

X.-ADENOVIRUS

Prof. Angel Goyenechea Hernández y Lic. Grehete González Muñoz MsC

INTRODUCCION.

Los adenovirus (Adv) fueron aislados por primera vez en 1953 por Rowe, y posteriormente fueron ubicados en la familia Adenoviridae, que incluye dos géneros: Mastadenovirus y Aviadenovirus. El primero agrupa a los agente virales causantes de infecciones en mamíferos, y el segundo, a aquellos que causan infección en aves.

Los Adv constituyen partículas virales con un diámetro de 70 a 110 nm, poseen una cápside de simetría cúbica, carentes de envoltura y con un genoma lineal de ADN de cadena doble. Hasta la fecha han sido reconocidos 49 serotipos, los que se han distribuidos en seis grupos (A – F) al tener en cuenta sus propiedades físicas, químicas, y biológicas tales como: hemaglutinación de hematíes de ratas y monos rhesus; oncogenicidad en roedores, composición de bases y homología de ADN, relación de antígenos tumorales, longitud de la fibra y perfiles de restricción y patrones de polipéptidos virales.

Las Infecciones Respiratorias Agudas (IRA) causadas por Adv ocurren en todo el mundo, pudiendo un sólo serotipo causar enfermedades diferentes e inversamente, más de un serotipo puede causar la misma enfermedad. Se presentan en brotes epidémicos y en casos esporádicos.

Las patologías respiratorias más frecuentes causadas por Adv se señalan en el cuadro siguiente:

Serotipo	Enfermedad	Indicadores de riesgo
1 – 3, 5 – 7.	Faringitis aguda.	Lactantes y niños pequeños.
3, 7, 14.	Fiebre faringoconjuntival.	Niños en edad escolar.
3,4,7,14,21.	I.R.A.	Reclutas militares.
1, 3, 7.	Neumonía.	Lactantes y niños pequeños.
4, 7.	Neumonía.	Reclutas militares.
5.	Síndrome similar al pertussis	Lactantes y niños pequeños.

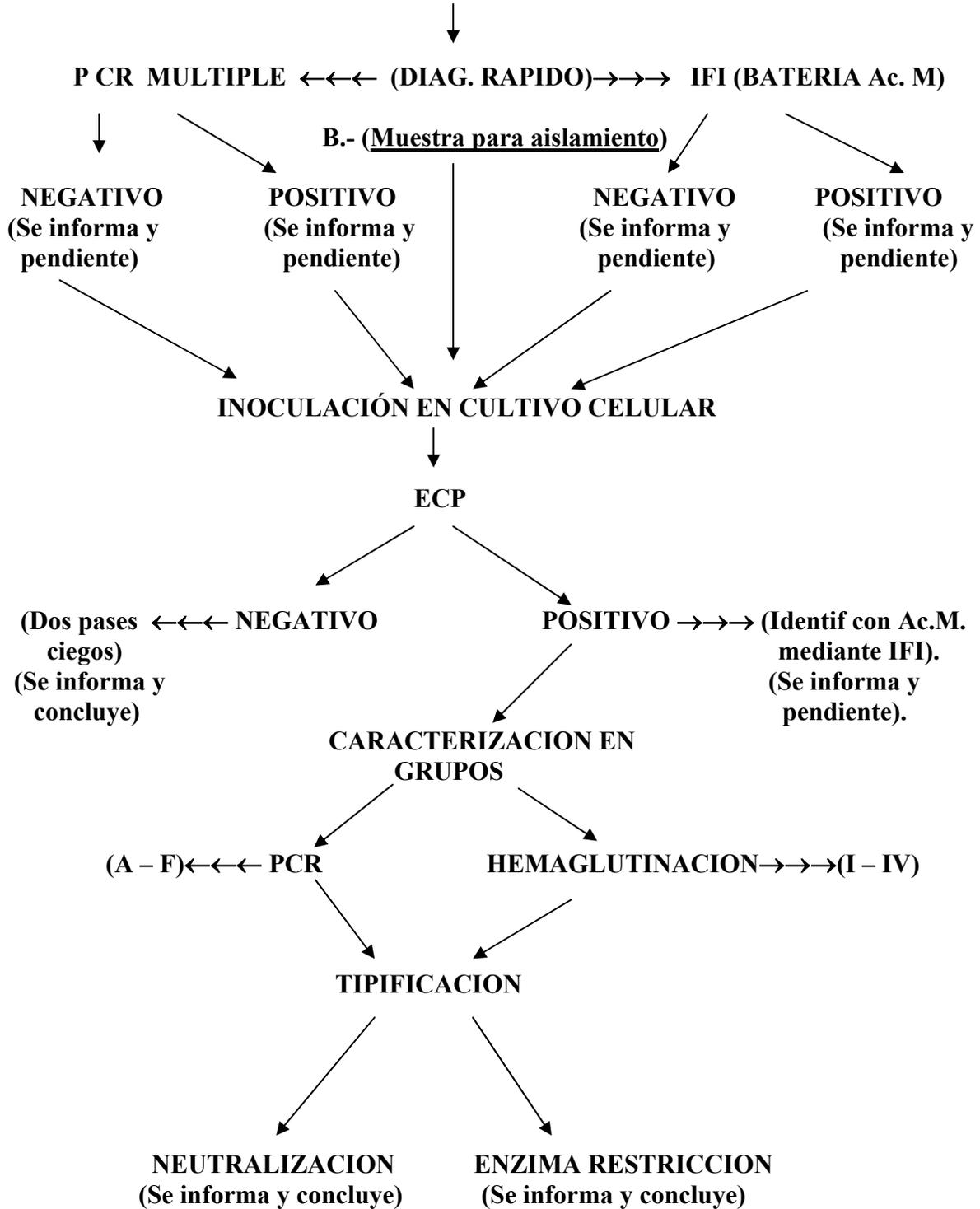
Los Adv son virus estables y pueden recuperarse de muestras clínicas con relativa facilidad.

Referencias:

1.-Goyenechea A, Cancio R, Pumaruega T. Adenovirus, En: Llop A, Valdés-Dapena M, Zuazo J. Microbiología y Parasitología Médica. Capítulo 59 pp 67 – 78. Editorial Ciencias Medicas. Ciudad de la Habana. Cuba. 2001

FLUJO DE TRABAJO

A.-Muestra clínica para:



I.- COLECCIÓN, TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE LA MUESTRA:

Se describe en el Capítulo I.

II.- DIAGNÓSTICO RÁPIDO

II.1- PCR -MÚLTIPLEX.

Se describe en el Capítulo I

Si el resultado es NEGATIVO se inocula en cultivo celular para aislamiento, y se informa como NEGATIVO por PCR Múltiple pendiente de otras investigaciones.

Si es POSITIVO, se inocula en cultivo de células para aislamiento, identificación y caracterización. El caso se informa como POSITIVO, pendiente de otras investigaciones.

II.2- INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI).

Se describe en un acápite general.

Si el resultado es NEGATIVO, se inocula para aislamiento, identificación y caracterización. El caso se informa como NEGATIVO a IFI, pendiente de otras investigaciones.

Si es POSITIVO se procede igual que anteriormente y se informa POSITIVO a IFI.pendiente de otras investigaciones.

III.- AISLAMIENTO VIRAL:

El aislamiento viral de muestras de pacientes se obtiene eficientemente en células de origen humano. Las células embrionarias de riñón humano (HEK) son las mejores para la replicación de todos los Adv humanos. Sin embargo, las líneas epiteliales continuas HeLa, Hep-2, KB son muy sensibles, pero son difíciles de mantener por largos períodos de tiempo (28 días), que es el requerido para aislar algunas cepas de Adv (1) La rapidez con que aparece el efecto citopático (ECP) depende del serotipo y de la concentración de virus en la muestra. El ECP, que consiste en redondeamiento, agrandamiento, refringencia y agrupamiento de células infectadas formando grupos que semejan “racimos de uvas”, se inicia en la periferia de la monocapa y posteriormente se disemina; aunque algunos Adv del grupo B no causan esta agrupación celular. Estos virus además, aumentan la glicólisis en las células de línea continua e inducen la misma gran cantidad de ácido. Puede aparecer dentro de las 24 horas de inoculadas las muestras clínicas, un efecto tóxico sobre las células. En estos casos se debe congelar y dar un nuevo pase. (2,3).

Referencias:

- 1.-Krisher KK, Menegus MA. Evaluation of three types of cell culture for recovery of Adenovirus from clinical specimens. J Clin Microbiol. 1987; 25: 1323 – 1324.)
- 2.-Pumariega T. Identificación y Caracterización de Adenovirus aislados de niños con infección respiratoria aguda en ciudad de la Habana. 1996. Tutor Lic. Clara Savón PhD. Asesores Lic Mayra Muné MsC y Prof Angel Goyenechea. Ciudad de la Habana. Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. 1997. Trabajo de Diploma.
- 3.-Pumariega T, Savón C, Muné M, Cancio R, González G, Valdivia A, González Z, Goyenechea A. Isolation and Identification of Adenovirus in Hospitalized Children, under Five Years, with Acute Respiratory Disease, in Havana, Cuba.2000,Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol 95(6): 859 – 861.

III.1 AISLAMIENTO:

Equipos:

Gabinete de Seguridad Clase II.

Microscopio.

Incubadora de 35°C - 37°C.

Refrigerador a 4°C.

Congelador de -20°C y -70°C.

Materiales y reactivos

Tubos de cultivos sembrados con células de HeLa, a razón de 150,000 células/mL

Medio de mantenimiento: Medio esencial mínimo (MEM) , con aminoácidos no esenciales

Suero bovina fetal (SBF) al 2%.

Penicilina y estreptomycin

Juego de micropipetas (graduación variable).

Puntas: 50,100,1000 µLs.

Gradilla para los tubos de cultivo celular.

Guantes

Batas.

III.2.-PROCEDIMIENTO

- Observar los tubos de células HeLa, antes de inocular para asegurarse de que presentan una monocapa celular semiconfluyente.
- Eliminar el medio de mantenimiento antes de inocular.

- Inocular dos tubo de células HeLa con 200 μ L de la muestra clínica por cada tubo y se dejan en contacto a temperatura ambiente por una hora.
- Añadir 1mL de medio de mantenimiento e incubar a 35 - 36°C.
- Dejar dos tubos sin inocular como control celular para evidencia de degeneración celular no específica y que pueden ser utilizados como control negativo en la prueba de identificación.
- Observar los tubos diariamente al microscopio por un período de alrededor de 10 – 12 días (si el control celular se mantiene normal).
- Realizar cambio de medio cada 2 – 4 días para suministrar medio fresco a las células
- Si no hay ECP se congela a -70°C para dar pase ciego.
- Volver a realizar todo el proceso como antes y si en este segundo pase no aparece el ECP, el caso se da como NEGATIVO.(En total se ejecuta una siembra primaria y dos pases ciegos para dar un caso como NEGATIVO).
- En cualquier momento de la observación que aparezca ECP, un tubo se congela a -70°C (para posteriores pases y realizar estudios de caracterización y serotipificación) y con el otro tubo y un tubo control se procede a la identificación.

IV.-IDENTIFICACIÓN

Para la identificación, se pueden utilizar diferentes ensayos serológicos, pero el que más se recomienda, es la Inmunofluorescencia Indirecta utilizando un anticuerpo monoclonal específico de Adv, basado en la propiedad del antígeno soluble de las capsómeras que es común a todos los Adv humanos.(1)

Referencias:

1 -Horwitz MS. Adenovirus. En: Fields MR, Knipe DM, Chanock RM, eds. Virology New York: Raven Press 1990: 1679 – 1942.

V.-CARACTERIZACIÓN EN SUBGRUPOS (A – F) Y/O GRUPOS HEMAGLUTINANTES (I – IV).

El objetivo de esta caracterización es facilitar la identificación en serotipos al agrupar todos los serotipos en grupos más reducidos, y dentro de ellos se identifican los que más frecuentemente producen IRA.

Para la caracterización se pueden utilizar dos métodos: Mediante PCR que identifica los subgrupos A – F, o en base las propiedades hemaglutinantes de eritrocitos de ratas o de monos rhesus en grupos I – IV.

