



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

1 de 2

Neiva, 04 de Febrero del 2022

Señores

CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

Ciudad

El (Los) suscrito(s):

Sara Bolivar Marín, con C.C. No. 1152470313,

José Ricardo Pucciny Cortés, con C.C. No. 1075317888,

Autor(es) de la tesis y/o trabajo de grado

Titulado: Desarrollo de un ensayo de formación de foco para identificar partículas virales infectantes de virus zika, presentado y aprobado en el año 2021 como requisito para optar al título de Médico;

Autorizo (amos) al CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN de la Universidad Surcolombiana para que, con fines académicos, muestre al país y el exterior la producción intelectual de la Universidad Surcolombiana, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo de grado en los sitios web que administra la Universidad, en bases de datos, repositorio digital, catálogos y en otros sitios web, redes y sistemas de información nacionales e internacionales “open access” y en las redes de información con las cuales tenga convenio la Institución.
- Permita la consulta, la reproducción y préstamo a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato Cd-Rom o digital desde internet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer, dentro de los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia.
- Continúo conservando los correspondientes derechos sin modificación o restricción alguna; puesto que, de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación del derecho de autor y sus conexos.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, “Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores”, los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es de responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.



CARTA DE AUTORIZACIÓN

CÓDIGO

AP-BIB-FO-06

VERSIÓN

1

VIGENCIA

2014

PÁGINA

2 de 2

EL AUTOR/ESTUDIANTE: Sara Bolivar Marin

Firma: Sara Bolivar Marin

EL AUTOR/ESTUDIANTE: José Ricardo Pucciny Cortés

Firma: [Handwritten Signature]



TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO: Desarrollo de un ensayo de formación de foco para identificar partículas virales infectantes de virus zika.

AUTOR O AUTORES:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Bolívar Marín	Sara
Pucciny Cortés	José Ricardo

DIRECTOR Y CODIRECTOR TESIS:

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Narvárez Rojas	Carlos Fernando

ASESOR (ES):

Primero y Segundo Apellido	Primero y Segundo Nombre
Cortés Guzmán	José Santiago
Castro Betancourt	Dolly

PARA OPTAR AL TÍTULO DE: Médico

FACULTAD: Salud

PROGRAMA O POSGRADO: Medicina



CIUDAD: Neiva **AÑO DE PRESENTACIÓN:** 2022 **NÚMERO DE PÁGINAS:** 66

TIPO DE ILUSTRACIONES (Marcar con una **X**):

Diagramas_X_ Fotografías_X_ Grabaciones en discos___ Ilustraciones en general___ Grabados___ Láminas___
Litografías___ Mapas___ Música impresa___ Planos___ Retratos___ Sin ilustraciones___ Tablas o Cuadros_X_

SOFTWARE requerido y/o especializado para la lectura del documento:

MATERIAL ANEXO:

PREMIO O DISTINCIÓN (*En caso de ser LAUREADAS o Meritoria*): Ninguna

PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:

Español

Inglés

- | | | |
|----|-----------------------------|---------------------|
| 1. | Virus Zika | Zika virus |
| 2. | Virus Dengue | Dengue virus |
| 3. | Ensayo de formación de foco | Focus forming assay |
| 4. | Arbovirus | Arbovirus |
| 5. | Unidad formadora de foco | Focus forming units |



RESUMEN DEL CONTENIDO: (Máximo 250 palabras)

La OMS declaró la infección por el virus del Zika (ZIKV) como una emergencia de salud pública. El ensayo de formación de foco (FFA) es un método para cuantificar partículas infecciosas usando una monocapa de células. Los anticuerpos monoclonales específicos contra la proteína no estructural (NS) -1 de ZIKV pueden usarse para identificar intracelularmente, el número absoluto de células infectadas. Nuestro objetivo era desarrollar un protocolo para la cuantificación de partículas de ZIKV por FFA. Crecimos células Vero-76 que se infectaban con ZIKV. Una vez fijadas, agregamos anticuerpos y cromógenos. Las células teñidas se contaron con un microscopio óptico invertido. Primero, determinamos el momento óptimo de infección necesario para detectar el mayor número de células infectadas. Posteriormente, probamos la confluencia de la monocapa celular en el momento de la infección. A continuación, verificamos la mejor concentración del anticuerpo primario. Finalmente, agregamos Brefeldin A después de la infección para ver el efecto de la inhibición del transporte de proteínas a través del recuento de células infectadas y la calidad de la tinción. Las células infectadas con ZIKV podrían identificarse mejor después de 24 hpi, las monocapas celulares al 70% de confluencia muestran mejores resultados. Ni el uso de una concentración de $0.5 \mu\text{g} / \text{ml}$ del anticuerpo primario, ni agregar Brefeldina A después de la infección mejoró la calidad de tinción de las células infectadas. Desarrollamos un protocolo para cuantificar partículas infecciosas de ZIKV usando células Vero- 76 para FFA. El ZIKV ahora puede estudiarse localmente utilizando modelos de cultivo celular.



ABSTRACT: (Máximo 250 palabras)

The WHO declared Zika virus (ZIKV) infection a public health emergency. The focus formation assay (FFA) is a method of quantifying infectious particles using a monolayer of cells. Specific monoclonal antibodies against the non-structural protein (NS) 1 of ZIKV can be used to identify intracellularly, the absolute number of infected cells. Our goal was to develop a protocol for the quantification of ZIKV particles by FFA. We grew Vero-76 cells that were infected with ZIKV. Once fixed, we add antibodies and chromogens. The stained cells were counted with an inverted light microscope. First, we determine the optimal time of infection necessary to detect the largest number of infected cells. Subsequently, we test the confluence of the cell monolayer at the time of infection. Next, we verify the best concentration of the primary antibody. Finally, we added Brefeldin A after infection to see the effect of inhibiting protein transport through infected cell count and quality of staining. Cells infected with ZIKV could be better identified after 24 hpi, cell monolayers at 70% confluence show better results. Neither the use of a concentration of 0.5 µg / ml of the primary antibody, nor the addition of Brefeldin A after infection improved the quality of staining of infected cells. We developed a protocol to quantify infectious ZIKV particles using Vero-76 cells for FFA. ZIKV can now be studied locally using cell culture models.

APROBACION DE LA TESIS

Nombre Presidente Jurado: Dolly Castro B.

Firma:

Nombre Jurado:

Firma:

Nombre

Jurado:

Firma:

DESARROLLO DE UN ENSAYO DE FORMACIÓN DE FOCO PARA IDENTIFICAR
PARTÍCULAS VIRALES INFECTANTES DE VIRUS ZIKA

SARA BOLIVAR MARÍN
JOSÉ RICARDO PUCCINY CORTÉS

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE SALUD
PROGRAMA DE MEDICINA
NEIVA - HUILA
2022

DESARROLLO DE UN ENSAYO DE FORMACIÓN DE FOCO PARA IDENTIFICAR
PARTICULAS VIRALES INFECTANTES DE VIRUS ZIKA

SARA BOLIVAR MARÍN
JOSÉ RICARDO PUCCINY CORTÉS

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de
Médico(a)

Asesores:

DOLLY CASTRO BETANCOURT
Enfermera, magíster en salud pública
magíster en epidemiología

JOSÉ SANTIAGO CORTÉS GUZMÁN
Médico

Director:

CARLOS FERNANDO NARVÁEZ ROJAS
Médico, magíster en microbiología con énfasis en inmunidad,
doctor en ciencias biológicas

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA
FACULTAD DE SALUD
PROGRAMA DE MEDICINA
NEIVA – HUILA
2022

Nota de Aceptación

Aceptado

A handwritten signature in black ink that reads "Polly Castro" followed by a stylized flourish consisting of several horizontal lines.

Presidente del Jurado

Jurado

Jurado

Neiva, 21 – Septiembre – 2021

DEDICATORIA

A nuestra familia y amigos por siempre prestarnos una voz de aliento; a nuestros maestros por impulsar en nosotros el amor por la investigación y a nuestra región Surcolombiana por darnos la oportunidad de formarnos como médicos.

Sara,
José Ricardo.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos F. Narváez, por impulsar en nosotros el espíritu de la investigación, el gusto por un trabajo bien realizado y los arbovirus.

A la profesora Dolly Castro, por su paciencia y corrección oportuna en la realización de este proyecto.

A nuestro tutor, José Santiago Cortés Guzmán, por su dedicación, paciencia y guía en la realización de cada paso de este proyecto.

Al semillero SFI&I, por abrir sus puertas para nosotros y hacernos crecer como personas y en el campo de la investigación.

A la Universidad Surcolombiana, por permitirnos emprender la aventura de ser médicos.

A nuestras familias y amigos, por su apoyo incondicional, porque con cada palabra y cada gesto nos impulsaban a continuar día a día en este camino.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	12
1. JUSTIFICACIÓN	14
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	15
3. ANTECEDENTES	16
4. OBJETIVOS	18
4.1 OBJETIVO GENERAL	18
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
5. MARCO TEÓRICO	19
5.1 FLAVIVIRUS:	19
5.1.1 Zika virus:	19
5.2 CÉLULAS VERO:	21
5.3 CULTIVO CELULAR	22
5.4 ENSAYO DE FORMACIÓN DE PLACAS	23
5.5 ENSAYOS DE FORMACIÓN DE FOCOS	24
6. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES	25
7. DISEÑO METODOLÓGICO	27
7.1 TIPO DE ESTUDIO	27
7.2 LUGAR	27
7.3 POBLACIÓN	27
7.4 MUESTRA	27
7.5 ESTRATEGIAS PARA EVITAR SESGOS	27
7.6 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS	28
7.6.1 Preparar equipos y reactivos (Día 0)	28
7.6.2 Descongelamiento e incubación línea celular vero 76 (Día 0)	30
7.6.3 Siembra de células vero 76 del t-75 a placa de 96 pozos (Dia 1)	30

	Pág.
7.6.4 Experimento #1: FFA comparando contraste y definición de la tinción de las células infectadas con Virus ZIKV -PR usando MAb 644 vs 130 con [MAb] de 0.5 µg/ml, 1 µg/ml y 2 µg/ml e incubación de la infección por 48h	31
7.6.5 Experimento #2: FFA. con MAb 644 en concentraciones 2,1,0.5 y 0.3 µg/ml en células Vero 76 infectadas con Virus ZIKV-PR y tiempo de incubación de la infección viral de 48h	33
7.6.6 Experimento #3: FFA con MAb 644 en concentración 0.5µg/ml infectadas con Virus ZIKV -PR con tiempo de incubación de la infección viral 6, 12 y 24 h	36
7.6.7 Experimento #4: Respuesta al inhibidor de la secreción celular Brefeldin A; 48, 24, 12 y 6h de incubación de infección viral con Virus ZIKV -PR con MAb644 a 0.5µg/ml	38
7.7. INSTRUMENTO PARA RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN:	41
7.8. PRUEBA PILOTO	41
7.9. CODIFICACIÓN Y TABULACIÓN:	43
7.10. FUENTES DE INFORMACIÓN	43
7.11. PLAN DE ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS	43
7.12 CONSIDERACIONES ÉTICAS	43
8. RESULTADOS	44
9. DISCUSIÓN	50
10. CONCLUSIÓN	52
11. RECOMENDACIONES	53
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
ANEXOS	59

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Confluencia de la monocapa con células Vero-76 previa a infección viral con ZIKA-PR.	44
Figura 2. Comparación de contraste y definición de la tinción de las células infectadas usando MAb 644 vs 130 [MAb] 1 µg/ml.	45
Figura 3. Mediana de FFU detectadas con MAb en concentraciones 2, 1, 0.5 y 0.3 µg/ml en células Vero 76 infectadas con Virus ZIKV -pR en dilución 10-6.	46
Figura 4. Comparación de diferentes tiempos de incubación viral (6, 12 y 24 h p.i.) con MAb 644 a 0.5µg/ml.	47
Figura 5. Respuesta al inhibidor de la secreción celular Brefeldin A 24 y 48 h p.i.	48
Figura 6. Respuesta al inhibidor de la secreción celular Brefeldin A 24h p.i. en dilución 10-2 ,10-3 y 10-4 de ZIKA-PR	48

LISTA DE ANEXOS

	Pág.
Anexo A: Mapa del experimento #1: FFA comparando contraste y definición de la tinción de las células infectadas con Virus ZIKV -PR usando MAb 644 vs 130 con [MAb] de 0.5 µg/ml, 1 µg/ml y 2 µg/ml e incubación de la infección por 48h	60
Anexo B: Mapa experimento #2: FFA. con MAb 644 en concentraciones 2,1,0.5 y 0.3 µg/ml en células Vero 76 infectadas con Virus ZIKV-PR y tiempo de incubación de la infección viral de 48h	60
Anexo C: Mapa experimento #3: FFA con MAb 644 en concentración 0.5µg/ml infectadas con Virus ZIKV -PR con tiempo de incubación de la infección viral 6, 12 y 24 h	61
Anexo D: Mapa experimento #4: Respuesta al inhibidor de la secreción celular brefeldin A; 48, 24, 12 y 6h de incubación de infección viral con Virus ZIKV -PR con MAb644 a 0.5µg/ml	61
Anexo E: Instrumento	62
Anexo F: Modelo administrativo	63

RESUMEN

Introducción: El virus del Zika (ZIKV) codifica una única proteína que posteriormente se procesa en tres proteínas estructurales y siete proteínas no estructurales, de las últimas la NS1 es la proteína que más se secreta al espacio vascular y sirve como marcador de infección viral. Luego de los brotes de 2013 y 2015 el ZIKV por su relación con microcefalia, síndrome de Guillain-Barré (SGB) y mielitis aguda es declarado por la OMS como una emergencia de salud pública. Por esto, aumentaron el número de investigaciones y se vio la necesidad de conocer el número de partículas infectantes de los stocks usados en diversos experimentos, para lo cual se utilizan diversas técnicas de laboratorio, en nuestro caso se va a utilizar el ensayo de formación de foco, método que utiliza una monocapa de células que posterior a la infección viral se fijan y marcan con anticuerpos específicos contra las proteínas virales, para luego ser teñidos y contados.

Objetivo: Desarrollar un ensayo de formación de foco para identificar partículas virales infectantes de Zika

Materiales y métodos: Se cultivaron células vero-76 en placa de 96 pozos con medio completo, las células fueron infectadas con ZIKV-PR y/o U, fijadas y permeabilizadas con metanol absoluto a -70°C , se agregó el anticuerpo primario, posteriormente el anticuerpo secundario acoplado a biotina, la estreptavidina- peroxidasa y el cromógeno 3-amino-9-etilcarbazol, para posteriormente detener la reacción con agua destilada y contar en microscopio de luz invertido. Se evaluó la confluencia de la monocapa y el tiempo de incubación de infección del virus, probándose de 6, 12, 24 y 48 horas, el anticuerpo monoclonal primario se probó el MAb 644 y 130 a diferentes concentraciones ($0.3\ \mu\text{g/mL}$, $0.5\ \mu\text{g/mL}$, $1\ \mu\text{g/mL}$ y $2\ \mu\text{g/mL}$) y por último la respuesta al inhibidor de la secreción celular brefeldin A.

