

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL SUERO DE INDIVIDUOS VACUNADOS
CONTRA LA FIEBRE AMARILLA EN LA INFECTIVIDAD DEL VIRUS DENGUE**

HENRY BAUTISTA AMOROCHO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA
2007**

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL SUERO DE INDIVIDUOS VACUNADOS
CONTRA LA FIEBRE AMARILLA EN LA INFECTIVIDAD DEL VIRUS DENGUE**

HENRY BAUTISTA AMOROCHO

**Tesis de Grado como requisito para optar al título de
Magíster en Ciencias Básicas Biomédicas**

Directora: RAQUEL E. OCAZONEZ Ph.D.

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA
2007**

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer sinceramente a la doctora Raquel Ocazonez, por su apoyo y sus consejos a lo largo de estos dos años que contribuyeron en gran parte con mi formación. Agradezco mucho su entusiasmo, dedicación y compromiso que siempre mostró durante la realización de este trabajo el cual hoy he culminado.

Así mismo, a Fabián Cortés y Sergio Gómez quienes asesoraron el diseño y la realización de varios experimentos y a Ángela Torres, quien siempre estuvo atenta a colaborar incondicionalmente en el laboratorio.

Al Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CINTROP) de la Universidad Industrial de Santander mi alma mater.

Finalmente, al Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología “Francisco José de Caldas” (COLCIENCIAS) por el apoyo financiero (proyecto UIS 8641; COLCIENCIAS 1102-04-16376).

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	11
1. OBJETIVO	13
2. MARCO TEÓRICO	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS	17
3.1 CÉLULAS	17
3.2 VIRUS	17
3.3 SUEROS	17
3.4 CUANTIFICACIÓN DE VIRUS	18
3.5 PRUEBA DE NEUTRALIZACIÓN POR REDUCCIÓN DE PLACAS	18
3.6 INFECCIÓN DE CÉLULAS K562 POR VDEN-2	19
3.7 INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA (IFD)	19
3.8 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA POR TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT-PCR)	20
3.9 ANÁLISIS DE DATOS	20
3.10 CONSIDERACIONES ÉTICAS	20
4. RESULTADOS	21
4.1 CUANTIFICACIÓN DEL VIRUS	21
4.2 NEUTRALIZACIÓN DE VDEN-2 POR SUERO DE VACUNADOS (YF 17DD)	22
4.3 IDA DE VDEN-2 POR SUERO DE VACUNADOS (YF 17DD)	25
5. DISCUSIÓN	28

5.1 ANTICUERPOS CONTRA LA FIEBRE AMARILLA E INFECTIVIDAD DEL VDEN-2	28
5.2 PLAQUEO DE VIRUS DENGUE	30
6. CONCLUSIONES	32
BIBLIOGRAFÍA	33

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Información de los donantes de sueros incluidos en el estudio.	18
Tabla 2. Título de VDEN-2 de acuerdo al protocolo de plaqueo.	22
Tabla 3. Anticuerpos neutralizantes contra el virus de la fiebre amarilla en los sueros de vacunados incluidos en el estudio.	23
Tabla 4. Reducción de placas del virus dengue serotipo 2 por suero de vacunados contra la fiebre amarilla comparados con inmunes a dengue y no inmunes.	24

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Tamaño y agrupación de placas de virus dengue serotipos 2 y 3 de acuerdo al protocolo del plaqueo.	21
Figura 2. Correlación entre el título de anticuerpos neutralizantes contra la fiebre amarilla (anti YF-17DD) y reducción de placas de infección del virus dengue serotipo 2.	25
Figura 3. Inmunofluorescencia con anticuerpo anti dengue de células K562 infectadas con virus dengue serotipo 2 preincubado con suero humano.	26
Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa mostrando el resultado de la RT-PCR para amplificar ARN del virus dengue serotipo 2.	27

TÍTULO: EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL SUERO DE INDIVIDUOS VACUNADOS CONTRA LA FIEBRE AMARILLA EN LA INFECTIVIDAD DEL VIRUS DENGUE *

AUTORES: BAUTISTA AMOROCHO, Henry**; OCAZONEZ JIMÉNEZ, Raquel Elvira**

PALABRAS CLAVES: anticuerpos, fiebre amarilla, dengue, neutralización.

RESUMEN

Anticuerpos de reactividad cruzada pueden contribuir a la protección o severidad de enfermedad causada por *flavivirus*. El objetivo de este estudio fue aportar al conocimiento sobre neutralización e incremento de la infectividad del virus dengue (VDEN) por anticuerpos contra la fiebre amarilla (FA).

El VDEN serotipo 2 se incubó 2 h a 37°C con sueros de vacunado (n = 36) o de no-inmunes (n = 17) y la neutralización se evaluó por reducción de placas virales en células BHK-21. En otros ensayos, el virus se incubó 14 h a 4°C con los mismos sueros y con suero de inmune a dengue y luego se adicionó a células mieloides humanas K562 (MOI = 0.7) por 48 h a 37° C. La presencia del virus se determinó buscando virus, proteína y ARN viral por plaqueo, inmunofluorescencia (IF) y RT-PCR respectivamente.

Sueros de vacunados contra la FA redujeron 12 - 56% de placas de infección del VDEN independiente de la dilución (1:2 o 1:10) y no hubo diferencia significativa con sueros de no inmunes (P = 0.65, Mann-Whitney U). No se detectó infección de células K-562 por VDEN-2 preincubado con suero de vacunados o no-inmunes (UFP/mL = 0; IF y RT-PCR negativos) pero si con suero de inmune a dengue. Estos resultados confirman que anticuerpos contra la FA no neutralizan ni contribuyen a la infección del VDEN-2 sugiriendo ausencia de protección cruzada o severidad en casos de dengue asociada a vacunación previa con el virus 17 DD.

* Tesis de grado

** Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas

** Facultad de Salud, Escuela de Medicina, Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas, Director de tesis

TITLE: EVALUATION OF THE EFFECT ON DENGUE VIRUS INFECTIVITY BY SERA FROM VACCINATED AGAINST YELLOW FEVER*

AUTHORS: BAUTISTA AMOROCHO, Henry**; OCAZIONEZ JIMÉNEZ, Raquel Elvira***

KEY WORDS: antibodies, yellow fever, dengue, neutralization, ADE

ABSTRACT

Cross-reactivity antibodies can contribute to disease protection or severity caused by *flavivirus*. The objective of this study was to gain insight into the neutralization and antibody-dependent enhancement (ADE) of dengue virus (DENV) by yellow fever (YF) antibodies.

Sera (n = 36) from YF vaccinated (17DD) and individuals without *flavivirus* immunity (n = 17) were incubated 2 h at 37° C with DENV serotype 2. Neutralization was evaluated by viral plaque reduction in BHK-21 cells. In others assays, the virus was incubated 14 h at 4° C with the same sera and dengue immune serum before adsorption on human myeloid cells (K562) and after 48 h the cells were harvested for virus detection by plaque, immunofluorescence (IF) and RT-PCR.

Sera from YF vaccinated reduced DENV plaque infection between 12 – 56% independent to dilution (1:2 or 1:10), and there is not significant difference when compared with non-immune sera (P = 0.65, Mann-Whitney U). Viral infection was not detected in K562 cells after adsorption of DEN-2 pre-opsonized with YF-vaccinated or non-immune sera (PFU/mL=0, IF and RT-PCR negative), in contrast with dengue immune serum. This resulted confirmed that YF antibodies did not neutralize or cause antibody-dependent infection of DENV-2 suggesting absence of cross protection or severity in dengue cases associated with previous vaccination with 17 DD virus.

* Master thesis.

** Medical Basic Sciences Postgraduate Programme.

*** Faculty of Health, Medicine School, Medical Basic Sciences Postgraduate Programme, Director thesis.

INTRODUCCIÓN

El género *flavivirus*, familia *Flaviviridae*, incluye más de 70 virus transmitidos por mosquitos o garrapatas entre estos varios patógenos para humanos como el virus del dengue (VDEN), fiebre amarilla (VFA), encefalitis Japonesa (VEJ), Oeste del Nilo (VON), encefalitis de San Luis (VESL), encefalitis del Valle de Murray (VEVM) y encefalitis transmitida por garrapata (VETG) (Heinz *et al.* 2000). Existe vacuna contra la fiebre amarilla (FA), encefalitis Japonesa y transmitida por garrapata. La vacuna contra la FA es un virus vivo atenuado por pases seriados del cual existen dos semillas conocidas como YF-17D y YF-17DD (Pugachev *et al.* 2005; Barrett 1997).

Los *flavivirus* son virus envueltos con una sola cadena de ARN de polaridad positiva que codifica para 3 proteínas estructurales (C, prM y E) y 7 no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) (Linderbach & Rice 2001). La glicoproteína E es el principal componente de la envoltura viral y posee determinantes antigénicos que inducen anticuerpos con capacidad de neutralizar el virus (Roehrig *et al.* 1998; Zhang *et al.* 1989; Kreil *et al.* 1998; Brandriss *et al.* 1986). Se han descrito otros determinantes en las proteínas prM y NS1 inductores de anticuerpos que contribuyen a la defensa contra el virus (Kaufman *et al.* 1989; Schlesinger *et al.* 1987). Varios de esos sitios antigénicos son compartidos entre miembros del género resultando en reactividad cruzada de los anticuerpos que se detecta en la mayoría de las pruebas serológicas utilizadas para diagnóstico (Johnson *et al.* 2005; Yamada *et al.* 2003; Martin *et al.* 2002).

Algunas evidencias sugieren que los individuos con inmunidad previa a un *flavivirus* podrían ser protegidos de la infección por otro debido a reactividad cruzada de anticuerpos y células T. Por ejemplo, encefalitis o enfermedad severa por el VON no se observa en pacientes que han sido previamente vacunados contra el VESL (Tesh *et al.* 2002) y la FA ictero-hemorrágica es infrecuente en áreas donde circulan varios virus del género (Vasconcelos 2003). Se ha encontrado que suero de vacunados contra el VEJ puede inhibir la infección celular por el VON (Takasaki *et al.*, 2003) y ratones inmunizados con una vacuna recombinante contra el VEVM sobrevivieron a la infección con una cepa silvestre de VEJ (Lobigs *et al.* 2003). La inmunidad previa a *flavivirus* puede también tener efecto contrario a la protección, es decir, favorecer la infección celular del virus por un mecanismo conocido como incremento dependiente de anticuerpo (IDA) (Morens 1994). El IDA se ha asociado con muerte temprana en animales con inmunidad previa a un *flavivirus* que se infectan con VFA, VEJ y *Alphavirus* como el virus de la encefalitis equina venezolana otro miembro de la familia *Flaviviridae* (Gould *et al.* 1989; Gould *et al.* 1987; Barrett & Gould 1986; Webb *et al.* 1968; Berge *et al.* 1961).

