



ORGANIZACION PANAMERICANA DE LA SALUD

Oficina Sanitaria Panamericana, Oficina Regional de la Salud

ORGANIZACION MUNDIAL DE LA SALUD

ÁREA de TECNOLOGÍA Y PRESTACIÓN DE SERVICIOS DE SALUD

***UNIDAD DE MEDICAMENTOS ESENCIALES VACUNAS Y TECNOLOGIA DE
SALUD***

SERVICIOS DE LABORATORIO Y SANGRE

***MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA EL
DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO DE LAS
INFECCIONES RESPIRATORIAS AGUDAS DE
ETIOLOGÍA VIRAL***

IPK

Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kouri”

Noviembre del 2003

PREFACIO

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) constituyen la principal causa de morbilidad y mortalidad en el mundo. Particularmente en la región de las Américas, las IRA se ubican entre las cinco primeras causas de defunción en menores de 5 años y representan la causa principal de enfermedad y consulta médica. Se estima que diariamente se producen 300 muertes en menores de un año producto de esta entidad.

Entre los agentes etiológicos de las IRA, los virus ocupan un lugar prioritario siendo el virus Influenza el de mayor importancia médica seguido por el virus Sincitial Respiratorio. Las IRA pueden ser causadas también por otros agentes virales como adenovirus, parainfluenza, rinovirus, hantavirus y otros.

Recientemente, se ha descubierto un nuevo coronavirus causante de la Neumonía Atípica Severa, que demuestra una vez mas la necesidad de contar con métodos de diagnóstico sensibles, específicos y eficaces para el estudio de las IRA.

Teniendo en cuenta la importancia de estas entidades, investigadores del Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí bajo el auspicio de la Organización Panamericana de la Salud y el Instituto Carlos III de España, afrontaron la tarea de preparar un manual dirigido a microbiólogos, biólogos y virólogos interesados en el tema.

En este manual, se presenta en forma amena y abreviada los principales métodos (serológicos, virológicos y moleculares) que se utilizan en la actualidad en el diagnóstico de laboratorio de los principales agentes virales causantes de IRA.

Esta obra dirigida, fundamentalmente a profesionales y técnicos de nuestra región servirá de guía de trabajo para el estudio de estas entidades.

Prof. María G. Guzmán
Jefe Dpto. Virología
Instituto Medicina Tropical
Habana, Cuba

AGRADECIMIENTOS:

La Organización Panamericana de la salud (OPS) quiere dejar constancia de su agradecimiento al Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri" por la confección de este Manual de Procedimientos para Diagnóstico de Laboratorio de las Infecciones Respiratorias Agudas de etiología viral. Pretendemos que este documento pueda ser utilizado para el desarrollo de manuales de procedimientos en cada una de las instituciones de la región.

Este agradecimiento se hace extensivo a sus autores: Dra, Clara Savón, Prof. Angel Goyenechea, Dra. Belsy Acosta, Dra. Suset Oropesa, Lic. Odalys Valdés MsC., Lic. Grehete González. MsC., Lic. Lídice Palerm, Lic. Alexander Piñón.

Del mismo modo, la OPS desea manifestar su reconocimiento a los que colaboraron a la feliz culminación de este manual, Prof. Alina Llop, Prof. Maria G. Guzmán, Lic. Gilda Torano, Lic. Isis Tamargo, Lic. Lester González, Tec. Guelsy González, Tec. Barbara Hernández y la Sra. Lucia Iturralde.

De forma especial también agradece al Instituto de Salud Carlos III la exhaustiva revisión del documento representada por la Dra. Pilar Pérez Breña.

La Organización Panamericana de la Salud dará consideración favorable a las solicitudes de autorización para reproducir o traducir, total o parcialmente, este manual, siempre que no sea con fines de lucro. Las solicitudes pueden dirigirse a la Unidad Medicamentos Esenciales, Vacunas y Tecnología de la Salud, Servicios de Laboratorio y Sangre de la Organización Panamericana de la Salud/Organización Mundial de la salud, 525 Twenty-third Street, N.W., Washington, D.C. 20037 EUA.

AUTORES

Clara Savón Valdés PhD
Lic. en Ciencias Biológicas
Dr. en Ciencias Biológicas
Investigador Titular

clara@ipk.sld.cu

Angel Goyenechea Hernández MD.
Dr. en Medicina.
Especialista de 2 do Grado en Micro biología
Profesor e Investigador Titular

goyenechea@ipk.sld.cu

Suset Oropesa Fernández MD
Dr. en Medicina
Especialista de 2do grado en Microbiología
Profesor e Investigador Auxiliar

s.oro@ipk.sld.cu

Odalys Valdés Ramírez MsC
Lic en Bioquímica
Master en Virología
Investigador Agregado

odalys@ipk.sld.cu

Belsy Acosta Herrera MD
Dr. en Medicina
Especialista de 1er Grado en Microbiología

betsy@ipk.sld.cu

Grehete González Muñoz MsC
Lic. en Microbiología
Master en Virología
Investigador Agregado

greg@ipk.sld.cu

Lisette Pérez Santos MsC
Lic. en Microbiología
Master en Virología
Investigador Agregado

lisette@ipk.sld.cu

Lidice Palerm Caraballo
Lic. en Microbiología

lpalerm@ipk.sld.cu

Alexander Piñon Ramos
Lic. en Microbiología

alexpr@ipk.sld.cu

INDICE GENERAL

I.- Situación Epidemiológica de la Región	15
II.- Criterios de Definición de Casos de IRA	18
III.- Algunas consideraciones sobre la Bioseguridad Biológica en el Laboratorio	19
I.1.-Nivel I de Bioseguridad (básico)	19
I.2.-Nivel II de Bioseguridad (básico)	19
I.3.-Nivel III de Bioseguridad (contención)	19
I.4.-Nivel de Bioseguridad IV (máxima contención)	19
I.5.-Laboratorios Básicos. Niveles I y II	20
I.6.-Código de Prácticas	20
1.6.1.-Acceso	21
I.6.2.-Protección del personal	21
I.6.3.-Procederes	22
I.7.-Laboratorio de Contención: Nivel de Bioseguridad III	22
IV.- Toma de Muestra, Transporte y Conservación	
I.-Muestras para el Aislamiento Viral	23
I.1.-Aspirados Nasofaríngeos	23
I.2.-Hisopados o Exudados Nasofaríngeo	23
I.3.-Lavados Faríngeos o Gargarismos	24
I.4.- Esputo	24
1.5.- Aspirado Bronquial	25
1.6.-Muestra de Necropsia	25
I.7.-Hisopado Faríngeo-Conjuntival	25
II.-Factores que Influyen en el Aislamiento Viral	26
II.1.- Tiempo	26
II.2.- Temperatura	26
II.3.-Medios de Transporte Viroológico	26
III.- Muestras para el Diagnóstico Rápido	28
IV.-Muestras para el Diagnóstico Serológico	28
V.-Transporte y Conservación de Muestras Clínicas	29
V.1.-Requerimientos para el Transporte de Muestras clínicas	29
V.- Cultivos Celulares empleados para los aislamientos de Virus Respiratorios	
Introducción	31
I.-Células NCI-H292	32
I.1.-Preparación de las Células NCI-H292	32
II.-Células Hela	33

II.1.-Preparación de las Células Hela	33
III.-Células Hep-2	33
III.-Preparación de las Células Hep-2	33
IV.-Células Vero	34
IV.1.-Preparación de las Células Vero	34
V.- Células MDCK-L	34
V.1.-Preparación de las Células MDCK-L	35
VI .-Células MRC-5	35
VI .- Preparación de las Células MRC-5	35
VI.- Técnicas Generales de Diagnóstico	
I.- Inmunofluorescencia	37
I.1.-Principios	37
I.2.-Microscopio de Fluorescencia	38
I.3.-Inmunofluorescencia Directa	41
I.3.1.-Procedimiento	41
I.4.- Inmunofluorescencia Indirecta	42
I.4.1.-Procedimiento	42
I.5.- Lectura e Interpretación de los Resultados	44
II.-Detección simultánea de los virus : Influenza A,B y C, Virus Sincitial Respiratorio A y B y Adenovirus en muestras clínicas por ensayo múltiplex RT-PCR-anidada	45
II.1Extracción de ARN Viral en Muestras Clínicas Respiratorias	47
II.2.-Primera Reacción de amplificación: RT/PCR	48
II.3 Segunda Reacción de amplificación	49
II.4.- Valoración de los Productos amplificados	51
II.5 Precauciones para evitar contaminaciones	51
II.6.-Preparación del Control Interno	52
II.7.-Oligonucleótidos utilizados	53
II.8.- Soluciones	54
VII.- Virus Influenza	
Introducción	55
I.-Aislamiento de los Virus Influenza en Cultivos celulares	57
I.1.- Aislamiento en Cultivos celulares	58
I.1.1.-Procedimiento	59
I.1.1.1.-Inoculación en los tubos de Cultivo Celular	59
I.1.1.2.-Cosecha	60
I.1.1.3.-Preparación de la Solución de eritrocitos al 0.2%	61
I.2.-Aislamiento en huevos embrionados	61
I.2.1.-Preparación de reactivos	62

I.2.2.-Procedimiento	62
I.2.3.- Cosecha	63
II.-Hemaglutinación e Inhibición de la Hemaglutinación	66
II.1.-Caracterización antigénica de los Virus de Influenza	66
II.1.1.-Estuche de reactivos de la OMS	68
II.1.2.-Soluciones	69
II.2.1.- Tratamientos de los antisueros de referencia para la inactivación de inhibidores no específicos	70
II.3.-Titulación de los antígenos controles y aislamientos por HA	72
II.4.- Preparación del antígeno para la prueba de IH	75
II.5.-Identificación de los aislamientos a partir de muestras clínicas	76
III.-Diagnóstico Serológico por Inhibición de la Hemaglutinación	81
III.1-Procedimiento	81
III.1.1.-Tratamiento de los sueros	82
III.2- Prueba de Inhibición de la Hemaglutinación	82
III.3.- Tratamientos alternativos de los sueros para el diagnóstico serológico	86
III.3.1 Tratamiento de los sueros con Enzima Destructora de los Receptores	86
III.3.3.-Tratamiento de los sueros con Peryodato de Potasio	87
IV.-Tipificación y Subtipificación de los virus de influenza mediante la Técnica de Inmunoperoxidasa	88
IV.1 Preparación de los reactivos	90
IV.1.1.- Procedimiento	91
IV.1.2 Interpretación	93
V.- Identificación de los Virus de Influenza Mediante Transcripción Reversa seguida de Reacción en Cadena de la Polimerasa	95
V.1.-Extracción de ARN	97
V.2.-Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa	98
V.3.-Detección del Producto Amplificado	98
VIII.- Virus Respiratorio s Sincitial Humano	
Introducción	100
I.-Aislamiento de Virus Respiratorio Sincitial Humano	102
I.1.-Procedimiento	103
I.2.-Medio de Mantenimiento para el aislamiento de VRSH en Hep-2	104
II.-Titulación de Virus Respiratorio Sincitial Humano por método en placa	105
II.1.-Procedimiento	106
II.2.-Lectura y Cálculo del Título Viral	107
II.3.- Cálculo de la dilución de trabajo de virus a utilizar	107
II.4.-Medios y Soluciones	107

III.-Detección de Antígenos Precoces Fluorescentes	108
III.1.-Preparación del Cultivo	109
III.1.2.-Interpretación de la Prueba	111
III.2.-Soluciones	111
IV.-Caracterización Antigénica de los aislados de Virus Respiratorio Sincitial Humano	112
IV.1.- Multiplicación de los virus aislados	114
IV.2.- Preparación de los extractos Virales	114
IV.3.- ELISA para Caracaterización Antigénica	115
IV.4.- Interpretación de los resultados	115
IV.5.-Soluciones	116
V.- Caracterización de Virus Respiratorio Sincitial Humano (VRSH) mediante RT-PCR anidada para los genes N y F	117
V.1.-Procedimiento	119
V.2.-RT/PCR –Anidada de Tipado para el Gen F	120
V.2.1 Primera Amplificación	120
V.2.2.-Segunda Amplificación	121
V.3.-Análisis directo de los productos de PCR por Electroforesis	121
VI.-Caracterización genotípica de Cepas aisladas de Virus Sincitial Respiratorio por Polimorfismo de longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP)	123
VI.1.- Enzimas de Restricción para el análisis del gen N	124
VI.2.- Esquema de los fragmentos digeridos por enzimas de restricción del gen N	124
VI.3.- Procedimiento : Digestión Enzimática	124
VI.4.- Análisis de restricción para el Gen F	125
VI.5.-Esquema de los fragmentos digeridos por enzima de restricción del Gen F	126
VI.6.-Interpretación de los resultados	126
VII.-Diagnóstico Serológico Respiratorio. Sincitial Humano	127
VII.1.- Sistema UltramicroElisa para Detección de Anticuerpos de tipo IgG al VirusVirus Respiratorio Sincitial Humano	127
VII.2.-Preparación de Antígeno de UMELISA del Virus Respiratorio Sincitial Humano	128
VII.2.1.-Procedimiento	129
VII.3.-Ultramicroelisa de doble anticuerpo para la determinación de anticuerpos IgG al Viru Respiratorio s Sincitial Humano	130
VII.3.1.-Procedimiento	131
VII.3.2.- Criterio de Lectura	132
VII.4.- Soluciones	132
IX.- Parainfluenza Humano	

Introducción	134
I.-Aislamiento en cultivos de Células del Virus Parainfluenza Humano	136
I.1.- Procedimiento	138
II.- Hemadsorción	139
II.1.-Obtención y Conservación de sangre de Curiel	140
II.2.-Soluciones	141
II.3.-Preparación de la suspensión de eritrocitos de curiel	141
III.-Hemaglutinación	142
III.1.- Soluciones	143
III.2.- Procedimiento	143
IV.-Inhibición de la hemaglutinación	144
IV.1.-Soluciones	144
IV.2.-Preparación del lote de virus	145
IV.2.1 Producción de Antígeno	145
IV.2.2.- Titulación de los antígenos	146
IV.2.3.-Dosis de Trabajo del antígeno	147
IV.3.-Tratamiento de los sueros	148
IV.4.- Técnica de IH por Micrométodo	148
V.- Detección de Virus Parainfluenza humano mediante la Reacción en Cadena de la Polimersa (PCR)	150
V.1.-Extracción de ARN	152
V.2.-Transcripción reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa	153
V.3.-PCR Anidada	154
V.4.-Detección del Producto Amplificado	154
V.5.- Soluciones	155
X.- Adenovirus	
Introducción	157
I.-Colección, transporte y conservación de las muestras	159
II.-Diagnóstico Rápido	159
II.1.-PCR Múltiple	159
II.2.-Inmunofluorescencia Indirecta	159
III.-Aislamiento Viral	159
III.1.-Aislamiento	160
III.2.-Procedimiento	160
IV.-Identificación	161
V.-Caracterización en Subgrupos(A-F) y /o Grupos Hemaglutinantes (I-IV)	161
V.1.-Identificación en subgrupos de los Adenovirus Aislados.PCR-Múltiplex	162
V.1.1.- Extracción de ADN Viral	163

V.1.2.-Amplificación y detección	164
V.1.3.-Soluciones	165
V.2.-Hemaglutinación	166
V.2.1.-Soluciones	166
V.2.2.-Preparación de los antígenos hemaglutinantes	167
V.2.3.-Preparación de la suspensión de eritrocitos al 0.4%	167
V.2.4.-Procedimiento	167
V.2.5.- Interpretación	168
VI.- Tipificación	169
VI.1.-Análisis de restricción del genoma viral	169
VI.I.1.-Digestión con endonucleasas de restricción	170
VI.1.2.-Procedimiento	171
VI.2.-Prueba de Neutralización	171
VI.2.1.-Titulación de Adenovirus para su Serotipificación	173
VI.2.1.1.-Procedimiento	173
VI.2.1.2.-Análisis de resultados	175
VI.2.2.-Titulación por Neutralización del suero Hiperinmune para determinar la dosis de trabajo en la serotipificación de los aislamientos	176
VI.2.2.1.-Procedimiento	177
VI.2.2.2.-Análisis de los resultados	178
VI.2.3.-Serotipificación de los aislamientos	180
VII.- Diagnóstico Serológico de los Adenovirus	182
VII.1.- Técnica de Fijación del Complemento	182
VII.2.-Reacción de Fijación del Complemento. Fundamento	183
VII.3.- Preparación de los componentes	183
VII.3.1.-Preparación de la Solución Salina Modificada	183
VII.3.2.-Preparación de los eritrocitos de carnero	184
VII.3.3.-Obtención del Complemento	184
VII.3.3.1.-Procedimiento	185
VII.3.4.-Obtención de la hemolisina	186
VII.3.5.-Antígeno específico y Control de antígeno	186
VII.4.- Desarrollo Esquemático de la Prueba de Fijación del Complemento	188
VII.4.1.- Determinación del Título del Complemento	188
VII.4.1.1.-Procedimiento	189
VII.4.2.-Determinación del Título de la hemolisina	190
VII.5.- Dosis de Trabajo del Complemento frente al antígeno	192
VII.5.1.-Procedimiento	192
VII.6.-Determinación de la Dosis de Trabajo del antígeno	194

VII.6.1.-Procedimiento	194
VII.7.-Prueba Principal	196
VII.7.1.- Procedimiento	197
VII.7.2.-Controles y Procedimiento	198
VII.7.3.-Lectura de la Prueba Principal	199
VII.8.- Tratamiento de los sueros que presentan actividad anticomplementaria	200
VII.8.1.-Tratamiento con Complemento	200
VII.8.2.- Tratamiento con CO₂	200
VII.8.3.-Tratamiento con Calor	201
VII.8.4.-Tratamiento con Cloroformo	201
VII.9.-Sistema Ultramicroanalítico para la detección de anticuerpos IgG a Adenovirus	202
VII.9.1- Preparación de Antígeno para el recubrimiento	203
VII.9.2- Recubrimiento de las placas de UMELISA	203
VII.9.3- Titulación del conjugado	203
VII.9.4- Procedimiento de los sueros a investigar	204
VII.9.5- Soluciones	204
XI.- Rinovirus	
Introducción	206
I-Diagnóstico de laboratorio	207
I.1- Aislamiento	208
I.2- Aislamiento en células de fibroblastos de pulmón humano	209
I.2.1- Procedimiento	209
I.3- Aislamiento en células HeLa	210
I.3.1- Procedimiento	210
I.4- Identificación de virus aislados	211
I.4.1- Efecto citopático y sensibilidad a la temperatura	211
I.4.2- Resistencia a los solventes lipídicos	211
I.4.3- Sensibilidad a ácidos débiles	211
I.4.4- Serotipificación	212
II- Diagnóstico serológico	212
II.1- Prueba de neutralización	212
III- Detección de Ácidos	213
III.1- RT-PCR para Rinovirus	213
III.1.2- Extracción de ARN viral	215
III.1.3- Ensayo de RT	215
III.2- PCR -anidada	216
IV- Análisis de los resultados	217

XII.- Coronavirus	
Introducción	218
I- Coronavirus como agente etiológico (SARS	218
II- Criterios de definición de casos de SARS	219
II.1- Recalificación de los casos	220
II.2- Recomendaciones especiales	221
III- Flujo de trabajo de Coronavirus SARS	222
IV- Diagnóstico de laboratorio	222
IV.1- Muestras útiles para el diagnóstico de Coronavirus SARS	223
IV.2- Reacción en Cadena de la Polimerasa(PCR)	223
IV.2.1- Oligonucleótidos de la Primera reacción de amplificación	224
IV.2.2- Oligonucleótidos de la Segunda reacción de amplificación	224
IV.3- Extracción de ARN viral	224
IV.3.1- Procedimiento	224
IV.4- Primera reacción de amplificación o RT-PCR	225
IV.5- Segunda reacción de amplificación o PCR anidada	226
IV.6- Detección del producto amplificado	227
V- Aislamiento e identificación del Coronavirus SARS	228
V.1- Procedimiento	230
XII.- Hantavirus	
I- Definición de un caso clínico	232
I.1- Clasificación de casos	232
II- Criterios para confirmar el diagnóstico	232
III- Situación Epidemiológica en la Región	232
IV- Aspectos Clínicos	234
IV.1- Diagnóstico Diferencial	234
IV.2- Diagnóstico virológico	235
V- Determinación de anticuerpos humanos IgM por ELISA de captura	235
V.1- Instrucciones especiales	236
V.1.1- Procedimiento	237
V.2- Determinación de anticuerpos IgG por ELISA de captura	238
V.2.1- Instrucciones especiales	239
V.2.2- Procedimiento	240
VI- Detección de Hantavirus mediante (Prueba RT- PCR) y PCR anidada	241
VI.1- Extracción de ARN utilizando el método del Trizol	242
VI.1.2- RT/PCR anidada	242

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

Acido Desoxirribonucleico	ADN
Acido etilen diamino tetracético	EDTA
Acido Ribonucleico	ARN
Adenovirus	AV
Albúmina de Suero Bovino	BSA
Análisis Serológico Automatizado	ANSA
Cantidad Suficiente Para	c.s.p.
Carboximetilcelulosa	CMC
Efecto citopático	ECP
Enzima Destructora de Receptores	RDE
Enzimas de Restricción	ER
Fijación del complemento	FC'
Hemadsorción	Had
Hemaglutinación	HA
Inhibición de Hemaglutinación	IHA
Inmunofluorescencia Indirecta	IFI
Medio Mínimo Esencial	MEM
Microlitro	μL
Mililitro	mL
Milimolar	mM
Molar	M
Napthol Blue Black	NBB
Neutralización	Nt
Organización Sanitaria Panamericana	OPS
Organización Mundial de la Salud	OMS
Ortophenylendiamina	OPD
Parainfluenza virus humano	PIVh
Polimorfismo de longitud de Fragmentos de restricción	RFLP

Reacción en cadena de la polimerasa	PCR
Revoluciones por minutos	r.p.m
Síndrome Respiratorio Agudo Severo	SARS
Sistema ultramicro analítico	Suma
Sistema ultramicroelisa	Umelisa
Solución Tamponada de Fosfatos	PBS
Solución tris Borato EDTA	TBE
Suero Bovino Fetal	SBF
Temperatura Ambiente	TA
Título a punto final	TPF
Transcripción Reversa	TR
Unidades formadoras de placas	ufp
Virus Respiratorio Sincitial Humano	VRSH

I.-SITUACIÓN EPIDEMIOLOGICA EN LA REGION.

Prof. Angel Goyenechea Hernández

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) constituyen un importante problema de salud, tanto por las impresionantes cifras de morbilidad como por el elevado índice de mortalidad que provocan, sobre todo en los países en vías de desarrollo, así como por las afecciones que producen, ausentismo laboral y escolar, necesidades de atención médica, consumo de medicamentos y las afectaciones sociales en sufrimiento y vidas humanas.

En casi todos los países de la Región, incluyendo los desarrollados, la principal causa de consulta pediátrica ambulatoria son las IRA. Estudios realizados han comprobado que entre el 40 y 60 por ciento de las consultas pediátricas y entre el 20 y 40 por ciento de las hospitalizaciones se deben a IRA. Es común que los niños tengan entre 4 y 6 episodios de IRA al año, lo que implica una demanda de elevada atención médica. A su vez existen variaciones estacionales donde el mayor número de casos se dan en las épocas invernales, mientras que en las estaciones más calurosas esta proporción disminuye.

Las IRA son también la principal causa de administración de antibióticos y otros medicamentos a los niños menores de 5 años, la mayor parte de las veces innecesarias e inadecuadas ya que no contribuyen a mejorar los síntomas ni a la curación de la enfermedad. Además que tienen efectos tóxicos potenciales, y fomentan la aparición de resistencia bacteriana.