V.1.-Identificación en subgrupos de los adenovirus aislados mediante PCR múltiple.

El ensayo de PCR se ha convertido en una alternativa muy útil para detección de Adv, mostrando rapidez, sensibilidad y precisión en la identificación molecular. La identificación de Adv en grupos específicos por esta técnica ha demostrado ser mejor que las técnicas clásicas. Este ensayo ha sido usado también para la clasificación de los Adenovirus.

Equipos:

Gabinete de Seguridad Clase II

Centrifuga refrigerada para viales.

Bloque térmico o baño de agua.

Termociclador

Cámara y Fuente de electroforesis

Transiluminador

horno microondas

Materiales y Reactivos:

Viales de 0.5mL

Micropipetas

Puntas para micropipetas con filtro

Guantes.

Batas.

PBS estéril

Tampón lisis

Tampón TNE 5X

Fenol – cloroformo

CHISAM: Cloroformo + alcohol isoamílico (24:1).

Tris-HCl 10 mM pH 8.3

MgCl₂ 1.5 mM

KCl 50mM

SDS 10%
 Proteinasa K
 Etanol absoluto
 Etanol 70%
 Mezcla o tampón de reacción para la amplificación del ADN
 Patrón de peso molecular VII Bioscience
 Agarosa
 Bromuro de etidio 0.1 µg/mL

Cebadores:	Talla (pares de bases)
Genéricos (A-F) (Hexón) 5'—3'	
Ad1 TTCCCATGGCICAYAACAC	482
Ad2 CCCTGGTAKCCRATRRTTGTA	
Subgénero B (Fibra)	
AdB1 TSTACCCYTATGAAGATGAAAGC	670-772
Adb2 GGATAAGCTGTAGTRCTKGGCAT	
Subgénero C (Fibra)	
AdC1 TATTCAGCATCACCTCCTTTCC	1988-2000
AdC2 AAGCTATGTGGTGGTGGGGC	
Subgénero E (Fibra)	
AdE1 TCCCTACGATGCAGACAACG	1205-1221
AdE2 AGTGCCATCTATGCTATCTCC	

Instrucciones especiales:

Todos los materiales para el PCR deben estar estériles y horneados a 80°C. La extracción del ADN viral puede realizarse en la mesa de trabajo sin necesidad de utilizar el Gabinete de Seguridad Clase II.

V.1.1.-Extracción del ADN viral.

Lisado (todo sobre hielo)

Del Frasco de cultivo con un 80 –90% de efecto citopático

- Eliminar el medio de cultivo
- Lavar la monocapa con 1 mL de PBS estéril y frío
- Añadir 200µL de Buffer lisis frío y estéril, mover hasta aspecto denso y transparente y resuspender. Pasar a un tubo.
- Tomar 50 µL del lisado
 - 150 µL de agua destilada
 - 60 µL de Buffer TNE 5X
 - 30 µL de SDS 10%
 - 10 µL Proteinasa K (10 mg/ mL)
- Calentar a 50⁰C durante 1 hora
- Añadir 300 µL de Fenol-cloroformo, agitar con la mano hasta observar un aspecto blanquecino, centrifugar a 10 000 r.p.m. de 5 a 10 minutos .a temperatura ambiente Pasar la fase acuosa a un nuevo tubo.
- Agregar 300 µL de Fenol – CHISAM (volumen/volumen) y repetir procedimiento anterior pasando la fase acuosa a un nuevo tubo
- Agregar 300 µL de CHISAM y repetir procedimiento anterior pasando la fase acuosa a un nuevo tubo
- Precipitar con 2,5 volúmenes (aproximadamente 1mL) de etanol absoluto y guardar a –20⁰C toda la noche.
- Centrifugar 15 min. A 10 000 r.p.m. a 4⁰C.
- Lavar el pellet con etanol al 70% y centrifugar a 10 000 r.p.m. durante 10 min. a 4⁰C
- Secar el pellet al vacío o en flujo laminar y resuspender en 10µL de Agua bidestilada.

V.1.2.-AMPLIFICACIÓN Y DETECCIÓN

Añadir al tubo de PCR 45 µL de la mezcla de reacción y 5µL del ADN extraído para un volumen final de 50 µL.

Mezcla de Reacción

Buffer Taq Pol 5µL

MgCl₂ (1.5mM) 4µL

DNTP (25mM) 1µL
 Taq Pol 1 U 0,5µL
 Cebadores (0.2µM) 1µL

Agua destilada hasta completar volumen

Se colocan los tubos en el termociclador, según programa

5 min. 94⁰C (desnaturalización previa)

1 min. 94 ⁰ C (desnaturalización)	} 30 ciclos
45 seg. 54 ⁰ C (hibridación)	
2 min. 72 ⁰ C (extensión)	

5 min. 72⁰C (extensión final)

10 µL del producto de PCR será visualizado mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.y se visualizan las bandas en un transiluminador de luz U.V.

Los resultados se interpretan según la talla de las bandas obtenidas.

V.1.3.-SOLUCIONES:

PBS para 1 litro

NaCl	8g
KCl	0.2g
KH ₂ PO ₄	0.2g
Na ₂ HPO ₄	1.15g
H ₂ O	1L

Tampón Lisis Para un volumen final de 50mL

TRIS-ClH 10mM pH 8.3 0.5 mL

EDTA 10mM 1 mL

NaCl 10mM 0.1 mL

SDS 10% 2.5 mL

TampónTNE 5X Para un volumen final de 25mL

TRIS-HCl 50mM pH8.3 6.25mL (partiendo de solución 1M)

EDTA 5mM 1.25mL (partiendo de solución 0.5M)

NaCl 50mM 6.25mL (partiendo de solución 1M)

REFERENCIAS:

1.-Wanhong Xu, Mike C. McDonough, and Dean Erdman. Species-Specific Identification of Human Adenoviruses by a Multiplex PCR Assay. J.Clin.Microbiol..2000;38: 4114-4120.

V.2.-HEMAGLUTINACIÓN.

Equipos:

Centrífuga refrigerada.

Incubadora a 37°C

Congeladores de -20°C y -70°C

Materiales y Reactivos:

Placas de microtitulación, de poliestireno, fondo en U

Hematíes de ratas y mono rhesus al 0.4% en PBS.

Micropipetas.

Puntas: 50,100,1000µL.

Tubos de centrifuga de 15 mL

Jeringuillas de 5, 10 mL

Agujas No. 20 x 1 pulg

Tubos de cultivo de células

Guantes.

Batas.

Cepas controles de Adv 3, 5 y 23.

V.2.1.-Soluciones:

Alsever:

NaCl -----0.42 g

Dextrosa ----- 2.05 g

Ac. Cítrico ----- 0.80 g.

H2O (dest) – 100.0 mL

El pH de 6.0 – 6.2, se esteriliza por filtración o por autoclave 10 lbs – 10 min

Solución Tamponada Fosfatos (PBS) (descrita en el apartado de PCR)

Diluyente: solución salina tamponada con fosfato (PBS: 0,01 M pH 7,2). Para realizar la suspensión de eritrocitos se le añadió a este diluyente, albúmina bovina fracción V a 0.1%

V.2.2.-Preparación de los antígenos hemaglutinantes:

Los casos clínicos positivos por IFI a Adv y las cepas controles de Adv 3, 5 y 23 se inoculan en 5 tubos de cultivo de células HeLa y cuando el ECP es de un 80%, los cultivos se congelan y descongelan 3 veces, y se clarifican por centrifugación a 1500 r.p.m., durante 20 min. a 4°C. Estos antígenos hemaglutinantes se conservan a -20°C en alícuota hasta su uso. El mismo proceso se sigue con 3 tubos del control celular.

V.2.3.-Preparación de la suspensión de eritrocitos al 0.4%:

a) **Ratas:** Se sacrifica la rata y se obtiene sangre de la región axilar con un capilar. Se deposita en un tubo de centrifuga con solución Alsever a volúmenes iguales y se lava cuidadosamente. Se lavan los hematies 4 veces con PBS, centrifugando y descartando el sobrenadante. Con el botón de eritrocitos sedimentados se prepara una suspensión al 0.4% en PBS cantidad suficiente para la prueba.

b) **Monos:** se obtiene la sangre por punción venosa estéril del brazo y se procede como se señaló anteriormente.

V.2.4.-PROCEDIMIENTO:

En placas de microtitulación de 96 pocillos, con 8 filas (A – G) y 12 columnas (1 – 12) procedemos del siguiente modo, por ejemplo para identificar 3 casos clínicos:

Esquema:

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

- En las filas A – G, columnas 2 – 6 y 8 – 12 dispensar 50 µL de PBS y en la fila H en todas las columnas (1 – 12).
- En las filas A, B y C en las columnas 1, 2, 7 y 8, dispensar 50 µL de los tres casos a investigar respectivamente.
- En las filas D, E y F en las columnas 1, 2, 7 y 8, dispensar 50 µL de los controles virales: Adv 3, Adv 5 y Adv 23 respectivamente.
- En la fila G, en las columnas 1, 2, 7 y 8, dispensar 50 µL del control celular.
- En la fila H, en todas las columnas 1 – 12, dispensar 50 µL de PBS.
- En las filas A – G desde la columna 2 hasta la 6, realizar diluciones de los antígenos (1/2 hasta 1/32) y repetir las diluciones desde la columna 8 – 12.
- Añade 50 µL de la suspensión de eritrocitos de ratas al 0.4% a todas las filas A – H en las columnas 1 - 6 y los eritrocitos de monos al 0.4% en las filas A – H en las columnas 7 – 12.
- Incuba dos horas a 37°C y realizar la lectura.

V.2.5.-Interpretación:

En la fila H: Controles de eritrocitos,todas las columnas (1 – 12) deben de dar botones de eritrocitos que resbalan al inclinarse la placa.

En la fila G: todas las columnas (1 – 12) deben de dar botones de eritrocitos que resbalan al inclinarse la placa.

En las filas D, E y F deben presentarse los patrones de hemaglutinación de los Grupos I al III que se corresponden a los controles virales utilizados:

Grupo I: Aglutinación total de eritrocitos de monos (columnas 7 – 12) de acuerdo con el título y botón (no aglutinación) con eritrocitos de ratas (columnas 1– 6). Este grupo comprende los serotipos: **3, 7, 11, 14 16, 21, 34 y 35.**

Grupo II: Aglutinación total de los eritrocitos de ratas (columnas 1 – 6) de acuerdo con el título y botón (no aglutinación) con eritrocitos de mono (columnas 7 – 12). Este grupo comprende los serotipos: **8 – 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22 – 30, 32, 33, 36 – 39, 42 – 49.**

Grupo III: Aglutinación parcial de los eritrocitos de rata (columnas 1– 6) de acuerdo con el título y botón (no aglutinación) con eritrocitos de monos (columnas 7 – 12). Este grupo comprende los serotipos **1, 2, 4 - 6, 40 y 41.**

Grupo IV: No aglutinan. Este grupo comprende los serotipo **12, 18 y 31.**(No se chequean)

(Nota: están marcados en negritas los serotipos de importancia en las IRA).

Referencias:

1 -Hirholzer JC, Suggs MT. Standarized viral hemagglutination and hemagglutination –inhibition test: Standarization of erythrocyte suspensions. App Microb. 1969; 18: 816 – 823.

VI.-TIPIFICACIÓN.

Para la serotipificación podemos utilizar dos métodos, el análisis de restricción del genoma viral o la prueba de neutralización.

VI.1.-ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN DEL GENOMA VIRAL.

La caracterización del ADN viral con endonucleasa de restricción (ER), ha sido usada para completar la identificación de aislamientos clínicos. (1). El descubrimiento de las ER, que cortan el ADN en fragmentos, fue un hecho relevante, en primer lugar, porque provee de sitios específicos para realizar el mapeo físico de ADN; segundo, porque la capacidad de producir fragmentos de ADN específicos por digestión con ER hace posible purificar esos fragmentos por clonaje molecular; tercero, porque la especificidad de esos cortes ha sido utilizada para subclasificar familias virales y por último porque los fragmentos generados por la digestión con ER, son sustratos básicos para una amplia variedad de manipulaciones enzimáticas que ahora son posibles. (2) Las ER reconocen secuencias cortas de ADN y cortan ambas cadenas en sitios

específicos o en adyacentes a las secuencias de reconocimientos. Existen tres tipos diferentes de tales enzimas:

Tipo I: Reconocen secuencias específicas pero cortan en una zona adyacente.