El VDEN circula en numerosos países tropicales causando epidemias frecuentes. Existen 4 serotipos (VDEN-1 – 4) y la infección con cualquiera puede manifestarse clínicamente desde una fiebre indiferenciada autolimitante conocida como Dengue Clásico (DC) hasta formas más severas como Dengue Hemorrágico (DH) y el Síndrome de Choque por Dengue (SCD) que puede llevar a la muerte en pacientes sin tratamiento médico oportuno (Gubler 1998). Varios estudios han confirmado que el SCD es hasta 15 veces más frecuente en individuos que se infectan por segunda vez con serotipos diferentes del virus (Thein *et al.* 1997; Sangkawibha *et al.* 1984; Russell *et al.* 1968). Numerosas evidencias experimentales, clínicas y epidemiológicas han demostrado que el IDA es el factor más asociado a la severidad de casos de dengue por infección secundaria (Endy *et al.* 2004; Guzman *et al.* 2002; Kliks *et al.* 1989; Halstead *et al.* 1978; Halstead *et al.* 1970; Nimmannitya *et al.* 1969). Es aceptado que durante la segunda infección los anticuerpos IgG contra el serotipo de la primera se unen al virus formando complejos inmunes que son captados por los macrófagos a través del receptor Fc γ . Como consecuencia, hay mayor infección celular e incremento de la viremia y esto conduce a mayor activación inmune con niveles elevados de sustancias vasoactivas y citoquinas pro inflamatorias resultando en incremento notorio de las anomalías vasculares y hematológicas propias del dengue (Halstead 1988).

La influencia de la inmunidad previa a otros *flavivirus* sobre el curso de la infección por el VDEN ha sido poco investigada y los resultados son contradictorios. Se ha documentado que en individuos previamente vacunados contra la FA la respuesta a una cepa atenuada del VDEN fue de mayor magnitud en términos de título y duración de los anticuerpos comparada con no vacunados (Bancroft *et al.* 1984). Al contrario, el suero de vacunados contra la FA incrementó la replicación del VDEN-2 en macrófagos humanos independiente del título de anticuerpos (Eckels *et al.* 1985). No existe información documentada de estudios clínicos o epidemiológicos sobre la asociación entre infección o vacunación previa con otros *flavivirus* y severidad del dengue.

En Colombia, el dengue y la FA son las enfermedades transmitidas por mosquitos de las que más casos se registran. Entre 1995 - 2005 se reportaron a la Organización Panamericana de la Salud 431.317 casos de dengue de los cuales 41.571 fueron severos y 318 fatales (PAHO 2005). En el 2003 ocurrió el último brote de FA con 104 casos y 47 muertes (OPS 2004). En los departamentos con mayor endemia de dengue (Norte de Santander, Santander, Antioquia, Atlántico, entre otros) existen focos selváticos de FA y esto ha conducido a la inmunización con el virus YF-17DD de la mayoría de los pobladores. Existen en el país 19'096,694 individuos vacunados y en Santander la cobertura supera el 80% (SIVIGILA 2006), se desconoce si esta condición puede fortalecer la respuesta inmune de defensa al dengue o contribuir a una mayor infección viral debido por IDA. Lo segundo presume riesgo mayor de la forma hemorrágica de la enfermedad.

1. OBJETIVO

Aportar al conocimiento sobre neutralización e incremento de la infectividad del virus dengue (VDEN) por anticuerpos contra el VFA. Específicamente, conocer la magnitud con la que anticuerpos séricos de vacunados contra la FA neutralizan o favorecen la infección celular por el virus.

2. MARCO TEÓRICO

Se sabe que por lo menos 50% de los *flavivirus* conocidos causan enfermedad en humanos. En los últimos años se ha observado incremento de casos principalmente por la introducción de nuevas cepas virales y emergencia de las existentes en regiones donde la presencia del hospedero y el vector contribuyen al inicio de epidemias (Bourgeade & Marchou 2003). En América, durante los años 90 ocurrieron en promedio 400 mil casos anuales de dengue pero solo en el 2002 se reportaron 1'003.961 de los cuales 12.920 fueron severos con 249 muertes (Guzman & Kouri 2003). La Organización Mundial de la Salud estima que en el mundo ocurren 200 mil casos de FA por año con 30 mil muertes, de los cuales 178 son en países de América del Sur principalmente Perú (Barnett 2007; Monath 2001). El VON llegó a Nueva York en el año 1999 y desde entonces ha sido responsable de 18.700 casos incluyendo 7.874 de enfermedad neuroinvasiva (Gould & Fikrig. 2004). En Colombia el dengue sigue siendo una causa importante de morbi - mortalidad causando por año en promedio 39.210 casos de DC y 4.157 de DH en la última década (PAHO 2005). Por otra parte, en el 2003 fueron notificados al sistema de vigilancia 104 casos de FA como consecuencia de un brote epidémico de origen selvático de los cuales 48% murieron (OPS 2004).

Los *flavivirus* están agrupados en 7 complejos teniendo en cuenta el vector y la relación antigénica identificada por reactividad cruzada en pruebas de inhibición de la hemaglutinación y neutralización (Calisher *et al.* 1989). La proteína E (gpE) es el antígeno que induce la mayor respuesta de anticuerpos, es la más conservada de todas las proteínas y se encuentra glicosilada en la mayoría de los virus de la familia. Adicionalmente, es esencial para la replicación del virus porque se liga al receptor de reconocimiento y participa en la fusión de la envoltura viral con la membrana celular. Estas funciones se relacionan directamente con el rango del hospedero, tropismo tisular y virulencia del virus (Allison *et al.* 2001). La gpE presenta un extenso dominio N-terminal anclado en la membrana por un fragmento hidrofóbico C-terminal y doce residuos de cisteína que forman seis puentes de disulfuro intramoleculares en su estructura dándole plegamiento espacial. Forma dímeros antiparalelos de aproximadamente 90 copias por virión y presenta tres dominios: DI es central en hoja plegada organizado en tres segmentos discontinuos, DII de dimerización elongada formado por dos segmentos discontinuos donde se encuentra el péptido de fusión y DIII de tipo inmunoglobulina unido al dominio central por un segmento de 15 aminoácidos portando la secuencia que se cree interactúa con el receptor celular. Los DI y III contienen epítopes específicos de tipo y subcomplejo, mientras que el DII contiene los que inducen anticuerpos de reacción cruzada entre grupos y subgrupos dentro de complejos (Modis *et al.* 2003; Allison *et al.* 2001; Roehrig *et al.* 1998; Rey *et al.* 1995; Mandl *et al.* 1989).

La protección contra la infección por un *flavivirus* está dada por la inmunidad innata, anticuerpos y respuesta de célula T (Kaufman *et al.* 1987). En individuos infectados se detectan anticuerpos IgM e IgG fijadores de complemento, hemaglutinantes y en menor proporción neutralizantes. Los últimos están dirigidos principalmente contra epítopes de la gpE donde se ligan a la secuencia que interactúa con el receptor celular e inducen cambios conformacionales en la proteína. Por esta propiedad se consideran protectores ya que bloquean la adsorción y penetración del virus a la célula huésped. (Kaufman *et al.* 2006; Nybakken *et al.* 2005; Oliphant *et al.* 2005). En infecciones primarias ocurre respuesta de anticuerpos específicos contra el virus y anticuerpos de reacción cruzada con capacidad para reconocer otros miembros del género. Los primeros de la clase IgG son los responsables de la inmunidad de por vida y los otros desaparecen después de 3-6 meses (Monath 1979; Sabin 1952). En individuos que se infectan por segunda vez con un *flavivirus* diferente, la respuesta de anticuerpos específicos es más rápida y vigorosa debido a la memoria inmunológica y se detectan títulos mayores de anticuerpos de reacción cruzada que aunque disminuyen con el tiempo se mantienen por toda la vida del individuo (Crill & Roehrig 2001; Calisher *et al.* 1989). Se sabe que anticuerpos contra la gpE exhiben grados variables de reacción cruzada entre serotipos de virus dengue y miembros del serocomplejo de la encefalitis Japonesa (Kurane & Takasaki 2006). La reactividad cruzada de anticuerpos neutralizantes en el suero de individuos inmunes se hace evidente por inhibición de la infectividad *in vitro* de 1 o varios *flavivirus* con los cuales no se tuvo contacto. Esto puede detectarse con la prueba de neutralización por reducción de número de placas (PRNT en inglés) (Morens *et al.* 1985; Clark & Casals 1958).

En la defensa contra *flavivirus* hay respuesta de linfocitos T CD4+ y CD8+ tipo Th1 contra varias proteínas virales. Se han identificado epítopes altamente inmunogénicos en la proteína no estructural NS3 inductores en los linfocitos de factor de necrosis tumoral (TNF) e interferón- γ que pueden inhibir la replicación viral (Lobigs *et al.* 1994). Se ha reportado que las células T de memoria contra un *flavivirus* pueden reconocer epítopes en otro dependiendo del grado de homología, sobre todo proteínas no estructurales más conservadas como NS3. Estos epítopes son reconocidos con menor afinidad por las células de memoria provocando una expansión clonal aberrante de linfocitos que fueron originados durante una infección pasada. Como consecuencia hay aumento en la producción de mediadores pro inflamatorios que pueden asociarse con incremento de la severidad (Mongkolsapaya *et al.* 2003; Kurane *et al.* 1998; Zivny *et al.* 1995)

Debido a la reactividad antigénica cruzada se cree que la inmunidad previa contra un *flavivirus* puede modular la infección por otro. Se ha observado que individuos con inmunidad al dengue que luego se infectan con *flavivirus* causantes de encefalitis desarrollan síntomas leves y se recuperan más fácilmente que los no inmunes (Tarr & Hammon 1974; Price & Thind 1971; Bond & Hammon, 1970; Sather & Hammon 1970) y al parecer lo mismo ocurre en quienes sufren FA (Monath *et al.*

1980; Ashcroft 1979; Sabin 1952). Por otro lado, numerosas evidencias han confirmado la contribución de los anticuerpos de reactividad cruzada entre serotipos del dengue a la severidad en infecciones secundarias, un mecanismo conocido como IDA (Guzman *et al.* 2002; Kliks *et al.* 1989; Halstead *et al.* 1978; Halstead *et al.* 1970; Nimmannitya *et al.* 1969). Muy pocos estudios se han realizado para conocer el papel de la inmunidad previa a la FA y curso del dengue. Algunos estudios sugieren que la vacuna contra la FA podría potenciar la respuesta de defensa contra el VDEN. Se encontró que el título de anticuerpos en individuos vacunados con un candidato atenuado de VDEN-2 fue mayor en quienes previamente habían sido inmunizados contra la FA (Bancroft *et al.* 1981; Schlesinger *et al.* 1956) y la administración simultánea de cepas atenuadas de VDEN y VFA incrementó la respuesta inmune a ambos virus observándose disminución de efectos adversos en los inmunizados (Scott *et al.* 1983; Price *et al.* 1973). No obstante, Sabin (1950) no encontró diferencias en relación a síntomas del dengue en vacunados o no con el virus YF-17D que se infectaron varios días después con VDEN silvestre.

