
***TECNICAS DE LABORATORIO PARA
EL DIAGNOSTICO Y LA
CARACTERIZACION DEL VIRUS
DENGUE***

Laboratorio de Arbovirus
Dpto. de Virología
Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"
Centro Colaborador de la OPS/OMS
para el Estudio de las Enfermedades Víricas.

***Ciudad Habana
2001***

INDICE

| | |
|---|-----|
| Seguridad en el laboratorio. | 1 |
| Colecta de muestras para el diagnóstico de dengue | 5 |
| Aislamiento del virus del Dengue. | 8 |
| Aislamiento del virus del Dengue en células C6/36 HT por shell vial | 27 |
| Inmunofluorescencia. | 27 |
| Titulación del virus del Dengue y neutralización por reducción del número de placas. | 32 |
| Preparación de antígeno por el método de sacarosa - acetona. | 41 |
| Hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación. | 44 |
| Preparación de conjugado anti-Dengue - peroxidasa. | 52 |
| Método de ELISA de Inhibición (MEI) | 57 |
| ELISA de captura de IgM (CAM-ELISA) | 61 |
| <u>“ Kit Diagnóstico “: Dengue * IgM</u> | 65 |
| Sistema Ultramicro-ELISA para la detección de Acs IgM al virus Dengue (UMELISA-DENGUE). | 68 |
| AuBioDOT IgM anti-Dengue. | 69 |
| Detección de antígeno a Dengue mediante un ELISA de amplificación Biotina -Estreptavidina (ELISA-BE) | 73 |
| SDS-PAGE / Western Blot. | 76 |
| Detección de antígenos del virus dengue en tejidos embebidos en parafina. | 83 |
| Detección de los virus del dengue mediante reverso transcripción/reacción en cadena de la polimerasa (RT/PCR) | 88 |
| Identificación de los subtipos de los virus del dengue mediante restricción enzimática | 94 |
| RT-PCR/ nested PCR genérico para la detección de flavivirus combinado con PCR multiple de dengue. | 101 |

| | |
|---|-----|
| Sistema de expresion diferencial de mRNA (“ RNAimage Kit: mRNA DIFFERENTIAL DISPLAY SYSTEM”) | 104 |
| Ensayo de Linfoproliferación a partir de células humanas de sangre periférica. | 111 |
| Ensayo de Linfoproliferación a partir de esplenocitos de ratón | 113 |
| Aislamiento de monocitos a partirde C.M.S.P. | 115 |
| Detección de Citoquinas Intracelulares y Marcadores Celulares de Superficie por Citometría de Flujo en cultivos de Células mononucleares murinas estimuladas con antígenos/mitógenos. | 116 |
| Ensayo de Inmunoamplificación. | 117 |

SEGURIDAD EN EL LABORATORIO

En los laboratorios médicos y biológicos se realizan trabajos muy variados que comportan un gran número de riesgos de diversa índole para el trabajador, el personal cercano al mismo y para la comunidad en su conjunto; entre tales riesgos se destaca en forma predominante el **riesgo biológico infeccioso** derivado de la manipulación o exposición a microorganismos patógenos en el laboratorio.

La infección en el personal de laboratorio depende básicamente de la interacción de varios factores como son: el agente infeccioso implicado; el reservorio de laboratorio; el modo de escape, vía de transmisión y puerta de entrada; y la susceptibilidad del hospedero. Sólo una parte de las infecciones contraídas en el laboratorio son atribuibles a accidentes reconocidos; en la mayoría de las infecciones ocurridas en este ambiente se desconoce la causa directa de la infección, aunque se presume que pueda deberse a contaminación por aerosoles infecciosos, capaces de ser generados por muchos procedimientos habituales de laboratorio.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha elaborado una clasificación de agentes biológicos sobre la base del riesgo que representan para el individuo que trabaja con ellos y para la comunidad; así se han establecido 4 grupos de riesgo en orden creciente de peligrosidad como se muestra a continuación:

Grupo de Riesgo 1 (escaso o nulo riesgo individual y comunitario)

Microorganismo que tiene pocas probabilidades de provocar enfermedades humanas o animales.

Grupo de Riesgo 2 (riesgo individual moderado, riesgo comunitario bajo)

Agente patógeno que puede provocar enfermedades humanas o animales, pero que tiene pocas probabilidades de entrañar un riesgo grave para el personal de laboratorio, la comunidad, el ganado o el medio ambiente. La exposición en el laboratorio puede provocar una infección grave, pero se dispone de medidas eficaces de tratamiento y /o de prevención, y el riesgo de propagación es limitado.

Grupo de Riesgo 3 (riesgo individual elevado, riesgo comunitario bajo)

Agente patógeno que suele provocar enfermedades humanas o animales graves, pero que de ordinario no se propaga de un individuo infectado a otro. En el laboratorio

pueden transmitirse por aerosoles. En general no se dispone de medidas eficaces de tratamiento y prevención.

Grupo de Riesgo 4 (elevado riesgo individual y comunitario)

Agente patógeno que suele provocar enfermedades graves en personas o en los animales y que puede propagarse fácilmente de un individuo a otro, directa o indirectamente. No suele disponerse de medidas eficaces de tratamiento y de prevención.

Entre los elementos a considerar para evaluar el potencial de riesgo de un agente biológico se cuentan: la capacidad patógena del agente, el modo de transmisión y su rango hospedero, la disponibilidad de medidas de prevención eficaces, disponibilidad de tratamiento eficaz, endemismo o exotismo del agente considerado y la experiencia de trabajo con el agente. En cada país se deberá clasificar por grupo de riesgo a todos los microorganismos que se encuentren en el territorio nacional.

El término contención se usa para describir métodos seguros para el manejo de agentes infecciosos en el laboratorio donde ellos son manipulados o mantenidos.

La Bioseguridad, disciplina que se ocupa de la prevención del riesgo biológico infeccioso, no es más que un conjunto de medidas científico-organizativas y técnico-ingenieras encaminadas a lograr la contención de los agentes infecciosos y proteger al trabajador de laboratorio y a la comunidad de este tipo de riesgo.

En correspondencia con los grupos de riesgo se han establecido también 4 niveles de Bioseguridad, o sea combinaciones de técnicas y prácticas de laboratorio, equipos de seguridad e instalaciones de laboratorio, apropiadas para el riesgo que representen los agentes infecciosos que se manipulen en estos lugares.

En el caso de los Arbovirus se siguen los mismos criterios que para el resto de los agentes patógenos aunque en particular, un Subcomité para la Seguridad de Laboratorio en Arbovirus (SALS), perteneciente al Comité Americano sobre Arbovirus (ACAV), ha categorizado, acorde con la clasificación de la OMS, a cada uno de los virus registrados en el Catálogo de Arbovirus y Ciertos Otros Virus de Vertebrados.

Las categorizaciones del SALS, periódicamente actualizadas desde 1980, se basan en las evaluaciones de riesgo realizadas a partir de la información proveída por 585 laboratorios que trabajan con arbovirus en todo el mundo. Según esta categorización los virus del dengue han sido asignados al Grupo de Riesgo 2. Antes de 1988 se habían reportado 12

infecciones por dengue adquiridas en el laboratorio; desde 1988 a 1991 se documentaron 4 casos adicionales.

Mientras que los riesgos primarios en el laboratorio son la inoculación parenteral accidental, el contacto del virus con la piel dañada o las membranas mucosas y las mordeduras de roedores de laboratorio o picaduras por artrópodos infectados, los aerosoles infecciosos pueden también constituir una fuente potencial de infección.

En los últimos 4 casos reportados, no se utilizaron medios de protección individual adecuados y en 3 de ellos también se ignoró la contención de aerosoles potenciales en cabinas de seguridad, especialmente cuando se trabajaba con altas concentraciones de virus. Tales aerosoles o salpicaduras con fluidos infecciosos pudieran haber producido contaminación de la piel dañada y no protegida adecuadamente. La manipulación segura en el laboratorio de los virus del Dengue (en especial las preparaciones concentradas) requieren de la adherencia estricta a las recomendaciones del Nivel de Bioseguridad 2 (Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. CDC-NIH, 4th ed. 1999).

Estas recomendaciones, según el manual de la OMS, comprenden en esencia el trabajo de un laboratorio básico y observar técnicas microbiológicas apropiadas (TMA).

Algunas de las reglas más importantes para trabajar en el laboratorio con especímenes infectados por virus:

- No pipeteo con la boca.
- Uso de guantes para el trabajo con muestras de sangre u otros líquidos orgánicos y siempre que se prevea el contacto con material potencialmente infeccioso.
- Uso de batas, uniformes u otras prendas apropiadas. No se llevará la ropa de trabajo a áreas fuera del laboratorio.
- Descontaminación de jeringas y agujas. Es recomendable el uso de material desechable.
- Evitar la formación de aerosoles y gotas.
- Es aconsejable el empleo de cámaras de seguridad cuando existe un gran riesgo de formación de aerosoles.
- Limpieza rápida de los derrames cubriéndolos con un paño o papel mojado en solución desinfectante (hipoclorito de sodio: 10g en un litro). Debe dejarse actuar el desinfectante por lo menos 30 minutos antes de proceder a la recogida de los materiales y limpieza de las superficies contaminadas.

- Descontaminación diaria de las mesas y superficies al terminar el trabajo.
- Descontaminación de todos los materiales utilizados en el trabajo, incluyendo la ropa.
- Lavado de las manos después de manipular especímenes y siempre antes de salir del laboratorio.
- En caso de inyecciones, cortaduras o abrasiones accidentales, deben quitarse los guantes, lavarse las manos, facilitar el sangrado de la herida, aplicar desinfectante a la piel si procede y consultar a un médico.
- No fumar, comer, beber etc en el área de trabajo.
- No tener alimentos ni bebidas en los refrigeradores del laboratorio.
- Las centrífugas deben estar equipadas con mecanismos de seguridad para que aerosoles potenciales de material infeccioso no se diseminen.
- Para centrifugar deben utilizarse de preferencia tubos plásticos con tapa de rosca.
- Debe existir un reglamento interno de bioseguridad así como un responsable que garantice su cumplimiento. Deben existir un plan de medidas a tomar en caso de accidente.
- El personal del laboratorio debe estar vacunado (de existir las vacunas) contra los agentes que se trabajan.
- El estado de salud de los trabajadores debe chequearse periódicamente.
- Las áreas de trabajo deben estar adecuadamente señalizadas como de "acceso restringido".
- Todos los materiales contaminados, muestras y cultivos, tienen que ser descontaminados antes de su eliminación o limpieza para reutilización (preferiblemente autoclave o incineración).

La concepción general e instalación del laboratorio, así como otros aspectos relativos a la seguridad en los laboratorios en que se trabajen agentes en Grupos de Riesgo de tipo 1 y 2, pueden encontrarse en: Laboratorios Básicos-Niveles de Bioseguridad 1 y 2. Parte 1. Normas generales. en Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. 2da ed. en español . OMS. 1994.

El trabajo con agentes de los Grupos de Riesgo 3 y 4, requiere de instalaciones especiales.

COLECTA DE MUESTRAS PARA EL DIAGNOSTICO DE DENGUE

El éxito de los resultados de las pruebas de laboratorio para el aislamiento viral depende en gran medida de las condiciones en que se realice la colecta, manipulación y transporte de las muestras por lo que la persona encargada de realizar este trabajo debe garantizar que las mismas lleguen en buenas condiciones al laboratorio junto a la documentación adecuada. Todos los especímenes deben recogerse observando precauciones universales en frascos estériles y rotularse cuidadosamente con los datos de identificación. Es conveniente emplear un modelo que incluya los siguientes aspectos:

Documentación del paciente e identificación

- ⇒ **Nombre, apellidos**
- ⇒ **Edad, sexo y raza**
- ⇒ **Dirección**
- ⇒ **Fecha de comienzo de los síntomas**
- ⇒ **Fecha de toma de las muestras**
- ⇒ **Número de historia clínica, resumen de los datos clínicos y epidemiológicos del caso**
- ⇒ **Impresión diagnóstica**
- ⇒ **Tipo de muestra colectada**
- ⇒ **Nombre y datos generales del médico de atención, hospital y provincia.**

Todas las muestras deben ser rotuladas con el nombre del paciente y fecha de toma de la muestra y deben estar acompañadas por los datos anteriores.

Muestras para aislamiento viral: Las muestras para aislamiento viral o estudios de detección del ácido nucleico viral (RCP) deben ser colectadas en los 3 primeros días del comienzo de la enfermedad. Deben colectarse asépticamente 10 ml de sangre total la cual será transferida a tubos estériles libres de aditivos o preservativos. Los tubos conteniendo la sangre se colocaran lo más rápido posible en hielo o en el refrigerador (4°C). Para asegurar las óptimas condiciones durante el aislamiento, la separación del suero del coágulo se realizará el mismo día de la toma de la muestra y asépticamente.

Los tubos con el suero se congelarán y almacenarán a temperatura de -70°C . El suero debe enviarse lo antes posible al laboratorio realizando el transporte en congelación. En las primeras 24-48h de colectado el suero, el mismo puede mantenerse a 4°C hasta su envío al laboratorio (a igual temperatura).

Para el aislamiento del virus a partir de muestras de vísceras (bazo, hígado, ganglios), deben transportarse también en frío. Se homogeneizan 20g del tejido en 100mL de PBS o medio de cultivo conteniendo suero de ternero (inactivado por calor) al 10% y antibióticos. Posteriormente se centrifugan a 3000 rpm durante 30 minutos a 4°C y se emplea el sobrenadante para el aislamiento. Es conveniente realizar una prueba de esterilidad en cada caso.

Muestras para diagnóstico serológico: Usualmente se toman dos muestras de suero: de fase aguda y convaleciente. El suero de fase aguda se extrae durante los primeros 5 días de la enfermedad y el de fase convaleciente de 2-3 semanas más tarde. Para lograr el máximo rendimiento del suero, la sangre colectada se deja a temperatura ambiente por una hora y durante toda la noche a 4°C (refrigerador) antes de centrifugar. Después de la centrifugación (1000 rpm por 10 minutos a 4°C) el suero se transfiere a un tubo previamente rotulado y se almacena preferiblemente en congelación (-20°C). El envío al laboratorio debe realizarse preferiblemente en congelación (-20°C) o a 4°C . Para la determinación de anticuerpos IgM a dengue se utiliza una muestra de sangre tomada a partir del quinto día de comienzo de los síntomas la que se procesa en forma similar para obtener el suero correspondiente.

Envío y transporte de las muestras: Durante el envío y transporte de las muestras deben observarse las medidas de seguridad elementales para proteger, tanto al personal, como a las muestras en sí. El suero debe enviarse dentro de contenedores especiales con tapa de rosca las que deben asegurarse con papel adhesivo. Pueden agruparse varios tubos con una liga y guardarse dentro de un contenedor plástico o metálico que deberá envolverse con suficiente papel absorbente para evitar el derrame de líquido en caso de rotura. Cada contenedor debe enviarse en cajas de poliespuma o termos con hielo seco (los tubos no deben ponerse en contacto directo con el hielo seco). De no tener hielo seco pueden utilizarse refrigerantes o hielo normal. Deben evitarse las congelaciones y descongelaciones repetidas de las muestras.

Cada contenedor debe tener los siguientes rótulos :

URGENTE, FRAGIL, MATERIAL MEDICO, MANTENER EN FRIO,

MANTENER EN POSICIÓN VERTICAL

Y deben cumplirse las regulaciones internacionales específicas que existen para el transporte de muestras. Acompañando al contenedor en la parte exterior deben ir los datos del paciente (no deben estar en contacto directo con el hielo o con la muestra). Cada país tiene regulaciones específicas para la importación de materiales biológicos.

En el momento del envío debe avisarse al laboratorio (telex, teléfono, fax) del momento de la llegada del mismo lo que asegurará que sea recogido inmediatamente a su llegada. Es aconsejable que los envíos no lleguen sábados, domingos o días festivos.

AISLAMIENTO DEL VIRUS DEL DENGUE

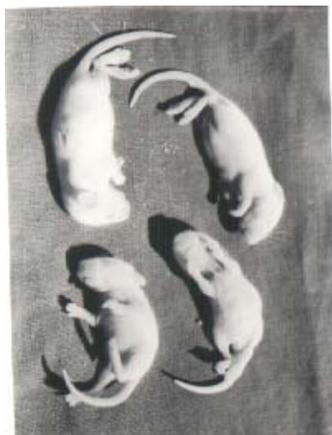
Uno de los sistemas biológicos mas empleados en el aislamiento del virus dengue, a pesar de su baja sensibilidad, ha sido el ratón lactante inoculado por vía intracerebral. También se han utilizado diferentes sistemas celulares de mamíferos entre los que se encuentran las líneas celulares: BSC1, VERO, BHK-21, LLCMK2.

En las últimas décadas se han desarrollado una serie de líneas de mosquitos que han resultado ser mucho mas sensibles a la infección por el virus que con los sistemas anteriores. Dentro de las mas utilizadas se encuentran las células AP-61, C6\36, TRA-284 y C6\36 HT. La elevada sensibilidad de estos sistemas, ha permitido alcanzar un alto índice de aislamiento.

Actualmente se emplea con éxito la inoculación intratorácica de mosquitos. Este método ha demostrado ser el más sensible.

Ratón lactante

- Inocular por vía intracerebral y subcutánea en ratón lactante (7 ratones por familia) de 1 a 3 días de nacidos, 0.02 ml de la muestra pura y diluida 1:10 y 1:50 en medio de cultivo o PBS + antibióticos y 2% de suero fetal bovino (SFB).
- Observar diariamente durante 21 días (debe producirse un cuadro encefálico aunque en ocasiones hay cepas que no se adaptan y sólo producen cambios ligeros en los ratones como erizamiento del pelo, marcha en punta de patas entre otros).



- Si se observa cualquier signo de enfermedad debe realizarse un pase en el mismo sistema (para adaptar la cepa) y en otro más sensible de ser posible. Para realizar el

pase, los ratones son desinfectados con alcohol al 70% y sus cerebros son cosechados guardándose a temperaturas de -70°C ó de lo contrario se prepara una suspensión al 10%(v/v) utilizando medio de cultivo o PBS con 2% de SFB, la que puede almacenarse a igual temperatura o procesarse inmediatamente.

- La identificación rápida puede hacerse por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) utilizando Líquidos Ascíticos Hiperinmunes (LAH) y anticuerpos monoclonales (AcM) o por Neutralización. También puede prepararse un antígeno por el método de extracción de sacarosa-acetona para identificar mediante la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación (IH).

Células de Mamífero

El virus dengue es capaz de multiplicarse en varias líneas celulares de mamíferos como las células BHK21, KB, VERO, no obstante las mas sensibles son las de riñón de mono verde africano LLCMK2, útiles no solo en el aislamiento sino también para la identificación aunque son menos sensibles que las células de mosquitos.

- Inocular, en frasco de 25 cm^2 con monocapa celular confluyente, 0.5 ml del suero previa decantación del medio del frasco. En algunos casos se prefiere diluir la muestra en medio de cultivo (1\20-1\30) para eliminar el efecto tóxico que pueda producir en las células.
- Incubar a 37°C por una hora y añadir posteriormente el medio de mantenimiento de las células.
- Observar durante 7 días la aparición de Efecto Citopatógeno (ECP): redondeamiento y desprendimiento de las células.
- Congelar y descongelar por 3 veces y realizar un pase en el mismo sistema para aumentar el título viral.
- De no observarse ECP, puede hacerse de rutina un plaqueo viral o una detección por IFI para saber si se ha multiplicado algún virus.
- La identificación rápida se hace por IFI y la confirmación por reducción del número de placas por neutralización.

Cultivos celulares de mosquitos

Son las células más sensibles para el aislamiento del dengue y pueden ser utilizadas las C6\36, AP61, Tra-284-SF y C6\36 HT en este orden creciente de sensibilidad. Es de señalar que algunas sublíneas del clono celular C6\36 se han vuelto menos sensibles a los virus del dengue sugiriendo que este sistema celular no es homogéneo y ha revertido apareciendo células menos sensibles. Aún cuando algunas pocas células se infectan, varias cepas no se replican y no favorecen la diseminación al resto de las células lo que influye en la identificación de los virus utilizando anticuerpos monoclonales. Las ventajas de esta línea celular es su facilidad de manipulación y rapidez de crecimiento.

La línea celular AP61 es altamente sensible a los virus del dengue mostrando frecuentemente ECP de tipo sincitial. Aunque algunos autores plantean la dificultad de identificar los aislamientos en estas células utilizando la IFI, dicha técnica es útil si se dispersan bien las células al realizar la suspensión de las mismas.

La línea celular TRA-284-SF es muy sensible para el aislamiento del dengue. Son fáciles de manipular y muy económicas ya que crecen en medio libre STF aunque su velocidad de crecimiento y split no son grandes. Son de mayor tamaño que las C6\36 y el “screening” mediante la IFI es relativamente fácil.

Recientemente ha comenzado a utilizarse una sublínea del clono C6\36 capaz de multiplicarse a 34⁰C. Algunos autores plantean que esta sublínea de alta temperatura (C6\36 HT) resiste sólo varias semanas de mantenimiento bajo estas condiciones y proponen tomar el clono original de 28⁰C y readaptarlo a crecer a 34⁰C cada vez que el deterioro provocado por la elevada temperatura lo exija; entre los investigadores de la región se ha propagado esta sublínea C6\36 HT que ha demostrado mayor eficacia para el aislamiento viral al adelantar la detección por IFI (inmunofluorescencia indirecta) y aumentar el número de aislamientos.

Como método general se inocular la muestra, se espera de 10 a 14 días (observando la posible aparición de efecto citopatogénico (ECP)) y se realiza IFI, primero como “screening” utilizando un “pool” de sueros humanos positivos o líquidos ascíticos hiperinmunes (LAH). En los casos positivos se realiza una IFI utilizando Acs. monoclonales específicos a los 4 serotipos del dengue. En ocasiones se presentan

dificultades al utilizar estos anticuerpos monoclonales dada la alta especificidad de los mismos, el bajo título viral y el grado de ECP entre otros factores.

La confirmación puede realizarse por neutralización por reducción del número de placas previo título del virus aislado.

Inoculación intratorácica de mosquitos

Dada su elevada sensibilidad, la inoculación de mosquitos es el método de elección para el aislamiento del dengue principalmente en aquellos casos de Fiebre Hemorrágica del Dengue/Síndrome de Choque por Dengue (FHD/SCD). Es conveniente utilizar los anticuerpos monoclonales específicos para cada serotipo en la identificación a partir del cerebro del mosquito infectado. En algunos casos puede haber fluorescencia inespecífica lo que conlleva a resultados erróneos.

Entre las especies de mosquitos utilizadas en el aislamiento están el *Aedes aegypti*, el *Aedes albopictus* y el *T. amboinensis*. Como vías de inoculación se utilizan la intracerebral y la intratorácica.

Los mosquitos a utilizar en esta técnica se inmovilizan sometiéndolos a bajas temperaturas, pero en algunas ocasiones que son resistentes al frío, se deben tomar medidas adicionales principalmente si estamos utilizando hembras que de escaparse crearían un riesgo de transmisión. Entre las medidas a tomar se encuentran el uso de CO₂ u otros anestésicos con mucha precaución, ya que pueden causar efectos letales sobre los mosquitos.

La zona de inoculación en el mosquito depende del sexo y la especie. Generalmente para los machos se usa la membrana del cuello y para las hembras, o bien en el cuello o en la sutura debajo del primer espiráculo torácico.

El equipo diseñado por Rosen et al. es de fácil manejo y permite controlar el volumen de suspensión viral a inocular. La parte que más se debe reponer es el capilar-aguja, el cual debe ser aguzado al calor o en un equipo especial. Estos capilares son graduados a distancias de 1mm lo que corresponde a un volumen de 0,17μ

Al escoger la especie de mosquito para ser inoculada se debe tener en cuenta, qué es lo que queremos aislar o amplificar. Rosen encontró que el Dengue no se replica en *Culex quinquefasciatus*.

A partir de la implantación de esta técnica se comenzaron a utilizar mosquitos del género *Toxorhynchites*, que aunque no son vectores debido a que sus estructuras bucales no están acondicionadas para la hematofagia, son excelentes amplificadores de varios arbovirus como el dengue.

Las principales ventajas que implica el uso de este método son:

1. Los mosquitos vivos son más sensibles a la infección por dengue que ningún otro método de ensayo.
2. No se necesitan grandes recursos ni equipos sofisticados.
3. La replicación de virus en mosquitos vivos puede ser mantenida en un rango mas amplio de temperatura a diferencia de lo que ocurre cuando se utilizan cultivos celulares.

Materiales:

- ⇒ Capilar aguja: Diámetro exterior 0,7 - 1 mm, diámetro interior aproximadamente 0,5 mm y grosor de la pared 0,2 mm.
- ⇒ Porta capilar.
- ⇒ Jeringuilla de 20 cc.
- ⇒ Tubos de goma.
- ⇒ Llave de 3 salidas.
- ⇒ Microscopio estereo.

Método:

- Preparar el sistema de inoculación y materiales a utilizar.
- Colocar los mosquitos en tubo de cristal y dentro de un baño de hielo por espacio de 10 - 15 minutos.
- Cargar el capilar con la suspensión del material a inocular evitando que el líquido llegue al porta-capilar.
- Colocar el mosquito sobre la platina del estereo para localizar el área de inoculación.
- Introducir aproximadamente 1 mm de la punta del capilar en la zona de inoculación y accionar la jeringuilla de manera tal que deje pasar 1 mm de suspensión viral (0,17 uL).

- Colocar el mosquito en una pequeña jaula sin tocarlo y sobre esta colocar un algodón embebido en una solución de sacarosa al 10%.
- La jaula es colocada dentro de una bolsa de plástico transparente como medida de seguridad para evitar el escape de los mosquitos inoculados.
- Los mosquitos deben ser observados a las 24 horas para detectar la mortalidad ocasionada por la inoculación.
- El tiempo para colectar los mosquitos después de inoculados dependerá del virus o de los propósitos de investigación.
- La detección viral se puede realizar por medio de las siguientes técnicas: FC, IFI, neutralización (Nt), ELISA y otras.

LÍNEA CELULAR C6\36

La línea celular C6\36 (Igarachi, 1978) es un clono obtenido de la línea *Aedes albopictus* de Singh (1967), que presenta una alta sensibilidad a los virus del dengue y Chikungunya, aunque en estudios realizados (Kuno, 1985) se ha demostrado que resultan menos sensibles en comparación con otras líneas celulares de mosquitos tales como la AP61(*aedes albopictus*) y las TRA-284. Algunas cepas de dengue son capaces de producir ECP (efecto citopatogénico) de tipo sincitial en las C6\36 pero este fenómeno no es característico de la línea. Con mucha frecuencia se observa toxicidad en las células a causa de los inóculos empleados.

Medios y Materiales:

| | |
|---|-------|
| ⇒ Medio de Crecimiento para 100 ml | |
| MEM (Earle) 10X | 10 mL |
| SFB (Inactivado) | 10 mL |
| Solución 100X aminoácidos no esenciales | 2 mL |
| Glutamina 200 mM | 1 mL |

Completar a 100 mL con agua bidestilada y ajustar el pH a 7,2-7,4. De las firmas comerciales Gibco y Flow puede obtenerse el medio MEM Earle con aminoácidos no esenciales y glutamina , al que sólo es necesario añadir STF.