En la región, durante los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo por cumplimentar los compromisos de la Cumbre Mundial a favor de la Infancia celebrada en 1990, lo que ha motivado que la reducción de la mortalidad por IRA tenga un impacto significativo. A pesar de estos esfuerzos, observamos en el siguiente cuadro las tasas estimadas de mortalidad por 100,000 habitantes, según causas en países seleccionados, donde las IRA están dentro de las cinco causas de mortalidad general en 16 de los 19 países seleccionados y dentro de las dos primeras causas en 18 de los 19 países entre el grupo de las enfermedades infecciosas, lo que indica que en nuestra región las IRA siguen constituyendo uno de los principales problemas de salud.

TASA ESTIMADA DE MORTALIDAD POR 100.000 HABITANTES, SEGÚN CAUSA EN PAISES SELECCIONADOS. REGION DE LA AMERICAS, FINALES DE 1990.

CAUSAS	ARG	BAR	BRA	CAN	CHI	COL	COR	CUB	DOR	ECU	ELS	JAM	MEX	PAN	PAR	PUR	TRT	USA	VEN
Infecciones intestinales	1.9	1.9	6.1	0.2	1.9	5.3	3.4	4.7	6.7	12.4	16.4	7.4	6.9	4.3	12.3	0.2	3.4	0.4	15.2
Enfermedades inmunoprevenibles	0.1	0.4	0.3	0.0	0.1	0.2	0.1	0.0	0.5	0.5	0.3	0.4	0.1	0.2	0.9	0.0	0.2	0.0	0.4
Septicemia	20.6	15.5	7.9	3.2	5.8	4.7	1.6	1.4	3.9	5.9	15.8	4.0	3.2	3.0	6.9	17.4	4.5	8.5	3.1
SIDA	5.4	34.3	8.8	4.5	2.5	4.1	3.6	1.0	11.3	1.2	6.5	0.0	4.3	15.2	0.7	27.3	18.8	7.8	4.2
Neoplasia de estómago	9.0	14.0	7.6	6.9	20.2	11.2	19.0	6.2	2.8	14.8	9.7	12.8	5.0	8.0	3.8	8.3	6.6	4.9	7.6
Neoplasia de colon, recto y ano	15.0	17.0	4.7	20.9	7.2	3.9	5.0	14.8	2.2	2.6	1.9	7.3	2.5	5.0	1.9	13.0	9.2	21.3	3.9
Neoplasia de tráquea bronquio y pulmón	24.1	9.9	9.4	52.3	12.7	7.3	6.3	31.5	4.4	4.3	2.8	11.3	6.6	7.1	3.5	16.2	7.5	57.7	8.6
Neoplasia de mama	14.1	17.2	5.3	17.0	6.7	3.6	4.8	9.5	2.1	2.5	1.8	7.7	3.5	4.1	2.9	9.3	10.2	16.0	4.2
Neoplasia de útero y placenta	6.8	13.0	4.4	3.6	6.6	5.6	5.5	8.5	3.6	6.8	7.9	9.3	5.4	5.6	6.1	3.5	8.6	4.1	6.7
Neoplasia de próstata	9.1	32.9	4.9	12.4	8.2	4.4	5.8	15.8	6.3	4.4	3.6	9.4	3.8	7.6	2.2	15.4	17.5	12.4	5.4
Leucemia, otras neoplasias hematopoyéticas	10.2	15.4	5.8	18.4	8.4	6.0	8.1	10.9	3.0	5.5	3.4	5.7	5.9	7.6	3.7	12.4	8.8	20.9	6.1
Diabetes Mellitus	21.0	88.4	19.6	18.8	15.6	13.7	9.3	18.9	13.3	18.4	15.8	53.8	42.9	19.3	11.0	61.8	92.3	23.8	20.3
Deficiencia nutricional	5.9	8.0	4.8	2.4	2.6	4.6	1.7	2.5	2.7	10.7	4.2	8.0	13.1	9.8	3.3	6.3	8.2	3.2	6.3
Enfermedad hipertensiva	13.1	20.7	14.4	4.7	12.1	14.7	10.4	9.9	13.7	25.4	3.0	32.5	9.8	6.7	6.0	27.0	29.9	16.2	15.5
Enfermedad isquémica del corazón	61.2	77.7	53.6	148.9	58.5	58.3	60.0	161.4	35.4	17.4	44.6	30.4	45.4	50.8	33.5	109.6	134.3	176.2	65.5
Enfermedades cerebro vasculares	68.4	130.4	59.5	53.4	50.9	36.9	29.3	72.8	28.2	26.1	22.0	86.7	26.5	48.9	45.0	46.0	88.6	60.1	35.5
Infección Respiratoria Aguda	27.0	25.9	24.0	26.2	52.2	16.1	15.3	45.1	8.0	22.6	37.4	16.6	19.7	15.4	17.6	33.5	27.6	33.3	16.2
Bronquitis enfisema y asma	4.2	7.2	6.6	6.6	6.4	4.7	6.3	7.3	3.6	7.6	7.7	7.1	8.3	5.8	3.0	12.7	10.8	9.8	4.1
Cirrosis y otras enfermedades hepáticas	8.9	11.6	11.4	7.3	24.7	4.2	10.7	9.1	12.0	12.0	10.9	3.0	25.1	6.6	3.1	21.7	6.3	9.5	7.7
Enfermedades del sistema urinario	17.2	21.3	8.6	11.8	11.8	7.2	8.5	6.0	3.9	13.6	22.9	17.5	11.6	9.5	6.2	24.9	16.3	17.2	7.3
Anomalías congénitas	9.0	4.5	6.4	3.9	8.1	6.1	11.2	5.7	3.9	4.9	6.2	1.8	10.3	13.8	5.6	5.6	6.4	4.9	9.0
Accidentes de transporte	11.8	8.7	20.4	11.2	---	19.1	16.0	---	14.4	16.1	26.1	1.1	15.4	17.8	7.3	17.4	11.5	17.2	20.1
Suicidio	6.3	5.8	4.1	12.9	---	3.3	5.4	---	1.8	4.7	9.1	0.1	3.4	4.8	2.1	8.5	14.0	11.5	4.8
Homicidio	4.5	7.1	24.2	1.6	---	64.0	5.3	---	6.5	14.0	40.2	0.2	13.5	9.4	7.0	24.0	11.2	7.2	14.5
Todas las demás	201.1	161.5	138.4	200.0	126.0	101.0	98.8	136.8	68.7	99.3	118.8	75.6	111.7	95.5	58.8	208.7	143.9	218.3	97.6

Horwitz A. Análisis de Salud Regional. Cap. I p 1 – 59. en .OPS/OMS. La Salud en las Américas. Edición de 2002. Vol.

1.Publicación Científica No. 587.Washington D.C. 20037. E.U.A.

Entre los numerosos agentes etiológicos descritos, los virus se reconocen como los agentes predominantes, señalándose que son responsable de más del 90% de las IRA de las vías respiratorias altas y de una proporción considerable aunque menor de las respiratorias bajas. Dentro de los principales virus que causan esta patología se encuentran los virus influenza A, B y C; virus sincitial respiratorio; adenovirus; rinovirus y los coronavirus. Se ha demostrado que un cuadro clínico puede ser causado por diferentes agentes. Por otra parte el mismo agente es capaz de causar una amplia gama de síndromes. Si bien se postula que en países en desarrollo la etiología bacteriana era la predominante en las IRA, en un estudio multicéntrico internacional coordinado por el Board on Sciences and Technology for International Development of the National Academy of Sciences de los Estados Unidos, se determinó, que la etiología viral está presente en mayor proporción que la bacteriana, variando los porcentajes de identificación viral según el país, encontrándose entre el 17 y 44% de las IRA en niños menores de 5 años.

Referencias:

- 1.- OPS/OMS. La Salud en las Américas. Edición de 2002. Vol. 1 y 2. Publicación Científica No. 587. Washington D.C. 20037. E.U.A.
- 2.-OPS/OMS. Investigaciones Operativas sobre el control de las infecciones respiratorias agudas (IRA) en niños en América Latina y el Caribe. Serie HLT/AIEPI – 3.E. Yehuda Benguigui, Carmen Valenzuela. Editores. Washington D.C. 20037. E.E.U.U. 1998.
- 3.- OPS/OMS. Infecciones Respiratorias en niños. Serie HCT/AIEPI – 1. Yehuda Benguigui, Francisco J. López Antañano, Joao Yunes. Editores. Washington D.C. 20037. 1999.

II.-CRITERIOS DE DEFINICION DE CASOS:

Se define como infección respiratoria aguda (IRA) toda aquella patología de presentación aguda que produce afección del tracto respiratorio tanto superior como inferior.

En los laboratorios de virología se reciben las muestras con la indicación que envía un profesional médico donde se señala el diagnóstico presuntivo del paciente. En el siguiente cuadro presentamos los síndromes clínicos con el agente etiológico viral, que en mayor o menor frecuencia lo producen.

Los virus como causa de infecciones respiratorias agudas:

Síndrome	Agente etiológico viral	
	Mas frecuente	Menos frecuente
Infecciones de vías respiratorias altas (resfrío común).	Rinovirus Coronavirus Adenovirus Parainfluenza 3.	Influenza A o B Parainfluenza 1 o 2 VRSH Enterovirus
Faringitis	Adenovirus Enterovirus	Influenza A VRSH Parainfluenza 1 y 2 Rinovirus Coronavirus
Bronquiolitis	VRSH Parainfluenza 3	Adenovirus Parainfluenza 1 y 2 Influenza A o B Rinovirus
Neumonía	VRSH Parainfluenza 3 Adenovirus Influenza A	Parainfluenza 1 y 2 Rinovirus.
Crup	Parainfluenza 1, 2 y 3	Influenza A VRSH Sarampión

Fuente:Weissenbacber M, Avila M. Los virus como causa de IRA alta y baja en niños: características generales y diagnóstico. Cap 5,89-106. en OPS/OMS. Infecciones Respiratorias en niños. Serie HCT/AIEPI-1. Yehuda Benguigui, Francisco J López, Joao Yunes. Editores Washington D.C 20037. 1999

III.-ALGUNAS CONSIDERACIONES DE IMPORTANCIA SOBRE SEGURIDAD BIOLÓGICA

Dra. Belsy Acosta Herrera

La Organización Mundial de la Salud siempre ha reconocido que la seguridad biológica es una medida internacional de la mayor importancia. El entendimiento de la responsabilidad personal que tienen los investigadores para garantizar actividades de laboratorio seguras es una consideración de primer orden. Un ambiente seguro en el laboratorio depende fundamentalmente de individuos bien entrenados y preparados técnicamente en prácticas seguras para sí mismos, para otros colegas, la comunidad y el medio ambiente.

La clasificación de los laboratorios se realiza teniendo en cuenta los objetivos fundamentales del laboratorio, las características constructivas y el nivel de contención:

1.-NIVEL I DE BIOSEGURIDAD (básico): su objetivo fundamental es la enseñanza e investigación básica y es suficiente la práctica de buenas técnicas microbiológicas.

I.2.-NIVEL II DE BIOSEGURIDAD (básico): servicios primarios de salud e investigaciones relacionadas con el diagnóstico. Es necesario además de la práctica de buenas técnicas microbiológicas, el uso de ropa protectora, la simbolización de la seguridad biológica y el uso de gabinetes de seguridad biológica Clase II. En este nivel se trabajan el Virus Sincitial Respiratorio, los Virus Parainfluenza, Adenovirus, Virus Influenza y Rinovirus.

I.3.-NIVEL III DE BIOSEGURIDAD (contención): servicios de diagnóstico e investigación especiales. Además de tener en cuenta los aspectos del nivel II, son necesarios el uso de algunos medios de protección individual especiales como, flujo de aire direccional y un acceso restringido al local. En este nivel se trabaja Hantavirus y Coronavirus (agente causal del SARS).

I.4.-NIVEL IV DE BIOSEGURIDAD (máxima contención): unidades de patógenos muy peligrosos. Son necesarios, gabinetes de seguridad biológica Clase III, material gastable desechable, presencia de ducha, filtros de aire, etc.

Cada país (región) deberá realizar una clasificación nacional (regional) de los microorganismos por grupos de riesgo basado fundamentalmente en los siguientes factores:

Patogenicidad del microorganismo.

Modo de transmisión y rango hospedero del microorganismo, que puede estar influenciado por los niveles de inmunidad existentes en la población local, la densidad de población y el movimiento de la misma, presencia de vectores apropiados y existencia de medidas de higiene ambiental apropiadas.

Disponibilidad local de medidas preventivas efectivas que pueden incluir: profilaxis por inmunización o administración de antisueros u otras medidas sanitarias.

Disponibilidad local de tratamiento efectivo que incluye inmunización pasiva, vacunación post exposición, uso de agentes antimicrobianos, agentes antivirales o quimioterapéuticos. Debe tomarse en consideración la posibilidad de la emergencia de cepas resistentes a las drogas.

I.5.-LABORATORIOS BÁSICOS. NIVELES DE BIOSEGURIDAD I Y II

Los laboratorios de diagnóstico y cuidados de la salud (instituciones de salud pública, hospitales o clínicas) deben poseer nivel de bioseguridad II o superior. Existen laboratorios en los cuales no hay un control riguroso sobre las muestras recibidas y los trabajadores de laboratorio pueden exponerse ocasionalmente y de forma no sospechada a microorganismos que pertenecen a los grupos de alto riesgo. Ante esta posibilidad existe es indispensable el desarrollo de políticas y planes de seguridad en cada país (región). Las precauciones universales deben ser adoptadas y practicadas mundialmente.

Aspectos importantes a tener en cuenta:

I.6CÓDIGO DE PRÁCTICAS:

Cada laboratorio debe poseer un manual de operaciones y seguridad del laboratorio que identifique riesgos potenciales y las prácticas para prevenir o minimizar estos riesgos. Las buenas técnicas microbiológicas son esenciales para la seguridad del laboratorio. El equipamiento especializado es fundamental pero nunca reemplaza los procedimientos apropiados.

I.6.1.-Acceso:

El símbolo internacional de seguridad biológica debe ser colocado en la puerta de las habitaciones donde se trabajan organismos que pertenecen a los grupos de riesgo II o superior.

Solo se debe permitir la entrada al área de trabajo del personal autorizado.

Las puertas de los laboratorios deben permanecer cerradas.

No se debe permitir la entrada de niños menores de 16 años a las áreas de trabajo.

No se debe permitir la entrada al laboratorio de animales que no están involucrados en el trabajo.

No se puede fumar, comer o beber dentro o fuera del laboratorio.

I.6.2.-Protección del personal:

Los trabajadores deben permanecer dentro del laboratorio con batas o uniforme destinado al trabajo dentro del mismo.

Usar guantes para todos los procedimientos que involucren el contacto directo con muestras de sangre, material infeccioso o animales infectados. Después de terminar el trabajo los guantes deben ser desinfectados y las manos deben ser correctamente lavadas.

El personal de laboratorio debe lavarse las manos frecuentemente y antes de abandonar el área de trabajo del laboratorio.

Espejuelos de seguridad, máscaras faciales u otras medidas de protección deben ser empleadas cuando es necesario proteger los ojos y la cara del impacto de objetos o de radiaciones ultravioletas.

No debe abandonarse el área de trabajo llevando consigo ropa u otros dispositivos protectores del laboratorio hacia otra área (biblioteca, oficinas, baños).

Está prohibido guardar alimentos en cualquiera de las áreas de trabajo del laboratorio.

I.6.3.-Procederes:

Nunca se debe pipetear con la boca.

Todos los procedimientos deben llevarse a cabo de manera que se evite o minimicen la formación de aerosoles o gotas. Si el proceder implica el riesgo de que se formen los mismos, el trabajo debe desarrollarse en un gabinete de seguridad biológica.

El uso de jeringuillas o agujas hipodérmicas debe ser limitado para inyección parenteral o extracción de fluidos de animales de laboratorio.

Cualquier accidente, derrame o exposición a material infeccioso debe ser reportado a un supervisor del laboratorio y deben ser correctamente archivados.

Los procedimientos de limpieza y desinfección a seguir ante cualquier derrame deben estar debidamente escritos y puestos en práctica.

I.7.-Laboratorio de contención: Nivel de Bioseguridad III.

Los laboratorios de nivel III de bioseguridad son empleados para trabajar con microorganismos que pertenecen al grupo de riesgo III o para cuando se trabajan con grandes volúmenes o altas concentraciones de microorganismos del grupo de riesgo II por existir el riesgo de diseminación de aerosoles. En el nivel de seguridad III deben cumplirse todas las medidas mencionadas con anterioridad para los laboratorios básicos (Nivel I y II de seguridad biológica) además de algunas específicas. Estos laboratorios deben ser debidamente registrados por las autoridades nacionales de salud.

Referencias:

1. Laboratory biosafety manual. Second Edition. (revised) World Health Organization. Geneva 2003. WHO/CDS/CSR/LYO/2003-4
2. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) Fourth Edition .U.S. Department of Health and Humana Centers for Disease Control and Prevention (CDC) and National Institute Of Health . Washington 1999.

IV.-PRINCIPIOS GENERALES DE LA TOMA DE MUESTRA, CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE.

Dra. Clara Savón Valdés

Para la obtención de un diagnóstico virológico acertado, es indispensable la selección adecuada de la muestra. Sin embargo de las condiciones en que se realice la colecta, manipulación y transporte de la muestra dependerá también el éxito de los resultados de laboratorio. El traslado al laboratorio debe efectuarse entre 24 a 48 horas como máximo para que la muestra sea útil para el aislamiento viral. De no poder trasladar la muestra en el tiempo establecido, la misma debe ser congelada a -70°C para la conservación de la partícula presente en la muestra, es necesario mantenerlas a pH 7 y evitar su desecación utilizando una solución denominada medio de transporte de virus (MTV)

I.- MUESTRAS PARA AISLAMIENTO VIRAL

I.1.- ASPIRADOS NASOFARINGEOS (ANF).

Esta muestra es la recomendada para la colecta en infantes, niño pequeño y adulto mayor (1) (2). Es la muestra clínica de elección para obtener los aislamientos de los virus causantes de infección respiratoria aguda (IRA), ya que puede suministrar un número apropiado de células infectadas. El aspirado puede obtenerse, utilizando un catéter acoplado a una jeringuilla de bulbo deprimido la cual se coloca en la orofaringe y luego en la fosas nasales, succionando con la jeringuilla. Para realizar esta operación el paciente debe sentarse con la cabeza inclinada hacia atrás instalándose 1.5 mL de MTV en cada fosa nasal con un gotero estéril y luego aspirando las secreciones. La aspiración de las secreciones de la orofaringe se realiza a partir de las secreciones presentes

El contenido de esta jeringuilla se vierte en un tubo plástico preferiblemente de fondo cónica y con tapa de rosca que contiene de 3-5 mL de medio de transporte virológico. Este tubo debe cerrarse herméticamente y rotularse inmediatamente, sumergirse en un baño de hielo o guardarse a una temperatura de 4°C, debiendo cumplirse las regulaciones de conservación y de traslado al laboratorio. (2).

I.2.-HISOPADOS O EXUDADO NASOFARINGEO (ENF).

Los hisopados nasofaríngeos generalmente contienen un número de células bajo, por lo que son menos útiles que los aspirados. Para tomarlos deben utilizarse hisopos de Teflón dracón (comerciales) estériles, de esta manera el raspado de las células epiteliales de las mucosas

es de mejor calidad, obteniéndose un mayor número de células. Una vez raspadas las mucosas nasales y faríngeas, los hisopos se sumergen inmediatamente en MTV en tubos plásticos de tapa de rosca cerradas herméticamente y rotulados. Deben conservarse en un baño de hielo o deben ser refrigerados a 4° C debiendo cumplirse las regulaciones de conservación y traslado al laboratorio (1, 2)

I.3.-LAVADOS FARÍNGOS O GARGARISMOS.

Esta muestra se utiliza fundamentalmente para el aislamiento del virus Influenza en pacientes adultos jóvenes (3). El paciente se enjuaga la orofaringe con una solución salina tamponada (PBS pH 7.2) con antibióticos, a las concentraciones establecidas para los medios de transporte, vertiendo el contenido en un tubo plástico con tapa de rosca utilizando un embudo hecho con papel estéril o de plástico desechable estéril. En ningún caso los guantes de técnico deben tocar la parte interior del embudo. Como precaución se debe preguntar al paciente si presenta alergia a los antibióticos que se han adicionado al medio transporte (PBS) para evitar accidentes por reacciones alérgicas. Como los antibióticos más comúnmente usados son la penicilina y estreptomina, es recomendable la sustitución de la penicilina por sulfato de neomicina que provoca menos reacciones alérgicas que la penicilina.

Una vez recogida la muestra, el tubo debe cerrarse herméticamente, rotularse y colocarse inmediatamente en un baño de hielo o refrigerarse a 4°C, durante 24 a 48 horas hasta su traslado al laboratorio, debiendo cumplirse las regulaciones de conservación y traslado al laboratorio (1, 2)

I.4.-ESPUTO

Esta muestra es recomendable en pacientes mayores de 60 años. El esputo puede obtenerse fácilmente provocando mecánicamente la tos al paciente introduciendo un hisopo estéril en la orofaringe del paciente.

Esta secreción es recogida en un frasco estéril de boca ancha que contenga 3 o 5 mL de medio de transporte de virus. Al igual que en las muestras anteriores deben cumplirse las regulaciones de conservación y traslado (3).

I.5.-ASPIRADO BRONQUIAL

Esta muestra sólo puede ser colectada cuando el paciente se encuentra bajo ventilación mecánica en una sala de terapia. La aspiración se realiza con un catéter estéril. La secreción colectada se deposita en tubo de plástico de fondo cónico preferiblemente y con tapa de rosca que contiene 3mL de medio de transporte virológico con antibióticos. El tubo es cerrado herméticamente, rotulado e inmediatamente refrigerado a 4°C. La toma de esta muestra responde a una verdadera urgencia médica por lo que su traslado debe estar previsto para que arribe al laboratorio en menos de 5 horas (1,2).

I.6.-MUESTRA DE NECROPSIA

La muestra de necropsia generalmente puede llegar altamente contaminada, debido a la manipulación a que se ve sometida en la morgue, por ello es importante que el laboratorio establezca los parámetros que se requieren para lograr una mayor calidad de la misma. Estas medidas consisten en que se coloquen los fragmentos de pulmón, cerebro (Síndrome de Reyé) del paciente con las lesiones macroscópicas inmediatamente en medio de transporte virológico con antibióticos, sin que medie ninguna otra manipulación Esta muestra debe refrigerarse a 4°C rápidamente y enviarse al laboratorio para ser procesada a la mayor brevedad posible Si esta norma no puede cumplirse entonces deberá congelarse – 70°C hasta su traslado al laboratorio (2).

I.7.-HISOPADO FARÍNGEO-CONJUNTIVAL

Esta muestra sólo es útil para el aislamiento de adenovirus, causante de fiebre faringoconjuntival. Para ello se utilizan hisopos de Tefón estériles. Los hisopos se deben introducir en el medio de transporte (MTV) antes de proceder a raspar la conjuntiva. El hisopo que se utilice para raspar la orofaringe no necesita introducirse previamente en el MTV. Una vez realizada esta operación se introducen en el tubo de rosca con MTV se cierra herméticamente, se rotula y refrigera a 4°C hasta su traslado al laboratorio, debiendo cumplirse las regulaciones de conservación y traslado al laboratorio (1, 2). Si la muestra no va ser trasladada entre 24 a 48 horas, entonces debe congelarse a –70°C (2).

