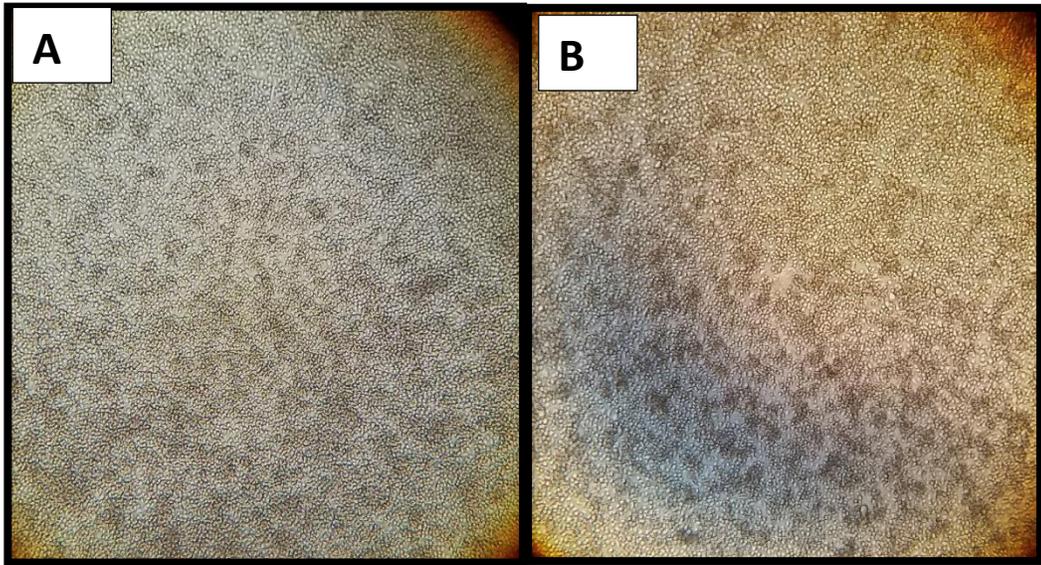


FIGURA 19. Efecto citopático en monocapa de células C6/36 inoculadas con el virus Zika - Título de 120 UFP/mL. A: Segundo día de inoculación, no se evidencia alteraciones celulares. (10X) B: Séptimo día de inoculación con ECP DE 1+, se observa la formación de un sincitio celular (10x).