⇒ Pipetas de 5-10 mL con la punta doblada en ángulo de 90 grados o policía de goma.

Siembra de las células

- ◆ Decantar el medio de un frasco Roux con monocapa confluyente
- ◆ Desprender las células en 10 mL de medio de crecimiento de forma tal que el medio caiga perpendicular a la monocapa celular o desprender raspando la superficie con un policía de goma (grstoit).
- ◆ Añadir 1 mL de suspensión celular a cada Roux que contenga de 100-120 mL de medio de crecimiento (“split” 1:10 semanal) lo que es equivalente a 8×10^4 células/mL incubar a 28° C. La monocapa estara completa en 4-5 días.

- ◆ Si fuera necesario realizar la inoculación a los tres días de sembradas las células, debe aumentarse la concentración a $2-3 \times 10^5$ células/ mL utilizando para ello una razón de pase de 1:5-1:6. El medio que se emplea para mantener las células después de inoculadas es el medio de crecimiento de la línea, pero sólo es necesario suplementarlo con 2% SFB.

Congelación

- ◆ Añadir 4 mL de medio de crecimiento y 1 mL de SFB en un frasco de 10 mL rotulado como #1. Colóquelo en un baño de hielo.
- ◆ Añadir 4 ml de medio y 1 mL de Dimetilsulfóxido (DMS) en otro frasco de 10 mL rotulado como # 2. Colóquelo en un baño de hielo.
- ◆ Decantar el medio de un Roux (monocapa confluyente de tres a cinco días de sembrada).
- ◆ Con la pipeta de 5mL de punta curva, extraiga los 5 mL del frasco #1 y desprenda las células del Roux. Opcionalmente puede utilizar policía de goma y pipeta normal.
- ◆ Echar la suspensión en el frasco #1.
- ◆ Añadir con una pipeta de 5 mL el medio del frasco # 2 al frasco # 1 , gota a gota y agitando (siempre en baño de hielo).
- ◆ Colocar 1 mL de la suspensión celular ($1-2 \times 10^6$ células/mL) en cada ampula de congelación y manténgalas en el baño de hielo. Deje 0.1 mL para la prueba de esterilidad.
- ◆ Guardar las ampulas a -20°C durante 1 hora
- ◆ Pase las ampulas a una caja de poliespuma y guárdelas a -70°C por toda la noche.
- ◆ Coloque las ampulas en termo de nitrógeno líquido (-196).

Descongelación

- ◆ Saque el ampula del nitrógeno y échela directamente en agua a 37°C hasta que se descongele su contenido.
- ◆ Desinfecte el ampula (exterior) con alcohol al 70%
- ◆ Con una pipeta de 1 mL extraiga el contenido del ampula y échelo en un frasco de 25 cm^2 que contenga 4.9 ml de medio de crecimiento. Guarde a 28°C .
- ◆ Cambie el medio a las 24 horas, por medio fresco de crecimiento.
- ◆ Cuando la monocapa este completa pase las células con split 1:5 inicialmente, luego puede restablecer el split acostumbrado.

Inoculación

- ◆ Decante el medio de un frasco de 25 cm² con monocapa celular confluyente.
- ◆ Inocule 0.2mL de una dilución 1:20 de la muestra de suero e incube por 1 hora a 28°C. En ocasiones se produce efecto tóxico por lo que es necesario inocular la muestra directamente en el medio contenido en el frasco (Se añade 0.2 mL de la muestra a los 4 ml del medio del frasco)
- ◆ Observar durante 10-14 días. Cambiar el medio si se produce efecto tóxico.
- ◆ Para la identificación, realizar la IFI utilizando anticuerpos monoclonales o LAH. También puede utilizarse el sobrenadante como inóculo para neutralización por reducción del número de placas.
- ◆ En caso de utilizar tubos con monocapa confluyente, inocular 0.1mL de una dilución del suero 1:30. Después de 1h de adsorción a la temperatura indicada, añadir 1mL de medio de mantenimiento.

En las fotos 1 y 2 se presenta un cultivo control de células C6\36 y otro inoculado con virus dengue 2 donde puede observarse un sincitio característico.

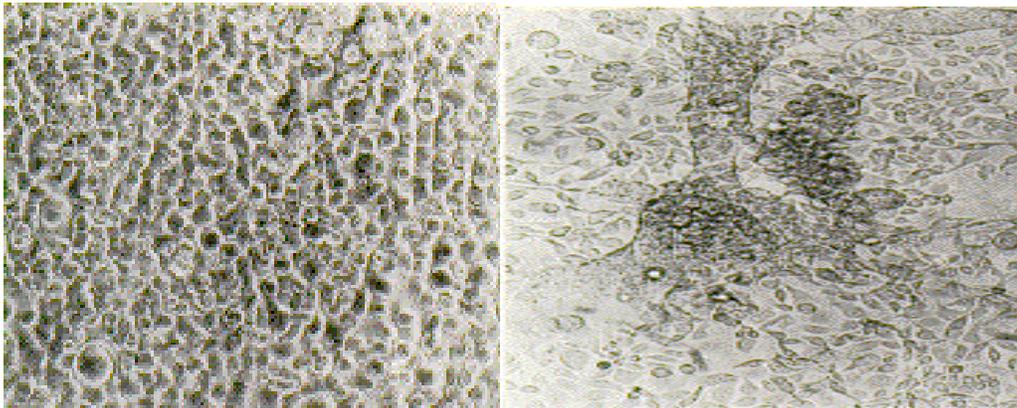


Foto 1

Foto 2

Línea Celular TRA-284-SF

La línea celular TRA-284-SF, es una sublínea de la TRA-284 obtenida por G.Kuno a partir de mosquitos *T. amboinensis*. Crece en medio libre de suero fetal bovino (SFB) y algunas cepas de dengue pueden producir ECP. Estudios realizados han mostrado que es más sensible para el aislamiento del virus dengue que la AP61 y la C6\36.

Materiales:

⇒ Medio de crecimiento: L-15 + 50 % de caldo Triptosa Fosfato (TBP) al 2.9 %

⇒ Policía de goma

⇒ Dimetil Sulfoxido (DMSO)

Multipliación de la línea

- Decante el medio de un frasco de 25 cm².
- Añada 0.3 mL de medio de crecimiento al frasco.
- Desprenda las células con el policía de goma.
- Pipetee delicadamente la suspensión celular para disgregar los grumos con pipeta de 1 mL.
- Añada 0.1mL de la suspensión celular a un frasco de 25 cm² que contenga 4.9 mL de medio de crecimiento. Split máximo semanal de 1:3. Incubar a 28° C.
- A las 24-48 horas, si no hay buena adhesión o en los grumos celulares no se observa crecimiento, cambie la mitad del medio de crecimiento de cada frasco por medio fresco. La monocapa tiene aspecto poroso, y raras veces es completamente confluyente.

Congelación

- Coloque un frasco de 10 mL en baño de hielo.
- Decante el medio del frasco de 25 cm².
- Añada 1 mL de medio fresco.
- Desprenda las células con el policía de goma.
- Con una pipeta de 1 mL tome la suspensión celular y póngala en el frasco sobre el baño de hielo.
- Añada 0.1mL de DMSO al frasco (del baño de hielo) que contiene la suspensión celular.

- Ponga en un ampula de congelación y guárdela a -20°C durante 30 minutos.
- Manténgala en una caja de poliestireno a -70°C durante toda la noche.
- Pase el ampula directamente a nitrógeno líquido (-196°C).

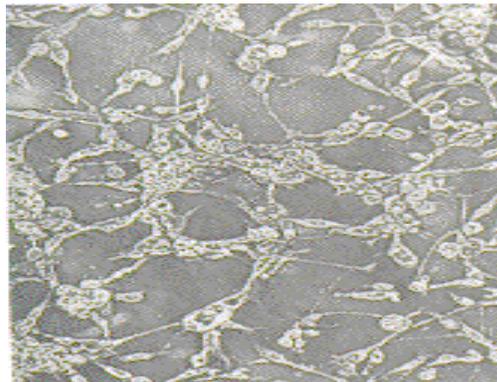
Descongelación

- Saque el ampula del nitrógeno directamente a un baño de agua a 37°C hasta que se descongele su contenido.
- Con pipeta de 1mL saque el contenido del ampula y viértalo en un frasco de siembra de 25 cm^2 que contenga 4.9 ml de medio de crecimiento. Incube a 28°C .
- A las 4 horas cambie la mitad del medio por medio fresco. Tenga cuidado de no arrastrar las células. Para ello, ponga en posición vertical el frasco durante 1-2 minutos y deje sedimentar las células que aún no se han adherido y extraiga el medio de la mitad superior.
- Incube a 28°C y cambie nuevamente el 50% de medio a las 24-48 horas.

Inoculación

- En un frasco de 25 cm^2 con capa celular casi confluyente al que previamente se le habían quitado 3 mL del medio de crecimiento inocular 0.05mL de la muestra (suero).
- Incube a 28°C por una hora .
- Añada 3 mL de medio.
- Incubar a 28°C por 10 días.
- En algunos casos se puede producir ECP.
- La identificación se realiza por medio de la IFI utilizando LAH o Acs. monoclonales o por neutralización por reducción del número de placas.

En la foto se presenta un cultivo de células TRA-284 no inoculadas.



Línea Celular AP-61

Las células de mosquito AP61 (*Aedes pseudoscutellaris*) han sido ampliamente utilizadas para el aislamiento e identificación de los virus del dengue los que producen efecto citopático de tipo sincitial en las mismas. También han sido utilizadas para aislar e identificar el virus de la Fiebre Amarilla el que provoca desprendimiento celular. Estas células fueron obtenidas a partir de larvas de mosquitos *Aedes pseudoscutellaris* por Varma y cols en 1974. Es sensible a varios arbovirus como Chikungunya, Encefalitis Japonesa B, Oeste del Nilo y otros. Se mantiene creciendo en frascos de vidrio y los autores recomiendan pasarlas a plástico para la inoculación. Su mayor sensibilidad ocurre a pasajes bajos (menores de 60).

Materiales:

- ⇒ Medio de crecimiento.
- ⇒ Medio de mantenimiento.
- ⇒ Policía de goma.
- ⇒ Suero de fetal bovino (Inactivado a 56° C por 30 minutos).
- ⇒ Antibióticos.
- ⇒ Incubadora de 28° C.
- ⇒ Unidad de filtración.
- ⇒ Cristalería preparada para cultivo de tejidos.

Medio de mantenimiento

El medio de mantenimiento puede obtenerse comercialmente y está constituido a base de medio Leibovitz (L-15). El mismo se prepara de la siguiente forma:

- ⇒ Filtrar el medio L-15 por membrana 0.22 um
- ⇒ Realizar prueba de esterilidad.

| | Medio de crecimiento | Medio de mantenimiento |
|------------------------------|----------------------|------------------------|
| L-15 (con L glutamina) | 80 mL | 88 mL |
| Caldo Triptosa fosfato (TPB) | 10 mL | 10 mL |
| STF | 10 mL | 2 mL |

Antibióticos (0.1 mL/100mL total de medio).O sea,100 U/ml de penicilina y 100 µg/mL de estreptomicina. El SFB, debe estar inactivado a 56° C por 30 minutos.

Medio de crecimiento MM/VP12 combinado:

| Para un total de... | 800mL | 1600mL |
|--|---------|----------|
| NaCl | 5060mg | 10120mg |
| NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O | 320mg | 640mg |
| MgCl ₂ 6H ₂ O | 490mg | 980mg |
| MgSO ₄ 7H ₂ O | 480mg | 960mg |
| KCl | 320mg | 640mg |
| CaCl ₂ 2H ₂ O | 260mg | 520mg |
| NaHCO ₃ | 260mg | 520mg |
| Glucosa(anhidro) | 2800mg | 5600mg |
| Cloruro de colina | 100mg | 200mg |
| Inositol | 160mL | 320mg |
| HLA | 5250mg | 10500mg |
| Albumina bovina(V) | 400mg | 800mg |
| Yestolate | 2500mg | 5000mg |
| Glutamina(200mM) | 2.4mL | 4.8mL |
| BME vitamina(100x) | 8 mL | 16mL |
| Agua destilada | 789.6mL | 1579.2mL |

Al preparar 800ml, el pH es de aprox. 6.5, llevar hasta 6.8 con 2ml de KOH 2%.

Al preparar 1600mL, el pH es de aprox 6,5, llevar hasta 6,8 con 5 ml de KOH 2%.

Propagación de la línea

El volumen de medio por frasco de 25 cm² es de 4 mL y el total de células de 1.6x10⁶ dependiendo del tiempo de sembrado. La razón de pase o split es de 1:10.

- * Preparar el medio de crecimiento de acuerdo al volumen requerido (para propagar la línea se utiliza el medio de crecimiento).
- * Eliminar el medio del frasco que se va a pasar y añadir 1 mL de medio MMVP12 de crecimiento (para un frasco de 25cm²).
- * Desprender las células usando un policia de goma.
- * Dispersar las células pipeteando varias veces con una pipeta Pasteur o pipeta de 1 mL.
- * Si se usa más de un frasco, hacer un “pool” de células.

- * Contar las células: Usar 1 volumen de la suspensión de células y añadir 1 volumen igual de tripan azul al 0.4 % en solución salina. (Esta dilución de 1:2 debe ser tomado en cuenta en el conteo).
- * Calcular el volumen total de células necesarias de acuerdo a la cantidad de frascos a sembrar (preparar 10 ml extra)
- * Para obtener la monocapa en tres días, sembrar los pases bajos a 5×10^5 células /mL y los pases altos a 4×10^5 células/mL.
- * En la práctica se toma 0,1 mL de la suspensión celular y se añade a un frasco de 25cm² conteniendo 4,9 ml de medio de crecimiento. Incubar a 28°C. La monocapa debe completarse en una semana.
- * Aunque el split de la línea es 1:10 semanal, se debe comenzar desde 1:3 (después de la descongelación) hasta que la misma esté completamente adaptada a las condiciones del laboratorio.

Preparación de células para inocular

- * De un frasco de 25 cm² realizar el desprendimiento celular como se describió anteriormente, utilizando como medio de crecimiento L-15 + 10% TPB (Caldo Triptosa Fosfato en solución al 2,9%) + 10% SFB. El medio de mantenimiento posterior a la inoculación es igual pero con SFB al 2%.
- * Tomar 0,3 mL de la suspensión celular y añadirlo a un frasco plástico de 25cm² que contenga 4,7 mL de medio de crecimiento para la inoculación. La concentración celular aproximada es de 4×10^5 para que la monocapa sea semiconfluyente en 3 días que es el momento idóneo para la inoculación.

Incubar a 28°C. Al aumentar la concentración de células se puede producir una monocapa celular completa en tres días, lista para inocular con el virus. Con las AP61, el efecto citopático es mejor cuando se siembran en superficies plásticas por eso se utilizan frascos plásticos de 25 cm².

La densidad de siembra debe ser de 4×10^5 células/mL para inocular en 2-3 días y de $1-2 \times 10^5$ células/mL para mantener la línea y pasar semanalmente.

Congelación

- * Eliminar el medio de un frasco Roux de 3 ó 4 días de sembrado con monocapa celular semiconfluyente.

- * Colocar 4 mL de medio MMVP12 y 1 ml de SFB en un frasco de 10 mL (rotular como # 1 y poner en baño de hielo).
- * Colocar 4 ml de medio MMVP12 y 1 ml de DMSO en otro frasco de 10 mL, rotularlo como # 2 y ponerlo en baño de hielo.
- * Echar los 5 ml de frasco # 1 en el Roux y desprender con policía de goma la monocapa celular.
- * Homogenizar la suspensión con pipeta de 5 mL y pasarla al frasco # 1 en el baño de hielo.
- * Con pipeta de 5 mL añadir el medio del frasco # 2 sobre el frasco # 1 gota a gota y con agitación manual. Mantener en baño de hielo.
- * Con pipeta de 1 mL dispensar la suspensión celular a 1 mL por cada ampula. Mantener en frío. Dejar 0,1 mL para la prueba de esterilidad.
- * Guardar las ampulas a -20°C durante 1 hora .
- * Guardar las ampulas en cajas de poliespuma durante toda la noche a -70°C .
- * Colocar las ampulas en termo de nitrógeno líquido(-196°C).

Descongelación

- * Extraiga un ampula del nitrógeno y descongélela completamente a 37°C en baño de agua.
- * Extraiga el contenido de la misma con una pipeta de 1 mL y pásela a un frasco de 25 cm^2 que contenga 4 mL de medio de crecimiento (MMVP12 + 10% de SFB).
- * Incubar a 28°C y cambiar el medio a las 24 h.
- * Pasar con split 1:2 o 1:3 cuando se complete la monocapa.

Aislamiento de virus Dengue en AP61

- * Eliminar el medio a los frascos plásticos de 25 cm^2 sembrados para inocular.
- * Inocular 0,2 mL de suero. Los sueros pueden ser tóxicos para las células por lo que en ocasiones se prefiere diluirlos 1:10 o 1:20. Los sueros hemolíticos frescos, o la sangre congelada son menos tóxicos, pudiendo inocularse 0,2 mL. Las suspensiones de macerados de larvas o mosquitos adultos pueden inocularse en volúmenes de hasta

1mL. Si en lugar de frascos de 25 cm² se utilizan tubos de cultivo, puede inocularse 0,2 mL de la muestra diluida 1:10 en medio de mantenimiento L-15.

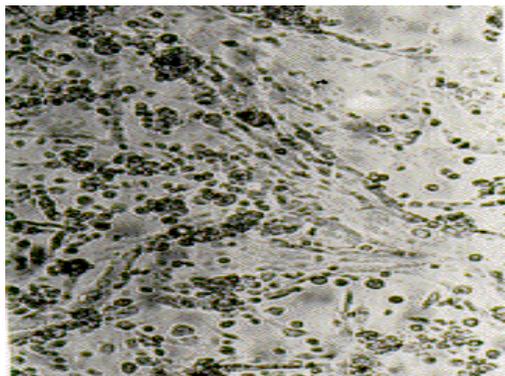
- * Incubar por 1 h a 28°C.
- * Añadir el medio de mantenimiento (L-15 + 10% TPB + SFB 2%).
- * Incubar a 28°C por 14 días. Generalmente no se necesita un cambio de medio.
- * Observar al microscopio diariamente y cambiar el medio si se observa toxicidad.

Nota: La contaminación bacteriana de la muestra puede eliminarse diluyendo la misma en 1-2 mL de medio y filtrando por membrana 0,22 um. Las membranas deben ser pre-tratadas con PBS + 10% de SFB para prevenir la pérdida de virus.

El virus Dengue induce ECP de tipo sincitial al 4to ó 5to día de la inoculación. Se observan áreas alargadas de sincitios que en 3-5 días muestran una fusión completa de la monocapa celular, seguido por retracción y formación de grandes masas de células. Los cultivos que no presentan efecto citopático pueden pasarse nuevamente a los 14 días previa congelación y descongelación.

Para la identificación se debe guardar una alícuota del sobrenadante a -70⁰ C. Las células pueden ser fijadas para inmunofluorescencia o puede realizarse una neutralización por reducción de placas o una fijación de complemento utilizando como antígeno el sobrenadante y como antisuero líquidos ascíticos hiperinmunes específicos de referencia.

En la foto se puede observar un sincitio característico producido por la multiplicación del virus dengue 2 en células AP61.



Línea celular C6\36 HT

Las células de mosquito se cultivan tradicionalmente a 28⁰C, sin embargo Zhu y cols. demostraron que el clono C6\36 podía adaptarse a crecer a 36⁰C pero bajo esas condiciones las células dejan de multiplicarse cuando la temperatura sobrepasa los 35⁰C. Así, Kuno y Oliver (1989) enuncian que las líneas de células de insectos, altamente sensibles y acostumbrada a crecer a 28⁰C al adaptarse a temperaturas mas elevadas mejoran su capacidad para la replicación viral (siempre que la temperatura no exceda los 35⁰C).

Esta sublínea C6\36 HT está adaptada a crecer a 34⁰C por Kuno y cols. Exhiben el mismo ECP que las C6\36 originales aunque éste se manifiesta mas rápidamente y se obtienen mayores títulos virales que a 28⁰C.

Materiales:

- ⇒ Medio de crecimiento: Eagle MEM + 2% aminoácidos no esenciales 100X + 2% soln. glutamina 200mM + 1% vitaminas BME + 10% suero fetal bovino (SFB) (pH 6.8).
- ⇒ Medio de inoculación o de mantenimiento: el mismo medio pero suplementado sólo con 2% de SFB.

Propagación de las células

- Elimine el medio de crecimiento de las células del frasco de 25cm².
- Añada 1ml de medio fresco y desprenda las células golpeando vigorosamente el frasco.
- Homogenice con pipeta Pasteur o de 1mL.
- Resuspenda en medio de crecimiento de acuerdo al fin de las células en cultivo:
 - a) Si es para el pase de la línea realizar un split de 1:8 ó ajustando la concentración a 1x10⁴ cel/ml.
 - b) Si se prepara para aislamiento, aplique un split de 1:3-1:4 ó ajustando la concentración 1x10⁵ cel/mL. Podrá utilizarse en 48h. Por tanto de un frasco de 25cm² se pueden preparar 75 tubos aproximadamente.
- Incubar a 34⁰C.

Congelación.

Similar que para la sublínea C6\36.

Descongelación.

Similar que para la sublínea C6\36.

Inoculación en tubos.

- Decantar el medio de cada tubo.
- Inocular 100uL de una dilución 1:30 del suero.
- Incubar por 1h a 34⁰C si hay evidencias de citotoxicidad, elimine el vehículo
- Añadir el medio (1mL) de inoculación o mantenimiento.
- Incubar a 34⁰C 9-10 días y observar diariamente.
- Realizar una IFI antes de dar la muestra como negativa.

Aislamiento de virus Dengue en células C6/36 HT por Shell Vial

Muestras para el aislamiento viral: Suero o sangre de pacientes en fase aguda, Fragmento de tejido de fallecido y Pool de mosquitos.

Sistemas de aislamiento: Cultivos Celulares: LLC-MK₂ (riñón de mono Rhesus), Vero (riñón de mono verde), BHK-21 (riñón de hamster recién nacido), AP-61 (*Aedes pseudoscutellaris*) 28⁰C, TRA-284 (*Toxorhynchitis amboinensis*) 28⁰C, C6/36 Sublínea de AAL (*A. albopictus*) 28⁰C, C6/36HT Sublínea de C6/36 de alta temperatura 34⁰C

SHELL VIAL. Consiste en la centrifugación de la muestra durante el tiempo de contacto virus-célula sobre una superficie excavada o el fondo de un tubo en el cual se encuentren las células y se realiza a la temperatura óptima para el virus. (Rodríguez R, Alvarez M, Guzmán MG, Morier L, Kouri G) Isolation of dengue 2 virus in C636/HT cells by rapid centrifugation/shell vial assay. Comparison with conventional virus isolation method. . J Clin Microbiol, 38: 3508-3510, 2000

OBJETIVO: Favorecer la adsorción y la penetración del virus a las células.

SHELL VIAL + C6/36HT = MAYOR EFICIENCIA DE AISLAMIENTO

TECNICA:

Para placas de 24 pozos con células C6/36 HT (24-48 horas de sembradas)

1. Eliminar el medio de crecimiento utilizando una pipeta de 5 mL.
2. Inocular 100 µL de una dilución de suero por triplicado.
3. Centrifugar a 2000 rpm durante 30 min a 33°C (la centrifugación facilita la adhesión viral)
4. Eliminar el inóculo aspirando cuidadosamente.
5. Añadir 1 mL de medio de mantenimiento por pozo.
6. Incubar a 33°C en atmósfera de CO₂.
7. Observar diariamente durante 7-10 días.
8. Identificar mediante IFI utilizando LAH o AcM.

INMUNOFLUORESCENCIA

La inmunofluorescencia (IF) o Técnica de Anticuerpos Fluorescentes se basa en la unión inmunológica de un anticuerpo marcado con un fluorocromo a su antígeno homólogo.

Se considera un fluorocromo a una sustancia que al ser excitada por una onda luminosa, es capaz de emitir luz de menor energía (mayor longitud de onda) que la de la onda que provoca la excitación. El fluorocromo de mas amplia aplicación en esta técnica es el isotiocianato de fluoresceína.

En 1941, la IF fue introducida por Coons y colaboradores, quienes emplearon el isocianato de fluoresceína para marcar tanto antígenos como anticuerpos. Posteriormente, las técnicas de conjugación fueron modificadas por Riggs y colaboradores. Estos investigadores reemplazaron el radical isocianato por el isotiocianato, este último más estable, más fácil de conjugar y de obtener comercialmente.

A partir de los años 50, la IF ha sido ampliamente utilizada para la identificación de parásitos, bacterias y numerosos virus, así como para la detección de anticuerpos contra estos agentes.

Principio de la técnica

Las moléculas proteicas de los anticuerpos se unen al marcador fluorescente (fluorocromo) por medio de firmes enlaces químicos. Como la actividad inmunológica de estos anticuerpos no se altera, la capacidad de los mismos de unirse a los antígenos homólogos permanece íntegra.

Debido a la alta especificidad de la reacción Ag-Ac, la IF se ha convertido en un método muy útil para el diagnóstico. Otra de sus desventajas es el tiempo relativamente corto que se requiere para el procesamiento de la muestra hasta llegar al resultado final.

La IF es aplicable a cualquier sustancia antigénica que se localice dentro o fuera de las células, sean antígenos protozoarios, bacterias, rickettsias, virus, hormonas, enzimas, antígenos tisulares y otros.

La extensa variedad de estructuras y propiedades físico-químicas de los antígenos implica que sus requerimientos para ser marcados con el fluorocromo variarán para cada caso en

específico, de ahí que se haya generalizado el procedimiento de marcar los anticuerpos (todos los anticuerpos son proteínas). Por ello, la IF se conoce también con el nombre de Técnica de Anticuerpos Fluorescentes.

Microscopio para fluorescencia

El principio de funcionamiento del microscopio para la fluorescencia es similar al de un microscopio óptico convencional, pero en el caso del primero ha de utilizarse un sistema de excitación que proporcione una energía tal que sea capaz de excitar a los fluorocromos empleados para marcar los anticuerpos.

Se ha comprobado en la práctica que el sistema de excitación ultravioleta es el más conveniente, debido a que en gran medida su empleo elimina la posibilidad de confundir la fluorescencia específica con la autofluorescencia propia de las células y tejidos. Por ello, en general se emplea como fuente de luz una lámpara de mercurio acompañada de un sistema de filtros de absorción de calor, de excitación, de "barrera" y otros. Estos filtros aseguran una mayor nitidez en la observación de las muestras ya que seleccionan las longitudes de onda más apropiadas para la excitación, eliminando aquellas que resulten perjudiciales para el observador.