II.-FACTORES QUE INFLUYEN EN EL AISLAMIENTO VIRAL

Son muchos los factores que influyen en el aislamiento viral, unos son independientes como por ejemplo la carga viral de la muestra, pero sin duda tres de ellos pueden ser controlados y son de gran relevancia: el tiempo, la temperatura y el medio de transporte.

II.1.-Tiempo

Es de gran relevancia el momento en que se realiza la toma de muestra para estudios de virus respiratorios. Un factor importante a considerar es que el período de excreción viral de estos virus es breve, por lo que las muestras deben ser colectadas antes de las 48 a 72 horas del comienzo de los primeros síntomas. Una muestra colectada tardíamente puede resultar falsa negativa. Por otro lado, teniendo en cuenta que muchas de estas infecciones pueden constituir infecciones nosocomiales, la muestra del paciente hospitalizado debe ser colectada durante las primeras 24 horas del ingreso hospitalario, para que el diagnóstico sea de utilidad epidemiológica. En el caso de que se tome tardíamente, perderá esta utilidad, aunque siga conservando su valor diagnóstico clínico etiológico (1).

II.2.-Temperatura

La temperatura de conservación es otro de los factores que inciden sobre la calidad de la muestra para el aislamiento viral. Si la muestra es conservada y transportada a una temperatura inadecuada es posible obtener un resultado falso negativo.

Por consiguiente toda muestra para aislamiento viral debe conservarse a 4°C si va ser trasladada al laboratorio dentro de las 24 a 48 horas posteriores a la colecta. Si no fuera así debe congelarse a - 70°C para la mejor conservación de la infectividad de las partículas presentes en la muestra

La temperatura de 0°C es crítica para muchos virus y especialmente los virus respiratorios, son capaces de perder casi la totalidad de su infectividad. Para la conservación óptima de los virus presentes en la muestra, es necesario mantenerlas a pH 7 y evitar su desecación. Para ello se utiliza una solución denominada "de transporte de virus (MTV)", en cuya composición toman parte los antibióticos con objeto de frenar la contaminación bacteriana.

II.3.-Medios de transporte virológico (MTV)

Para el diagnóstico virológico se requieren de medios de transporte isotónicos que proporcionen un pH 7 aproximadamente para la conservación de las células infectadas y de las partículas virales presentes en la muestra clínica. Entre estos podemos citar:

Solución Salina de Hanks

Solución Salina Tamponada, PBS (sólo útil para coleccionar virus Influenza)

Medio Esencial Mínimo (MEM) (con el cual se obtienen los mejores resultados, aunque resulta caro)

Estos medios en su preparación requieren de la adición de los llamados estabilizadores, que no son más que proteínas, cuya función no es más que proteger la partícula viral presente en el material infeccioso. Se añaden al medio de transporte al 0.5 %.

Entre los estabilizadores más utilizados comúnmente están:

Suero bovino fetal

Albúmina bovina

Lactoalbúmina

La adición de antibióticos es obligatoria, por cuanto previenen la contaminación bacteriana que puede surgir durante la colecta y manipulación (1). Otro aspecto importante a considerar es el empleo de fungicidas para prevenir la contaminación por hongos, el más comúnmente usado es la anfotericina B.

Por lo general las concentraciones recomendadas de antibiótico para el medio de transporte son las siguientes: (1)

Penicilina----- 200 unidades x mL

Estreptomina ----- 200µg /mL

Anfotericina B-----5 µg / mL

Es necesario tener en consideración que el empleo de concentraciones muy superiores puede provocar un efecto tóxico en el cultivo celular inoculado, que podría llegar a ser confundido si se carece de experiencia con un falso positivo por desprendimiento de la monocapa celular.

III.-MUESTRAS PARA DIAGNÓSTICO RÁPIDO

Las muestras idóneas para el diagnóstico rápido por Inmunofluorescencia (IF) o por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son las mismas que se utilizan en el aislamiento viral, es decir secreciones respiratorias tomadas mediante aspirados, lavados, o hisopados. Pero en el caso de IF debe tenerse en cuenta que las muestras no deben ser congeladas ya que el proceso de congelación y descongelación, rompe las células haciéndolas difíciles de reconocer. La PCR no se afecta por la congelación- descongelación (2)

IV.-MUESTRAS PARA EL DIAGNOSTICO SEROLOGICO

El diagnóstico serológico de los virus respiratorios generalmente tiene carácter confirmatorio aunque, cuando se hace nula la posibilidad de coleccionar muestras para la detección del virus o sus componentes es factible realizar el diagnóstico por serología.

Usualmente se toman dos muestras de suero; la primera en la fase aguda de la enfermedad (1^{er} suero) y la segunda en la fase convaleciente (2^{do} suero). El suero en la fase aguda se extrae en los primeros 3 días del comienzo de los primeros síntomas y el de fase convaleciente entre 15 y 21 días después de haber tomado la primera muestra. La sangre colectada debe permanecer al menos una hora a temperatura ambiente, posteriormente se coloca en el refrigerador de 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente las muestras son centrifugadas a 1000 r.p.m. por 10 minutos a 4°C. A continuación se separa el suero que se transfiere a un tubo previamente rotulado y se almacena preferiblemente a 4°C. El envío al laboratorio debe realizarse preferiblemente en congelación (4°C o - 20°C) (1).

DATOS PARA EL ENVIO DE MUESTRAS CLÍNICAS.

Las muestras deben ir acompañadas de un conjunto mínimo de datos para que el laboratorio pueda tomar la decisión de cuáles son las pruebas diagnósticas más adecuadas e interpretar los resultados. Los datos más importantes son:

Nombre y Apellidos

Edad, sexo

Dirección particular

Fecha del comienzo de los primeros síntomas

Fecha de Toma de las Muestras

Tipo de Muestra (ANSF, ENF, LF, E, Necro)

Número de historia clínica, diagnóstico clínico primario, resumen de datos clínicos (los hallazgos clínicos más relevantes) y epidemiológicos del caso

Unidad de Salud de procedencia. Hospital, Provincia etc.

Nombre y datos generales del médico de atención

V.-TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS CLINICAS

V.1.-REQUERIMIENTOS PARA EL TRANSPORTE DE MUESTRAS CLÍNICAS.

Para el transporte de muestras debe usarse el sistema básico de **TRIPLE EMPAQUE**. A continuación se describe el sistema de la IATA que es el recomendado por la Organización Mundial de la Salud muy especialmente para transporte de muestras de SARS (2003) (4).

Primer contenedor. En el se deposita la muestra clínica. Debe ser de plástico con tapa de rosca, cierre hermético y debe envolverse en suficiente papel absorbente por si hubiera algún derrame de la muestra en cuestión.

Contenedor secundario. En este contenedor es donde deben colocarse las sustancias refrigerantes, hielo seco. Los datos de la muestra clínica, así como la información que describe el tipo de muestra deberá, colocarse en el exterior del mismo. El contenedor secundario debe ser de un material que permita conservar la temperatura o evite los escapes de frío.

Contenedor Externo. Es el encargado de proteger al segundo contenedor de daños físicos que puedan ocurrir durante el proceso de transporte. En el debe consignarse el remitente y quien lo recibe. Las etiquetas correspondientes al riesgo biológico de la muestra que esta siendo transportada deberán estar visibles.

Las regulaciones internacionales específicas para el transporte debe ser de estricto cumplimiento. Por otro lado cada país tiene regulaciones específicas para la importación de materiales biológicos.

En el momento del envío debe avisarse al laboratorio receptor (FAX teléfono E mail).del momento de la llegada del mismo, lo que asegurará que sea recogido inmediatamente a su llegada.

Teniendo en cuenta que los virus respiratorios no producen en general viremia en el transporte de sueros si bien no constituye un material infeccioso como tal, no puede ser descartado la posible contaminación con un virus como la Hepatitis B o C

Referencias:

- 1.-Lennette DA. General principles for laboratory diagnosis of viral rickettsial and Chlamydial infections Chapter 1. IN: Diagnostic Procedure for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections 7 ed Washington DC 1995. 3-25.
- 2.-C Weissenbacher M, Avila M. Los Virus como causa de IRA alta y baja en niños: Características generales y diagnóstico en: Benguigui Y Antuñano F, Schmunis G, Yunes J. Infecciones respiratorias en niños. USA OPS/OMS, 1999:87-104
- 3.-W Covalcuic KA, Webb K, Carlson C. Comparison of four clinical specimen types for detection of Influenza A and B Viruses by Optical Immunoassay (Flu OA test) and cell culture methods. J Clin Microbiol 1999, 37(12) : 3971-74.
- 4.-Reglamentación sobre mercancías peligrosas. Resolución 618 de la IATA 44 Edición. En vigor desde el 1 de Enero al 31 de Diciembre de 2003.

V.-CULTIVOS CELULARES Y VIRUS RESPIRATORIOS.

Lic Lisette Pérez Santos MsC

INTRODUCCION.

Hace más de 30 años que Enders y col. descubrieron que los Poliovirus podían replicarse en cultivo de células de origen no neuronal, estimulando así el uso de los cultivos celulares "in vitro" para la propagación de virus humanos y animales. Estos hallazgos permitieron los estudios de virus que no se propagaban en los sistemas hasta ese momento empleados como los huevos embrionados o los ratones, e igualmente hicieron posible la profundización en el conocimiento de otros muy conocidos como el virus de la Poliomielitis. En el campo de la Virología la extensión de los sistemas de cultivos celulares ha suplantado a los sistemas hospederos animales y los huevos embrionados para el aislamiento viral, el test de Neutralización y la obtención de antígenos virales entre otros.

Equipos:

Incubadora preferiblemente de CO₂.

Cabina de flujo Laminar.

Microscopio invertido.

Baño Termostataado.

Cámara de 4 ° C

Materiales y Reactivos:

Tubos plásticos para el cultivo de células.

Placas de 96 pocillos (fondo plano).

Medio MEM con amino acidos no esenciales y glutamina.

Medio 199.

Medio Dulbecco's MEM.

Medio RPMI-1640.

Agua bidestilada de calidad suficiente para cultivo de células.

Solución stock de Penicilina G 100 U/mL-Sulfato de Estreptomina 100 mg/mL.

Solución de Bicarbonato de Sodio (para cultivo celular) al 7.5%

Solución de Tripsina-EDTA: Tripsina (1:250) al 0.25% -EDTA al 0,02%.

Solución de Tripsina (Difco) (1:250) a 1,5 µg/mL.

Glutamina.

Solución stock de buffer Hepes 1 M

Albúmina bovina humana fracción V.

Suero Fetal Bovino inactivado a 56°C durante 30 min.

Frascos plásticos de 25 cm², 75 cm², 182 cm², 225 cm².

Pipetas de 2, 5 y 10 mL.

I.Células NCI-H292

La línea NCI-H292 (ATCC CRL-1848) Fue lograda en 1980 a partir de un carcinoma mucoepidermoide de pulmón y ha sido reportada como sustituto de los cultivos primarios de riñón de mono para el aislamiento de los *Paramyxovirus* humanos (1, 2,3). Estudios más recientes demuestran que esta nueva línea también es sensible a *Adenovirus* y *Enterovirus* (4,5,9,10).

Crece en medio RPMI-1640 suplementado con 20µM de glutamina, Hepes 25 mM y 10% de suero fetal bovino (SFB). El Medio de inoculación es RPMI-1640 con 20 µM de glutamina y 1,5 µg/mL de tripsina (Difco 1:250) y antibiótico (Penicilina 100U/mL- Estreptomomicina 100mg/mL, concentración final).

I.1.-Preparación de las células NCI-H292

Partir de un frasco de cultivo (25 cm³ o 75 cm³) de una semana de sembrado.

Preparar el medio de crecimiento de cultivo (RPMI 1640, SBF 10% y antibiótico al 0,1%) necesario para los tubos que se van a sembrar.

Desprender las células con solución de Tripsina-EDTA (0,25% y 0,02%) y se adicionan al medio preparado a razón de 200 000 cel./mL. Recogerlas por centrifugación y adicionar al medio preparado a razón de 200 000 cél./mL

Incubar los tubos en plano inclinado a 37°C durante 48 o 72 horas. Al cabo de este tiempo debe estar cubierta la monocapa (al menos 1 cm²) y los tubos, listos para inocular.

II.- Células HeLa

La línea celular continua HeLa ATCC (CCL-2), fue lograda en 1951 a partir de un carcinoma de cervix humano (6). Se ha descrito que es sensible a *Poliovirus* tipo 1 y *Adenovirus* tipo 3 (8).

Utiliza como medio de cultivo, medio mínimo esencial (Eagle MEM) con amino ácidos no esenciales y glutamina suplementado con 10% de SFB. El medio postinoculación es Eagle MEM con 2% de SFB y antibiótico 0,1% (concentración final Penicilina 100U/mL-Estreptomicina 100mg/mL).

II.1.-Preparación de las células HeLa

Partir de un frasco de cultivo (25 cm³ o 75 cm³) de una semana de sembrado.

Preparar el medio de cultivo (Eagle MEM con 10% de SFB y antibiótico al 0,1%) necesario para los tubos que se van a sembrar.

Desprender las células con solución de Tripsina-EDTA (0,25% y 0,02%) Recogerlas por centrifugación.y se adicionan al medio preparado a razón de 150 000 cel./mL

Incubar los tubos en plano inclinado a 37°C durante 48 o 72 horas. Al cabo de este tiempo debe estar cubierta la monocapa (1 cm²) y los tubos listos para inocular.

En este tipo de células se recomienda trabajar la línea celular con la línea celular con monocapa semiconfluente dadas sus características de crecimiento.

III .- Células HEp-2

La línea continua HEp-2 ATCC (CCL-23) se obtuvo en 1952 a partir de un carcinoma epidermoide de laringe humano (6). El medio de crecimiento de cultivo es Eagle MEM con 10% de SFB. El medio postinoculación es Eagle MEM con 2% de SFB y antibiótico 0,1% (concentración final Penicilina 100U/mL-Estreptomicina 100mg/mL).

Esta línea se ha reportado como sensible a *Poliovirus* tipo 1, *Adenovirus* tipo 3 y el Virus de la estomatitis vesicular (cepa Indiana) (7,8).

III .-Preparación de la células HEp-2

Partir de un frasco de cultivo (25 cm³ o 75 cm³) de una semana de sembrado.

Preparar el medio de crecimiento para el cultivo (Eagle MEM con 10% de SFB y antibiótico al 0,1%) necesario para los tubos que se van a sembrar.

Desprender las células con solución de Tripsina-EDTA (0,25% y 0,02%), centrifugar y adicionar al medio preparado a razón de 150 000 cel./mL.

Incubar los tubos en plano inclinado a 37°C durante 48 o 72 horas. Al cabo de este tiempo debe estar cubierta la monocapa (mínimo 1 cm²) y los tubos listos para inocular. En este tipo de células se recomienda utilizar la línea celular con la monocapa semiconfluyente dadas las características de crecimiento de esta línea.

IV.- Células Vero

La línea Vero fue obtenida en 1952 a partir de un riñón de un mono verde africano adulto normal (ATCC-CCL-81) (6). Está reportado que esta línea es sensible a *Poliovirus* tipo 3, *Getah*, *Ndumu*, *Pixuna*, *Ross River*, *SemLiki*, *Paramaribo*, *Kokobera*, *Herpes virus*, *Adenovirus* tipo 3 y 7 (8).

El medio de cultivo empleado es 199 con 5% de SFB y el medio de postinoculación es 199 con 2% de SBF y antibiótico 0,1% (concentración final Penicilina 100U/mL- Estreptomicina 100mg/mL).

IV.1.--Preparación de células Vero

Partir de un frasco de cultivo (25 cm³ o 75 cm³) de una semana de sembrado.

Prepara el medio de cultivo (199 con 5% de SFB y antibiótico al 0,1%) necesario para los tubos que se sembraran.

Desprender las células con solución de Tripsina-EDTA (0,25% y 0,02%) y se adicionan al medio preparado a razón de 200 000 cel./mL.

Incubar los tubos en plano inclinado a 37°C durante 48 o 72 horas. Al cabo de este tiempo debe estar cubierta la monocapa (mínimo 1 cm²) y los tubos listos para inocular.

V.- Células MDCK-L

La línea MDCK-L, cepa de la línea celular MDCK se obtuvo en 1958 de un riñón de cocker spaniel adulto aparentemente normal (ATCC-CCL-34) (6). Es sensible a *Influenza virus* al virus de la estomatitis vesicular, a *Vaccinia virus*, *Coxsackie B-5*, *Reovirus* tipo 2 y 3, *Adenovirus* tipo 4 y 5.

El medio de cultivo empleado es Dulbecco's MEM suplementado con albúmina bovina humana fracción V al 0,2%, glutamina 2,5 g/L, Heps 25 mM y SBF al 5%. El Medio de

inoculación es Dulbecco's MEM suplementado con albúmina bovina humana fracción V al 0,2%, glutamina 2,5 g/L, Hepes 25 mM, 1,5 µg/mL de tripsina (Difco 1:250) y antibiótico 0,1% (Penicilina 100U/mL-Estreptomicina 100mg/mL).

V.1.-Preparación de las células MDCK

Partir de un frasco de cultivo (25 cm³ o 75 cm³) de una semana de sembrado.

Preparar el medio de cultivo (Dulbecco's MEM al 5% SFB y antibiótico al 0,1%) necesario para los tubos que se van a sembrar o la placa de 96 pocillos.

Desprender las células con solución de Tripsina-EDTA (0,25% y 0,02%) y adicionar al medio preparado a razón de 250 000 cel. /mL.

Incubar los tubos en plano inclinado a 37°C durante 48 o 72 horas. La placa se incuba a 37°C en atmósfera de CO₂. Al cabo de este tiempo debe estar cubierta la monocapa y los tubos o la placa listos para inocular.

VI.- CMRC-5

La línea celular MRC-5 fue obtenida de pulmón normal de un feto masculino de 14 semanas en 1966 (6). Se ha descrito que es sensible a *Poliovirus* tipo 1 y *Herpes simplex*, *Citomegalovirus*, Adenovirus y el virus de la Estomatitis vesicular.

Se emplea como medio de cultivo, medio mínimo esencial (Eagle MEM) con amino ácidos no esenciales y glutamina suplementado con 10% de SFB. El medio postinoculación es Eagle MEM con 2% de SFB y antibiótico 0,1% (Penicilina 100U/mL-Estreptomicina 100mg/mL).

VI .1.-Preparación de las células MRC-5

Partir de un frasco de cultivo (25 cm³ o 75 cm³) de una semana se sembrado.

Preparar el medio de cultivo (Eagle MEM con 10% de SFB y antibiótico al 0,1%) necesario para los tubos que se van a sembrar.

Desprender las células con solución de Tripsina-EDTA (0,25% y 0,02%) y adicionar al medio preparado a razón de 250 000 cel. /mL.

Incubar los tubos en plano inclinado a 37°C durante 48 o 72 horas. Al cabo de este tiempo debe estar cubierta la monocapa (1 cm²) y los tubos listos para inocular.

Referencias:

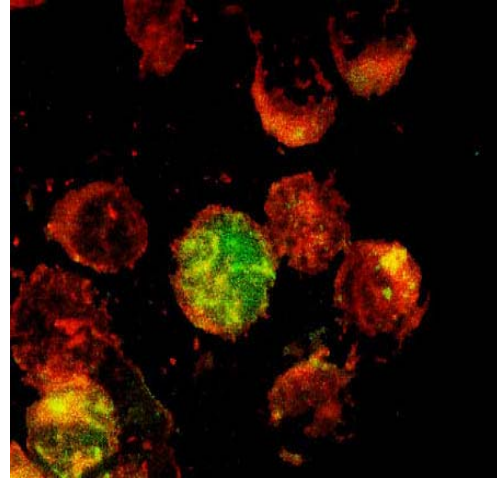
- 1.- Banks-Schlegel, SP; Gazdar AF, Harris CC. Intermediate filament and cross-linked envelope expresión in human lung tumor cell line. *Cancer Res* 1985;45(6):1187-97.
- 2.- Carney ND; Gazdar AF; Bepler G; Guccion JG; Marangos PJ; Moody TW; et al. Establishment and identification of small cell lung cancer lines having classic and variant features. *Cancer Res*, 1985;45(8):2913-23.
- 3.- Castells E; George VG; Hierholzer JC. NCI-H292 as an alternative cell line for the isolation and propagation of the human paramyxoviruses. *Arch Virol* 1990;115(2):277-88.
- 4.- Kinsburg DW. Paramyxovirus and their replication. En: Fields, Knipe DM, eds. *Virology*. 2 ed. New York: Raven Press, 1990; Vol 1:945-62.
- 5.- Hierholzer JC; Castells E; Bank K; Bryan JA; Mc Ewen CT. Sensitivity of NCI-H292 human lung mucocoeptidermoide cell for respiratory and other human viruses. *J Clin Microbiol* 1993;31(6):1504-72.
- 6.- American Type Culture Collection. Catalogue of Cell lines and Hybridomes. Maryland, 1992:4,17, 21, 48, 98, 175.
- 7.- McIntosh K, Chanock RM. Respiratory syncytial viruses. En: Fields, Knipe DM, eds. *Virology* 2ed. New York Raven Press, 1990; Vol 1:1045-72.
- 8.- Horwitz S. Adenovirus and their replication. En: Fields, Knipe DM, eds. *Virology* 2ed. New York Raven Press, 1990; Vol 1:1723-40.
- 9.- Chanock RM; McIntosh K. Parainfluenza virus . En: Fields, Knipe DM, eds. *Virology* 2ed. New York Raven Press, 1990; Vol 1:963-87.
- 10.- Morier L, Pérez L, Cancio R, Savón C, González Z, Goyenechea A. Comparación de la línea celular NCI-H292 con otras líneas continuas para la multiplicación de virus respiratorios. *Rev Cub Med Trop* 1996; 48(3): 171-73.

VI.-TECNICAS GENERALES DE DIAGNOSTICO

I.- INMUNOFLUORESCENCIA

Lic. Alexander Piñón Ramos

La inmunofluorescencia fue introducida por primera vez a principios de los años 40 y fue utilizada en el diagnóstico virológico a mediados de los cincuenta. Se ha comprobado que la técnica de inmunofluorescencia es sensible y segura para diagnosticar virus. Puede ser directa o indirecta y emplearse para detectar antígenos víricos específicos o para demostrar anticuerpos específicos de clase



para virus conocidos,proporciona resultados pocas horas después de haber ingresado un paciente en el hospital. Por tanto, es actualmente una de las técnicas principales en uso para el diagnóstico rápido de muchas infecciones víricas en período agudo.

I.1.-PRINCIPIOS:

Los fluorocromos se unen químicamente a los anticuerpos con una elevada eficiencia, sin interferir en la especificidad inmunológica del anticuerpo y sin perder la intensidad de su fluorescencia. El fluorocromo utilizado es excitado por la luz de corta longitud de onda (luz ultravioleta o azul) y emite luz de onda mas larga (luz verde) Los anticuerpos una vez marcados pueden ser utilizados en muchos formatos de inmunoensayo para detectar tanto antígenos virales como anticuerpos contra estos. En años recientes, la pureza de los fluorocromos y el uso y calidad de los microscopios ópticos de fluorescencia han mejorado grandemente.

Los fluorocromos más ampliamente utilizados son el isotiocianato de fluoresceína (FITC), que emite un color verde manzana, y el isotiocianato-tetrametil-rodamina (TRITC), que emite un color rojo-naranja. Aunque ambos fluorocromos son eficientes y fluorescen intensamente, la fluoresceína tiene tres ventajas: (1) el ojo humano es más sensible a la porción verde del espectro; (2) la fluoresceína deja un fondo rojizo; y (3) el posible brillo

verde no específico puede ser bloqueado por muchos agentes como el azul de Evans y el rojo congo, que refuerzan el fondo rojo. La presencia de 25µg/mL de azul de Evans en la solución del conjugado tiñe todas las partes de la célula, y su fluorescencia roja provee de un gran contraste con el verde de la fluorescencia del FITC. El azul de Evans es carcinogénico y teratogénico, por lo que debe ser manipulado con cuidado.