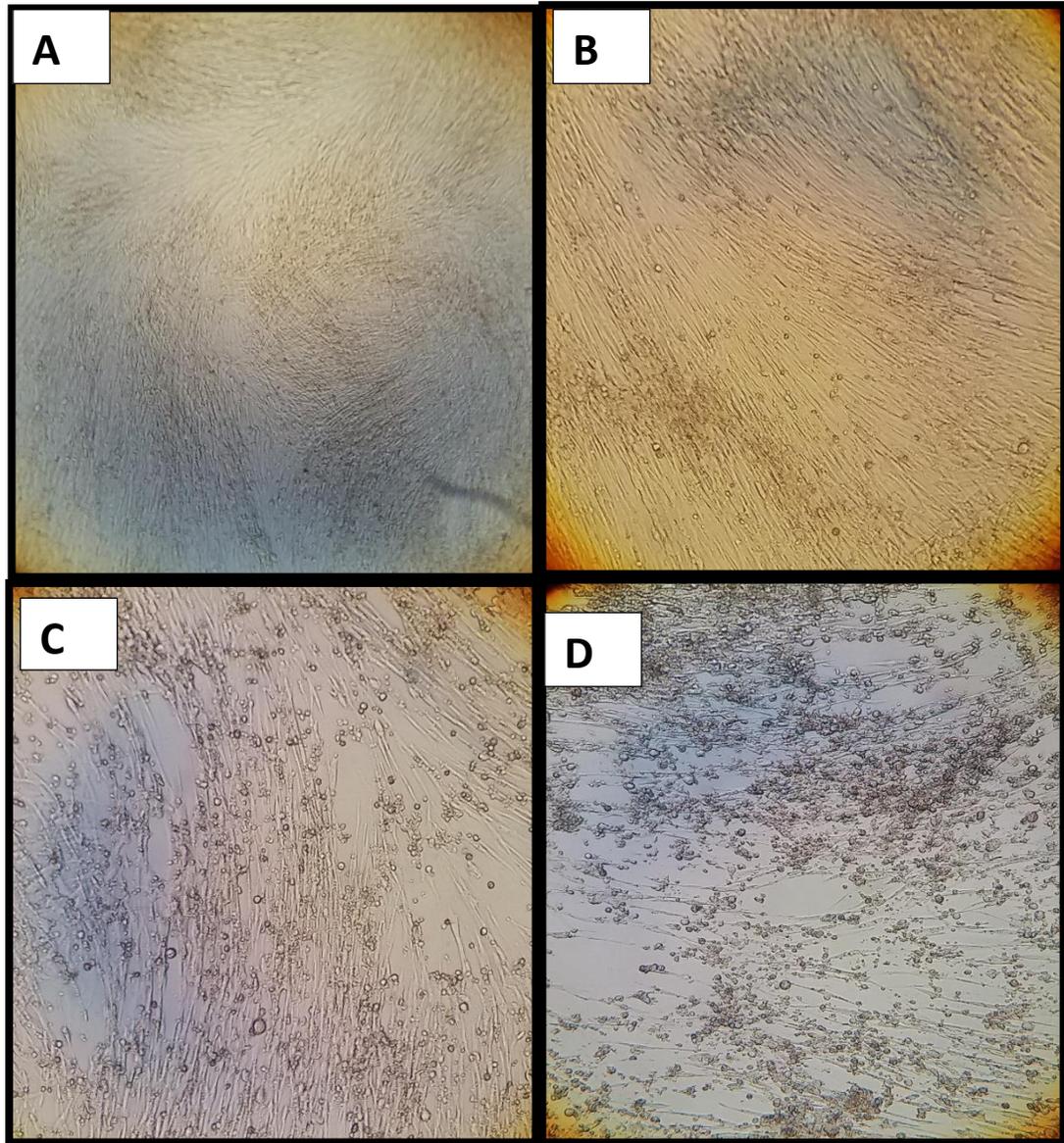


FIGURA 20. Efecto citopático en línea BHK 21 con el título de 120 UFP/mL .A: Segundo día de inoculación (4X), no se observa ECP. **B:** Tercer día de inoculación, sin presencia de ECP (10X), **C:** Séptimo día de inoculación donde se evidencia un ECP de 3+con agregación celular y redondamiento celular marcado, **D:** Octavo día de inoculación se observa ECP de 4+ con diversas alteraciones como formación de sincitios redondamiento y lisis celular (10X).