Existen dos métodos básicos de iluminación en el microscopio para fluorescencia: la luz transmitida y la luz incidente, este último método presenta diversas ventajas ya que al no requerirse un condensador campo-oscuro pueden utilizarse objetivos de mayor aumento lo que permite una observación de mayor brillantez e intensidad. Por otra parte, su uso resulta más seguro para la vista del observador.

En dependencia de los objetivos trazados, se pueden emplear distintas variantes de tinción en la inmunofluorescencia:

Método Directo: El material se tiñe directamente con el correspondiente anticuerpo marcado.

Antígeno(Ag) + Ac fluorescente (Ac-F) → Ag-Ac-F

Este es el método más simple y específico aunque es menos sensible que el indirecto. Tiene la desventaja de que para cada antígeno específico se requiere de un anticuerpo homólogo marcado con el fluorocromo, lo cual no resulta económico ni práctico.

Método Indirecto: El anticuerpo primario (no marcado) se añade sobre la muestra y el anticuerpo secundario (marcado) se combina con el complejo Ag-Ac primario. Si la fluorescencia es específica, se puede identificar el antígeno cuando se conoce el anticuerpo primario o viceversa.

Ag + Ac primario ---- Ag-Ac primario

Ag-Ac primario + Ac secundario (Ac-**F**) ----- Ag-Ac primario-(Ac-**F**)

Este método, en comparación con el directo, presenta 3 ventajas fundamentales:

- I. Es mas sensible.
- II. Sirve para detectar tanto Ag como Ac.
- III. Se puede trabajar una amplia variedad de Ag-Ac siempre que se utilicen sueros de la misma especie.

Preparación del sustrato antigénico para la inmunofluorescencia

Ratón:

- Si se parte de un ratón agonizante, hay que extraerle el cerebro y colocarlo sobre un papel de filtro.
- Con la punta de un bisturí se tomarán pequeñas porciones de cerebro, con las cuales se practicará frotis sobre los portaobjetos cuidando que queden bien extendidos para poder lograr una capa de célula lo más fina posibles.
- Esperar que los frotis sequen completamente a temperatura ambiente.
- Después de secos se colocarán las láminas en un vaso koplín y se añade acetona a 4°C hasta cubrir los frotis. Se mantendrán en acetona durante 10 minutos.
- Se elimina la acetona y en los mismos vasos se conservan las láminas en congelación (20 ó -70°C). Mientras menor sea la temperatura, por más tiempo se conservarán las muestras. Si están mantenidas a -20°C, no deben almacenarse por más de 1,5 meses.

Células:

- Para utilizar las células como sustrato antigénico para la IFA, estas deben ser inoculadas como está establecido para cada línea celular en específico, es decir, teniendo en cuenta los requerimientos individuales de cada una de ellas.

- En el caso del virus Dengue las células deben ser fijadas a partir del tercer día y no antes.
- Para la fijación, se eliminará el sobrenadante del cultivo y la monocapa celular se lavará con 2-3 ml de PBS, evitando desprender las células.
- Posteriormente, a la monocapa se añaden 3 ml de PBS y se desprenden las células con un policia de goma o golpeando el frasco que las contiene vigorosamente.
- La suspensión celular obtenida se gotea sobre láminas porta objeto y se observa al microscopio óptico la concentración celular, que no debe ser ni muy baja (pocas células), ni muy alta (muchas células que se superponen y dificultan la observación).
- Después de ajustada la concentración adecuada de células por adición de PBS, el sustrato antigénico se distribuye sobre las láminas y estas se dejan secar a temperatura ambiente. No deben utilizarse secadores eléctricos porque provocan aerosoles de las células infectadas.
- Ya secas las muestras, los portaobjetos se colocan en un vaso koplín y se añade acetona a 4°C durante 10 minutos.
- Se elimina la acetona y en los mismos vasos koplín se guardan las láminas en congelación hasta su uso. Mientras menor sea la temperatura, por más tiempo se conservarán las láminas.

Procedimiento para la IF Indirecta

- Sobre la muestra se añade el antisuero específico en la dilución apropiada y en cantidad suficiente para cubrirla por completo (aproximadamente 10 ml de esta solución). El antisuero específico puede ser líquido ascítico hiperinmune de referencia, sueros hiperinmunes, sueros de pacientes en fase convalescente, anticuerpos monoclonales y otros en dependencia del objetivo de la experiencia. Las láminas se mantienen a 37° C durante una hora en cámara húmeda.
- Posteriormente se colocan las láminas en los vasos koplín. Se añade PBS que se elimina al instante. Se agrega nuevamente PBS y se realiza un lavado de 5 minutos, se elimina el PBS y de esta misma forma se realizan otros lavados dos lavados.
- Se extraen las láminas de los vasos koplín, se dejan secar a temperatura ambiente y entonces, se añade el conjugado comercial que ha sido previamente titulado para

determinar la dilución de trabajo. Esta dilución se prepara utilizando PBS + Azul de Evans, que servirá de contraste.

- Las muestras se mantienen en contacto con el conjugado durante 30 min a 37° C en cámara húmeda.
- Después de lavadas, las láminas se secan a temperatura ambiente y se añaden 2 gotas por lámina de glicerina buferada (9 volúmenes de glicerina + 1 volumen de Tris 100 mM). Sobre la glicerina se coloca cuidadosamente el cubreobjeto con un ángulo de 45 grados con respecto a la superficie de las láminas de forma tal que no se forme burbujas que dificulten considerablemente la observación al microscopio.
- Se observan las láminas al microscopio para fluorescencia y se determina si las muestras son positivas o negativas teniendo en cuenta lo observado en los controles que deben incluirse en cada experiencia. La IF específica, en el caso del virus dengue, se describe como citoplasmática perinuclear.

TITULACIÓN DEL VIRUS DEL DENGUE Y NEUTRALIZACIÓN POR REDUCCIÓN DEL NUMERO DE PLACAS

Entre los métodos de identificación del dengue, la técnica de neutralización por reducción del número de placas ha sido ampliamente utilizada por su elevada especificidad. Para esta prueba los virus pueden ser aislados en cualquier sistema aunque en ocasiones es necesario realizar un pase por una línea de células de mamífero permisiva como son las células LLCMK2, Vero y las de mosquito.

La utilización de las células BHK21 en la técnica de placas (por micrométodo) ha brindado resultados satisfactorios y rápidos. La misma es útil, no sólo para la identificación, sino también para la detección de anticuerpos contra virus dengue. Esta línea celular, fue obtenida en 1963 a partir de una mezcla de riñones de hamsters sirios recién nacidos. La misma ha mostrado ser útil para la multiplicación del virus de la rabia, los adenovirus y numerosos arbovirus, entre otros.

Título de Dengue por micrométodo

Medios y soluciones:

- ⇒ Medio Hanks + 0.5 % STF + Antibióticos
- ⇒ Solución salina tamponada con fosfato (PBS)(pH 7.95)
- ⇒ Solución de tripsina al 0.25%, pH 7.4-7.6
- ⇒ Solución de versene al 0.02%, pH 7.4-7.6
- ⇒ Medio de crecimiento de las células BHK21(clono 15):

| | |
|--------------------------------|-------|
| MEM con glutamina 2mM | 90 ml |
| y aminoácidos no esenciales 1% | |
| Suero fetal bovino | 10 ml |
| Antibióticos | |

Ajustar a pH 8 con solución de bicarbonato de sodio al 7.5%

⇒ Medio Overlay:

| | |
|--------------------------|--------|
| STF | 10 ml |
| L-Glutamina | 1 ml |
| 2x MEM (MBA) sin R.Fenol | 100 ml |
| CMC 3% estéril | 50 ml |
| Antibióticos | 0.2ml |

Ajustar a pH 8 con solución de bicarbonato de sodio al 7.5%.

La carboximetilcelulosa (CMC) SIGMA # C-4888, viscosidad media se prepara al 3%: A 50 ml de agua bidestilada, se añaden 1.5 g de CMC dejando que se deja disolver a 4° C durante uno o dos días.

⇒ Colorante: Naphthol Blue Black (NBB)

| | |
|------------------------------|---------|
| Naphthol Blue Black | 1 g |
| Acetato de sodio | 13.6 g |
| Ácido acético glacial | 60 ml |
| H ₂ O a completar | 1000 ml |

Nota: El NBB puede obtenerse de Matheson Coleman y Bell. El mismo puede no estar estéril y almacenarse por largos períodos.

Materiales y Equipos:

- ⇒ Tubos de dilución (100 x 13) o placas de 96 pocillos.
- ⇒ Pipetas de cristal.
- ⇒ Placas de 24 pozuelos.
- ⇒ Puntas amarillas estériles.
- ⇒ Pipetas "Eppendorf" de 1000, 200, 100, 50 y 20 ul.
- ⇒ Incubadora de CO₂

Siembra de células BHK21 Clono 15

- ◆ Frasco Roux de monocapa completa (5 ó 7 días).
- ◆ Decantar el medio.
- ◆ Lavar las células con PBS (10ml).

- ◆ Añadir 10 ml de tripsina - versene (1:1). Dejar a temperatura ambiente por 3 minutos. Eliminar el medio e incubar durante 5-10 minutos a 37° C (el desprendimiento se hará evidente).
- ◆ Añadir 9 ml de medio de crecimiento. Resuspender las células pipeteando vigorosamente (10-15 veces).
- ◆ Comprobar que la monocapa se a desprendido completamente.
- ◆ Distribuir 3 ml de células por cada frasco Roux (de cada Roux se obtienen 3 similares: split 1:3 semanal).
- ◆ Completar el volumen de cada frasco a 100-120 ml de medio de crecimiento.
- ◆ Incubar a 37° C por 5-7 días. Aproximadamente a los 4-5 días la monocapa será confluyente y las células crecerán de forma organizada en remolinos.

Preparación de las células para la titulación del virus

- ◆ Calcular el número de células necesarias para la prueba (2.5×10^5 células / ml x 0.5 ml / pozuelo x 24 pozuelos x placa). Hacer una cantidad extra (aproximadamente de un frasco de 75 cm², se obtienen 3-6 x 10 células). Un frasco de 75 cm² de monocapa confluyente (4-5 días) da para 10 placas.
- ◆ Decantar el medio y lavar con PBS.
- ◆ Añadir 4 ml de tripsina-versene y realizar el desprendimiento como se describió anteriormente.
- ◆ Desprender las células en 5 ml de medio de crecimiento.
- ◆ Añadir toda la suspensión celular a un frasco de 200 ml de boca ancha que contenga 120 ml de medio de crecimiento. Este volumen es suficiente para 10 placas a razón de 0,5 ml/pozuelo.

Congelación de las células BHK-21

- ◆ De un frasco Roux con monocapa casi confluyente (3-4 días) desprender las células como se describió anteriormente.
- ◆ Colocar la suspensión celular en tubos de centrífuga y centrifugar 3-5 minutos a temperatura ambiente a 1000 r.p.m.

- ◆ Decantar el sobrenadante y resuspender las células en 5 mL de medio MEM + glutamina + aminoácidos no esenciales + 1 mL de STF. Colocar en un frasco rotulado con el # 1 que previamente debió estar en baño de hielo.
- ◆ Preparar otro frasco que contenga 4 mL del mismo medio (sin STF) pero añadiendo 1 ml de dimetilsulfóxido. Colocarlo sobre el baño de hielo. Rotular con el # 2. Comprobar que ambos frascos tienen bien mezcladas sus soluciones.
- ◆ Con una pipeta de 5 mL tomar el medio del frasco # 2 y añadir lentamente, gota a gota y agitando, el contenido del frasco # 2 en el # 1. Siempre en baño de hielo.
- ◆ Distribuir 1 mL de la suspensión (aprox. 1×10^8 células / mL) por ampula (siempre en frío). Dejar 0,1 mL para la prueba de esterilidad.
- ◆ Guardar durante 1 hora a -20° C.
- ◆ Colocar las ampulas en una caja de poliespuma y guardar a -70° C por 24 horas. Pasarlas después a nitrógeno líquido.

Descongelación de células BHK-21

- ◆ Extraer el ampula directamente del nitrógeno líquido y colocarla a 37° C en baño de agua hasta que se descongele.
- ◆ Extraer su contenido con pipeta de 1 mL y verterlo en un frasco plástico de 25 cm² que contenga 4 mL de medio de crecimiento. Incubar a 37° C.
- ◆ Cambiar el medio a las 24 horas.
- ◆ Cuando la monocapa celular se complete, pasar la línea en split 1:2.

Título de Dengue en células BHK21

- ◆ Preparar un grupo de tubos marcados desde 10^{-1} y hasta 10^{-7} , dependiendo del título viral sospechado.
- ◆ Pipetear asépticamente 0.9 ml del diluyente (medio Hanks + 0.5% STF) en cada uno de los tubos. Mantener en hielo.
- ◆ Descongelar rápidamente un vial del virus (preferiblemente a 37° C). Transferir 0.1 ml del virus al primer tubo con diluyente, eliminar la pipeta
- ◆ Mezclar vigorosamente en el agitador.

- ◆ Transferir con una pipeta nueva 0.1 ml de la dilución de virus 10^{-1} al siguiente tubo y así sucesivamente.
- ◆ Añadir 0.5mL de la suspensión celular en cada pozuelo de la placa de 24 y dejarlas en reposo 1 hora a temperatura ambiente.
- ◆ Marcar las placas, se toman 3 pozuelos por cada dilución de virus como mínimo.
- ◆ Dejar las diluciones virales por 1 hora a 37° C.
- ◆ Inocular 50 uL de cada dilución viral a las células.
- ◆ Incubar por 4 horas a 37° C en incubadora de CO_2 , al 5 %.
- ◆ Añadir 0.5 mL de medio con CMC.El medio debe tener un pH de 8-8,5 para dengue 1, 3 y 4. Para dengue 2 puede encontrarse entre 7- 8,5
- ◆ Incubar a 37° C por 8 días para el dengue 4, 5 días para el dengue 2 y 9 días para el dengue 1 y 3, en incubadora de CO_2 5%.
- ◆ Descartar el medio. Lavar suavemente con agua corriente. Teñir las células con NBB (0.5 mL por pozuelo). Después de 30 minutos lavar con agua de nuevo. Las placas pueden ser contadas inmediatamente o cuando se sequen.

Neutralización por reducción del número placas

- ◆ Preparar las diluciones de los sueros en estudio, usando como diluyente Hanks + 2% de SFB .Estas diluciones pueden ser preparadas previamente y mantenidas a 4° C no más de una semana).
- ◆ Preparar una dilución de trabajo del virus que contengan aproximadamente de 15 a 20 ufp / 50uL. Se prepara una dilución de trabajo de 40 ufp / 50uL, que al ser mezcladas con igual volumen, dichas diluciones de virus contengan las 20 ufp/50 μ L
- ◆ Calcular el volumen de virus necesario de la dilución de trabajo multiplicando por 100uL, el número de sueros en estudio más el número de controles.
- ◆ Realizar las mezclas de virus-suero en placas de 96 pozuelos. Cada pozuelo de esta placa, contendrá una mezcla de virus-suero en cantidad suficiente para inocular 3 pozuelos de la placa de 24 pozos. Incluir en esta última placa 2 pozuelos como mínimo para el virus control, y 2 pozuelos con una dilución del control de virus 1:10 y 2 pozuelos dilución del control de virus de 1:100. Colocar la placa sobre hielo.

- ◆ Añadir 100ul de la dilución de trabajo del virus y a los huecos controles de la forma siguiente:

| | |
|-----------------------|-------------------------------|
| Control de virus | 100uL de la dilución de virus |
| A la 1:10 | 100uL de la dilución de 1:10 |
| A la 1:100 | 100uL de la dilución de 1:100 |
| Al control de células | 100uL de Hanks |

- ◆ Utilizar una pipeta "Eppendorf" de 100uL, añadir 100uL de cada suero o de las diluciones de sueros en estudio. Mezclar 5 veces.
- ◆ Cubrir la placa y mantener a 37° C por 1 hora.
- ◆ Marcar las placas de 24 pozuelos y añadir 0.5 mL de la suspensión de células BHK21
- ◆ Dejar las células en reposo durante 1 hora a temperatura ambiente.
- ◆ Inocular 50 uL de la mezcla virus-suero a cada pozuelo (por triplicado).
- ◆ Incubar por 4 horas a 37° C en atmósfera de 5% de CO₂.
- ◆ Añadir a cada pozuelo 0.5 mL del medio overlay.
- ◆ Incubar a 37° C en CO₂ por 8 días para dengue 4, 5 días para dengue 2 y 9 días para dengue 1 y 3.
- ◆ Teñir las placas de la misma forma que se describió en el tópico de titulación viral.

Lectura de las placas

Título viral: Para conocer el título de un virus se aplica la siguiente fórmula:

$$P \times 20 \times 10^X = \text{UFP/mL.}$$

donde:

P es el promedio del número de placas obtenido en la dilución en que se contaron las placas.

20 es el factor de corrección para expresar el título en UFP/mL (1000μL/ Vol. Inoc.).

10^x representa la dilución en que se contaron las placas (Factor de dilución).

Ejemplo:

| Dilución | # de placas | | | Promedio |
|-----------|-------------|----|----|----------|
| 10^{-1} | NC | NC | NC | NC |
| 10^{-2} | 15 | 19 | 17 | 17 |
| 10^{-3} | 4 | 3 | 2 | 3 |
| 10^{-4} | 0 | 0 | 0 | 0 |

NC - No contable

$$\text{Título: } 3 \times 20 \times 10^3 = 6.0 \times 10^4 \text{ ufp/mL}$$

Cálculo de la dilución de trabajo de virus a utilizar:

La manera más fácil de calcular la dilución de trabajo es observando el número de placas virales en la placa de titulación y tomando una dilución 2 veces más concentrada de la que muestra el número ideal de placas. Por ejemplo: Si en la dilución 1/10000 se observa un promedio de placas virales entre 20 y 30 (número ideal de placas), la dilución de trabajo adecuada será de 1/5000

Cálculo del punto final del 50% de reducción de placas:

⇒ Calcular el promedio del número de placas en el control de virus o en su lugar, en el control de virus más suero negativo.

Calcular el % de reducción de placas para cada mezcla virus-suero con respecto al promedio del virus control. Ejemplo:

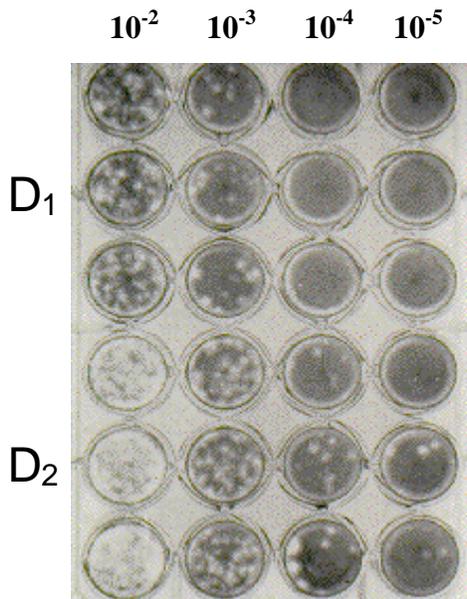
| | # de placas | | | Promedio |
|---------------|-------------|----|----|----------|
| virus control | 20 | 20 | 20 | 20 |
| Virus + suero | 6 | 4 | 5 | 5 |

$$5/20 = 25\% \quad 100\% - 25\% = 75\% \text{ de reducción}$$

Para conocer el título de anticuerpos de un suero pueden utilizarse 2 métodos:

1. El suero se prueba a una dilución específica frente a una dilución constante de virus. En este caso se obtiene el % de reducción de placas para la dilución de suero utilizada, lo cual indicaría si el suero tiene o no anticuerpos (% de reducción). Cuando este % de reducción es de $\geq 50\%$, se considera que el suero es positivo (presencia de Acs).
2. El suero se prueba en varias diluciones frente a una concentración constante de virus, esto nos permite conocer el título de anticuerpos del suero. Para cada dilución de suero se halla el % de reducción del número de placas. Estos datos se llevan a un papel semilogarítmico, para hallar la dilución que reduce en 50% el número de placas, la cual representa el título del suero. Este método es también utilizado para identificar virus, pues se pone un virus aislado a una concentración constante previamente definida frente a diluciones de un suero hiperinmune conocido.

En la foto pueden observarse las placas producidas por una cepa de virus dengue 2 y una de dengue 1 en células BHK21 (diluciones virales desde 10^{-2} a 10^{-5}). Las tres primeras filas representan las diluciones de dengue 1 y las tres segundas de dengue 2.



En la neutralización se puede utilizar el método de diluciones variables de virus frente a una dilución constantes de suero. La dilución de virus que infecta el 50% del hospedero se considera el punto final. Los resultados obtenidos se comparan con el título del virus sin suero (control de virus) y se halla el índice de neutralización. Una diferencia de al menos 2 en el logaritmo de base 10 se considera como un criterio de neutralización significativa. Este método puede ser utilizado para identificar virus (frente a un suero hiperinmune conocido a una dilución constante) o para conocer diferencias en el título neutralizante entre un suero de paciente en fase aguda y uno convaleciente.

El método de neutralización basado en una dilución variable de virus que se pone en contacto con diluciones variables de suero, no se utiliza en la práctica, dada su complejidad.

- Morens, D.M., Halstead, S.B., Repik, P.M., Putvatana, R.P., and Raybourne, N.. 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. *J. Clin. Microbiol.* 1985; **22**: 250-54

REPARACIÓN DE ANTÍGENO POR EL MÉTODO DE SACAROSA-ACETONA

Aunque existen varios métodos para la preparación de antígenos para arbovirus, la técnica más utilizada es la extracción con sacarosa-acetona descrita por Clarke y Casals en 1958, la cual proporciona antígenos estables con altos títulos.

El proceso es potencialmente peligroso y deben tomarse las medidas necesarias para la manipulación del virus infeccioso, de la acetona (inflamable) y de la sustancia inactivadora del virus.

Este método rinde antígenos hemaglutinantes y fijadores del complemento por lo que pueden utilizarse para ambas técnicas.

La acetona permite un mayor rendimiento viral al actuar sobre los lípidos del cerebro. La sacarosa protege de la acción de la acetona sobre la envoltura del virus mediante un mecanismo que aun no ha sido dilucidado por completo. La relación entre las concentraciones de sacarosa, cerebro, acetona y agua parecen ser críticas en el rendimiento viral.

Materiales y Equipos:

- ⇒ Gabinete de seguridad
- ⇒ Centrifuga refrigerada
- ⇒ Homogenizador mecánico o eléctrico
- ⇒ Cristalería

Reactivos:

- ⇒ Sacarosa
- ⇒ Acetona , calidad reactiva a -70°C
- ⇒ Solución Borato Salina pH 9 (BS)
- ⇒ Tris (Hydroxymethyl aminomethane, Gibco 130910)
- ⇒ Beta propiolactona (BPL) (Betaprone, Fellows Testagar, Detroit, Michigan)
- ⇒ Alcohol 70%

Obtención de cerebros de ratones infectados:

- Inocular por vía intracerebral los ratones lactantes de 1-2 días de nacidos con 0,02 ml de una suspensión de cerebro de ratón infectado con alguno de los serotipos en cuestión. Esta suspensión usualmente se prepara a una dilución 1/50 del cerebro en PBS con 5 % de suero de ternera inactivado por calor y antibióticos. Puede usarse en lugar de PBS, medio 199 u otro.
- Examinar los ratones inoculados entre el 4to y el 7mo día post inoculación (dependiendo de la cepa y el serotipo inoculado) en busca de los signos de la enfermedad. Cuando la mayoría de los ratones estén enfermos deben congelarse preferiblemente a -20 ó -70° C hasta su uso.
- Los ratones se desinfectan con alcohol al 70% y se dejan secar. El tejido cerebral de cada ratón se extrae asépticamente por aspiración colocándolo en un frasco con hielo.
- Para preparar el antígeno pueden utilizarse los cerebros previamente extraídos y guardados a -70 C o pueden guardarse los ratones a -20 ó -70° C hasta el día antes de la preparación del antígeno momento en el cual se dejan durante toda la noche a 4°C para su descongelación y posterior extracción del cerebro.

Extracción del antígeno

El antígeno se prepara asépticamente en un gabinete de seguridad grado 2 preferiblemente. Tanto el antígeno como la acetona utilizada son infecciosas por lo que deben manipularse con extremo cuidado. Debe evitarse el uso de mecheros durante el proceso.

- Por cada volumen de cerebro de ratón extraído añadir 4 volúmenes de sacarosa al 8,5% en agua destilada. Homogenizar la suspensión exhaustivamente en frío.
- Añadir la suspensión de cerebro a 20 volúmenes de acetona fría (kitasato). Utilizar para esto una aguja #18 larga sumergida en la acetona.
- Agitar vigorosamente en ambos sentidos y dejar reposar en baño de hielo durante 15 minutos.
- Aspirar la acetona completamente y añadir otros 20 volúmenes de acetona fría. Romper el precipitado con un agitador de vidrio. Dejar sedimentar el antígeno y reposar en baño de hielo durante 1,5 horas con agitación ocasional durante la primera hora.

- Aspirar la acetona y secar el precipitado utilizando una bomba de alto vacío (10^{-2} mB) hasta la aparición de un polvo rosado claro (aproximadamente 30 min).
- Rehidratar con buffer tris-borato salina + 5% sacarosa a 0.5 volúmenes del homogenizado de cerebro-sacarosa (el tris se prepara al 1 M en cloruro de sodio al 0,85% y posteriormente se lleva a 0,1 M en buffer borato-salina pH 9 chequeándose este posteriormente).
- Dejar rehidratando toda la noche a 4°C con agitación.
- Centrifugar 30 minutos a 4°C a 3000 rpm y desechar el precipitado.
- Para inactivar el antígeno se añade BPL para una concentración final de 0,1% para dengue 1, 3 y 4 ; al 0,19 % para dengue 2. Agitar bien y mantener a 4°C durante 48 horas.
- Distribuir en alícuotas para guardar a -70°C o para liofilizar y guardar a -20°C.
- Chequear si la inactivación fue efectiva inoculando con el antígeno inactivado por vía intracerebral dos familias de ratones lactantes y observar por 21 días.
- Para los virus Dengue la concentración de BPL es crítica de acuerdo al serotipo, ya que concentraciones mayores reducen la actividad del antígeno.
- Durante el proceso de extracción deben reenvasarse varias ámpulas conteniendo cerebro de ratón solo en suspensión al 10% (en PBS o medio de cultivo + suero de ternera al 5% + 100 U por ml de antibióticos) las cuales se guardarán a -70° C y servirán como virus "semilla" para el próximo pase en ratones y de esta forma mantener el virus.

HEMAGLUTINACION E INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACION

Ciertos virus aglutinan los glóbulos rojos. La hemaglutinación (HA) es la unión de los eritrocitos producida por el virus o por alguna estructura del mismo. El resultado visible de la HA viral es un patrón formado en el fondo del pozuelo por los eritrocitos unidos por la hemaglutinina viral.

En la hemaglutinación directa, el virus actúa directamente sobre las células y esta propiedad puede ser inhibida por anticuerpos específicos al virus. En el caso de los arbovirus la propia partícula viral es la hemaglutinina no existiendo enzima destructora del receptor como en los orthomyxovirus.