Existe la inquietud que anticuerpos originados por vacunación previa contra la FA pueden potenciar la infección celular por VDEN (Guzman & Kron 1997), pero no hay evidencias suficientes que lo demuestren o descarten. Eckels *et al.* (1985) reportaron que la incubación previa de VDEN-2 con suero de vacunados contra la FA incrementó la infección de macrófagos por el virus debido al mecanismo de IDA. Esto se vio con 39 (50%) de 78 sueros usando diluciones bajas del suero ($\leq 1:5$) y fue independiente del título de anticuerpos contra el virus vacunal. En el estudio se usó una cepa atenuada de VDEN-2 y no se conoce si el mismo efecto ocurre con virus silvestre. No se encontraron estudios clínicos o epidemiológicos sobre riesgo de DH asociado a vacunación previa contra la FA. Carey *et al.* (1965) sugirieron que la vacunación podría haber favorecido la ocurrencia en un individuo de dos episodios de dengue en un año.

Al parecer la vacuna YF-17D no modifica el curso de infección por otros *flavivirus* diferentes al VDEN. En el 2003, durante un brote por el VON en Colorado (USA) la frecuencia de infección y enfermedad fue similar entre quienes habían sido vacunados contra la FA y los que no tenían inmunidad conocida a ningún *flavivirus*. Se encontró que la vacuna YF-17D no induce anticuerpos neutralizantes contra otros virus de la misma familia como VEJ o VON lo cual podría explicar la ausencia de protección cruzada (Johnson *et al.* 2005). Igualmente, otros autores informaron ausencia de anticuerpos neutralizantes o activación de la respuesta celular protectora frente a la infección por VON en individuos vacunados contra la FA (Yamshchikov *et al.* 2005). No obstante, Tesh *et al.* (2002) encontraron protección parcial contra el VON conferida por la vacuna YF-17D, esto es, la mortalidad de hámsteres con inmunidad a FA se redujo 13% comparada con el grupo control (47%), aunque anticuerpos de protección cruzada no se detectaron en el suero y la viremia fue similar en los dos grupos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 CÉLULAS

Se usaron cuatro líneas: a) *Aedes albopictus* (clon C6/36) cultivadas en medio Leibovitz (L-15; GIBCO-BRL.) con triptosa y suero bovino fetal (SBF) al 10%; b) BHK-21 clon 15, de riñón de hámster lactante en medio RPMI-1640 (GIBCO-BRL) suplementado con SBF 10%; c) Vero, de riñón de mono verde africano en Medio M-199 (GIBCO-BRL) con SBF al 10%; y d) K562, células de la línea mieloide humana que expresan el receptor Fc γ II en medio RPMI-1640 con SBF 10%. De cada una se hicieron cultivos semanales en frascos plásticos de 25 cm², las primeras se incubaron a 28° C y las otras a 37° C en atmósfera de CO₂ (5%).

3.2 VIRUS

Se usaron cepas de VDEN-2 (G-025) y VDEN-3 (02-271 y H-87) que fueron seleccionadas del stock del laboratorio de Arbovirus del CINTROP. La G-025 y 02-271 fueron aisladas de suero de pacientes del departamento de Santander y la última es la cepa prototipo de ese serotipo aislada en Filipinas en 1957 (donación del Dr. Vance Vorndam. CDC, Puerto Rico). Los virus fueron cultivados en células C6/36 siguiendo el procedimiento de uso rutinario en el laboratorio (Ocazonez *et al.* 2005). Brevemente, tubos de vidrio con monocapas de 48 h de crecimiento se inocularon con 250 μ l de sobrenadante de un precultivo en las mismas células. Después de 1 h a 28° C se adicionaron 500 μ l de medio de mantenimiento (L-15; SBF 2%; triptosa 10%) y luego los tubos se incubaron durante 4 o 5 días a 28° C. El procedimiento se repitió seis veces y en la última el sobrenadante se colectó para ser almacenado a -70° C. hasta usarlo. Para la selección de las cepas de VDEN se tuvo en cuenta los siguientes criterios: a) que fueran de bajo número de pases y b) aisladas de pacientes que sufrieron dengue hemorrágico.

3.3 SUEROS

Se incluyeron muestras colectadas de individuos sanos vacunados (n=36) o no (n=17) contra la FA residentes en Mutiscua y Pamplona (Norte de Santander). Los municipios están ubicados por encima de 2500 m sobre el nivel del mar donde se presume no hay transmisión de Arbovirus y hasta la fecha casos de dengue o FA no se han documentado. Se consideró vacunado contra la FA el donante que presentó el carné expedido por la autoridad local de salud. En caso contrario se consideraron no inmunes a *flavivirus*. Se incluyeron además sueros de casos de dengue confirmado por aislamiento del virus (n=12) de un estudio previo realizado por el grupo de Arbovirus del CINTROP (Ocazonez *et al.* 2007) y que permanecían almacenados a -70° C, estos se denominaron de inmunes a dengue. Los sueros se inactivaron a 56° C por 30 min para inhibir la acción del

complemento y se codificaron de tal forma que al procesarlos no se conoció el donante. Se analizaron inicialmente por la prueba de neutralización como se describe adelante para confirmar o descartar la presencia de anticuerpos específicos contra VDEN y VFA. En la Tabla 1 se detallan las características de los donantes de sueros incluidos en el estudio.

Tabla 1. Información de los donantes de sueros incluidos en el estudio

Donante	n	Edad (años)	Anticuerpos séricos*		Procedencia
			Fiebre amarilla	Dengue	
Vacunados (YF-17DD)	36	11 ± 7	+	-	1
No inmune [†]	17	29 ± 25	-	-	1
Inmune a dengue	12	28 ± 18	-	+	2

*: Valores $\geq 1:10$ por PRNT₅₀ confirmaron la presencia del anticuerpo respectivo. †: no inmune a *flavivirus*. 1: Mutiscua y Pamplona (N. de Santander). 2: Bucaramanga y área metropolitana.

3.4 CUANTIFICACIÓN DE VIRUS

Se siguió un procedimiento adaptado de los descritos por Morens *et al.* (1985) y Ocazonez *et al.* (2007). Brevemente, cajas de 24 pozos fueron sembradas con células BHK-21 a diferente concentración y luego de 24 h se infectaron por duplicado con 100 μ l de diluciones seriadas base 10 (1:10 hasta 1:10⁶) de sobrenadante de un cultivo celular (C6/36) donde el virus se replicó. Después de 1 h de incubación a 37°C se adicionó 1 ml de medio de RPMI-1640 que varió en el pH y concentración de carboximetilcelulosa (CMC) para estandarizar el procedimiento. Los cultivos se incubaron a 37° en atmósfera de CO₂ (5%) durante 5 días para VDEN-2 y 8 días para VDEN-3. Las placas virales fueron reveladas fijando las células con formaldehído al 10% durante 1 h y aplicando cristal violeta (1%) por 1 min. La concentración de virus (título) se expresó como unidades formadoras de placa por mililitro (UFP/ml), calculada así: UFP/ml = promedio del número de placas x recíproco de la dilución / vol. de inóculo (ml). Debido a que los resultados del plaqueo del virus VDEN-3 no fueron reproducibles este serotipo no se incluyó en los experimentos descritos adelante.

3.5 PRUEBA DE NEUTRALIZACIÓN POR REDUCCIÓN DE PLACAS (PLAQUE REDUCTION NEUTRALIZATION TEST O PRNT)

Para investigar la presencia y título de anticuerpos anti FA, 40-60 UFP del virus YF-17DD se incubaron por 2 h a temperatura ambiente con diluciones del suero (1:10 hasta 1:320) inactivado a 56° C por 30 min. Al término, 100 μ l de la mezcla se adicionaron por duplicado a monocapas de células Vero crecidas en cajas de 24 pozos, que se incubaron 1 h a 37°C, CO₂ (5%) cuando se adicionó 1 ml de medio de plaqueo (RPMI-1640; CMC 9%; SBF 9%) y se incubó por 7 días bajo las

mismas condiciones. Virus en medio de cultivo se usó como control. La reducción de 50% de placas virales en relación al control con la dilución 1:10 del suero se consideró presencia de anticuerpos neutralizantes y el título se definió como el \log_{10} de la máxima dilución del suero que produjo dicha reducción calculada por análisis de regresión lineal (PRNT₅₀ [log10]).

Para investigar la neutralización de VDEN-2 por anticuerpos anti FA se siguió el mismo procedimiento usando células BHK-21 y diluciones 1:2 y 1:10 del suero de vacunados, no inmunes a *flavivirus* e inmunes a dengue. Las placas virales fueron reveladas a los 5 días post infección. Cada ensayo se realizó por duplicado con dos réplicas del experimento. Se consideró neutralización cruzada cuando se encontraron diferencias significativas con suero no inmune.

3.6 INFECCIÓN POR VDEN DE CÉLULAS K562

Los primeros ensayos se hicieron con el virus sin previa incubación con suero para determinar si ocurría infección no dependiente del receptor Fc γ . Para esto, 5×10^5 células en 150 μ l se infectaron con diferentes UFP de VDEN-2 en el mismo volumen de medio resultando en variada multiplicidad de infección o proporción virus / célula (MOI = 0.1, 0.3, 0.5 y 1). Luego de 2 h a 37° C (CO₂ 5%), las células fueron lavadas 2 veces con medio RPMI suplementado con SBF 2%, se resuspendieron en 500 μ l de medio y se distribuyeron por duplicado en cajas de 24 pozos (500 μ l / pozo) las cuales se incubaron a 37° C. La infección celular se evaluó a las 24, 48 y 72 h buscando proteína viral o ARN intracelular por inmunofluorescencia directa (IFD) o RT-PCR respectivamente, siguiendo el protocolo descrito adelante. Para los siguientes experimentos se usó el MOI con el que se vio infección celular.