Como procedimiento general se toman las muestras o las suspensiones de cultivos celulares, se lavan mediante resuspensión en PBS y centrifugación. Las células resultantes se depositan y se dejan secar sobre un portaobjetos. En este procedimiento, la fijación celular es importante. Mediante la misma se impide la difusión de proteínas celulares y víricas, quedando intacta la morfología de las células y la distribución de antígenos víricos. La fijación también hace permeables las membranas de las células a los reactivos. La fijación en acetona durante 5-10 minutos a -20°C es el procedimiento sistemático que se sigue en las investigaciones víricas, pues da una fijación satisfactoria y no destruye la reactividad inmunológica de la mayoría de los antígenos. Después de la fijación, los anticuerpos específicos aplicados a las células se difunden a través de la membrana celular y se combinan con antígenos víricos en el interior de las células. El anticuerpo específico estará marcado con un fluorocromo si la técnica a emplear es la IF directa. Si el anticuerpo específico para el virus no estuviera conjugado con FITC, se usa la IF indirecta en que se aplica un segundo anticuerpo frente a las globulinas de la especie del primer anticuerpo conjugado con FITC, en los dos casos la fluorescencia se localiza en los antígenos víricos dentro de las células infectadas o en sus membranas y resalta las modalidades del ciclo de replicación de los diferentes virus. En los dos casos, la fluorescencia se localiza en los antígenos víricos dentro de las células infectadas o en sus membranas y resalta las modalidades características del ciclo de replicación de los virus. La distribución esperada de antígenos víricos dentro de la célula infectada, el color preciso de la fluorescencia y el tipo de célula en que apareció la fluorescencia contribuyen a la mayor especificidad del ensayo.

I.2.-MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA:

Muchos de los modernos microscopios de fluorescencia tienen luz incidente (epiluminación). La luz, de longitudes de onda seleccionadas para producir excitación, se refleja por medio de un espejo de interferencia dirigiéndose a través del objetivo hasta la

muestra desde arriba. La luz emitida desde el fluorocromo pasa por atrás a través del objetivo y el espejo dicroico hasta el ocular.

En un microscopio de luz ordinaria, la estructura celular o del tejido es visible a causa de la absorción y la difracción de la luz incidente. El microscopio de fluorescencia funciona con un principio diferente. Si las sustancias fluorescentes están presentes, ellas se convierten en fuente de luz independiente, por irradiación con luz ultravioleta, violeta azul o luz verde excitada.

Uno de los dos tipos de sistemas de iluminación son utilizados para todos los microscopios de fluorescencia. La primera generación de microscopios de fluorescencia utilizaron la luz transmitida. En estos microscopios, la luz pasa a través de un filtro excitante y es reflejada por un espejo a través de un condensador de campo oscuro y llega hasta la muestra atravesándola. La fluorescencia emitida por la muestra pasa por el objetivo y el filtro barrera a través de los oculares hasta el observador. La mayor desventaja de estos microscopios es que requieren de altas fuentes de energía luminosa.

Virtualmente, todos los microscopios de fluorescencia modernos en los laboratorios de virología, usan sistemas de iluminación incidentes o sistemas de epi-iluminación, y están equipados con filtros de interferencia. En este tipo de microscopio, la fuente de luz está localizada en la parte superior de la muestra. La luz excitada pasa a través del filtro de excitación a un espejo dicroico, desviando el rayo de luz (a la longitud de onda seleccionada) bajando continuamente hasta el objetivo y llegando hasta la superficie de arriba de la muestra. La luz fluorescente emitida por la muestra es guiada a través del objetivo, el espejo dicroico, y el filtro barrera a través de los oculares del observador.

Las ventajas de la epi-iluminación son: (1) no es necesario un condensador externo; (2) el objetivo actúa como un condensador, centrando y enfocando la luz y (3) con solo la capa de la superficie de arriba de la muestra, se obtiene un buen brillo y una mejor imagen con elevado contraste.

Además, muchos microscopios combinan la fluorescencia con la luz ordinaria o con el sistema de contraste de fase. Esta última combinación es la más utilizada en el estudio de las células vivas.

Las fuentes de luz de suficiente intensidad de excitación son esenciales en la microscopía de fluorescencia. Las tres fuentes de luz más comúnmente utilizadas para la epi-

iluminación son: las lámparas de mercurio (50 o 100watt), lámparas de halógeno cuarzo (12volt, 100watt), y las lámparas de alta presión de xenón (12volt, 75-100watt) que tienen un espectro muy cercano a la luz del día o natural. La luz UV es requerida para la excitación del fluorocromo. Sin embargo, el pico de absorción del FITC es a 445nm, con emisión a 525nm. Con filtros de interferencia, más del 80% de la luz transmitida es entre los 400-500nm, en el espectro visible, y no en el rango ultravioleta.

Ventajas técnicas

1. Permite detectar antígenos víricos mientras están en la célula; por tanto, se necesitan relativamente pocas células.
2. Tras la fijación, las muestras son estables y pueden enviarse al laboratorio sin grandes limitaciones de tiempo.

Desventajas técnicas

1. Son indispensables los antisueros altamente específicos y buenos conjugados, que no siempre son asequibles.
2. Se necesita un microscopio de fluorescencia, que es costoso.
3. Es necesario tener gran experiencia.
4. Algunas muestras dan altos grados de reacciones no específicas por la presencia de mucosidad o por contaminaciones.

Equipos

Vórtex

Centrífuga (que alcance las 3000rpm, no tiene que ser refrigerada)

Microscopio de fluorescencia

Secador

Materiales y Reactivos:

Láminas porta objetos para fluorescencia

Viales de 1mL

Puntas de micropipetas que permitan tomar las cantidades especificadas en el protocolo

Micropipetas de 5-20 y de 50-100µL.

Vasos o frascos Coplin.

PBS 1x

Acetona pura

Anticuerpos monoclonales necesarios (casa comercial Chemicon):

- Adenovirus: MAB8052
- Influenza A, antígeno H1: MAB8252
- Influenza A, antígeno H3: MAB8254
- InfluenzaB: MAB8671
- Parainfluenza 1: MAB834-1
- Parainfluenza 2: MAB844-1
- Parainfluenza 3: MAB855-1

Virus Sincitial Respiratorio, fusión 1b, 92-11c: MAB8581

I.3- INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA:

Es adecuada para

- a) la detección de un antígeno siempre que se cuenta con un suero hiperinmune específico de elevada potencia para conjugarse.
- b) para demostrar los sitios de formación o la presencia de anticuerpos cuando se cuenta con un antígeno marcado.

I.3.1.-PROCEDIMIENTO:

1. Homogeneizar la muestra agitándola en vórtex.
2. Repartirla en viales estériles y correctamente rotulados (tomar un vial para realizar la prueba y el resto conservarlos a -70°C).
3. Centrifugar a 3000 r.p.m. durante 10 minutos.
4. Eliminar el sobrenadante con pipeta Pasteur de 1mL (cuidar que no se elimine el sedimento).
5. Añadir 1mL de PBS y resuspender suavemente el sedimento.
6. Repetir los pasos 4 y 5 por dos veces más, cuidando siempre de en el último lavado dejar al menos 10µL de PBS para resuspender.
7. Añadir en cada pocillo de la lámina porta objetos (limpia y previamente rotulada) una gota de la muestra (aproximadamente 20µL) y observar al microscopio la presencia de células.

8. Secar (incubando a 37°C durante 1 hora o mejor a temperatura ambiente por mas tiempo).
9. Fijar la muestra embebiendo la lámina en el frasco Coplin con acetona preenfriada durante 10 minutos.
10. Secar (después de este paso, si no se va a continuar la técnica, las láminas deben ser conservadas a 4°C si la tinción se hará en dos días, si demora más, deben ser guardadas a -20°C en un porta laminas).
11. Añadir 20µL del anticuerpo específico conjugado con fluoresceína a la dilución de trabajo correspondiente.
12. Incubar durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda.
13. Eliminar el conjugado lavando ligeramente con PBS por tres veces (inclinara lámina y dejar correr suavemente sobre la misma 1mL de PBS).
14. Realizar un lavado en agitación lento (introduciendo la lámina en un frasco Coplin con PBS durante 10 minutos).
15. Secar la lámina como en el paso 8.
16. Añadir una gota del glicerol al 90% al centro y bordes de la lámina, y colocar un cubreobjetos.
17. Examinar la muestra en un microscopio de fluorescencia.

I.4.-INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA:

También es utilizada para la detección de antígeno, usando de suero hiperinmune no conjugado, demostrándose los sitios de reacción por medio de un segundo suero marcado para inmunoglobulina del primer suero. Es más sensible que la inmunofluorescencia directa en la detección de antígenos.

I.4.1.-PROCEDIMIENTO

1. Homogenizar la muestra agitándola en vórtex.
2. Repartirla en viales estériles y correctamente rotulados (tomar un vial para realizar la prueba y el resto conservarlos a -70°C).
3. Centrifugar a 3000 r.p.m. durante 10 minutos.
4. Eliminar el sobrenadante con pipeta Pasteur de 1mL (cuidar que no se elimine el sedimento).

5. Añadir 1mL de PBS y resuspender suavemente el sedimento.
6. Repetir los pasos 4 al 5 por dos veces más, cuidando siempre de no eliminar el sedimento y dejando en el último lavado dejar al menos 10 μ L de PBS para resuspender.
7. Añadir en cada pocillo de la lámina (limpia y previamente rotulada) una gota de la muestra (20 μ L aproximadamente) y observar al microscopio la presencia de células.
8. Secar (incubando a 37°C durante 1 hora o mejor temperatura ambiente mas tiempo).
9. Fijar la muestra embebiendo la lámina en un frasco Coplin con acetona previamente durante 10 minutos.
10. Secar (después de este paso, si no se va a continuar la técnica, las láminas deben ser conservadas a 4°C si la tinción se hará en dos días, si demora más, deben ser guardadas a -20°C en un porta láminas).
11. Añadir 20 μ L del anticuerpo monoclonal en cada depresión circular conteniendo muestra.
12. Incubar durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda.
13. Lavar rápido con PBS por tres veces (inclinando la lámina y dejar correr suavemente sobre la misma 1mL de PBS).
14. Realizar un lavado lento (introducir la lámina en un frasco con PBS durante 10 minutos).
15. Secar la lámina como en el paso 8.
16. Añadir 20 μ L del anticuerpo anti especie conjugado con fluoresceína en cada pocillo conteniendo muestra.
17. Repetir pasos del 12 al 15.
1. Añadir una gota del glicerol al 90% al centro y bordes de la lámina, y colocar un cubreobjetos.
18. Examinar la muestra en un microscopio de fluorescencia.

I.5.-LECTURA E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:

Ante la presencia de 5 o más células fluorescentes se informa el caso como positivo. En ausencia de células fluorescente (coloración roja) o por debajo de 5 células se informa el caso como negativo.

Referencias:

1. Edwin H, David A, Evelyne T. 1995. Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial, and Chlamydial infections. 7a edition. American Public Health Association.

II.-DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE LOS VIRUS: INFLUENZA A, B y C, VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL A y B y ADENOVIRUS EN MUESTRAS CLÍNICAS POR ENSAYO DE MULTIPLEX RT-PCR-ANIDADA.

Dra. Clara Savón Valdés

Los estudios clínicos epidemiológicos de los virus respiratorios están basados en el aislamiento y la serología. Como ya ha sido planteado en acápites anteriores es difícil recuperar algunos virus respiratorios en muestras clínicas por malas prácticas en el transporte o conservación de las mismas o debido a que muchas de ellas presentan una carga viral baja, por ejemplo en el hisopado nasofaríngeo de un niño menor de un año sólo se encuentran como promedio 2×10^4 ufp de VRSH por mL (1).

Por otro lado la presentación clínica de las infecciones por distintos virus respiratorios, pueden tener características muy similares, es por ello que el desarrollo de ensayos virológicos que permiten la rápida identificación, del agente etiológico son de gran interés para la toma de medidas terapéuticas.

Actualmente las técnicas de nested RT-PCR y PCR de tipo múltiplex son de gran utilidad. Entre sus principales ventajas, está la posibilidad de realizar un diagnóstico preciso aún en una muestra clínica no útil para el aislamiento viral, o bien la de incluir iniciadores capaces de detectar más de un virus en una sola reacción con buenos resultados (2).

La múltiplex RT-PCR anidada desarrollada por Coira y cols. en el 2003, es capaz de detectar y tipificar a la vez, diferentes virus respiratorios. Los iniciadores o cebadores fueron diseñados en regiones altamente conservadas de la nucleoproteína (NP) de los Influenzavirus, la proteína de fusión (F) del Virus Respiratorio Sincicial Humano (VRSH) y el hexón de los Adenovirus de los tipo 1-47. Los productos de amplificación de la PCR son específicos de cada uno de ellos y se pueden diferenciar por electroforesis en gel de agarosa al 3%, por ejemplo pueden observarse fragmentos de 661 pb para el VRSH tipo B, 363 pb para el VRSH tipo A, 301pb para el Influenza tipo A, 226 pb para el Influenza tipo B, 168pb para los adenovirus y 111pb para el virus de la Influenza C.

Este ensayo en su diseño incluye en el tampón de extracción un control interno de amplificación que permite excluir la presencia de falsos negativos en las muestras debidos a la presencia de inhibidores en la muestra o fallas en el proceso de extracción de ARN viral.

La sensibilidad del ensayo es elevada siendo posible obtener niveles de detección entre 0.1-0.01 TCID₅₀ para el virus de la influenza A y B, entre 1-10 moléculas de producto clonado amplificado para el influenza C. Para el VRSB A y B los niveles de detección son de 1-10 moléculas del producto amplificado y clonado y 1 molécula para el Adenovirus, fue el nivel de detección que se obtuvo para este último.

Su especificidad es muy alta no existiendo reacciones cruzadas con otros virus respiratorios, como Rinovirus o Parainfluenza tipo 1, 2, 3, 4 a y 4b (3).

Equipos :

- Gabinete de seguridad Clase II
- Centrifuga de viales refrigerada
- Vortex
- Congelador de -70°C
- Refrigerador o Cámara de 4°C
- Termociclador
- Cámara de electroforesis submarina con fuente
- Transiluminador y cámara fotográfica

Materiales y Reactivos:

Viales eppendorf de 2mL

Viales de PCR de 0.5mL

Micropipetas de 10,100,200,1000 μl

Puntas de PCR con filtro para micropipetas

Pipetas Pasteur

Guantes desechables

Tubos de 5mL plástico

Tubos universales de 50 mL

Batas

Glicógeno

Sarkosyl

Tiocianato de Guanidinio
Citrato de Sodio
Etanol 100 % (PA)
Isopropanol (PA)
Agarosa L M
Kit RT –Access (Promega n cat:1250)
Amplitaq Pol (Perkin Elmer)
dNTPs
MgCL2
Agua libre de ARNsa
Marcador de peso Molecular XIII (Roche)
Azul de Bromofenol

II.1.-EXTRACCIÓN DE ACIDOS NUCLEICOS VIRALES DE MUESTRAS CLÍNCAS RESPIRATORIAS.

PROCEDIMIENTO:

Se describe la extracción de acuerdo con el protocolo propuesto por Casas y cols. 1995 (4).

1. Dispensar en un vial eppendorf 200µL de la muestras clínicas y se adicionan 600µL de Buffer lisis (ver preparación). Incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
2. Añadir 600µL de Isopropanol preenfriado a -20°C ; agitar en Vortex y centrifugar a 13000 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C .
3. Eliminar el sobrenadante con pipeta pasteur desechable.
4. Añadir 1mL de etanol al 70% preenfriado preparado en el momento o alicuotado. Agitar ligeramente para limpiar el sedimento.
5. Centrifugar a 13000 r.p.m. durante 10-20 minutos a 4°C .
6. Eliminar el sobrenadante con una pipeta pasteur desechable sin dejar resto de alcohol . Secar perfectamente.
7. Resuspender en 15µL de H₂O libre de ARNsa.

REACTIVOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ACIDOS NUCLEICOS			
BUFFER LISIS CON CONTROL INTERNO			
Reactivos	Solución de Partida	Preparación	Concentración final de buffer
Tiocianato de Guanidinio	5M	5.91 gr+ 5.5mL H ₂ O para 10mL	4M
Citrato de Na	1M	14.71 gr hasta 50mL con H ₂ O ajustar pH=7 con Ac. Acético glacial	25mM
DTT	1M	1.54 gr +10mL de H ₂ O	1mM
Sarkosyl	3%	3 gr + 100mL de H ₂ O	0.5%
Glicógeno	20 mg/mL	concentración comercial	0.1mg/mL
Control Interno	2x10 ⁸ cop/μL	Hacer diluciones seriadas a 1/100 hasta 2x10 ⁶	2x10 ³ cop/μL

Otros Reactivos Necesarios		
Isopropanol	puro	Alicuotas de 5mL a -20 ⁰ C
Etanol al 70%	70mL + 30mL de H ₂ O	Alicuotas de 20 mL a -20 ⁰ C
	350 mL+150 mL de H ₂ O	
Agua libre de ARNsa	puro	aliquotas en eppendorf 1.5mL

II.2.-PRIMERA REACCION DE AMPLIFICACIÓN: RT/PCR

PROCEDIMIENTO:

Para la primera reacción de amplificación se utiliza el Kit de RT-PCR Access System (Promega n Cat a1250). Este Kit compatibiliza la Transcripción Inversa y la amplificación del c ADN degenerado.

1. Preparar la mezcla de reacción de acuerdo con lo que se muestra en el esquema 1. El volumen final de la reacción es de 50 μL /tubo (45μL de mezcla + 5μL de extracto de ARN). Las características de la mezclas son las siguientes:

2.-Mezcla previa de iniciadores o cebadores de sentido (+) y sentido negativo (-). Esto se prepara de manera que la concentración final de los iniciadores sea de 20 pmol/50µl de los reactivos. Los iniciadores se muestran en el esquema 3.

3.-La concentración óptima del SO_4Mg_2 es de 2mM y 300mM para los dNTPs de cada uno de ellos .

4.-Añadir 5µl del extracto de ARN, y dar un golpe de centrifuga a los tubos para que se mezcle el ARN con la mezcla de reacción. Llevar los tubos al termociclador.

Nota: Pueden prepararse lotes de 50 o 100 tubos de mezcla de reacción manteniéndolos congelados a $-70^{\circ}C$ hasta su uso.

Esquema 1

Protocolo de la RT/PCR Múltiplex

Mezcla de Reacción

Kit –RT Access	1 Tubo	10 Tubos			
H2O	23.36. µL	183.86µL			
Buffer AMVRT/TFL (5X)	10 µL	100 µL	RT	48 ⁰ C	45min
DNTPs(promega 10mM)	1.5 µL	15 µL		94 ⁰ C	2min
SO4Mg2(25mM)	4 µL	40 µL	PCR x 45 ciclos	94 ⁰ C	30seg
M1 (+)	2.14µL	21.14µL		50 ⁰ C	2min
M1(-)	2µL	20µL		68 ⁰ C	1min
AMVRtasa 5u/µL	1µL	10 µL	Elongación Final	72 ⁰ C	10min
TFLpolymerasa 5u/µL	1µL	10 µL		4 ⁰ C	
Cantidad total de Mezcla	40µL	400µL			

II.3.-SEGUNDA REACCION DE AMPLIFICACIÓN/PCR.

PROCEDIMIENTO:

Para la segunda reacción de amplificación los tubos deben prepararse de acuerdo al protocolo que se muestra en el esquema 2.

El volumen de la reacción es de 50µL /tubo (48µL de la mezcla de reacción y 2µL de ADN amplificado en la reacción de RT-PCR). Esta mezcla de reacción se prepara en el laboratorio partiendo de un Buffer 5X, que se describe en la Tabla 1.

Las mezclas de los iniciadores sentido positivo (+) y sentido negativo (-) se preparan previamente y deben quedar a una concentración de 20pmol /50µL de cada uno de ellos en la mezcla de reacción

Las concentraciones de los dNTPs será 200µM.

El Mg se le adiciona al Buffer con una concentración final 2mM

Tabla 1

BUFFER 5X para la PCR Anidada				
Reactivos	Lote	uso	2mL	20mL
Tris-HCl pH8.5	1M	300mM	600µL	6mL
(NH ₄) ₂ SO ₄	1M	75mM	150µL	1.5mL
MgCl ₂	25mM	10mM	800µL	8mL
H ₂ O			450µL	4.5mL

Esquema 2

Protocolo de la PCR Anidada

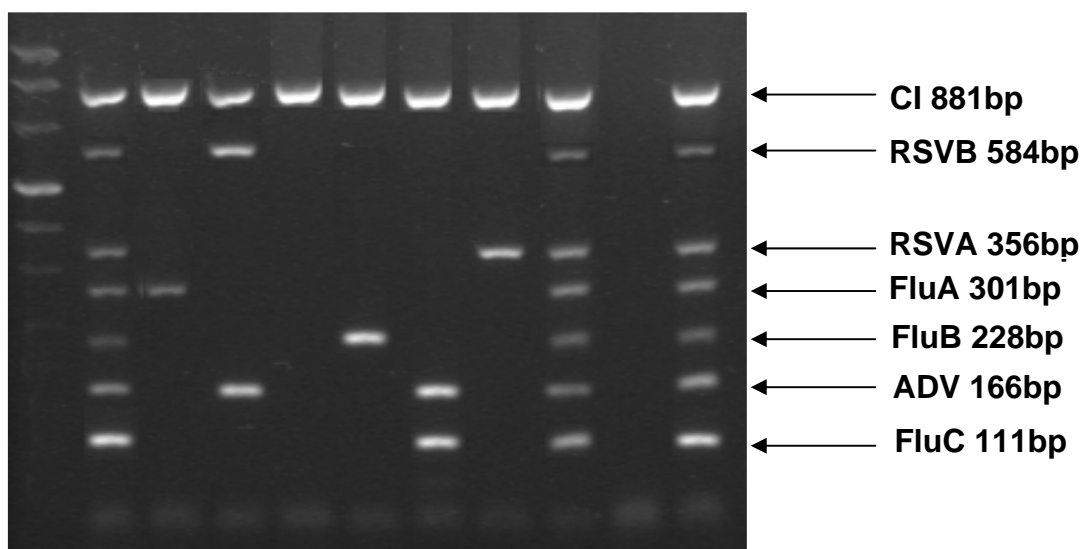
Mezcla de Reacción

	1 Tubo	10 Tubos			
H ₂ O	31.68µL	316.8µL			
5XB (pre y alicoutado)	10µL	100µL		95 ⁰ C	4min
dNTPs(Pharmacia-100mM)	0.4µL	40µL	PCR x35 ciclos	94 ⁰ C	30seg
M 2 (+)	2.95µL	29.5µL		55 ⁰ C	1min
M 2(-)	2.47µL	24.7µL		72 ⁰ C	30seg
Taq pol (Perkin Elmer)	0.5µL	2.5µL	Elongación Final	72 ⁰ C	10min
Cantidad Total de Mezcla	48µL	480µL		4 ⁰ C	forever

II.4.-VALORACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN:

Los Productos se revelarán por electroforesis en un gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidium (solución de bromuro de etidium 0.1 mg/mL , en 100mL de TBE). Las bandas correspondientes a los diferentes virus serán visualizadas en un transiluminador de luz UV. En la figura 1 se pueden observar fragmentos de 661 pb para el VRSH tipo B, 363 pb para el VRSH tipo A, 301pb para el Influenza tipo A, 226 pb para la influenza tipo B, 168pb para los adenovirus y 111pb el virus de la Influenza C.