Resultados: Las células infectadas por ZIKV se lograron identificar en monocapa de células Vero 76 cultivadas en placa de 96 pozos hasta confluencia del 70%, al momento de la infección con el virus, para lograr confluencia del 100% a las 24h de incubación viral, tiempo propicio para contar los focos de células e impedir la formación de cúmulos de células infectadas. El anticuerpo monoclonal primario más apropiado para el ensayo es MAb 644 a $0.5\ \mu\text{g/mL}$. Ni el uso de concentraciones $\geq 0.5\ \mu\text{g/mL}$ de anticuerpo primario, ni de Brefeldin A mejoró el conteo de las células infectadas. El número de focos contados por ml en nuestro Stock es a dilución de 10^{-3} $5,08\ \log 10$

Conclusiones: Desarrollamos un protocolo para cuantificar partículas infectantes de ZIKV usando células Vero-76. El ZIKV ahora puede estudiarse en nuestra región utilizando modelos de cultivo celular.

PALABRAS CLAVE: Arbovirus, virus Dengue, virus Zika, Ensayo de formación de foco, unidad formadora de foco

ABSTRACT

Introduction: Zika virus (ZIKV) RNA viral genome encodes three structural proteins and Seven Non-Structures Proteins (NS). NS1 is the protein that is most secreted into the vascular space and serves as a marker of viral infection. WHO declares it as a public health emergency because it was related with Microcephaly, Guillain-Barré syndrome (GBS). The number of investigations about ZIKV increases; various assays and laboratory techniques are used. In our case, the focus forming assay will be used.

Objective of the study: The aim is to develop a protocol for the quantification of Zika viral titers through focus forming essay.

Brief materials and methods: The focus forming assay is performed in Vero 76 cell monolayer at a 70% confluence in 96-well plate were inoculated in 10-fold serial dilutions with 2% FBS medium at a final volume 0.1ml. Viral absorption time was 6, 12, 24 and 48 hours at 37 ° C according to experiment. The medium is removed. It is incubated with BFA at 0.1 µg/mL for 12 or 6h according to the experiment. The cells were fixed for 30 minutes at room temperature with ice-cold absolute methanol. ZIKV foci were labeled with Mab 130 or 644 and a secondary antibody Anti-Mouse IgG made in goat conjugated to biotin. Foci were stained using streptavidin peroxidase and AEC. They were counted on inverted optical microscope.

Results: In this work, Mab 644 obtained better contrast and definition in light microscopy. Said antibody was tested at different concentrations obtaining the following medians: 11, 12, 5 and 5 FFU at 0.3, 0.5, 1 and 2 µg/mL respectively. Consequently, with Mab 644 at 0.5 µg/mL with different viral absorption times, obtaining that: 6 and 12h undetectable focus, 24h: detectable focus. Then carried out using the brefeldin A (BFA) with the following results at 10⁻³, BFA-free: 5,08 log 10, 10⁻⁴: 5,54 log and with BFA 4,9 log 10.

Conclusion: We concluded that the most adequate are cellular confluence at 70%, time for viral absorption is 24 hours. Mab 644 at 0.5 µg/ml is the antibody that better contrast and definition by optical microscopy offered. The BFA modifies the background noise facilitating the identification of the foci.

KEY WORDS: Arbovirus, Dengue virus, Zika virus, Focus forming assay, Focus forming Unit.

INTRODUCCIÓN

Flavivirus es un género de virus que pertenece a la familia flaviviridae, los cuales poseen una envoltura, una nucleocápside icosaédrica y cuyo material genético se compone de una única cadena de ácido ribonucleico (ARN) de polaridad positiva(1,2). Pertenecen a este género virus como el de la fiebre amarilla (YFV), el virus del dengue (DENV) y el virus del zika (ZIKV)(3).

El ZIKV fue descubierto en el bosque Zika en Uganda, después de identificar el desarrollo de fiebre sobre ejemplares de macacos Rhesus(4). En 2013, ZIKV generó un nuevo gran brote de 28,000 casos en la Polinesia Francesa, en donde se comenzaron a ver asociaciones post-infección como síndrome de Guillain-Barre y parálisis (5). En 2014, ZIKV se propagó a Brasil y otros países suramericanos como Paraguay, Venezuela y Colombia, donde creó una emergencia por su muy rápida diseminación en el continente (~1 año), el reporte de muertes a causa de este virus, múltiples nuevas formas de transmisión, y transmisión congénita del virus, la cual dio lugar a recién nacidos que presentaban artrogriposis, microcefalia, ceguera, sordera y otras malformaciones del sistema nervioso central y óseo, generando resultados fatales en muchos casos, incluidos el aborto y la muerte fetal, o la supervivencia con un alto grado de deficiencia cognitiva y física(6).

El genoma del ZIKV codifica para una única proteína que posteriormente se procesa en tres proteínas estructurales que son la cápside (C); la membrana precursora (prM); la proteína de la envoltura (E); y siete proteínas no estructurales (NS): NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5. La NS1 es muy similar a la de otros flavivirus (2), también, se le ha implicado en la evasión inmune y en la respuesta de anticuerpos protectores, además de ser el principal marcador antigénico de la infección viral y se ha sugerido como un biomarcador para la detección temprana de la infección viral(2,7).

Las células vero son una línea de células epiteliales aisladas del riñón de un mono verde africano, y son de gran importancia, ya que tienen un rango de usos bastante grande, en especial para estudios de virus ya que poseen una delección genética a los genes productores de interferones tipo I que son clave en la respuesta antiviral(8,9).

El ZIKV puede ser estudiado a través de diversas técnicas y ensayos, en este proyecto se utilizó el FFA (sigla del inglés focus forming assay: “Ensayo de formación de foco”), útil para medir partículas infectantes de números virus; el cual a partir de una monocapa de células y posterior a la infección y absorción viral, se marcan las proteínas virales con anticuerpos primarios y secundarios que posteriormente son teñidos mediante técnicas inmunocromatográficas o inmunofluorescencia para su conteo (10). Dicho ensayo nos permite la identificación de las partículas infectantes

de Zika que hay en el stock almacenado en el laboratorio de infección e Inmunidad (I&I). En la literatura hay pocos protocolos acerca de este tipo de ensayo, que entre sus ventajas se encuentra su menor tiempo para desarrollarlo. También es importante conocer la cantidad de virus para la realización de múltiples estudios (10).

Se diseñó un protocolo de FFA a partir de modificaciones en las variables confluencia celular, clon de anticuerpo primario y su concentración, y tiempo de incubación del virus hasta encontrar los valores óptimos para el correcto desarrollo del ensayo.

1. JUSTIFICACIÓN

El primero de febrero del 2016 la OMS declaró la epidemia de ZIKV en las américas como una emergencia pública de interés internacional(19). En nuestro país, con la epidemia se registraron aproximadamente 105,000 casos entre agosto del 2015 y noviembre del 2016, de los cuales 20,000 eran mujeres en embarazo, población de muy alto riesgo por el aumento en el riesgo de desarrollo de microcefalia y otras malformaciones del sistema nervioso central(20), pero este riesgo sigue latente, debido a que somos una población endémica con 109 casos reportados hasta semana epidemiológica 16 de 2020 según el INS(21).

Por tal motivo se han desarrollado múltiples formas de estudiar dicho virus, abordando entre ellas la cuantificación de las partículas virales; actualmente la mayoría de los protocolos que se han publicado para dicho fin son por medio de PFA(13,16), que es un ensayo mucho más costoso y su tiempo de realización es mayor al de su homólogo el FFA(11). El FFA se encuentra en la metodología de diversos artículos, donde sirve para la cuantificación del inóculo utilizado en la infección de tejidos tanto humanos como no humano e incluso algunos animales vivos (14,22,23), sin embargo, detalles precisos de su protocolos de realización no son dados.

En la literatura hay pocos artículos que describen el protocolo del FFA de ZIKV (11,14,24), ninguno de investigadores colombianos. Esto conlleva a una menor comprensión de este virus en cuanto a fisiopatología, mecanismos de virulencia y afección poblacional.

Por este motivo, es importante el poder desarrollar un protocolo para la realización de experimentos en los que se necesita tener el inóculo viral debidamente medido mejorando así el estudio del virus, además el desarrollo de un sistema de cultivo de células infecciosas de ZIKV reproducible y efectivo es crítico para estudiar los mecanismos moleculares de la replicación de ZIKV, y es el primer paso para lograr el desarrollo de medicamentos y vacunas efectivos.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En los años 2015 – 2016 se presentó una epidemia por ZIKV en Colombia que implicó un aumento de prevalencia de Síndrome de Guillain-Barre, parálisis, recién nacidos que presentaban artrogriposis, microcefalia, ceguera, sordera y otras malformaciones del sistema nervioso central y óseas, generando aborto y muerte fetal, o la supervivencia pero con un alto grado de deficiencia cognitiva y física (6), lo que generó una preocupación entre la comunidad científica de querer entender con mayor profundidad su fisiopatología, mecanismos de virulencia y afección poblacional (17).

Para el estudio del ZIKV actualmente existen muchos métodos como el ensayo de ELISA (acrónimo del inglés Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay: 'ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas'), PFA, métodos biomoleculares de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y uno usado en menor proporción que es el FFA. Este último consiste en un ensayo de cuantificación viral donde se requiere una única capa de células cultivadas, estas, se permeabilizan e incuban con un anticuerpo contra alguna proteína viral. Un segundo anticuerpo (que reconoce el primero) es añadido, para que genere señales en forma de cambio de coloración.. Las células luego son observadas en el microscopio para contarlas (10,18).

Una característica del FFA, es que tiene la capacidad de ponerse a prueba con virus infectantes por su propiedad de poder medir la capacidad replicativa del virus (por lo que puede dar un dato cuantificable sobre la replicación viral) el PFA que solo evalúa la capacidad del virus, de poder generar daño y muerte celular. Además el FFA tiene una duración de realización menor y es útil para cuantificar virus que no forman placas. (11,18)

El estudio será realizado en el laboratorio de investigación en infección e inmunidad (SFI&I) de la Facultad de Salud de la Universidad Surcolombiana de Neiva y busca solucionar la falta de protocolos descritos en la literatura sobre el ensayo de formación de focos para el ZIKV, ya que esto disminuye la posibilidad de investigar con mayor profundidad dicho virus, que ha sido denominado por la OMS como un problema en salud pública y permitirá entender con mayor profundidad su fisiopatología, mecanismos de virulencia y afección poblacional. Esto nos lleva a preguntarnos ¿Cuál es la mejor forma de desarrollar un ensayo de formación de foco para identificar partículas virales infectantes del Virus Zika en el laboratorio de infección e inmunidad de la Universidad Surcolombiana?

3. ANTECEDENTES

En 2006, Payne et al (11) desarrollaron un ensayo de inmunofluorescencia indirecta para la cuantificación de flavivirus como alternativa al ensayo de formación de placa estándar. El ensayo se realizó con WNV, el virus de la encefalitis de San Luis (SLEV) y DENV de los serotipos 1-4 en células vero. Los títulos virales se calcularon como unidades de foco fluorescentes por ml. Concluyeron que el tiempo óptimo para realizar el ensayo de formación de foco por fluorescencia en células Vero fue de 24 h para WNV y de 48 h para SLEV y los cuatro serotipos DENV. Esto mostró una diferencia importante en el tiempo requerido para completar un ensayo estándar de placa con células Vero, que para estos virus varía entre 3 días, para el WNV, y 11 días, para el DENV-1. Por lo tanto, el ensayo de formación de foco para cuantificación de virus es útil para los virus cuyas placas se desarrollan lentamente. El FFA para flavivirus fue validado por su exactitud, precisión, especificidad y robustez.

En 2016, un estudio realizado en Los Ángeles (EE. UU.) por Contreras et al (12), se presentó un protocolo que describe un sistema de cultivo ZIKV in vitro basado en células de mamíferos para la producción viral y el análisis del crecimiento. Se presentan detalles sobre la formación de placas por el ZIKV en una monocapa celular con una confluencia al 80% y el PFA (sigla del inglés plaque forming assay: “ensayo de formación de placa”) para medir el título viral, mostrando que el efecto citopático (CPE) sobre las células es cercano del 30% al tercer día, y se puede dividir la densidad dividir en 1:4 permitiendo al cultivo continuar durante 4-5 días adicionales, Permitiendo así final del séptimo día, se puede observar un CPE completo. Adicionalmente las células se pretrataron con varias citocinas durante 12 horas y luego se infectaron con el virus Zika. El interferón tipo I, IFN- α , exhibió una fuerte actividad antiviral contra el virus del Zika a dosis de 10 unidades internacionales (UI), 100 UI y 1,000 UI. IFN- β demostró un potente efecto inhibitor también. El tipo II IFN- γ también demostró actividad viral anti-Zika. Las citocinas TNF- α , IL-1 e IL-6 no inhibieron el ZIKV a las concentraciones de fármaco indicadas. Mostrando el potencial que tiene para beneficiar enormemente a la comunidad de investigación estos hallazgos con el fin de poder dilucidar más los mecanismos de la patogénesis viral y la evolución de la virulencia viral.

En 2017, Coelho et al (13) presentan métodos estándar para la propagación, titulación y purificación del ZIKV. Lograron purificar una alta cantidad de virus cultivado en tres líneas celulares: C6/36, Vero y A549, medida por PFA. En este caso, el alto rendimiento del virus purificado se obtuvo por purificación a través de un gradiente discontinuo de sacarosa, obteniendo el mayor rendimiento de la progenie infecciosa ZIKV-AFR y ZIKV-BR a los 7 días posteriores a la infección en células C6 / 36 (7×10^7 y 2×10^8 PFU / ml, respectivamente).

En 2017, Hirsc et al (14) realizaron una investigación en Macacos Rhesus adultos con ZIKV, en donde utilizaron el FFA con diluciones seriadas del virus en células Vero, se dejó adsorber por 1 hora y se superpuso con carboximetilcelulosa al 0.5%, para 30 horas después fijar con paraformaldehído. Todo esto con el fin de cuantificar la cantidad de virus a infectar que fue aplicado de manera subcutánea a dichos primates, en donde se realizaron luego de varios días de infección múltiples estudios para determinar viremia, cuadro clínico, anticuerpos neutralizantes y persistencia del virus en diversos tejidos después de la muerte de dichos animales.

En 2018, Nikolay et al (15) desarrollaron un protocolo para la propagación de cepas brasileñas de ZIKV en células Vero y células de riñón de hámster bebé (BHK) estas últimas tanto adherentes como en suspensión; en donde se cuantificó por PFA la cantidad de virus producido y se confirmó con reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa (RTq PCR) la cantidad de virus intra y extracelular. A pesar de que se vio buen rendimiento en las células adherentes, las células BHK-21 que fueron tomadas por suspensión no fueron tan efectivas como las adherentes con títulos bajos de solo 9×10^3 PFU/ mL a las 80h post-infección, esto se postula como uno de los primeros pasos para la creación de una vacuna viva atenuada de dicho microorganismo.