Para evaluar el efecto sobre la infección celular del VDEN-2 por incubación previa del virus con anticuerpos anti FA se siguió el siguiente procedimiento: 150 μ l de la suspensión del virus se incubaron con igual volumen de suero de vacunado (n = 10) o de no inmune a *flavivirus* (n = 2) diluido 1:2 y 1:5 por 14 h a 4° C. Al término, a la mezcla se adicionó 5×10^5 células en 50 μ l de medio y se incubó 2 h a 37° C, luego se realizaron 2 lavados para remover el virus extracelular, las células se resuspendieron en 500 μ l de medio y se sembraron por duplicado en cajas de 24 pozos que se incubaron durante 48 h bajo las mismas condiciones cuando se determinó la infección celular como se anotó arriba. Como control positivo del ensayo, el virus se incubó con suero (1:250) de la convalecencia de un paciente con infección primaria por VDEN-3 sin vacuna de FA. Los ensayos se realizaron por duplicado y se hicieron dos réplicas de cada experimento.

3.7 INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA (IFD)

Se utilizó el procedimiento de uso rutinario en el laboratorio utilizando anticuerpo policlonal M29341 (CDC Puerto Rico) (Ocazionez *et al.* 2005). Como control

positivo se usaron células de mosquito (C6/36) infectadas con la misma cepa del virus.

3.8 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA POR TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT-PCR)

Se siguió el protocolo del laboratorio previamente descrito (Ocazonez *et al.* 2006). Brevemente 250 µl del lisado celular se mezcló 750 µl de Trizol (Invitrogen), y el ARN viral se extrajo por centrifugación con cloroformo – isopropanol resuspendiendo el sedimento en 50 µl de agua DEPC. La transcripción reversa a DNA copia se realizó a 42°C en un volumen final de 15 µl utilizando la enzima *Tth* DNA polimerasa (Promega). La amplificación se llevó a cabo en una segunda reacción de 30 ciclos a 94, 55 y 72 grados centígrados adicionando los cebadores D1 y D2 descritos por Lanciotti *et al.* (1992). ARN de VDEN-2 obtenido del lisado de célula C6/36 se usó como control positivo. La visualización de una banda de 511 bp en gel de agarosa (2%) confirmó la presencia de virus intracelular.

3.9 ANÁLISIS DE DATOS

Se comparó entre sí el porcentaje de reducción de placas del VDEN-2 por los sueros de cada grupo y se exploró la correlación entre título de anticuerpos neutralizantes contra FA y reducción de placas del virus. Se usaron las pruebas de Mann-Whitney *U* y de Spearman respectivamente, para establecer la significancia de las diferencias. Se consideraron valores de $P \leq 0.05$.

3.10 CONSIDERACIONES ÉTICAS:

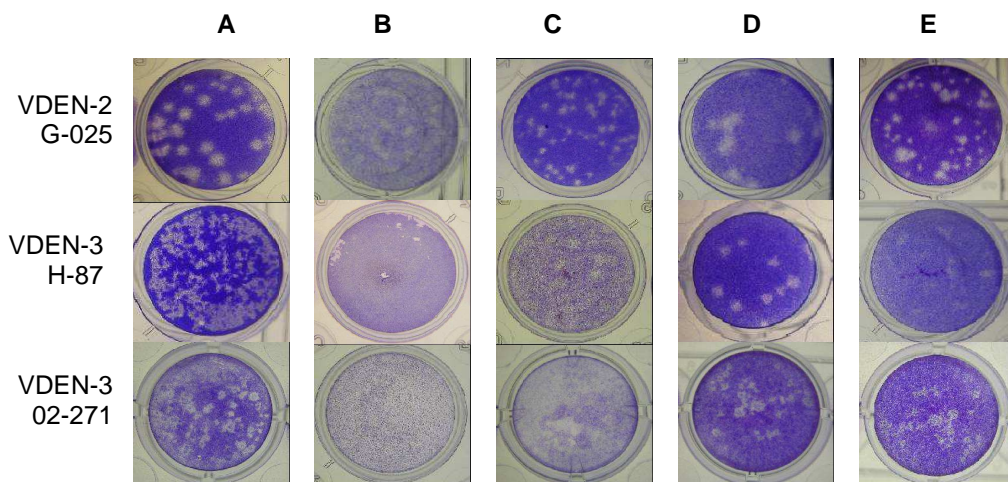
El estudio original fue aprobado por el Comité de Ética en Investigación de la Facultad de Salud de la Universidad Industrial de Santander. Las personas fueron invitadas a participar después de explicarles el objetivo del estudio y la aceptación se registró por firma del consentimiento. Este fue un estudio de riesgo mínimo, de acuerdo a la resolución 8430 de 1993 del Ministerio de Salud, que establece las normas éticas para la investigación en seres humanos en el país (República de Colombia 1993).

4. RESULTADOS

4.1 CUANTIFICACIÓN DEL VIRUS

Se realizaron 5 protocolos de plaqueo (A – E) con cada serotipo del virus que se diferenciaron en la concentración de células (BHK-21) por pozo y medio de cultivo (RPMI 1640; SBF 6%) en relación con pH y concentración de CMC. Las placas de infección variaron en tamaño, forma y número dependiendo del serotipo y protocolo de plaqueo (Figura 1). Fueron visibles con medio pH 8.2 y 7.8 pero no 8.4. Variaciones en la concentración de CMC produjeron cambios en tamaño, morfología y distribución: placas más grandes (> 1mm), con bordes bien definidos (redondeados vs irregulares) y mejor distribuidas (al azar vs racimos) se observaron con 1.3% de CMC vs 0.7%.

Figura 1. Tamaño, forma y distribución de placas de virus dengue serotipos 2 (VDEN-2) y 3 (VDEN-3) de acuerdo al protocolo del plaqueo



Ver detalles en Tabla 2. Cada pozo es un ejemplo representativo de varios ensayos.

Con VDEN-2 el protocolo A (8×10^4 células/pozo; RPMI 1640 pH 8.2 con SBF 6%; CMC 1.3%) resultó mejor que los otros y esto se reflejó en el título viral: 1.7, 2.6, 4.8 veces más UFP / ml comparado con el C, D y E, respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. Título de virus dengue serotipo 2 (VDEN-2) de acuerdo al protocolo de plaqueo

Protocolo	Células / ml (BHK-21)	Medio de cultivo*		Título: UFP / ml
		CMC [†] : %	pH	
A	8 x 10 ⁴	1.3	8.2	24 x 10 ⁴
B	8 x 10 ⁴	1.3	8.4	NC
C	8 x 10 ⁴	1.3	7.8	14 x 10 ⁴
D	8 x 10 ⁴	0.7	8.2	9 x 10 ⁴
E	12 x 10 ⁴	1.3	8.2	5 x 10 ⁴

Los resultados corresponden al promedio de 2 pozos de 2 experimentos independientes. *: RPMI 1640 y 6% de suero bovino fetal. †: carboximetilcelulosa. NC: no contable.

Con virus VDEN-3 el plaqueo no fue exitoso comparado con VDEN-2 por defecto en la formación de placa y reproducibilidad. Con la cepa prototipo (H-87) el protocolo D (8x10⁴ células/pozo; RPMI 1640 pH 8.2 con SBF 6%; CMC 0.7%) resultó en placas de tamaño y morfología similar a las de VDEN-2 usando el protocolo A. Con la cepa local (02 271) el resultado no fue confiable: con los 4 protocolos se obtuvieron placas pequeñas (<1 mm) con bordes irregulares y superpuestas que no se pudieron contar (Figura 1). Debido a esos resultados este serotipo del VDEN no se incluyó en los otros experimentos.

4.2 NEUTRALIZACIÓN DE VDEN-2 POR SUERO DE VACUNADOS (YF-17DD)

El título de anticuerpos contra el virus vacunal YF-17DD varió entre 1:10 y 1:1457, 14 (39%) de 36 sueros tenían títulos >1:320 (Tabla 3). Reducción < 50% de placas del VDEN-2 se observó con 35 (97.2%) sueros a dilución 1:2 o 1:10. Un suero con título de anticuerpos 1:403 a las mismas diluciones redujo 67 y 73% de placas, respectivamente. La reducción de placa por sueros de vacunados no fue diferente con suero de no inmunes a *flavivirus* diluido 1:2 ($p = 0.78$) o 1:10 ($p = 0.65$) y como se esperaba, suero de inmunes a dengue redujeron 75 -100% de placas del virus (Tabla 4). Por otro lado, no se encontró correlación entre el título de anticuerpos anti YF-17DD (PRNT₅₀ log₁₀) y porcentaje de reducción de placas del VDEN-2 ($r = - 0.081$; $p = 0.64$. Figura 2). Esto es, reducción mayor y menor de 20% ocurrió con sueros con títulos bajos y altos de anticuerpos. Los resultados permiten concluir que suero de vacunados contra la FA no neutralizan VDEN-2 independiente del título de anticuerpos contra el virus vacunal.

Tabla 3. Anticuerpos neutralizantes contra el virus de la fiebre amarilla en los sueros de vacunados incluidos en el estudio

No.	Edad: años	Título*	No.	Edad: años	Título*
1	4	41	19	14	948
2	28	360	20	9	80
3	29	1457	21	9	10
4	4	168	22	10	17
5	5	340	23	14	403
6	24	519	24	10	130
7	27	406	25	5	94
8	27	886	26	6	320
9	9	585	27	6	41
10	6	170	28	6	277
11	14	585	29	6	18
12	10	370	30	6	239
13	6	315	31	5	209
14	10	244	32	7	21
15	9	94	33	9	21
16	6	209	34	7	680
17	11	309	35	8	130
18	14	585	36	6	10

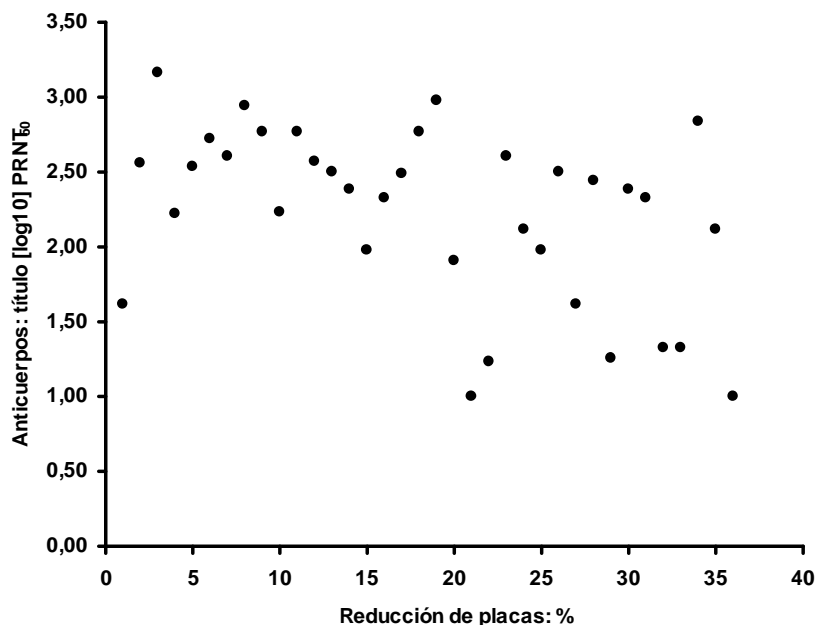
*: Recíproco de la dilución mayor (\log_{10}) del suero que redujo 50% de placas del virus YF-17DD (PRNT_{50} [\log_{10}]).