MULTIPLEX PCR PARA VIRUS RESPIRATORIOS



II .5.-PRECAUCIONES PARA EVITAR CONTAMINACIONES:

Debido a la alta sensibilidad de la PCR anidada deben tomarse precauciones para excluir la posibilidad de contaminación de los tubos de reacción con productos previamente amplificados o ARN o ADN procedente de otras muestras y controles. La preparación de alícuotas de las muestras respiratorias, la preparación de los reactivos el procesamiento de las muestras y la PCR anidada deben ser realizadas en cabinas situadas en laboratorios separados , todo ello alejado de la Zona donde se analizan los productos amplificados. Cada cabina debe estar equipada con un juego independiente de reactivos , micropipetas , tubos de reacción esterilizados y puntas de pipetas con filtro.

II .6.-PREPARACIÓN DEL CONTROL INTERNO DE LA MULTIPLEX RT-PCR DE VIRUS RESPIRATORIOS CLONADOS EN E. COLI.

Plásmidos clonados en E. coli

pGemT A	Influenza A
pGemT B	Influenza B
pGemT C	Influenza C
pGemT RSA	VRSA
pGem T RSB	VRSB
pGemT CI	Control Interno

guardados a -70°C con 50% de glicerol

Cultivo bacteriano

Se utilizan 10 mL medio de LB en universales. se inoculan con asa en mechero y se dejan en agitación a 37°C durante toda la noche.

Extracción de los Plásmidos de las bacterias

Para ello se utilizan columnas Wizard de Promega y se siguen las orientaciones del fabricante.

Linearización del Plásmido

	Vol 50 μL	Vol 100 μL	Vol 200 μL
ADN purificado cerrado	20 μL	40 μL	80 μL
buffer H 10X	5 μL	10 μL	20 μL
Sal I	1 μL	2 μL	4 μL
H ₂ O bidestilada	24 μL	48 μL	96 μL

Incubar a 37°C en baño de agua o en el termociclador durante 2.5 horas

Incubar a 65°C durante 5min.

II.7.-OLIGONUCLEOTIDOS UTILIZADOS: ESQUEMA 3

Oligonucleótidos RT/PCR de sentido directo (M1+) o inverso (M1-)		
M1 +	NPAC11+	GAACTCRTCCYWWATSWCAAWGRRGAAAT
M1 +	NPB1+	ACAGAGATAAAGAAGAGCGTCTACAA
	RSFAB41+	ATGGAGYTG CYRATCCWCARRRCAARTGCAAT
	RTS	GCTTGGGCGTGTCTCAAATCT
	ADV1F+	CAACACCTAYGASTACATGAA
M1 -	NPABC22-	ATKGC GCWYRAYAMWCTYARRTCTTCAWAKGC
	RSFAB51-	AGGTGTWGTTACACCTGCATTRACACTRAATTC
	RTA-	GTCGCCACGGTTGATGAGAGCT
	ADV1R-	KATGGGGTARAGCATGTT

Oligonucleótidos de la PCR Anidada		
	NPAB3 +	GATCAAGTGAKMGRRAGYMGRAAYCCAGG
M2 +	NPC3+	AAATTGGAATTTGTTCCTTTCAAGGGACA
	RSFA8+	TTATACTCAACAATRCCAAAAAWACC
	RSFB112+	ATCTTCCTAACTCTTGCTRRTTAATGCATTG
	NS	GGGGTGT TATGAGCCATATTCAACGG
	ADV2F+	CCCITTYAACCACCACCG
M2 -	NPAC4 -	TCTTCAWATGCARSWSMAWKG CATGCCATC
	NPB4 -	CTTAATATGGAAACAGGTGTTGCCATATT
	RSFA10 -	AAATTCCTGGTAATCTCTAGTAGTCTGT
	RSFB133B -	GATGCGACAGCTCTGTTGATTTACTATG
	NA	AGCCGCCGTCCCGTCAAGTCAG
	ADV2R -	ACATCCTTBCKGAAGTTCCA

II .8.-SOLUCIONES :

Tampón de electroforesis. TBE 5X pH 8.0

TRIS	54g
ACIDO BORICO	27.5g
EDTA	20mL *
H2O C.S.P.	1000 mL

*20mL de EDTA 0.5M

Nota :para preparar TBE 1X tomar 200 mL de TBE 5X y completar con 800 mL de agua.

Tampón muestra 6X

EDTA	500mM
Glicerol	10%
Azul de Bromofenol	0.01%

Gel de Agarosa al 3%

Agarosa	3gr
TBE IX	100 mL
Bromuro de Etidium*	0.1µg/mL

Referencias:

- 1.-Smith Mc, CreutzC, Huang YT. Detection of Respiratory Syncytial Virus in nasopharyngeal secretions by Shell vial assay. J Clin Microbiol.1991;21:29-30.
- 2.-Weige J A, Puppe W, Grondhal B, Schmidt H. Epidemiological investigation of nine respiratory pathogens in hospitalized children in Germany Using Multiplex reverse Transcriptase Polymerase Chain reaction. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000;19:336-343.
- 3.-Coira MT, Pérez-Breña P, Garcia ML , Casas I. Simultaneous detection of Influenza A, B, And C viruses Respiratory Syncytial Virus and Adenovirus in clinical samples by Multiplex Reverse Transcription Nested - PCR Assay. J Virol Methods 2003;69:132-144.
- 4.- Casas.I,Powell L, Klapper Pe, Cleator GM New methods for the extraction of viral ARN and ADN from cerebrospinal fluid for use in polymerase chain reaction .J Virol Methods 1995,53:25-36.
- 5.-Maniatis T, Sambrook J, Fritsch E.F. Molecular Cloning . Laboratory Part III Second ed 1989.

VII. VIRUS INFLUENZA.

Dra. Suset Oropesa Fernández

INTRODUCCIÓN.

Clasificación. Nomenclatura. Descripción de la enfermedad. Estructura. Morfología.

Los virus de la Influenza, pertenecen a la Familia Orthomyxoviridae, que se divide en cuatro Géneros Virus de Influenza A, Influenza B Influenza C y el género Thogota. (trasmitidos por garrapatas). La nomenclatura es descriptiva e incluye lo siguiente: Tipo (basado en la especificidad antigénica de la nucleoproteína y la proteína matriz), huésped de origen, (no se indica en los aislamientos humanos, si en los aislamientos de animales y objetos inanimados), origen geográfico, número de registro de la cepa y año del aislamiento. Para el tipo A, se señala al final y entre paréntesis, las características antigénicas de la hemaglutinina y la neuraminidasa. Para los virus tipo B y C, no se señala. Ejemplos: A / Habana/ 817/ 85 (H3N2), B/Beijing/184/93 y C/París/1/67.

El cuadro gripal clásico se presenta abrupta o súbitamente con síntomas sistémicos y comunes que incluyen fiebre alta, malestar general, escalofríos, dolor de cabeza, mialgias, postración y síntomas respiratorios como: tos seca, estornudos, secreción nasal abundante, enrojecimiento de la conjuntiva, dolor de garganta y adenopatías cervicales. Pueden incluirse otros síntomas como la anorexia, síntomas gastrointestinales como las náuseas, vómitos, diarrea particularmente en niños pequeños. La recuperación es total en un periodo de 2 a 4 semanas. (1)

Pueden observarse también síntomas de faringitis, laringitis, traqueobronquitis, laringotraqueobronquitis (croup), o bronquitis, otitis, y sinusitis.

Las complicaciones más importantes de esta enfermedad son: la neumonía viral primaria, bacteriana secundaria y una combinación de ambas. Se reporta también el Síndrome de Reyé, encefalopatía aguda con una tasa de mortalidad alta (10-14%), (2, 3)

Los virus influenza poseen genoma de tipo ARN, de simple cadena y polaridad negativa. Son pleomórficos, miden de 80 a 120 nm de diámetro, simetría helicoidal, se cubren de una membrana lípida y en ella se insertan las glicoproteínas HA y NA, que determinan el alto grado de variabilidad del virus.

El virión de Influenza, está constituido por diez proteínas estructurales diferentes: la Hemaglutinina (HA), la Neuraminidasa (NA), la nucleoproteína (NP) ,la

ribonucleoproteína, nucleocápsida o RNP (reunión de la NP con el ARN viral), las tres grandes proteínas PB2, PB1 y PA, que forman el complejo polimerasa, la proteína matriz (M1) y la proteína M2.

Existen además dos proteínas virales no estructurales (NS). De ellas la NS1 sólo se detecta en células infectadas, mientras NS2 se ha identificado recientemente asociada a la M1.

Se han identificado 15 subtipos de proteínas HA y 9 NA (humanas y animales).

La proteína HA, es el principal antígeno del virus, contra el cual va dirigida la respuesta inmune neutralizante (anticuerpos protectores). Además, su variabilidad antigénica que se traduce en la aparición de nuevas cepas, la convierte en el principal factor desencadenante de las epidemias y pandemias de gripe.

La Neuraminidasa, es importante como antígeno, aunque los anticuerpos anti-NA, no son neutralizantes, salvo a altas concentraciones. Sin embargo reducen tanto el título del virus, como las lesiones en pulmón. Su variabilidad antigénica es alta (4).

Una característica de los virus con genoma ARN es su alta variabilidad genética y antigénica, lo que acarrea que la infección se desarrolle generalmente en forma de brotes epidémicos y ocasionalmente pandemias, con altos índices de morbilidad y grandes costos económicos.

La más devastadora pandemia del siglo XX (1918-1920) fue la “gripe española” (virus AH1N1), se desarrolló el más grave conflicto epidémico del que se tenga constancia histórica, afectó al 50% de la población mundial y causó más de 20 millones de muertes.

En épocas recientes se han documentado otras importantes pandemias (1957-1958, la “gripe asiática”(virus AH2N2), y en 1968, la “gripe de Hong Kong” (virus AH3N2). En 1977-1978 el virus (AH1N1) comienza de nuevo a circular y a partir de esta fecha continúan circulando en el mundo, los virus A(H1N1), A(H3N2) y el tipo B. (6) (7).

En 1997- 98, se detectó en humanos, la gripe aviar A (H5N1),causando una alta mortalidad. Los virus del tipo A, pueden infectar además del ser humano, a caballos, cerdos, y una larga variedad de aves; mientras que el tipo B infecta humanos solamente.(5)

La infección por influenza es causa substancial de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, y resulta extremadamente difícil encontrar una solución actual, que no sea limitada a su prevención con vacunas y a la medicación frente a los síntomas.

Para la profilaxis se emplean antivirales y vacunaciones anuales que se ajustan todos los años a las cepas circulantes. En casos especiales pueden aconsejarse antivirales para complementar la acción de la vacuna.

La OMS recomienda hoy vacunas trivalentes e inactivadas constituídas por los antígenos superficiales purificados, el principal método de prevención de la influenza siendo particularmente importante para aquellos que tienen el riesgo de sufrir complicaciones. (1).

REFERENCIAS

1. Oropesa S. Orthomixovirus. En: Llop A, Valdes-Dapena M, Zuazo J. Primera Edición. Microbiología y Parasitología Médicas. Editorial Ciencias Médicas.Cuba, 2001.
2. Couch R B, Kasel J A. Influenza. En: Lennette E H, Lennette D A, Lennette E, editores. Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. 7ª. Ed. USA: American Public Health associations, 1995.
3. Ward MR. Reye's syndrome: an update. Nurse pract. 1997; 22:45-6, 49-50, 52-3.
4. Murphy B, Robert G. Orthomixoviruses: Influenza. En: Fields BN, Knipe DM, Howley P. Fields Virology. Volumen 1. New York: Lippincott-Raven, 1996.
5. Shortridge KF. Pandemic Influenza: A zoonosis? Semin Repir Infect 1992;7(1): 11-25.
6. Wu X, Cox N, Bender C, Regnery H, Shaw M. Genetic variation in Neuraminidase genes of influenza A H3N2 viruses. Virology. 1996; 224: 175-83.

I.-AISLAMIENTO DE LOS VIRUS DE INFLUENZA.

El aislamiento de un virus es una técnica de alta sensibilidad y muy útil para el diagnóstico de las infecciones virales cuando se obtienen muestras con la calidad requerida, dentro de los parámetros ya señalados. El cultivo celular presenta la ventaja de amplificar en gran escala el virus para poder utilizarlo en pruebas de caracterización antigénica, genética o pruebas de susceptibilidad a medicamentos.

Las células MDCK (Madin-Darby canine Kidney), son las más apropiadas para el aislamiento del virus de influenza. También pueden ser utilizados los cultivos primarios de riñón de monos rhesus (RMK) y la línea continua LLC-MK2. El uso de los sistemas celulares requiere la presencia de tripsina para activar las moléculas de HA y garantizar la penetración viral (1, 2).

El efecto citopático (ECP) que producen estos virus no es patognomónico y puede no aparecer hasta después de múltiples pases, siendo sugestivo de la presencia de los virus de

influenza. Debe ser demostrados por la hemadsorción en la monocapa celular con eritrocitos de curiel, o la hemaglutinación del medio de cultivo celular utilizando una solución de eritrocitos de curiel, pollo, o humanos del grupo “O”, o por IF (3, 4).

El virus de influenza también se aísla en huevos embrionados (9-10 días), inoculando la muestra en la cavidad amniótica del embrión. Aunque este resulta un sistema hospedero animal simple, económico y utilizado en muchos laboratorios, pero actualmente se prefiere el cultivo celular (5).

I.1.-AISLAMIENTO EN CULTIVOS CELULARES. (6) (7)

EQUIPOS.

Gabinete de seguridad Clase II.

Incubadora 37 °C.

Refrigerador (4 °C).

Congelador (- 70 °C).

Centrífuga refrigerada.

Microscopio óptico invertido.

Microscopio para Inmunofluorescencia.

Materiales y Reactivos:

Tripsina, TPCK (tipo XIII de páncreas bovino).

Dulbecco's Modificado Medio Eagle. (D-MEM).

Albúmina bovina fracción V, solución 7,5%.

Solución stock de estreptomycin- penicilina. (10,000U/mL penicilina G; 10,000 µg/mL de sulfato de estreptomycin).

Solución stock de buffer Hepes 1M.

Frascos plásticos. (25 y 75 cm²)

Tubos de cultivo, plásticos con tapa de rosca o de cristal con tapones de goma.(12 x 75).

Gradillas de tubos de cultivo.

Tubos de centrífuga (de al menos 15 mL)

Monocapa confluyente de células MDCK-L (ATCC), en frascos o tubos.

Pipetas 10 mL, 1 mL

Placas de microtitulación (fondo en U).

Anticuerpos monoclonales anti influenza A H3N2, A H1N1 y tipo B o al menos frente a los tipos Influenza A y B.

Muestras clínicas.

I.1.1.-PROCEDIMIENTO.

Este procedimiento debe ser realizado en un Gabinete de Seguridad Clase II.

I.- Preparación de los tubos de cultivo de tejidos.

- 1.- Utilizar monocapas recientes, y confluentes en los tubos que se utilizaran para la inoculación. Chequear al microscopio con una magnificación de 40x.
- 2.- Eliminar el medio de cultivo de los tubos y lavar la monocapa 1 mL del medio D- MEM sin suero.

I.1.2.-Inoculación en los tubos de cultivo.

- 1 Inocular 200 μ L de la muestra por cada 2cm de monocapa celular, usando pipetas estériles. Generalmente 2-4 tubos por cada muestra clínica.
- 2- Añadir 200 μ L del medio completo a dos tubos, que serán los controles celulares.
- 3.- Centrifugar a 2000 r.p.m. por 45 minutos a temperatura ambiente. De no poderse realizar la adsorción por centrifugación, dejar a temperatura ambiente 1 hora.
- 4.- Eliminar el inóculo y añadir 1 mL de medio de mantenimiento D-MEM, sin suero y con tripsina.
- 5.- Incubar a 37 °C
- 6.- Observe al microscopio diariamente para verificar alguna manifestación de efecto citopatogénico (E.C.P.).

Preparación de Solución de Tripsina para incorporar al medio de cultivo

2.5 gr de tripsina (Tripsina Sigma T-8253)

1 gr glucosa

Solución stock rojo fenol al 1 %

100 mL PBS 10X

Diluir en agua destilada hasta algo menos de 1 L

Ajustar el pH hasta 7.4 con NaOH 0.1 N. Enrasar a 1 L

Esterilizar por filtración

Guardar a -20°C

Utilizar a concentración final 1/1000 – 2000 en el medio de mantenimiento Tagle MEM.

I.1.3.-Cosecha.

1.- En caso de observar algún cambio morfológico en cultivo coleccionar el líquido sobrenadante. Realizar la prueba de hemadsorción (Had) a uno de los tubos inoculados, el que se lavará dos veces con medio de cultivo o PBS estéril. Añadir 1mL de una solución de hematíes de curiel e incubar a temperatura ambiente (TA), lavar dos veces con PBS y observar al microscopio del virus. Ó realizar inmunofluorescencia con anticuerpos monoclonales para confirmar crecimiento del virus.

2.- Un segundo tubo debe ser guardado a -70°C para un nuevo pase que permita obtener mayor cantidad de virus para identificar por Inhibición de la Hemaglutinación (IHA).

3.- Si no se observa ECP, se debe esperar al menos 5 –9 días para realizar la Had y la IFI.

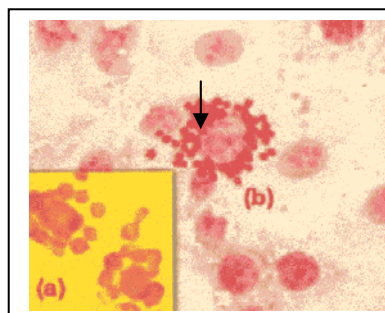
- Si estas pruebas son negativas, realizar dos pases ciegos, como se refiere desde el paso 1 hasta el 6. Antes de dar por negativa la muestra debe repetirse la Had y la IFI.

4.- Si se observa ECP, realizar IFI, Had.

- Si estas pruebas dan positivas, en alguno de los días señalados, tomar una alícuota del medio de cultivo y titular por HA.
- Si la HA es ≥ 8 , identificar por IHA.
- Si la HA es ≤ 4 , congelar y volver a pasar.

Si es necesario, centrifugar los tubos a 3000 r.p.m. durante 5 minutos para eliminar las células.

HEMADSORCION EN CULTIVO CELULAR.



Consideraciones especiales

Los virus de influenza aislados deben ser enviados a un Centro Nacional de Referencia de cada país, que a su vez seleccionará los aislados que deban ser analizados en el Centro Colaborador de Referencia e Investigación de la OMS, correspondiente a cada región del mundo.

No se deben procesar nunca al mismo tiempo, muestras clínicas y cepas de referencia o adaptadas al laboratorio a fin de evitar contaminaciones cruzadas.

I.1.4.-Solución de eritrocitos al 0,2 %.

Se prepara la solución lavando 3 veces el paquete de eritrocitos de curiel con PBS pH 7.2, centrifugando a 1500 r.p.m., durante 5 minutos entre cada lavado.

-Tomar 200 μ L del paquete compactado de eritrocitos.

-Mezclar con PBS. (pH 7,2) c.s.p.....100 mL.

-Guardar a 4° C., hasta su uso.

I.2.-AISLAMIENTO EN HUEVOS EMBRIONADOS. (6)(7)

Equipos.

Incubadora 34° C.

Refrigerador (4° C).

Congelador (- 70° C).

Centrífuga.

Cámara para observación de los huevos embrionados.

Materiales y Reactivos:

Huevos de embrionados de 9-11 días, de cáscara blanca (raza White Leghorn).

Etanol al 70%.

Jeringuillas de 1mL.

Agujas, No. 22, por 1 ½ pulgadas.

Punzón.

Parafina.

Frascos o tubos con capacidad para 15 mL.

Pipetas de 10 mL.

Pinzas.

Rotulador.

Crioviales.

Placas de microtitulación de 96 pozuelo, fondo en U.

Antibióticos.

Suspensión de eritrocitos de pollo y curiel.

Reactivos necesarios para la prueba de HA (Soluciones salinas y antisueros).

Reactivos necesarios para la prueba de IHA (Soluciones salinas y antisueros).

I.2.1.-Preparación de reactivos.

1.- etanol al 70%.

Alcohol etílico.....70 mL.

Agua destilada (c.s.p.).....100 mL.

Mezclar las 70 partes de alcohol con 30 partes de agua destilada.

Guardar a temperatura ambiente, el frasco debe estar bien tapado.

2.- Suspensión de eritrocitos (gallo al 0.5 % y curiel 0.2 %)

La extracción de sangre se describe en el apartado II. 1.2. Soluciones de la sección II.1.

CARACTERIZACION ANTIGENICA DE VIRUS INFLUENZA.

A partir de la sangre extraída con anticoagulante, se prepara la suspensión lavando 3 veces el paquete de eritrocitos con PBS pH 7.2, centrifugando a 1500 r.p.m. durante 5 minutos entre cada lavado

Tomar 500 μ L (sangre de gallo) o 200 μ L (sangre de curiel).

Mezclar con PBS. (pH 7,2) c.s.p.....100 mL

Guardar a 4°C., hasta su uso.

I.2.2.-Procedimiento.

Este procedimiento debe ser realizado en un gabinete de seguridad Clase II. Los huevos fértiles, deben estar certificados como libres de patógenos, incubados en cámara húmeda a 37.5° C.

1.- Revisión de los embriones. (Ver Figura No.1).

- 2.- Marcar la cámara de aire y el ojo del embrión (será la zona más oscura).
- 3- Descarte los huevos no fértiles, sin el tamaño requerido, muertos o cuando aparezcan poros en la cáscara.
- 4.-Colocar los huevos con la cámara de aire hacia arriba y marcarlos con el número de muestra correspondiente para su identificación.(4 embriones por muestra).
- 5.- Limpiar la zona de la cámara de aire con algodón o hisopo de gaza y alcohol al 70%.
- 6.-Puncionar la cámara de aire abriendo un pequeño orificio por donde posteriormente se inoculará.
- 7.- Aspirar 1 mL de la muestra clínica, con una jeringuilla de tuberculina, No.22 y aguja de 1 1/2 pulgada.
- 8.- Colocar el embrión en la mano en un ángulo de 45°e insertar la aguja en dirección del ojo del embrión para inocular la muestra en cavidad amniótica.
- 9.- Descargar 100 µL del inóculo dentro de la cavidad amniótica, retirar la aguja descargar los otros 100 µL en cavidad alantoidea. Retirar la aguja.
- 10.- Inocular de igual forma el resto de los embriones.
- 11.- Descartar la jeringuilla en un recipiente de seguridad.
- 12.- Sellar los orificios en la cámara de aire con parafina o algo similar.
- 13.-Incubar los huevos embrionados a una temperatura entre 33 / 35 °C por 48/ 72 horas, en atmósfera húmeda. (De los embriones inoculados, incubar unos por 48 horas para la multiplicación de los virus AH3N2 y dejar el resto por 72 horas, para la multiplicación de los virus AH1N1 y tipo B).

I.2.3.- Cosecha.

- 1.- Colocar los huevos embrionados a 4° C durante toda la noche, antes de la cosecha.
- 2.- Rotular los tubos para cada huevo embrionado con el número correspondiente.
- 3.- Limpiar la zona de la cámara de aire con algodón o hisopo de gaza y alcohol al 70%.