Tipo II: Cortan dentro de la secuencia específica reconocida.

Tipo III: son similares al tipo I y consisten en múltiples subunidades codificadas por diferentes genes.

Los de uso más generalizado son las del Tipo II. (3) En el caso de la familia Adenoviridae, la digestión del ADN con ER se ha aplicado fundamentalmente en la taxonomía, estudios de epidemiología molecular y tipificación de cepas, puesto que el análisis de diferentes patrones de restricción ha permitido determinar la relación genética de los Adv humanos y han hecho posible la existencia de patrones de restricción de referencia para un amplio rango de tipos de Adv, lo cual ha permitido el uso mantenido de esta técnica y su introducción en laboratorios de diagnóstico.(4)

V11.1.-DIGESTIÓN CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Equipos:

Termociclador

Baño de agua.

Transiluminador de luz UV

Cámara y fuente de electroforesis.(ya descritos)

Materiales y Reactivos:

Enzima: Bam – H1 (Amersham, United Kingdon) y Hind III (Promega) 10 u/μL.

Tampón de enzima correspondientes (Amersham, United Kingdon) y B (Promega) 10x.

ADN viral (previamente extraído), incluyendo el de las cepas patrones Adv 4 y 5 (ya descrito).

Colorante de electroforesis (ya descrito)

Marcador de peso molecular: Lambda ADN digerido con Hind III (Promega) 487 μg/mL

Agarosa al 0.8 – 1.5 % (ya descrito)

TBE (ya descrito).

Bromuro de etidio (ya descrito)

VI.1.2.-PROCEDIMIENTO DE DIGESTIÓN:

- Realizar una mezcla de digestión que incluye: 1 µg de ADN, 2 µL de la enzima (20 unidades), tampón de la enzima 10x y agua bidestilada estéril, hasta completar un volumen de 30 µL.
- Incubar la mezcla a 37°C 1 hora.
- Para la detección del producto digerido, se aplican 20µL de la mezcla y 4 µL del colorante de electroforesis, aplicándose en un gel de agarosa (0.8 – 1.5%) con TBE y Bromuro de etidium como se describió anteriormente.
- Dejar migrar por 1 hora.
- Utilizar el marcador de peso molecular y 2 controles positivos que corresponden a ADN extraídos de cepas de Adv 4 y 5 con los que se siguió igual procedimiento.
- Visualizar las bandas de ADN en un transiluminador de luz UV
- Fotografiadas el gel.
- Analizar de los resultados e informarlos.

Referencias:

1. Horwitz MS. Adenovirus En: Fields MR, Knipe DM, Chanock MR eds. Virology. New York. Raven Press. 1990: 1679-1942
2. Current Protocols in Molecular Biology. Vol 2 New York: Green Publishing associates and Wiley-Interscience. 1989. Chapter 3)
3. Methods in Molecular Biology. New Jersey: Human Press Inc. 1993 Vol 16: 387 – 389.
4. Adrian TH, Wadell G, Hierholzer JC and Wigand R. ADN restrictions analysis of adenovirus prototypes 1 to 41. Arch Virol 1986: 91 (3 – 4): 277 – 290.)
5. Hirt B. Selective extraction of polyoma ADN from infected mouse cell cultures. J Mol Biol. 1967;26: 365 – 369)

VI.2.-PRUEBA DE NEUTRALIZACIÓN

Esta prueba es un procedimiento básico en Virología. Su alto grado de especificidad inmunológica hace que sea el patrón contra el que se evalúan otros procedimientos.

La neutralización viral es definida como la pérdida de la infectividad a través de la reacción de un virus con su anticuerpo específico.

La prueba de neutralización puede ser usada para identificar virus o determinar anticuerpos; el virus y el suero son llevados a un mismo tiempo bajo condiciones apropiadas, incubados e inoculados en sistemas de hospederos susceptibles en los cuales la presencia de virus superviviente puede ser detectada, (por ECP, hemadsorción, formación de placas, inhibición de la

hemaglutinación, inhibición del metabolismo celular, muerte o parálisis en animales, muerte o formación de pústulas en embriones de pollos).

Aunque simples en principios, las reacciones de neutralización son costosas tanto en tiempo como en material y sus interpretaciones pueden ser difíciles, principalmente debido a la variabilidad en el punto final de la titulación y a la posible inespecificidad de la neutralización.

En virología se aplican cuatro modalidades de la técnica de neutralización:

La reacción se puede emplear, utilizando un virus conocido, para determinar anticuerpos específicos en sueros. O bien a la inversa, para identificar un virus desconocido utilizando un suero hiperinmune conocido.

1.- Virus variable --- suero constante:

Se realizan diluciones del virus y se mezclan con dilución constante del suero. Esas mezclas son incubadas para permitir que el antígeno y el anticuerpo reaccionen. Cada mezcla virus-suero es inoculada en el sistema de hospedero sensible. La dilución del virus que infecte al 50% del sistema hospedero es considerada como la dilución punto final (ahí no hay anticuerpos neutralizantes). Se puede utilizar con los dos propósitos mencionados anteriormente: con un virus conocido, para determinar anticuerpos específicos en sueros pareados. Una diferencia de al menos dos logaritmos entre el segundo y el primero suero, muestra una neutralización significativa. Puede utilizarse a la inversa, enfrentando un el virus desconocido con un suero hiperinmune conocido, con lo cual podemos identificar al virus.

2.- Virus constante --- suero variable:

Una dilución de virus seleccionada previamente titulado, se mezcla con diluciones variable de suero (pueden ser pareados). Incubados y cada mezcla inoculadas en sistema de hospedero sensible. La mayor dilución de anticuerpo protector contra el virus es el título del suero. Una seroconversión o un aumento cuatro veces del título de anticuerpo del segundo suero con respecto al primero, es considerado como positivo.

3.- Virus constante --- suero constante:

Una dilución seleccionada del virus desconocido (determinado por título anterior) se mezcla con una dilución seleccionada del suero (conocido). Son incubados y cada mezcla inoculada en el sistema hospedero sensible. El virus es identificado si es neutralizado con la presencia de su anticuerpo específico.

4.- Virus variable --- suero variable:

Este tipo de neutralización hay que usarlo con cautela. El título de un virus desconocido y de un anticuerpo conocido no tienen que ser predeterminado. Se realizan diluciones variables del virus y del antisuero, se mezclan, incuban y son inoculados en un sistema sensible. Esta prueba, puede dar la máxima información acerca de ambos (virus—suero), pero a causa de su complejidad, no se utiliza de rutina.

VI.2.1.-TITULACIÓN DE ADENOVIRUS PARA SU SEROTIPIFICACIÓN.

PROCEDIMIENTO:

Equipos:

- Gabinete de seguridad Clase II
- Microscopio
- Incubadora de 37°C.
- Refrigerador a 4°C.
- Congelador -20°C y -70°C.

Materiales y Reactivos:

- Guantes.
- Batas.
- Tubos de cultivos de tejidos sembrados con células HeLa.(ya descritos).
- Medio de mantenimiento (ya descrito)
- Los aislamientos que se van a identificar.
- Micropipetas
- Puntas para micropipetas.
- Viales 1.5 mL
- Tubos plásticos de tapa de rosca de 13 x 100.
- Gradillas para los tubos de cultivos de celulares y viales.

VI.2.1.1.-PROCEDIMIENTO

- Ver al microscopio los tubos de HeLa antes de inocular, para ver si presentan una monocapa semiconfluente.
- Preparar las diluciones de los diferentes aislamientos que se van a serotipificar, desde 10^{-1} hasta 10^{-7} para titularlos, del siguiente modo:

- a)- Preparar una gradilla con 8 viales estériles de 1.5 mL.
- b)- Añadir 900µL de medio de mantenimiento a los primeros 7 tubos y al 8vo añadir 1 mL.
- c)- Añadir 100µL de la cepa que se va a tipificar al primer vial, Descartar la punta y con una nueva pipetear muy cuidadosamente varias veces (para mezclar bien, puede utilizarse un vortex suave), y pasar 100µL al segundo vial. Descartar la punta, etc, y repetir esta operación hasta el séptimo vial.
- Eliminar el medio de crecimiento que traen los tubos con las células HeLa.
 - Inocular 4 tubos de las células HeLa con 100µL de cada dilución (cambiando la punta en cada dilución) y del 8º tubo hacer la misma operación (que serán los controles celulares).
 - Incubar a temperatura ambiente por una hora.
 - Añadir 1 mL de medio de mantenimiento a todos los tubos.
 - Incubar a 37°C por 7 días.
 - Observar al microscopio diariamente y anotar en el protocolo de trabajo la lectura del ECP observado.
 - Al 7º día concluye la lectura y analizar el protocolo, para determinar por el método de Reed-Muench la dosis infectiva en cultivo tejido 50 (TCID 50).
- (ESTE PROCEDIMIENTO SE LE HACE A TODOS LOS AISLAMIENTOS QUE SE VAN A TIPIFICAR)

VI.2.1.2.- ANALISIS DE RESULTADOS

Protocolo de lectura de los tubos del titulo de los Adenovirus:

Dilución	Tubos	Días de Observación						
		1	2	3	4	5	6	7
10^{-1}	1	++	++++	----	----	----	----	----
	2	+++	++++	----	----	----	----	----
	3	++	++++	----	----	----	----	----
	4	++	++++	----	----	----	----	----
10^{-2}	1	+	+++	++++	----	----	----	----
	2	0	++	+++	++++	----	----	----
	3	+	++++	----	----	----	----	----
	4	0	+	+++	++++	----	----	----
10^{-3}	1	0	+	+++	++++	----	----	----
	2	0	0	+	++	++++	----	----
	3	0	++	++++	----	----	----	----
	4	0	+	+++	++++	----	----	----
10^{-4}	1	0	0	0	++	+++	++++	----
	2	0	0	+	+++	++++	----	----
	3	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	+	++	++++	----
10^{-5}	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	+	++	+++	++++	----
10^{-6}	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0
10^{-7}	1	0	0	0	0	0	0	0
	2	0	0	0	0	0	0	0
	3	0	0	0	0	0	0	0
	4	0	0	0	0	0	0	0

LOS CONTROLES CELULARES SE MANTUVIERON NORMALES DURANTE LOS 7 DIAS. + = 25% ECP; ++ = 50% ECP; +++ = 75% ECP; ++++ = 100 ECP.

A.- DATOS DEL ECP:

Dilución del virus	E.C.P.	E.C.P. (*)	NO E.C.P. (*)
10^{-1}	4/4	4	0
10^{-2}	4/4	4	0
10^{-3}	4/4	4	0
10^{-4}	3/4	3	1
10^{-5}	1/4	1	3
10^{-6}	0/4	0	4

(*) Las flechas indican la dirección en que debe hacerse la suma para obtener los valores acumulados.

B.- VALORES ACUMULADOS DE LOS DATOS DE ECP:

Dil. Del virus. 162n	E.C.P.	NO E.C.P.	E. C. P.	
			Relación	%
10^{-1}	16	0	16/16	100.0
10^{-2}	12	0	12/12	100.0
10^{-3}	8	0	8/8	100.0
10^{-4}	4	1	4/5	80.0
10^{-5}	1	4	1/5	20.0
10^{-6}	0	8	0/8	0.0

La distancia proporcional entre las dos diluciones (en el ejemplo mostrado en los cuadros A y B (entre 10^{-4} y 10^{-5}) en el cual se encuentra el punto final de 50%, es igual a:

$$\text{Cálculo de la DICT/50} = \frac{\% \text{ de ECP mayor de } 50\% - 50\%}{\% \text{ de ECP mayor de } 50\% - \% \text{ de ECP menor de } 50\%}$$

$$= \frac{80 - 50}{80 - 20} = \frac{30}{60} = 0.5 \text{ (Distancia proporcional)}$$

Logaritmo negativo de la DICT 50 = Logaritmo negativo de la dilución mayor al 50% de
 $ECP + \text{ distancia proporcional}$
 $10^{-4} + 0.5 = 10^{-4.5}$

Si se desea conocer en que dilución esta el título del virus, se halla el antilogaritmo de $10^{-4.5}$ y se corresponde a 1: 31,622.8 (1:32,000)

VI.2.2.-TITULACIÓN POR NEUTRALIZACIÓN DEL SUERO HIPERINMUNE PARA DETERMINAR LA DOSIS DE TRABAJO EN LA PRUEBA DE SEROTIPIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS.