Tabla 4. Reducción de placas del virus dengue serotipo 2 (VDEN-2) por suero de vacunados contra la fiebre amarilla comparados con no inmunes a *flavivirus* e inmunes a dengue

Vacunado (YF 17DD)	No inmune		Dengue		
	1:2	1:10	1:2	1:10	
No. 1	22	27	23	22	100
2	17	23	17	32	100
3	14	18	23	12	75
4	36	23	25	31	100
5	21	18	15	24	100
6	23	29	34	25	100
7	31	21	45	27	100
8	17	19	37	25	100
9	29	25	17	25	100
10	32	28	28	25	100
11	25	20	46	23	97
12	25	23	14	15	100
13	29	21	13	29	
14	26	33	21	29	
15	20	13	38	20	
16	40	38	31	27	
17	24	35			
18	13	19			
19	24	31			
20	33	22			
21	30	19			
22	34	28			
23	67	73			
24	22	21			
25	29	17			
26	31	31			
27	45	40			
28	24	23			
29	39	35			
30	25	38			
31	37	25			
32	25	46			
33	37	15			
34	29	33			
35	20	13			
36	29	33			

Los datos corresponden al porcentaje de reducción con las diluciones señaladas del suero. P = 0.78 y 0.65 (Mann-Whitney U) al comparar vacunados vs. no inmunes con la dilución 1:2 y 1:10, respectivamente.

Figura 2. Correlación entre el título de anticuerpos neutralizantes contra la fiebre amarilla (anti YF-17DD) y porcentaje reducción de placas de infección del virus dengue serotipo 2 (VDEN-2). $r = -0.081$; $P = 0.64$ (Spearman).

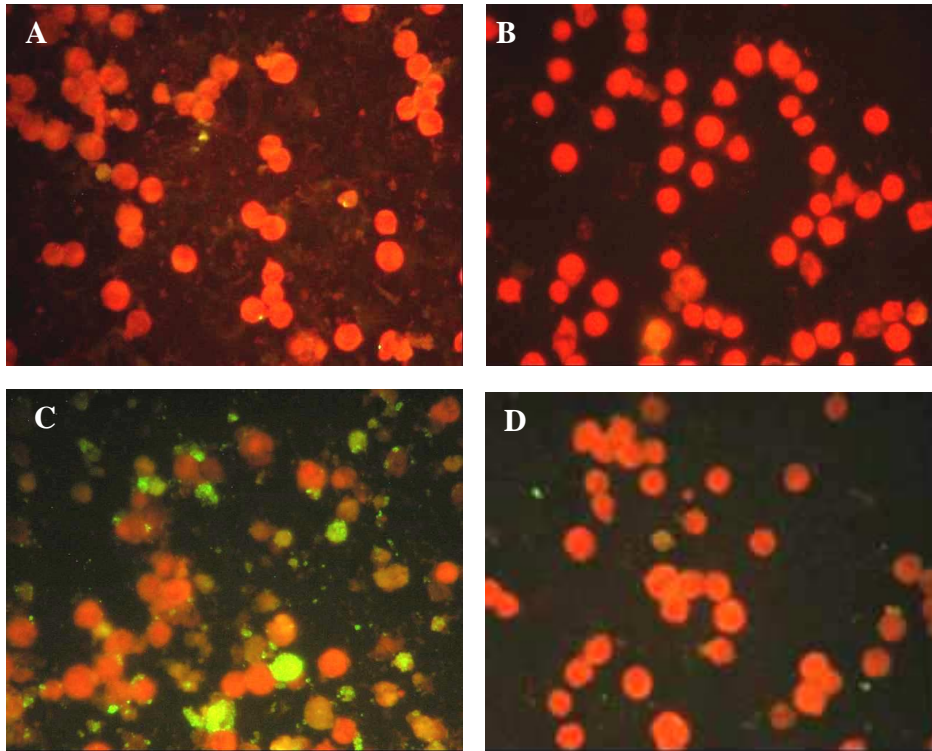


4.3 IDA DE VDEN-2 POR SUERO DE VACUNADOS (YF-17DD)

No se detectó infección viral de células mieloides humanas (K562) por VDEN-2 en ausencia de anticuerpos contra *flavivirus*. Esto es, 72 h después de la infección a MOI de 0.1, 0.3, 0.5 o 1 no se detectaron proteína (IFD negativa) o ARN (RT-PCR negativo) viral en las células o virus (UFP/ml = 0) en el sobrenadante del cultivo. Lo contrario se observó 48 h después de la infección a MOI de 0.5 o 1 con virus que se incubó antes de la adsorción 14 h a 4°C con suero inmune a dengue (anti-VDEN-3 1:250 o 1:1000). Con base en estos resultados los experimentos se hicieron con MOI de 0.7 y la infección se evaluó a las 48 h.

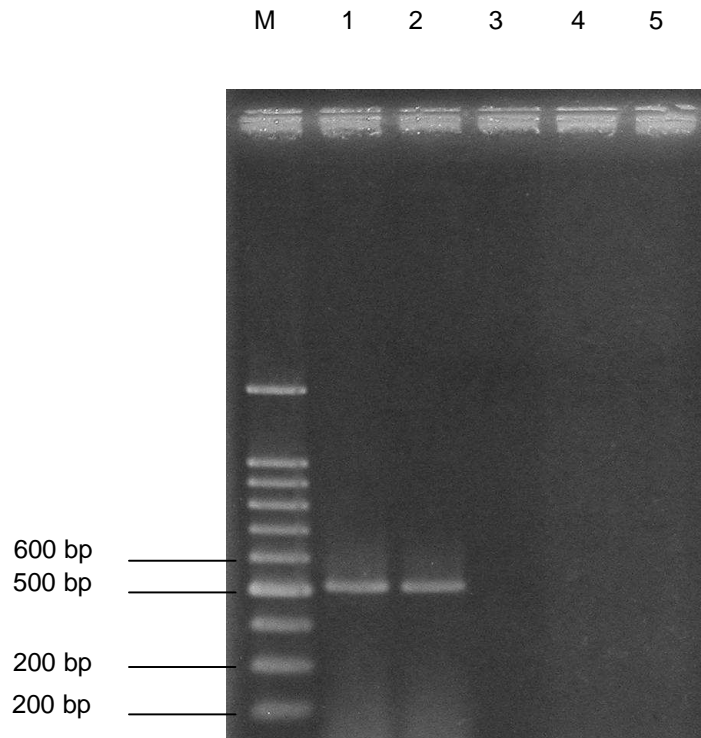
El IDA se investigó con 10 sueros de vacunados con título alto y bajo de anticuerpos neutralizantes (Tabla 3, números: 1, 3, 4, 8, 19, 21, 24, 27, 35, 36). La incubación previa del VDEN-2 con cualquier suero diluido 1:2 o 1:5 no favoreció la infección de macrófagos. En ningún cultivo se detectó virus en el sobrenadante (UFP /ml = 0), proteína o ARN viral en el lisado celular y lo mismo se observó con virus preincubado con suero no inmune a *flavivirus*. Al contrario, virus preincubado con suero heterólogo (anti VDEN-3) infectó los macrófagos (Figura 3 y 4). Los resultados indican que anticuerpos anti FA en suero de inmunizados con la vacuna YF-17DD no contribuyeron a la infección de macrófagos humanos por una cepa colombiana del VDEN-2 bajo las condiciones del ensayo.

Figura 3. Inmunofluorescencia con anticuerpo anti dengue de células K562 infectadas con virus dengue serotipo 2 (VDEN-2) preincubado con suero humano



A: virus y suero de vacunado contra la fiebre amarilla (1:2). B: virus y suero no inmune (1:5). C: control positivo: virus y suero anti VDEN-3 (1:250) D: control negativo: virus en ausencia de suero.

Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa mostrando el resultado de la RT-PCR para amplificar ARN del virus dengue serotipo 2 (VDEN-2) a partir de células K562



M: marcador de peso molecular 100 bp Ladder (GIBCO BRL). RNA del virus extraído de células C6/36 infectadas (carril 1). Cultivo infectado con virus preincubado con suero humano: anti VDEN-3 diluido 1:250 (carril 2), de vacunado contra la fiebre amarilla diluido 1:2 (carril 3), no inmune a *flavivirus* diluido 1:2 (carril 4). Virus sin suero (carril 5).

5. DISCUSIÓN

5.1 ANTICUERPOS CONTRA LA FIEBRE AMARILLA E INFECTIVIDAD DEL VDEN-2

En este trabajo se demuestra que anticuerpos contra el VFA inducidos por vacunación con la cepa YF-17DD no reconocen VDEN, lo cual se evidenció por ausencia de neutralización *in vitro* usando una dilución muy baja del suero (1:2). El mismo resultado se ha encontrado cuando sueros de casos de dengue y FA se analizan simultáneamente por la prueba de reducción de placa con fines de diagnóstico por laboratorio (Acuña *et al.* 2001). Igualmente con suero de primates no humano o ratón inmunizados con la vacuna YF 17DD que se incubó con una cepa atenuada o la prototipo (New Guinea C) de VDEN-2. (Lim *et al.* 2006; Galler *et al.* 2005; Guirakhoo *et al.* 2000). Reactividad cruzada de anticuerpos séricos contra la FA tampoco se ha detectado contra otros *flavivirus* como el VON, VEJ, VETG (Johnson *et al.* 2005; Tesh *et al.* 2002; Buckley *et al.* 1985).