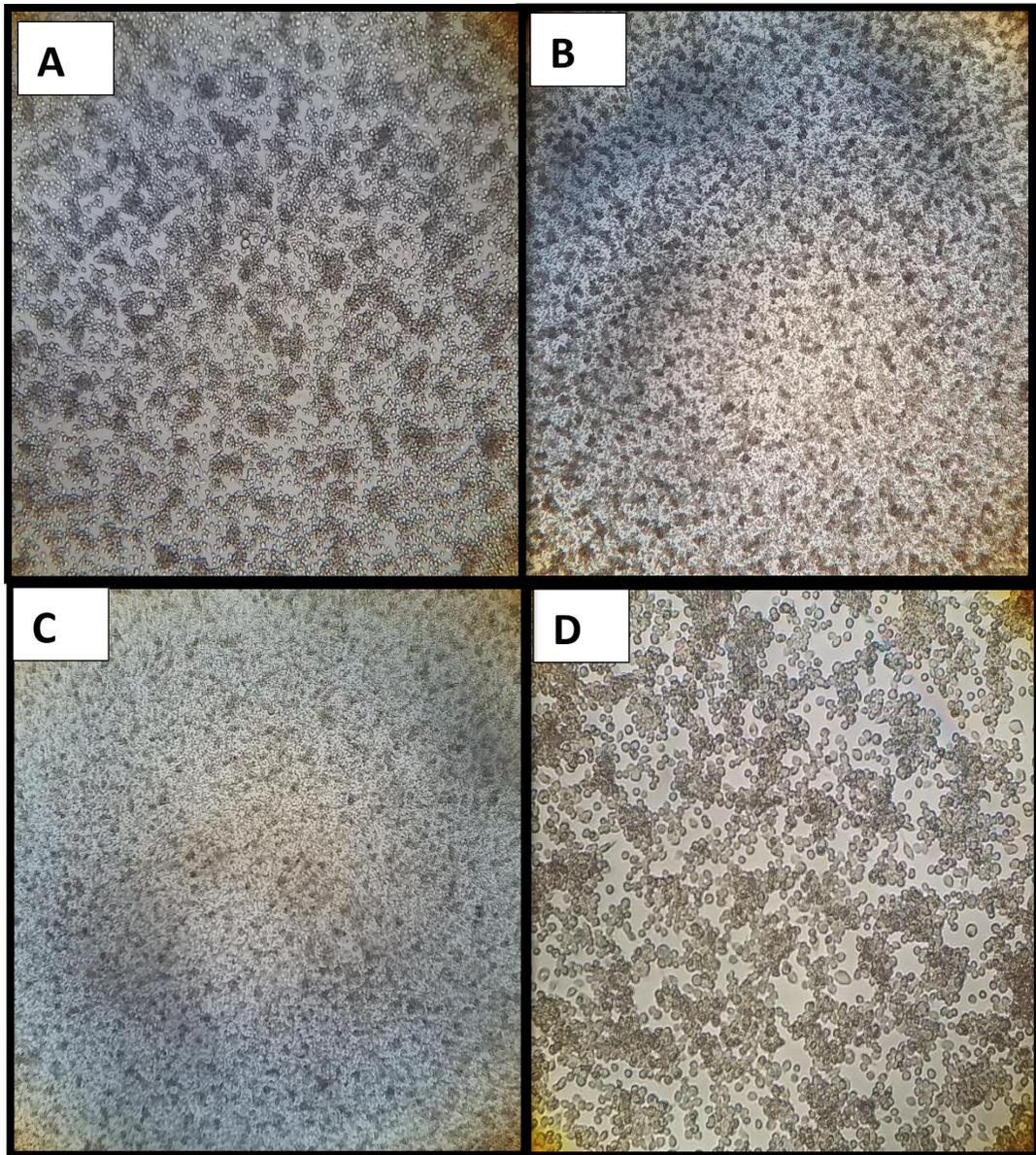


FIGURA 21. . Efecto citopático en células C6 36 inoculadas con el virus Zika - título de 55 UFP/mL. A: Monocapa de células no infectadas (10X).**B:** Cuarto día de inoculación células sin ECP (4X) **C:** Séptimo día de inoculación con ECP de 1+ (4X). **C:** Células c6 36 infectadas con formación de sincitios de 1+ en el octavo día (20X)