En 2018, Himmelsbach et al (16) infectaron varias líneas celulares humanas y no humanas con una cantidad definida de la cepa de ZIKV de la Polinesia. Las células se analizaron 48 h después de la infección para determinar la cantidad de genomas virales intracelulares y extracelulares y partículas virales infecciosas mediante reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real (qPCR) y PFA. Todas las líneas celulares investigadas, excepto las células de Ovario de hámster chino (CHO), hicieron factible la infección, la replicación y la liberación de ZIKV. Una de las líneas celulares más eficiente para dicho propósito es la línea de las células Vero, tomadas en este estudio como punto de comparación para las demás. Allí concluyen que las líneas celulares investigadas (A549, CHO, COS7, HepG2/C3A, Huh7.5, HaCaT, N29.1, SH-SY5Y, Vero y células 293T) son útiles y sirven como una caja de herramientas para la investigación de ZIKV.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un ensayo de formación de foco para identificar partículas virales infectantes de Zika en el laboratorio de investigación en infección e inmunidad de la Facultad de Salud de la Universidad Surcolombiana de Neiva.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar las condiciones óptimas de confluencia celular, clon de anticuerpo primario y su concentración y tiempo de incubación del virus para realizar el FFA.

Determinar el título de las 3 siembras de virus Zika cepa Puerto Rico almacenado en el laboratorio de infección e inmunidad de la Facultad de Salud de la Universidad Surcolombiana de Neiva.

5. MARCO TEÓRICO

5.1 FLAVIVIRUS:

Los flavivirus son un género de virus de la familia flaviviridae, los cuales tienen en su estructura una envoltura, una nucleocápside icosaédrica, y material genético compuesto de una única cadena de ARN de polaridad positiva.(1,2)

Dentro de este género encontramos virus como la YFV, EJV, WNV, ZIKV y DENV, estos dos últimos de alta importancia para nosotros, ya que somos endémicos y epidémicos en ellos.(21,25)

El virus del Dengue (DENV) es un virus RNA, que cuenta con 4 serotipos los cuales son genéticamente similares y comparten aproximadamente el 65% de sus genomas. (Aunque hay un informe de 2013 de que se ha encontrado un quinto serotipo)(26).

5.1.1 Zika virus:El ZIKV es un arbovirus, es decir se transmite por medio de la picadura de mosquitos del género Aedes; hasta la fecha, el RNA viral (RNAv) de ZIKV ha sido aislado de siete especies diferentes de Aedes(27). A diferencia de muchos flavivirus, el ZIKV puede transmitirse de humano a humano a través de muchas rutas, incluido el contacto sexual, la transfusión de sangre y verticalmente de la madre al feto, de hecho, el ARNv de Zika persiste en el semen por más tiempo que en la sangre, la saliva o la orina (28).

ZIKV se aisló por primera vez en 1947 y fue reportado en 1952 por Dick et al ; fue aislado de manera incidental mientras se estudiaban las dinámicas de transmisión zoonótica de YFV en un área de bosque llamada Zika, en Entebbe, (Uganda), los monos Rhesus fueron alojados en jaulas en plataformas de madera a lo largo de una milla del bosque Zika, cuando uno de estos monos desarrolló fiebre, se extrajo sangre del animal y se inoculó a ratones y otro mono, evidenciando infección solo en ratones inoculados de manera intracraneal, más no hubo infección en aquellos inoculados intraperitonealmente Se realizaron pruebas de neutralización para determinar si este virus era YFV, que resultaron negativas, por lo cual a este nuevo agente se denominó virus Zika por el lugar donde se descubrió.(29)

La primera evidencia de enfermedad por ZIKV en humanos ocurrió en Nigeria en 1954. Tres personas que visitaron una clínica informaron fiebre, dolor en las articulaciones y dolor de cabeza. Se aisló el virus de un paciente y se encontró un aumento en los títulos de anticuerpos específicos de ZIKV en los otros dos pacientes. Más tarde, un voluntario humano se infectó experimentalmente con el virus aislado en Nigeria y desarrolló fiebre leve, dolor de cabeza y malestar antes de recuperarse por completo al día 7 después de la infección. Durante los siguientes años, los investigadores en África y Asia continuaron buscando evidencia de enfermedad

humana debida a ZIKV(5,30). Anticuerpos específicos contra ZIKV fueron encontrados desde 1953 en una variedad de lugares que incluyen Malaya, Borneo, India, Vietnam, Tailandia y Angola, pero la enfermedad humana no se asoció con ZIKV. Las enfermedades humanas significativas causadas por ZIKV solo se informaron 7 décadas después del descubrimiento inicial del virus.

En 2007, una pequeña epidemia en la isla de Yap, Estados Federados de Micronesia, llamó la atención del mundo, ya que representó el primer brote bien documentado de la enfermedad del ZIKV en el mundo (6). A partir de allí se iniciaron estudios para poder entender más a profundidad este virus emergente, donde se encontró que el genoma de ZIKV comprende una molécula de ARN de sentido positivo monocatenario de 10.8 kb que contiene una UTR 5', un marco de lectura abierto único de ~ 10 kb, y una UTR 3'. El marco de lectura abierto codifica una sola poliproteína, que luego se procesa en la cápside (C); la membrana precursora (prM); la proteína de la envoltura (E); y siete proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5)(2). La proteína C comprende la cápside viral, que tiene una forma icosaédrica y está rodeada por una membrana de bicapa lipídica esférica derivada del huésped. Las proteínas M y E se muestran en la superficie viral y tienen hélices transmembrana que las anclan en la membrana externa. La estructura de la proteína E expuso una diferencia potencialmente importante entre ZIKV y otros flavivirus tal es el ejemplo del virus del Dengue (DENV) que está glicosilado en Asn67 en la proteína E, que es importante para la unión al receptor, ZIKV carece de este sitio de glicosilación, la región que rodea este área glicosilada tiende a variar entre los flavivirus y puede ser un determinante importante para la especificidad de los anticuerpos(2).

Las proteínas no estructurales (NS1-NS5) forman el complejo replicativo y desempeñan un papel en el antagonismo de la inmunidad innata del huésped. La proteína ZIKV NS1 es muy similar a otros flavivirus; una vez ha sido glicosilada se asocia con los lípidos de membrana, formando un homodímero dentro de las células que es necesario para la replicación viral y la infección tardía. NS1 también se secreta en el espacio extracelular como una lipoproteína hexamérica que está involucrada en la unión de los factores del huésped ayudando a la generación de la patogénesis y los anticuerpos protectores, por lo que podría ser un objetivo antiviral potencial, también se ha implicado en la evasión inmune y parece desempeñar un papel en la replicación viral junto con NS4A (2,7). NS2A, NS2B, NS4A y NS4B son proteínas hidrófobas que pueden estar asociadas a la membrana. La proteína NS3 es fundamental para la replicación viral y el procesamiento de poliproteínas debido a su dominio de proteasa N-terminal junto con su actividad helicasa de ARN C-terminal. La proteína NS5 tiene dos actividades conocidas: una actividad de ARN polimerasa dependiente de ARN realizada por el término C y una función de limitación de ARN ejecutada por el dominio metiltransferasa ubicado en el extremo N. NS5 suprime la señalización de IFN a través de la degradación dependiente de proteasoma de STAT2 humano(2).

La entrada y replicación de ZIKV en conjunto activan vías de señalización tales como vías de receptor tipo Toll, que posteriormente activan los factores de transcripción. Estos factores de transcripción causan la desregulación de la transcripción de la célula huésped, lo que lleva a respuestas antivirales y proinflamatorias causando daño tisular, apoptosis y desregulación de la proliferación celular(2). El mecanismo patológico por el cual la infección del virus causa patología está determinado por varios factores, entre ellos la cepa del virus, la ruta de la infección, la edad y el fondo genético del huésped, el tiempo después de la infección del virus y el tropismo tisular(4).

La infección con ZIKV ocurre tras un periodo de incubación de 3 a 12 días después de la picadura del mosquito, a menudo es asintomática (cerca del 80% de los casos), sin embargo, tiene un amplio espectro clínico que puede cursar desde un cuadro autolimitado con una duración de 4 a 7 días con síntomas como fiebre, conjuntivitis no purulenta, cefalea, mialgia, artralgia, astenia erupción maculopapular pruriginosa cefalocaudal, edema en miembros inferiores y con menos frecuencia dolor retroocular, anorexia, vómitos diarrea o dolor abdominal(27). Aunque los brotes de ZIKV en la Polinesia Francesa (2013) y Brasil (2015) se han asociado con graves secuelas neurológicas, en particular microcefalia, síndrome de Guillain-Barré (SGB) y mielitis aguda. Como resultado, el 1 de febrero de 2016, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró que el reciente grupo de casos de microcefalia y otros trastornos neurológicos informados constituye una emergencia de salud pública de interés internacional(19).

5.2 CÉLULAS VERO:

Las células Vero son una de las líneas celulares de mamíferos más comunes utilizadas en la investigación, se aislaron originalmente del riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) adulto sin enfermedad, el 27 de marzo de 1962 por Y. Yasumura e Y. Kawakita en la Universidad Chiba en Chiba, Japón. En su paso número 93, la línea celular se llevó al Instituto Nacional de Alergias y Enfermedades Infecciosas de los Institutos Nacionales de la Salud en los Estados Unidos, y se entregó a la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC) en 1966. Al final de la década de 1960, las líneas celulares Vero se estaban utilizando en todo el mundo, principalmente en laboratorios de virología(9).

Esta línea celular tiene característica de morfología epitelial y propiedades de crecimiento adherente. Se ha utilizado ampliamente en estudios de virología, pero también se ha utilizado en muchas otras aplicaciones, incluida la propagación y el estudio de bacterias intracelulares (vgr, *Rickettsia* spp) y parásitos (vgr, *Neospora*), y evaluación de los efectos de productos químicos, toxinas y otras sustancias en células de mamíferos a nivel molecular(9).

El linaje de células Vero es continuo y aneuploide. El cromosoma 12 de las células Vero tiene una deleción homocigótica de ~ 9-Mb, lo que provoca la pérdida del grupo de genes de interferón tipo I (α - β), impidiendo la producción de los mismo, los cuales son claves en la respuesta antiviral, lo que las hace perfectas para cultivos de infección viral, aunque poseen receptor de interferones de tipo I, por lo que tienen la capacidad de generar respuestas antivirales cuando se agrega interferón de otra fuente al cultivo(8).

Debido a la naturaleza continua de las líneas celulares y su sensibilidad a varios virus diferentes, Vero se ha utilizado ampliamente en el campo de la producción de vacunas y para estudiar varios tipos de patógenos emergentes como el virus de la influenza H5N1, el síndrome respiratorio del Medio Oriente, coronavirus, virus Zika y varios virus de la fiebre hemorrágica(31).

Varias líneas celulares se han derivado clonalmente de la línea celular principal de las células Vero, que muestran diferentes fenotipos. Vero 76 por ejemplo, muestra una menor densidad de saturación y las células son susceptibles a los virus de la fiebre hemorrágica humana, otra es la Vero C1008 que es un subclon de Vero 76, muestran cierto grado de inhibición por contacto y son adecuados para soportar el crecimiento de virus de replicación lenta(31).

5.3 CULTIVO CELULAR

El cultivo celular es un conjunto de técnicas que permite el mantenimiento de células in vitro, preservando al máximo sus propiedades fisiológicas, bioquímicas y genéticas(10). Para prepararlo los tejidos deben ser disgregados hasta formar una suspensión de células únicas, es decir, sin unión a otra, gracias al tratamiento con enzimas proteolíticas, luego son suspendidas en medio de cultivo y situadas en frascos plásticos, a medida que se dividen cubren la superficie de este, las células epiteliales y fibroblásticas forman una monocapa adherente, mientras células sanguíneas solo se asientan, no se adhieren(18). En este sentido, se puede lograr el crecimiento y división celular, a veces solo limitado por el espacio y los nutrientes disponibles en el medio (18).

La técnica nace a principios del siglo XX, en ese entonces era bastante engorrosa y presentaba serias dificultades; las principales eran: con respecto a los medios de cultivo debido a la dificultad para su realización y la contaminación gracias a la falta de antibióticos y a medidas de asepsia y antisepsia inadecuadas(10,18,32). Hoy en día estas dificultades se han superado; en el mercado existen numerosos medios de cultivo preformados que poseen los elementos necesarios para el mantenimiento de la línea celular, abundantes antibióticos que impiden el crecimiento de hongos y bacterias -los principales contaminantes de los cultivos celulares- puedan crecer y el desarrollo de medios asépticos como las cámaras de flujo laminar que impiden no solo que el cultivo se contamine, sino que el operario este protegido(33).

El cultivo celular es utilizado en numerosos campos de investigación, tanto animales como vegetales, sin embargo, uno de los campos que más depende de esta técnica es la virología. En 1949, Jonh Enders, Thomas Weller y Frederick Robbins, probaron que el polio virus se podía replicar en células cultivadas, descubrimiento que les valió el premio nobel en 1954 y que abrió las puertas para la propagación de otros virus en cultivos celulares, la creación de vacunas y el estudio de la bioquímica y biología molecular de la replicación viral, tanto así que actualmente el cultivo celular es la forma de producción más común de virus animales(18).

Existen números tipo de cultivos celulares, entres lo cuales están los de células primarias, que son células tomadas directamente del animal o paciente humano y que pueden permanecer en cultivo en un periodo corto de tiempo no más de 5 a 20 divisiones celulares o de líneas de células inmortalizadas o continuas, que bajo condiciones apropiadas pueden continuar creciendo de forma indefinida en cultivo (32) a menudo no se parecen a la célula de origen; son menos diferenciados (habiendo perdido la morfología y las características bioquímicas que poseían en el órgano), a menudo son anormales en la morfología y el número de cromosomas (aneuploidía) y pueden ser tumorigénicos(18).

Las primeras se utilizan en virología experimental cuando el estado de la diferenciación celular es importante o cuando las líneas celulares apropiadas no están disponibles. También se utilizan en la producción de vacunas: por ejemplo, las cepas de vacunas de poliovirus atenuadas vivas pueden propagarse en células primarias de riñón de mono. Los cultivos celulares primarios fueron obligatorios para el crecimiento de virus que iba a ser utilizados como vacunas humanas para evitar la contaminación del producto con ADN potencialmente oncogénico; mientras que las ultimas proporcionan una población uniforme de células que se pueden infectar sincrónicamente para analizar su curva de crecimiento o realizar estudios bioquímicos de replicación viral(18).

5.4 ENSAYO DE FORMACIÓN DE PLACAS

El PFA fue desarrollado por Renato Dubelcco en 1992 para determinar los títulos de stocks de bacteriófagos para usarlos en virología animal(32).

Actualmente este ensayo se utiliza para cuantificar títulos virales, donde se requiere que una monocapa de células cultivadas sea incubada con diferentes diluciones del virus para permitir la entrada de este a las células, posteriormente el inóculo es retirado y las células son cubiertas generalmente por medio agar, que restringe la propagación del virus solo a las células vecinas, como consecuencia se forman zonas circulares de células infectadas llamadas placas. Solo los virus que causen un daño visible al cultivo celular pueden ser cuantificados de esta forma(18).