Los anticuerpos a los diferentes arbovirus poseen una amplia reactividad de grupo por lo que la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH) se utiliza para clasificar a los mismos en grupos antigénicos.

Equipos:

- ⇒ Centrífuga refrigerada
- ⇒ Placas en fondo U desechables
- ⇒ Pipetas eppendorf de 25 y 50ul. Pipeta multicanal de 25-250ul.
- ⇒ Cristalería

Reactivos:

- ⇒ Solución de Alsever

| | |
|---|---------|
| Dextrosa | 20.5 g |
| NaCl | 4.2 g |
| Ácido cítrico(C ₆ H ₈ O ₇ .H ₂ O) | 0.55 g |
| Citrato de sodio(Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .2H ₂ O) | 8.0 g |
| H ₂ O destilada a completar | 1000 mL |

Esterilizar en autoclave durante 10 minutos a 10 libras de presión.

- ⇒ Glóbulos rojos de ganso, adulto, macho (sangrar sólo cada 6 semanas). Las hembras no se utilizan ya que los cambios en el ciclo hormonal pueden variar los títulos hemaglutinantes.

- ⇒ Cloruro de sodio 1.5 M.
- ⇒ Fosfato dibásico de sodio ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) 0.5 M.
- ⇒ Fosfato monobásico de sodio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 1 M.
- ⇒ Ácido Bórico 0.5 M.
- ⇒ Solución borato salina pH 9.
- ⇒ Albúmina bovina (fracción V) al 0.4 % en buffer borato salina, pH 9 (BABS)
- ⇒ Kaolín (lavado en ácido) al 25% en buffer borato salina (Flow laboratories) del utilizado para el diagnóstico de Rubéola.
- ⇒ Antígenos (preparados por el método sacarosa-acetona).
- ⇒ Soluciones stocks:

| | |
|--|-------------------------------|
| NaCl (1.5 M). | 87.6g en 1000mL de agua dest. |
| NaH_2PO_4 (anhidro) 1M | 120g en 1000 mL de agua dest. |
| Na_2HPO_4 (anhidro)0,5 M | 70.59g en 1000mL de agua dest |

- ⇒ Solución A (pH 8.8):

| | |
|----------------------------------|---------|
| NaCl(1.5M) | 100 mL |
| Na_2HPO_4 (0.5M) | 400 mL |
| Completar c/agua dest. | 1000 mL |

- ⇒ Solución B (pH 4.3):

| | |
|---------------------------------|---------|
| NaCl(1.5M) | 100 mL |
| NaH_2PO_4 (1 M) | 200 mL |
| Completar c/agua dest. | 1000 mL |

Tabla de Valores de pH

| pH | <u>Solución A</u> (mL) | <u>Solución B</u> (mL) |
|-----------|---------------------------|---------------------------|
| 5.75 | 3.95 | 97 |
| 6.0 | 12.5 | 87.5 |
| 6.2 | 22 | 78 |
| 6.4 | 32 | 68 |
| 6.6 | 45 | 55 |
| 6.8 | 55 | 45 |
| 7.0 | 64 | 36 |
| 7.2 | 72 | 28 |
| 7.4 | 79 | 21 |

NOTA: El pH final es obtenido mezclando volúmenes iguales de buffer borato-salina pH 9 con cada una de las soluciones anteriores. El ajuste de los pH se hace con las soluciones A y B (dependiendo si hay que acidificar o alcalinizar). Las soluciones de pH pueden guardarse a 4°C menos las que están por encima de 6.8 que pueden cristalizar.

⇒ Soluciones stocks para buffer borato-salina pH 9:

| | | |
|--|---------|-----------------------------|
| NaOH(1.0M) | 40.02g | completar 1000mL agua dest. |
| BO ₃ H ₃ (0.5 M) | 30.912g | completar 1000mL agua dest. |
| NaCl(1.5 M) | 87.6g | completar 1000mL agua dest. |

Buffer borato-salina:

| | |
|--|--------|
| NaOH(1.0 M) | 24 mL |
| BO ₃ H ₃ (0.5 M) | 100 mL |
| NaCl(1.5 M) | 80 mL |

Completar a 1000 mL con agua destilada y ajustar el pH a 9. No debe usarse por mas de 30 días.

⇒ Albúmina bovina 0.4%:

| | |
|---------------------------|--------|
| Albúmina bovina | 0.8 g |
| Buffer borato salina pH 9 | 200 mL |

Ajustar el pH a 9 (con NaOH 2N). Puede prepararse una solución al 4% en cantidad de 100 ml y filtrar por "millipore" la que puede guardarse en frío hasta su uso momento en el cual debe diluirse 10 veces en buffer borato salina pH 9. Una vez preparada, debe utilizarse en una semana y guardarse a 4° C.

Dilución del Antígeno: Las diluciones de antígenos y sueros se realizan con albúmina bovina 0.4%.

Preparación de los glóbulos rojos de ganso:

- Extraer la sangre de forma estéril (1 parte de sangre y 4 de Alsever). Usar una aguja de # 20. Filtrar por gasa estéril.
- Lavar las células 3 veces en solución salina (0.9g de NaCl en 100 mL de agua destilada) o PBS. Centrifugar en un tubo de fondo redondo y posteriormente de fondo cónico a 1000 rpm por 10 minutos a 4°C. Eliminar el sobrenadante.
- Para la técnica preparar una solución al 0.5 % de glóbulos en los buffers de diferentes pH previamente ajustados.
- Si no se emplean los glóbulos inmediatamente pueden ser guardados a 4°C en solución salina o PBS

Tratamiento de los sueros con Kaolín:

El kaolín se utiliza para eliminar los inhibidores inespecíficos de la hemaglutinación que puedan estar presentes en los sueros humanos. Pueden existir lotes de kaolín que brinden resultados no satisfactorios.

- Tomar 0,1 mL de suero.
- Añadir 0,4 mL buffer borato salina pH 9 (el suero queda diluido 1:5).
- Añadir 0,5 mL de Kaolín previamente agitado.
- Agitar la mezcla.
- Dejar a temperatura ambiente por 20 minutos con agitación ocasional.
- Centrifugar a 2,500 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- El suero queda diluido 1:10.

Para eliminar las aglutininas inespecíficas se absorben los sueros ya tratados con glóbulos rojos de ganso de la siguiente forma:

- Preparar una suspensión de glóbulos rojos de ganso al 50% en solución salina ó PBS.
- Añadir 0,025 mL de la suspensión anterior al suero ya tratado y agitar.
- Mantener a 4°C durante 20 minutos con agitación ocasional.
- Centrifugar a 1,500 rpm 10 minutos a 4°C.
- Guardar en frío (si se transfiere a otro tubo puede mantenerse durante varios días a 4°C sin pérdida apreciable del título de anticuerpos) No deben almacenarse por tiempo indefinido ya que los títulos no son estables y las aglutininas inespecíficas pueden reaparecer.

Hemaglutinación (HA)

- Hidratar los antígenos liofilizados y mantenerlos a 4°C por al menos 1 hora, pero preferiblemente toda la noche.
- Preparar diluciones seriadas (al doble) en las placas previamente rotuladas, a los diferentes pH de trabajo (el pH óptimo para el antígeno, el valor superior de pH y el valor inferior). De no conocer el pH óptimo de cada antígeno, debe titularse a todos los pH.
- Añadir 0,025 mL de BABS a cada pozuelo de la placa.
- Añadir 0,025 mL del antígeno al primer pozuelo de cada hilera.
- Hacer diluciones al doble comenzando por el primer pozuelo y utilizando para ello pipetas “multicanal”.
- Agitar la placa.
- Añadir 0,025 mL de la solución glóbulos rojos al 0,5% preparados en cada uno de los diferentes pH.
- Agitar y dejar reposar de 30-40 minutos a temperatura ambiente.
- Leer la hemaglutinación (una capa fina y bien distribuida de glóbulos).

Para determinar el título hemaglutinante y el pH óptimo de antígeno se usa como punto final la mas alta dilución de antígeno que muestra aglutinación completa (título del antígeno). El pH óptimo es aquel donde el título del antígeno es mayor. Para la IH se utiliza

una dilución de antígeno que contenga de 4 a 8 unidades hemaglutinantes (UH) por 0,025 ml:

Ejemplo:

Si el título del antígeno es 1:2048, entonces:

| | |
|------|------|
| 2048 | 1 UH |
| 1024 | 2 UH |
| 512 | 4 UH |
| 256 | 8 UH |

Por tanto, debe realizarse una dilución del antígeno de 1:256 que dará las 8 UH / 0,025 mL. La dilución del antígeno se hace en BABS, y es aconsejable retitular el mismo una vez hecha la dilución para comprobar que contenga las 8 UH.

Patrón de hemaglutinación:

- * No hemaglutinación: Los glóbulos rojos sedimentan en el fondo del pozuelo observándose como un botón.
- * Hemaglutinación parcial: Se observa un anillo de células aglutinadas alrededor de un botón en el centro. No se lee como punto final de hemaglutinación.
- * Hemaglutinación completa: Los glóbulos rojos dan una capa fina y bien distribuida en el pozuelo. Se lee como punto final de la hemaglutinación.

Inhibición de la hemaglutinación (IH)

- Rotular las placas con el número de los sueros a probar y el antígeno a utilizar. Es recomendable usar una placa por antígeno. Los sueros son probados utilizando 4, 8 ó 12 diluciones de los mismos contra el antígeno; dependiendo esto del tipo de suero, del propósito y de la experiencia del laboratorio en el diagnóstico o encuestas serológicas. Los pares de suero de un paciente deben ser tratados y probados en el mismo ensayo.
- Añadir 0,025 mL de BABS a cada pozuelo.
- Añadir 0,025 mL del suero a titular en el primer pozuelo de cada hilera.
- Diluir los sueros con pipeta “multicanal”.

- Añadir a cada pozuelo 0,025 mL de la dilución de antígeno que contiene 8 unidades hemaglutinantes.
- Agitar y dejar reposar a temperatura ambiente durante 45 minutos.
- Añadir 0,05 ml de glóbulos rojos diluidos en el pH óptimo para el virus.
- Agitar y dejar reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Lectura:

La inhibición de la hemaglutinación presenta un patrón de no hemaglutinación. El título de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación es la mayor dilución de cada suero que produce inhibición de la hemaglutinación completa o casi completa y se expresa como la dilución del suero. Como el patrón de aglutinación puede cambiar con el tiempo, el punto final puede ser marcado sobre la placa con un plumón tan pronto como se forme.

Controles:

- Control de glóbulos rojos de ganso (permite detectar aglutinación inespecífica de las células en ausencia de suero y antígeno); solo contiene BABS y glóbulos rojos.
- Control de suero positivo o líquido ascítico hiperinmune con anticuerpos al antígeno utilizado.
- Control de suero negativo al antígeno utilizado.
- Control de células para cada suero para detectar aglutinación no específica (sólo contiene una dilución baja de suero 1:10 o 1:20 y glóbulos rojos).
- Control de las unidades hemaglutinantes del antígeno.

En la foto se muestra el título de Acs IH en 6 pares de sueros frente a virus dengue 2.

Suero 1 ($20 \setminus 20$)

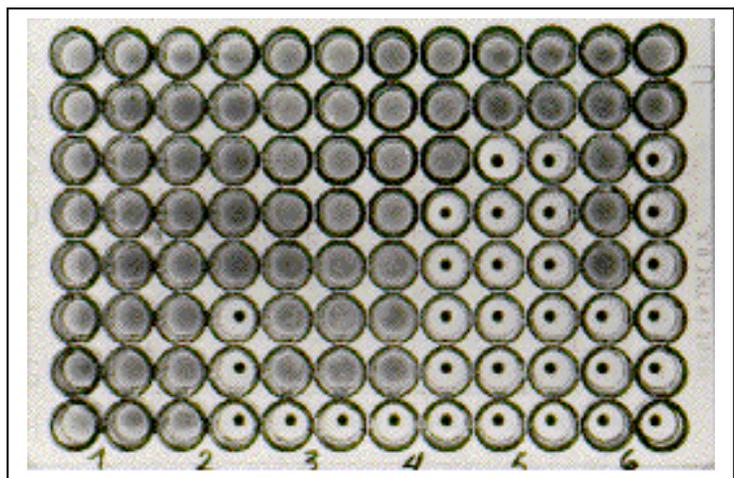
Suero 2 ($20 \setminus 80$),

Suero 3 ($20 \setminus 20$),

Suero 4 ($20 \setminus 320$),

Suero 5 ($640 \setminus 640$),

Suero 6 ($80 \setminus 640$).



NOTA: En el caso del virus Dengue deben incluirse en cada prueba varios serotipos y algún otro flavivirus como Encefalitis de San Luis o Fiebre Amarilla de acuerdo a los virus que circulen en el área.

Interpretación de los resultados:

Para el diagnóstico deben utilizarse sueros pareados ya que los monosueros no son útiles para confirmar un caso como dengue, sin embargo, la detección de títulos elevados de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación ($\geq 1:1280$) en un monosero es criterio de caso probable de infección por dengue. Dada la reacción cruzada que presentan los flavivirus, una prueba serológica positiva nunca puede ser tomada totalmente como criterio de identificación del virus infectante (en cada brote debe intentarse el aislamiento y la identificación del virus). Puede ocurrir una variedad de respuestas serológicas:

Interpretación de la respuesta de Acs IH a dengue

| Respuesta de Anticuerpos | Intervalo 1er y 2do suero | Título suero convaleciente | Interpretación |
|--------------------------|---------------------------|----------------------------|---|
| aumento ≥ 4 veces | ≥ 7 días | $\leq 1:1280$ | infección comprobada, primaria |
| aumento ≥ 4 veces | cualquier muestra | $\geq 1:2560$ | infección comprobada, secundaria |
| aumento ≥ 4 veces | < 7 días | $\leq 1:1280$ | infección comprobada, posible primaria ó secundaria |
| sin cambio | cualquier muestra | $\geq 1:2560$ | presunta infección, secundaria |
| sin cambio | ≥ 7 días | $\leq 1:1280$ | no dengue |
| sin cambio | < 7 días | $\leq 1:1280$ | sin interpretación |
| - | solo una muestra | $< 1:1280$ $= 1280$ | sin interpretación caso probable |

- Clarke DH, Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination inhibition with arthropodborne viruses. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 1958;7:561-573.

PREPARACIÓN DE CONJUGADO ANTI-DENGUE-PEROXIDASA

En los últimos años se han desarrollado métodos inmunológicos que han tenido una aplicación creciente en el campo de la virología. Algunos de estos métodos se han agrupado bajo el nombre de "Métodos rápidos para el diagnóstico virológico", entre los cuales se destaca el Inmunoensayo Enzimático Sobre Fase Sólida conocido como ELISA, que por reunir características que lo hacen muy útil para la detección de anticuerpos y antígenos ha reforzado o reemplazado algunos de los métodos clásicos.

Uno de los componentes principales de este sistema lo constituyen los conjugados, los cuales están formados por una enzima ligada a un antígeno o anticuerpo determinado.

Existe una gran variedad de enzimas que han sido utilizadas como marcadores, por ser estables, altamente reactivas y puras, entre las que se encuentran: la Acetil colinesterasa, Citocromo C, B-D-galactosidasa y otras. Sin embargo la Fosfatasa alcalina y la peroxidasa han sido las más utilizadas por su bajo costo, fácil conjugación y su amplia variedad de sustrato.

En el proceso de conjugación es importante que tanto la enzima como el anticuerpo o antígeno mantengan al máximo su actividad, además de lograr un óptimo acoplamiento de ambos componentes. Entre los métodos de conjugación mas utilizados se encuentran el del Glutaraldehido de 2 pasos y el del Peryodato, siendo este último el que brinda mejores resultados cuando se trabaja con peroxidasa (Nakane PK and Kawoi A 1974. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. J. Histochem. Cytochem. 22: 1084).

Precipitación de inmunoglobulinas con sulfato de amonio

Materiales:

- Solución saturada de sulfato de amonio (pH 7). La solución debe prepararse con varios días de anticipación para garantizar su saturación y debe ser filtrada antes de usarse.
- Solución salina al 0,85% : 8,5 g en 1L de agua destilada.

Método:

- Adicionar 2 ml de suero humano conteniendo anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación con títulos de 1/1280 o más, contra los 4 serotipos de virus dengue a 2 ml de solución salina al 0,85%.
- La mezcla es mantenida en agitación con la adición lenta de 4 ml de la solución saturada de sulfato de amonio, continuar la agitación durante 45 minutos.
- La mezcla es centrifugada a 5000 rpm por 30 minutos a 4° C. El sobrenadante es eliminado.
- El precipitado es resuspendido en 2 ml de solución salina. Se adicionan lentamente y agitando, 2 ml de sulfato de amonio, manteniéndose la agitación por unos minutos. Centrifugar nuevamente.
- Se repite el paso anterior.
- Se resuspende con 2 ml de solución salina y se dializa contra grandes volúmenes de dicha solución (3 veces por 2 litros de salina) a 4°C.
- Determinar la concentración de inmunoglobulinas mediante la lectura de la densidad óptica a 280 y 260 nm.

Concentración de inmunoglobulinas

Para determinar la concentración de proteínas de una muestra, se determina la densidad óptica de la muestra a 280 y a 260; se calcula la relación (R 280 / 260), y se determina el factor (F) correspondiente en la tabla, se procede entonces a sustituir en la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración de proteínas (mg/mL)} = F \times 1/d \times \text{DO 280}$$

Donde: d es el ancho de la cubeta en cm

Algunos valores de F y R (280 / 260)

| R 280 / 260 | % Ácidos nucleicos | F |
|--------------------|---------------------------|----------|
| 1.75 | 0.00 | 1.116 |
| 1.63 | 0.25 | 1.081 |
| 1.52 | 0.50 | 1.051 |
| 1.40 | 0.75 | 1.023 |
| 1.36 | 1.00 | 0.994 |
| 1.30 | 1.25 | 0.970 |
| 1.25 | 1.50 | 0.944 |
| 1.16 | 2.00 | 0.890 |
| 1.09 | 2.50 | 0.852 |
| 1.03 | 3.00 | 0.814 |
| 0.979 | 3.500 | 0.770 |
| 0.939 | 4.00 | 0.743 |
| 0.874 | 5.00 | 0.628 |
| 0.846 | 5.50 | 0.650 |
| 0.822 | 6.00 | 0.632 |
| 0.801 | 6.50 | 0.607 |
| 0.781 | 7.00 | 0.585 |
| 0.767 | 7.50 | 0.565 |
| 0.753 | 8.00 | 0.545 |
| 0.730 | 9.00 | 0.506 |
| 0.705 | 10.00 | 0.478 |
| 0.671 | 12.00 | 0.422 |
| 0.644 | 14.00 | 0.377 |
| 0.615 | 17.00 | 0.322 |
| 0.505 | 20.00 | 0.278 |

Conjugación por el método del peryodato de sodio

Materiales:

⇒ Buffer Acetato de sodio 1mM, pH 4,4.

Solución **A**: Acetato de sodio anhidro 8,24 g en 1 L de agua destilada

Solución **B**: Ácido acético 6 ml en 1L de agua destilada.

Añadir 1 parte de A para 2 partes de B.

Diluir 1:100 con agua destilada para obtener 1mM. Chequear pH 4,4

⇒ Buffer Bicarbonato de sodio 0,2 M pH 9,5.

Solución **A**: Carbonato de sodio anhidro 0,2 M 0. 212g/L de agua destilada.

Solución **B**: Bicarbonato de sodio 0,2 M 0. 16802g/L de agua destilada.

Añada A a B hasta obtener pH 9,5.

⇒ Buffer Carbonato / Bicarbonato 0,01M pH 9,5.

Carbonato de sodio anhidro 1,59g

Bicarbonato de sodio 2,93g.

Disolver en 1 L de agua destilada y ajuste el pH si es necesario. Diluir 1:5 para obtener 0,01 M.

⇒ Buffer Borato, 0,1 M, pH 7,4.

Ácido bórico 24,732 g en 4 L de agua destilada.

Bórax 19,07 g en 500 mL de agua destilada.

Añada aproximadamente 115 ml de bórax a 4 L de ácido bórico, ajuste pH 7,4.

⇒ Peryodato de sodio

⇒ Borohidruro de sodio.

Método:

- Disuelva 8 mg de Peroxidasa de Rábano picante (tipo VI) "Sigma" en 1 mL de agua destilada.
- Prepare solución fresca de peryodato de sodio 0,01 M (21 mg/mL) en agua destilada. Añada 0,2 mL de esta solución a la de peroxidasa suavemente y agitando, manténgalo en agitación durante 20 min. a temperatura ambiente.
- La mezcla de peroxidasa y peryodato es dializada toda la noche contra un exceso de buffer acetato de sodio 1mM pH 4,4 a 4°C. Se dializa también 1mL de las Igs a conjugar en concentraciones de 10 mg/mL contra buffer carbonato-bicarbonato 0.01M pH9,5.
- Añadir 20 uL de buffer bicarbonato de sodio 0.2M pH 9,5 a la peroxidasa. Chequear pH y añadir otros 20µL si fuese necesario. Adicione 1mL de Igs dializadas. Agite la mezcla suavemente por 2 horas a temperatura ambiente.
- Adicione 0,1 mL de borohidruro de sodio (4mg/mL) recién preparada, a la mezcla. Mantenga la agitación por 2 horas a 4°C.

Después del paso del borohidruro se pueden hacer dos variantes para la purificación y/o concentración del conjugado:

Primera variante:

- Dialice la mezcla contra buffer borato pH 7,4 toda la noche a 4°C.

- Para separar el conjugado del no conjugado pasar la mezcla por una columna de Sephadex G-200 equilibrada con buffer borato. Determinar los valores de densidad óptica de cada fracción, a 280 y 403 nm, colectando aquellas donde coincidan los valores máximos para ambas longitudes de onda (concentrar a 1 mL). Agregar albúmina bovina fracción V a concentración final del 1% y glicerol a igual volumen del conjugado. Homogeneizar bien.
- Determinar el título del conjugado mediante la técnica ELISA.
- El título se determina realizando varias diluciones del conjugado, utilizando como dilución de trabajo aquella que presente un valor de densidad óptica cercano a 1,0.
- Envasar en alicuotas y almacenar a -20°C.

Segunda variante

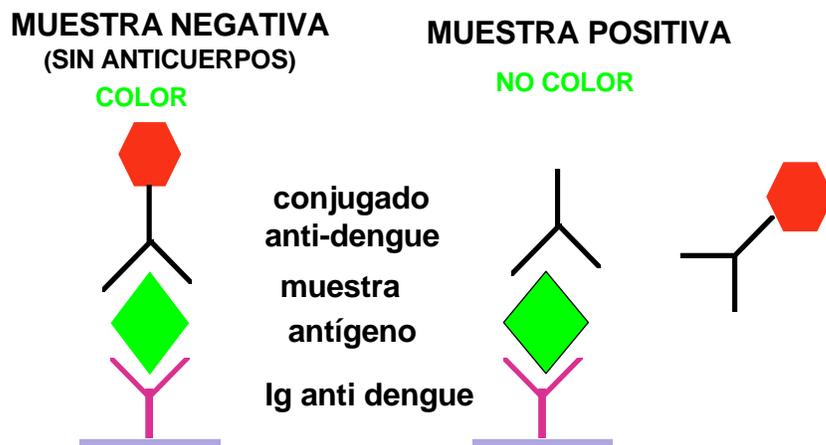
- Precipitación con sulfato de amonio: Después del paso con borohidruro añadir al conjugado igual volumen de sulfato de amonio saturado gota a gota y agitando. Dejar 5 minutos en agitación y centrifugar a 5 000 rpm por 10 minutos. Eliminar sobrenadante y resuspender el pellet en 1 mL de PBS. Dializar toda la noche contra PBS.
- Agregar albúmina bovina fracción V para una concentración final del 1 % y glicerol a igual volumen del conjugado. Homogeneizar bien.
- Determinar el título del conjugado mediante la técnica ELISA.
- El título se determina realizando varias diluciones del conjugado, utilizando como dilución de trabajo aquella que presente un valor de densidad óptica cercano a 1,0.
- Envasar en alicuotas y almacenar a -20°C.

MÉTODO ELISA DE INHIBICIÓN (MEI)

Las técnicas serológicas constituyen un auxiliar imprescindible para el diagnóstico virológico y se les confiere esta importancia por lo difícil que resulta, en la mayoría de los casos, lograr el diagnóstico por aislamiento viral.

Para el diagnóstico de los arbovirus se han aplicado pruebas serológicas que por su amplio uso se consideran como técnicas clásicas; tal es el caso de la Inhibición de la Hemaglutinación (IH), la Fijación del Complemento (FC) y la Neutralización (Nt), sin embargo desde hace varios años se han introducido técnicas de mayor sensibilidad y facilidad de ejecución, que han ido ganando terreno en el campo del diagnóstico en Virología, sobre todo por lograr resultados rápidos. Entre ellas se encuentran los inmunoensayos enzimáticos y de estos, el Inmunoensayo enzimático sobre fase sólida (ELISA), ha sido de gran aplicación en el diagnóstico de otros virus como Hepatitis, Rubéola, Encefalitis B Japonesa, Citomegalovirus y otros.

ELISA DE INHIBICION



Materiales:

⇒ Inmunoglobulinas humanas anti-dengue

Pool de sueros humanos conteniendo anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación con título mayor o igual a 1/1280 contra los virus del complejo dengue, precipitados por el

método del sulfato de amonio y determinando su concentración mediante la lectura de la densidad óptica a 280 y 260 nm.

⇒ Antígeno dengue 2

Antígeno preparado según el método de sacarosa.

⇒ Buffer de Recubrimiento (coating) 0,05 M pH 9,5

Carbonato de sodio (Na_2CO_3) anhidro 1,59g ; Bicarbonato de sodio (NaHCO_3) 2,93g.

Disuelva en 1L de agua destilada. Ajuste pH si es necesario. Duración máxima de 15 días.

Mantener a 4°C.

⇒ PBS-Tween 20 (PBS-T) pH 7,4

Cloruro de sodio (NaCl) 8g; Cloruro de potasio (KCl) 0,2g; Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) 0,2g; Fosfato dibásico de sodio anhidro (Na_2HPO_4) 1,2g.

Disuelva en 1L de agua destilada y agregue 0,5 mL de Tween-20. Mantenerlo a temperatura ambiente.

⇒ Fosfato-citrato 0,05M pH 5:

Ácido cítrico 5,1g; Fosfato dibásico de sodio anhidro 7,47g.

Disuelva en 1L de agua destilada . Ajuste pH a 5.

⇒ Ortofenilendiamina (OPD)

⇒ Peróxido de hidrógeno (p.a.) 100 vol/ 30%

⇒ Albúmina bovina sérica fracción V (ABS) al 1%

1g de ABS en 100mL en buffer de recubrimiento (coating). Prepararlo al momento de ser usado.

⇒ Sustrato

25 mL de buffer fosfato-citrato; 10mg de OPD + 10ul H_2O_2 . Proteger de la luz.