La ausencia de neutralización cruzada de anticuerpos anti FA vs VDEN podría explicarse por la baja homología antigénica del VFA con los otros del género. Recientemente se demostró que solo 45% de la secuencia de aminoácidos de la proteína E es similar en contraste con 60-75% cuando se compara entre sí la de otros miembros del género. Esto resulta en que el VFA se ubica en un único grupo muy distante de los otros cuando se construyen árboles utilizando el método del vecino más cercano (Stiasny *et al.* 2006). Un suero de los vacunados incluidos en el estudio redujo >50% de placas del VDEN (Tabla 4) y una explicación podría ser que el participante porte anticuerpos contra un *flavivirus* diferente al VDEN que no se investigó. La presencia de virus Ilhéus se ha detectado en la región nororiental de Colombia (Prías *et al.* 1968).

La neutralización de un virus por anticuerpos resulta en la inhibición de la infectividad por bloqueo de epítopes virales que ligan el receptor en la célula blanco durante la adsorción o durante la internalización (Klasse & Sattentau 2001; Dimmock 1984; Mandel 1978). Una forma de medir este efecto es mediante la prueba de reducción de placa pero la misma puede variar dependiendo del tipo de célula, tiempo de incubación del virus con el suero y cepa del virus. En este estudio se utilizaron células BHK-21 una línea celular con mejores resultados en términos de sensibilidad y especificidad que otras (Morens *et al.* 1985) y el virus se incubó con el suero 2 h a temperatura ambiente, un tiempo suficiente para que ocurra la opsonización teniendo en cuenta que el tiempo mínimo ha sido reportado en 60 min (Sheldon & Nicola 1969). En este sentido, se descarta que la ausencia de neutralización del VDEN por anticuerpos anti FA encontrada en el estudio haya sido causada por alguna de las variables del procedimiento técnico arriba mencionadas. Esto porque bajo las mismas condiciones del ensayo se detectó

neutralización de VDEN-2 por sueros homólogos (Tabla 4) y en otro estudio del grupo se demostró reactividad cruzada de anticuerpos anti dengue contra el VFA pero no al contrario (Gómez & Ocazonez 2007). No obstante, se ha sugerido que la presencia de antígenos celulares en la envoltura viral pueden ser reconocidos por los anticuerpos del suero ocasionando neutralización falsa positiva (Halstead 2003).

Numerosas evidencias demuestran la contribución del IDA al dengue hemorrágico en individuos con anticuerpos de una infección primaria por un serotipo diferente del virus (Guzman 2002; Vaughn *et al.* 2000; Kliks *et al.* 1989). Existe la inquietud que lo mismo ocurra en vacunados previamente contra la FA. Los resultados de este estudio no respaldan este supuesto teniendo en cuenta que la incubación previa del VDEN con diluciones bajas de suero de vacunados no resultó en infección de células K562 (Figuras 3 y 4). Este resultado se esperó considerando que no hubo neutralización parcial una condición necesaria para la internalización del virus mediada por anticuerpos (Halstead 2003).

El resultado del ensayo para evaluar IDA puede variar de acuerdo a la cepa, célula, tiempo de incubación virus-suero, MOI y el indicador que se utilice para detectar la infección, entre otros, haciendo difícil comparar resultados de estudios. En este estudio no se detectó IDA de un aislado primario de VDEN-2 (cepa G 025) de un caso del municipio de Girón que se incubó 14 h a 4° C con bajas diluciones de suero de vacunados contra la FA y luego se usó para infectar células K562 a MOI de 0.7. Al revisar la literatura se encontraron dos estudios que se diferencian en varios aspectos metodológicos y eso podría en parte explicar la diferencia de resultados. Diamond *et al.* (2000) reportaron IDA de VDEN-2 con una cepa prototipo (Thai 16681) pero no con 3 aislados primarios de Nicaragua usando células K562, THP-1 y U937 infectadas a MOI de 10 con virus previamente incubado con anticuerpo monoclonal anti *flavivirus*. No obstante, en ausencia de anticuerpo solo se observó infección de K562 con la cepa prototipo. Los autores encontraron diferencias significativas en el porcentaje de infección (50, 23 y 1.4% respectivamente) y título viral (3.6×10^4 UFP/ml en U937 vs 8.1×10^3 UFP/ml en THP-1) con la misma cepa (Thai 16681) en relación con el MOI. Por otro lado, en el estudio de Eckels *et al.* (1985) el IDA por suero de vacunados contra la FA se demostró usando cultivo primario de macrófagos humanos, MOI de 0.05 y una cepa prototipo (PR-159) de VDEN-2 que se dejó replicar por 4 días. Al contrario, no se observó IDA con las mismas células usando aislados primarios del mismo serotipo del virus que se incubaron previamente con anticuerpos contra *flavivirus* (Laoprasopwattana *et al.* 2005; Diamond *et al.* 2000). Estas contradicciones en los resultados ha generado discusión acerca de la reproducibilidad de los ensayos de IDA en cultivo primario de macrófagos dada la variabilidad individual de las células (Green *et al.* 2006).

No se descarta que el resultado del IDA de la cepa local del estudio pudiera haber variado si se hubiese conseguido mayor productividad del cultivo en

términos de título en el sobrenadante de cultivos del control positivo. No obstante, la ausencia de proteína y ARN viral en el interior de las células infectadas con virus pretratado con suero de vacunados vs la presencia en el control positivo (Figura 3,4) confirma que el ensayo fue apropiado para evaluar el IDA y por lo mismo se puede descartar que el resultado negativo se debiera al procedimiento técnico. Un resultado no esperado es que en cultivos usados como control positivo (virus preincubado con anticuerpos anti VDEN-3) no se detectó virus en el sobrenadante (UFP / ml = 0) y el subcultivo de éste en células C6/36 resultó negativo, a pesar que se detectó proteína y ARN intracelular. El resultado podría explicarse por baja replicación del virus en las células K562 sumado a sensibilidad de las técnicas de plaqueo y aislamiento viral. Las diferencias entre cepas de VDEN que varían en la susceptibilidad al IDA se ha relacionado con la capacidad de replicación en líneas celulares de macrófagos humanos. Diamond *et al.* (2000) encontraron que la cepa de VDEN-2 susceptible a IDA (Thai 16681) produjo mayor cantidad de cadenas negativas de ARN que los aislados primarios del mismo serotipo y esto se correlacionó con el título viral en el sobrenadante de los cultivos. No obstante, la presencia de cantidades similares de cadenas positivas de ARN viral intracelular con todas las cepas, sugiere que factores asociados al virus determinan la magnitud de la infección (Diamond *et al.* 2000).

En la patogénesis del dengue por infección secundaria influye la respuesta inmune celular además del mecanismo del IDA. La evidencia sugiere que durante la segunda infección los linfocitos T de memoria de la primaria son activados resultando en incremento de citoquinas proinflamatorias como IL-8, IL-12, IL-4, TNF α e IFN γ y por lo mismo de la permeabilidad vascular que conduce al choque hipovolémico (Bashyam *et al.* 2006; Mongkolsapaya *et al.* 2003). Se ha visto que la respuesta de anticuerpos a una cepa atenuada de VDEN-2 fue mayor en quienes estaban previamente vacunados contra la FA y no se conoce si lo mismo sucede con la inmunidad celular (Eckels *et al.* 1975). Si la vacunación previa contra la FA contribuye a mayor activación inmune de célula T en infectados con VDEN y por lo mismo mayor riesgo de DH por incremento de citoquinas requiere ser investigado.

5.2 PLAQUEO DE VIRUS DENGUE

Los ensayos demostraron que variaciones de pH, concentración de CMC y células afectaron el tamaño, morfología y distribución de placas de VDEN dependiendo del serotipo y cepa. Con la de VDEN-2 incluida en el estudio el mejor resultado se obtuvo con medio pH entre 7.8 y 8.2 y 1.3% de CMC usando células BHK-21. Se ha descrito inhibición en la formación de placas a pH < 7.5 con cepas prototipo de VDEN-2 (New Guinea C) y VDEN-4 (H-241) usando las mismas células (Malewicz *et al.* 1979). Stim (1970) encontró placas con medio pH 6.6 - 8.6 usando células LLC-MK2 con variaciones en el tamaño según el serotipo del virus.

La influencia en la formación de placa por la concentración de CMC en el medio de cultivo se demostró en este estudio, disminución de CMC al 0.7% produjo placas de VDEN-2 más pequeñas (<1 mm) con bordes irregulares a los 5 días. En otro estudio se observaron cambios similares con la cepa prototipo de VDEN-2 cuando se incrementó la CMC de 1 a 2% y placas grandes (> 1mm) de bordes bien definidos cuanto más el tiempo de incubación a 37°C, mejor a los 8 que 6 días (Malewicz et al. 1979). En este estudio no se hicieron variaciones en tiempo ya que en todos los ensayos el revelado se hizo a los 5 días y por lo tanto no es posible concluir sobre la influencia de esta variable en la formación de placa.

El estado de la monocapa celular es otro factor que determina la formación de placa por VDEN. Placas grandes (≥ 1 mm) se observaron cuando la siembra en el soporte se inició con 8×10^4 que con 12×10^4 células BHK-21 (Figura 3). Lo mismo observó Manning *et al.* (1979) con esa línea celular y la cepa prototipo del mismo serotipo (VDEN-2, New Guinea C). Al parecer, con menos células la confluencia de monocapa no alcanza 100% y por ello hay mayor espacio cuando mueren por efecto de la lisis originada por el virus resultando en mayor efecto citopático que se refleja en formación de placas más grandes. Al contrario, en las monocapas confluentes se dificulta la replicación viral disminuyendo la probabilidad de efecto citopático en el tiempo que normalmente se deja el cultivo (5-7 días).

Con VDEN-3 se hicieron varios intentos de plaqueo y aunque las placas fueron visibles con uno de los procedimientos el ensayo no fue reproducible. La dificultad pudo deberse a baja infectividad del virus en células BHK-21 o ausencia de efecto citopático. Esta dificultad ha sido reportada por otros y ha obligado el uso de métodos diferentes al plaqueo para cuantificar VDEN, principalmente del serotipo 3, tales como RT-PCR en tiempo real, ensayo de fluorescencia de foco y citometría de flujo (Johnson et al. 2005; Lambeth *et al.* 2005; Laoprasopwattana *et al.* 2005).

6. CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo demuestran que anticuerpos contra el virus de la FA por vacunación, no neutralizaron ni contribuyeron a la infección de una cepa colombiana de VDEN-2. Bajo esa circunstancia se sugiere ausencia de protección cruzada o severidad en casos de dengue asociado a vacunación previa con el virus YF-17DD.

Debido a que el resultado de los ensayos pudo variar de acuerdo al virus, célula y MOI entre otros, es necesario analizar cepas de otros serotipos que permitan confirmar los hallazgos de este estudio. Igualmente, se sugiere usar métodos cuantitativos más sensibles como citometría de flujo y RT-PCR en tiempo real para evaluar la magnitud de la neutralización o potenciación de la infección.