El título del stock del virus puede ser calculado en Unidades formadoras de placa, sigla del inglés: Plaque forming units (FFU), por mililitro, multiplicando el número de placas por el factor de dilución y posteriormente dividiendo por el volumen del virus. Cuando una partícula de virus infeccioso inicia una placa, la progenie viral dentro de la placa son clones, y las reservas de virus preparadas a partir de una placa única se conocen como placa purificada. La purificación de placa se emplea ampliamente en virología para establecer reservas de virus clonales. La punta de una micropipeta se sumerge en la capa sobre la placa y se recupera el tapón de agar que contiene el virus. El virus dentro del tapón de agar se lleva en tampón y se usa para preparar reservas de virus. Para garantizar la pureza, este proceso generalmente se repite al menos una vez más(18).

5.5 ENSAYOS DE FORMACIÓN DE FOCOS

El FFA una variante del ensayo de placa, que puede realizarse más rápidamente y es útil para determinar títulos virales de virus que no forman placas. El procedimiento inicial es igual al de formación de placas. Sin embargo, después de un periodo suficiente de absorción del virus y expresión génica, las células se permeabilizan e incuban con un anticuerpo contra alguna proteína viral. Un segundo anticuerpo, que reconoce el primero es añadido, este último generalmente esta conjugado con una molécula fluorescente o que produzca señales colorimétricas. Las células luego son observadas en el microscopio para contarlas(18).

La principal ventaja que posee es el tiempo, en estudios con flavivirus se logró acortar el tiempo para la cuantificación viral en dos días máximo, mientras el PFA tenía un tiempo de realización de 3 a 11 días(11), otra ventaja es la versatilidad que posee, se puede realizar el ensayo con un mayor número de células, como es el caso de la línea celular C6/36 que no formo placas en el ensayo de Payne et all(11) y de virus que no lisan las membranas celulares. Sin embargo, como el objetivo de este ensayo es verificar la infección del virus, es decir que entre a la célula, no se puede medir por completo el ciclo celular, ni garantizar la formación de nuevos viriones (18)

El título del stock viral se expresa en unidades formadoras de focos por mililitro (FFU/mL) y se calcula multiplicando el promedio de pocillos duplicados por el factor de dilución del virus y posteriormente dividiendo por el volumen del virus añadido.

6. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

Variable	Definición	Categorías	Nivel de medición	Indicador
Tiempo de incubación de infección	Periodo de tiempo entre la infección de las células en monocapa hasta la fijación de las células con metanol	Horas	Numérica	Frecuencia
clon de anticuerpo primario	Es el tipo de anticuerpo monoclonal primario que se une de manera específica a la proteína NS1 de ZIKV en el FFA	MAB-130 / 644	Nominal	Frecuencia
Confluencia de la monocapa	Es el porcentaje que ocupan las células del área total de superficie que pueden llegar ocupar.	Porcentaje	Numérica	Porcentaje
Concentración de anticuerpo monoclonal primario	Es la relación masa/volumen del anticuerpo monoclonal primario	µg/ml	Numérica	Frecuencia

Título de stock de ZIKV	número de partículas virales infectantes por unidad de volumen del stock	unidades formadoras de foco7mL	Numérica	Frecuencia
-------------------------	--	--------------------------------	----------	------------

7. DISEÑO METODOLÓGICO

7.1 TIPO DE ESTUDIO

Se realizó un estudio de desarrollo de un ensayo de laboratorio. Es un ensayo de laboratorio porque todo el proyecto se realizó dentro de este, haciendo experimentos y utilizando reactivos del laboratorio.

7.2 LUGAR

Se tomó como área de estudios el laboratorio de infección e inmunidad de la Universidad Surcolombiana ubicado en el segundo piso de la facultad de salud (Calle 9 No. 15-25) el cual cuenta con todos los equipos necesarios para realizar los experimentos del proyecto y para analizar los resultados de estos.

7.3 POBLACIÓN

Se tomó como población el stock de ZIKV almacenado en el laboratorio.

7.4 MUESTRA

Muestra no probabilista porque no depende del azar, por conveniencia del stock de ZIKV del laboratorio, debido a que la elección de las muestras utilizadas derivó de la disponibilidad del laboratorio.

7.5 ESTRATEGIAS PARA EVITAR SESGOS

- Reactividad cruzada entre los flavivirus Este variable se controlaría mediante los anticuerpos monoclonales para ZIKV.
- Error de técnica del ensayo: Se controlará mediante la utilización de controles negativos o MOCK, el cual es una sustancia procesada de la misma manera que la que posee el virus, pero sin añadir este.
- Stocks con confirmación por PCR de ZIKV y ausencia de DENV

- Conteo de focos por dos personas de manera independiente.
- Infección de pozos por duplicado

7.6 TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS PARA LA RECOLECCIÓN DE DATOS

El protocolo inicial fue desarrollado en base a protocolos descritos en la literatura (11,34,35) y con base en la experiencia del asesor científico.

El protocolo del ensayo de formación de foco inicial fue modificándose de acuerdo con las variables, empezando por el tipo de anticuerpo, seguido por su concentración, tiempo de incubación viral y por último la utilización del inhibidor de secreción celular Brefeldin A.

El proceso de descongelamiento e incubación, así como la siembra de las células Vero en la placa de 96 pozos no tuvo modificaciones a las planteadas en el protocolo inicial.

La evaluación práctica del protocolo fue realizada por ensayo y error, donde las conclusiones del experimento anterior de acuerdo con la variable en estudio modificaban el protocolo, ajustándolo al resultado óptimo.

Una vez se completó el desarrollo del protocolo, se tomaron todos los stocks de ZIKV-PR y ZIKA-U del laboratorio para la cuantificación.

Se siguió el siguiente procedimiento:

7.6.1 Preparar equipos y reactivos (Día 0)

- ZIKV cepa Puerto Rico para ser titulado. (los viales fueron donados)
- Células Vero 76 (ATCC® CRL-1587™)
- Mock
- Medio de cultivo completo 10% y 2%:
 - RPMI 1640 1x + L-glutamina (Gibco) estéril Ref:11875-085/11875-135
 - 10% o 2% FBS estéril (Gibco) Ref: 16000-044
 - 1%Pen Step Glutamine 100X estéril (Penicilina 10.000 U/mL-estreptomocina 10,000 ug/mL – L-glutamina 29.2 mg/mL) Ref: 10378-016

- DPBS (Dulbecco's Phosphate-buffered saline) (Gibco) sin cloruro de calcio ni magnesio, estéril. Ref: 13190-144
- Tripsina al 0.05% + solución de EDTA al 0.02% en DPBS (BI, Ref:03-053-1b)
- BD GolgiPlug (BD Cat:51-2301KZ Lot:81620)
- Azul de Metileno (Sigma-Aldrich ref: M9140)
- Metanol absoluto -70°C (EMSURE®, Ref: 106009)
- PBS-BSA
 - DPBS (Dulbecco's Phosphate-buffered saline) (Gibco, cat: 10010023)
 - BSA 1% (Bovine Serum Albumin) (Sigma-Aldrich ref: A7906-500G)
 - Tween 20 al 0.01% (ACROS, Cat. 23336-2500)
- Anticuerpo primario (MAb 644 y MAb 130 anticuerpos fueron donados por Irene Bosh del MIT (del inglés Massachusetts Institute of Technology),)
- Anticuerpo monoclonal secundario (anticuerpo anti-IgG de ratón hecho en cabra acoplado a biotina) (GAMB) (Molecular probes, C-962 Lot:65b1-1)
- 3-amino 9-etilcarbazol (AEC kit, Vector Ref: SK-4200)
- Estreptavidina–Peroxidasa (KPL, Cat: 5120-0038)
- Tubos Falcon de 15 (BD, Cat: 352096) y 50ml (BD, Cat: 352070)
- Tubos Eppendorfs 1.5ml (Ref: 0030108051)
- Frasco de cultivo de 75 cm² (Falcon Ref: 734-0046)
- Placa de 96 pozos para cultivo celular (Costar, ref:3595)
- Pipeta automática (Thermo Scientific, Ref: 10402822)
- Pipetas serológicas 5-10-25 mL (Costar cat: 4487, 4488, 4489)
- Pipeta monocanales de 1000, 200, 10, 2 μ L (Finnpipette™ cat:4642090, 4642080, 4642040,4642010) y multicanales de 50 y 200 μ L (Finnpipette™ cat: 4662010, 4662030)
- Parafilm
- Alcohol etílico al 70%

- Toallas de papel
- Baño de agua Termo Scientific Series 8000 WJ. Modelo 3428
- Microscopio de luz invertido Motic AE31.
- Microscopio de luz Olympus CH30RF100

7.6.2 Descongelamiento e incubación línea celular vero 76 (Día 0)

- Descongelar el vial de células VERO 76 (ATCC® CRL1587) con agitación suave en un baño de agua a 37 ° C (en aproximadamente 2 minutos).
- Para reducir la posibilidad de contaminación, mantenga el O ring y la tapa fuera del agua.
- Retirar el vial del baño de agua tan pronto como se descongele el contenido, y descontaminar sumergiéndolo o rociándolo con etanol al 70%. Todas las operaciones a partir de ahora deben llevarse a cabo bajo estrictas condiciones asépticas.
- Transferir el contenido del vial a un tubo de centrifuga que contenga 9,0 ml de medio de crecimiento completo y centrifugue a aproximadamente 1200rpm por 10 minutos con velocidad de frenado 4 a temperatura ambiente.
- Realizar conteo en cámara de Neubauer.
- Re-suspender el sedimento celular con el medio de crecimiento completo y dispensar en un frasco de 75 cm². Es importante evitar la alcalinidad excesiva del medio durante la recuperación de las células.
- Incubar a 37°C en una incubadora adecuada con 5% de CO₂

7.6.3 Siembra de células vero 76 del t-75 a placa de 96 pozos (Dia 1)

- Retirar el medio de cultivo y enjuagar con 6ml DPBS estéril, distribuir por todo el frasco y luego descartar.
- Adicionar 3ml de Tripsina al 0.125% + solución de EDTA 0.53 Mm, distribuir por todo el frasco, incubar la placa a 37°C por 5 min máximo 10 min hasta que las células se despeguen.
- Dar golpes al frasco para desprender las células
- Agregar 3ml de medio completo al frasco, mezclar el contenido en la pipeta.
- Realizar conteo en cámara de Neubauer

- Añadir 10ml de medio completo a un Falcon de 15ml
- Depositar la cantidad de la mezcla de células con tripsina y medio al Falcon con el medio completo (350.000 células/ células por pozo 3.500)
- Las células se incuban hasta alcanzar confluencia de 70%, aproximadamente dos días.

7.6.4 Experimento #1: FFA comparando contraste y definición de la tinción de las células infectadas con Virus ZIKV -PR usando MAb 644 vs 130 con [MAb] de 0.5 µg/ml, 1 µg/ml y 2 µg/ml e incubación de la infección por 48h

- Realizar Mapa (VER ANEXO A)
- Preparar diluciones en serie de 10 veces de la muestra del virus, según mapa y el mock prepararlo en 1:1000 así:
 - 1/10³: 1500µL de medio al 2% + 1.5 µL de ZIKV
 - 1/10⁴: 1350µL de medio al 2% + 150 µL de A
 - 1/10⁵: 1350µL de medio al 2% + 150 µL de B
 - 1/10⁶: 1350µL de medio al 2% + 150 µL de C
 - 1/10⁶: 1350µL de medio al 2% + 150 µL de C
 - 1/10⁷: 1350µL de medio al 2% + 150 µL de E
 - 1/10⁸: 1350µL de medio al 2% + 150 µL de F
 - MOCK: 1500µL de medio al 2% + 1.5 µL de MOCK
- Verificar confluencia de las células
- Retirar el contenido con pipeta multicanal empezando por el pozo destinado para el MOCK, luego de menor a mayor concentración, inmediatamente se termina de retirar, lavar con 150 µL de DPBS por pozo (Proceso se realiza 2 veces) Inmediatamente se termina de lavar se agrega la dilución del virus o MOCK según el mapa
- Verificar monocapa en el microscopio e incubar a 37°C en una incubadora adecuada con 5% de CO2 durante 48h

Ensayo de formación de foco (Día 6)

- Después de 48 horas de infección se retira el medio de los pozos, iniciando por la fila A quien contiene el MOCK
- Se hace lavado de la placa de 96 pozos con PBS 1X agregando 150 μ L por pozo y agitando un poco en el proceso, se invierte la placa, se agita de arriba hacia abajo 3 veces posteriormente se seca sobre toallas de papel sin golpear (proceso se realiza 2 veces).
- Se agregan 150 μ L de metanol absoluto a -70° c. por pozo, se deja incubar por 30 mins a temperatura del laboratorio.
- Se prepara MAb 130 y MAb 644 a 0.5 μ g/ml, 1 μ g/ml y 2 μ g/ml cada uno.
- Pasados los 30min, se invierte la placa y se agita de arriba hacia abajo 3 veces, posteriormente se seca sobre toallas de papel sin golpear (proceso se realiza 2 veces).
- Se agrega 150 μ L de PBS 1X por pozo y se repite el proceso de lavado (repetir 2 veces)
- Pos lavado y secado, se agrega 100 μ L por pozo de PBS BSA al 1% /MAb 130 o 644 al 0.5 μ g/ml ,1 μ g/ml y 2 μ g/ml según mapa (ver anexo A). Se deja incubar por 1h a temperatura del laboratorio y agitando cada 10 minutos.
- Adicionar en 1 falcon 3,2 ml de PBS BSA 1% con 1.6 μ L de GAMB para diluir 1:2000
- Haga 2 lavados a la palca de 96 pozos con PBS 1X 150 μ L por pozo
- Ahora agregue 100 μ L de GAMB/PBS BSA 1% a todos los pozos que no se hayan descartado según anexo 1 (ver) y espere 1h agitando cada 10 minutos.
- Haga 2 lavados a la palca de 96 pozos con PBS 1X 150 μ L por pozo
- Se prepara la SPO agregando en 3.2ml, 3.2 μ L de SPO (1:1000) adicione 100 μ L por pozo agitando cada 5mins.

- Haga 2 lavados a la palca de 96 pozos con PBS 1X 150 μ L por pozo
- Preparación AEC: En 5ml de agua destilada agregue 2 gotas de buffer Ph 5.3, 3 gotas de AEC y 2 gotas de Peroxido de Hidrógeno y agite hasta homogeneizar
- Agregar 100 μ L por pozo que no se haya descartado (Ver anexo A) de la solución anterior y esperar 20mins mientras ocurre la reacción
- Luego de 20mins se toma 150 μ L de agua destilada y se adiciona a cada pozo para detener la reacción.
- Descarte y realice conteo inmunocitoquímico bajo microscopio.