- 4.- Abrir la cámara de aire con tijeras estériles. Romper la membrana alantoidea, con una pinza estéril y coleccionar con una pipeta de 10 mL el líquido alantoideo, colocándolo en uno de los tubos o frascos rotulados. El líquido amniótico debe ser coleccionado con una jeringuilla y aguja, y debe colocarse en otro frasco o tubo (la cantidad de líquido amniótico obtenido es poca, puede unirse a la cantidad aspirada de todos los embriones de la misma muestra analizada). Debe realizarse prueba de esterilidad a los líquidos coleccionados.
- 5.- Los líquidos amnióticos y alantoideos coleccionados deben guardarse a 4 °C hasta realizar la prueba de hemaglutinación.
- 6.- Si la hemaglutinación es negativa pasar la muestra dos veces más antes de reportarla como negativa.
Si es positiva, el título de la HA es ≥ 8 , identificar por IHA.
Si la HA es ≤ 4 , congelar y volver a pasar.
- 7.- Si es necesario, debe centrifugarse a 3000 r.p.m. para eliminar el exceso de sangre y membranas del embrión.
- 8.- La identificación de los aislamientos se realiza mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación y el aislamiento debe ser guardado a -70° C.

Precauciones

No guardar nunca los aislamientos a -20° C. Los virus de influenza son muy inestables a esta temperatura.

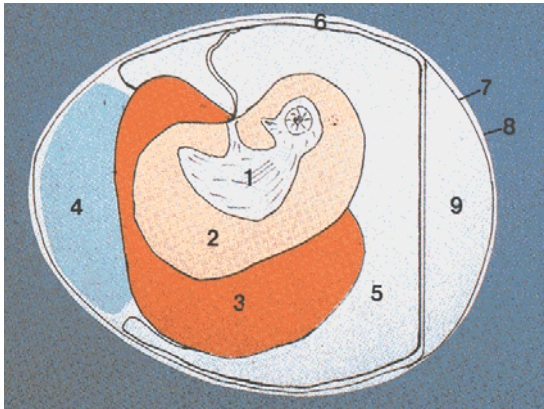
Nunca procesar muestras clínicas y cepas adaptadas al laboratorio al mismo tiempo. Esto evitará contaminaciones.

Nunca procesar muestras de humanos y animales en el mismo laboratorio.

Deben ser procesados por diferente personal y en diferentes laboratorios.

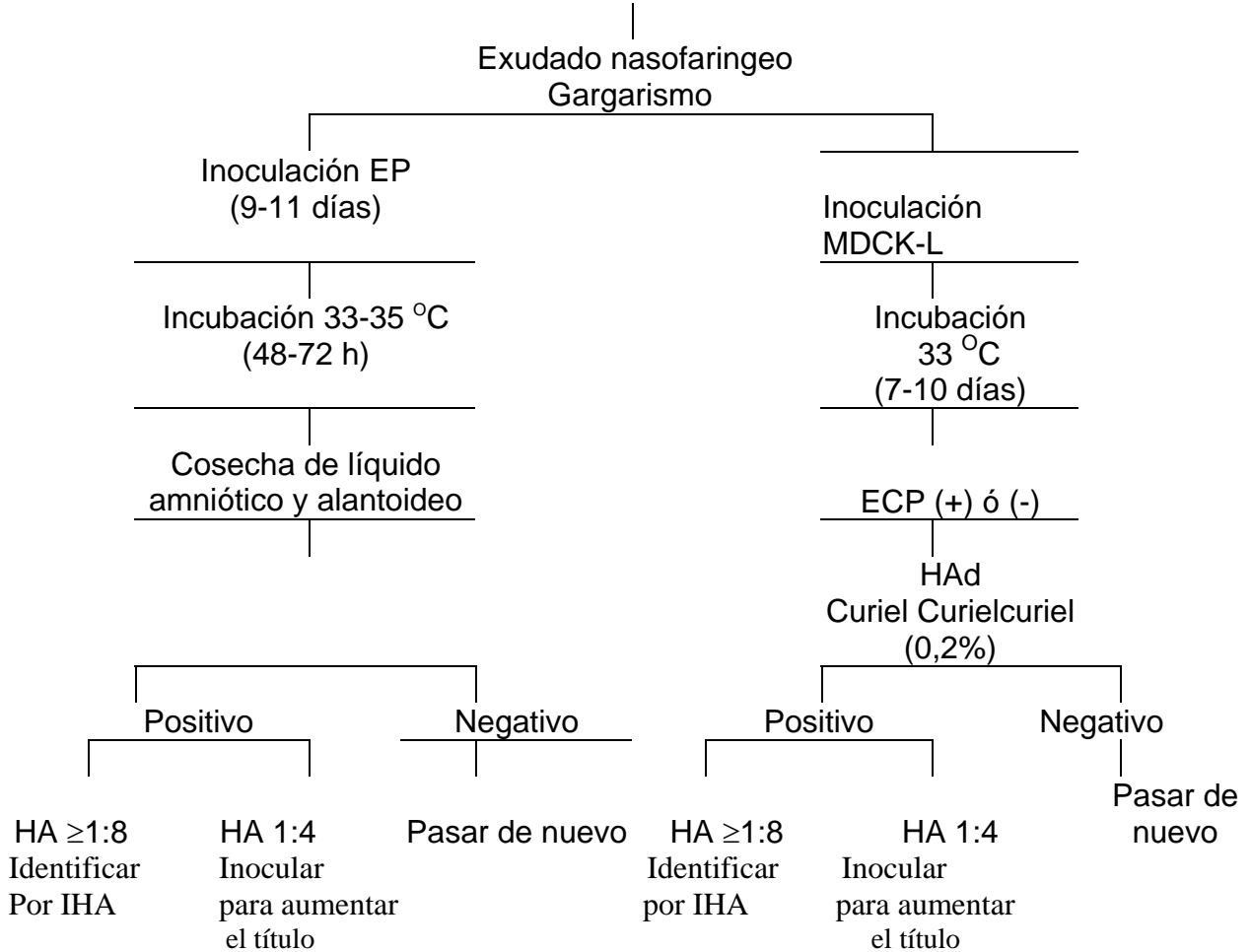
Los virus de Influenza aislados deben ser enviados a un Centro Nacional que a su vez los enviará a los Centros de Referencia Internacional.

FIGURA No. 1 ESQUEMA DE HUEVO EMBRIONADO (9 DÍAS).



1. Embrión.
2. Cavidad amniótica.
3. Saco vitelino (yema).
4. Albúmina (Clara – parte blanca).
5. Cavidad Alantoidea.
6. Membrana corioalantoica.
7. Membrana externa del huevo.
8. Cáscara.
9. Saco de aire.

ESQUEMA PARA EL AISLAMIENTO DE VIRUS DE INFLUENZA



Fuente: Dowdle W, Coleman M, Shild G. Advanced laboratory techniques for influenza diagnosis. Immunology series No.6 Part.2: Procedural guide US Department of Health Educat. and Public Health Service. 1975:25-26

Referencias:

- 1- Murphy B, Robert G. Orthomixoviruses: Influenza. En: Fields BN, Knipe DM, Howley P. Fields Virology. Volumen 1. New York: Lippincott-Raven, 1996.
- 2.- Jawetz E, Melnick J, Adelberg E. Manual de microbiología médica. 14ª. Ed. México: El manual moderno, 1996: 555-567.
- 3- Couch R B, Kasel J A. Influenza. En: Lennette E H, Lennette D A, Lennette E, editores. Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. 7ª. Ed. USA: American Public Health associations, 1995.
- 4- Oropesa S. Orthomixovirus. En: Llop A, Valdes-Dapena M, Zuazo J. Primera Edición. Microbiología y Parasitología Médicas. Editorial Ciencias Médicas.Cuba, 2001.

II.-HEMAGLUTINACIÓN E INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN.

Los virus influenza tienen su superficie cubierta de espículas formadas por la proteína hemaglutinina (HA, que tienen la propiedad de aglutinar diferentes eritrocitos o glóbulos rojos (pollo, ganso, curiel, humanos del grupo "O", carnero, etc.), derivando su nombre de esta característica. (1)

La unión específica del anticuerpo al sitio antigénico en la molécula de la hemaglutinina interfiere con el enlace de la HA viral con los receptores en los eritrocitos, denominándose a este efecto inhibición de la hemaglutinación (IHA) (2)

La prueba de inhibición de la hemaglutinación fue descrita por Hirst en 1942 y luego modificada por Salk en 1944. Se realiza en placas de microtitulación, mezclándose una cantidad estandarizada de antígeno con antiseros diluidos en forma seriada doble. Posteriormente se añaden eritrocitos para determinar una unión específica del anticuerpo a la molécula HA (3) (4) (5)

Es una técnica extremadamente confiable, pero es requisito indispensable que los antiseros de referencia se preparen basándose en las cepas vacunales, que son las cepas que circulan anualmente de forma mayoritaria en todo el mundo, a fin de poder obtener resultados comparativos.

En sentido general puede ser utilizada en la detección de anticuerpos contra la HA de diferentes cepas de virus de influenza, en la caracterización de nuevos aislamientos y para demostrar la efectividad de la vacuna antigripal (6, 7, 8).

II.1.-CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA DE LOS VIRUS DE INFLUENZA.

El primer paso para la caracterización de los virus influenza es la diferenciación en los tipos A y B y posteriormente es preciso determinar los subtipos dentro del tipo A.

Este análisis se hace tradicionalmente por la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación (IH), utilizando antisueros específicos. Después del aislamiento, generalmente son necesarios uno o más pases del virus en huevos embrionados o en cultivos celulares, para obtener títulos hemaglutinantes suficientemente altos, que permitan realizar la IH (3, 4,5)

Ventajas:

Tiene una alta sensibilidad y especificidad

Simple, bajo costo, rápida.

Elevada reproducibilidad.

Desventajas:

Tratamiento para eliminar los inhibidores inespecíficos, que se encuentran normalmente en los sueros

Comprobar las 4 unidades hemaglutinantes del antígeno cada vez que se efectúa la prueba.

Experiencia del personal para leer la prueba e interpretarla.

Equipos.

Baño de agua 37 °C.

Baño agua 56 °C.

Centrífuga.

Materiales y Reactivos.

Placas de microtitulación de 96 pozuelos.

Costar #3897: V- Para usar con eritrocitos de pollo o de ganso.

Costar # 3797 U - Para usar con eritrocitos humanos tipo O, o de curiel.

Micropipetas y pipeta multicanal y puntas.

Tubos de centrífugas graduados (50 mL y 15 mL).

Tubos de 50 mL para preparar las diluciones de antígenos.

Gradillas.

Antisueros específicos

Estuche de reactivos de la OMS (suministrado a los Centros Nacionales de Influenza)

Sangre en solución de Alsever (pollo, curiel, ganso, humanos del grupo O).

Agua destilada y desionizada estéril.

Solución salina fosfatada (0,01M), pH 7,2 (PBS).

Solución salina normal, (NaCl al 0,85 %).

II.1.1.- Estuche de reactivos de la OMS.

El estuche de reactivos de referencia de influenza es preparado con las cepas vacunales seleccionadas para cada temporada y distribuido anualmente a los Centros Nacionales de Influenza Colaboradores de la OMS.

El estuche contiene reactivos para la identificación de los virus tipo A, subtipos A(H1N1) y A(H3N2) e influenza tipo B, así como reactivos para el diagnóstico serológico.

Los antisueros de referencia utilizados en la identificación de los aislamientos son preparados en carneros, mediante un esquema de inyecciones múltiples con HA purificadas de las cepas vacunales, o en pollos por inoculación intravenosa con virus multiplicados en huevos embrionados. Los controles de antígenos consisten en líquido alantoideo inactivado con beta-propiolactona.

Reactivos que contiene el estuche:

a) Reactivos para la identificación de aislamientos tipo A y diagnóstico serológico.

Control de antígeno Influenza A (H3N2).

Antisuero de referencia Influenza A (H3N2).

Control de antígeno Influenza A (H1N1).

Antisuero de referencia Influenza A (H1N1).

b) Reactivos para la identificación de aislamientos tipo B.

Dos juegos de reactivos son distribuidos para distinguir los aislamientos del tipo B: (linaje B/Panamá/45/90 y linaje B/Victoria/2/87).

Control de antígeno Influenza B/Beijing/184/93- semejante a (linaje B/Panamá/45/90).

Antisuero de referencia frente a Influenza B/Beijing/184-/93- semejante a B/Panamá/45/90).

Control de antígeno Influenza B/Guangdong/8/93-semejante a (B/Victoria/2/87).

Antisuero de referencia frente a Influenza B/Guangdong/8/93- semejante a (B/Victoria/2/87).

c) Reactivos para el diagnóstico serológico de influenza tipo B (SOLAMENTE)

Control de antígeno Influenza B/Beijing/184/93 (tratado con éter).

Control de antígeno Influenza B/Guangdong/8/93 (tratado con éter).

d) Otros reactivos.

Control de suero negativo.

Enzima destructora de receptores. (EDR).

II.1.2 SOLUCIONES

1.- Solución Salina Fosfatada (0,01M), pH 7,2 (PBS).

- Preparar una solución patrón 25 veces concentrada (25X).

Solución tampón de fosfato conteniendo en 100 mL:

- Fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4).....2,74 g
- Fosfato monobásico monohidratado de sodio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$).....0,79 g
- Preparar PBS para 1 litro, mezclando y disolviendo en agua destilada y desionizada.
 - PBS 25X (Solución tampón de fosfato).....40 mL.
 - Mezclar bien.
 - Chequear el pH= 7,2 +/- 0,1)
 - Ajustar el pH con NaOH 1N o HCL 1N, si fuera necesario.
 - Autoclavear a 21 lbs. durante 15 minutos, o filtrar (poro 0,22 μm .)
 - Guardar a 4 °C, por un período no mayor de 21 días.

2.- Solución de Asever para la extracción de sangre.

- dextrosa.....20,5 g
- citrato de sodio deshidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)..... 8g
- cloruro de sodio (NaCl)..... 4,2 g
- Acido cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$).....0,55 g
- Disolver en agua destilada (c.s.p.).....1000 mL
- Mezclar bien.
- Chequear el pH = 6,1 (+/- 0,1.)
- Ajustar el pH con NaOH 1N o HCL 1N, si fuera necesario.
- Autoclavear a 21 lbs. durante 15 minutos, o filtrar (poro 0,22 μm .)

3.- Solución Salina Fisiológica (Na Cl al 0,85%)

NaCl 0,85 gramos

Disolver en agua destilada (c.s.p.).100 mL.

4.- Enzima Destructora de Receptores.

Reconstituir en solución salina normal (0,85%).

Almacenar hasta su uso a -20°C , o en -70°C .

Eliminar a los 6 meses de reconstituida.

5. Extracción de sangre y preparación de soluciones al 0.5% de eritrocitos de pollo o ganso, o al 0,75% si se utiliza curiel o humanos del tipo "O".

- Limpiar con alcohol al 70%, la zona donde se extraerá la sangre.
- Colectar la sangre por punción venosa (pollo, ganso, humano) o intracardiaca si se utiliza de curiel.
- La sangre se coloca en un tubo de centrifuga con 1 mL de Alsever (para evitar la coagulación) por cada 5 mL de sangre que se extraiga. Agitar suavemente el tubo para homogeneizar.
- Centrifugar a 1500 r.p.m., durante 5 minutos, eliminar el suero.
- Añadir PBS al paquete de eritrocitos para lavarlos y agitar suavemente para homogeneizar
- Centrifugar 1500 r.p.m., durante 5 minutos entre cada lavado..
- Repetir esta operación 3 veces.
- Prepare la solución al % indicado según el tipo de eritrocitos que vaya a utilizar.

Tomar 500 μL (eritrocitos de pollo o ganso) o 750 μL (curiel, etc)

Mezclar con PBS) pH 7.2) c.s.p.-----100mL

Guardar a 4°C , hasta su uso

II.2.P ROCEDIMIENTO (3) (4) (5).

II.2.1.-Tratamiento de antisueros de referencia para la inactivación de inhibidores no específicos.

1.-Antisueros de referencia y el control negativo. A (H3N2), A (H1N1), B/Beijing/184/93 y B/ Guangdong/8/93 y suero de control negativo.

2.- Reconstituir los antisueros de referencia liofilizados con agua destilada estéril, con el volumen indicado en la etiqueta. Alicuotar 100 μL reconstituidos y almacenarlos hasta su uso a -20°C o -70°C .

3.- Reconstituir la enzima destructora de receptores con 25 mL de solución salina normal (0,85% NaCl). Almacenarla hasta su uso a -20°C o -70°C .

Tratamiento con EDR de los antisueros.

1.- Añadir 3 volúmenes de EDR a un volumen de suero (100 μL de suero + 300 μL de EDR). Mezclar bien.

2.- Incubar en baño de agua o Incubadora de 37°C , durante toda la noche (aproximadamente 16 a 18 horas).

3.- Incubar en baño de agua a 56°C durante 30 minutos para inactivar el resto de la EDR.

4.- Dejar enfriar a temperatura ambiente.

5.- Añadir 6 volúmenes (600 μL) de solución salina normal (0,85% NaCl).

6.- Los sueros tratados se encuentran en una dilución final de 1:10.

7.- De no ser probados inmediatamente, congelarlos hasta su uso a -20°C .

Determinación de la presencia de aglutininas no-específicas en los sueros tratados.

1.- Seleccionar y rotular la placa de microtitulación en el orden que controlará los sueros tratados.

2.- Añadir 25 (μL) de PBS a los pozos necesarios para controlar todos los sueros tratados.

3.- Añadir 50 μL de PBS (pH 7.2) a dos pozos seleccionados para usarlos como control de eritrocitos.

4.- Añadir 25 μL de cada uno de los antisueros tratados a un pozo de los que añadió el PBS.

5.- Añadir 50 μL de los eritrocitos lavados y estandarizados a todos los pozos utilizados.

8.- Agitar las placas manualmente o usando agitador mecánico.

9.- Colocar las placas a temperatura ambiente (22 a 25°C), por un tiempo aproximado entre 30 minutos y 60 minutos.

Fíjese en el botón del control de eritrocitos.

Lectura y anotación de los resultados.

Interpretación.

A.- Si los eritrocitos sedimentan totalmente y forman un botón en el fondo de la placa, el tratamiento fue efectivo y el antisuero está listo para usarse en la prueba de IHA.

B.- Si los eritrocitos no sedimentan totalmente, la presencia de aglutininas no-específicas se hará evidente. Debe adsorberse el antisuero con eritrocitos. (Ver Sección III).

Adsorción de los sueros para eliminar las aglutininas inespecíficas.

Al suero que después de ser tratado según las instrucciones de la sección II, contenga aglutininas inespecíficas debe ser adsorbido de la siguiente forma:

- 1.-Añadir un volumen de eritrocitos (100 μ L), lavados 3 veces con PBS a 1500 r.p.m. y compactados.
- 2.- Agitar suavemente o mezcle de forma manual e incube a 4 °C por 2 horas, mezclando a repetición por intervalos de tiempo (aproximadamente 15 minutos) que permitan mantener los eritrocitos en suspensión.
- 3.- Centrifugar a 1500 r.p.m. durante 10 minutos.
- 4.-Transferir a otro vial el suero adsorbido cuidadosamente para no remover los eritrocitos.
- 5.- Sueros controles: Antisueros de referencia y el control negativo. A (H3N2), A (H1N1), B/Beijing/184/93 y B/ Guangdong/8/93 y suero de control negativo.
Se adsorben siguiendo la misma metodología.
- 6.-Repetir la adsorción con los eritrocitos, hasta que los controles sean negativos (sedimentación total de los eritrocitos).

II.2.2 -TITULACION DE LOS ANTIGENOS DE CONTROL Y LOS AISLAMIENTOS POR HEMAGLUTINACIÓN (HA).

- 1.- Preparar la solución al 0,5 % de eritrocitos en solución de PBS (pH 7,2).Ver preparación de materiales y reactivos.
- 2.- Rotular las placas de microtitulación (Ver Figura 1)
- 3.- Añada 50 μ L de PBS (pH 7,2) a los pozos desde el #2 al #12 (A2-H12).
- 4.- Añada 100 μ L de cada antígeno control o aislamiento al primer pozo (A1-G1), excepto el pozo de la fila H.
- 5.- Control de eritrocitos en la fila H1, se añade 100 μ L de PBS.
- 6.- Transferir sucesivamente 50 μ L del primer pozo de las filas de letras a los pozos de las otras filas, para hacer diluciones de serie doble. Se descartan los últimos 50 μ L.
- 7.- Añadir 50 μ L de la solución al 0,5 % de eritrocitos en solución de PBS (pH 7,2), a cada pozo de la placa.
- 8.- Agitar suavemente o mezcle de forma manual.

9.- Colocar las placas a temperatura ambiente (22 a 25 °C), por un tiempo aproximado entre 30 min. y 60 min. Fíjese en el botón del control de eritrocitos que este sedimentado totalmente.

10.- Anotar los resultados obtenidos.

Interpretación.

Hemaglutinación: Ocurre cuando los eritrocitos permanecen en suspensión, en el mismo momento de lectura en que el control de eritrocitos esta sedimentado totalmente.

Lectura y anotación de la hemaglutinación.

- Hemaglutinación completa: + (los eritrocitos permanecen en suspensión)
- Hemaglutinación incompleta: + / - (solo una porción de los eritrocitos aglutinan o quedan parcialmente sedimentados).
- Ausencia de hemaglutinación: O. (Los eritrocitos forman un botón compacto en el fondo del pozo).

Como se determina la Hemaglutinación:

- Se inclina la placa de microtitulación y hay ausencia de la formación de lágrima en los eritrocitos sedimentados, imagen que se observa en el control de eritrocitos. Los eritrocitos de curiel y del grupo humano tipo O, forman un halo o círculo sedimentado en el fondo de la placa. (Ver Figura 2.)

Título de la Hemaglutinación:

- El título se corresponde con la dilución más alta del antígeno de control o de los aislamientos que muestre hemaglutinación completa, en la cual los eritrocitos forman una capa eventualmente distribuida.

FIGURA No1.

ESQUEMA PARA LA TITULACIÓN DE LOS CONTROLES DE ANTIGENOS Y DE LOS AISLAMIENTOS.

		Títulos										<u>Títulos HA</u>													
		HA																							
		H	G	F	E	D	C	B	A	↓				H	G	F	E	D	C	B	A	↓			
<u>Antígeno 100µl</u> ⇒		0	0	0	0	0	0	0	0	1	50 µl	<u>Antígeno 100µl</u> ⇒	0	0	0	0	0	0	0	0	1	50µl			
PBS 50µl ⇒		0	0	0	0	0	0	0	0	2	↓ D	PBS 50µl ⇒	0	0	0	0	0	0	0	0	2	↓ D			
↓		0	0	0	0	0	0	0	0	3	↓ I	↓	0	0	0	0	0	0	0	3	↓ I				
↓		0	0	0	0	0	0	0	0	4	↓ L	↓	0	0	0	0	0	0	0	4	↓ L				
↓		0	0	0	0	0	0	0	0	5	↓ U	↓	0	0	0	0	0	0	0	5	↓ U				
↓		0	0	0	0	0	0	0	0	6	↓ C	↓	0	0	0	0	0	0	0	6	↓ C				
↓		0	0	0	0	0	0	0	0	7	↓ I	↓	0	0	0	0	0	0	0	7	↓ I				
↓		0	0	0	0	0	0	0	0	8	↓ O	↓	0	0	0	0	0	0	0	8	↓ O				
↓		0	0	0	0	0	0	0	0	9	↓ N	↓	0	0	0	0	0	0	0	9	↓ N				
↓		0	0	0	0	0	0	0	0	10	↓ E	↓	0	0	0	0	0	0	0	10	↓ E				
↓		0	0	0	0	0	0	0	0	11	↓ S	↓	0	0	0	0	0	0	0	11	↓ S				
↓		0	0	0	0	0	0	0	0	12	↓	↓	0	0	0	0	0	0	0	12	↓				
										2048										2048					

I.- Dilución de antígenos y aislamientos

Placa No. 1 Controles de antígenos

- A Influenza A (H1)
- B Influenza A (H3)
- C Influenza B (B/Beijing/184/93)
- D Influenza B (B/Beijing/243/97)
- E Influenza B Tratado con Eter (B/Beijing/184/93)
- F Influenza B Tratado con Eter (B/Beijing/243/97)
- G PBS
- H Control de glóbulos rojos

Placa No. 2 Aislamientos

- A Aislamiento No. 1
- B Aislamiento No. 2
- C Aislamiento No. 3
- D Aislamiento No. 4
- E Aislamiento No. 5
- F Aislamiento No. 6
- G PBS
- H Control de glóbulos rojos

II. - Añadir 50 µL de la solución de glóbulos rojos.

III. - Incubar a TA y anotar los resultados

FIGURA No.2

ESQUEMA DE PATRONES DE AGLUTINACION



II.2.3.- PREPARACIÓN DEL ANTÍGENO PARA LA PRUEBA DE IHA.