La dificultad para plaquear VDEN es conocida y los resultados del estudio lo demuestran. De acuerdo a la experiencia adquirida se recomienda usar diferentes protocolos de plaqueo debido a que variables como pH, concentración de células, CMC entre otros, difieren con cada cepa e influyen en el tamaño, morfología y título de unidades formadoras de placas.

BIBLIOGRAFÍA

Acuña MB, Castillo RO, García MM (2001) Neutralización por reducción de placas como método específico para el diagnóstico serológico de fiebre amarilla. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública* 18, 71-76.

Allison SL, Schalich J, Stiasny K, Mandl CW & Heinz FX (2001) Mutational evidence for an internal fusion peptide in the Flavivirus envelope protein. *Journal of Virology* 75, 4268-4275.

Ashcroft M (1979) Historical evidence of resistance to yellow fever acquired by residence in India. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 73, 247-248.

Bancroft WH, Scott RM, Eckels KH, Hoke CH Jr, Simms TE, Jesrani KD, Summers PL, Dubois DR, Tsoulos D & Russell PK (1984) Dengue virus type 2 vaccine: reactogenicity and immunogenicity in soldiers. *The Journal of Infectious Diseases* 149, 1005-1010.

Bancroft WH, Top FH, Eckels KH, Anderson JH, McCown JM & Russell PK (1981) Dengue-2 vaccine: virological, immunological, and clinical responses of six yellow fever-immune recipients. *Infection and Immunity* 31, 698-703

Barnett ED (2007) Yellow fever: epidemiology and prevention. *Clinical Infectious Disease* 44, 850-856.

Barrett AD (1997) Yellow fever vaccines. *Biologicals* 25, 17-25.

Barrett AD & Gould EA (1986) Antibody-mediated early death in vivo after infection with yellow fever virus. *Journal of General Virology* 67, 2539-2542.

Bashyam HS, Green S & Rothman AL (2006) Dengue virus reactive CD8+ T cells display quantitative and qualitative differences in their response to variant epitopes of heterologous viral serotypes. *Journal of Immunology* 176, 2817-2824.

Berge TO, Gleiser CA, Gochenour WS, Miesse ML & Tigertt WD (1961) Studies on the virus of Venezuelan equine encephalomyelitis. II. Modification by specific immune serum of response of central nervous system of mice. *Journal of Immunology* 87, 509-517.

Bond JO & Hammon WM (1970) Epidemiological studies of possible cross-protection between dengue and St. Louis encephalitis arboviruses in Florida. *American Journal of Epidemiology* 92, 321-330.

- Bourgeade A & Marchou B (2003) Yellow fever, dengue, Japanese encephalitis and West Nile virus infection: four major Arbovirus diseases. *Medecine et Maladies Infectieuses* 33, 385-395.
- Brandriss MW, Schlesinger JJ, Walsh EE & Briselli M (1986) Lethal 17D yellow fever encephalitis in mice. Passive protection by monoclonal antibodies to the envelope proteins of 17D yellow fever and dengue 2 viruses. *Journal of General Virology* 67, 229-234.
- Buckley A & Gould EA (1985) Neutralization of yellow fever virus studied using monoclonal and polyclonal antibodies. *Journal of General Virology* 66, 2523-2531.
- Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS & Westaway EG (1989) Antigenic relationship between Flavivirus as determined by cross-neutralization test with polyclonal antisera. *Journal of General Virology* 70, 37-43.
- Carey DE, Myers RM & Rodrigues FM (1965) Two episodes of dengue fever, caused by types 4 and 1 viruses, in an individual previously immunized against yellow fever. *Am J Trop Med Hyg* 14, 448-450.
- Clarke DH & Casals J (1958) Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 7, 561-573.
- Crill WD & Chang GJ (2004) Localization and characterization of flavivirus envelope glycoprotein cross-reactive epitopes. *Journal of Virology* 78, 13975-13986.
- Crill WD & Roehrig JT (2001) Monoclonal antibodies that bind to domain III of DENV virus E glycoprotein are the most efficient blocker of virus adsorption to Vero cells. *Journal of Virology* 75, 7769-7773.
- Dimmock NJ (1984) Mechanisms of neutralization of animal viruses. *Journal of General Virology* 65, 1015-1022.
- Diamond MS, Edgil D, Roberts TG, Lu B, Harris E (2000). Infection of human cells by dengue virus is modulated by different cell types and viral strains. *Journal of Virology* 74, 7814-7823
- Eckels KH, Kliks S, Dubois DR, Wahl IM & Bancroft WH (1985). The association of enhancing antibodies with seroconversion in humans receiving a dengue-2 live-virus vaccine. *Journal of Immunology* 135, 4201-4203.
- Endy TP, Nisalak A, Chunsuttitwat S, Vaughn DW, Green S & Ennis FA (2004) Relationship of Preexisting Dengue Virus (DV) Neutralizing Antibody Levels to

Viremia and Severity of Disease in a Prospective Cohort Study of DV Infection in Thailand. *The Journal of Infectious Diseases* 189, 990–1000.

Galler R, Marchevsky RS, Caride E, Almeida LF, Yamamura AM & Jabor AV (2005) Attenuation and immunogenicity of recombinant yellow fever 17D-dengue type 2 virus for rhesus monkeys. *Brazilian journal of medical and biological research* 38, 1835-1846.

Gómez SY & Ocazonez RE (2007). *Revista Médica Chilena*. En Prensa

Gould LH & Fikrig E (2004) West Nile virus: a growing concern?. *Journal of Clinical Investigation* 113, 1102-1107.

Gould EA & Buckley A (1989) Antibody-dependent enhancement of yellow fever and Japanese encephalitis virus neurovirulence. *Journal of General Virology* 70, 1605-1608.

Gould EA, Buckley A, Groeger BK, Cane PA & Doenhoff M (1987) Immune enhancement of yellow fever virus neurovirulence for mice: studies of mechanisms involved. *Journal of General Virology* 68, 3105-3112.

Green S, Libraty DH, Laoprasopwattana K, Ennis FA & Rothman AL (2006) Measuring dengue enhancing antibodies: caveats. *Journal of Infectious Diseases* 193, 603-604

Gubler DJ (1998) Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews* 11, 480-496.

Guirakhoo F, Weltzin R, Chambers TJ, Zhang ZX, Soike K & Ratterree M (2000) Recombinant chimeric yellow fever-dengue type 2 virus is immunogenic and protective in nonhuman primates. *Journal of Virology* 74, 5477-5485

Guzman MG & Kouri G (2003) Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *Journal of Clinical Virology* 27, 1-13.

Guzman MG, Kouri G, Bravo J, Valdes L, Vazquez S & Halstead SB (2002) Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. *International The Journal of Infectious Diseases* 6, 118-124.

Guzman JR & Kron MA (1997) Threat of dengue haemorrhagic fever after yellow fever vaccination. *Lancet* 349,1841.

Halstead SB (2003) Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. *Advances in virus research* 60, 421-467

Halstead SB (1988) Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* 239, 476-481.

Halstead SB, Marchette NJ & O'rourke E (1978) Immunologically enhanced dengue virus infection of mononuclear phagocytes: a mechanism which may regulate disease severity. *Asian Journal of Infectious Diseases* 2, 85-93.

Halstead SB, Nimmannitya S & Cohen SN (1970) Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *Yale Journal of Biology and Medicine* 42, 311-328.

Heinz FX, Collett MS, Purcell RH, Gould EA, Howard CR & Houghton M (2000) Family *Flaviviridae*. In: *Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (eds MH Van Regenmortel, CM Fauquet, DH Bishop, EB Carstens, MK Estes, SM Lemon et al.) Academic Press, San Diego, Calif, pp. 859-878.

Johnson BW, Kosoy O, Martin DA, Noga AJ, Russell BJ, Johnson AA & Petersen LR (2005) West Nile virus infection and serologic response among persons previously vaccinated against yellow fever and Japanese encephalitis viruses. *Vector Borne Zoonotic Disease* 5, 137-145.

Johnson BW, Russell BJ & Lanciotti RS (2005) Serotype-specific detection of dengue viruses in a fourplex real-time reverse transcriptase PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 4977-4983

Kaufman BM, Nybakken GE, Chipman PR, Zhang W, Diamond MS & Fremont DH (2006) West Nile virus in complex with the Fab fragment of a neutralizing monoclonal antibody. *Proceedings of the National Academic of Science USA* 103, 12400–12404.

Kaufman BM, Summers PL, Dubois DR, Cohen WH, Gentry MK & Timchak RL (1989) Monoclonal antibodies for dengue virus prM glycoprotein protect mice against lethal dengue infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 41, 576-580.

Kaufman BM, Summers PL, Dubois DR, Eckels KH (1987) Monoclonal antibodies against dengue 2 virus E-glycoprotein protect mice against lethal dengue infection. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 36, 427–434.

Klasse PJ & Sattentau QJ (2001) Mechanisms of virus neutralization by antibodies. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 260, 87-108.

Kliks SC, Nisalak A, Brandt WE, Wahl L & Burke DS (1989) Antibody-dependent enhancement of dengue virus growth in human monocytes as risk factor for

dengue hemorrhagic fever. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 40, 444-451.

Kreil TR, Maier E, Fraiss S & Eibl MM (1998) Neutralizing antibodies protect against lethal flavivirus challenge but allow for the development of active humoral immunity to a nonstructural virus protein. *Journal of Virology* 72, 3076-3081.

Kurane I & Takasaki T (2006) Immunogenicity and protective efficacy of the current inactivated Japanese encephalitis vaccine against different Japanese encephalitis virus strains. *Vaccine* 18, 33-35.

Kurane I, Zeng L, Brinton MA & Ennis FA (1998) Definition of an epitope on NS3 recognized by human CD4+ cytotoxic T lymphocyte clones cross-reactive for dengue virus types 2, 3, and 4. *Virology* 240, 169-174.

Lambeth CR, White LJ, Johnston RE & Silva AM (2005) Flow cytometry-based assay for titration dengue virus. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 3267-3272.

Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ & Vorndam AV (1992) Rapid Detection and Typing of Dengue Viruses from Clinical Samples by Using Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 30, 545-551.