Método:

- Adsorber en placa de poliestireno Igs humanas anti-dengue en buffer carbonato / bicarbonato pH 9,5 a una concentración de 10ug/mL (100uL por pozo). Dejar las placas en cámara húmeda tapada toda la noche a 4° C. Se necesita un volumen de 10 mL por placa.
- Vaciar el contenido de las placas y hacer un bloqueo con 150ul en cada pozo de la solución de ABS al 1% en buffer Carbonato/Bicarbonato. Incubar a 37°C por 1 hora. Volumen total de 15 mL por placa.

- Lavar las placas 3 veces con PBS-T.
- Agregar 100ul de la dilución de trabajo de la suspensión del antígeno en cada pozo (diluido en PBS-T en dependencia del título obtenido).
- Incubar la placa 1 hora a 37°C.

El título del antígeno se determina realizando varias diluciones de este y utilizando como control negativo antígeno de cerebro normal de ratón extraído según el método de sacarosa acetona a las mismas diluciones del antígeno viral, se realiza la curva de dosis-respuesta determinando la dilución de antígeno cuya densidad óptica de cercana a 1,0 y que este valor, al relacionarlo con el del control negativo, sea de 5 a 10 veces mayor. Ejemplo: Si a la dilución de 1/40 da un valor de DO de 1,105 y el control negativo a esa misma dilución da 0,12 entonces la dilución de trabajo del antígeno será 1:40.

- Lavar 3 veces con PBS-T.
- Agregar 100uL por pozo de los sueros diluidos 1/20 en PBS-T, al igual que los sueros controles (positivo por duplicado y negativo por cuadruplicado). Agregar en 2 pozos PBS-T a igual volumen que los sueros. Incubar a 37° C por 1 hora.
- Lavar 3 veces con PBS-T.
- Añadir 100 uL por pozo del conjugado anti-dengue-peroxidasa diluido 1/8000 en PBS-T con 2% de suero de ternero. Dejar incubando 1 hora a 37°C.
- Lavar 3 veces con PBS-T.
- Añadir el sustrato 100uL por pozo. El sustrato debe ser preparado unos minutos antes de su utilización. Esperar 30 minutos de reacción.
- Detener la reacción agregando 100 uL de ácido sulfúrico al 12,5 % en cada pozo.
- Determinar los valores de densidad óptica a 492nm en un lector Micro-ELISA.
- Calcular los % de inhibición para cada muestra según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Inhibición de ELISA} = 1 - (\text{DO de la muestra} / \text{DO de la media del control negativo}) \times 100$$

Criterio de positividad

Aquellos sueros que presenten un % de inhibición mayor o igual al 50% con relación al control negativo.

En casos de pares de sueros, se considera seroconversión en aquellos cuyo primer suero sea negativo y el segundo positivo, en los que presenten positividad en ambas sueros evidenciando un aumento de anticuerpos expresado en el aumento del porcentaje de inhibición en un 10% ó más del segundo suero con respecto al primero y aquellos que presenten valores del % de inhibición fijos elevados del 85% ó más. Estos casos deben ser titulados para confirmar positividad, expresándose en un aumento de 4 veces o más en el título de anticuerpos del segundo suero con respecto al primero.

En monosueros:

Se define como caso probable aquel paciente cuyo suero presente un título de Acs. $\geq 1/5120$.

Se define como caso de infección secundaria aquel paciente cuyo suero presente un título de Acs. $\geq 1/10240$.

En pares de sueros:

Se define como caso confirmado aquel paciente que presente seroconversión o elevación de 4 veces el título de Acs. entre los dos sueros.

Se define como caso de infección primaria aquel paciente cuyo segundo suero presente un título de Acs. $\leq 1/5120$.

- S. Vázquez , R. Fernández. Utilización de un método de Inhibición de ELISA en el diagnóstico serológico de dengue. Rev. Cub. Med. Trop. 41, (1) p. 18-26, 1989.
- R.Fernández,S.Vázquez Serological diagnosis of dengue by ELISA Inhibition Method (EIM) Mem.Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro vol 85(3), 347-351,1990.
- S.Vázquez,R.Fernández,C.Llorente Utilidad de sangre almacenada en papel de filtro para estudios serológicos por ELISA de Inhibición Inst. Med.Trop.SaoPaulo vol33 No4 309-312 1991.
- S.Vázquez, J. Bravo, AB Pérez, MG. Guzmán ELISA de Inhibición su utilidad para clasificar un caso de dengue. Rev.Cub. Med. Trop. 49 (2) 1997..
- S. Vázquez, J. Bravo, AB Pérez, MG. Guzmán ELISA de Inhibición . Una alternativa en el estudio serológico de los casos de dengue. Bol. Epidem. OPS vol 18, No 2 pag. 7-8, 1997..

ELISA DE CAPTURA DE IgM (CAM- ELISA)

En la infección primaria por cualquier virus del complejo Dengue se produce una respuesta de anticuerpos de la clase IgM, los cuales aparecen en niveles detectables una vez finalizada la fiebre y la viremia, por lo que se recomienda que las muestras utilizadas para la determinación de este anticuerpo sean extraídas después del 5to día de establecimiento de la enfermedad.

El inmunoensayo enzimático sobre fase sólida (ELISA) ha sido utilizado como método para el diagnóstico serológico en numerosas enfermedades virales. Uno de los métodos aplicados es el de Captura de IgM, utilizado para demostrar infecciones actuales o recientes. Para ello se emplea Igs anti-IgM humanas las cuales se fijan a la placa.

La detección de anticuerpos IgM al virus Dengue resulta de extrema utilidad tanto en el diagnóstico de casos clínicamente sospechosos como en los sistemas de vigilancia epidemiológica para esta enfermedad.

Gubler describió un método ELISA de captura de IgM para la vigilancia del Dengue y Dengue Hemorrágico. Comparó los resultados del estudio con la IH encontrando una buena sensibilidad y una especificidad muy semejante a la de esta técnica, planteando que dicho método es rápido para determinar infecciones de Dengue en casos hospitalizados de áreas endémicas, siendo aun más útil en la vigilancia en áreas no endémicas ya que se puede estar seguro que cualquier caso positivo indica infección reciente. Es de señalar que se requiere una sola muestra para realizar el diagnóstico.

ELISA DE CAPTURA ANTI-IgM



Materiales:

⇒ Buffer fosfato-salina (PBS) pH 7,4:

| | |
|----------------------------------|--------|
| NaCl | 8 g |
| KCl | 0,2 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0,14 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 0,91 g |

Completar con agua destilada hasta 1L.

⇒ Buffer carbonato/bicarbonato pH 9,6:

| | |
|---------------------------------|--------|
| Na ₂ CO ₃ | 1,59 g |
| NaHCO ₃ | 2,39 g |

Completar con agua destilada hasta 1L.

⇒ Inmunoglobulinas anti-IgM humana purificada por cromatografía de afinidad (SIGMA).

⇒ Albúmina bovina sérica fracción V (ABS)

⇒ Antígeno de complejo Dengue obtenido por el método de sacarosa-acetona (ver técnica IH).

⇒ Suero humano negativo de anticuerpos a virus dengue (SNH).

⇒ Conjugado anti-dengue peroxidasa (ver método de conjugación)

⇒ Buffer fosfato-citrato pH 5 (ver ELISA de Inhibición)

⇒ OPD (ver ELISA de Inhibición)

⇒ Peróxido de hidrógeno o urea peróxido (ver ELISA de Inhibición)

⇒ Sustrato (ver ELISA de Inhibición)

Método:

- A una placa (maxisorb) se le agrega 100uL por pozo de Igs anti- IgM humanas a una concentración de 5ug/mL en buffer de recubrimiento (coating); este valor se determina probando el sistema con varias concentraciones de Igs generalmente entre 0,1 y 10 ug/mL obteniéndose la concentración de saturación que se identifica al no presentarse incremento del valor de DO a partir de esa dilución. La placa es colocada a 4°C toda la noche.

- Lavar 5 veces con PBS.
- Añadir 150uL por pozo de ABS al 4% en buffer de recubrimiento (coating) por 30 minutos a 37°C. Se requiere un total de 15 mL por placa.
- Lavar 5 veces con PBS.
- Agregar los sueros a probar diluidos 1/20 en PBS-ABS al 0,5%. 50uL por pozo. Se deben incluir sueros positivos y sueros negativos como controles diluidos también 1/20.
- Lavar 5 veces con PBS.
- Añadir el antígeno preparado para 16 UH (esto se calcula en función del título hemaglutinante y se necesita 5 ml por placa) 50uL por pozo. Este antígeno se prepara en PBS-SNH al 5%. Colocar la placa a 4°C toda la noche. (Se incluye los 4 serotipos)
- Lavar 5 veces con PBS.
- Agregar conjugado anti-dengue peroxidasa diluido en PBS-SNH al 5%, 50uL por pozo y se incuba 1 hora a 37° C. La dilucion del conjugado (1/2500) se calculó realizando varias diluciones y se tomó aquella que establecía diferencia entre el control positivo y el negativo de 5 veces o más.
- Lavar 7 veces con PBS.
- Agregar el sustrato 100 uL por pozo. Mantener la reacción durante 30 minutos su cámara a temperatura ambiente y detener con 100 µL por pozo de ácido sulfúrico al 12,5%.
- Leer la placa en un lector de ELISA a 492nm.

Cálculo de los resultados

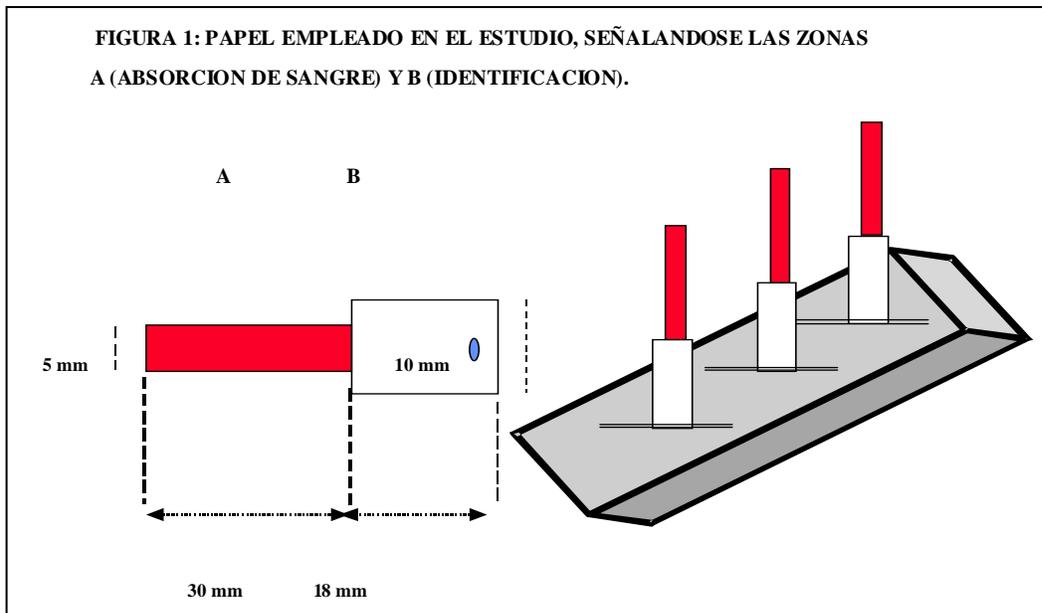
Determinar la media geométrica de las D.O. de los controles negativos y multiplicar por 2. Toda muestra que tenga un valor mayor o igual al calculado será positiva. Debe incluirse varias veces el negativo para poder hacer el cálculo, además debe probarse la validez de la prueba dividiendo positivo/negativo y dicho valor debe ser mayor o igual a 5.

Muestras de sangre en papel de filtro

Determinación de la presencia de anticuerpos IgM en muestras de sangre total capilar tomadas en papel de filtro (Blood Sampling Paper, NOBUTO, Toyo Roshi Kaisha, Ltd. Japón): Para la toma de sangre total capilar, se punciona con lanceta estéril el pulpejo del dedo índice dejando absorber la sangre sobre el papel de filtro hasta que el mismo estuvo

totalmente impregnado por ambos lados. Previamente, cada papel de filtro había sido rotulado en la zona B utilizando grafito.

Después que la sangre es totalmente absorbida sobre el papel se deja secar a temperatura ambiente en posición vertical con la zona B hacia abajo. Posteriormente, se guardan en sobre preferiblemente a 4⁰C.



Procesamiento

Las muestras de sangre total capilar colectadas en papel de filtro son eluidas durante toda la noche a 4°C en 400uL de solución fosfato-salina (PBS) conteniendo albúmina bovina al 0,5% (correspondiente a una dilución de suero de 1/10). Posteriormente, a cada muestra se le determina la presencia de anticuerpos IgM a virus dengue en forma similar a como se procesan los sueros.

- S. Vázquez, MG. Guzman y col. Detección de IgM contra virus del dengue en sangre total absorbida en papel de filtro. Rev. Pan. Salud Pub. Pan. Am. J. Pub. Health. vol 3 No 3 1998.

"Kit Diagnóstico": Dengue* IgM

El "kit Diagnóstico Dengue* IgM se conformó para realizar un total de 180 determinaciones, ya sea en placas completas o en grupos de 4 tiras desmontables, siendo los componentes del sistema los siguientes:

- ◆ 2 Placas de poliestireno sensibilizadas con anti-IgM
- ◆ 1 Frasco de diluyente de muestra 25X (3mL)
- ◆ 2 frascos de control positivo (1mL c/u) y 2 de negativo (1.5mL c/u) listos para usar.
- ◆ 1 frasco de solución de lavado 25X (100mL)
- ◆ 1 frasco de suero humano negativo (2mL)
- ◆ 6 frascos de antígeno inactivado liofilizado conteniendo los 4 serotipos (2mL c/u).
- ◆ 1 frascos de conjugado prediluido.
- ◆ 6 frascos de sustrato liofilizado (5mL c/u)
- ◆ 1 frasco de peróxido de hidrógeno (200uL)

El antígeno de dengue, los controles positivos y negativos y el suero humano negativo (SHN) se encuentran inactivados. Los controles y el suero humano negativo son no reactivos para los virus VIH 1 y 2, y para HBAGs. No obstante deben manejarse con precaución.

Procedimiento:

1. Retirar del estuche las placas o tiras a utilizar según el número de muestras a procesar. Se recomienda confeccionar un esquema de trabajo identificando correctamente la posición de cada muestra y los controles.
2. Dispensar 50 uL del diluyente de muestra 1X en todos los pocillos con excepción de los pocillos para los controles positivos y negativos. Añada entonces siguiendo el esquema de distribución 2,5 uL de cada suero, agitando ligeramente la placa para homogenizar la dilución. Se recomienda utilizar no menos de 2 pocillos para el control positivo y 4 para el negativo.
3. Incubar en cámara húmeda 2 horas a temperatura ambiente.

4. Lavar la placa 5 veces con la solución de lavado 1x, utilizando un volumen de 250-300 uL por pozo. Si se dispone de lavador automático seguir similar procedimiento. Secar la placa invirtiéndola sobre papel de filtro.
5. Dispensar 50 ul de antígeno por pozo, reconstituido previamente con 2 mL de solución de lavado conteniendo SHN al 5%. Incubar a 4° C durante toda la noche.
6. Lavar 5 veces con solución de lavado como en el punto 4.
7. Dispensar 50 uL por pozo del conjugado previamente diluido (80uL de conjugado + 100uL de SNH + 1.82mL de PBS). Incubar 1 hora a 37° C en cámara húmeda.
8. Lavar 7 veces con solución de lavado como en el punto 4.
9. Añadir 100 uL del sustrato reconstituido previamente con 5 mL de agua destilada, adicionando 2 uL de peróxido de hidrógeno. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
10. Detener la reacción adicionando 100 uL por pozo de la solución de ácido sulfúrico al 12,5% en el mismo sentido en que se añadió el sustrato.
11. Realizar la lectura de la densidad óptica utilizando un filtro de 492 nm y ajustando blanco con el aire.

Cálculo de los resultados:

1. Calcular la media de la densidad óptica de los controles negativos (X_n)
2. Calcular la media de la densidad óptica de los controles positivos (X_p)

Validez de la prueba: $X_p > 5X_n$; Valor limite = $2X_n$

El valor de corte se establece en función de la media del control negativo considerando como positivos aquellos sueros que presenten un valor de densidad óptica mayor o igual a dos veces la media del negativo. La validez del sistema se establece por la relación de la media de los positivos y los negativos la cual debe ser igual o mayor de 5.

IMPORTANTE: Un resultado negativo a la presencia de IgM contra dengue no excluye la posibilidad de exposición anterior a este virus por lo que en caso de síntomas clínicos compatibles, se recomienda probar una nueva muestra varios días después.

Almacenaje y Estabilidad:

Cuando no se encuentran en uso, los reactivos deben almacenarse a una temperatura de 2 a 8° C. Los reactivos y placas así conservadas tendrán una estabilidad garantizada durante 6 meses. Verifique la fecha de expiración reflejada en las etiquetas antes utilizar el Kit.

Medidas de Bioseguridad:

Al manipular sueros humanos para su testaje mediante la prueba deben observarse las precauciones requeridas para evitar infecciones por el virus de la Inmunodeficiencia humana (VIH), Hepatitis B u otros agentes similares.

SISTEMA ULTRA MICRO ELISA PARA LA DETECCIÓN DE **Acs Ig M AL VIRUS DENGUE (UMELISA-DENGUE)**

El UMELISA-DENGUE es un análisis inmunoenzimático heterogéneo, en su variante de captura, en el cual se utiliza como fase sólida una placa de ultramicroELISA (10 microlitros por pocillo) revestida previamente con anticuerpos contra IgM humana.

Las muestras se incuban por duplicado en los pocillos de la placa y la IgM presente en el suero se fijará a los anticuerpos de recubrimiento. A continuación, previo lavado que elimina los componentes no fijados, se añade el antígeno específico de Dengue (los 4 serotipos); seguido nuevamente de incubación y lavado. A continuación se añade un anticuerpo monoclonal de ratón contra virus Dengue conjugado con fosfatasa alcalina. En caso de reacción positiva, este anticuerpo marcado se unirá al complejo formado previamente sobre la fase sólida. Un nuevo lavado de la placa eliminará el conjugado en exceso. Al añadirse un sustrato fluorigénico, este será hidrolizado y la fluorescencia emitida permitirá detectar la presencia de anticuerpos IgM específicos contra el virus Dengue.

El sistema UMELISA-DENGUE esta compuesto por los siguientes elementos:

- * Lector SUMA
- * Paquete de Programas UMELISA-DENGUE
- * Multipipeta ERIZO
- * Juego de accesorios de laboratorio SUMA

La técnica detallada aparece en el prospecto adjunto al Kit Comercial

"UMELISA-DENGUE"

Para la detección de anticuerpos IgM
al virus Dengue

AuBioDOT™ IgM anti-Dengue

96 pruebas

Sistema diagnóstico visual para la detección de anticuerpos IgM contra el virus del Dengue basado en el uso de anticuerpos monoclonales

CARACTERÍSTICAS PRINCIPALES

El **AuBioDOT™ IgM anti-Dengue** es un inmunoensayo que usa un anticuerpo monoclonal conjugado con oro coloidal y amplificación con reveladores de plata, para la detección en suero de anticuerpos IgM contra el virus del Dengue (IgM anti-Dengue) en pacientes con 5 o más días de evolución de la enfermedad.

El sistema emplea anticuerpos y antígenos que aseguran una buena sensibilidad y especificidad del sistema, según estudios realizados con paneles de muestras positivas y negativas, caracterizadas mediante técnicas inmunoenzimáticas.

El **AuBioDOT™ IgM anti-Dengue** es un sistema especialmente desarrollado para la operación manual y lectura visual de los resultados, por lo que su empleo es recomendable para:

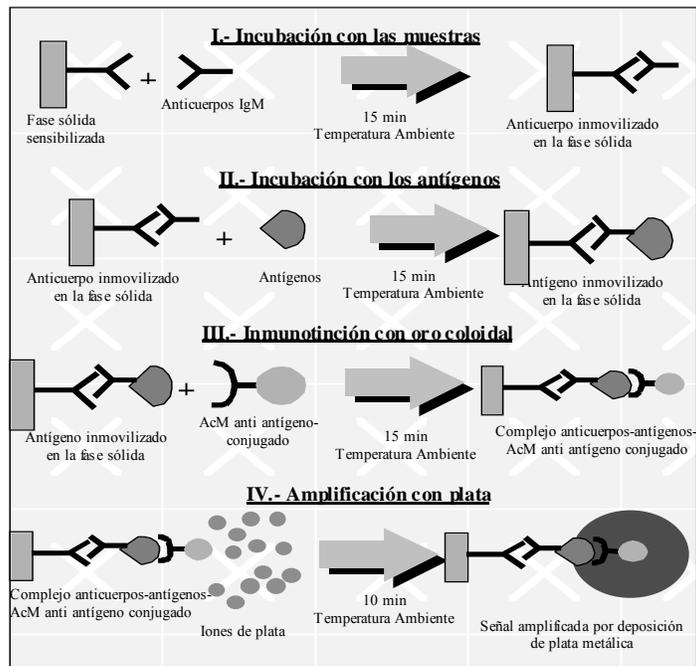
- El diagnóstico serológico de infección por el virus Dengue en diferentes niveles de salud que realicen una vigilancia activa, principalmente en áreas con condiciones mínimas de laboratorio
- Para el diagnóstico rápido a virus dengue en caso de brotes y/o epidemias.

PRINCIPIO DEL METODO

El inmunoensayo consiste en el uso de soportes de poliestireno blanco opaco con excavaciones circulares, sensibilizadas con un anticuerpo IgG que tiene selectividad por anticuerpos del tipo IgM humanos.

Las muestras son incubadas en dichas excavaciones y los anticuerpos IgM presentes en la muestra se fijan a la fase sólida. Después del lavado del exceso de los reactivos, se añade una preparación de 4 antígenos de dengue los cuales serán reconocidos específicamente por los anticuerpos IgM de los individuos enfermos. Después de la incubación las tiras son lavadas y la reacción es finalmente amplificada por la adición de reveladores físicos basados en iones de plata, produciéndose *in situ* reacciones coloreadas insolubles de color pardo claro a oscuro, cuya intensidad es proporcional a la concentración de anticuerpos presentes en las muestras.

La lectura se realizará directamente en los pocillos de las placas mediante simple inspección visual y las mismas pueden ser archivadas para el registro permanente de los resultados.



PRESENTACION

Sistema para 96 determinaciones cualitativas, compuesto por:

- 1 bolsa metálica conteniendo una placa **de poliestireno** blanco opaco sensibilizada con un anticuerpo monoclonal. Cada placa puede dividirse en tiras de 8 determinaciones.
- 1 frasco con 3 mL de tampón de dilución del conjugado.
- 1 frasco con 0,3 mL del **Conjugado del anticuerpo monoclonal - oro coloidal**. Este frasco contiene conjugado líquido para diluir 10 veces con tampón de dilución del conjugado.
- 6 bulbos con la mezcla de antígenos liofilizados
- 1 frasco (rótulo negro) con 1,4 mL de **Solución Amplificadora** (reactivo A del revelador físico).
- 1 frasco (rótulo blanco) con 1,4 mL de **Solución Iniciadora** (reactivo B del revelador físico).
- 1 frasco con 0,3 mL de **Suero de Control Negativo** listo para usar no reactivo para IgM anti-Dengue, AgsHB, anti HCV, anti HIV, VDRL.
- 1 frasco con 0,3 mL de **Suero de Control Positivo** listo para usar (inactivado por calor, no reactivo para AgsHB, HCV, anti HIV, VDRL).
- 1 plástico con 9,55 g de **Sales mezcladas**, en cantidad para reconstituir tampón de lavado PBS en 500 mL de agua destilada. La solución tampón contiene azida de sodio como preservativo.
- 1 vial con 0,5 mL de **Tween-20**.

MATERIALES ADICIONALES REQUERIDOS

- Agua destilada para la reconstitución del Tampón de lavado.
- Micropipetas automáticas y puntas desechables para dispensar volúmenes de 20; 100; 500 μ L respectivamente.
- Papel de filtro para el secado de las tiras.
- Viales o tubos para preparar el volumen exacto del revelador físico a utilizar.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Los componentes del sistema **AuBioDOT™ IgM anti-Dengue** en su forma original de presentación, mantienen la estabilidad hasta la fecha de vencimiento impresa en el envase, si son debidamente conservados de 2 a 8 °C.

No congelar ninguno de los componentes. Mantener las placas de poliestireno bien cerradas todo el tiempo y junto a la bolsa de gel de sílice. Antes de comenzar la prueba deje que los reactivos alcancen la temperatura ambiente para evitar la condensación.

El conjugado reconstituído mantiene la máxima actividad biológica hasta 30 días, si es conservado de 2 a 8 °C.

PRECAUCIONES Y RECOMENDACIONES

- Evite tocar con los dedos los pocillos de las placas. Todos los componentes de la sangre y materiales biológicos deben ser considerados como potencialmente infecciosos, por lo que debe tomarse precaución durante la manipulación de los mismos. Es recomendable usar guantes durante la realización de la prueba.
- Las muestras deben ser frescas y estar libres de partículas extrañas y contaminantes por lo que se aconseja previa centrifugación. Evite la contaminación entre los reactivos usando puntas diferentes para cada uno.
 - Si se desean archivar las tiras plásticas o las placas como registro permanente de los resultados, se recomienda una inmersión previa de las mismas en una solución alcohólica al 70 %.
- No mezcle los reactivos de diferentes lotes y no utilice reactivos vencidos.
- La azida puede reaccionar con el cobre o el plomo utilizado en determinadas tuberías y formar sales explosivas. Aunque las cantidades utilizadas en este juego son pequeñas, cuando se deseché material que contenga azida deber eliminarse con abundante agua.

INSTRUCCIONES PARA EL USO

A) PREPARACION DE REATIVOS:

- **Placas sensibilizadas:** Evitar el contacto de los dedos con las áreas circulares sensibilizadas con el anticuerpo.

- **Conjugado Anticuerpo monoclonal - oro coloidal:** En dependencia del número de muestras a estudiar deberá hacerse una dilución previa de 1/10 del conjugado 10X en tampón de dilución del conjugado.

| No. de ensayos | Vol. de conjugado (µl) | Vol. de diluyente (µl) |
|----------------|------------------------|------------------------|
| 16 | 35 | 315 |
| 24 | 50 | 45 |
| 48 | 100 | 900 |
| 72 | 150 | 1350 |
| 96 | 200 | 1800 |

- **Tampón de lavado:** Preparar el tampón PBS - Tween 20, mediante disolución de las sales contenidas en el frasco de Sales Mezcladas en 500 mL de agua destilada. Adicionar posteriormente el reactivo Tween-20, enjuagando repetidas veces el vial hasta la completa disolución del contenido. Conservar de 2 a 8°C hasta su uso.
- **Muestras:** Se utilizarán muestras frescas, puras y previamente centrifugadas.
- **Antígenos:** Reconstituir el bulbo en 0,4mL de agua destilada. Después de reconstituida la preparación antigénica queda lista para ser usada.
- **Revelador:** El volumen exacto de revelador físico debe ser preparado al momento de su empleo, en el paso de la amplificación argéntica de la reacción. La preparación del revelador deberá hacerse en un tubo limpio y se deben usar puntas plásticas diferentes para cada solución.

| No. de ensayos | Vol. de solución A (µl) | Vol. de solución B (µl) |
|----------------|-------------------------|-------------------------|
| 16 | 170 | 170 |
| 24 | 250 | 250 |
| 48 | 500 | 500 |
| 72 | 730 | 730 |
| 96 | 1000 | 1000 |

B) PROCEDIMIENTO

1.- PRELAVADO DE LAS LAMINAS.