7.6.5 Experimento #2: FFA. con MAb 644 en concentraciones 2,1,0.5 y 0.3 μ g/ml en células Vero 76 infectadas con Virus ZIKV-PR y tiempo de incubación de la infección viral de 48h

- ◆ Infección de vero 76 en placa de 96 pozos con ZIKV-PR (Día 4)
 - Realizar Mapa (VER ANEXO B)
 - Preparar diluciones en serie de 10 veces de la muestra del virus, según mapa y el mock prepararlo en 1:1000 así:
 - 1/10³: 1000 μ L de medio al 2% + 1 μ L de ZIKV
 - 1/10⁴: 1620 μ L de medio al 2% + 180 μ L de A
 - 1/10⁵: 1620 μ L de medio al 2% + 180 μ L de B
 - 1/10⁶: 1620 μ L de medio al 2% + 180 μ L de C
 - 1/10⁷: 1620 μ L de medio al 2% + 180 μ L de D
 - 1/10⁸: 1620 μ L de medio al 2% + 180 μ L de E
 - MOCK: 1000 μ L de medio al 2% + 1 μ L de MOCK
 - Verificar confluencia de las células
 - Retirar el contenido con pipeta multicanal empezando por el pozo destinado para el MOCK, luego de menor a mayor concentración, inmediatamente se termina de retirar, lavar con 150 μ L de DPBS por pozo. (Proceso se realiza 2 veces) Inmediatamente se termina de lavar se agrega la dilución del virus o MOCK según el mapa

- Inmediatamente se termina de lavar se agrega la dilución del virus según el mapa
- Verificar monocapa en el microscopio e incubar a 37°C en una incubadora adecuada con 5% de CO2 durante 48h

Ensayo de formación de foco (Día 6)

- Después de 48h de infección retirar el medio de los pozos con micropipeta, iniciando por la fila A (MOCK)
- Lavar la placa de 96 pozos con PBS 1X agregando 150µL por pozo, retirar con pipeta (proceso se realiza 2 veces).
- Agregar 150µL de metanol absoluto a -70°C. por pozo, se deja incubar por 30 min a temperatura del laboratorio.
- Preparar diferentes concentraciones del MAb 644.
- 0.3 ng/ml agregando a 2,6 ml de PBS BSA al 1% 5,2 µL de MAb 644
- 0,5 ng/ml agregando a 2,6 ml de PBS BSA al 1% 7,8 µL de MAb 644
- 1 ng/ml agregando a 2,6 ml de PBS BSA al 1% 15,7 µL de MAb644
- 2 ng/ml agregando a 2,6 ml de PBS BSA al 1% 31,5 µL de MAb 644
- Adicione 100µL por pozo según mapa (Ver anexo B)
- Invertir la placa para retirar el contenido y lavar con PBS 1X 150 µL por pozo, posteriormente invertir y secar sobre toalla de papel sin golpear (proceso se realiza 2 veces)
- Agregar 100µL por pozo de las diferentes concentraciones del MAb / PBS BSA al 1% según mapa. Incubar por 1h a temperatura del laboratorio.

- Preparar GAMB en dilución 1:2000 en PBS BSA al 1%, así: a 10ml de PBS BSA al 1% agregar 5 L de GAMB, adicione 100µL por pozo
- Invertir la placa para retirar el contenido y lavar con PBS 1X 150 µL por pozo, posteriormente invertir y secar sobre toalla de papel sin golpear (proceso se realiza 2 veces)
- Agregar 100µL de GAMB/PBS BSA al 1% a todos los pozos según Tabla 1. (ver) por 1h a temperatura del laboratorio.
- Invertir la placa para retirar el contenido y lavar con PBS 1X 150 µL por pozo, posteriormente invertir y secar sobre toalla de papel sin golpear (proceso se realiza 2 veces)
- Preparar la SPO Dilución 1:1000, así: a 10 ml de PBS BSA al 1% agregar 10 µL de SPO. adicione 100µL por pozo. Incubar por 30min a temperatura del laboratorio.
- Invertir la placa para retirar el contenido y lavar con PBS 1X 150 µL por pozo, posteriormente invertir y secar sobre toalla de papel sin golpear (proceso se realiza 2 veces)
- Preparar AEC, según indicaciones del fabricante. A 10 ml de agua destilada agregar 4 gotas de buffer, 6 gotas de AEC y gotas de peróxido de hidrogeno, agitar hasta homogenizar.
- Agregar 100µL por pozo de la solución anterior y esperar 20mins mientras ocurre la reacción
- Luego de 20mins retire con micropipeta el AEC y deposite 150µL de agua destilada a cada pozo para detener la reacción.
- Realizar conteo inmunocitoquímico bajo microscopio.

7.6.6 Experimento #3: FFA con MAb 644 en concentración 0.5µg/ml infectadas con Virus ZIKV -PR con tiempo de incubación de la infección viral 6, 12 y 24 h

- INFECCIÓN DE VERO 76 EN PLACA DE 96 POZOS CON ZIKV-PR (Día 4)
- Realizar Mapa (VER ANEXO C)
- Preparar diluciones en serie de 10 veces de la muestra del virus, según mapa y el mock prepararlo en 1:1000 así.
 - 1/10³: 600µL de medio al 2% + 0,6 µL de ZIKV
 - 1/10⁴: 540µL de medio al 2% + 60 µL de A
 - 1/10⁵: 540µL de medio al 2% + 60 µL de B
 - 1/10⁶: 540µL de medio al 2% + 60 µL de C
 - 1/10⁷: 540µL de medio al 2% + 60 µL de D
 - 1/10⁸: 540µL de medio al 2% + 60 µL de E
 - MOCK: 1000µL de medio al 2% + 1 µL de MOCK

Nota: Procedimiento se repite para la infección de 24h (00:00h), 12h(18:00h) y 6h(6pm).

- Verificar confluencia de las células
- Retirar el contenido con pipeta multicanal empezando por el pozo destinado para el MOCK, luego de menor a mayor concentración, inmediatamente se termina de retirar, lavar con 150 µL de DPBS por pozo. (Proceso se realiza 2 veces) Inmediatamente se termina de lavar se agrega la dilución del virus o MOCK según el mapa
- Verificar monocapa en el microscopio e incubar a 37°C en una incubadora adecuada con 5% de CO2 durante 24h, 12h y 6h, según corresponda.

Ensayo de formación de foco (Día 6)

Después de 24h,12h y 6h de infección (12:00m) retirar el medio de los pozos con micropipeta, iniciando por la fila A (MOCK) según mapa (Ver Anexo C

- Lavar la placa de 96 pozos con PBS 1X agregando 150µL por pozo, retirar con pipeta (proceso se realiza 2 veces).

- Agregar 150µL de metanol absoluto a -70°C. por pozo, se deja incubar por 30 min a temperatura del laboratorio.
- Preparar MAb 644.a 0,5 µg/ml agregando a 10ml de PBS BSA al 1% 30,3 µL de MAb 644
- Invertir la placa para retirar el contenido y lavar con PBS 1X 150 µL por pozo, posteriormente invertir y secar sobre toalla de papel sin golpear (proceso se realiza 2 veces)
- Agregar 100µL por pozo de las diferentes concentraciones del MAb / PBS BSA al 1% según mapa. Incubar por 1h a temperatura del laboratorio.
- Preparar GAMB en dilución 1:2000 en PBS BSA al 1%, así: a 10ml de PBS BSA al 1%, agregar 5 µL de GAMB, adicione 100µL por pozo
- Invertir la placa para retirar el contenido y lavar con PBS 1X 150 µL por pozo, posteriormente invertir y secar sobre toalla de papel sin golpear (proceso se realiza 2 veces)
- Agregar 100µL de GAMB/PBS BSA al 1% a todos los pozos según tabla 1 (ver) Incubar por 1h a temperatura del laboratorio.
- Invertir la placa para retirar el contenido y lavar con PBS 1X 150 µL por pozo, posteriormente invertir y secar sobre toalla de papel sin golpear (proceso se realiza 2 veces)
- Preparar la SPO Dilución 1:1000, así: a 10 ml de PBS BSA al 1% agregar 10 µL de SPO. adicione 100µL por pozo. Incubar por 30min a temperatura del laboratorio.
- Invertir la placa para retirar el contenido y lavar con PBS 1X 150 µL por pozo, posteriormente invertir y secar sobre toalla de papel sin golpear (proceso se realiza 2 veces)
- Preparar AEC, según indicaciones del fabricante. A 10 ml de agua destilada agregar 4 gotas de buffer, 6 gotas de AEC y gotas de peróxido de hidrogeno, agitar hasta homogenizar.

- Agregar 100µL por pozo de la solución anterior y esperar 20mins mientras ocurre la reacción
- Luego de 20mins se toma retire con micropipeta el AEC y deposite 150µL de agua destilada a cada pozo para detener la reacción.
- Realizar conteo inmunocitoquímico bajo microscopio.

7.6.7 Experimento #4: Respuesta al inhibidor de la secreción celular Brefeldin A; 48, 24, 12 y 6h de incubación de infección viral con Virus ZIKV -PR con MAb644 a 0.5µg/ml

- Infección de vero 76 en placa de 96 pozos con zikv-pr (Día 4 y 5)
- Realizar Mapa (VER ANEXO D)
- Preparar diluciones en serie de 10 veces de la muestra del virus, según mapa y el mock prepararlo en 1:100 así:
 - 1/100: 600µL de medio al 2% + 6 µL de ZIKV
 - 1/10³: 540µL de medio al 2% + 60 µL de A
 - 1/10⁴: 540µL de medio al 2% + 60 µL de B
 - 1/10⁵: 540µL de medio al 2% + 60 µL de C
 - 1/10⁶: 540µL de medio al 2% + 60 µL de D
 - 1/10⁷: 540µL de medio al 2% + 60 µL de E
 - 1/10⁸: 540µL de medio al 2% + 60 µL de F
 - MOCK: 600µL de medio al 2% + 6 µL de MOCK

Nota: Procedimiento se repite para la infección de 48h(17/06/2019 17:00), 24h (18/06/2019 17:00h), 12h(19/06/2019 5:00h)y 6h(19/06/2019 11:00am).

- Verificar confluencia de las células
- Retirar el contenido con pipeta multicanal empezando por el pozo destinado para el MOCK, luego de menor a mayor concentración, inmediatamente se

termina de retirar, lavar con 150 μ L de DPBS por pozo. Se repite con las demás columnas. (Proceso se realiza 2 veces).

- Inmediatamente se termina de lavar se agrega la dilución del virus según el mapa
- Verificar monocapa en el microscopio e incubar a 37°C en una incubadora adecuada con 5% de CO₂ durante 48h, 24h, 12h y 6h, según corresponda.

Agregar BFA (día 5)

- El proceso se realiza en el caso de 48h luego de 24h, en el de 24h luego de 12h, en el de 12h luego de 6h, en el de 6h no se realizo ensayo con BFA.
- Preparar BFA a 0.1 μ g/mL, así: 0,3 de BD GolgiPlug y 3ml de medio al 2%
- Retirar el contenido con pipeta multicanal empezando por el pozo destinado para el MOCK, luego de menor a mayor concentración, inmediatamente se termina de retirar, lavar con 150 μ L de DPBS por pozo. Se repite con las demás columnas. (Proceso se realiza 2 veces)
- Agregar 100 μ L de BFA al 0.1 μ g/mL

Ensayo de formación de foco (Día 6)

- Después de 48h, 24h, 12h y 6h de infección (19/06/2019 17:00pm) retirar el medio de los pozos con micropipeta, iniciando por la fila A (MOCK) según mapa (Ver Anexo C)
- Lavar la placa de 96 pozos con PBS 1X agregando 150ul por pozo, retirar con pipeta (proceso se realiza 2 veces).
- Agregar 150 μ L de metanol absoluto a -70°C. por pozo, se deja incubar por 30 min a temperatura del laboratorio.
- Preparar MAb 644.a 0,5 μ g/ml agregando a 10ml de PBS BSA al 1% 30,3 μ L de MAb 644

- Invertir la placa para retirar el contenido y lavar con PBS 1X 150 μ L por pozo, posteriormente invertir y secar sobre toalla de papel sin golpear (proceso se realiza 2 veces)
- Agregar 100 μ L por pozo de las diferentes concentraciones del MAb / PBS BSA al 1% según mapa. Incubar por 1h a temperatura del laboratorio.
- Preparar GAMB en dilución 1:2000 en PBS BSA al 1%, así: a 10ml de PBS BSA al 1% , agregar 5 μ L de GAMB, adicione 100 μ L por pozo
- Invertir la placa para retirar el contenido y lavar con PBS 1X 150 μ L por pozo, posteriormente invertir y secar sobre toalla de papel sin golpear (proceso se realiza 2 veces)
- Agregar 100 μ L de GAMB/PBS BSA al 1% a todos los pozos según Tabla 1 (ver) Incubar por 1h a temperatura del laboratorio.
- Invertir la placa para retirar el contenido y lavar con PBS 1X 150 μ L por pozo, posteriormente invertir y secar sobre toalla de papel sin golpear (proceso se realiza 2 veces)
- Preparar la SPO Dilución 1:1000, así: a 10 ml de PBS BSA al 1% agregar 10 μ L de SPO. adicione 100 μ L por pozo. Incubar por 30min a temperatura del laboratorio.
- Invertir la placa para retirar el contenido y lavar con PBS 1X 150 μ L por pozo, posteriormente invertir y secar sobre toalla de papel sin golpear (proceso se realiza 2 veces)
- Preparar AEC, según indicaciones del fabricante. A 10 ml de agua destilada agregar 4 gotas de buffer, 6 gotas de AEC y gotas de peróxido de hidrogeno, agitar hasta homogenizar.
- Agregar 100 μ L por pozo de la solución anterior y esperar 20mins mientras ocurre la reacción
- Luego de 20mins se toma retire con micropipeta el AEC y deposite 150 μ L de agua destilada a cada pozo para detener la reacción.

- Realizar conteo inmunocitoquímico bajo microscopio.

7.7. INSTRUMENTO PARA RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN:

El instrumento para la recolección de información fue una hoja que contiene las siguientes variables: Tiempo de incubación de infección, clon de anticuerpo primario, concentración de anticuerpo monoclonal primario, confluencia de la monocapa y título de stock de ZIKV, en los cuales se anotó cada detalle respecto a estas variables. (Ver Anexo D)

7.8. PRUEBA PILOTO

Prueba piloto ffu vero 76 infectadas con zika-pr en placa de 6 pozos

Experimento realizado: 10 / 11 / 2018

Hora de inicio: 8:00 am

Duración total del experimento: 10 Horas

Encargados: José Santiago Cortés Guzmán // Sara Bolivar Marín // José Ricardo Pucciny Cortés

Objetivo: Probar el protocolo base para realización de FFU y funcionamiento de los reactivos con respuesta de la tinción.

Materiales: Ver PREPARAR EQUIPOS Y REACTIVOS

Procedimiento:

- Luego de 48 horas de cultivo de ZIKV-PR en Vero-76 se retira el medio de los pozos iniciando por el MOCK, luego por las diluciones en menor concentración a las de mayor concentración.
- Se realiza un lavado de la placa adicionando 2ml de PBS 1X por pozo, agitando la placa y haciendo inversión total, secando la misma suavemente sobre toallitas de papel absorbente.
 - Repita el paso 2 una vez mas
- Adicione 2ml de metanol por pozo y deje reposar a temperatura ambiente por 30 minutos.