Laoprasopwattana K, Libraty DH, Endy TP, Nisalak A, Chunsuttiwat S, Vaughn DW, et al. (2005) Dengue virus (DV) enhancing antibody activity in preillness plasma does not predict subsequent disease severity or viremia in secondary DV infection. *Journal of Infectious Diseases* 192, 510-519

Lim CS, Chua JJ, Wilkerson J & Chow VT (2006) Differential dengue cross-reactive and neutralizing antibody responses in BALB/c and Swiss albino mice induced by immunization with flaviviral vaccines and by infection with homotypic dengue-2 virus strains. *Viral immunology* 19, 33-41

Linderbach BD & Rice CM (2001). *Flaviviridae: the viruses and their replication*. In: *Fields Virology*, 4th edn., (eds DM Knipe & PM Howley). London, New York & Tokyo: Lippincott Williams & Wilkins, pp. 991-1042.

Lobigs M, Pavy M & Hall R (2003) Cross-protective and infection-enhancing immunity in mice vaccinated against flavivirus belonging to the Japanese encephalitis virus serocomplex. *Vaccine* 21, 1572-1579.

Lobigs M, Arthur CE, Müllbacher A & Blanden RV (1994) The flavivirus nonstructural protein NS3 is a dominant source of cytotoxic T cell peptide determinants. *Virology* 202, 195-201.

- Malewicz B & Jenkin HM (1979) Development of dengue virus plaque under serum-free overlay medium. *Journal of Clinical Microbiology* 9, 609-614.
- Mandel B (1978) Neutralization of animal viruses. *Advances in Virus Research* 23, 205-268
- Mandl CW, Guirakhoo W, Holzmann H, Heinz FX & Kunz C (1989) Antigenic structure of the Flavivirus envelope protein E at the molecular level, using tick-borne encephalitis virus as a model. *Journal of Virology* 63, 564-571.
- Manning JS & Collins JK. (1979) Effects of cell culture and laboratory conditions on type 2 dengue virus infectivity. *Journal of Clinical Microbiology* 10, 235-239
- Martin DA, Biggerstaff BJ, Allen B, Johnson AJ, Lanciotti RS & Roehrig JT (2002) Use of immunoglobulin M cross-reactions in differential diagnosis of human flavivirus encephalitis infections in the United States. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 9, 544-549.
- Ministerio de la protección Social. Evolución de algunos indicadores de interés en salud pública (2006). Informe ejecutivo, Sistema Nacional de Vigilancia (SIVIGILA).
- Modis Y, Ogata S, Clements D & Harrison SC (2003) A ligand-binding pocket in the DENV virus envelope glycoprotein. *Proceedings of the National Academic of Science USA* 100, 6986-6991.
- Monath TP (2001) Yellow fever: an update. *Lancet Infectious Disease* 1, 11-20.
- Monath T, Craven R, Adjuikiewicz A, et al. (1980) Yellow fever in the Gambia, 1978-1979: epidemiologic aspect with observations on the occurrence of Orungo virus infections. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 29, 912-928.
- Monath TP (1979) Pathobiology of the flaviviruses. In Schlessinger S, Schlessinger MJ (eds.): "The Togaviridae and Flaviviridae". New York: Plenum Press, pp 375-440. 1979
- Morens DM (1994) Antibody-dependent enhancement of infection and the pathogenesis of viral disease. *Clinical Infectious Disease* 19, 500-512.
- Morens DM, Halstead SB, Repik PM, Putvatana R & Raybourne N (1985) Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semimicro methods in BHK-21 cells: comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization. *Journal of Clinical Microbiology* 22, 250-254.

- Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N & Chairunsri A (2003) Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nature Medicine* 9, 921-927.
- Nimmannitya S, Halstead SB, Cohen SN & Margiotta MR (1969) Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-1964. I. Observations on hospitalized patients with hemorrhagic fever. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 18, 954-971.
- Nybakken GE, Oliphant T, Johnson S, Burke S, Diamond MS & Fremont DH (2005) Structural basis of West Nile virus neutralization by a therapeutic antibody. *Nature* 437, 764–769.
- Ocazonez RE, Gómez SY & Cortés FM (2007) serotipo, patrón de infección y dengue hemorrágico en área endémica colombiana. *Revista salud pública* 9, 262-274.
- Ocazonez RE, Cortés FM, Villar LA & Gómez SY (2006) Temporal distribution of dengue virus serotypes in Colombian endemic area and dengue incidence. Re-introduction of dengue-3 associated to mild febrile illness and primary infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 101, 1-7.
- Ocazonez RE, Cortés F & Villar LA (2005) Vigilancia del dengue basada en el laboratorio: diferencias en el número de casos y virus aislados según la recolección del suero y la prueba serológica. *Colombia Médica* 36, 65-72.
- Oliphant T, Engle M, Nybakken GE, Doane C, Johnson S & Huang L (2005) Development of a humanized monoclonal antibody with therapeutic potential against West Nile virus. *Nature Medicine* 11, 522–530.
- Organización Panamericana de la Salud. PAHO-Región de las Américas (2004) Brote de fiebre amarilla selvática en Colombia. Boletín 2: Enero 22.
- Pan American Health Organization (2005) number of reported cases of dengue and dengue hemorrhagic fever (DHF), region of the Americas (by country and subregion). <http://paho.org/English/AD/DPC/CD/dengue-cases-2005.htm>.
- Prías E, Bernal C & Morales A (1968) Isolation of Ilhéus virus from man in Colombia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 17, 112-114.
- Price W, Casals J, Thind I, et al. (1973) Sequential immunization procedure against Group B arbovirus using living attenuated 17D yellow fever virus, living attenuated Langkat E5 virus, and living attenuated dengue 2 virus (New Guinea C isolates). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 22, 509-523.

- Price W & Thind I (1971) Protection against West Nile virus induced by a previous injection with dengue virus. *American Journal of Epidemiology* 94, 596-606.
- Pugachev KV, Guirakhoo F & Monath TP (2005) New developments in flavivirus vaccines with special attention to yellow fever. *Current Opinion in Infectious Disease* 18, 387-394
- República de Colombia. Ministerio de Salud Pública. Resolución 8430 de 1993.
- Rey FA, Heinz FX, Mandl C, Kunz C & Harrison SC (1995) The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature* 375, 291-298.
- Roehrig JT, Bolin RA & Kelly RG (1998) Monoclonal antibody mapping of the envelope glycoprotein of the DEN 2 virus, Jamaica. *Virology* 246, 317-328.
- Russell PK, Yuill TM, Nisalak A, Udomsakdi S, Gould DJ & Winter PE (1968) An insular outbreak of dengue hemorrhagic fever. II. Virologic and serologic studies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 17, 600-608.
- Sabin A (1952) Research on dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg* 1, 30-50.
- Sabin AB (1950) The dengue group of viruses and its family relationships. *Bacteriological reviews* 14, 225-232.
- Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, Viriyapongse S, Jatanasen S & Salitul V (1984) Risk factors in dengue shock syndrome: A prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand I. The 1980 outbreak. *American Journal of Epidemiology* 120, 653-669.
- Sather GE & Hammon W (1970) Protection against St. Louis encephalitis and West Nile arboviruses by previous dengue virus (types 1-4) infection. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 135, 573-578.
- Schlesinger JJ, Brandriss MW & Walsh EE (1987) Protection of mice against dengue 2 virus encephalitis by immunization with the dengue 2 virus non-structural glycoprotein NS1. *Journal of General Virology* 68, 853-857.
- Schlesinger RW, Gordon I, Frankel JW, Winter JW, Patterson PR & Dorrance WR (1956) Clinical and serologic response of man to immunization with attenuated dengue and yellow fever viruses. *Journal of Immunology* 77, 352-364.
- Scott RM, Eckels KH, Bancroft WH, Summers PL, McCown JM, Anderson JH & Russell PK (1983) Dengue 2 vaccine: dose response in volunteers in relation to yellow fever immune status. *The Journal of Infectious Diseases* 148, 1055-1060.

- Sheldon LS & Nicola MT (1969) Yellow fever virus. II Factors affecting the plaque neutralization test, *applied microbiology* 18, 736-743
- Stiasny K, Kiermayr S, Holzmann H & Heinz FX (2006) Cryptic properties of a cluster of dominant flavivirus cross-reactive antigenic sites. *Journal of Virology* 80, 9557-9568
- Stim TB (1970) Dengue virus plaque development in simian cell systems I. Factors influencing virus adsorption and variables in the agar overlay medium. *Applied Microbiology* 19, 751-756
- Takasaki T, Yabe S, Nerome R, Ito M, Yamada K & Kurane I (2003) Partial protective effect of inactivated Japanese encephalitis vaccine on lethal West Nile virus infection in mice. *Vaccine* 21, 4514-4518.
- Tarr GC & Hammon WM (1974) Cross-protection between group B arboviruses: resistance in mice to Japanese B encephalitis and St. Louis encephalitis viruses induced by Dengue virus immunization. *Infection and Immunity* 9, 909-915.
- Tesh RB, Travassos da Rosa AP, Guzman H, Araujo TP & Xiao SY (2002) Immunization with heterologous Flaviviruses protective against fatal West Nile encephalitis. *Emerging Infectious Disease* 8, 245-251.
- Thein S, Aung MM, Shwe TN, Aye M, Zaw A, Aye K, Aye KM & Aaskov J (1997) Risk factors in dengue shock syndrome. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 56, 566-572.
- Vasconcelos PF (2003) Yellow fever. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 36, 275-293.
- Vaughn DW, Green S, Kalayanarooj S, Innis BL, Nimmannitya S & Suntayakorn S (2000). Dengue viremia titer, antibody response pattern, and virus serotype correlate with disease severity. *The Journal of Infectious Diseases* 181, 2-9.
- Webb HE, Wight DG, Platt GS & Smith CE (1968) Langat virus encephalitis in mice. I. The effect of the administration of specific antiserum. *The Journal of Hygiene* 66, 343-354.
- Yamada K, Takasaki T, Nawa M, Yabe S & Kurane I (2003) Antibody responses determined for Japanese dengue fever patients by neutralization and hemagglutination inhibition assays demonstrate cross-reactivity between dengue and Japanese encephalitis viruses. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 10, 725-728.

Yamshchikov G, Borisevich V, Kwok CW, Nistler R, Kohlmeier J & Seregin A (2005) The suitability of yellow fever and Japanese encephalitis vaccines for immunization against West Nile virus. *Vaccine* 23, 4785-4792.

Zhang MJ, Wang MJ, Jiang SZ & Ma WY (1989) Passive protection of mice, goats and monkeys against Japanese encephalitis with monoclonal antibodies. *Journal of Medical Virology* 29, 133-138, 1989.

Zivny J, Kurane I, Leporati AM, Ibe M, Takiguchi M, Zeng LL, Brinton MA & Ennis FA (1995) A single nine-amino acid peptide induces virus-specific, CD8+ human cytotoxic T lymphocyte clones of heterogeneous serotype specificities. *J Exp Med* 182, 853-863.