Equipos:

- Gabinete de seguridad Clase II
- Microscopio
- Incubadora a 37°C
- Refrigerador a 4 °C
- Congelador de -20°C y -70°C

Materiales y Reactivos:

- Tubos de cultivos de tejidos sembrados con células HeLa a una concentración de 150,000 células / mL.
- Medio de mantenimiento (ya descrito)
- Los sueros hiperinmunes que se van a titular
- Las cepas controles de virus correspondientes a los sueros que se van a identificar.
- Micropipetas
- Puntas para micropipetas.
- Viales 1.5 mL
- Tubos plástico de tapa de rosca de 13 x 100.
- Gradillas para los tubos de cultivos de tejidos
- Guantes.
- Batas

VI.2.2.1.-PROCEDIMIENTO:

- 1.- Ver al microscopio los tubos de células HeLa antes de inocular, para ver si presentan una monocapa semiconfluente antes de las 48 horas.
- 2.- Preparar las diluciones de los diferentes sueros hiperinmunes desde 1:100 hasta 12,800. Procedemos del siguiente modo (ejemplo de un suero):
 - 2.a)- Preparar una gradilla con 9 viales estériles de 1.5 mL. Del 1 al 8 para las diluciones de 1:100 hasta 1: 12,800 y el 9 para el control del suero con la dilución mas concentrada
 - 2.b)- En los viales del 2 al 8, se añade 500µL de medio de mantenimiento para preparar las diluciones y en el 9 también para preparar para el control del suero con la dilución 1:100.
 - 2.c)- En un tubo aparte se prepara la dilución del suero 1:100 en volumen suficiente (2mL) para realizar las diluciones del siguiente modo: 20µL de suero mas 1.98 mL de medio de mantenimiento.
 - 2.d)- Distribuir 500µL de la dilución 1:100 en los viales 1, 2 y 9.
 - 2.e)- A partir del 2 se pipetear cuidadosamente con punta nueva o se agita en vortex(para mezclar bien). Pasar 500µL al vial 3, pipetear varias veces, cambiar de punta etc y repetir esta operación hasta el vial 8. Cambiar de punta y después de pipetear varias veces, eliminar 500µL.
- 3.- Preparar la dilución de trabajo del virus (100 DICT 50/ 100µL) en volumen suficiente:

3.a)- En el ejemplo del título del virus anteriormente señalado, se determinó que 1 DICT 50 se correspondía al título de $10^{-4.5}$ (dilución aprox. 1:32,000), por lo que las 100 DICT 50 estarán en $10^{-2.5}$ (dilución aprox. 1:320)

3.b)- En un tubo estéril aparte se prepara el volumen necesario: 20 μ L del virus en 6.38mL de medio de mantenimiento.

4.- Distribuir 500 μ L de las 100 DICT 50 a los viales del 1 al 8 que contienen las diluciones del suero y lo que queda se deja para preparar el control del virus.

5.- Control del virus: Preparar una gradilla con 3 viales estériles de 1,5 mL y se añade 500 μ L de medio de mantenimiento al primero, al segundo y tercero se le añaden 900 μ L.

Al primer tubo se le añaden 500 μ L de la dilución 100 DICT 50 y al segundo 100 μ L. Se cambia la punta, se cambia la punta y pasan 100 μ L al tercero etc. De esta forma estamos controlando 100, 10 y 1 DICT 50 del virus.

6.- Incubar una hora a temperatura ambiente.

7.- Eliminar el medio que traen los tubos con las células HeLa.

8.-Inocular 4 tubos de las células HeLa con 100 μ L de cada dilución de la mezcla suero-virus, 1:100 – 1:12,800 (cambiando la punta en cada dilución).

9.-Del control del suero, se inoculan 4 tubos.

10.-Además se inoculan 4 tubos con cada dilución del control del virus (100, 10 y 1 DICT) 11.- Se dejan 4 tubos sin inocular (que serán los controles celulares).

12.-.- Añadir 1 mL de medio de mantenimiento a todos los tubos.

13.-.- Incubar a 37°C por 5 - 7 días.

14.- Observar al microscopio diariamente y anotar en el protocolo de trabajo. Cuando el control de las 100 DICT/ 50 del virus presentó 80% o más de ECP, finaliza la prueba y se calcula en que dilución se encuentra 1 Unidad neutralizante del suero por el Método de Reed-Muench (ESTE PROCEDIMIENTO SE LE HACE A TODOS LOS SUEROS QUE SE VAN A TITULAR)

VI.2.2.2.-Análisis de los Resultados:

Ejemplo de cómo realizar el análisis de un protocolo de lectura del título de anticuerpo de un suero para determinar 1 Unidad neutralizante del mismo:

Resumen del protocolo al 7mo día

Diluc. Tubos	1:100	1:200	1:400	1:800	1:1600	1:3200	1:6400	1:12800
1	0	0	0	0	0	++++	++++	++++
2	0	0	0	0	++	+++	++++	++++
3	0	0	0	0	0	0	++++	++++
4	0	0	0	0	0	++++	++++	++++

A.- DATOS DEL ECP:

Dilución del SUERO	E.C.P.	NO E.C.P. (*)	E.C.P. (*)
1:100	4/4	4	0
1:200	4/4	4	0
1:400	4/4	4	0
1:800	4/4	4	0
1:1600	3/4	3	1
1:3200	1/4	1	3
1:6400	0/4	0	4

(*) Las flechas indican la dirección en que debe hacerse la suma para obtener los valores acumulados

B.- VALORES ACUMULADOS DE LOS DATOS DE ECP:

Dil Del virus. (log) 162n	NO E.C.P.	E.C.P.	E. C. P.	
			Relación	%
(Log) 2 1:100	20	0	20/20	100.0
2.3 1:200	16	0	16/16	100.0
2.6 1:400	12	0	12/12	100.0
2.9 1:800	8	0	8/8	100.0
3.2 1:1600	4	1	4/5	80.0
3.5 1:3200	1	4	1/5	20.0
3.8 1:6400	0	8	0/8	0.0

La distancia proporcional entre las dos diluciones (en el ejemplo mostrado en los cuadros A y B entre 1:1600 y 1:3200) en el cual se encuentra el punto final de 50%, es igual a:

$$\begin{aligned} \text{Cálculo de la Unidad de neutralización del suero} &= \frac{\% \text{ de ECP mayor de } 50\% - 50\%}{\% \text{ de ECP mayor de } 50\% - \% \text{ de ECP menor de } 50\%} \\ &= \frac{80 - 50}{80 - 20} = \frac{30}{60} = 0.5 \times 0.3 \text{ (log. del paso de dilución)} \\ &= 0.15 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}\text{Logaritmo de la dilución mayor al 50\%} &= 3.2 + 0.15 \\ &= 10^{-3.35}\end{aligned}$$

Si deseamos conocer en que dilución esta el título del suero , se haya el antilogaritmo de $10^{-3.35}$ y se corresponde a 1: 2238.7 (aproximadamente 2300.).

VI.2.3.-SEROTIPIFICACIÓN DE LOS AISLAMIENTOS POR PRUEBA DE NEUTRALIZACIÓN.

En esta prueba vamos a utilizar la modalidad: virus constante – suero constante.

Una dilución seleccionada del virus desconocido (100 DICT 50/100 μ L) se mezcla con una dilución seleccionada de los sueros hiperinmunes conocidos (40 – 60 Unidades neutralizantes 50/100 μ L). De acuerdo al grupo hemaglutinante (I – IV) o al subgénero (A – F) se selecciona la batería de sueros hiperinmunes que se va a utilizar.

Ejemplo: los aislamientos se agruparon en el grupo I hemaglutinante, donde se encuentran los serotipos 3, 7, 11, 14, 16, 21, 34 y 35, donde marcados en negritas se señalan los serotipos más frecuente que pueden producir IRA.

PROCEDIMIENTO:

Materiales y Equipos; ya descritos anteriormente.

1.- En una gradilla se ponen 4 viales de 1.5 mL
2.-Preparar 100 TICT 50/100 μ L del virus desconocido en volumen suficiente para la prueba (2 mL). Como el virus tiene una Unidad en el título 1: 32,000, las 100 Unidades estarán en 1:320; por lo tanto en un tubo estéril se ponen 3.2 mL de medio de mantenimiento y se le añaden 10 μ L del virus desconocido.

2.a)- En los cuatro viales de la gradilla añadir 500 μ L del virus a cada vial.

2.b)- Control del virus: se prepara una gradilla con 3 viales estériles de 1,5 mL y añadir 500 μ L de medio de mantenimiento al primero, al segundo y tercero se le añaden 900 μ L.

Al primer tubo se le añaden 500 μ L de la dilución de 100 DICT 50 y al segundo 100 μ L. Se cambia la punta , se pipetea varias veces y se pasan 100 μ L altercero,etc. De esta forma estamos controlando 100,10 y 1 DICT 50 del Virus

3.- Preparan 50 Unidades neutralizantes 50 / 100 μ L de cada suero (tipos 3, 7, 14 y 21) en cuatro viales de 1.5 mL estériles, del siguiente modo:

3.a)- Como la Unidad neutralizante 50/100 μ L del suero hiperinmune fue de 1: 2300 y se necesitan entre 40 y 60 Unidades, vamos a trabajar con 50, por lo tanto en 1:46 tenemos las 50 Unidades neutralizantes del suero 50/100 μ L

3.b)- En cuatro tubos estériles (uno para cada tipo de suero hiperinmune) echar 2.25 mL de medio de mantenimiento y le añadir 50 μ L del suero.

3.c)- Añadir 500 μ L de cada suero, al vial correspondiente que tiene el virus.

3.d)-Control del suero, el suero que no se utilizó sigue el mismo procedimiento que la mezcla virus – suero.

4.- Incubar 1 hora a temperatura ambiente.

5.- Eliminar el medio de los tubos de cultivo de tejido.

6.- Inocular 4 tubos con cada mezcla virus – suero.

7.- Inocular cuatro tubos con la dilución de trabajo del suero (control del suero)

8.- Inocular cuatro tubos con cada dilución de los virus preparados para controles.

9.- Dejar cuatro tubos de células sin inocular que serán el control celular.

10.-Incubar una hora a temperatura ambiente.

12.-Añadir 1 mL de medio de mantenimiento a todos los tubos.

13.- Incubar a 37°C por 5 - 7 días.

14.- Observar al microscopio diariamente y anotar en el protocolo de trabajo. Cuando el control de las 100 DICT/ 50 del virus presenta 80% o más de ECP, finaliza la prueba.

15.- Analizar el protocolo de trabajo: El control celular deben estar normales, el control de los sueros deben estar normales; los controles virales deben estar con 80% o mas de ECP en las 100 DICT 50/100 μ L

16.- El suero hiperinmune específico debe neutralizar el virus desconocido y los no específicos deben tener ECP igual que los controles virales.