Sumerja las placas a utilizar en tampón de lavado por 5 min, para eliminar el preservativo.

2.- INCUBACION DE LAS MUESTRAS.

Colocar 20 µL de las muestras y los controles sobre las correspondientes áreas de reacción. Incubar durante 15 min a temperatura ambiente y en cámara húmeda.

3.- LAVADO.

Eliminar previamente el exceso de reactivos mediante abundante goteo o enjuague directo de las placas con agua. Transferir las mismas a un recipiente adecuado que contenga la solución de lavado, para continuar el lavado durante 5 min a temperatura ambiente, o hacer cuatro lavados usando un frasco lavador. Eliminar el exceso de líquido invirtiendo y golpeando la placa ligeramente contra un papel de filtro, evitando el contacto con la áreas de reacción.

4.- INCUBACION CON LOS ANTIGENOS

Colocar 20 µL de los antígenos sobre las correspondientes áreas de reacción. Incubar durante 15 min a temperatura ambiente y en cámara húmeda.

6.- LAVADO.

Repetir las operaciones de lavado como en el paso 3.

7.- INMUNOTINCION.

Colocar 20 µL del conjugado diluido sobre cada área de reacción e incubar durante 15 min a temperatura ambiente y en cámara húmeda.

8.- LAVADO.

Repetir las operaciones de lavado como en el paso 3.

9.- AMPLIFICACION ARGENTICA.

Depositar 20 µL de la mezcla reveladora. Incubar durante 10 min (temperatura ambiente y cámara húmeda).

10.- LAVADO.

Eliminar el exceso de reactivos mediante suficiente goteo o enjuague directo de las placas con agua destilada.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Los resultados son interpretados directamente por simple inspección visual sobre las áreas de reacción.

La muestra se considera REACTIVA cuando se produce *in situ* una coloración pardo claro a oscuro, que abarca toda el área circular de reacción. La intensidad de la coloración dependerá de la concentración de anticuerpos presentes en las muestras.

La muestra se considera NEGATIVA cuando no evidencia señales de coloración respecto a la textura blanca de la superficie sólida. Si alguna muestra presenta efectos muy débiles de coloración de fondo, la intensidad de la misma, visualmente comparada, debe ser igual o menor al control negativo correspondiente. Para muestras con resultados dudosos, se recomienda repetir la prueba con otro suero del paciente con más días de evolución de la enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

1. Sánchez Vizcaino, JM. Técnicas inmunoenzimáticas en patología animal y vegetal . Madrid 1981.
2. Peterson D L., Nath N., Gavilans F. Structure of Hepatitis B Surface Antigen. J. of Biol. Chem. Vol. 257 pp 10 414-10 420, 1982.
3. Santiso C. Resúmenes del III Seminario Internacional Ingeniería Genética y Biotecnología, 1989.
4. Miranda, A. et al. A comparison of VDRL and immunoassays develop with a recombinant TmpA antigen in the screening of antibodies to *Treponema pallidum* , 1997.

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

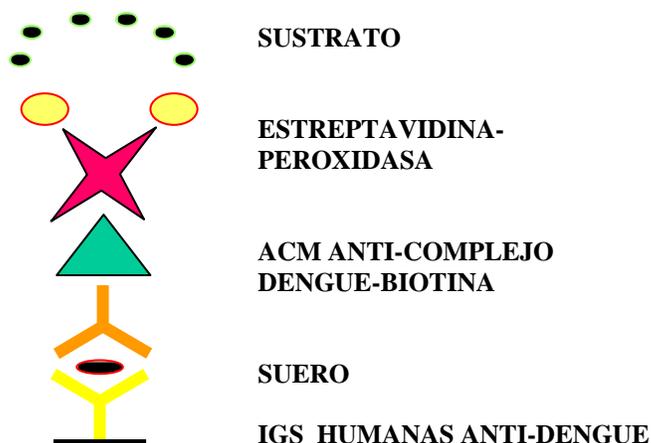
P.O. Box 6162, La Habana, Cuba
Teléfonos: (53-7) 21 8008, 21 8039
Fax: (53-7) 33 6008, 21 8070
Telex: 51 2330

Instituto Pedro Kouri

P.O. Box: 601 Marianao, La Haban, Cuba
Teléfonos:(53-7)220426
Fax:(53-7)220633
Telex: 51 1902cuipk

DETECCIÓN DE ANTÍGENO A DENGUE MEDIANTE UN ELISA DE AMPLIFICACIÓN BIOTINA-ESTREPTAVIDINA (ELISA-BE)

La detección directa del virus dengue en muestras de suero mediante sistemas inmunoenzimáticos, es una alternativa útil para el diagnóstico temprano de la enfermedad. Se han desarrollado algunos sistemas que incluyen la amplificación mediada por biotina-estreptavidina, la cual permite establecer un método de alta sensibilidad y especificidad, lográndose esto último, al incluir el uso de anticuerpos monoclonales.



Materiales:

- Placas de poliestireno Maxisorb (NUNC), constituidas por 12 tiras de 8 pozos cada una.
- Inmunoglobulinas humanas anti-dengue Pool de sueros humanos conteniendo anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación con títulos mayores o iguales a 1/1280 contra los virus del complejo dengue, precipitados por el método del sulfato de amonio y determinada su concentración mediante la lectura de DO a 280 y 260 nm.
- Anticuerpo monoclonal anti-complejo dengue conjugado con biotina
- Conjugado estreptavidina peroxidasa (Amersham)
- Buffer de Recubrimiento (coating) 0,05 M pH 9,5
Carbonato de sodio (Na₂CO₃) anhidro 1,59g; Bicarbonato de sodio (NaHCO₃) 2,93g.
Disuelva en 1L de agua destilada. Ajuste pH si es necesario. Duración máxima de 15 días.
Mantener a 4°C.
- PBS-Tween (PBS-T) pH 7,4

Cloruro de sodio (NaCl) 8g; Cloruro de potasio (KCl) 0,2g; Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) 0,2g; Fosfato dibásico de sodio anhidro (Na_2HPO_4) 1,2g.

Disuelva en 1L de agua destilada y agregue 0,5 mL de Tween-20. Mantenerlo a temperatura ambiente.

- Fosfato-citrato 0,05M pH 5:

Ácido cítrico 5,1g; Fosfato dibásico de sodio anhidro 7,47g.

Disuelva en 1L de agua destilada. Ajuste pH a 5.

- Ortofenilendiamina (OPD)
- Peróxido de hidrógeno (p.a.) 100 vol/ 30%
- Albúmina bovina sérica fracción V (ABS) al 3%

3 g de ABS en 100ml en buffer de recubrimiento (coating). Prepararlo al momento de ser usado.

- Sustrato

25 mL de buffer fosfato-citrato; 10mg de OPD + 10ul H_2O_2 . Proteger de la luz.

Método:

- Adsorber en placa de poliestireno Igs humanas anti-dengue en buffer carbonato / bicarbonato pH 9,5 a una concentración de 5ug/ml (100uL por pozo). Dejar las placas en cámara húmeda tapada toda la noche a 4° C. Se necesita un volumen de 10 mL por placa.
- Vaciar el contenido de las placas y hacer un bloqueo con 150uL en cada pozo de la solución de ABS al 3% en buffer Carbonato/Bicarbonato. Incubar a 37°C por 1 hora. Volumen total de 15 mL por placa.
- Lavar las placas 3 veces con PBS-T.
- Agregar 100uL de una dilución de la muestra de suero 1/20 en PBS-T. Se incluirá un control negativo por cuadruplicado y uno positivo por duplicado. Incubar la placa 2 horas a 37°C.
- Lavar 3 veces con PBS-T.
- Agregar 100uL por pozo del AcM conjugado a Biotina diluido 1/500 en PBS-T + 2% de STF. Incubar a 37° C por 1 hora.
- Lavar 3 veces con PBS-T.

- Añadir 100 uL por pozo del conjugado estreptavidina-peroxidasa diluido 1/2000 en PBS-T + 2% de STF. Dejar incubando 1 hora a 37°C.
- Lavar 3 veces con PBS-T.
- Añadir el sustrato 100uL por pozo. El sustrato debe ser preparado unos minutos antes de su utilización. Esperar 30 minutos de reacción.
- Detener la reacción agregando 100 uL de ácido sulfúrico al 12,5 % en cada pozo.
- Determinar los valores de densidad óptica a 492nm en un lector Micro-ELISA.

Valor de corte (VC): Se calculará la media de las DOs y desviación estándar del control negativo, estableciéndose como VC= la media de las DO + 3 veces la desviación estándar.

Toda muestra que tenga un valor de DO mayor o igual al VC será considerada positiva.

SDS-PAGE / Western Blot.

El blotting de proteínas fue originalmente descrito en 1979 como resultado de las técnicas de ácido nucleico; recibiendo la designación de Western Blot (WB) en 1981.

Esta técnica ha permitido que las proteínas corridas por electroforesis se encuentren accesibles al análisis a través de la reacción con anticuerpos o antisueros, lo cual ha tenido aplicación clínica e investigativa.

En nuestro laboratorio la técnica de WB fue normalizada para observar la respuesta de los sueros, tanto de infección primaria como secundaria, ante las proteína de los virus dengue. De esta forma hemos podido apreciar diferencias en cuanto a cantidad de proteínas que reconocen los sueros de infección primaria y secundaria, así como la intensidad de la respuesta.

El principio de la técnica está basado en la transferencia de las proteínas separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de duodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE, Laemmli, 1970) a una membrana de nitrocelulosa. Luego de la transferencia, las membranas son teñidas para chequear la eficiencia de este proceso (el colorante empleado es Rojo Ponceau S). Una vez eliminado el colorante la membrana debe ser bloqueada con leche para prevenir las uniones inespecíficas. Los polipéptidos transferidos pueden ser identificados usando anticuerpos que se unen a ellos y el complejo antígeno-anticuerpo es reconocido por un segundo anticuerpo que es conjugado con peroxidasa de rábano picante. Las proteínas pueden ser localizadas según su peso molecular utilizando los marcadores moleculares de proteínas (Rainbow TM, Amersham) o pueden ser identificadas por anticuerpos monoclonales según la disponibilidad. La actividad de la enzima es visualizada luego de una incubación de la membrana con un sustrato cromógeno apropiado, el cual proporciona color a una producto insoluble en la membrana. De esta forma queda identificado el complejo antígeno- anticuerpo.

Materiales:

❖ Tampón separador:

Tris ----- 45.5 g

SDS----- 1g

Ajustar pH 8.8 con HCl

Enrazar a 250 mL

❖ Tampón concentrador:

Tris-----15.14 g

SDS ----- 1 g

Ajustar pH 6.8 con HCl

Enrazar a 250 mL

❖ Acrilamida-Bisacrilamida:

Acrilamida ----- 73 g

Bisacrilamida ----- 2 g

Amberlite HB1----- 2.5 g

Enrazar a 250 mL

Agitación toda la noche a 4°C en oscuridad.

Filtrar para eliminar el amberlite.

❖ Tampón muestra:

Tris-HCl pH 6.8 (1M) ----- 6.2 mL

Solución Bromofenolazul 1% ----- 1 mL

Glicerol ----- 10 mL

H₂O destilada ----- 2.8 mL

❖ Tampón de Corrida:

Tris ----- 3 g

Glicina -----14.4 g

SDS ----- 1 g

Completar a 1 L con H₂O destilada.

❖ Tampón de Transferencia:

Tris----- 3.03 g

Glicina ----- 14.4 g

Metanol ----- 100 mL

Completar a 1 L de H₂O destilada.

❖ Solución Rojo Ponceau S:

Rojo Ponceau -----0.5 g

Acido acético glacial --- 1 mL

Completar a 100 mL con H₂O destilada.

❖ Solución de lavado:

PBS 1X -----1 L

Tween 20----- 0.5 mL

❖ Solución Bloqueadora (PBS-T₂₀-leche):

Leche -----4 g

Diluir en Solución de lavado.

❖ Sustrato:

4-cloro-1-naftol ----- 10 mg

Diluirlo en 5 ml de Metanol

3.3 diaminobenzidina-tetrahydroclorhídrico ----- 30 mg

Diluirlo en 40 mL de PBS 1X.

Mezclar ambos y adicionar 25 µL de peróxido.

Procedimiento:

Preparación del material:

Se cosechan cepas de los 4 serotipos en frascos Roller correspondientes, con monocapa de células confluentes Vero, una vez que el efecto citopático sea del 70 % se procede a la preparación del antígeno de trabajo según figura 1. La fracción seleccionada será la 3, donde se encuentran las proteínas NS5, NS3, NS1, E, PreM y C.

SDS-PAGE.

❖ Preparación del gel de acrilamida separador al 10%:

Mezclar los reactivos en el siguiente orden:

Tampón separador pH8.8 -----9mL

Acrilamida-Bisacrilamida -----8mL

H₂O destilada -----7mL

Persulfato de amonio 10% -----60μL

TEMED -----30μL

Una vez adicionado a la cámara y polimerizado se adiciona el gel concentrador.

❖ Preparación del gel concentrador:

Tampón concentrador pH6.8 ----3.1 mL

Acrilamida-bisacrilamida-----1.9 mL

H₂O destilada -----7mL

Persulfato de amonio 10% -----60μL

TEMED -----30μL

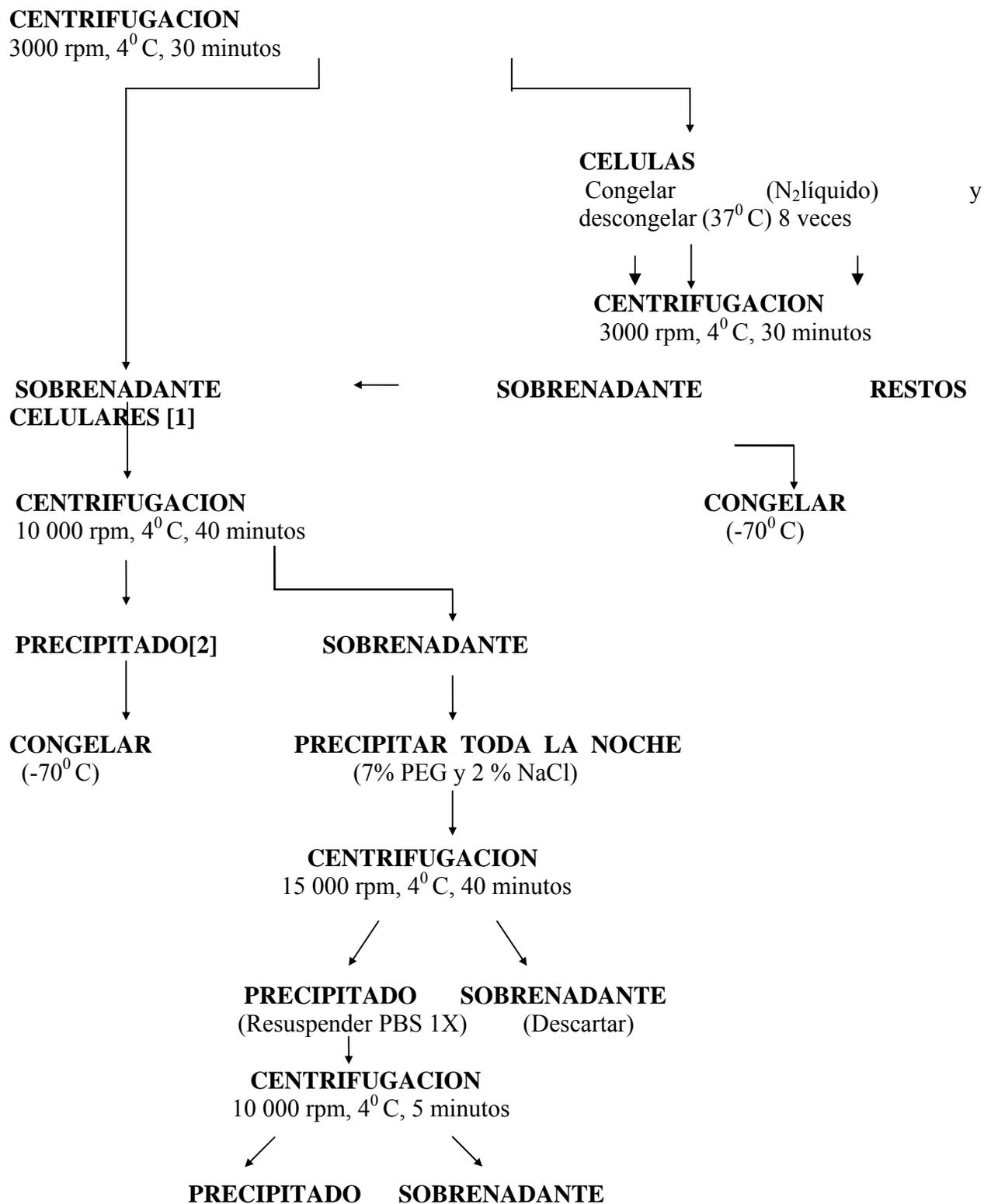
Una vez polimerizado el gel, se procede a la corrida electroforética en presencia de tampón de corrida, con previa unión del antígeno y tampón de muestra (100 μ L fracción 3 y 300 μ L del tampón) y previo calentamiento durante 2 min. a 80°C. Se adiciona por cada pozo 12 μ L de la mezcla calentada y 7 μ L del marcador molecular RaibowTM, aplicando una corriente constante de 60 mA durante 1h.

3. Western Blot:

- Colocar en el equipo de transferir en este orden (15 min. antes adicionarlos en tampón de transferencia):
 - a) 8 papeles de filtro
 - b) membrana de nitrocelulosa
 - c) gel de poliacrilamida corrido
 - d) 8 papeles de filtro.

- Aplicar corriente constante de 85 mA por gel durante 1h.
- Colocar la membrana en solución Rojo Ponceau S durante 15 min.
- Retirar la solución y lavar la membrana con H₂O destilada hasta visualizar bandas de proteínas (una vez que se verifique la eficiencia de la transferencia se sigue lavando con H₂O destilada hasta que desaparezca de la membrana la coloración rojiza).
- Colocar la membrana en solución bloqueadora durante 1h en agitación a temperatura ambiente (TA).
- Retirar solución bloqueadora e incubar con los sueros (suero primario diluido 1/40 y secundario 1/80 con PBS-T₂₀-leche) y con líquido ascítico hiperinmune (obtenido en ratón) como control positivo diluido 1/100, así como un suero negativo a dengue diluido 1/40 durante 2h en agitación a TA.

- Lavado de la membrana con PBS-T₂₀. Un lavado rápido y 3 lavados de 10 min. en agitación a TA.
- Incubar membrana con conjugado humano (anti Ig humana-peroxidasa, Amersham) y conjugado anti-ratón (anti Ig ratón –peroxidasa, Amersham) diluïdos 1/2000 y 1/1000 con PBS-T₂₀-leche, respectivamente según corresponda, durante 1h en agitación a TA.
- Lavado de la membrana similar al anterior.
- Adicionar sustrato para revelar e incubar durante 5 min. en agitación a TA.
- Detener la reacción con H₂O destilada.
- Towbin H, Stachelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1979, 76: 4350-4354.
- Laemmli UK. Cleavage of structure proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680-685.
- Valdés K, Alvarez M, Pupo M, Vázquez S, Rodriguez R, Guzmán MG. Human Dengue antibodies against structural and nonstructural proteins. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2000; 7(5): 856-57



DETECCION DE ANTIGENOS DEL VIRUS DENGUE EN TEJIDOS EMBEBIDOS EN PARAFINA.

La presencia de antígenos en tejidos puede ser evidenciada con el uso de diferentes técnicas. Sin embargo, son las técnicas inmunohistoquímicas (IHQ), y dentro de éstas las que utilizan como enzima la peroxidasa, las más usualmente empleadas.

El uso de sistemas que emplean la afinidad de la avidina por la biotina tienen gran sensibilidad y son en la actualidad los sistemas más usados cuando la señal a buscar necesita ser amplificada para su detección.

En el caso del virus Dengue, el empleo de estas técnicas permiten esclarecer la etiología en aquellos casos fatales con sospecha de infección por este virus. Igualmente puede emplearse para el diagnóstico retrospectivo en muestras incluidas en parafina de archivo o de referencia.

MATERIALES Y REACTIVOS:

Cortes histológicos procesados por parafina (método convencional) de 6 um de grosor de material en estudio, de caso positivo conocido y de otro caso no dengue.

- 1.- Kit StreptABComplex (DAKO)
- 2.- Anticuerpo anti-ratón biotinilado F(ab')₂(Boehringer)
- 3.- Anticuerpo Monoclonal contra virus dengue
- 4.- PBS 0.1 M pH 7,2
- 5.- Xilol
- 6.- Etanol absoluto
- 7.- Peróxido de Hidrógeno 30%
- 8.- Suero de Ternera
- 7.- Hematoxilina de Mayer
- 8.- Tabletas de 6 mg DAB
- 9.- Agua destilada
- 10.- Láminas cubreobjetos
- 11.- Medio de Montaje (Bálsamo de Canadá)

PROCEDIMIENTO

1. Desparafinar e hidratar:

- Se colocan las láminas de tejidos en xilol durante 5 minutos con agitación a temperatura ambiente.
- Se repite el paso anterior haciendo cambio de xilol.
- Pasar el tejido a alcohol; al 100% durante 5 minutos con agitación
- Pasar las láminas a alcohol al 75% durante 5 minutos
- Colocar las láminas en PBS durante 5 minutos.

IMPORTANTE. A partir de este momento impedir que el tejido y sus alrededores se sequen.

2.- Bloqueo de la Peroxidasa endógena.

- Se elimina el exceso de líquido de las láminas alrededor del tejido sin desprenderlo.
- Se añade H₂O₂ al 3% en agua destilada en cantidad suficiente para cubrir el tejido. Se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Realizar un lavado con agua destilada y posteriormente se coloca las láminas en PBS.
- Eliminar el exceso de líquido y se bordea el tejido usando lápiz DAKO-PEN (opcional).

3.- Bloqueo

- Se añade al tejido Suero Bovino al 20% en PBS durante 20 minutos con agitación y a temperatura ambiente. A partir de este paso, las incubaciones se hacen en cámara húmeda.

4.- Anticuerpos

- Eliminar la solución de bloqueo de la lámina
- Sin realizar ningún lavado se añade el anticuerpo primario (AcM anti-dengue) en la dilución de trabajo (1:20) con suero de ternera al 0.5% en PBS. Se agita durante 5 minutos a temperatura ambiente y luego se coloca en cámara húmeda a 4°C toda la noche.
- Se realizan 2 lavados con PBS durante 5 minutos.
- Secar el exceso de líquido y añadir el anticuerpo secundario (anti-ratón biotinilado) diluido 1:500 en PBS. Se incuba a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación.

IMPORTANTE

Faltando 30 minutos para finalizar la incubación, se preparan los reactivos para agregar el complejo streptavidina-biotina.(StrepABCComplex)

Por cada 1ml de reacción se necesitan 10 microlitros de A y 10 microlitros de B en PBS. Se colocan en un vial y se mantiene a 4°C hasta su uso.

5.- Enzima

- Lavar 2 veces en PBS durante 5 minutos y después de eliminar el exceso de líquido añadir

mezcla de StreptABComplex. Se incuba durante 30 minutos.

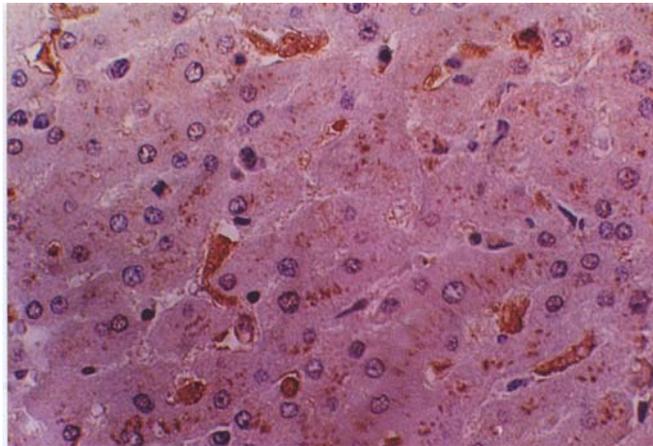
- Lavar 2 veces con PBS

Añadir sustrato [H_2O_2 6 microlitros, 10 mililitros de H_2O y 1 tableta de Diaminobencidina (6 miligramos)]. Este paso se realiza lámina por lámina y la reacción se controla bajo observación en el microscopio. Se detiene la reacción con un lavado de agua corriente.

6.- Tinción y deshidratación de los tejidos.

- En un vaso copplin con Hematoxilina de Mayer colocar las láminas durante 45 segundos. Los núcleos de las células deben tomar una coloración azul. Colocar bajo agua corriente para eliminar colorante en exceso.
- Deshidratar en alcoholes en orden ascendente: 75%, 90%, 95%, 100%, alcohol-xilol y luego aclarar con 2 pases por xilol.
- Secar y gotear solución de montaje (Bálsamo de Canadá o DAKO Glycergel), colocar cubreobjeto y observar al microscopio.

En cada experiencia se debe contar con controles positivos y negativos para la técnica.



- J.L. Pelegrino, E. Arteaga, A.J. Rodríguez, E. González, M.C. Frontela, M.G. Guzmán. Normalización de técnicas inmunohistoquímicas para la detección de antígenos del virus dengue en tejidos embebidos en parafina. Rev Cub Med Trop Vol 49, # 2, 1997.

DAKO® Catalyzed Signal Amplification (CSA) System

K1500

Reagent Preparation

For optimal staining results, use of the CSA Ancillary System (Code No. K1499) is recommended. This system includes DAKO Target Retrieval Solution, DAKO Tris Buffered Saline with Tween 20, DAKO Biotin Blocking System and DAKO Antibody Diluent with Background Reducing Components. For staining with primary antibodies from RABBIT use of the DAKO CSA Rabbit Link (Code No. K1498) is recommended as a substitute for the Link Antibody provided (Bottle 4).

- **PREPARE WASH BUFFER SOLUTION**
0.05 M Tris-HCl pH7.6, 0.3 M NaCl, 0.1% Tween 20. DAKO TBST 10 x Concentrate (Code No. S3306 or in K 1499) is recommended.