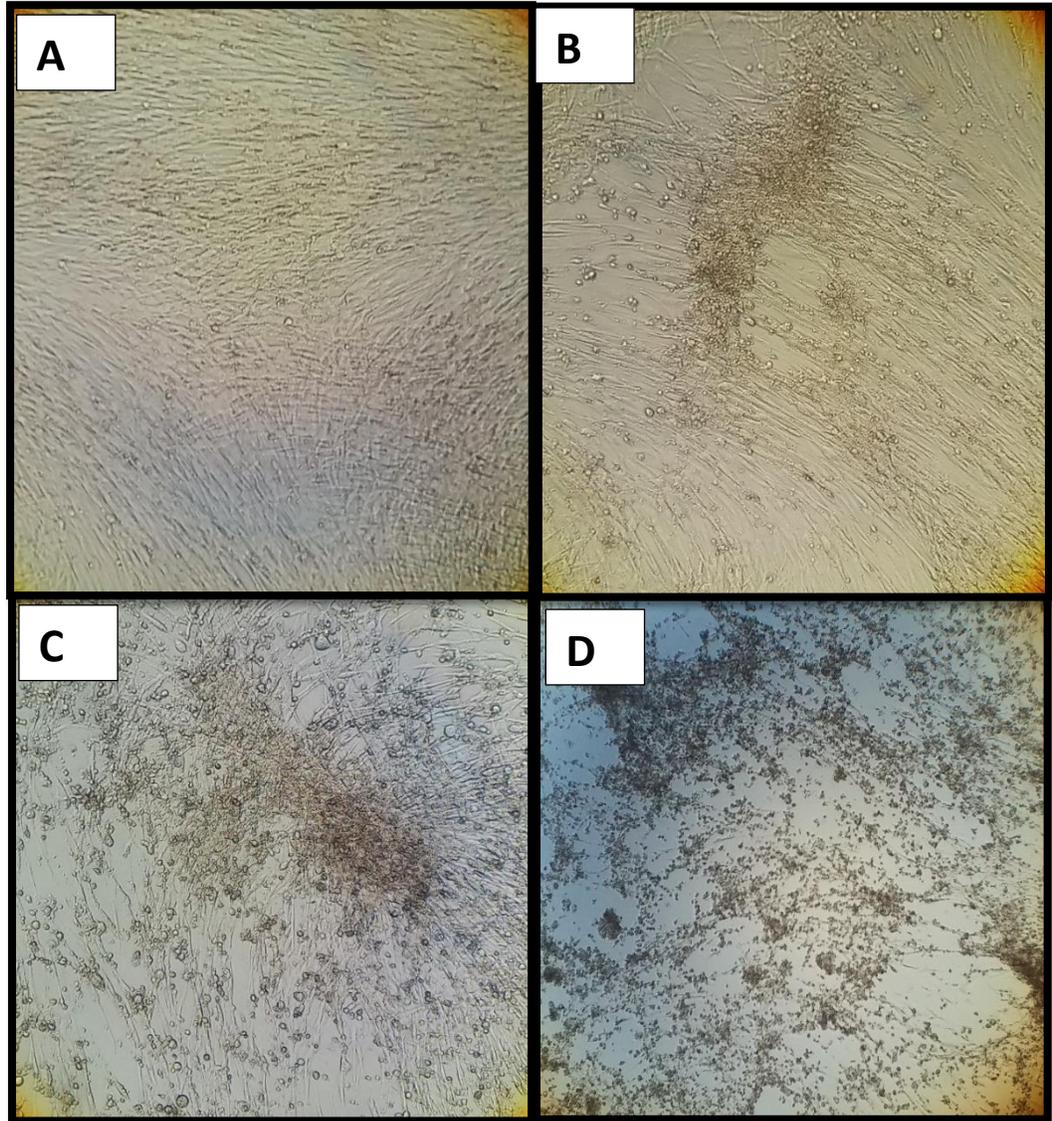


FIGURA 22. . Efecto citopático en línea BHK 21 con el título de 120 UFP/mL.A: Segundo día de inoculación (4X), no se observa ECP. B: Quinto día de inoculación, se observa la agregación celular y muerte celular ECP 1+ (10X), C: Séptimo día de inoculación donde se evidencia un ECP de 3+ con agregación celular y agregación celular marcada, D: Octavo día de inoculación se observa ECP de 4+ con diversas alteraciones como formación de sincitios, muerte y redondamiento celular (10X)