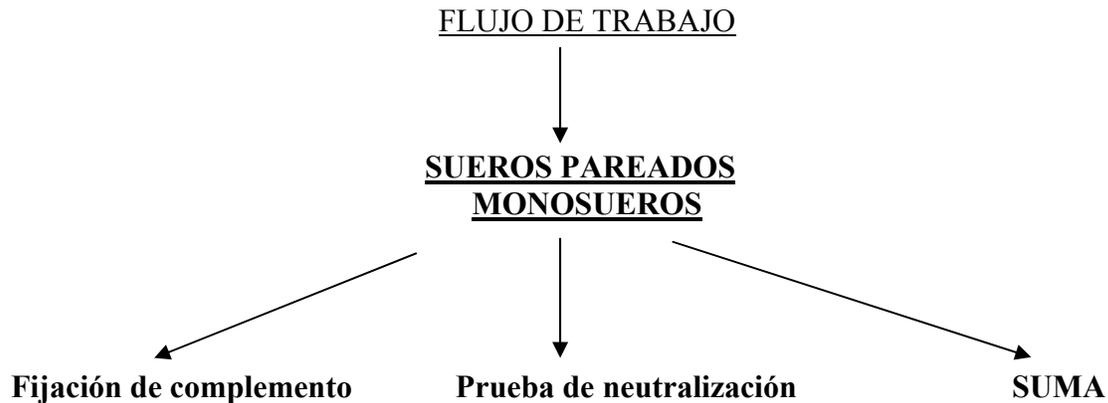
17.- Informar.

Referencias:

1 -Herrann K, Erdman D. Diagnosis by serologic assays in Diagnostic Procedure for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections. Chapter 6, pag 121 – 138.Editors: Edwin Lennette, David Lennette, Evelyne Lennete. 7th Edition 1995. American Public Health Association. Washington D.C. 20005.

2 -Goyenechea A, Oropesa I, López E, Bello M, Comellas M, Savón C. Capítulo: Prueba de Neutralización. Folleto: Diagnóstico Viroológico de las Enfermedades Respiratorias Agudas. Actividades Nacionales de Educación Continuada. Sección Virología. Instituto Nacional de Higiene, Epidemiología y Microbiología. Ministerio de Salud Pública. 1983.

VII.-DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE LOS ADENOVIRUS:



VII.1.-TECNICA DE FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO.

Complemento: es un sistema complejo de naturaleza protéicas que se encuentra en la sangre y en otros fluidos del organismo. Es un componente del suero sanguíneo de todos los vertebrados.

Para que el complemento (C') pueda actuar es necesario la formación de un inmunocomplejo, que es la unión del antígeno con su anticuerpo específico, al cual se fija el C' en forma de cascada (las fracciones del C' actúan en un orden de acción determinado):

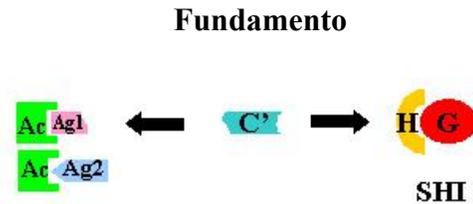
C'1, C'4, C'2, C'3, C'5, C'6, C'7, C'8, C'9.

Factores que influyen en la actividad del C':

- Temperatura: es un factor importante, debido a la naturaleza proteica de sus componentes, ya que el C' se inactiva a 56°C en 30 minutos. El procedimiento para su obtención debe realizarse en frío y su conservación a -70°C y si se liofiliza a 4°C.
- Fuerza iónica: pH óptimo de 7.2 a 7.4, a mayores o menores el C' pierde su actividad.
Iones de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺: el Ca⁺⁺ juega un papel fundamental en la actividad del C'1 y el Mg⁺⁺ activa el C'2 y C'4.
- Sustancias inhibitorias: aniones de pirofosfato, EDTA, veneno de cólera, levadura, formol, cloroformo, e inhibidores inespecíficos que pueden estar presente en algunos sueros.

VII.2.-Reacción de fijación del complemento:

La propiedad que tiene el sistema del C' para hemolizar los glóbulos rojos de carnero frente a su anticuerpo (hemolisina) es empleada en la reacción de fijación del complemento.



Esta reacción está constituida por dos

I.- Sistema Problema: Antígeno fijador de C' (conocido)

Suero (anticuerpo) del paciente a investigar.

II.- Sistema hemolítico incompleto: Antígeno (Eritrocitos de carnero al 2%)
Anticuerpo (Hemolisina). } en volúmenes iguales

Si el antígeno y el anticuerpo son específicos, el C' se fijará a este inmunocomplejo y no habrá lisis, por tanto, como hay presencia de anticuerpos la reacción es POSITIVA (específica).

Si no hay presencia de anticuerpo, no se forma el inmunocomplejo y el C' no se fija, irá hacia el sistema hemolítico y lizará los glóbulos y la reacción es NEGATIVA.

VII.3.-Preparación de los componentes para la reacción de Fijación del Complemento:

VII.3.1.- Preparación de la solución salina modificada.(SSM):

Teniendo en cuenta los factores que influyen en la actividad del C' (pH, iones de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺) preparamos una SSM que no es más que solución salina fisiológica a la cual se le adiciona concentraciones adecuadas de iones de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺

Sol. A ----- Cl Na----- 9g.

H₂O (dest)----- 1000 mL

Sol B. Mg Cl₂. 6H₂O-----10 g

Ca Cl₂. 2H₂O ----- 4g.

H₂O (dest) ----- 100mL

Las dos soluciones se esterilizan (filtración o autoclave 10 lbs – 10 min)

Para preparar la SSM se toma 1 mL de la Sol B para 1000 mL de la Sol A.

VII.3.2- Preparación de los eritrocitos de carnero:

Los glóbulos de carnero se obtienen por punción estéril de la yugular y se conservan en solución Alsever:

NaCl -----0.42 g

Dextrosa ----- 2.05 g

Ac. Cítrico ----- 0.80 g.

H₂O (dest) – 100.0 mL

El pH de 6.0 – 6.2, se esteriliza por filtración o por autoclave 10 lbs – 10 min

Se recomienda preparar un pool de sangre de carnero (3 carneros), y así el parámetro de los eritrocitos se hará más estable.

- Extraer 10 mL de sangre en forma estéril de cada carnero y se va echando en un frasco que contenga 30 ml de Alsever y se conserva a 4°C y debe estar 24 horas en esta temperatura antes de utilizarse, para que los eritrocitos dañados por la extracción se autodestruyan.
- La sangre para obtener los eritrocitos se lava de cuatro a cinco veces del siguiente modo: extraer en forma aséptica la cantidad de sangre aproximada para obtener un volumen adecuado de eritrocitos que van a ser utilizados en la prueba y añadir en un tubo centrífuga estéril.
- Centrifugar a 1000 – 1200 r.p.m. durante 5 min., extraer el sobrenadante, y recolectar 1 mL en un tubo y el resto se elimina.
- Añadir igual volumen de SSM del que se extrajo, resuspender el paquete de eritrocitos y centrifugar de nuevo, del sobrenadante se recolecta 1 mL en un tubo y el resto se elimina. Este procedimiento se repite dos o tres veces más.
- Realizar a los tubos que contienen 1 mL de sobrenadante la prueba de Hellers, que consiste en añadir 0.3 mL de ácido nítrico por las paredes y si se forma un precipitado blanco (lechoso) indica que existen residuos de proteínas, mientras aparezca el precipitado hay que seguir lavando.
- Cuando desaparezca el precipitado los eritrocitos están listos para ser utilizados.
- Preparar la suspensión de eritrocitos al 2% y conservar a 4°C hasta que se vaya a preparar el sistema hemolítico incompleto.

VII.3.3.- Obtención del Complemento:

Es posible adquirirlo de diferentes casas comerciales, viene señalado el título del lote. Se recomienda chequearlo en el laboratorio.

Si se obtiene en el laboratorio es necesario:

- Curieles machos, saludables, con un peso de mas de 450g. Se toman 10 curieles con las características señaladas y el día anterior de sacrificarlo se dejan a dieta de agua solamente.
- Usar jeringuillas de 20 mL con agujas 18 o 20 x 1 pulgada, y utilizar una jeringuilla por cada curiel.
- Preparar 10 tubos (20 x 125) estériles y añadir 5 mL de SSM. Utilizar un tubo para cada extracción y se conservan en el refrigerador hasta su uso)
- Se necesitan además tubos de centrífugas de 50 mL, erlenmeyer, embudos de cristal de 20 cm , preparados con gasa para filtrar, frascos de 10ml con sus tapas de gomas (tipo bulbos de antibióticos). Todo este material se pone a -20°C previo a utilizarlo para mantenerlo frío, además una bandeja de esmalte con hielo.

Equipos:

Centrífuga normal y refrigerada

Refrigerador a 4°C.

Congelador de -20°C y -70°C.

Materiales y Reactivos:

Pipetas de 5mL y 10 mL

Micropipetas de diferentes graduaciones.

Puntas para micropipetas

Guantes.

Batas.

VII.3.3.1.Procedimiento:

- Realizar la extracción de sangre por punción cardiaca Se debe extraer 15 mL o más de cada curiel. Previamente a la extracción se enjuagan los tubos con SSM y la jeringuilla, seguidamente se elimina toda la SSM. Este proceso se realiza con cada jeringuilla.
- La sangre extraída se deposita en los tubos y ponen a 4°C para que se retraiga el coágulo; a las dos horas se despende el coágulo y se deja a esa temperatura toda la noche.
- Al día siguiente, decantar el suero a través de un embudo con gasa en un erlenmeyer haciéndose un pool de suero de los 10 curieles; todo este proceso debe hacerse en frío sobre una bandeja con hielo.

- Distribuir el pool en los tubos centrífuga y centrifugar a 2000 – 2500 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C
- Recoger el sobrenadante en otro erlenmeyer frío sobre la bandeja con hielo y distribuir a razón de 1 mL en los viales.
- Conservar a -70°C o mejor liofilizados a 4°C.

VII.3.4.- OBTENCIÓN DE LA HEMOLISINA:

Es posible adquirirla de diferentes casa comerciales, viene señalado el título de producción del lote. Se recomienda chequearla en el laboratorio.

Si se desea obtener en el laboratorio:

La hemolisina no es más que un anticuerpo que se desarrolla en un animal de experimentación contra un antígeno. En este caso se inoculan eritrocitos de carnero o su estroma (antígeno) a un conejo, siguiendo un esquema de inmunización adecuado y el animal responde produciendo anticuerpos (hemolisina)

El conejo se sangra y se obtiene suero, el cual se inactiva (56°C durante 30 minutos), se dispensa en viales (1 mL) y se conserva a -70°C o liofilizado a 4°C.

VII.3.5.- ANTÍGENO ESPECÍFICO Y CONTROL DE ANTÍGENO

De acuerdo a lo que se investiga son ofertados por casas comerciales y con las indicaciones para su uso .Se recomienda chequearlos antes de utilizarse

En el caso que se realice su producción en el laboratorio, por ejemplo el antígeno fijador del complemento de los adenovirus, se procede del siguiente modo, basado en la propiedad del antígeno soluble de las capsómeras que es común a todos los Adv humanos, vamos a utilizar Adv. tipo 3..

- Inocular 5 tubos de cultivo celular sembrados con HeLa con monocapa celular semiconfluente antes de las 48 horas con 200µL de la cepa de Adv. tipo 3 para cada tubo.
- Incubar a temperatura ambiente por una hora y se añaden 1 mL de medio de mantenimiento a cada tubo.
- Observar diariamente al microscopio, efectuando cambio de medio si es necesario, y cuando presente 80% de ECP o más se recogen y se congelan a -70°C.