- **PREPARE PRIMARY ANTIBODY NEGATIVE CONTROL REAGENT**

- **PREPARE STREPTAVIDIN-BIOTIN COMPLEX**
(at least 30 minutes before use)

| <u>number of specimens</u> | <u>1-10</u> | <u>11-20</u> | <u>21-30</u> | <u>31-40</u> | <u>41-50</u> |
|--|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| ml of Streptavidin-Biotin Complex Diluent (Bottle 7) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| <u>drops of Reagent A (Bottle 5)</u> | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |
| <u>drops of Reagent B (Bottle 6)</u> | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 |

- **PREPARE SUBSTRATE-CHROMOGEN SOLUTION**
 - 10 drops S substrate Tris Buffer Concentrate (Bottle 11) in provided 10 ml tube
 - Fill to 10 mL with distilled water
 - add 1 Substrate Tablet (Bottle 10)
 - cap
 - shake to dissolve

| <u>number of specimens</u> | <u>1-20</u> | <u>21-40</u> | <u>41-60</u> | <u>61-80</u> | <u>81-100</u> |
|----------------------------|-------------|--------------|--------------|--------------|---------------|
| 2 | 4 | 6 | 8 | 10 | |

| <u>ml of DAB solution</u> | <u>1</u> | <u>2</u> | <u>3</u> | <u>4</u> | <u>5</u> |
|--|----------|----------|----------|----------|----------|
| drops of Substrate Hydrogen Peroxide (Bottle 12) | | | | | |

- **PREPARE TARGET RETRIEVAL (IF APPLICABLE)**
DAKO Target Retrieval Solution (Code No. S 1699, S 1700 or in K1499) is recommended.

- **PREPARE BIOTIN BLOCK**

DAKO Biotin Blocking System (Code No. X0590 or in K1499) is recommended.

DAKO Antibody Diluent with Background Reducing Components (Code No. S3022 or in K1499) is recommended as diluent.

Staining Procedure

▶ DEPARAFFINIZE AND REHYDRATE SPECIMENS

PERFORM TARGET RETRIEVAL (IF APPLICABLE)

PERFORM BIOTIN BLOCK

1 APPLY HYDROGEN PEROXIDE
(Bottle 1)
incubate 5 minutes
wash • place in fresh buffer bath

2 APPLY PROTEIN BLOCK
(Bottle 2)
incubate 5 minutes
do not rinse • blot excess protein block

3 APPLY PRIMARY ANTIBODY OR
NEGATIVE CONTROL REAGENT
incubate 15 minutes
wash • place in fresh buffer bath

4 incubate 15 minutes
wash • place in fresh buffer bath

APPLY PREPARED STREPTAVIDIN- 5+6+7 BIOTIN COMPLEX

incubate 15 minutes
wash • place in fresh buffer bath

8 APPLY AMPLIFICATION REAGENT
(Bottle 8)
incubate 15 minutes
wash • place in fresh buffer bath

9 incubate 15 minutes
wash • place in fresh buffer bath

APPLY PREPARED SUBSTRATE- 10+11+12 CHROMOGEN SOLUTION

incubate 5 minutes
wash with water

APPLY STREPTAVIDIN-PEROXIBASE (Bottle 9)

- COUNTERSTAIN
- MOUNT
COVERSLIPS

DETECCIÓN DE LOS VIRUS DEL DENGUE MEDIANTE REVERSO TRANSCRIPCIÓN/REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT/PCR)

Los 4 serotipos de los virus del Dengue producen un rango de patogenicidad en el humano que va desde una enfermedad febril indiferenciada hasta la Fiebre Hemorrágica del Dengue/ Síndrome de Choque por Dengue (FHD/SCD). Desde los años 70 han ocurrido brotes, cada vez mas frecuentes con incremento de la severidad de la enfermedad, involucrando cada vez a una mayor población.

Los estudios epidemiológicos y clínicos del Dengue están basados en el aislamiento viral y la serología. Sin embargo la recuperación del virus del suero virémico puede fallar si la muestra contiene anticuerpos contra este virus o cuando se conserva en condiciones inapropiadas. Comúnmente el diagnóstico de Dengue se basa en el aislamiento viral en células permisivas y su identificación por seroneutralización o mediante anticuerpos monoclonales que permiten detectar los antígenos del virus en cultivos celulares infectados (Henchal et al., Am. J. Trop. Med. Hyg., 1982, 31, 830-836). Por otra parte la detección directa del ácido nucleico de muestras de sangre mediante probes es una técnica con limitaciones debido a la baja viremia en algunas muestras, y la necesidad de tener que contar con probes para cada uno de los serotipos virales.

El PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) sin embargo, permite una amplificación rápida y selectiva de una secuencia corta del genoma que después puede ser identificado mediante hibridación con probes o sondas de cADN tipo-específicas o análisis del material amplificado en investigaciones de epidemiología molecular. Se han desarrollado diversos métodos para la detección de los virus del Dengue mediante identificación del material amplificado con cADN marcado, de cada serotipo clonado, como sonda (Deubel et. al., J. Virol. Methods, 1990, 30, 41-54.) o semi-nested PCR usando cebadores tipo-específicos en una segunda amplificación (Lanciotti et al., J. Clin. Microbiol.1992, 30, 545-551.). En este estudio nosotros seleccionamos la amplificación del fragmento genómico que comprende parte de los genes C-prM para el diagnóstico de los virus del dengue con buena sensibilidad y especificidad (Lanciotti et al., J. Clin. Microbiol.1992, 30, 545-551). Este fragmento esta flanqueado por una secuencia conservada entre todos los virus del Dengue, que permite la

amplificación genómica usando cebadores universales de dengue. El serotipo es entonces identificado mediante el uso de primer serotipo- específico en un semi-nested PCR.

I. Preparación del ARN viral.

I.1. De cepas multiplicadas en cultivo celular o en cerebro de ratón lactante

- 1) Los aspectos relacionados con la infección, multiplicación y cosecha se relacionan en los acápites anteriores en este mismo folleto.
- 2) Se monitorea la multiplicación viral mediante IFI. Cuando existe mas de un 50% de células fluorescentes, se cosecha 200 µl del sobrenadante de ese cultivo infectado.

I.2. En muestras de suero se parte de igual volumen que de sobrenadante de cultivo infectado, y el resto del procesamiento es idéntico en ambos casos.

- se transfiere a un tubo Eppendorf y se le adiciona igual volumen de 1x Buffer Lisis (4M guanidinium isotiocianato, 25mM de tampón de citrato de sodio, pH 7.0, 0.5% sarkosyl, 100mM de 2-mercaptoetanol y 1µg/mL de tRNA de levadura)
- Adicionar 40 µL de 2M acetato de sodio, pH 4.0. Vortex
- “ 500 µL de fenol equilibrado con agua (libre de RNasas). Vortex 30 seg.
- “ 150 µL de cloroformo. Vortex
- Mantener en hielo durante 15 minutos, y centrifugar a 10 000 r.p.m., 15 min. a 4° C
- Remover la fase acuosa, pasándola a un tubo nuevo, y adicionar igual volumen de Isopropanol, mantener a menos 20 ° C al menos 1 hora.
- Centrifugar en iguales condiciones por 20 min. Descartar el sobrenadante y adicionar Etanol al 75% al precipitado resultante en el fondo del tubo (pellet), centrifugar igual durante 5 min. más. Remover el etanol con mucho cuidado y poner a secar el precipitado con el tubo en posición invertida y abierto sobre un papel estéril. Resuspender el pellet en 20 µL de agua estéril, libre de RNasas.

I.3) De muestras de tejidos en bloques de parafina

- Realizar cortes seriados entre 15-20 micras utilizando un micrótomo horizontal LEICA. Colocar los cortes en viales eppendorf de 1.8ml.
- Adicionar 1mL de xilol y mantener por 10 min. a temperatura ambiente (TA) en una plataforma con movimientos suaves.
- Centrifugar por 3 min. a 10000 rpm.
- Eliminar el sobrenadante y repetir este proceso 2 veces mas hasta no observar restos de parafina.
- Adicionar 1ml de etanol absoluto y mantener durante 5 min. a TA y posteriormente al 95% y al 70% durante igual período con centrifugaciones entre cada paso de 3 min. a 10000 rpm.
- Dejar secar el tejido en flujo laminar hasta eliminar los restos de etanol (mediante evaporación). Aproximadamente durante 30-45 min.

Extracción del ARN:

- Resuspender el pellet en 300ul de tampón de lisis (100mM Tris-ClH pH 8.5, 0.5M EDTA, 10% SDS, 25mg/ml de Proteinasa K y 20u Rnasin) e incubar por 1h a 56⁰C en baño de agua.
- Añadir 300ul de fenol-cloroformo en incubar por 10 min a TA utilizando plataforma o balancín. Centrifugar por 5 min a 7000 rpm. Extraer la fase acuosa (superior) y pasarla a un tubo eppendorf nuevo. Repetir la extracción una vez más.
- Añadir 300uL de cloroformo y realizar un proceso similar al anterior. Repetir por segunda vez la extracción con cloroformo.
- Precipitar el ARN con 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío y acetato de sodio (1\10) durante 18h a -70⁰C.
- Centrifugar por 15 min. a 4⁰C y 12000 rpm, lavar con etanol al 70%, centrifugar en iguales condiciones y dejar secar el pellet en flujo laminar durante 30 min.
- Resuspender el pellet añadiendo 10uL de agua libre de Rnasas y mantener en hielo hasta la síntesis del cADN.

II. RT/PCR

La RT y posterior amplificación del cADN se realizan en un solo paso en un mismo tubo (de 0.5 mL) donde se adicionan secuencialmente:

- Tampón 10x [50 mM KCl, 10mM Tris (pH 8.5), 1.5 mM MgCl₂, 0.01% gelatina]
- 200uM de cada uno de los 4 deoxinucleotidos trifosfatos
- 100 mM ditioneitol
- 50 pmoles (~ 32 ng /uL) de cada uno de los cebadores D1 y D2(cebadores universales)
- 10 U de AMV-RT
- 2.5 U de Taq DNA polimerasa
- agua destilada estéril libre de Rnasas (hasta completar 90 µl)
- Se adiciona a cada tubo con la mezcla anterior 10 µL del ARN y se homogeniza bien.

Se llevan los tubos al termociclador automático para realizar las 2 reacciones secuencialmente con la siguiente programación:

30 min - 42° C

30 seg - 94 °C

1 min - 55 °C x 35 ciclos

2 min - 72 °C

5 min - 72 °C

III. Segunda amplificación o nested PCR

En un tubo estéril y horneado de 0.5 ml se adicionan los reactivos anteriores excluyendo: el cebador D2 que es reemplazado por los cebadores serotipo-específicos (TS1, TS2, TS3, y TS4), el DTT, y la AMV-RT, que son eliminados. Se completa el volumen hasta 99 µL con agua de similar calidad y se adiciona 1 µL del producto de la primera amplificación. La reacción preparada se somete a 26 ciclos de las siguientes temperaturas:

30 seg. - 94 °C, 1 min. - 55 °C 2 min. - 72 °C

Después del ciclaje, mantener las muestras a 72 °C durante 10 minutos más.

Cebadores empleado en el diagnóstico de dengue según Lanciotti et al, 1992.

| Cebador | <u>Secuencia nucleotídica</u> | Talla del producto DNA |
|---------|-------------------------------|------------------------|
|---------|-------------------------------|------------------------|

| | | |
|-----|-------------------------------------|---------------------|
| D1 | 5' TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG 3' | 511 bp |
| D2 | 5' TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC 3' | 511 bp |
| TS1 | 5' CGTCTCAGTGATCCGGGGG 3' | 482 bp (D1 and TS1) |
| TS2 | 5' CGCCACAAGGGCCATGAACAG 3' | 119 bp (D1 and TS2) |
| TS3 | 5' TAACATCATCATGAGACAGAGC 3' | 290 bp (D1 and TS3) |
| TS4 | 5' CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA 3' | 392 bp (D1 and TS4) |

IV. Análisis directo de los productos del PCR por Electroforesis

Preparar un gel de agarosa al 2 % en buffer TBE 1X (0,4M de Tris, 0,5 M de ácido bórico y 0,01 M de ácido etilendiamín tetracético), teñido con bromuro de etidio al 0.1µg/mL. 10µL del producto amplificado más 2 µL de indicador de corrida (Tampón Loading 6X, Promega) se someten a electroforesis en el gel de agarosa, en cámara de electroforesis submarina (LKB) utilizando para ello como tampón de corrida el TBE 1X , a 100 V, durante 1 hora. Al finalizar, las bandas del ADN amplificado son visualizadas mediante un transiluminador de luz UV (LKB), determinando sus tallas por comparación con un marcador de peso molecular de ADN como el DNA Leader 100 pb y PCR Marker (Promega).

El producto del RT/PCR tiene una talla de 511 pb, y generalmente se visualiza con buen rendimiento, no así en los casos de muestras clínicas en que la visualización del primer producto depende de la concentración viral y calidad de la muestra entre otros factores.

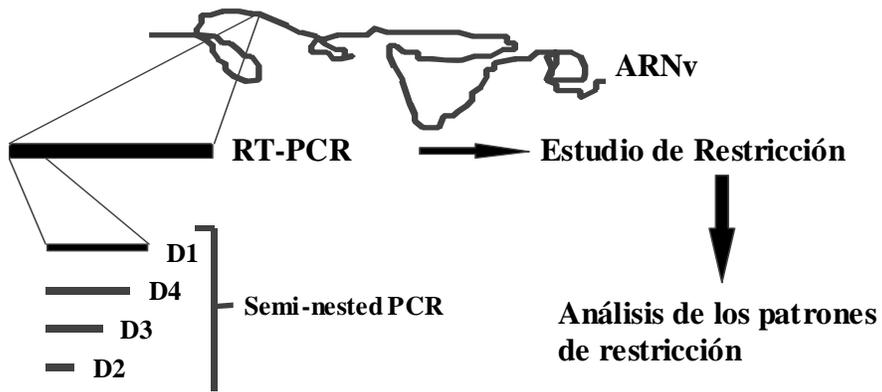
La talla del producto del nested PCR, depende del serotipo que se este amplificando:

Serotipo 1_482 PB

“ 2_119 PB

“ 3_290 PB

“ 4_392 PB



IDENTIFICACIÓN DE LOS SUBTIPOS DE LOS VIRUS DEL DENGUE MEDIANTE RESTRICCIÓN ENZIMÁTICA

La introducción de una nueva cepa es frecuente que suceda con la aparición de un nuevo brote epidémico. El movimiento del virus del Dengue entre diferentes áreas geográficas es un importante elemento en la epidemiología de esta enfermedad. Sin embargo la caracterización rápida del agente causal pudieran ayudar a instituir las medidas para el control de los brotes. Mas aún , la identificación de las variaciones y evolución del genoma viral, pudieran contribuir a un mejor entendimiento de la epidemiología y de los aspectos moleculares de la enfermedad. La información acerca de la variación genética en un tipo de virus o sobre el origen epidemiológico de un nuevo aislamiento de dengue ha sido obtenido mediante: Finger printing de ARN (Repick et al., Am. J. Trop. Med. Hyg.,1983, 577-589; Trent et al., Virol., 1983, 128, 271-284; Henchal et al., Am. J. Trop. Med. Hyg., 1986, 35, 393-400), Hibridación de ARN usando oligonucleótidos sintéticos como probes (Kerschner et al., J. Gen. Virol., 1986, 67, 2645-2661), Restricción enzimática de un fragmento previamente amplificado por PCR (conocido por sus siglas en inglés, RFLP) (Vorndan et al., J. Virol. Meth., 1994, 48, 237-244), o por análisis comparativo de secuencias de RNA o cDNA (Blok et al., Arch. Virol., 1989, 105, 39-53; Rico Hesse, Virology, 1990, 174, 479-493; Deubel et al., Arch. Virol., 1993, 197, 216-224; Chungue et al., J. Gen. Virol., 1993, 74, 2765-2770; Lewis et al., Virology, 1993, 216-224; Lanciotti et al., J. Gen. Virol., 1994, 75, 65-75).

En este estudio, se digiere el fragmento genómico del virus del Dengue obtenido por RT/PCR usando los primer universales de dengue D1 y D2, con un panel de enzimas de restricción. Los fragmentos producto de la digestión son vizualizados por electroforesis de agarosa, constituyendo un patrón de restricción, que puede ser sencillamente observados en presencia de luz UV, y analizado de esa forma sin necesidad de un aditamento adicional o programa computarizado.

V. Digestión del fragmento producto del primer PCR de diagnóstico por enzimas de restricción.

- Transferir 8 μ L del producto amplificado del RT/PCR a un tubo Eppendorf de 0.5 μ L
- Adicionar 1 μ L del tampón de la enzima de restricción

- “|” 1 μ L de la correspondiente enzima de restricción (HaeIII, AluI, RsaI, HinfI) o 1 μ L de agua (Control)
- Incubar a 37 ° C durante 1 hora
- Adicionar 2 μ L de tampón de aplicación de muestra para EF
- Preparar un gel de agarosa al 4 % con TBE 1X con 1 μ g/mL de bromuro de etidio
- Aplicar cada muestra. Incorporar en la corrida un marcador de peso molecular
- Visualización de las bandas a través de luz UV.

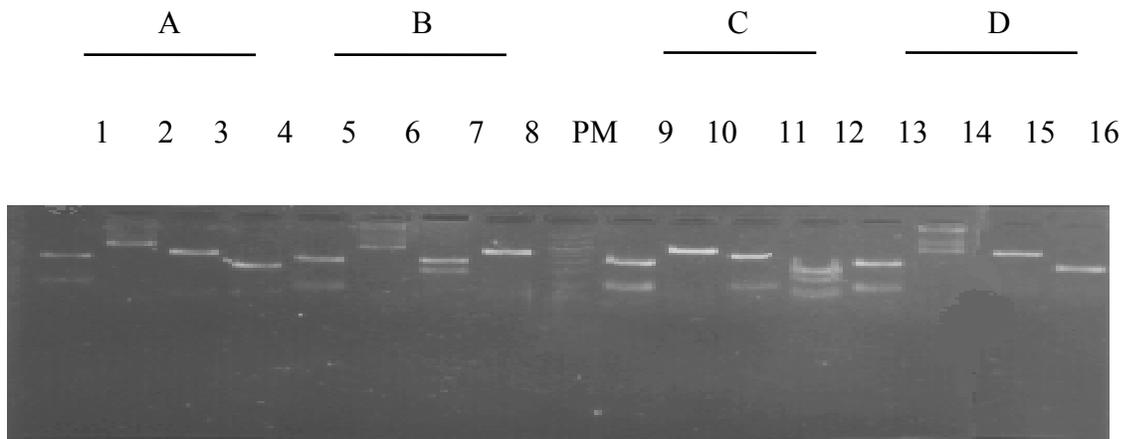


Figura. 1. Cuatro patrones de restricción para las enzimas seleccionadas encontrados en un grupo de cepas de Dengue 2 estudiadas. 1,5,9, y 13: restricción enzimática con HaeIII; 2, 6, 10 y 14: restricción enzimática con AluI; 3, 7, 11, y 15: restricción enzimática con RsaI; 4, 8, 12, 16: restricción enzimática con HinfI.

VI. Secuencia directa del fragmento amplificado

VI.1. Purificación del fragmento amplificado:

- Adicionar 10 μ L del producto del PCR a 1 mL de la Resina (WisardTM clean, Promega), y 100 μ L del tampón, mezclar invirtiendo el tubo varias veces.
- Aplicar la mezcla ADN/Resina a la barra de una jeringuilla que esta previamente fijada a una minicolumna.
- Gentilmente aplicar el émbolo y desplazarlo dentro de la barra de la jeringuilla.
- De la misma forma, lavar la columna con 2 mL de Isopropanol al 80 %.
- Centrifugar a 10 000 rpm por 30 segs, a T.A.

- Transferir la minicolumna a un tubo eppendorf nuevo.
- Aplicar 50 μL de agua destilada a la minicolumna. Centrifugar 30 segs.

VI.2. Secuenciación del ADN purificado.

Teniendo en cuenta el protocolo propuesto por el Sequenace PCR Product Sequencing Kit (Amersham).

1. Pretratamiento enzimático del producto del PCR:

-5 μL del producto del PCR

-1 μL de Exonucleasa 1 (10 U/ μL)

-1 μL de Fosfatasa alcalina (2 U/ μL)

Mezclar e incubar a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 15 min. Inactivación enzimática, calentando a 80 $^{\circ}\text{C}$, 15 min.

Todas estas incubaciones es conveniente realizarlas en termociclador.

El ADN esta en este momento listo para su secuenciación con este Kit.

2. Preparación de la mezcla de hibridación:

ADN pretratado (1-9 μL , 0.5 pmoles)

Cebador (5-10 pmoles/ μL) - 1 μL

Agua (para ajustar volumen hasta 10 μL).

Desnaturalizar por calor 2-3 min, 100 $^{\circ}\text{C}$, y enfriar de inmediato en un baño de hielo, por 5 min. Centrifugar brevemente y mantener en hielo hasta el paso 6.

3. Marcar una serie de tubos de 0.5 mL con A, C, G y T. Agregarle 2.5 μL de la mezcla de terminación. Mantener tapados a T. A. hasta los pasos 5 y 7.

4. Diluir LA MEZCLA DE MARCAJE 1:5 en agua.

5. Calentar a 37 $^{\circ}\text{C}$, 1 min, los tubos del paso 3 (A, C, G y T).

6. Reacción de marcaje:

-10 μL de la mezcla de hibridación del ARN (mantener en baño de hielo)

-2 μL del tampón de reacción

-1 μL DTT (0.1M)

- 2 μL labeling mix (1:5)
- 0.5 μL [^{33}P] o [^{35}S] (5 uCi)
- 2 μL de Secuenasa ADN polimerasa
- 17.5 μL en Total.

Mezclar y encubar a T.A. 5 min.

7. Reacción de terminación:

Transferir 3.5 μL de reacción de marcaje a cada tubo de terminación (A, C, G y T) mezclar y continuar incubando a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 5-10 min.

8. Detener la reacción adicionando 4 μL de la solución de parada a cada tubo.

9. Calentar las muestras a 75 $^{\circ}\text{C}$, 2 min inmediatamente antes de aplicar en el gel de secuencia. Aplicar 2-3 μL en cada línea.

VI.3. Preparación del gel de secuencia

-Preparación de los cristales: Lavar cada cristal con agua y detergente abundante y tratar el cristal grande con Bind-silano y el cristal pequeño con Repel- Silano.

-Montar los cristales empleando espaciadores plásticos de 0.53 mm.

-Preparar la Acrilamida al 8% en un Beaker:

-Mezclar:

-Urea: 35.3 g

-Acrilamida/Bis (40/2): 12.5 ml

-TBE 10X: 8.4 mL

-Agua destilada: 36.2 mL

Inmediatamente antes de aplicar:

-Persulfato de amonio 15%: 600 μL

-TEMED: 60 μL

- Aplicar el gel inmediatamente entre las placas de cristal, precionando a cada lado con una presilla de presión. Dejar que el gel polimerise en posición horizontal durante 2 horas.

- Insertar los cristales con el gel en el aparato secuenciador, y aplicar TBE 1X en cada una de las 2 cámaras. Poner a pre-correr antes de aplicar, durante aproximadamente 30 min, con las mismas condiciones de corrida.
- Desnaturalizar las muestras a 80⁰C, 5 min (en bloque térmico), y aplicar inmediatamente.
- Aplicar las muestras en el orden A, C, G y T, con una pipeta Eppendorf.
- Correr a voltaje constante ~ 1600 vols, hasta que el azul de bromofenol llegue al final del gel
- Quitar los cristales del aparato y remover cuidadosamente el cristal mas pequeño.
- Enjuagar el gel fijado al cristal más largo, con una solución de Metanol 12%/ Ácido acético 10%, durante 10 min.
- Secar en horno a ~ 80⁰ C, y exponer en cámara oscura, a T. A. un tiempo que varia de acuerdo al isótopo empleado.
- Revelado: En condiciones semejantes a las empleadas para revelar cualquier placa de Rayos X. Lectura de la secuencia.

Materiales y Reactivos

1. Equipos

- Centrífuga Eppendorf (a T.A. y refrigerada)
- Freezer (-80⁰C)
- Freezer (-20⁰C)
- Fuente de poder (300V/100mA)
- Fuente de poder (3000V/150mA)
- Bloque térmico de 70-95⁰C.
- Termociclador para PCR
- Transiluminado de luz UV
- Vortex
- Horno de 70-80⁰C

2. Materiales

Pipetas estériles (10, 5 y 1 mL)
Cámara de electroforesis de minigel
Cámara de electroforesis de secuencia
Guantes desechables
Pipetas (P10, P20, P100, P1000)
Puntas estériles y horneadas (blancas, amarillas y azules)
Tubos Eppendorf estériles y horneados (1.5 y 0.5 mL)
Jeringuillas de 3 mL

3. **Buffers y reactivos**

Acrilamida/Bis acrilamida (38/2)
Persulfato de Amónio
TEMED
Acetato de sódio 3M
Acido acético
Metanol
Isopropanol
Agua destilada estéril/ tratada con DEPC
Fenol/ equilibrado con agua
Cloroformo/ isoamil alcohol
TBE tampón 10X (Tris base 1M, Acido Borico 0,91M, 0.02M EDTA, pH final de 8.3)
Buffer de aplicación: TBE 2X, glicerol 10%, Bromofenol azul 0.06%, Xylene cyanol 0.06%, 2 mM de EDTA.
Buffer de lisis: Guanidinium isotiacianato 4M, Sarkosyl 0.5%, Citrato de sodio 25mm pH 7.0, 2 mercapto etanol 100mM.
Bromuro de etidium (10 mg/mL)
Agarosa para uso en estudio de ADN
Cebadores: D1, D2, TS1, TS2, TS3, TS4
Marcador de peso molecular (PCR marker)
Kit de secuencia: **Sequenace PCR Product Sequencing Kit (Amersham)**.
Kit de purificación de ADN Wisard™ (Promega)

Rnasin (Inhibidor de ribonucleasas)

4 dNTP: 5mM de dATP, dGTP, dCTP, dTTP (Promega)

³⁵S-ATP (Amersham)

4. **Enzimas**

AMV- Reverso transcriptasa (Promega)

Taq ADN polimerasa (Promega)

Enzimas de restricción: AluI, RsaI, HaeIII y HinfI (Promega)

(todos los tampones están disponibles con las enzimas)

RT-PCR/ NESTED PCR GENÉRICO PARA LA DETECCIÓN DE FLAVIVIRUS COMBINADO CON PCR MULTIPLE DE DENGUE.

Extracción del ARN viral empleando el reactivo TRIZOL LS Reagent (Gibco BRL).

- A partir de 250 μ L de sobrenadante de cultivo celular infectado, homogenizado de tejido cerebral o suero, se añade 750 μ L de TRIZOL. Esta mezcla se agita manualmente y se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Adicionar 200 μ L de cloroformo, se agita vigorosamente durante 15 segundos y se incuba durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 12 000 rpm, durante 10 minutos, a 4°C.
- Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo eppendorf y se le agrega 500 μ L de isopropanol y se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 12 000 rpm, durante 10 minutos, a 4°C.
- La fase acuosa se desecha y al precipitado obtenido se le adiciona 1 mL de etanol al 75%, se mezcla y se centrifuga a 12 000 rpm, durante 5 minutos a 4°C.
- Eliminar todo el etanol residual, el precipitado se deja secar completamente a temperatura ambiente invirtiendo el tubo sobre un papel de filtro (irradiado previamente con luz UV).
- El material seco se resuspende en 50-100 μ L de agua libre de RNAsas.