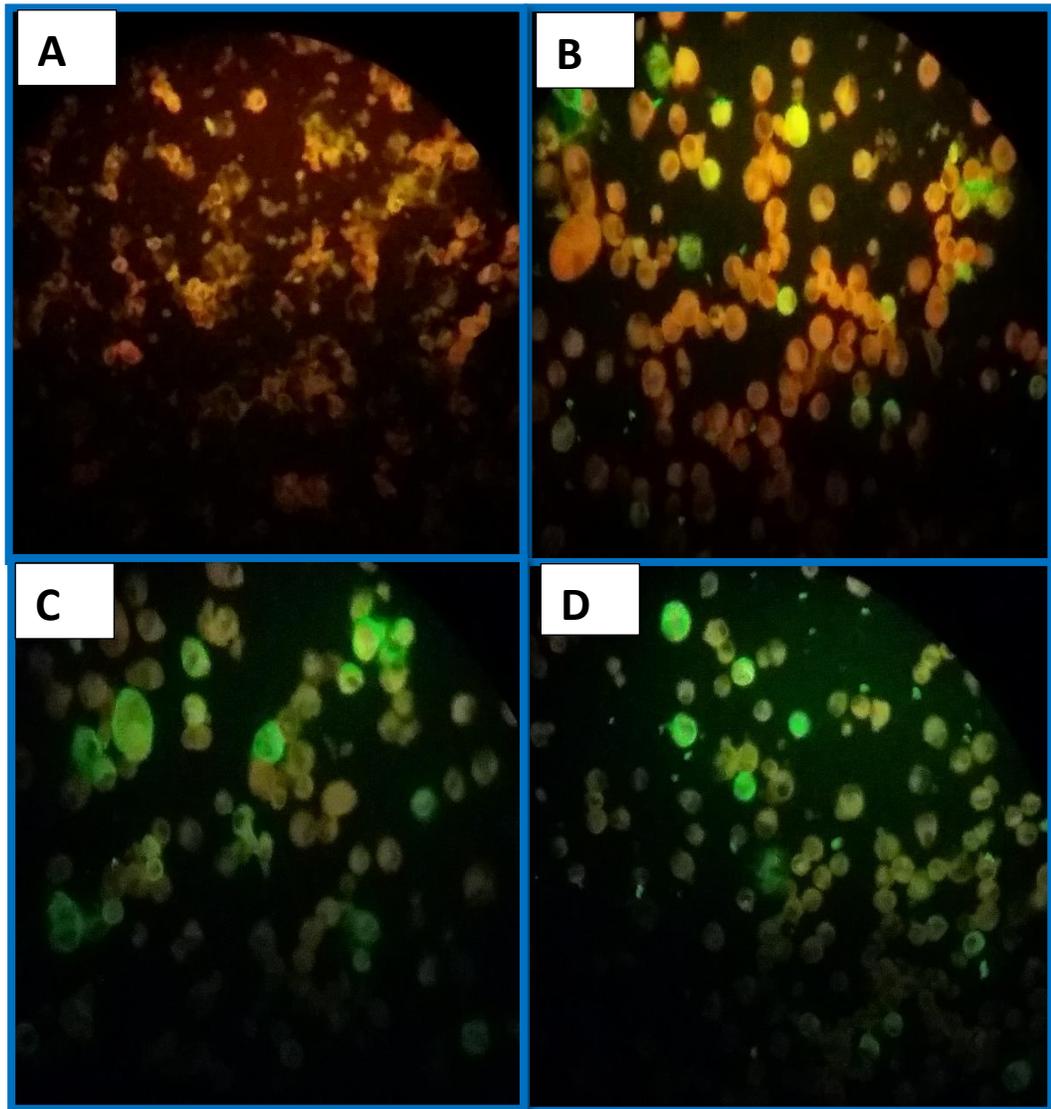


Figura 23. Inmunofluorescencia indirecta de las células BHK-21. A: Se muestra células no fluorescentes en el primer y segundo día posinoculación, se observa la ausencia de fluorescencia. B: se observa 1+ (25 %) de células infectadas en el tercer día en todos los títulos. C: Inmunofluorescencia positiva 2+ (50%) de células infectadas en el cuarto día de inoculación. D: Células infectadas con el virus a los cinco días presentándose positividad de 4+ (Mas de 75%) en todos los títulos estudiados.