- En un tubo falcon agregue 6ml de PBS-BSA 1% y adicione 20 μ L de MAb130
- Lave la placa según paso 2 de este procedimiento
- Adicione 2ml de PBS-BSA 1%- MAb 130 a cada pozo y deje reposar a temperatura ambiente por 30 minutos. (No se adiciona la solución en uno de los pozos)
- Adicione en un falcon 6ml de PBS-BSA 1% y adicione 3 μ L de GAMB
- Descarte y lave la placa según 2
- Agregue 1ml de PBS-BSA 1%- GAMB por pozo y se deja reposar por 60 minutos a temperatura ambiente.
- En un falcon adicionar 6ml de PBS-BSA 1% y adicione 6 μ L SPO.
- Descarte y lave la placa según 2
- Agregue 1ml de PBS-BSA 1%-SPO y deje reposar por 30 minutos a temperatura ambiente
- Prepare el AEC así: con 10ml de agua destilada en un falcon agregue 4 gotas de buffer, 6 gotas de AEC y 4 gotas de peróxido de hidrógeno. Agite hasta homogenizar.
- Descarte y lava la placa según 2
- Agregue 1,5ml de PBS-BSA 1%-AEC por pozo y detenga reacción pasados 20 minutos con agua destilada
- Descarte y realice conteo de FFU bajo microscopio de luz invertida.

Conclusiones:

- Se probó por primera vez la técnica del FFU, así como el desarrollo inicial para la creación de un protocolo propio.

- Se probó el protocolo base, así como el funcionamiento de los reactivos, demostrando utilidad, sin embargo, es necesario ponerlo a prueba bajo diferentes condiciones realizando nuevos experimentos.
- La confluencia celular utilizada en este experimento no fue la óptima, por ello la confluencia debe estar a un alto porcentaje, pero nunca al 100% ya que impide el conteo por sobresaturación de la monocapa

7.9. CODIFICACIÓN Y TABULACIÓN:

Los datos se almacenaron mediante una base de datos en el programa Excel versión 2017 además los gráficos de los resultados fueron realizados mediante el programa CorelDraw. El registro fotográfico se almacenó en Google drive.

7.10. FUENTES DE INFORMACIÓN:

La fuente de información fue directa ya que se tomó de los resultados de los experimentos.

7.11. PLAN DE ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS

Se aplicó estadística descriptiva, todas las variables se expresaron con frecuencias y/o porcentajes. Se evaluó la replicabilidad del ensayo con los resultados obtenidos.

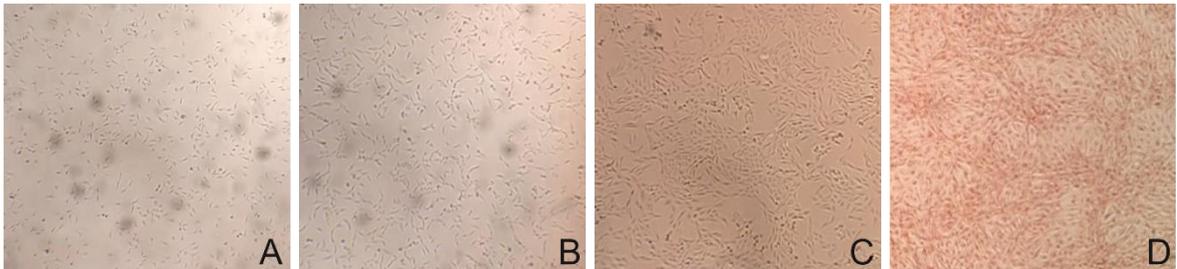
7.12 CONSIDERACIONES ÉTICAS

El estudio cuenta con la aprobación del comité de bioética del Hospital Universitario Hernando Moncaleano Perdomo para el uso de la seroteca del laboratorio de infección e inmunidad de la Universidad Surcolombiana mediante acta de aprobación N° 012-012 del 19 de noviembre de 2015, cumpliendo la normatividad vigente del artículo 4 de la resolución 8430 del año 1993 donde se establecen las “normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud”. Nuestra investigación DESARROLLO DE UN ENSAYO DE FORMACIÓN DE FOCO PARA IDENTIFICAR PARTICULAS VIRALES INFECTANTES DE VIRUS ZIKA se ubica en el tipo de estudio que comprende el desarrollo de acciones que contribuyen al estudio de las técnicas y métodos que se recomienden o empleen para la prestación de servicios de salud.

8. RESULTADOS

Se realizaron un total de 10 ensayos de formación de foco, donde se encontraron los siguientes resultados. En la realización de la prueba piloto se utilizó la confluencia de 70% para realizar la infección del virus, encontrándose que luego de 24h alcanzaba el 100%, confluencia óptima para realizar experimento (ver Figura 1)

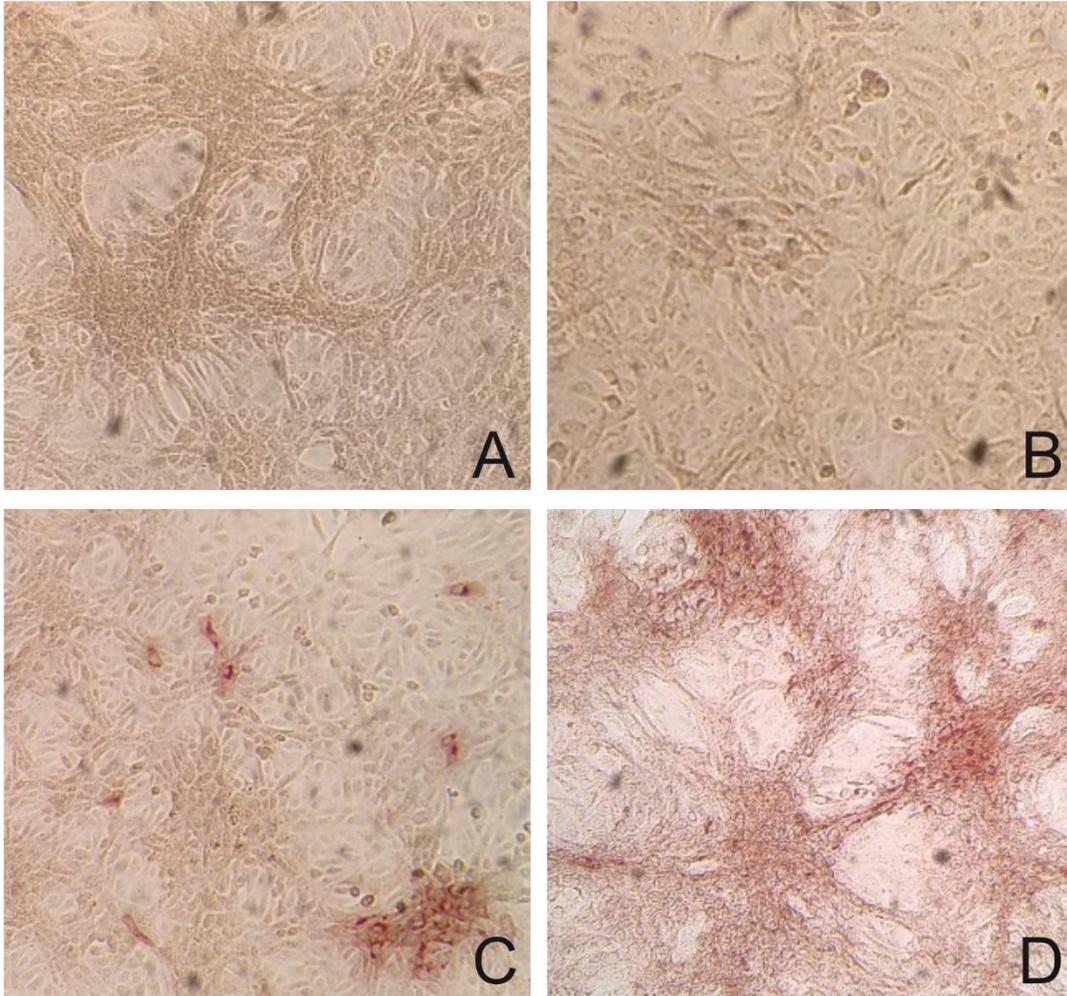
Figura 1. Confluencia de la monocapa con células Vero-76 previa a infección viral con ZIKA-PR.



Aumento 100x A. Confluencia de la monocapa al 30%. B. Confluencia de la monocapa al 50% C. Confluencia de la monocapa al 70% D. Confluencia de la monocapa al 100%. Fuente: Base de datos.

Posteriormente, según procedimiento del experimento #1 (ver materiales y métodos), se evaluó el anticuerpo con mejor contraste y definición en base a la observación por microscopía óptica convencional, probándose el MAb 644 y el MAb 130 (Ver Figura 2), el clon de anticuerpo óptimo para el protocolo resulto ser el MAb 644, según las características antes mencionadas.

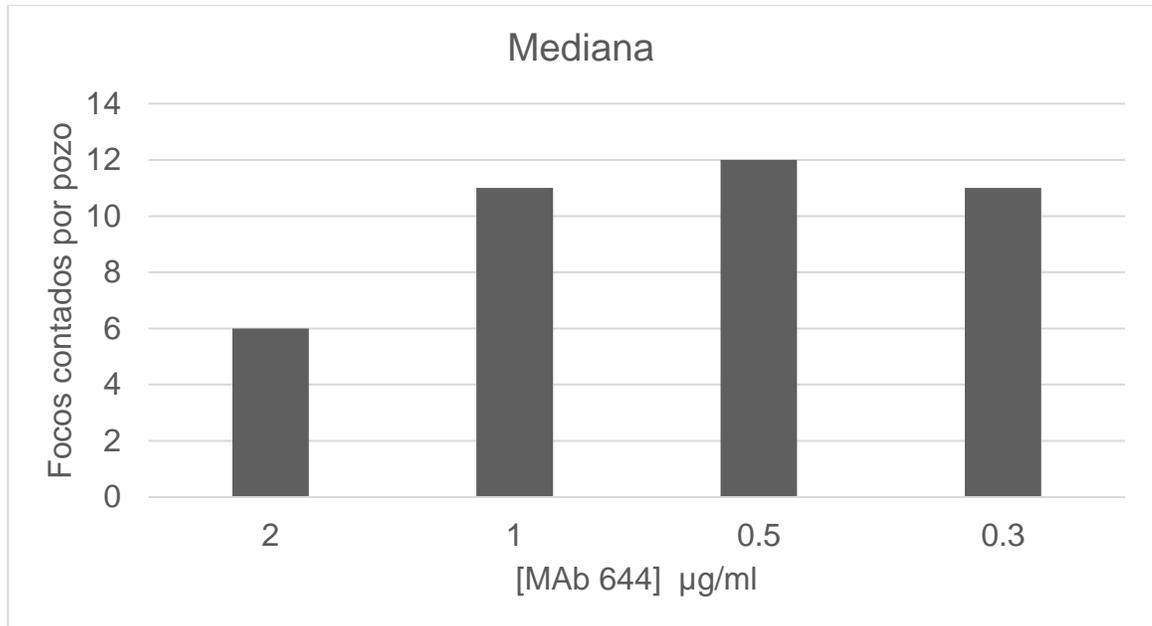
Figura 2. Comparación de contraste y definición de la tinción de las células infectadas usando MAb 644 vs 130 [MAb] 1 µg/ml.



Ensayo 48h p.i, Dilución 10^{-3} de ZIKA-PR, 400x de aumento A Mock tinción MAb 130 B. Mock tinción MAb 644 C. Tinción con MAb 644 D. Tinción con 130. Fuente: Base de datos.

Después, se configuró el experimento #2 (ver materiales y métodos) para determinar la concentración adecuada del anticuerpo monoclonal primario MAb 644 (ver Figura 3), escogiendo la concentración que al terminar de realizar el ensayo mostró la mediana más alta de focos formados en la dilución 10^{-6} la cual fue 0.5µg/ml.

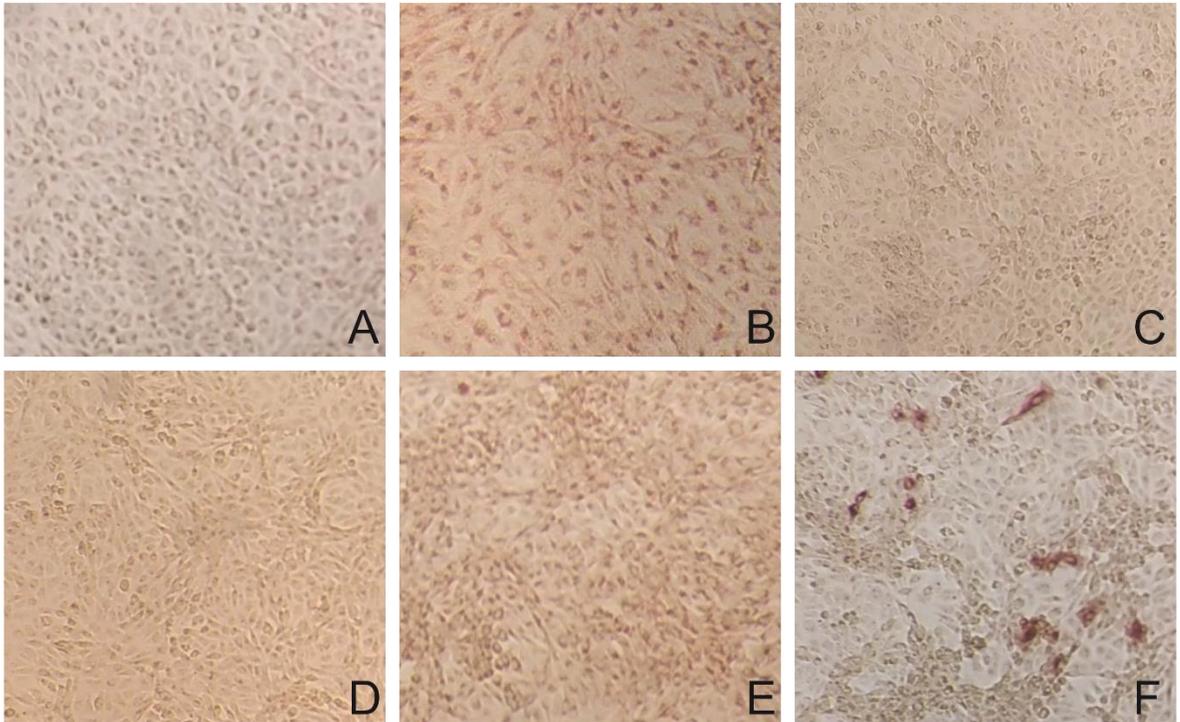
Figura 3. Mediana de FFU detectadas con MAb en concentraciones 2, 1, 0.5 y 0.3 $\mu\text{g/ml}$ en células Vero 76 infectadas con Virus ZIKV -pR en dilución 10^{-6}



Fuente: Base de datos.