- Inocular 5 frascos de 15 cm cultivos celulares sembrados con HeLa con monocapa celular semiconfluyente antes de las 48 horas con 200 μ L de la cepa de Adv. tipo 3 para cada tubo.(Que se reactivó anteriormente).
- Incubar a temperatura ambiente por una hora y se añaden 5 mL de medio de mantenimiento a cada frasco.
- Observar diariamente al microscopio, efectuando cambio de medio si es necesario, y cuando presente 80% de ECP o más se recogen y se congelan a -70°C. (Esta cosecha viene a ser la semilla para preparar los antígenos).
- Descongelar los 5 frascos y se hace un pool con el contenido de los mismos y se pasan a titular (descrito anteriormente) para determinar la dilución del virus que de un ECP de 80% o más al 4to o 6to día.
- Inocular 5 frascos de 125 cm² de cultivo celular sembrados con HeLa con monocapa celular semiconfluyente antes de las 48 horas con 1 mL de la cepa de Adv. tipo 3 para cada roux..
- Incubar a temperatura ambiente por una hora y se añaden 80 mL de medio de mantenimiento sin suero de ternera a cada frasco.
- Observar diariamente al microscopio, efectuando cambio de medio si es necesario, y cuando presente 80% de ECP o más se recogen y se congelan a -70°C.
- Un frasco de 125 cm de cultivo celular sembrado con células HeLa sin inocular pasa todo el proceso para que nos sirva de control celular.
- Todos los frascos (inoculados y el que esta sin inocular) se descongelan lentamente a temperatura ambiente y después se congela de nuevo a -70°C. Este proceso se repite tres veces, de tal forma que las células se destruyan totalmente y se liberen las partículas virales
- Hacer un pool con el contenido de los 5 frascos inoculados con Adv tipo 3 y se centrifugan a 2500 r.p.m. durante 20 minutos.
- Decantar el sobrenadante en frasco estéril.
- Inactivar a 56°C durante 30 minutos. En este paso el virus se inactiva y las sustancias anticomplementarias termolábiles que puedan existir desaparecen)
- Colocar el antígeno viral y su control celular en frascos estériles y se congelan a -20°C hasta su titulación

VII.4.-DESARROLLO ESQUEMÁTICO DE LA PRUEBA DE FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO:

- Chequear el complemento.
- Titular la hemolisina.
- Titular el C' frente a los antígenos.
- Dosis de trabajo del antígeno frente a un suero positivo conocido para determinar la dilución de trabajo del antígeno si no esta establecida o para chequear la recomendada Las determinaciones hasta aquí establecidas se realizan siempre que se comience a utilizar un nuevo lote de los elementos básicos (C', hemolisina, Antígeno) o los tres por primera vez, a fin de estandarizarlos en el laboratorio y solamente quede el suero problema como variable que estamos investigando. (Si queremos utilizar la fijación de complemento para identificar antígeno, debemos tener estandarizado el suero hiperinmune conocido).

- Prueba Principal: para la determinación de los niveles de anticuerpos frente a un antígeno (s) específico (s) conocido (s) en un suero problema,

Junto con la Prueba Principal se realizan los siguientes controles:

a)-Antígeno frente a un suero conocido positivo y negativo.

b)- De las dos unidades del C'

c)-Del SHI (eritrocitos al 2% y Hemolisina 2 Uds).

d)-Cada suero lleva dos controles individuales: del suero y del suero con el antígeno control. (En caso de que alguno de estos dos controles de positivo, hay que tratar el suero y repetirlo)

NOTA: Todos los controles generales de la prueba deben estar correctos para poder valorar los resultados obtenidos en los sueros que se investigan.

VII.4.1.-Determinación del título del complemento:

Esta prueba se realiza para chequear el título del C' que viene señalado por el productor en nuestras condiciones de trabajo o para conocerlo si se ha producido en el laboratorio, (NO SE CORRESPONDE CON LAS UNIDADES) y se procede del siguiente modo:

Equipos:

Incubadora

Centrífuga.

Refrigerador a 4°C

Congelador -20 y -70°C

Materiales y reactivos:

SSM (ya descrita)

Eritrocitos de carnero al 2% (ya descrito)

Hemolisina (2 Uds)

Complemento puro.

Gradilla

Viales de 1.5 mL

Micropipetas.

Puntas para micropipetas.

Placas de microtitulación de fondo en U de 96 excavaciones.

VII.4.1.1.-PROCEDIMIENTO:

- Lavar los eritrocitos y preparar la suspensión al 2% (en volumen suficiente para la prueba).
- De acuerdo con el título preparar las 2 Uds de hemolisina.(1:3000 en volumen suficiente para la prueba
- Preparar el SHI en cantidades suficientes para la prueba (2mL de eritrocitos al 2% y 2mL de 2 Uds de hemolisina) Dejar en reposo unos 15 a 20 min. para que se sensibilicen los glóbulos con su anticuerpo)
- Preparar las diluciones del C' (de acuerdo al título del productor por ej. 1:120 o si es de producción del laboratorio lo vamos a considerar igual), chequeamos dos diluciones por debajo y dos por encima del siguiente modo:
 - a.) Una gradilla con 6 viales de 1.5 mL, el 1er vial para preparar la dilución madre de 1;10 y del 2do al 6to para preparar las diluciones 1:80; 1:100; 1:120; 1:140; 1:160.
 - b)- Primero dispensar la SSM del siguiente modo: al 1er vial 900µL; al 2do 700µL; al 3ro 900µL, al 4to 550µL; al 5to 650µL y al 6to 750µ.
 - c.)-Dispensar el C'puro al 1er vial 100µL (dil 1:10), cambiar la punta (pipetear cuidadosamente) y pasar 100µL al 2do (dil 1:80); 100µL al 3ro (dil 1:100); 50µL al 4to (dil 1:120); 50µL al 5to (dil. 1: 140) y 50µL al 6to (dil. 1:140).
 - d.)-En la placa de microtitulación fondo en U realizar la prueba por duplicado:

En las filas A y B, columnas 1 al 5, dispensar en todas las excavaciones 50µL de SSM, después dispensar 25µL de las distintas diluciones desde 1:80 hasta 1:160, cambiando la punta en cada

dilución en las cavidades correspondientes. En la fila C columna 1 y 2 dispensar 75µL de SSM para el control del SHI.

- Posteriormente añadir 50µL del SHI a todas las excavaciones (filas A y B columnas 1 al 5 y fila C columna 1 y 2)
- Agitar suavemente y se incubaba a 37°C por 30 minutos, agitando suavemente cada 10 minutos.
- Lectura: El título del C' se corresponde con la dilución mas alta donde hay hemólisis total, que en el caso del ejemplo debe ser 1:120. Los controles de eritrocitos deben estar en suspensión

VII.4.2.-DETERMINACIÓN DEL TÍTULO DE LA HEMOLISINA:

Esta prueba se realiza para chequear el título de la Hemolisina que viene señalado por el productor en nuestras condiciones de trabajo o para conocerlo si se ha producido en el laboratorio.

Equipos:

Incubadora 37°C

Centrífuga.

Refrigerador a 4°C

Congelador -20 y -70°C

Materiales y Reactivos:

SSM (ya descrita)

Eritrocitos de carnero al 2% (ya descrito)

Hemolisina (pura)

Complemento. (puro).

Gradilla

Viales de 1.5 mL

Micropipetas.

Puntas para micropipetas

Placas de microtitulación fondo en U de 96 excavaciones.

Procedimiento:

- 1.- Lavar los eritrocitos y preparar la suspensión al 2% (en volumen suficiente para la prueba)
- 2.- De acuerdo con el título del C' 1:120 (Ej. anterior), preparar dil. 1:60 en volumen suficiente para la prueba (se conserva en frío hasta el momento de utilizarlo: 4°C.)

3.-Preparar las diluciones de la Hemolisina (de acuerdo al título del productor por ej. 1:6000 o si es de producción del laboratorio lo vamos a considerar igual), chequeamos dos diluciones por debajo y dos por encima del siguiente modo:

3.a) Una gradilla con 8 viales de 1.5 mL, en los viales 1 al 3 para preparar la dilución patrón de 1:1000 y del 4to al 8vo para preparar las diluciones 1:4000; 1:5000; 1:6000; 1:1700; 1:8000.

3.b)- Primero se dispensa la SSM del siguiente modo: del 1er vial al 3ro 900 μ L; al 4to 300 μ L; al 5to 400 μ L, al 6to 500 μ L; al 7mo 600 μ L y al 8vo 700 μ L.

3.c)-Dispensar 100 μ L de hemolisina pura al primer vial (dil 1:10) cambiar la punta y, pasar 100 μ L al segundo vial (dil 1:100); pipetear varias veces, cambiar la punta y pasar 100 μ L al tercer vial (dil 1:1000); a partir de esta dilución patrón se preparan las restantes. Pasar 100 μ L al cuarto vial (dil 1:4000); 100 μ L quinto vial (dil. 1: 15000); 100 μ L al sexto vial (dil. 1:16000); 100 μ L al séptimo vial (dil. 1:8000) y 100 μ L al octavo vial (dil. 1: 9000).

4.-En la placa de microtitulación fondo en U realizar la prueba por duplicado:

4.a).-En las filas A y B, columnas 1 al 5, dispensar en todas las cavidades 50 μ L de SSM. En la fila C, columnas 1 y 2 dispensar 100 μ L para el control de los eritrocitos.

4.b)-Dispensar 25 μ L de las distintas diluciones de la Hemolisina desde 1:4000 hasta 1:8000, cambiando la punta en cada dilución en las cavidades correspondientes.

4.c)-Posteriormente añadir 25 μ L de la suspensión de eritrocitos al 2% a todas las excavaciones, incluyendo a las del control de los glóbulos.

4.d)- Finalmente añadir el C' 25 μ L (dil 1:1:60) a todas las excavaciones (filas A y B columnas 1 al 5 (excepto en la fila C columna 1 y 2 que son el control de eritrocitos) Agitar suavemente

5.)- Incubar a 37°C por 30 minutos, agitando suavemente cada 10 minutos.

6.)-El título de la Hemolisina se corresponde con la dilución mas alta donde hay hemólisis total, que en el caso del ejemplo debe ser 1:6000. Los controles de eritrocitos deben estar en suspensión.

El título de la Hemolisina se corresponde con 1 Unidad, después de acuerdo con la técnica empleada se pueden utilizar 2, 4 o más Uds. En nuestro caso utilizamos 2Uds en 25 μ L que estarán en el doble de la concentración del título obtenido.

(En el ejemplo: título 1:6000 = 1Ud, por lo tanto las 2Uds estarán en 1:3000.)

VII.5.-DETERMINAR LA DOSIS DE TRABAJO DEL C' FRENTE AL ANTÍGENO

Se realiza para buscar la cantidad mínima de C' que es necesaria para que produzca hemólisis total frente al antígeno y se corresponde con 1 Unidad. Después de acuerdo a lo que indica la técnica que estamos empleando se pueden utilizar 2, 4 o más Uds. En nuestro caso utilizamos 2 Unidades de C' en 25µL.

Los equipos y materiales ya están descritos anteriormente

VII.5.1.-PROCEDIMIENTO.

- 1.- Lavar los eritrocitos y preparar la suspensión al 2%. (en volumen suficiente para la prueba: 200µL de eritrocitos en 9.8mL de SSM)
- 2.- Preparar 2 Uds de Hemolisina 1:3000) en volumen suficiente para la prueba: 800µL de 1:1000 en 11.6 mL de SSM)
- 3.-Preparar SHI en volumen suficiente para la prueba: 5 mL de glóbulos al 2% adicionar 5 ml de Hemolisina (2Uds). Dejar a temperatura ambiente.
- 4.- De acuerdo con el título del C' 1:120 (Ej. anterior), preparar dil. 1:60 en volumen suficiente para realizar la prueba y conservar en frío sobre hielo durante la preparación de las diluciones y la placa de microtitulación también)

Para determinar los volúmenes de C' que se distribuyen en forma decreciente se utiliza el siguiente esquema para un antígeno;

	1	2	3	4	5	6	7	8
C' (1/60)	0.06	0.055	0.05	0.045	0.04	0.035	0.03	0.025
SSM	0.14	0.145	0.15	0.155	0.16	0.165	0.17	0.175
Volumen	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

Como normalmente se trabaja con un antígeno específico (en este caso adv) y su control celular, las cantidades deben multiplicarse de acuerdo al número de antígenos y además hay que tener un control de las distintas diluciones de C', y siempre dejando un margen de seguridad en los volúmenes - nunca ser exacto – por lo que preparamos el esquema de trabajo multiplicando por 5 todas las cantidades, siguiendo el siguiente esquema:

	1	2	3	4	5	6	7	8
C' (1/60)	0.30	0.28	0.25	0.23	0.20	0.18	0.15	0.13
SSM	0.70	0.72	0.75	0.77	0.80	0.82	0.85	0.87
Volumen	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00

4.a) Una gradilla con 8 viales de 1.5 mL,; para preparar las diluciones de acuerdo al esquema anterior.