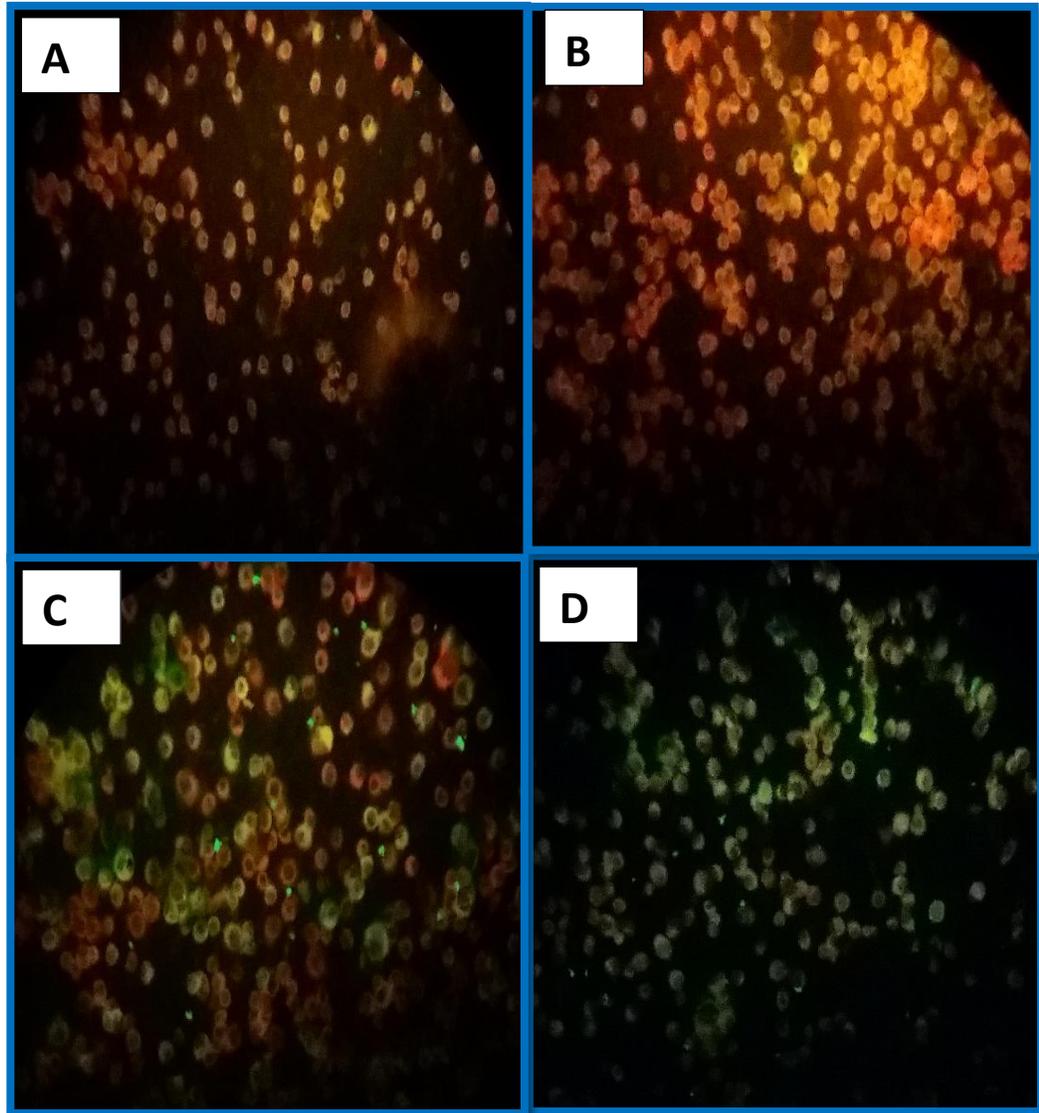


Figura 24. Inmunofluorescencia indirecta de las células C6/36HT. A: Se muestra células no fluorescentes por el virus 24 horas posinoculación en los títulos 200 UFP/mL, 120 UFP/mL y 55 UFP/mL. B: Se observa 1+ (menos del 25 %) de células infectadas a las 24 horas posinoculación, título de 400 UFP/mL. C: células fluorescentes 2+ (50%) representan células infectadas con el virus Zika en el tercer día de inoculación. D: Células infectadas con el virus a los cuatro días presentándose positividad de 3+ (75%).

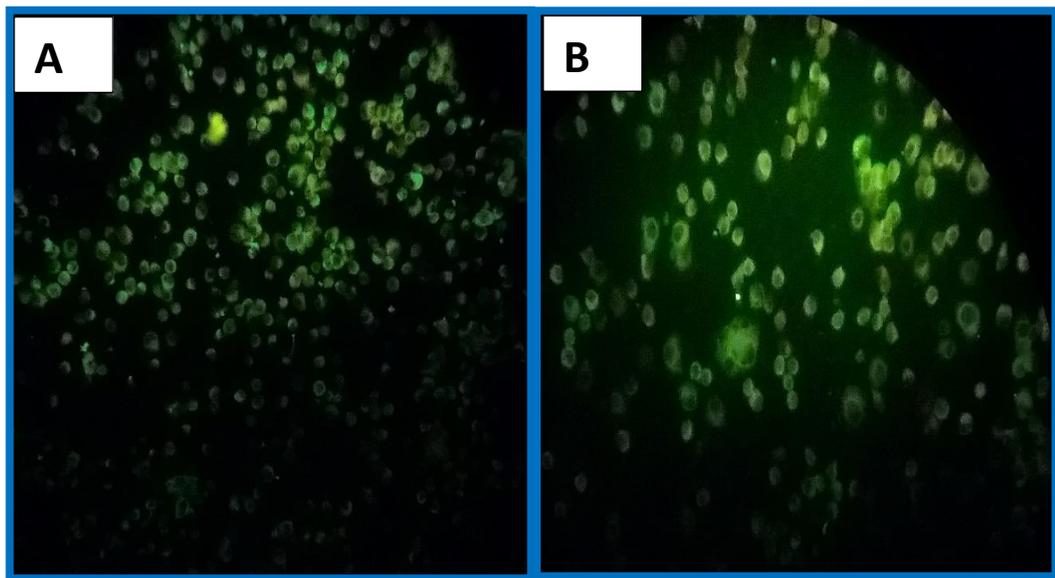


Figura 25. Inmunofluorescencia indirecta de las células C6-36. A: Se observa 100% de células infectadas al quinto día de inoculación con el virus (20x). B: células infectadas del 100% del título 55UFP/ml al sexto día (40x).