El siguiente experimento permitió definir el tiempo de incubación o absorción viral necesario para observar correctamente cada célula infectada de manera individual, sin formación de cúmulos, para ello se realizó el experimento #3 (ver materiales y métodos), donde se observó luego de realizar el ensayo, en la misma dilución 10^{-3} que a 6 y 12 horas no había focos detectables, era similar al Mock, por otro lado, a las 24 horas se veían focos contables; por lo que se consideró como insuficiente al tiempo de 6 y 12 horas para realizar el ensayo luego de infección y como tiempo óptimo el tiempo de 24 horas. (Ver Figura 4)

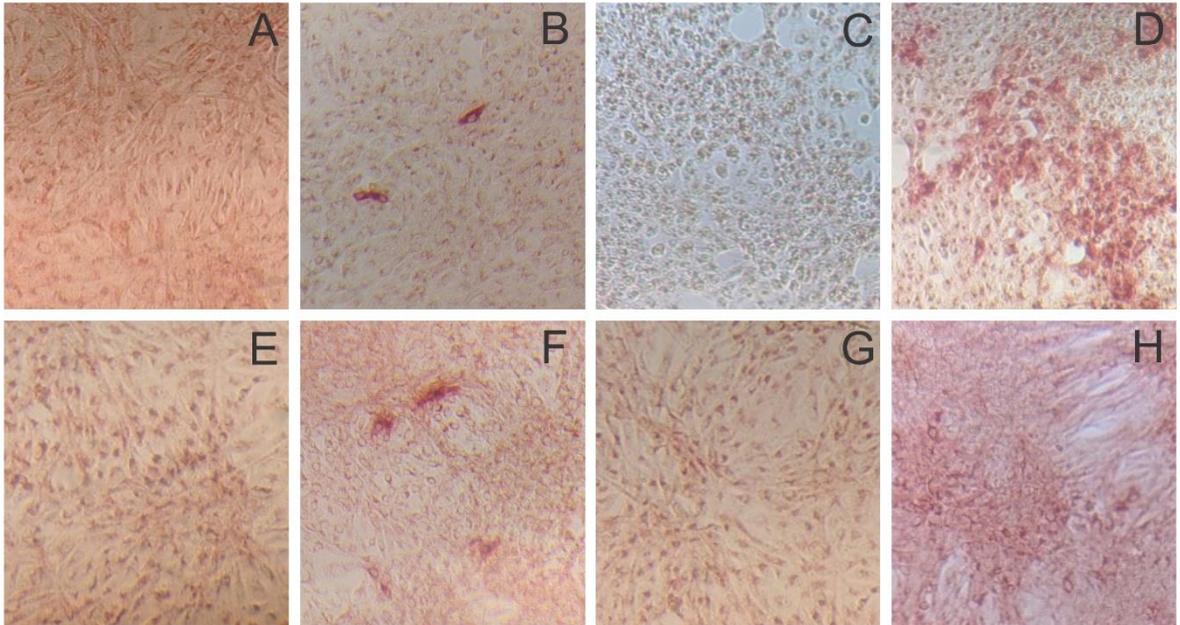
Figura 4. Comparación de diferentes tiempos de incubación viral (6, 12 y 24 h p.i.) con MAb 644 a 0.5µg/ml.



Aumento 400x, dilución 10^{-3} ZIKA-PR. A. Mock 6h p.i B. Mock 12h p.i C. Mock 24h p.i D. 6h p.i E. 12h p.i F. 24h p.i. Fuente: Base de datos.

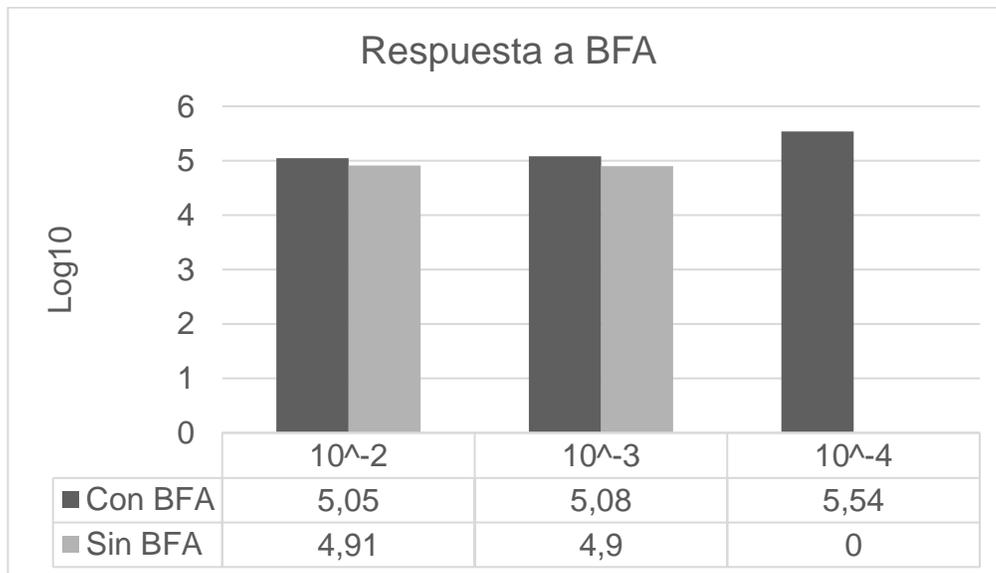
Para finalizar el desarrollo del protocolo y buscando mejorar la definición y contraste de los focos de células infectadas se utilizó la Brefeldin A, inhibidor de la secreción celular que realiza su efecto en el aparato de Golgi, evitando así el transporte de NS1 hacia el espacio extracelular (36). Para esto se realizó el experimento #4 (ver materiales y métodos), en donde se determinó que la BFA disminuye el ruido de fondo facilitando la identificación de los focos, pero no se notó un incremento en el número de FFU/ml detectadas en presencia o ausencia del respectivo inhibidor de la secreción celular. (Figura 5 y 6)

Figura 5. Respuesta al inhibidor de la secreción celular Brefeldin A 24 y 48 h p.i.



Aumento 400x dilución 10^{-2} ZIKA-PR, MAb644 a $0.5\mu\text{g/ml}$. A. Mock 24 p.i con BFA B. FFA con BFA 24h p.i C Mock 48h p.i. con BFA D. FFA con BFA 48 p.i E. Mock Sin BFA 24h p.i. F. FFA sin BFA 24h p.i G. Mock sin BFA 48h p.i. H. FFA sin BFA 48h p.i. Fuente: Base de datos.

Figura 6. Respuesta al inhibidor de la secreción celular Brefeldin A 24h p.i. en dilución 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} de ZIKA-PR



Fuente: Base de datos.

En resumen, el ensayo de formación de foco para identificar partículas virales infectantes de virus Zika, quedo de la siguiente manera: En monocapa de células Vero 76 a una confluencia del 70% en placa de 96 pozos se inocula el virus en diluciones de 10 veces seriadas con medio al 2% de FBS-RPMI a un volumen final de 0.1ml, a las 12h se retira el medio y se lava, se incuba con BFA a 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, se incuba el virus por un tiempo total de 24h, se fija con metanol absoluto a -70°C por 30min a temperatura ambiente, posteriormente los focos de ZIKV se marcaron con MAb 644 a 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón hecho en cabra acoplado a biotina en dilución 1:2000, ambos se incubaron por una 1h a temperatura ambiente y se lavaron luego de este tiempo. Los focos se tiñeron usando estreptavidina peroxidasa en dilución 1:1000, se incuba durante 30 min, se lava y se agrega AEC, según indicaciones del fabricante, se espera 20min y se detiene la reacción con agua destilada, posteriormente se cuentan en microscopio de lu

9. DISCUSIÓN

Los arbovirus a través de las últimas décadas han generado graves problemas de salud pública, tal es el caso del ZIKV, que debido a las malformaciones congénitas como la microcefalia causada en neonatos después de transmisión vertical madre-feto, o el síndrome de Guilliam Barré, fue declarada por la OMS como un problema de salud pública (19).

Por tal motivo se ha disparado la investigación acerca de dicho virus, sin embargo, aún no se conoce con exactitud su fisiopatología o como interactúa con otros arbovirus de su misma familia, como el Dengue (37). A lo largo de los años se han desarrollado múltiples ensayos para el estudio de los virus, entre estos se encuentra el FFA.

El desarrollo de este ensayo mostró una confluencia de monocapa óptima del 70% al momento de la infección, otros autores como Brien et al para FFA con WNV recomiendan una confluencia entre el 80-100% (35), sin embargo la mayoría de los artículos no refieren la confluencia de la monocapa, sino la densidad de la siembra, en nuestro caso se utilizaron placas de cultivo de 96 pozos, y se sembró a una densidad de 3.500 células por pozo, dejando incubar las células por 48h para que alcanzaran la confluencia de 70%.

Con respecto al tiempo de incubación viral, la literatura presenta una gran variación; en estudios realizados para ZIKV, se observan tiempos de incubación desde 30h hasta 72h (14,38,39), también se evidencia variación del tiempo óptimo de un flavivirus a otro, como el DENV que varía de 48h a 72h (11,34) o el WNV que varía de 18- 24h (11,35). En nuestro ensayo se encontró que el tiempo de incubación óptimo es de 24h, tiempos menores no mostraron focos detectables y en tiempos más prolongados se observó superposición de los focos.

Con respecto al anticuerpo monoclonal (MAb), el MAb 644 es superior para la identificación de las partículas de NS1 de ZIKV que el MAb 130, dado por el mayor grado de intensidad de color estimable por los investigadores, según Bosch et al el MAb 130 distingue las partículas de NS1 de ZIKV de manera específica, sin reactividad cruzada para dengue, ellos utilizaron dicho anticuerpo para ensayos de pruebas rápidas en conjunto con el MAb 110, y para la realización del ELISA indirecto(40), sin embargo no se menciona la utilización del MAb 644 en ningún artículo publicado, siendo este anticuerpo el que demostró el rendimiento óptimo; cabe destacar que en material no publicado por la misma autora se muestra un mejor rendimiento del MAb 644 con respecto al MAb 130. Los anticuerpos utilizados en este ensayo fueron donados por Irene Bosch del MIT (del inglés Massachusetts Institute of Technology).

La concentración del anticuerpo que mejor se adaptó al ensayo fue de 0,5 µg/ml, en la literatura como se mencionó anteriormente no hay evidencia de la realización de algún experimento con el MAb 644, sin embargo, en el ensayo realizado por Hirsch et al utilizaron una concentración de 0,3 µg/ml, además Quicke et al utilizaron una concentración de 1 µg/ml ambos de un MAb contra flavivirus 4G2 (14,38) y en otro realizado por Lazear et al utilizaron 0,5 µg/ml de MAb contra flavivirus E60 (39). La mayoría de los investigadores utiliza concentraciones similares a las de nuestro ensayo, sin embargo, utilizan anticuerpos que no son específicos para NS1 de ZIKV, por lo cual nuestro experimento tendría la capacidad de detectar solo ZIKV en caso de estar realizando incubación viral de ZIKV con DENV.

En vista de que el ensayo tuviera una cuantificación de los focos más certera y fácil para el investigador se utilizó BFA a 0.1 µg/ml, esto en concordancia con lo expuesto por Alcalá, Rosales y sus respectivos colaboradores, los cuales evidenciaron una disminución en la secreción de NS1 en células de mamífero previamente tratados con BFA(41,42), se esperaba que mejorara la intensidad del color al aumentar la concentración intracelular de NS1, pero no se evidenció una mejoría en el conteo de los focos.

10. CONCLUSIÓN

Después de múltiples experimentos se concluyó que la confluencia celular más adecuada para realizar la infección del ZIKV es del 70% y que el tiempo más adecuado de infección es de 24h, por otra parte, en el FFA el anticuerpo monoclonal murino contra NS1 de ZIKV MAb644 en una concentración de 0,5 µg/mL, es el anticuerpo que mejor contraste y definición por microscopía óptica convencional de las células infectadas, ofreció. La BFA disminuye el ruido de fondo facilitando la identificación de los focos, pero no se notó un incremento en el número de FFU detectadas en presencia o ausencia del respectivo inhibidor de la secreción celular. Se logro el desarrollo de un protocolo para cuantificar partículas infectantes de ZIKV usando células Vero-76. El ZIKV ahora puede estudiarse en nuestra región utilizando modelos de cultivo celular.

11. RECOMENDACIONES

Se recomienda el uso del ensayo de formación de foco como una alternativa a la medición de título viral que permite observar de manera cualitativa y cuantitativa la infección. Además, es versátil ya que podría utilizarse en diversos experimentos con otros virus. Por otra parte, el ensayo puede adaptarse para realizar pruebas de neutralización de anticuerpos y utilizarse como base de múltiples investigaciones donde es necesario medir el inóculo del virus. Sin embargo, se pueden probar e investigar nuevos reactivos para mejorar el rendimiento del ensayo.

Se recomienda a la comunidad académica el continuar con la investigación del virus del Zika en todos sus campos tanto clínicos como de posible diagnóstico, tratamiento y comprensión de su fisiopatología, debido a el impacto social y económico que ha dejado y sigue dejando en nuestra región, que se manifiesta en los cientos de niños nacidos con alteraciones como microcefalia, problemas de audición y visión(6).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Quereshi A. Flaviviruses. In: Zika Virus [Internet]. Elsevier; 2018 [cited 2019 May 7]. p. 47–61. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128123652000044?via%3Dihub>
2. Wang A, Thurmond S, Islas L, Hui K, Hai R. Zika virus genome biology and molecular pathogenesis. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2017 Mar 8;6(1):1–6. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1038/emi.2016.141>
3. Simmonds P, Becher P, Bukh J, Gould EA, Meyers G, Monath T, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *J Gen Virol* [Internet]. 2017 Jan 1 [cited 2019 Jul 23];98(1):2–3. Available from: <http://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.000672>
4. Tsunoda I, Omura S, Sato F, Kusunoki S, Fujita M, Park A-M, et al. Neuropathogenesis of Zika Virus Infection: Potential Roles of Antibody-Mediated Pathology. *Acta Medica Kinki Univ* [Internet]. 2016;41(2):37–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28428682>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5395253>
5. Sam JI-C. Chikungunya and Zika Virus in Asia. In: Chikungunya and Zika Viruses. Elsevier; 2018. p. 135–92.
6. Vasconcelos PFC, Powers AM, Hills S. The Emergence of Chikungunya and Zika Viruses in the Americas. In: Chikungunya and Zika Viruses [Internet]. Elsevier; 2018. p. 215–35. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128118658000076>
7. Song H, Qi J, Haywood J, Shi Y, Gao GF. Zika virus NS1 structure reveals diversity of electrostatic surfaces among flaviviruses. *Nat Struct Mol Biol*. 2016 May 1;23(5):456–8.
8. Osada N, Kohara A, Yamaji T, Hirayama N, Kasai F, Sekizuka T, et al. The Genome Landscape of the African Green Monkey Kidney-Derived Vero Cell Line. *DNA Res* [Internet]. 2014 Mar 8;21(6):673–83. Available from: <https://academic.oup.com/dnaresearch/article-lookup/doi/10.1093/dnares/dsu029>
9. Ammerman NC, Beier-Sexton M, Azad AF. Growth and Maintenance of Vero Cell Lines. In: Coico R, Kowalik T, Quarles J, Stevenson B, Taylor R, editors.