4.b)- Primero dispensar la SSM del 1ro al 8vo vial del siguiente modo: 1er vial 700µL, al 2do: 720µL, al 3ro 750µL; al 4to 770µL; al 5to 800µL, al 6to 820µL; al 7mo 850µL y al 8vo 875µL.

4.c)-Dispensar el C (1/60): al 1er vial 300µL; al 2do 280µL; al 3ro 250µL, al 4to 230µL al 5to 200µL al 6to 180µL al 7mo 150µL y al 8vo 130µL.

5.-En la placa de microtitulación fondo en U se realiza la prueba:

5.a)-En la fila A, columnas 1 al 8, dispensar en todas las cavidades 25µL del antígeno específico (Adv)

5.b)-En la fila B, columnas 1 al 8, dispensar en todas 25µL del antígeno control

5.c)-En la fila C: columnas 1 al 8 dispensar 50µL de SSM para el control del C'.

5.d)-En la fila D, columnas 1 y 2 dispensar 75µL de SSM para el control del SHI.

6).-En las filas A, B y C columnas 1 al 8, dispensar 50µL de las distintas diluciones del C' (Cambiando de punta en cada dilución).

7).-Posteriormente añadir 50µL del SHI a todas las excavaciones, incluyendo a las del control del SHI y se agita suavemente

8.)- Incubar a 37°C por 30 minutos, agitando suavemente cada 10 minutos.

9).-Lectura: se buscará la menor cantidad de C' (1/60) que fue necesaria para lisar a los glóbulos al 100%, en esa concentración tenemos 1 Unidad del C' frente a los antígenos que estamos investigando, por ej. En las filas A y B en la 5ta columna se corresponde con un volumen de 0.04 del C' (1/60) llegó la lisis total En la fila C la lisis puede llegar hasta las columnas 7 u 8, lo que nos indica que en los antígeno pueden existir sustancias anticomplementaria, por lo que es importante esta prueba para controlar la cantidad exacta del C' que está reaccionando

Las 2 Uds del C' se calculan por una regla de tres, siguiendo el ejemplo anterior

1/60 ----- 0.04 ----- 1D
1/60 -----0.08 ----- 2Uds
X ----- 0.1 ----- 2Uds.

$$X = \frac{60 \times 0.1}{0.08} = 75 \quad (\text{las 2 Uds del C' estarán en la dil. } 1/75)$$

VII.6.-DETERMINACIÓN DE LA DOSIS DE TRABAJO DEL ANTÍGENO:

Se realiza para conocer la dilución óptima del antígeno en la prueba principal, las casa comerciales normalmente la señalan, además hay antígenos que utilizan distintas dosis de trabajo de acuerdo a la edad, por ej, el Virus Respiratorio Sincitial, que para los niños menores de 1 año se recomiendan 16 – 32 Uds, y para niños mayores se puede trabajar con 4 – 8Uds. Para los Adv. se utilizan 4 Uds.

Para determinar la dosis de trabajo se realiza una titulación en forma de tablero de ajedrez, donde se enfrentan distintas diluciones de un suero positivo conocido frente a distintas diluciones del antígeno que estamos valorando.

VII.6.1.-PROCEDIMIENTO:

- 1.- Los equipos y materiales necesarios (ya descritos)
- 2.- Preparar la solución de glóbulos al 2% y la Hemolisina 2 Uds en cantidades suficiente para preparar el volumen necesario de SHI para esta prueba (ya descrito).
- 3.- Preparar diluciones del suero positivo conocido (Adv) desde 1:10 hasta 1: 80 y del antígeno (Adv) desde puro hasta 1/32 en volúmenes suficientes para realizar la prueba, según el esquema:

3.a)- Diluciones del suero:

0.2 mL del suero puro	↗	1 mL de 1/10	↗	1 mL de 1/20	↗	1 mL de 1/40
1.8 mL de SSM		1 mL de SSM		1 mL de SSM		1 mL de SSM
2.0 mL de suero 1/10		2 mL de 1/20		2 mL de 1/40		2 mL de 1/80

3.b)- Diluciones del antígeno:

1 mL Ag puro	↗	1 mL de 1/2	↗	1 mL de 1/4	↗	1 mL de 1/8	↗	1 mL de 1/16
1 mL SSM		1 mL SSM		1 mL SSM		1 mL SSM		1 mL SSM
2 mL Ag 1/2		2 mL 1/4		2 mL 1/8		2 mL 1/16		2 mL 1/32

3.c).-Preparar una dilución 1/10 de un suero negativo conocido:

0.1 mL del suero (-) añadir 0.9 mL de SSM

3.d).- Preparar un vial con 1 mL del control del antígeno.

4).-En el siguiente esquema se indica la metodología a seguir:

Suero	1/10	1/20	1/40	1/80	Neg. 1/10	KAdv(**)
Ag. Adv.	25µL	25µL	25µL	25µL	25µL	25µL
Puro						→
1/2						→
1/4						→
1/8						→
1/16						→
1/32						→
Ksueros (*)						→
SSM (**)	→					→

4.a)-Distribuir 25µL de las diluciones del suero positivo (1/10 a 1/80) en las excavaciones correspondientes: filas A – H y columnas 1 hasta la 4.

4.b)- Distribuir 25µL del suero negativo (1/10) en las excavaciones correspondientes: filas A – H y columna 5

4.c)- Distribuir 25µL del antígeno específico (Adv) desde puro hasta la dilución 1/32 en las excavaciones correspondientes: fila A hasta la F y en las columnas 1 hasta la 6.

4.d)-Distribuir 25µL del control celular (control del antígeno) en la fila G, columna 6.

4.e)-Distribuir 25µL SSM para compensar volumen en fila H, columnas 1 hasta la 5 y filas A – F, columna 6. En la excavación correspondiente a la fila H columna 6 (que hasta el momento no tenia nada) se le añaden 75µL

5.-Añadir 25µL de las 2 Uds del C' a todas las excavaciones, exceptuando la de la fila H columna 6 (que tiene 75µL de SSM)

6.- Incubar toda la noche a 4°C

7.-Preparar el SHI en volumen suficiente para la prueba: 10 mL de eritrocitos al 2% al cual se le adiciona 10 mL de Hemolisina 2 (Uds).

8.- Añadir 50µL del SHI a todas las excavaciones, incluyendo a las del control del SHI y se agita suavemente

9.- Incubar a 37°C por 30 minutos, agitando suavemente cada 10 minutos.

10.- Lectura: se leen primeros todos los controles:

Control del suero positivo (dil 1/10 hasta 1/80): 100% de hemólisis: fila H columnas 1 – 4.

Control del suero positivo (dil 1/10 hasta 1/80) con el control de celular: 100% de hemólisis fila G columnas 1 hasta la 4.

Control del suero negativo (dil. 1/10): 100% hemólisis: fila H columna 5

Control del suero negativo (1/10): con el control celular: 100% de hemólisis: fila G columna 5.

Control del suero negativo (dil. 1/10) con el antígeno de Adv.: 100% hemólisis filas A – F columnas 5

Control del antígeno Adv. (dil. Puro hasta 1/32): 100% de hemólisis: filas A –F, columna 6.

Control del SHI: glóbulos en suspensión: fila H columna 6.

Si todos los controles están correctos pasamos a realizar la lectura donde se está valorando distintas diluciones del antígeno frente a distintas diluciones del suero positivo conocido:

Por definición se plantea que la mayor dilución del antígeno que fija al C' con la mayor dilución del suero (3 o 4 cruces de suspensión de los eritrocitos) está la dosis de trabajo del antígeno o sea 1 Unidad Fijadora del C' del Antígeno).

Ejemplo: la mayor dilución del Ag que fijó al C' (1/16) con la mayor dilución del suero 1/40, tenemos que el antígeno tiene si se utiliza puro 16 unidades fijadoras del C'

VII.7.-PUEBA PRINCIPAL

La realización de esta prueba conlleva para que tenga validez que los controles de la misma funcionen adecuadamente. En ella se determina la presencia o ausencia de anticuerpos frente a los antígenos que se investigan; también puede utilizarse para la identificación de un antígeno cuando el parámetro del suero hiperinmune está controlado.

Los equipos y materiales que se necesitan ya están descritos.

Sueros de pacientes que se van a investigar, y los sueros controles (positivo y negativo)

Esquema de trabajo:

Prueba Principal

	H	G	F	E	D	C	B	A
Dil.	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	K Ag N	K suero
1erS								
2do S								
1er S								
2do S								
1er S								
2do S								
1er S								
2do S								
1er S								
2do S								
1er S								
2do S								

VII.7.1.-PROCEDIMIENTO:

1.- Prepara la primera dilución del suero a investigar 1/10 (0.1 mL de suero + 0.9 de SSM) y se inactiva a 56°C – 30 min.

1.a)- Realizar los mismos procedimientos a los sueros controles positivo y negativo.

2.-Preparar la dosis de trabajo del antígeno de Adv. y el control celular (en volumen suficiente para la prueba).

3.- Realizar la prueba en placas de microtitulación de fondo en U: (Por ej. para 6 pares de sueros) En este caso las letras sirven de columnas y los números de filas)

3.a)-En las columnas G hasta la C, y después en la B, y en las filas 1-12 distribuir 25µL de SSM

3.b)-En las columnas H, G, B y A, filas 1 - 12 distribuir 25µL de suero a investigar,(1er suero fila 1 y 2do suero en la fila 2 y así sucesivamente), hasta distribuir los 6 pares.

3.c)- En las columnas G hasta la C y filas 1 - 12 realizar las diluciones de los sueros con pipeta Eppendorf múltiple del siguiente modo: en las columna G de todas las filas se pipetea varias veces y extraer 25µL y se pasa para la F, esta operación se repite hasta la columna C donde se eliminan 25µL..De esta forma el suero queda diluido desde 1/10 hasta 1/320.

4.) Distribuir 25µL de antígeno de Adv en las excavaciones correspondientes a las columnas H hasta la C, en las filas 1 – 12.

5.) Distribuye 25µL del antígeno celular en las excavaciones correspondientes a las columna B, en las filas 1 – 12.

6.)-A todas las excavaciones dispensar 25µL de 2 Uds de C'e incubar a 4°C toda la noche.

VII.7.2.- CONTROLES Y PROCEDIMIENTOS

Preparar los controles de la prueba en placa de microtitulación:

- a)- Control del suero positivo con su antígeno específico y el antígeno de control celular.
- b)-Control del suero negativo con el antígeno específico y el antígeno de control celular
- c) Control de las 2Uds de C'
- d)- Control del SHI

Utilizar la placa de microtitulación normalmente, para los controles y procedemos del modo siguiente:

- a)- En las filas A y B, columnas 1 y 2 adicionar 25µL del suero positivo conocido, y añadir 25µL del antígeno de Adv. en la columna 1 y 25µL del antígeno del control celular en la columna 2. A todos se le añaden 25µL de 2 Uds de C' (Control del suero positivo)
- b)- En las filas C y D, columnas 1 y 2, adicionar 25µL del suero negativo conocido, y añadir 25µL del antígeno de Adv en la columna 1 y 25µL del antígeno del control celular en la columna 2. (Control del suero negativo)

A todos añadir 25µL de 2 Uds de C'

- c)- En las filas E y F: Control de las 2 Uds de C' frente a los antígenos de Adenovirus y del antígeno control.

Fila E: Control del antígeno Adenovirus.

	Columna 1	Columna 2	Columna 3
SSM	25µL	25µL	25µL
Ag de Ad	25µL	25µL	25µL
Complemento	25µL (2 Uds)	25µL (1 Ud)	25µL (0,5 Uds)

Nota: Para preparar una unidad y media unidad del Complemento a partir del que tiene dos unidades se realiza una dilución seriada al doble en dos viales que contienen 100µL de SSM del siguiente modo; al primer vial se le añade 100µL del C' con dos unidades, se cambia la punta, se pipetea varias veces y se pasan 100µL al segundo vial.

En la Fila F se comprueba la dosis del C' frente al antígeno control con la misma metodología.