La IHA en influenza se trabaja con 4 unidades hemaglutinantes, aunque algunos laboratorios prefieren 8 unidades. La última dilución donde hay hemaglutinación completa, es el título del antígeno y representa 1 unidad hemaglutinante. Las 4 unidades se obtienen dividiendo el título del antígeno entre 4.

Por ejemplo: un título de 160 dividido por 4 = 40. Proceder mezclando un volumen de antígeno con 39 volúmenes de PBS para obtener el volumen que se necesita de antígeno estandarizado.

Es necesario controlar las 4 unidades preparadas, de la siguiente forma:

- 1.- Determinar el volumen de antígeno estandarizado que necesite para la prueba.
- 2.- Calcular la dilución del antígeno que necesite para preparar una dilución que contenga 4 unidades de HA por cada 25 µL.

Las unidades finales que se añaden a la prueba de IHA serán 4 unidades HA por cada 25 µL.

- 3.- Anote las diluciones utilizadas.
- 4.- Realizar la titulación del antígeno, repitiendo una segunda prueba de HA con el antígeno para verificar las unidades de HA.(Descrito en el paso 4 y figura 1)
- 6.- Anote los resultados.
- 7.- Guarde el antígeno diluido a 4 °C y úselo en el día.

Interpretación.

Dosis correcta: Los antígenos requieren un título de 4 unidades por cada 25 µL. Este título debe hemaglutinar los 3 primeros pozos (4 unidades HA).

Dosis débil: Cuando la HA se observa en el primer o hasta el segundo pozo, entonces hay que agregar más antígeno. (1 o 2 unidades HA).

Dosis fuerte: Cuando la HA se observa hasta el cuarto pozo o más, debe agregarse más PBS.

Siempre que haya que agregar más antígeno o PBS, deben controlarse de nuevo las 4 unidades, hasta que se observe la dosis correcta con 4 unidades no podrán ser empleadas.

Controle también la solución de eritrocitos.

II.2.4.-IDENTIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS A PARTIR DE MUESTRAS CLÍNICAS.

A.- Rotular las placas de microtitulación. Determine el número de placas que necesita para que sean rotuladas de manera idéntica.

B.- Puede colocar dos antígenos por placa para procesar un conjunto de sueros.

C.- Preparar una placa adicional para el control de los sueros tratado (1/10). En lugar de antígeno se añade PBS, y determinar si hay aglutininas inespecíficas presentes.

D.- El conjunto completo de sueros de referencia tratados debe incluir:

- Influenza A (H3N2).
- Influenza A (H1N1).
- B/Beijing/184/93 (B/Panamá/45/90).
- B/Guangdong/8/93 (B/Victoria/2/87).
- Suero Control Negativo.

En las placas de microtitulación rotuladas: (Ver Figura 3 y 4).

1.- Añada 25 µL de PBS a los pozos desde B1 hasta H12, de cada columna numerada.

2.- Añada 50 µL de cada suero tratado al primer pozo de la columna seleccionada.

Por ejemplo: El suero #1 se añade a los pozos A1 y A8, el suero #2 se añade a los pozos A2 y A9, y así sucesivamente con el conjunto de sueros tratados.

3.- Añada 50 µL de PBS al primer pozo de las columnas A6 y A7, como control de eritrocitos.

- 4.- Transfiera y diluya 25 μ L del primer pozo de las columnas 1 hasta la 12 sucesivamente. Descarte los 25 μ L después de la fila H.
- 5.- Añada 25 μ L del antígeno control #1, a todos los pozos de un conjunto de sueros tratados y diluidos desde A1 hasta A5. Continúe con todos los demás antígenos de control y los aislamientos.
- 6.- Añada 25 μ L de PBS a la placa de control de suero, sustituyendo el antígeno.
- 7.- Agite suavemente o mezcle de forma manual.
- 8.- Cubrir las placas evitando la evaporación.
- 9.- Colocar las placas a temperatura ambiente (22 a 25 °C), por un tiempo aproximado de 30 min.
- 10.- Añada 50 μ L de la solución de eritrocitos al 0,5%.
- 11.- Agite suavemente o mezcle de forma manual.
- 12.- Cubrir las placas y colocar a temperatura ambiente (22 a 25 °C), por un tiempo aproximado entre 30 y 45 minutos. Fíjese en el botón del control de eritrocitos que este sedimentado totalmente.
- 13.- Anote los resultados obtenidos.

Interpretación. (Ver Tabla No.1)

- 1.- Si ocurre una reacción antígeno –anticuerpo (se INHIBE la hemaglutinación de los eritrocitos).
- 2.- El título de IHA es el recíproco de la última dilución de antisuero que inhiba completamente la hemaglutinación.

FIGURA No. 3.

ESQUEMA PARA LA IDENTIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS UTILIZANDO LA REACCION DE INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACION.

		25 μ l ANTIGENO 1					CG CG		25 μ l ANTIGENO 2					Títulos IHA	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
Antisuero 50 μ l \Rightarrow	A	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	10	25 μ l
PBS 25 μ l \Rightarrow	B	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	20	\downarrow D
$\downarrow \downarrow$	C	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	40	\downarrow I
$\downarrow \downarrow$	D	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	80	\downarrow L
$\downarrow \downarrow$	E	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	160	\downarrow U
$\downarrow \downarrow$	F	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	320	\downarrow C.
$\downarrow \downarrow$	G	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	640	\downarrow
$\downarrow \downarrow$	H	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1280	\downarrow

I.- Preparación de las diluciones de los antisueros de referencia.

1	Influenza A (H1)	7	Control de glóbulos (50 μ L PBS)
2	Influenza A (H3)	8	Influenza A (H1)
3	Influenza B (B/Beijing/184/93)	9	Influenza A (H3)
4	Influenza B (B/Beijing/243/97)	10	Influenza B (B/Beijing/184/93)
5	Control de suero negativo.	11	Influenza B (B/Beijing/243/97)
6	Control de glóbulos rojo (50 μ L PBS)	12	Control de suero negativo.

II. - Adicionar 25 μ L del control de antígeno

IV.- Añadir 50 μ L de la solución de glóbulos rojos.

III. - Incubar a TA.

V.- Incubar, anotar los resultados e interpretar.

FIGURA No. 4.

IDENTIFICACIÓN DE AISLAMIENTOS. ILUSTRACIÓN DE LA REACCION DE IHA.

	AISLAMIENTO 1					C	C	AISLAMIENTO 2					Título
	1	2	3	4	5	G	G	8	9	10	11	12	de IH
A	O	●	O	O	O	●	●	●	●	O	O	O	↓
B	O	●	O	O	O	●	●	●	●	O	O	O	10
C	O	●	O	O	O	●	●	●	O	O	O	O	20
D	O	●	O	O	O	●	●	●	O	O	O	O	40
E	O	●	O	O	O	●	●	●	O	O	O	O	80
F	O	●	O	O	O	●	●	●	O	O	O	O	160
G	O	●	O	O	O	●	●	O	O	O	O	O	320
H	O	O	O	O	O	●	●	O	O	O	O	O	640
Antisuero	H1	H3	B/184	B/243	Neg	PBS	PBS	H1	H3	B/184	B/243	Neg	1280

TABLA No.1**INTERPRETACIÓN DE LA IDENTIFICACIÓN DE UN AISLAMIENTO.**

(En la identificación de un aislamiento deben ser utilizados los reactivos que se correspondan con la temporada de influenza.(OMS).

ANTIGENOS DE CONTROL	ANTISUEROS DE REFERENCIA.				
	A 3N2	A H1N1	B/BEIJING	B/GUANGDONG	NEGATIVO
1. A(H3N2)	<u>2560</u>	< 10	10	< 10	< 10
2. A(H1N1)	< 10	<u>1280</u>	10	< 10	< 10
3.B/Beijing/184/93-Like	< 10	< 10	<u>320</u>	40	< 10
4.B/Guandong/08/93-like	< 10	< 10	< 10	<u>320</u>	< 10
Aislamientos para identificar					
					INTERPRETACION
AISLAMIENTO # 1	<u>1280</u>	< 10	80	20	H3
AISLAMIENTO # 2	< 10	<u>1280</u>	< 10	< 10	H1
AISLAMIENTO # 3	< 10	< 10	<u>160</u>	80	B/ BJ
AISLAMIENTO # 4	< 10	< 10	< 10	<u>640</u>	B/Gu

REFERENCIAS:

- 1.- Murphy B, Robert G. Orthomixoviruses: Influenza. In Fields BN, Knipe DM Howley P . Fields Virology. Vol 1. New York: Lippincott-Raven, 1996.
- 2.- Jawetz E, Melnick J, Adelberg E. Manual de Microbiología Médica. 14ed. México:El Manual Moderno, 1992.
- 3.- Palmer D,Dowdle W, Coleman M, Shild G. Advanced laboratory techniques for influenza diagnosis. Immunology series No.6 Part. 2: procedural guide US Department of Health Educat. And Public Health Service. 1975: 25-62.
- 4.- WHO/ PAHO/ CDC. Influenza Surveillance and Epidemiology. Course. May14-18, 2001.Atlanta, GA EEUU.
- 5.- Goyenechea a, Oropesa S, López E, Bello M, Comellas MM, Savón C. Curso Nacional de Diagnóstico Viroológico de las enfermedades respiratorias agudas. La Habana: MINSAP, 1983.
- 6.- Swenson PD. Hemagglutination inhibition test for the identification of influenza viruses. En: Iceberg HD, editor. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington, DC: ASM, 1992: 8-11.
- 7.- Wood J, Gaines Das, Taylor J, Chacraverty P. Comparison of influenza serological techniques by inteARNtional collaborative study. Vaccine 1994;12(2): 165-178.
- 8.- Weissenbasher C, Avila W. Los virus como causa de IRA alta y baja en niños: características generales y diagnóstico En: Benguigui Y, Antuñano F, Schmunis G, Yunes J, editores. Infecciones respiratorias en niños. EEUU: OPS-OMS,1997.

III.-DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE LOS VIRUS DE INFLUENZA POR INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACION.

El diagnóstico de la gripe mediante el aislamiento viral es definitivo, permite identificar la cepa involucrada y es generalmente más rápido que la serología Sin embargo, el diagnóstico serológico es un procedimiento importante cuando se hace imposible obtener la muestra clínica del individuo o se carece de los recursos en el laboratorio. Muchos laboratorios dependen de la serología para identificar infecciones individuales recientes. El diagnóstico se basa en la toma de una muestra de suero durante la fase aguda (hasta el 5 día de comenzados los síntomas) y otra en la fase convaleciente, 2-3 semanas más tarde. La respuesta de los anticuerpos se reflejará mediante el incremento de 4 títulos entre las fases aguda y convaleciente, frente a un tipo o subtipo de los virus de influenza. No puede realizarse el diagnóstico de la influenza mediante un solo suero, pues la mayor parte de los individuos tienen anticuerpos frente a los virus de influenza. El diagnóstico de casos individuales usando la muestra de la fase convalescente no será confiable y no debe realizarse salvo en circunstancias muy especiales. (1, 2)

Para determinar si un brote ha sido causado por influenza, se deben coleccionar un gran número de sueros de las fases agudas y convalecientes. Los sueros deben parearse de acuerdo a la edad de los pacientes. Para determinar si un brote ha sido causado por el virus de influenza se deberá demostrar una diferencia estadísticamente significativa entre las medias geométricas de los títulos agudos y de los convalecientes. (3)

La IH es la técnica recomendada para el diagnóstico serológico, aunque pueden utilizarse otras técnicas como la fijación de complemento y técnicas inmunoenzimáticas. (4) (5)

Los reactivos necesarios para la IH son los mismos del Estuche de Influenza de la OMS.

III.1.-PROCEDIMIENTO

Los antígenos de este estuche utilizados para la identificación de aislamientos, son apropiados para el diagnóstico serológico de infecciones causadas por los subtipos de influenza A (H3N2) y A (H1N1). Sin embargo dada la disminución en la sensibilidad de los antígenos virales completos de influenza B, se requieren antígenos tratados con eter para las pruebas de diagnóstico serológico de infecciones con influenza B. (6). A causa del volumen limitado de los reactivos del Estuche OMS, si se desean hacer encuestas para serovigilancia o un numero elevado de

diagnósticos sexológicos es conveniente preparar antígenos propios, utilizando los de la OMS como controles.

EQUIPOS: Descritos anteriormente al inicio del capítulo

MATERIALES Y REACTIVOS: Descritos anteriormente al inicio del capítulo.

III.1.1.-Tratamiento del suero.

1. Trate los sueros y los antisueros de referencia para el control positivo con Enzima Destructora de Receptores (EDR), según fue descrito. Cada prueba debe contener sueros de la etapa aguda o convaleciente y antisueros de referencia para el control de los subtipo A (H3N2) y A (H1N1), del Tipo B (B/Panamá/45/90 y del linaje B/Victoria/02/87).
2. Adsorba los sueros para eliminar las aglutininas no inespecíficas según se describió anteriormente
3. II.- Solución de eritrocitos al 0,5%. Descritos anteriormente
4. III.-Titulación de los antígenos de control. Descritos anteriormente
5. IV.- Preparación de los antígenos estandarizados para la IH y su titulación.

Cada antígeno de control debe estandarizarse para que contenga 4 unidades por cada 25 μL .

III.2.-Prueba de Inhibición de la hemaglutinación. (Ver Figura No.5)

1. Rotular las placas de microtitulación.
2. Añadir 25 μL de PBS a los pozos desde B hasta H (B1 – H12) por cada columna numerada.
3. Añadir 50 μL de cada suero tratado (1:10) en los primeros pozos de la columna numerada (A1 - A12).
4. Transferir 25 μL a fin de diluir los sueros tratados desde (A1-A12) el primer pozo de las columnas numeradas 1-12 a los pozos sucesivos.
5. Añadir 25 μL de antígeno estandarizado a todos los pozos (A1 a H12) de un conjunto de sueros tratados.

6. Mezclar el contenido de las placas con un dilutor mecánico (vibrador mecánico) por 10 segundos o agitando las placas manualmente, teniendo en cuenta que es crítico coseguir una mezcla perfecta.
7. Tapar la placa e incubar a la temperatura ambiente (22 a 25 °C) durante 30 min.
8. Añadir 50 µL de la solución de eritrocitos al 0,5% estandarizados a todos los pozos y mezcle como lo hizo anteriormente.
9. Cubra las placas para permitir que los eritrocitos se asienten a temperatura ambiente (22 a 25 °C) por un periodo apropiado, de acuerdo a los eritrocitos que esté empleando generalmente ocurre entre 30–45 minutos. Leer los títulos.
10. – Anote los títulos de IH obtenidos.

Interpretación. (Ver Figura No. 6)

La hemaglutinación y la inhibición de la hemaglutinación se leen según fue descrito anteriormente.

El título de cada suero será el valor recíproco de la dilución donde haya una inhibición total de la hemaglutinación.

Se considera positivo el diagnóstico para un tipo o subtipo cuando se demuestre el incremento de 4 títulos entre la fase aguda y convalescente.

FIGURA NO. 5

ESQUEMA PARA EL DIAGNOSTICO SEROLOGICO POR INHIBICON DE LA HEMAGLUTINACION

		25 μ l ANTIGENO 1												Títulos	
		IHA													
Antisuero 50 μ l \Rightarrow	A	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	10	25 ul	
PBS 25 μ l \Rightarrow	B	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	20	\downarrow D	
$\downarrow \downarrow$	C	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	40	\downarrow I	
$\downarrow \downarrow$	D	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	80	\downarrow L	
$\downarrow \downarrow$	E	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	160	\downarrow U	
$\downarrow \downarrow$	F	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	320	\downarrow C.	
$\downarrow \downarrow$	G	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	640	\downarrow	
$\downarrow \downarrow$	H	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	1280	\downarrow	

- | | |
|--|--|
| <p>I Preparar diluciones de antisueros</p> <ol style="list-style-type: none"> 1 Muestra de suero humano No. 1 (S1) 2 Muestra de suero humano No. 1 (S2) 3 Muestra de suero humano No. 2 (S1) 4 Muestra de suero humano No. 2 (S2) 5 Muestra de suero humano No. 3 (S1) 6 Muestra de suero humano No. 3 (S2) 7 Muestra de suero humano No. 4 (S1) 8 Muestra de suero humano No. 4 (S2) 9 Antisuero de referencia A(H1) 10 Antisuero de referencia A(H3) 11 Antisuero de referencia Tipo B (B/Beijing/184/93- parecido) 12 Antisuero de referencia Tipo B (B/Beijing/243/97- parecido) | <p>II Añadir 25μL del control de los antígenos</p> <p>Controles de Antígenos</p> <ul style="list-style-type: none"> Influenza A (H1) Influenza A (H3) Influenza B (B/Beijing/184/93) Tratado con Eter Influenza B (B/Beijing/243/97) Tratado con Eter PBS como antígeno para el control de sueros. <p>III Incubar</p> <p>IV Añadir 50 μL de la solución de eritrocitos</p> <p>V Incubar, anotar los resultados e interpretar.</p> |
|--|--|

S1 = Suero de la fase aguda S2 = Suero de la fase convaleciente

FIGURA No. 6

DIAGNOSTICO SEROLOGICO. ILUSTRACIÓN DE LA REACCION DE IHA.

	Influenza A(H3) Antígeno de control												Título de IH ↓
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	●	●	○	●	○	○	●	●	●	○	○	○	10
B	●	●	○	●	○	○	●	●	●	○	○	○	20
C	●	●	○	●	○	○	●	●	●	○	○	○	40
D	○	●	○	●	○	○	○	●	●	○	○	○	80
E	○	○	○	●	○	○	○	●	●	○	○	○	160
F	○	○	○	○	○	○	○	○	●	○	○	○	320
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	640
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	1280
Antisuero	S1	S2	S1	S2	S1	S2	S1	S2	H3	H1	B/184	B/243	
	SP 1		SP 2		SP 3		SP 4		Control de sueros				

INTERPRETACIÓN.

SP 1 = Una diferencia de título de dos diluciones es interpretado como evidencia de anticuerpos preexistentes a A(H3N2) y probablemente no relacionada con una infección reciente.

SP 2 = Una diferencia de título mayor de cuatro diluciones se interpreta como significativo e indicativo de una infección reciente por un virus de influenza A (H3N2) – (Seroconversión)

SP 3 = Negativo.

SP 4 = Un título \geq de cuatro diluciones es indicativo de una infección reciente por un virus de influenza A (H3N2)

REFERENCIAS.

- 1.- Palmer D, Dowdle W, Coleman M, Shild G. Advanced laboratory techniques for influenza diagnosis. Immunology series No.6 Part.2: Procedural guide US Department of Health Educat. and Public Health Service. 1975:25-26
- 2.- Swenson PD. Hemagglutination inhibition test for the identification of influenza viruses. En: Iceberg HD, editor. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington, DC: ASM,1992: 8-11.
- 3.- Cough RB, Kasel JA. Influenza. En: Lennette EH, Lennette DA, Lennette E, editores. Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. 7ª. ed. USA: American Public Health Associations,1995.
- 4.- Stuart- Harris S, Schild G, Oxford J. Influenza: the viruses and the diseases.2ª.ed. Great Britain: Edward Arnold, 1985.
- 5.- Oropesa S. Orthomixovirus. En: Llop A, Valdes-Dapena M, Zuazo J. Primera Edición. Microbiología y Parasitología Médicas. Editorial Ciencias Médicas.Cuba, 2001.
- 6.- WHO/PAHO/CDC. Influenza Surveillance and Epidemiology. Course. May 14 –18, 2001. Atlanta,GA, EEUU.

III.3.-TRATAMIENTOS ALTERNATIVOS DE LOS SUEROS PARA EL DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE INFLUENZA. (3) (4) (5).

Las cepas de influenza difieren en su sensibilidad a los diferentes inhibidores inespecíficos presentes en los sueros.

III.3.1.-Tratamiento con Enzima Destructora de Receptores. (EDR).

Generalmente el tratamiento usado es el que se refiere a continuación, aunque las cantidades pueden variar con relación al productor de EDR e inclusive al lote del reactivo.

Conjuntamente con el estuche de reactivos de la OMS, viene un bulbo de EDR (producida por Sigma).

- 1.- Reconstituir la EDR con 5 mL de agua estéril.
- 2.- Diluir con solución salina de calcio.
- 3.- Añadir 4 volúmenes de EDR a 1 volumen de suero (400 µl EDR + 100 µL de suero).
- 4.- Incubar toda la noche a 37^o C.
- 5.- Añadir 5 volúmenes (500 µL) de 1.5% de citrato de sodio.
- 6.- Poner en Baño María a 56^o C. para inactivar la EDR remanente.

SOLUCIONES

Preparación de la solución Salina de Calcio. (pH 7,2)

Pesar:

- a.- Cloruro de Calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$).....1 gr.
- b.- Cloruro de Sodio (NaCl)..... 9 gr.
- c.- Acido Bórico (H_3BO_3)..... 1.2 gr.
- d.- Borato de Sodio decahidratado ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$).....0.052 gr.
- e.- Autoclavear o esterilizar por filtración, pH 7,2.
- f.- Guardar a 4°C por un tiempo no mayor de 3 semanas.

Preparación de la solución de Citrato de Sodio 1,5%, pH 7,2.

- a.- Citrato de Sodio dihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).....1.6 gr.
Disolver en 100 ml de PBS, pH 7.2
- b.- Autoclavear o esterilizar por filtración.
- c.- Dispensar en frascos ambar para prevenir la fotodegradación.
- d.- Guardar a 4°C por un tiempo no mayor de 3 semanas.

III.3.2.- Tratamiento de los sueros con Periodato de Potasio. (KIO_4).

Para realizar este tratamiento es necesario preparar las siguientes soluciones.

Preparación de la solución de glucosa al 5%.

- a.- glucosa.....5 gr.
- b.- Agua destilada c.s.p.....100 ml.

Preparación de la solución 0,05M de KIO_4 .

- a.- KIO_41,15 gr.
- b.- Agua destilada c.s.p.....100 ml.

Disolver en baño de agua a 70°C ., agitando el frasco hasta que no quede ningún precipitado.

Tratamiento de los sueros.

Inactivar el suero (100 μL) a 56°C , durante 30 minutos.

- a.- Mezclar 100 μL de suero inactivado con 100 μL de la solución de KIO_4 .
- b.- Dejar los sueros tratados a temperatura ambiente durante 2 horas.
- c.- Neutralizar el KIO_4 con 200 μL de glucosa al 5% .

d.- Agregar 600 μ L de PBS, pH 7,2.

e.- El suero tratado queda a una dilución de 1/10.