Current Protocols in Microbiology [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2008. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780471729259.mca04es11>

10. Ossa Jorge Silvio U. Principios de Virología. Cuarta edición. [Internet]. Cuarta. Itagui-Colombia: Artes y Letras Ltda.; 208AD. Available from: <https://aprendeenlinea.udea.edu.co/revistas/index.php/biogenesis/issue/view/2511/showToc>
11. Payne AF, Binduga-Gajewska I, Kauffman EB, Kramer LD. Quantitation of flaviviruses by fluorescent focus assay. *J Virol Methods* [Internet]. 2006 Jun 10;134(1–2):183–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166093406000267>
12. Contreras D, Arumugaswami V. Zika Virus Infectious Cell Culture System and the *In Vitro* Prophylactic Effect of Interferons. *J Vis Exp* [Internet]. 2016 Aug 23;(114). Available from: <http://www.jove.com/video/54767/zika-virus-infectious-cell-culture-system-vitro-prophylactic-effect>
13. Coelho SVA, Neris RLS, Papa MP, Schnellrath LC, Meuren LM, Tschoeke DA, et al. Development of standard methods for Zika virus propagation, titration, and purification. *J Virol Methods* [Internet]. 2017;246(February):65–74. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.04.011>
14. Hirsch AJ, Smith JL, Haese NN, Broeckel RM, Parkins CJ, Kreklywich C, et al. Zika Virus infection of rhesus macaques leads to viral persistence in multiple tissues. Geisbert T, editor. *PLOS Pathog* [Internet]. 2017 Dec 10;13(3):e1006219. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1006219>
15. Nikolay A, Castilho LR, Reichl U, Genzel Y. Propagation of Brazilian Zika virus strains in static and suspension cultures using Vero and BHK cells. *Vaccine* [Internet]. 2018;36(22):3140–5. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.03.018>
16. Himmelsbach K, Hildt E. Identification of various cell culture models for the study of Zika virus. *World J Virol*. 2018;7(1):10–20.
17. Rodríguez-Morales AJ, Willamil-Gómez WE. El reto de Zika en Colombia y América Latina: Una urgencia sanitaria internacional. *Infectio* [Internet]. 2016 Apr 1 [cited 2019 May 7];20(2):59–61. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0123939216000151>
18. Skalka AM, Flint J, Rall GF, Racaniello VR. Principles of Virology, Volume I: Molecular Biology [Internet]. American Society of Microbiology; 2015.

Available from:
<http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555818951>

19. Yun SI, Lee YM. Zika virus: An emerging flavivirus. *J Microbiol.* 2017;55(3):204–19.
20. Cuevas EL. Preliminary Report of Microcephaly Potentially Associated with Zika Virus Infection During Pregnancy — Colombia, January–November 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2016 Dec 10;65. Available from: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6549e1.htm>
21. Instituto Nacional de Salud. Informe de evento: Enfermedad por virus Zika [Internet]. 2019. Available from: <https://www.ins.gov.co/buscador-eventos/Informesdeevento/ENFERMEDAD POR ZIKA PE IV 2019.pdf>
22. Miner JJ, Cao B, Govero J, Smith AM, Fernandez E, Cabrera OH, et al. Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. *Cell* [Internet]. 2016 May;165(5):1081–91. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.008>
23. Quicke KM, Bowen JR, Johnson EL, McDonald CE, Ma H, O’Neal JT, et al. Zika Virus Infects Human Placental Macrophages. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2016;20(1):83–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.05.015>
24. Hierholzer J, Killington R. Virus Isolation and Quantitation. In: *Virology methods manual*. Virol methods Man. 1996;374.
25. Instituto Nacional De Salud. Informe de evento Dengue [Internet]. [cited 2019 Jul 5]. Available from: www.ins.gov.co
26. Mustafa MS, Rasotgi V, Jain S, Gupta V. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Med J Armed Forces India* [Internet]. 2015 Mar 8;71(1):67–70. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0377123714001725>
27. Plourde AR, Bloch EM. A Literature Review of Zika Virus. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2016 [cited 2019 Jul 5];22(7):1185–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27070380>
28. Moreira J, Peixoto TM, Siqueira AM, Lamas CC. Sexually acquired Zika virus: a systematic review. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2019 Jul 5];23(5):296–305. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X16306590>

29. Powers AM. The Origins of Chikungunya and Zika Viruses—History of the Discoveries. In: Chikungunya and Zika Viruses [Internet]. Elsevier; 2018. p. 1–13. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128118658000015>
30. Diallo D, Dia I, Diagne CT, Gaye A, Diallo M. Emergences of Chikungunya and Zika in Africa. In: Chikungunya and Zika Viruses. Elsevier; 2018. p. 87–133.
31. Cultures EC of AC. ECACC General Cell Collection: Vero [Internet]. Public Health England. 2016. Available from: https://www.phe-culturecollections.org.uk/products/celllines/generalcell/detail.jsp?refId=84113001&collection=ecacc_gc
32. Cann AJ. Introduction, Particles and Genomes. Principles of Molecular Virology. 2012. 1–99 p.
33. Cann ACN-Q. C 2012. Principles of molecular virology. 5th ed. Amsterdam : Waltham, MA: Elsevier ; Academic Press; 2012. 303 p.
34. Ludert JE, Mosso C, Ceballos-Olvera I, del Angel RM. Use of a commercial enzyme immunoassay to monitor dengue virus replication in cultured cells. Virol J [Internet]. 2008;5(1):51. Available from: <http://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-422X-5-51>
35. Brien JD, Lazear HM, Diamond MS. Propagation, Quantification, Detection, and Storage of West Nile Virus: Propagation, Quantification, Detection, and Storage of West Nile Virus. In: Coico R, McBride A, Quarles JM, Stevenson B, Taylor RK, editors. Current Protocols in Microbiology [Internet]. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2013. p. 15D.3.1-15D.3.18. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/9780471729259.mc15d03s31>
36. Prussin C, Metcalfe DD. Detection of intracytoplasmic cytokine using flow cytometry and directly conjugated anti-cytokine antibodies. J Immunol Methods. 1995 Dec 15;188(1):117–28.
37. Langerak T, Mumtaz N, Tolk VI, van Gorp ECM, Martina BE, Rockx B, et al. The possible role of cross-reactive dengue virus antibodies in Zika virus pathogenesis. PLoS Pathog. 2019;15(4):e1007640.
38. Quicke KM, Bowen JR, Johnson EL, McDonald CE, Ma H, O’Neal JT, et al. Zika Virus Infects Human Placental Macrophages. Cell Host Microbe [Internet]. 2016 Dec 10;20(1):83–90. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1931312816302116>

39. Lazear HM, Govero J, Smith AM, Platt DJ, Fernandez E, Miner JJ, et al. A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2016;19(5):720–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.03.010>
40. Bosch I, de Puig H, Hiley M, Carré-Camps M, Perdomo-Celis F, Narváez CF, et al. Rapid antigen tests for dengue virus serotypes and Zika virus in patient serum. *Sci Transl Med* [Internet]. 2017 Sep 27;9(409):eaan1589. Available from: <http://stm.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/scitranslmed.aan1589>
41. Alcalá AC, Hernández-Bravo R, Medina F, Coll DS, Zambrano JL, Del Angel RM, et al. The dengue virus non-structural protein 1 (NS1) is secreted from infected mosquito cells via a non-classical caveolin-1- dependent pathway. *J Gen Virol*. 2017;98(8):2088–99.
42. Rosales Ramirez R, Ludert JE. The Dengue Virus Nonstructural Protein 1 (NS1) Is Secreted from Mosquito Cells in Association with the Intracellular Cholesterol Transporter Chaperone Caveolin Complex. *J Virol*. 2018;93(4).

ANEXOS

Anexo A: Mapa del experimento #1: FFA comparando contraste y definición de la tinción de las células infectadas con Virus ZIKV -PR usando MAb 644 vs 130 con [MAb] de 0.5 µg/ml, 1 µg/ml y 2 µg/ml e incubación de la infección por 48h

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Mock	A	100%	100%	100%	98%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	5%
1/10 ⁸	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1/10 ⁷	C	-	-	70%	100%	100%	100%	-	-	-	-	-	-
1/10 ⁶	D	-	90%	70%	-	-	-	90%	90%	-	-	-	-
1/10 ⁵	E	-	-	90%	-	-	-	100%	100%	100%	-	-	-
1/10 ⁵	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1/10 ⁴	G	-	80%	100%	-	100%	90%	100%	100%	100%	-	100%	-
1/10 ³	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

X=CÚMULOS -=Descartado

mAb 130 0.5 µg/ml (A1, A2)

mAb 130 1 µg/ml (A3, A4, C3, C4, D2, D3, G2, G3)

mAb 130 2 µg/ml (A5, A6, A11, E3, E7, G5, G6)

mAb 644 0.5 µg/ml (A7, A8)

mAb 644 1 µg/ml (A9, A10, C5, C6, D7, D8, G7, G8)

mAb 644 2 µg/ml (A11, E8, E9, G9)

Anexo B: Mapa experimento #2: FFA. con MAb 644 en concentraciones 2,1,0.5 y 0.3 µg/ml en células Vero 76 infectadas con Virus ZIKV-PR y tiempo de incubación de la infección viral de 48h

[Ab] 644	MOCK	1/10 ³	1/10 ⁴	1/10 ⁴	1/10 ⁵	1/10 ⁵	1/10 ⁶	1/10 ⁶	1/10 ⁷	1/10 ⁷	1/10 ⁸	1/10 ⁸
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A. 2							8	3	1			
B. 2							9	4		1		
C. 1							5	4				
D. 1							4 (15)	11				
E. 0.5							11	16				
F. 0.5							6	13				
G. 0.3							15	16				
H. 0.3							4	7				

Anexo C: Mapa experimento #3: FFA con MAb 644 en concentración 0.5µg/ml infectadas con Virus ZIKV -PR con tiempo de incubación de la infección viral 6, 12 y 24 h

M 644 a 0,5 ng/ml	6h				12h				24h			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A. Mock												
B. 10 ⁻³	1	3	2	1	7	7	4	4	X	x	x	x
C. 10 ⁻⁴					0	1	0	1	57	48	62	48
D. 10 ⁻⁵									7	5	4	8
E. 10 ⁻⁶									1	0	0	1
F. 10 ⁻⁶												
G. 10 ⁻⁷												
H. Mock												

Anexo D: Mapa experimento #4: Respuesta al inhibidor de la secreción celular Brefeldin A; 48, 24, 12 y 6h de incubación de infección viral con Virus ZIKV -PR con MAb644 a 0.5µg/ml

[]		Mock		10 ⁻²		10 ⁻³		10 ⁻⁴		10 ⁻⁵		10 ⁻⁶		
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
SIN BFA	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6h
	B	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12h
	C	0	0	110	116	11	12	4	3	1	0	0	0	24h
	D	0	0	X	X	X	X	X	X	X	0	0	0	48h
CON BFA	E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6h
	F	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12h
	G	0	0	82	81	11	5	0	1	0	0	0	0	24h
	H	0	0	X	X	X	X	X	X	X	0	0	0	48h

X=CÚMULOS

Anexo E: Instrumento



PROTOCOLO DE CUANTIFICACIÓN DE TÍTULOS VIRALES DE ZIKA MEDIANTE ENSAYO DE FORMACIÓN DE FOCOS



El objetivo de este proyecto es desarrollar un protocolo para la cuantificación de títulos virales de Zika por medio de ensayo de formación de foco en el laboratorio de investigación en infección e inmunidad de la Facultad de Salud de la Universidad Surcolombiana de Neiva.

Experimento N° _____ **Fecha:** _____

Variables:

Tiempo de incubación de infección: _____ Horas

Clon de anticuerpo primario (MAb): MAb 130 _____ MAb 644 _____

Concentración de anticuerpo monoclonal primario _____ $\mu\text{g/ml}$

Confluencia de la monocapa: _____ %

Título de stock de ZIKV: _____ FFU/mL

Mapa: (llenar según las condiciones anteriores a conveniencia del investigador)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A.												
B.												
C.												
D.												
E.												
F.												
G.												
H.												

Anexo F: Modelo administrativo

CRONOGRAMA DE LA INVESTIGACIÓN

ACTIVIDADES	2018			2019												2020			
	O c t	N o v	D i c	F e b	M a r	M a r	A b r	M a y	J u n	J u l	A g o	S e p	O c t	N o v	D i c	F e b	M a r	A b r	
Elaboración del proyecto																			
Experimentos																			
Recolección de información																			
Análisis de la información																			
Discusión de resultados																			
Elaboración de informe final																			

PRESUPUESTO

Global de la propuesta por fuentes de financiación (en miles de \$)

RUBROS	TOTAL
PERSONAL	19.440
EQUIPOS	660
MATERIALES	50.790
TOTAL	70.890

Descripción de los gastos de personal (en miles de \$)

INVESTIGADOR/ EXPERTO / AUXILIAR	FORMACION ACADEMICA	FUNCION DENTRO DEL PROYECTO	HORAS DE DEDICACIÓN SEMANAL	RECURSOS
Sara Bolivar Marín	Bachiller	Investigador principal	8	600
José Ricardo Pucciny Cortés	Bachiller	Investigador principal	8	600
José Santiago Cortés Guzmán	MD	Investigador principal	8	7.680
Carlos F Narváez	PhD	Asesor Científico	2	5.280
Dolly Castro Betancourth	Magister	Asesora epidemiológica	2	5.280
TOTAL				19.440

Descripción y cuantificación de los equipos de uso propios (en miles de \$)

EQUIPO	VALOR
Espectrofotómetro	100
Ultracongelador	100
Cámara de flujo	100
Incubadora	100
Balanza	40
Computador portátil	20
Baño de agua	100
Microscopio de luz invertido	100
Total	660

Materiales, suministros (en miles de \$)

Materiales	JUSTIFICACIÓN	VALOR
Pipeta monocanales de 1000, 200, 10 uL y multicanales de 50 y 200 uL (BRAND)	Para realizar el experimento	160
Buffer salino fosfato (PBS) estéril (Gibco- Lot 1806048)	Para realizar el experimento	70
Tween 20 10% (ACROS, Cat. 23336-2500)	Para realizar el experimento	50
ZIKV cepa Puerto Rico	Para realizar el experimento	15.000
Células Vero 76 (ATCC® CRL-1587™)	Para realizar el experimento	10.000
RPMI 1640 1x + L-glutamina (Gibco) estéril	Para realizar el experimento	250
FBS estéril (Gibco)	Para realizar el experimento	1.000
DPBS (Dulbecco's Phosphate-buffered saline) (Gibco)	Para realizar el experimento	150
Tripsina + solución de EDTA (Gibco)	Para realizar el experimento	500
BD GolgiPlug (BD)	Para realizar el experimento	6.000
Azul de metileno	Para realizar el experimento	200
Metanol absoluto	Para realizar el experimento	120
3-amino 9-etilcarbazol (AEC kit, Vector)	Para realizar el experimento	400
Frasco de cultivo de 75 cm ² (Falcon)	Para realizar el experimento	500
Pipeteador automático (Brand)	Para realizar el experimento	150
Pen Step Glutamine 100X estéril	Para realizar el experimento	800
Proteína NS1 recombinante de ZIKV	Para realizar el experimento	3.000

Anticuerpo primario Anti-NS1 hecho en ratón	Para realizar el experimento	6.000
Anticuerpo secundario Anti-IgG de ratón hecho en cabra ligado a biotina	Para realizar el experimento	6.000
Estreptavidina-Peroxidasa (KPL, Cat)	Para realizar el experimento	100
Placa de cultivo de 96 pozos de alta afinidad (NUNC, Cat)	Para realizar el experimento	200
Tubos Falcon de poliestireno 15 ml (BD, Cat: 352096)	Para realizar el experimento	80
Tubos eppendorf 1.5 ml	Para realizar el experimento	50
Recipiente para solución de lavado	Para realizar el experimento	10
Total		50.790

Nota: El laboratorio cuenta con todos los reactivos del listado.