- d)- En las filas G y H, columnas 1 y 2 añadir 75µL de SSM (Control del SHI)

Todos los controles incubar a 4°C durante toda la noche, junto con la Prueba Principal

Al día siguiente:

- Lavar los eritrocitos y preparar la suspensión al 2% en volumen suficiente para la prueba.
- Preparar las 2 Uds de Hemolisina en volumen suficiente para la prueba.
- Preparar el SHI en volumen suficiente para la prueba.
- Dispensar 50 μ L del SHI a todas las excavaciones, y agitar suavemente.
- Incubar a 37°C durante 30 minutos, agitando suavemente cada 10 minutos para que los eritrocitos no sedimenten.

Lectura:

- a) Control del suero positivo: suspensión de los eritrocitos (++++)
- b) Control del suero negativo: lisis del 100% de los eritrocitos (-)
- c) Control del SHI: suspensión de los eritrocitos (++++)
- d) Control de las 2 Uds del C' Lisis total en 2 Uds, y 1 Ud. En 0.5 Uds deben de haber eritrocitos en suspensión (mas menos ++)

(SI LOS CONTROLES GENERALES DE LA PRUEBA ESTAN CORRECTOS SE LEE LA PRUEBA PRINCIPAL)

VII.7.3.-LECTURA DE LA PRUEBA PRINCIPAL:

1.-Leer los controles individuales de cada suero: columnas B y A, filas 1 -12: todas deben estar con lisis al 100% de los eritrocitos (-).

Si no es así, el suero hay que repetirlo previo tratamiento porque presenta sustancias anticomplementarias que inhiben la acción del C'.

2.- Lecturas de los casos individuales (sueros pareados)

2.a) Ejemplo I.- El 1er suero en todas las diluciones hay hemólisis (-)

El 2do suero en todas las diluciones hay hemólisis. (-).

El caso es NEGATIVO

2.b) Ejemplo II.- El 1er suero en todas las diluciones hay hemólisis. (-).

El 2do suero hasta la dilución 1/40 hay suspensión de eritrocitos (+)

El caso es POSITIVO, es una seroconversión

2.c) Ejemplo III.-El 1er suero presenta suspensión de eritrocitos hasta la dilución 1/20 (+)

El 2do suero presenta suspensión de eritrocitos hasta la dilución 1/160 (+)

El caso es POSITIVO, presenta un aumento del título de Ac de 4 veces o más en el 2do suero con respecto al 1ro.

2.d) Ejemplo IV.- El 1er suero presenta suspensión de eritrocitos hasta la dilución 1/20 (+)

El 2do suero presenta suspensión de eritrocitos hasta la dilución 1/40 (+)

El caso en NEGATIVO, aunque presenta anticuerpos en ambos sueros.

2.e)- Ejemplo V.- El 1er suero presenta suspensión de eritrocitos hasta la dilución 1/160

El 2do suero presenta suspensión de eritrocitos hasta la dilución 1/320

POSITIVO, se interpreta como que el 1er suero se tomó en la fase convaleciente.

VII.8.-TRATAMIENTO DE LOS SUEROS QUE PRESENTAN ACTIVIDAD ANTICOMPLEMENTARIA:

Los sueros deben ser tomados y mantenidos estériles hasta llegar al laboratorio donde deben ser conservados a -20°C hasta que vayan a ser investigados. Los sueros que no estén estériles o que presenten actividades anticomplementarias necesitan un tratamiento especial.

Para eliminar la actividad anticomplementaria se utilizan varios tratamientos:

VII.8.1- TRATAMIENTO CON COMPLEMENTO:

Consiste en adsorber las sustancias anticomplementarias del suero con el propio complemento (Este es un procedimiento que es costoso por el precio del C')

Tomar 0.1 mL del suero y añadir 0.9 mL de C' (1/10) de tal forma que el suero nos queda diluido 1/10 (dilución de trabajo)

Incubar 2 horas a 37°C

Inactivar 56°C durante 30 minutos y ya está listo para trabajar.

VII.8.2.- TRATAMIENTO CON CO₂:

Tomar 0.1 mL de suero y añadir 0.4 mL de agua destilada (el suero queda diluido 1/5)

Se le pasa al suero una corriente de CO₂ o añadir unos pedacitos de hielo seco.

Se deja en reposo a temperatura ambiente 20 minutos.

Las sustancias anticomplementarias precipitan

Centrifugar a 2000 r.p.m. durante 20 minutos.

Pasar el sobrenadante a otro tubo

Añadir 0.5 mL de solución salina hipertónica (2X) y tenemos 1mL del suero diluido 1/10.

Inactivar a 56°C durante 30 minutos y ya está listo para trabajar.

VII.8.3.- TRATAMIENTO CON CALOR:

Toma 0.1 mL del suero y añadir 0.9 mL de solución SSM.

Inactivar a 60°C durante 20 – 30 minutos y ya está listo para trabajar.

(Este tratamiento es muy agresivo y puede destruir proteínas del anticuerpo)

VII.8.4.- TRATAMIENTO CON CLOROFORMO:

Se puede utilizar para descontaminar los sueros y al mismo tiempo para eliminar sustancias anticomplementarias.

0.1mL de suero añadir 0.9 mL de SSM (suero diluido 1/10)

Inactivar 56°C durante 30 minutos.

Añadir de 0.3 – 0.5 mL de cloroformo.

Agitar suavemente 3 a 5 veces.

Poner en reposo a temperatura ambiente 20 minutos.

Centrifugar a 2000 - 2500 r.p.m. durante 20 minutos.

Decantar el suero con pipeta con mucho cuidado para no tomar cloroformo, ya que este inactiva al C'.

REFERENCIAS:

1 -Lennette D. General Principles for Laboratory Diagnosis of viral, rickettsial, and chlamydial infections.in Diagnostic Procedure for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections. Chapter 1, pag 3 25..Editors: Edwin Lennette, David Lennette, Evelyne Lennete. 7th Edition 1995. American Public Health Association. Washington D.C. 20005.

2 - Goyenechea A, Oropesa S, López E, Bello M, Comellas M, Savón C. Diagnóstico Viroológico de las Enfermedades Respiratorias Agudas. Capítulo Técnica Fijación del Complemento FOLLETO..1983. Actividades Nacionales de Educación Continuada. Instituto Nacionales de Higiene Epidemiología y Microbiología.MINSAP
Prueba de neutralización: (Ya descrita)

VII.9.-SISTEMA ULTRAMICROANALÍTICO PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS IgG A ADENOVIRUS.

Es un sistema ultramicroELISA de tipo indirecto, diseñado para sueros pareados, donde el Antígeno es inmovilizado en la fase sólida, se le añaden los sueros controles y los sueros a investigar .La reacción es revelada con un conjugado anti-IgG humano unido a la fosfatasa alcalina, al cual se le adiciona su sustrato fluorescente, cuantificándose la fluorescencia obtenida en un espectrofluorímetro acoplado a una computadora que procesa los resultados y de acuerdo a un valor de corte establecido, mediante una curva patrón nos ofrece el resultado en forma de títulos de anticuerpos.

Equipos:

Gabinete de seguridad Clase II

Centrifuga refrigerada

Refrigerador

Congelador de -70°C

Incubadora de 37°C

Espectrofotómetro

Sonicador

Lector de SUMA

Equipo de rotación de frascos roller

Materiales y Reactivos:

Pipetas de 5 y 10 mL

Micropipetas (5-20, 25-200 y 50-1000 µL)

Frascos tipo roller sembrado con células VERO a una concentración de 180 000 células/mL

Medio 199

Viales (1.5mL)

Tiras de poliestireno

Membranas para filtro miliporo clarificante calibre 1.2 micras

Homogenizador Dounce

Guantes desechables

VII.9.1.-PREPARACIÓN DE ANTÍGENO PARA EL RECUBRIMIENTO:

Células Vero infectadas con Adenovirus tipo 3, al presentar efecto citopatogénico de más del 80%, las células fueron desprendidas mecánicamente, la suspensión celular fue centrifugada a 1500rpm, durante 10 minutos a 4⁰C. El pellet fue resuspendido en la centésima parte del volumen inicial con una solución de fosfato-salina-glicina 0.43M pH 4, dándosele 60 golpes con un homogenizador Dounce. El homogenizado se deja a 4⁰ C durante 16 horas, se sonica en 2 ciclos de 15 segundos con una intensidad de 20 Hz y se centrifuga a 3500 r.p.m. por 15 minutos. El sobrenadante así obtenido se cuantifica por el método de BCA.

La misma metodología se sigue con el control celular. Ambos se guardan a -70⁰C hasta su utilización.

VII.9.2.-RECUBRIMIENTO DE LAS PLACAS DE UMELISA

1. Recubrir las placas de UMELISA diluyendo antígeno y control en tampón de recubrimiento o coating buffer pH 9, a una concentración de 16 µg/mL, a razón de 15µL por pocillo y guardar en cámara húmeda a 4⁰C toda la noche.

El antígeno y el control se dispensan en filas alternas de manera que cada suero a investigar y cada suero control se enfrente a ambos.

2. Lavar 4 veces el recubrimiento con PBS-Tween al 0.5%
3. Adicionar la solución de bloqueo a razón de 15 µL por pocillo e incubar 1 hora a temperatura ambiente en cámara húmeda.
4. Aspirar el bloqueo.

Las placas pueden guardarse a 4⁰C, bien selladas para ser posteriormente utilizadas, o continuar con la metodología de trabajo.

VII.9.3.-TITULACIÓN DEL CONJUGADO:

Se sigue la misma metodología que se describe debajo para los sueros a investigar, pero solamente se colocan sueros controles positivos y negativos. Se añade el conjugado a varias diluciones comenzando por 1:1000 hasta un rango donde los valores de fluorescencia para el control positivo estén cercanos a 100 y los del control negativo no rebasen de 10.

VII.9.4.-PROCESAMIENTO DE LOS SUEROS A INVESTIGAR:

1. Diluir los sueros controles positivos y negativos y las muestras a investigar en buffer de dilución 1:40 por duplicado a razón de 10µL por pocillo e incubar a 37⁰C en cámara húmeda durante 30 minutos.
2. Lavar 4 veces con tampón de lavado
3. Preparar la dilución del conjugado, previamente titulado en buffer de dilución. y añadirlo a los pocillos a razón de 10µL por pocillo. Incubar a 37⁰C en cámara húmeda durante 30 minutos.
4. Lavar 4 veces con tampón de lavado.
5. Añadir 10 µL de sustrato fluorescente comercial (dilución 1:10) e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
6. Leer en lector SUMA 521, aplicando el programa de lectura Análisis serológico automatizado (ANSA) en el cual se obtienen los resultados en forma de título (<40, 40, 80, 160, 320, >320). El programa realiza a su vez la validación de la placa de reacción, así como el funcionamiento de los sueros controles.
7. Se consideran positivos los pares de sueros que aumenten su título en al menos 4 veces el 2^{do} suero con respecto al 1^{ro} o que presenten seroconversión o sea que el 1ro suero sea < 1:40 y el 2do 1:40 o más.

VII.9.5.-SOLUCIONES:

PBS-Tween Tampón de Lavado

NaCl	8g
KCl	0.2g
KH ₂ PO ₄	0.2g
Na ₂ HPO ₄	1.15g
Tween 20	0.5 %
H ₂ O	1L

Coating Buffer pH 9.6

Na ₂ CO ₃	1.59g
NaHCO ₃	2.93g
NaN ₃	0.2g

Disolver en 800mL de agua destilada, ajustar pH y enrasar a 1L.

Solución de bloqueo

Albúmina de suero bovina (fraccion V) 0.1% en PBS-Tween

Sacarosa 50mg/mL

Buffer de dilución

Tris-Tween + suero de carnero al 5%

REFERENCIAS:

- 1- Savón C, Laferté J, Goyenechea A, Valdivia A, Morier L, Tejeiro Y. UltramicroELISA indirecto para la detección de anticuerpos totales al Adenovirus en muestras de sueros humanos. Rev. Cub Med. Trop. 1994; 46: 144 – 147.
- 2 -Laferte J, Savón C. Goyenechea A, Vázquez V, Otero A, Tejeiro Y, Hernández B. Estimación del título de anticuerpo a Adenovirus utilizando una curva patrón y un ensayo de ultramicroELISA indirecto. Rev Cub Med Trop. 1996;48 (2): 102 – 108.