Cebadores empleados en la RT/PCR genérica de Flavivirus y PCR m de dengue.

| Talla del ADN | Cebadores | Secuencia de bases (5'-3') |
|-------------------------|-----------|--|
| TR-RCP genérico Flavi 1 | FLAVI 1+ | GAYYTIGGITGYGGIIGIGGGGMTGG |
| (1300 pb) | FLAVI 1- | <u>CCASTGITCYKCRTTIAIRAAICC</u> |
| RCP genérico Flavi 2 | FLAVI 2+ | TGYRTITAYAACAYSATGGG |
| (144 pb) | FLAVI 2- | TCCAICCCIGCIRTRTCRTCIGC |
| RCP múltiple de Dengue | Dengen | <u>AGICCTTCYCCTTCYACTCCA</u> <u>C</u> |
| (480 pb) | DEN1 | GTGGTTATGGGGTTTTCTCTCTAG |
| (834 pb) | DEN2 | CCGYAAYATYGGRATTGAAAGTGA |
| (244 pb) | DEN3 | GAGCTGCTGTTGAGGACGARGAATT |
| (658 pb) | DEN4 | ATGAACCTCCTTCGACAGGCTCTCC |

Según el código de bases ambiguas IUB: I (A,C, G, T); Y(C/T); R(G/A); M(C/A); S(G/C); K(T/G).

RT-PCR genérico para Flavivirus (RT-PCR Flavi 1).

La RT y la PCR se realizan en un mismo tubo de reacción. Se adicionan 10 µL de ARN viral extraído a 90 µL de una mezcla que contiene: 50mM de KCL, 10mM de Tris pH 8.5, 1,5 mM de MgCl₂, 0,01% de gelatina (componentes del tampón de reacción), 200 µM de cada deoxinucleótido trifosfato (dNTP), 5mM de ditiotritol, 50 pMoles de cada cebador (Flavi 1+, Flavi 1-), 5 U de RT-AMV (Promega) y 2,5 U de Taq DNA polimerasa (Promega).

El programa para la RT-PCR es como sigue: 42°C, continuando con la reacción de amplificación: 94°C, 4 min.; (94 °C, 30 seg.; 55°C, 1 min., 72°C, 2 min.) por 30 ciclos, finalmente se mantuvo durante 7 minutos a 72°C para completar la extensión de los productos amplificados.

Nested PCR Flavivirus (PCR Flavi 2) y PCR múltiple de Dengue (PCRm Dengue).

PCR Flavi 2: Una alícuota de 1 μ L de la RT-PCR Flavi 1 se toma como molde para la PCR Flavi 2. La mezcla para la reacción (en volumen final de 100 μ l) consiste de los mismos componentes del tampón de reacción empleado para la RT-PCR, 100 pMoles de los cebadores Flavi 2+ y Flavi 2-, 200 μ M de los dNTP y 2,5U de Taq DNA polimerasa.

El programa para que se produzca la reacción es: 94°C, 5 min.; (94°C, 1 min.; 52°C, 1 min.; 72°C, 2 min.) por 26 ciclos y una extensión durante 7 minutos.

PCRm Dengue: 1 μ L del producto de la RT-PCR Flavi 1 se utiliza también como molde de ADN para esta reacción, empleando las mismas condiciones que la PCR Flavi 2 pero en este caso 100 pMoles de los cebadores DenGen, Den1, Den2, Den3 y Den4 y sometidos al mismo ciclaje que la PCR Flavi 2.

SISTEMA DE EXPRESION DIFERENCIAL DE mRNA **(“RNAimage Kit: mRNA DIFFERENTIAL DISPLAY SYSTEM”)**

La tecnología de expresión diferencial de mRNA es una poderosa herramienta para la identificación y la clonación de genes diferencialmente expresados. Este método comprende:

- la transcripción inversa de mRNA con cebadores de oligo-dT que se incorporan a la cola de poli(A),
- la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) en la presencia de un segundo cebador corto cuya secuencia es arbitraria,
- la corrida electroforética, en un gel de secuenciación de DNA, de las subpoblaciones de cDNA amplificadas.

El análisis de las muestras de mRNA puestas una al lado de la otra permite identificar genes expresados diferencialmente y la recuperación de estos para ser usados como sondas y para la clonación de su cDNA o de su DNA genómico.

Materiales:

- ⇒ tampón de transcripción inversa 5X
- ⇒ transcriptasa inversa MMLV (100 u/μl)
- ⇒ dNTP (250 μM)
- ⇒ H-T₁₁G (2 μM)
- ⇒ H-T₁₁A (2 μM)
- ⇒ H-T₁₁C (2 μM)
- ⇒ tampón de RCP 10X
- ⇒ dNTP (25 μM)
- ⇒ H-AP1 (2 μM)
- ⇒ H-AP2 (2 μM)
- ⇒ H-AP3 (2 μM)
- ⇒ H-AP4 (2 μM)
- ⇒ H-AP5 (2 μM)

- ⇒ H-AP6 (2 μ M)
- ⇒ H-AP7 (2 μ M)
- ⇒ H-AP8 (2 μ M)
- ⇒ control de RNA (1 μ g/ μ L)
- ⇒ glucógeno (10 mg/mL)
- ⇒ H₂O destilada (H₂Od)
- ⇒ colorante de corrida
- ⇒ Taq DNA polimerasa (5 u/ μ L) o AmpliTaq DNA polimerasa (5 u/ μ L)
- ⇒ α -[³³P]dATP (2 000 Ci/mmol) o α -[³⁵P]dATP (1 000 Ci/mmol)

El sistema RNAimage fue optimizado usando Taq DNA polimerasa de Qiagen o Perkin Elmer y α -[³³P]dATP de New England Nuclear. DNA polimerasas termoestables producidas por otras casas comerciales pueden no ser compatibles con el sistema RNAimage.

- ⇒ MessageCleanKit de la Corporación GenHunter. El RNA total debe ser purificado de contaminantes de DNA cromosomal con este sistema, antes de su uso en differential display.

Métodos:

- Transcripción inversa del mRNA
1. Descongelar los siguientes componentes y poner en hielo:

| Para un volumen final de 20 μ L | μ L |
|-------------------------------------|---|
| H ₂ Od | 9.4 |
| tampón de transcripción inversa 5X | 4.0 |
| dNTP (250 μ M) | 1.6 |
| RNA total (libre de DNA) | 2.0 (0.1 μ g/ μ L, diluido en el momento de ser usado.) |
| H-T ₁₁ M* (2 μ M) | 2.0 |
| Total | 19.0 |

*(la M puede ser G, A o C)

2. Programar su termociclador a 65° C por 5 minutos → 37° C por 60 minutos → 75° C por 5 minutos → 4° C. Cuando los tubos de RCP tengan 10 minutos a 37° C, parar el termociclador y añadir 1 µL de transcriptasa inversa MMLV a cada tubo (usar P10 o una pipeta Gilford con micropuntas para evitar errores en la carga de pequeños volúmenes) y mezclar bien golpeando con el dedo antes de continuar la incubación. Al final de la transcripción inversa, centrifugar brevemente cada tubo para recoger la condensación. Poner los tubos en hielo para la RCP o guardar a -20° C para su uso posterior.

Nota: El período de incubación de 75° C está previsto para inactivar la transcriptasa inversa MMLV sin desnaturalizar el dúplex mRNA/ cDNA, de manera que se evitan errores de apareamiento iniciales de los cebadores en la mezcla de reacción de la RCP.

El control de RNA (libre de DNA) es el RNA total aislado de fibroblastos transformados de embrión de rata y está previsto que sirva como un control de la amplificación de mRNA dependiente de la transcripción inversa y con cualquiera de las combinaciones de cebadores. El control de RNA debe ser diluido justo antes de su uso, por adición de 9 µl de H₂O_d o agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC.)

- RCP

1. Descongelar los componentes indicados abajo y ponerlos en hielo. Preparar las reacciones de RCP a temperatura ambiente en tubos de reacción de paredes finas. Los tubos de paredes gruesas son una de las fuentes principales de falsos positivos debido a transferencia de calor desigual entre los tubos.

20 µL de volumen final para cada combinación

de pares de cebadores

µL

| | |
|---|-------|
| H ₂ O | 10.0 |
| tampón de RCP 10X | 2.0 |
| dNTP (25 μM) | 1.6 |
| cebador H-AP (2 μM) | 2.0 |
| H-T ₁₁ M (2 μM) | 2.0 |
| mezcla de transcripción inversa del paso 1 (debe contener el mismo H-T ₁₁ M usado para la PCR) | 2.0 |
| α-[³³ P]dATP (2 000 Ci/mmol) | 0.2 |
| Taq DNA polimerasa (Qiagen) | 0.2 |
| | <hr/> |
| Total | 20.0 |

Nota: Puede usarse 1 μl de α-[³⁵P]dATP (1 000 Ci/mmol) en lugar de α-[³³P]dATP (2 000 Ci/mmol). Ajustar el volumen total con H₂O.

2. Mezclar bien por carga y descarga sucesivas con pipeta. Adicionar 25 μL de aceite mineral si es necesario. RCP a 94° C por 30 segundos → 40° C por 2 minutos → 72° C por 30 segundos, por cuarenta ciclos seguidos por 72° C por 5 minutos → 4° C. (Para termocicladores Perkin Elmer 9 600 se recomienda que la temperatura de desnaturalización sea reducida a 15 segundos y que los restantes parámetros permanezcan sin cambio.)

Electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida a 6 %.

1. Preparar un gel desnaturalizante de poliacrilamida a 6 % en tampón TBE. Dejar polimerizar por al menos 2 horas antes de su uso. Poner a correr el gel durante 30 minutos. Es crucial que la urea en los pozos sea completamente lavada justo antes de correr sus muestras. Para una mejor resolución, lavar cada cuatro a seis pozos durante la adición de las muestras, mientras se trata de no afectar las muestras que ya han sido adicionadas.

2. Mezclar 3.5 μl de cada muestra con 2 μl de colorante de corrida e incubar a 80° C por 2 minutos inmediatamente antes e adicionarlas a un gel de secuenciación de DNA al 6 %. Poner a correr durante 3.5 horas a 60 watts (el voltaje no debe exceder de 1700) hasta que el colorante de xileno (de menor movilidad en el gel) alcance el borde inferior del gel. Apagar la fuente de energía y secar el gel sobre un papel 3M. Cubrir el gel con una envoltura plástica y secarlo al vacío en un secador de geles a 80° C por 1 hora. (Debido a que el DNA es sensible a ácidos, no fijar el gel con metanol/ ácido acético debido a que esto puede conducir a problemas en la reamplificación.)

Reamplificación de las sondas de cDNA.

1. Orientar el autorradiograma y el gel seco con tinta radioactiva o con un corte en un extremo antes de exponerlos a la película de rayos-X.
2. Después de revelar la película (el tiempo de exposición puede variar desde toda la noche hasta 72 horas), orientar el autorradiograma con el gel. Marcar las bandas de interés por perforación a través de la película con una aguja en los cuatro extremos de cada banda de interés. (Manipular el gel seco con guantes y guardarlo entre dos hojas de papel limpio.) Extraer las bandas marcadas con un bisturí limpio.
3. Poner los fragmentos de gel en tubos y añadir tampón de RCP 2X.
4. Hervir los tubos con la tapa bien cerrada (con parafilm) durante 15 minutos.
5. Centrifugar durante 2 minutos para recoger la condensación y precipitar los desechos de gel.
6. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga. Añadir 10 μL de acetato de sodio 3M, 5 μL de glucógeno (10 mg/mL) y 450 μL de EtOH a 100%. Dejar durante 30 minutos en hielo seco o en un congelador de -80° C.

7. Centrifugar durante 10 minutos a 4° C para precipitar el DNA. Eliminar el sobrenadante y lavar el precipitado con 200 μ l de EtOH frío (temperatura de hielo) a 85% (el DNA puede perderse si se usa EtOH menos concentrado.) Centrifugar brevemente y extraer el etanol residual.

8. Disolver el precipitado en 10 μ L de H₂O y usar 4 μ L para la reamplificación. Guardar el resto a -20° C.

9. La reamplificación debe ser realizada con el mismo juego de cebadores y en las mismas condiciones de la RCP, excepto que las concentraciones de dNTP deben ser de 20 μ M (usar la mezcla de dNTP de 250 μ M) en lugar de 2 a 4 μ M y que no se añaden isótopos. Se recomienda que el volumen de la reacción de reamplificación sea de 40 μ L.

| | μ l |
|------------------------------------|---------|
| H ₂ O | 20.4 |
| tampón de la Taq DNA polimerasa 2X | 4.0 |
| dNTP (250 μ M) | 3.2 |
| cebador H-AP (2 μ M) | 4.0 |
| H-T ₁₁ M (2 μ M) | 4.0 |
| molde de cDNA del paso 8 | 4.0 |
| Taq DNA polimerasa (Qiagen) | 0.4 |
| Total | 40.0 |

Se corren treinta microlitros de las muestras de RCP en un gel de agarosa a 1.5 % y se tiñen con bromuro de etidio. Si usted falla en reamplificar la sonda de cDNA en una primera ronda de RCP, puede usar 4 μ l de una dilución 1:100 de la muestra de la primera ronda de RCP como molde para otra amplificación de 40 ciclos. Aproximadamente 90 % de las sondas debe ser visible en geles de agarosa después de la primera ronda de RCP. Guardar el resto de las muestras de RCP a -20° C para clonación.

10. Verificar que la talla de los productos de RCP reamplificados se corresponden con sus tallas en el gel de secuenciación del DNA. Extraer la sonda de cDNA reamplificada del gel de agarosa mediante un sistema QIAEX de Qiagen.
 11. Analizar la identidad de la sonda por hibridación Northern antes de la clonación o de forma más eficiente por hibridación inversa Northern después que la sonda ha sido clonada (PCR-TRAP Cloning System and ReversePrime cDNA labeling kit de la Corporación GenHunter.) El segundo de estos métodos permite la verificación simultánea de múltiples sondas.
 12. Clonar la sonda de cDNA usando PCR-TRAP Cloning System de la Corporación GenHunter.
 13. Analizar la identidad de la sonda de cDNA clonada mediante hibridación Northern o, de forma más eficiente, por hibridación inversa Northern, y secuenciar la sonda de cDNA clonada mediante AidSeq Kit C de la Corporación GenHunter.
 14. Clonar el cDNA de talla completa mediante su localización en una genoteca de cDNA siguiendo el procedimiento estándar.
- Peng Liang and Arthur B. Pardee: Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction (1992) Science 257: 967-971.

ENSAYO DE LINFOPROLIFERACIÓN A PARTIR DE CÉLULAS HUMANAS DE SANGRE PERIFÉRICA

Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica.

- Punción de la vena cubital con extracción de sangre en condiciones asépticas. Descargar jeringuilla en tubo de 50ml con Heparina (12-15 UI/mL de sangre). Mezclar por inversión del tubo.
- Diluir la sangre heparinizada 1/2 en PBS, solución salina 0.9% o solución de Hank modificada (sin Calcio ni Magnesio).
- Montar sangre diluída sobre Medio de separación de CMP Ficoll-Hypaque (Sigma) (densidad =1.077g/ml) a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 800g(2500rpm) durante 30 minutos a 22-25 °C .
- Extraer con pipeta Pasteur el anillo de células mononucleares periféricas (CMP) y dispensarlo en tubos 12-15 mL fondo redondo (o cónico). Completar el tubo con solución de Hank modificada a 4°C .
- Centrifugar a 400g (1800 rpm) 10 minutos a 4°C.
- Decantar sobrenadante, resuspender el pellet celular gentilmente y completar el tubo con solución de Hank modificada.Repetir dos lavados en iguales condiciones.
- Resuspender el pellet en 2ml de RPMI-1640 suplementado (STF 10%, Glutamina 100mM, Peni-estrepto 100UI-100ug/mL).
- Conteo de células en cámara de Neubauer con colorante Turk violeta. Medir viabilidad con Tripán azul. Se preparan diluciones 1/20 de las células con el colorante. Contar 4 cuadrantes externos de la cámara, luego aplicar la fórmula:

$$\text{Cel/ml de medio} = \frac{\# \text{ Cel. Contadas} \times \text{Dilución en colorante} \cdot 10^4}{\# \text{ cuadrantes contados}}$$

Ensayo de linfoproliferación:

- Ajuste de células a la concentración de 1×10^6 /ml en medio RPMI-1640 suplementado.
 - Dispensar 100uL de células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos, fondo en U(Costar/Falcon).
 - Añadir antígenos (virus dengue purificado a partir de cerebro de ratón lactante) o mitógenos como PHA o medio en control de síntesis espontánea por triplicados, a concentraciones deseadas, en un volumen de 100 uL/pozo.
 - Incubar placas a 37° C, atmósfera húmeda, 5% de CO_2 durante 6 días para antígenos y 3 días para mitógenos.
 - Dar pulso con timidina tritiada 6 horas antes de completar el tiempo de incubación a 1uCi/pozo.
 - Tras completar el tiempo de incubación congelar la placa a -70° C hasta su cosechamiento.
 - Cosechar las células con Cosechador automático (Cell harvester, Skatron)sobre papel de fibra de vidrio(Skatron).
 - Poner a secar el papel a temperatura ambiente durante toda la noche, a 37° C durante 3 horas o a 60° C durante durante 30 minutos.
 - Dispensar los discos en papel de fibra de vidrio en viales de centelleo.
 - Añadir Coctel líquido de centelleo (Scitran)1mL en viales pequeños o 5ml en viales grandes.
 - Contar en contador de centelleo líquido(LKB) a 1 min./vial.
 - Cálculo del I.E.: $IE = \frac{\text{cpm media del triplicado}}{\text{cpm media síntesis espontánea}}$
- Bojum A. (1968) Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose dextran and Ficoll as erythrocyteaggregating agents. Scand J. Clin Lab. Invest 21 supplement 97, 31-50.

ENSAYO DE LINFOPROLIFERACIÓN A PARTIR DE ESPLENOCITOS DE RATÓN

Aislamiento de esplenocitos

- Extracción de los bazos en condiciones asépticas (incisión lateral izquierda y disección del órgano) .
- Obtención de los esplenocitos por perfusión o macerado de los bazos con solución de Hank modificada a 4°C ..
- Completar a 15 ml con solución de Hank modificada a 4°C .
- Centrifugar a 400g (1800 rpm) 10 minutos a 4°C.
- Decantar sobrenadante, resuspender el pellet celular gentilmente.
- Lisis de eritrocitos por choque osmótico con tampón de hemólisis (NH₄Cl 0.15M, Tris 9.9mM pH 7.2) a 4°C por 10 minutos.
- Lavar por centrifugación a 400g (1800 rpm) 10 minutos a 4°C. con solución de Hank modificada.Repetir dos lavados en iguales condiciones.
- Resuspender el pellet en 2ml de RPMI-1640 suplementado(STF 10%, Glutamina 100mM, Peni-estrepto 100UI-100ug/ml).
- Conteo de células en cámara de Neubauer con colorante Turk violeta. Medir viabilidad con Tripán azul. Se preparan diluciones 1/20 de las células con el colorante. Contar 4 cuadrantes externos de la cámara, luego aplicar la fórmula:

$$\text{Céls/ml de medio} = \frac{\# \text{ céls. contadas} \times \text{dil. en colorante} \times 10^4}{\# \text{ cuadrantes contados}}$$

- Ajuste de células a la concentración de 2x10⁶/ml en medio RPMI-1640 suplementado.
- Dispensar 100ul de células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos, fondo en U(Costar/Falcon).

- Añadir antígenos o mitógenos (o medio en control de síntesis espontánea) por triplicados, a concentraciones deseadas, en un volumen de 100 ul/pozo.
- Incubar placas a 37⁰ C, atmósfera húmeda, 5% de CO₂ durante 4 días para antígenos y 3 días para mitógenos.
- Pulso con 1uCi/pozo de timidina tritiada (Amershan) por 18 horas.
- Añadir Timidina tritiada a la concentración de 1μCi/pozo.
- Incubar 6 horas.
- Congelar a -70⁰C.
- Descongelamiento.
- Cosechamiento
- Conteo de cpm

Cálculo del I.E.:
$$IE = \frac{\text{cpm media del triplicado}}{\text{Cpm Síntesis espontánea}}$$

- Watsom J. (1979) Continuous proliferation of murine antigen-specific helper T lymphocytes in culture. J. Exp. Med. 150, 1510-1519.

AISLAMIENTO DE MONOCITOS A PARTIR DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (C.M.S.P.)

- Preparación de gelatina al 3% en agua . Seguidamente esterilizar y disolver por autoclave.
- Colocar sobre los frascos 10mL e incubarlos toda la noche a 50⁰C.
- Aislar las CMSP según el método de Boyum,A. (Isolation of leucocytes from human blood. Isolation of mononuclear cell by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. (SCAND.J Lab. Invest **1968**; 21 (97): 77-89).
- Colectar el anillo así como el plasma.
- Añadir 15 mL de plasma .
- Incubar 1hora a 37⁰C.
- Absorber el plasma y lavar dos veces con RPMI sin suplementar (10mL /frasco).Observar la limpieza al Microscopio.
- Colocar las CMSP en RPMI al 10%STF
- Incubar de 60-90 minutos, 37⁰C, 5%CO₂.
- Extraer células que no se pegaron: Lavar con RPMI 2 veces y chequear al microscopio
- Añadir sln salina fría (20 mL).
- Incubar 5
- Centrifugar 7 minutos 4⁰C
- Resuspender en RPMI al 2% de STF, si el objetivo siguiente es infectarlas (la infección se realiza empleando la técnica ya descrita de Shell vial).
- Ajustar a 500x 10⁶ células minutos a 4⁰C.
- Desprender
- Tomar todo

Detección de Citoquinas Intracelulares y Marcadores Celulares de Superficie por Citometría de Flujo en cultivos de Células mononucleares murinas estimuladas con antígenos/mitógenos.

Bloqueo de Receptores FC para disminuir marcaje fluorescente no-específica.

- Se emplea un Ac anti receptor FC \square II/III, 1 μ g/10⁶ en 100 μ L de tampón de marcaje (PBS-Dulbecco, STF 1% inactivado, Azida Sódica 1%, pH 7.4-7.6) filtrado; (TM)
- Incubar 30 minutos a 4 °C.

Marcaje de Antígenos de Superficie.

- Depositar 10⁶ células en 100 μ L de Tm en tubos precubiertos con ACM específico conjugado a fluorocromos(0,5 μ g)
- Incubar 30 minutos a 4 °C .
- Lavar 2 veces con TM 1 mL/tubo 250 x g, 10 minutos.
- Desagregar por vortex.

Fijado y Permeabilización de las células.

- Resuspender las células en 200 μ L de solución de fijado y permeabilización.
- Incubar 20 minutos a 4 °C.
- Lavar en iguales condiciones

Marcaje de citoquinas intracelulares.

- Depositar 10⁶ células en 100 μ L de Tm en tubos pretratados con ACM específico conjugado a fluorocromos (5 μ g)
- Incubar 30 minutos a 4 °C
- Lavar en las mismas condiciones

Análisis Citométrico.

- Control de marcaje para citoquinas intracelulares: Después de paso 3.
 - Depositar 10⁶ células en 50 μ L de Tm en tubos pretratados con ACM específico NO conjugado a fluorocromos (5 μ g), del mismo clon del conjugado.
 - Añadir el ACM específico conjugado a fluorocromos (5 μ g) en 50 μ L.
 - Incubar 30 minutos a 4 °C
 - Lavar en idénticas condiciones.
-
- Haynes J. L. (1988) Principles of flow cytometry. Cytometry supplement 3: 7-17.
 - Prussin C. (1992) Cytokine flow cytometry : Understanding Cytokine Biology at the single cell level. Journal of Clinical Immunology vol 17 No 3.

ENSAYO DE INMUNOAMPLIFICACIÓN

La patogénesis de la fiebre hemorrágica del dengue con síndrome de choque por dengue (FHD/SCD) es, probablemente, un proceso multifactorial complejo. Halstead et al., basados en observaciones epidemiológicas hechas en el Sudeste asiático, propusieron en 1970 que los anticuerpos neutralizantes heterólogos derivados de una infección primaria podrían incrementar, en los individuos susceptibles, la replicación de un segundo serotipo infectante y, consecuentemente, tendrían lugar procesos que desencadenan la FHD/SCD. El fenómeno anteriormente enunciado se conoce como incremento en la replicación viral dependiente de anticuerpos (ADA). Aunque el fenómeno de ADA no ha sido demostrado *in vivo*, se han desarrollado ensayos de inmunoamplificación *in vitro*, como el que a continuación aparece.

Materiales:

- ⇒ Células K₅₆₂.
- ⇒ Virus: dengue 2 (D2) previamente titulado
- ⇒ Anticuerpos: sueros humanos con anticuerpos neutralizantes contra el virus dengue 1 (D1), sueros hiperinmunes o líquidos ascíticos hiperinmunes producidos contra D1 en animales de laboratorio.

Preparación de las células K₅₆₂:

- Las células K₅₆₂ se desprenden, por agitación vigorosa, de la superficie de frascos de cultivos celulares de 150 cm² y se centrifugan. Estas células se resuspenden en medio de mantenimiento RPMI con 2 % de suero de ternera fetal y 2 mM de glutamina, para obtener una suspensión celular con una concentración de 2x10⁵ células/mL.

Preparación de las mezclas de reacción

- Se hacen diluciones seriadas de los sueros, en medio RPMI, desde 1/10 hasta 1/3906250, y se ponen 50 µl de cada dilución de sueros en placas de 96 pozos. A una fila de esta placa se añaden 50 µL de idénticas diluciones de un suero que contenga anticuerpos inmunoamplificadores (control positivo de suero) y a otra fila se añaden 50 µL de RPMI (control de virus).
- Se diluye el virus D2 de manera tal que al ser añadido a las células K₅₆₂ quede en una multiplicidad de 0.0006. Se adicionan 50 µL de esta dilución de virus a cada uno de los pozos que contienen diluciones de sueros o medio RPMI.
- Se incuban las mezclas de virus-suero y las de virus-RPMI, durante 1 hora, a 37° C.
- Se añaden 100 µL de células K₅₆₂ y se incuban las mezclas de reacción durante 48 horas, a 37° C y 5 % de CO₂. Pasado este tiempo se congela la placa a -70° C.

Titulación de las mezclas de virus-suero en células BHK21.

- Cada mezcla virus-suero o virus-RPMI debe ser titulada, sin diluir y por duplicado, en células BHK21 (para el método de titulación ver p. 34.)

Se considera que se ha producido ADA si:

$$\frac{x_1 - x_0}{\sqrt{x_1 + x_0}} \geq 1.96$$

x_1 – número de placas del virus con suero

x_0 – número de placas del control de virus