IV.-TIPIFICACIÓN Y SUBTIPIFICACIÓN DE LOS VIRUS DE INFLUENZA MEDIANTE LA TÉCNICA DE INMUNOPEROXIDASA.

Un gran número de laboratorios participa en la vigilancia de la actividad de los virus de influenza y sus cambios, debido a la necesidad de informar tempranamente la presencia de nuevas cepas epidémicas y la diferenciación entre los tipos A y B.

Para facilitar y perfeccionar el análisis de las cepas de influenza los laboratorios necesitan métodos más rápidos y menos engorrosos en la identificación en tipo y subtipo de estos virus, aislados de muestras clínicas o después de un pase por alguno de los sistemas clásicos para su aislamiento. El aislamiento viral tiene como ventaja su alta sensibilidad y provee además un material que puede ser utilizado posteriormente para la caracterización viral por diferentes métodos (1, 2).

La técnica de inmunoperoxidasa utilizada en el diagnóstico rápido de los virus de influenza , se basa en la detección rápida de antígenos virales en un cultivo celular de MDCK-L(placa de 96 pozos). Se inoculan 4 pozos de cada cepa de referencia por cada caso clínico, reservándose 4 pozos no infectados como control negativo. Los pozos con virus de influenza tipo A (subtipos H1N1 y H3N2) y tipo B,se utilizan como controles positivos y en el resto de los pozos se inoculan casos clínicos. Se incuba toda la noche, se lava, y se fijan las células con metanol. Posteriormente se incuban con anticuerpos monoclonales específicos de tipo y subtipo, eliminados después de una hora, para añadir anticuerpos antiratón conjugados con peroxidasa que también son eliminados a la hora por lavados sucesivos .Todos los periodos de incubación hasta este paso se realizan a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5% y finalmente se coloca el sustrato 3-amino-9-ethylcarbazole que le imprime un sello característico a las células, al ser observadas al microscopio de luz invertida, observándose de color de rojo las células infectadas por los virus de influenza.

Esta técnica es altamente recomendada para la identificación de especímenes clínicos de emergencia, por su capacidad de ser rápida, específica, sensible y además capaz de detectar cepas de nueva circulación (3, 4,5, 6).

EQUIPOS:

Gabinete de seguridad Clase II
Incubadora de CO₂.
Refrigerador (4 ° C).
Congelador (- 70 ° C).
Centrifuga (aditamentos para placas de 96 pozuelos.)
Bomba de vacío.

MATERIALES Y REACTIVOS

1.- Células.

Resuspender las células a una concentración de 100,000 células /mL en medio Dulbecco's modificado (DMEM), suplementado con 0,2% de albúmina bovina, 1% de suero bovino fetal , 25mM HEPES y antibióticos.

Se prepararon placas de 96 pozos(Costar, Cambridge, Mass) con 100 µLde la suspensión celular (10,000 cel/pozo).

2.- Virus. (Controles positivos).

Cepas de referencia que incluyen los tipos A (H1N1), A (H3N2) y tipo B.

3.- Anticuerpos monoclonales.

Para tipar y subtipar. Procedentes del CDC, Atlanta, Georgia, EEUU.

OMS /Pool de anticuerpos contra Influenza A.

OMS/Pool de anticuerpos contra el tipo B.

OMS/ Anticuerpos HA1-71.

OMS/Anticuerpos HA2-76.

4.- Leche descremada al 5% en PBS.

5.- Anticuerpo antiratón conjugado con peroxidasa (Amersham).

6.-Sustrato: 3-amino-9-ethylcarbazole.

7.- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂ al 30%).

8.- PBS, pH 7,2.

9.- Placas de 96 pozos.Costar, Cambridge, Mass.

10.- Metanol.

11.-Pipeta multicanal

12.- Pipetas graduadas.

13.- Puntas.

IV.1.- PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS.

1.- Virus. (Controles positivos).

Cepas de referencia que incluyen los tipos A (H1N1), A (H3N2) y tipo B.

2.- Anticuerpos monoclonales. Procedentes del CDC, Atlanta, Georgia, EEUU.

La dilución de los Ac Ms se realiza con la solución de leche descremada al 5% en PBS, según las indicaciones del centro productor para cada uno de ellos.

Pool de anticuerpos contra el tipo A.

Pool de anticuerpos contra el tipo B.

Anticuerpos HA1-71.

Anticuerpos HA2-76.

3.- Solución de leche descremada al 5%.

leche descremada.....5 g

PBS (c.s.p.).....100 mL.

Debe calcularse la cantidad que se va a utilizar por cada placa.

4.- Anticuerpo antiratón conjugado con peroxidasa.

La dilución del conjugado se realiza con la solución de leche descremada al 5%.

Debe calcularse la cantidad que va a ser utilizada del conjugado 1/1000 o de acuerdo a la dilución de trabajo obtenida.

5.- Solución del sustrato: 3-amino-9-ethylcarbazole.

Solución A: solución de acetato de sodio

acetato de sodio.....4,76 g en 700 mL de agua.

Añadir ácido acético glacial.....0,9ml en 299.1 mL de agua.

Unir las dos soluciones y eliminar 50 mL.

tenemos 950 mL de solución de acetato de sodio.

Solución B:

3- amino-9-ethylcarbazole200 mg.

Disolverlos en:

Dimethylformamide.....50 mL.

Agregar la solución B (50mL) a la solución A (950 mL).

Filtrar con membrana de poro 0,22 um, para eliminar algún precipitado.

Guardar en alicuotas de 10mL, a -20 °C.

6.- Solución Salina Fosfatada (0,01 M), pH 7,2.

Preparar una solución stock 25 veces concentrada (25 X).

Solución buferada de fosfato conteniendo en 100 mL:

-Fosfato dibásico de sodio (Na₂ HPO₄).....2,74 gr.

-Fosfato monobásico monohidratado de sodio (Na H₂PO₄. H₂O).....0,79 gr.

Preparar PBS para 1 litro, mezclar y disolver. En agua destilada y desionizada.

-PBS 25 X (Solución buferada de fosfato).....40 mL.

-H₂O c.s.p.....960 mL.

Mezclar bien.

-Chequear el pH 7,2 (más o menos 0,1).

-Ajustar el pH con NaOH 1N o HCL 1N, si fuera necesario.

-Autoclavear a 21 lbs. durante 15 minutos, o filtrar (poro 0,22 um).

-Guardar a 4° C, por un período mayor de 21 días.

IV.2.-PROCEDIMIENTO (3)(4).

Este procedimiento debe ser realizado en un gabinete de seguridad Clase II.

1.- Lavar la placa 3 veces con PBS estéril (200 µl por /pozo).

2.- Inocular 4 pozuelos con 20 µL de cada una de las cepas de referencia (controles) .

3.- Inocular 4 pozuelos con 20 µL de cada muestra clínica.

4.- Reservar 4 pozuelos no infectados, como control negativo. Se mantienen con medio de cultivo. Incubar a 37° C en CO₂ al 5% durante 20 minutos para equilibrar el pH.

5.- Centrifugar a 2500 r.p.m. (aprox. 700 x g) a temperatura ambiente durante 45 minutos.Las placas pueden colocarse durante una hora a temperatura ambiente, sino se las puede centrifugar.

6.- Añadir 80 µl a cada pozuelo de medio DMEM, (suplementado con albúmina bovina al 0,2%, Hepes 25 mM, antibiotico y 4ug/ml de TPCK tratado con tripsina al 0,25%).

7.- Incubar a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%, durante toda la noche (16 a 20 horas).

Al día siguiente:

8.- Aspirar el medio a toda la placa, con mucho cuidado de mezclar el medio de diferentes pozuelos, evitando la contaminación (utilizar bomba de vacío y sacudir vigorosamente la placa).

9.- Lavar la placa 2 veces con PBS (200 µl /pozo).

Consecutivamente agregar a todos los pozos para FIJAR LAS CELULAS :

10.- Añadir 50 µL de PBS a cada pozuelo.

11.- Añadir 50 µL de metanol absoluto a cada pozuelo.

12.- Añadir 100 µL de metanol absoluto a cada pozuelo.

Una vez que se haya realizado la dosificación anterior en todos los pozuelos:

13.- Eliminarlo todo (aspirar utilizando bomba de vacío y sacudir vigorosamente la placa).

14.- Añadir de nuevo 100 µl de metanol absoluto a cada pozuelo.

15.- Incubar la placa 10 minutos a temperatura ambiente.

16.- Lavar la placa 2 veces con PBS (200 µl -pozo).

Anticuerpos Monoclonales

17.-Preparar las diluciones de trabajo de los anticuerpos monoclonales (según el centro productor), en una solución de leche descremada al 5% con PBS:

18.- Añadir 75 µl de los anticuerpos monoclonales por pozo (diluciones de trabajo) a la fila correspondiente.

Pool A en las columnas 1,5 y 9; AcM HA1-71 en las columnas 2, 6, y 10; AcM HA2-76 en las columnas 3, 7 y 11; y el Pool B en las columnas 4, 8, y 12.(Figura 1).

19.- Incubar a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%, durante 60 minutos.

20.- Eliminarlo todo (aspirar utilizando bomba de vacío y sacudir vigorosamente la placa)

21.- Lavar la placa 4 veces con PBS (200 µL -pozo).

Conjugado.

Preparar la dilución del conjugado en una solución de leche descremada al 5% con PBS. (generalmente 1:1000).

22.- Añadir 75 µl de anticuerpos antiratón conjugado con peroxidasa-por pozo.

23.- Incubar a 37 °C en una atmósfera de CO₂ al 5%, durante 60 minutos.

24.- Eliminarlo todo (aspirar con bomba de vacío y sacudir vigorosamente la placa).

25.- Lavar la placa 4 veces con PBS (200 µL -pozo).

Sustrato.

26.- Añadir 60 µL del sustrato-por pozo.

27.-Incubar a temperatura ambiente por 30-60 minutos, tiempo en que se desarrolla la coloración.

28.- Eliminarlo todo (aspirar utilizando bomba de vacio y sacudir vigorosamente la placa.)

29.- Lavar la placa 2 veces con PBS (200 µL -pozo).

30.- Añadir 100 µL de PBS a todos los pozuelos.

31.- Observar al microscopio invertido (magnificación 40x100).

IV.3.-INTERPRETACIÓN. (VER FIGURA No.2

La coloración roja intracelular en las muestras clínicas se interpreta como un resultado positivo de infección y su ausencia como negativo.

En las células de los controles, constituyen resultados positivos para la prueba: la coloración roja intracelular en los pozuelos inoculados con las cepas de referencia (control positivo) y la ausencia de coloración en los no inoculados (control negativo).

Las células infectadas reaccionan coloreándose frente a:

Pool A positivo = Influenza tipo A.

Pool A + HA1- 71 + HA2-76 positivos = Influenza subtipo A H3N2.

Pool A + HA2-76 positivo = Influenza subtipo A H1N1

Pool B positivo = Influenza tipo B.

FIGURA No.1

REACCIÓN DE LAS CELULAS INFECTADAS FRENTE A LOS AcsM EMPLEADOS POR TIPO Y SUBTIPO.

COLORACIÓN DE LAS REACCIONES POSITIVAS: ROJA.

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

A.- Control H3N2. (Columnas 1-2-3-4)

- B.- Control H1N1. (Columnas 1-2-3-4)
- C.- Control tipo B. (Columnas 1-2-3-4)
- D.- Control Celular. (Columnas 1-2-3-4)
- E.- Continuar con las muestras clínicas. (Resto de la placa)







1.- Pool de anticuerpos contra el tipo A. (Columnas 1-5-9)

- 2.- Pool de anticuerpos contra el tipo B. (Columnas 2-6-10)
- 3.- Anticuerpos HA1-71. (Columnas 3-7-11)
- 4.- Anticuerpos HA2-76. (Columnas 4-8-12).

FIGURA No. 2

REACCIÓN DE LAS CELULAS INFECTADAS FRENTE A LOS AcM EMPLEADOS POR TIPO Y SUBTIPO.

COLORACIÓN DE LAS REACCIONES POSITIVAS ROJA.

	Pool A	HA2-71	HA2-76	Pool B
A(H1N1)				
A(H3N2)				
TIPO B				

REFERENCIAS

- 1.- Meguro H, Bryant JD, Torrence AE, Wright PF. Canine kidney cell line for isolation of respiratory viruses. J Clin Microbiol 1979; 9:175-9.
- 2.- Johnston SL, Bloy H. Evaluation of a rapid enzyme immunoassay for detection of influenza A virus. J Clin Microbiol 1993; 31:142-3.
- 3.- CDC. Protocolo Técnico. Influenza Branch. CDC. Atlanta, GA EEUU.
- 4.- Oropesa S, Morier L, Vazquez S, Goyenechea A, Valdivia A, Hernández B, García S. Caracterización de los virus influenza utilizando anticuerpos monoclonales. Montaje y validación. Rev Cub Med Trop 1996; 48(3):149-154.
- 5.- Sanchez-Fauquier A, Guillén M, Martín J, Kendal AP, Melero JA. Conservación of epitopes recognized by monoclonal antibodies against the separated subunits of influenza hemagglutinin among type A viruses of the same and different subtypes. Arch Virol 1991; 116: 285-93.
- 6.- Ziegler T, may H, Sanchez-Fauquier A, Gamble WC, Cox NJ. Type and subtype-specific detection of influenza viruses in clinical specimens by rapid culture assay. J Clin Microbiol 1995; 33(2):318-21.

V.-IDENTIFICACIÓN DE LOS VIRUS DE INFLUENZA MEDIANTE TRANSCRIPCIÓN REVERSA-SEGUIDA DE REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR).

Lic. Odalys Valdés Rámirez MsC.

Desde 1977 cocirculan en humano.dos subtipos de virus de influenza A, el subtipo A (H3N2) y el subtipo A (H1N1) y del tipo B dos linajes, antigénica y genéticamente diferentes, representados por las cepas B/Beijing/184/93 (o B/Panama/45/90) y B/beijing/243/97(o B/Victoria/2/87).

La cocirculación de múltiples tipos y subtipos de virus de influenza incrementa la dificultad del diagnóstico y la identificación viral. Los métodos de diagnóstico de rutina para las infecciones virales por virus de influenza incluyen la detección de antígenos y el cultivo viral, los que resultan altamente sensibles y específicos. Sin embargo, el uso de las técnicas moleculares para la detección directa de estos virus en muestras clínicas facilita el estudio de los brotes de infección respiratoria aguda y puede ofrecer una rápida identificación de estos virus. (1).

La RT-PCR constituye un método altamente específico y sensible que garantiza la amplificación de un número bajo de copias del genoma viral, pudiendo ser aplicada directamente a muestras clínicas para la identificación de los diferentes subtipos del virus y para la caracterización de virus multiplicados en huevos embrionados o cultivo de tejidos, utilizando para ello cebadores específicos de subtipo, que son regiones complementarias altamente conservadas del gen que codifica para la HA1. (2)(3)

El proceso consiste en la repetición del ciclo de síntesis de ADN que cuenta con tres secuencias: desnaturalización de la cadena molde por calor, hibridación de los cebadores al ADN desnaturalizado y extension o polimerización de la nueva cadena de ADN a partir del cebador por una polimerasa. La amplificación se realiza utilizando oligonucléotidos cebadores sintéticos, que flanquean la región diana e hibridan en cadenas opuestas del ADN. Los productos de cada ciclo de síntesis son utilizados como molde en el ciclo siguiente, por lo que la amplificación presenta una cinética exponencial (3) (4).

Finalmente los productos de PCR pueden ser examinados por electroforesis en gel de agarosa, y el tipo y subtipo puede ser determinado de acuerdo con la talla (pares de base pb) del fragmento amplificado. (5)(6)(7).


Equipos

- Gabinete de seguridad clase II
- Centrífuga
- Termociclador
- Cámara de electroforesis con fuente de alimentación
- Transiluminador y cámara fotográfica
- Horno microondas

Materiales y Reactivos

- Tubos de 500 μ L
- Pipeta estériles de cristal (2-5mL)
- Micropipetas
- Puntas de micropipeta con filtro
- Rotuladores
- Bata
- Guantes desechables.
- Trizol
- Cloroformo
- Isopropanol
- Etanol
- Estuche TR-PCR Access System
- Taq Polymerasa (Perkin-Elmer)
- Agarosa LE
- Tris
- Acido Bórico
- EDTA
- Glicerol
- Azul de bromofenol
- Bromuro de etidium
- 100 pb ADN Ladder.

Tabla1. Secuencia de los oligonucleótidos empleados.

Cebadores	Posición de (nucleotidos)	Secuencia (5'  3')
Primera reacción de amplificación		
H1N1 +	1-20	AGCAAAGCAGGGGAAATAA
H1N1 -	1175-1193	GTAATCCCGTTAATGGCA
H3N2 +	7-25	ACTATCATTGCTTTGAGC
H3N2 -	1166-1184	ATGGCTGCTTGAGTGCTT
B +	36-54	GAAGGCAATAATTGTACT
B -	845-874	TCACCATTAAAGGCAAGGACCCTTTTATT

V.1.-Extracción de ARN.**Procedimiento:**

Se realiza la extracción de ARN viral para cada una de las cepas de Influenza virus (H1N1, H3N2, B) y de cada uno de los aislamientos a partir de cultivo embrionario, utilizar como control negativo cultivo embrionario sin inocular.

- Tomar 250 µL de cada muestra (líquido coro alantoideo).
- Añadir 750 µL de TRIZOL, dar vortex durante 30 segundos. Dejar reposar 5 minutos a temperatura ambiente.
- Añadir 100µL de cloroformo, mezclar dando vortex 30 segundos y dejar reposar 3 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 12000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C.
- Transferir la fase superior a otro tubo eppendorf, evitar tomar de la interfase.
- Añadir 500µL de Isopropanol, mezclar por agitación manual e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar 15 minutos bajo las mismas condiciones.
- Adicionar 1000µL de Etanol al 75%.
- Centrifugar 15 minutos en igualdad de condiciones.
- Retirar el sobrenadante y secar el ARN (para ello se deja cada eppendorf abierto en el gabinete de seguridad). Es importante que el pellet no se seque demasiado ya que se vuelve insoluble.
- Resuspender en 30µL de agua bidestilada estéril.

- Guardar el ARN a -70°C

V.2.-Transcripción Reversa y Reacción en Cadena de la Polimerasa

- Preparar tubos eppendorf de $500\mu\text{L}$ con la mezcla de reacción que se muestra a continuación:

Reactivos de la mezcla	Cantidad por tubo
Buffer AMV 5X	10 μL
MgSO ₄ 25Mm	6 μL
DNTP (A, T, G, C) 10mM	1 μL
H1N1 + (100 ng)	1 μL
H1N1 - (100 ng)	1 μL
H3N2 + (100 ng)	1 μL
H3N2 - (100 ng)	1 μL
B + (100 ng)	1 μL
B - (100 ng)	1 μL
AMV RT 5U	1 μL
Taq Poli 5U	1 μL
H ₂ O	15 μL
	40 μL

- Añadir $10\mu\text{L}$ del ARN extraído al tubo con la mezcla de reacción para completar un volumen final de $50\mu\text{L}$.
- Dar un golpe de centrifuga para que se mezcle bien el ARN con la mezcla de reacción.
- Colocar los tubos en el termociclador bajo las siguientes condiciones:

Ciclos	Temperatura	Tiempo(minutos)
RT	48°C	45min
	92°C	2min
PCR x 30 ciclos	94°C	1min
	50°C	1min
	72°C	1min
Final	72°C	7min

V.3.-Detección del producto amplificado.

- Tomar $8\mu\text{L}$ de cada uno de los productos de la segunda reacción de amplificación, así como, del marcador de peso molecular (Macarcador de peso molecular ADN Ladder) y mezclar con $2\mu\text{L}$ de tampón de muestra para electroforesis 6X.
- Aplicar en un gel de agarosa al 2% en TBE 1X.

- Realizar la electroforesis a 90V durante 1 hora.
- Exponer el gel a la luz ultravioleta en un transiluminador.
- Realizar la lectura. Si es posible fotografiarlo.

Se consideran positivas aquellas muestras que den el peso molecular esperado para las bandas de H1N1 (1193 pb) , H3N2 (1177 pb), B (838 pb).

REFERENCIAS

- 1.- Fitch WM, Bush RM, Bender CA, Cox NJ. Long term trends in the evolution of H(3) HA1 human influenza type A. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. Jul 22;94(15):7712-8
- 2.- Cox NJ, Bender CA. The molecular epidemiology of influenza. Sem Virol. 1995; 6: 359-370.
- 3.- Wright KE, Wilson GA, Novosad D, Dimock C, Tand D. Typing and subtyping of influenza virus in clinical samples by PCR. J Clin Microbiol. 1995; 10:95-98.
- 4.- Class EJ, Sprenger MJ, Kleter GE, van Beek R. Type specific identification of influenza viruses A, B and C by the polimerase Caín reaction. J Virol Methods. 1992;39:1-13.
- 5.- WHO/ PAHO/ CDC. Influenza Surveillance and Epidemiology. Course. May14-18, 2001. Atlanta, GA EEUU.
- 6.- Ellis JS, Slader CJ, Laidler P. Análisis of influenza AH3N2 strains isolated in England during 1995-1996 using polymerase Caín reaction restriction J. Med Virol. 1997; 51:234-41.
- 7.- Zhang W, Evans D. Detection and identification of human influenza viruses by the polymerase Chaín reaction. J Virol Methods. 1991; 33: 165-89.

VIII. VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL HUMANO

Dra. Clara Savón Valdés.

INTRODUCCIÓN.

El virus Respiratorio Sincicial Humano (VRSH) después de su primer aislamiento en un lactante con neumonía en 1956, ha sido reconocido como el principal agente etiológico de la infección del tracto respiratorio bajo en lactantes y niños pequeños (1).

Este virus se clasifica dentro de la familia Paramixoviridae y el género Pneumovirus. La partícula viral es más pequeña que el resto de los paramixovirus, al igual que la nucleocápside (80nm-120nm y 11-15 nm) respectivamente. Su ARN es monocatenario, no segmentado y codifica para 10 proteínas. El orden de la transcripción de los genes es NS1 y NS2, correspondientes a las proteínas no estructurales), gen de la nucleoproteína (N), de la fosfoproteína (P), de matriz no glicosilada (M), pequeña proteína hidrofóbica (SH), gen de la glicoproteína de unión (G), gen de la glicoproteína de fusión (F) y gen de la polimerasa o proteína (L) también conocida como proteína larga. Las proteínas SH, G y F forman parte de la envoltura del virión; estas últimas son las que inducen los anticuerpos neutralizantes (2)

La partícula viral es estable aunque muy lábil o sensible a los cambios de temperatura y pierde más del 90% de su infectividad en un proceso de congelación y descongelación.

En el VRSH se reconocen dos subgrupos antigénicos que pueden definirse por su reacción con anticuerpos monoclonales. Ambos subgrupos muestran una gran variabilidad antigénica intergrupo e intragrupo.

El espectro de trastornos respiratorios producidos por el VRSH va desde un resfriado común en adultos, hasta cuadros de bronquiolitis en lactantes y neumonía en niños mayores.

Este virus es el responsable del 40% de las bronquiolitis y del 25% de todas las neumonías virales (3), siendo en los lactantes el virus más frecuente en los 6 primeros meses de edad. El período de incubación de la enfermedad es de 4 a 5 días sin embargo la excreción viral puede durar hasta 3 semanas.

La mortalidad es baja; pero si se superpone una enfermedad preexistente, la mortalidad puede alcanzar hasta el 37 %. El VRSH se ha descrito también como causante de neumonía en el anciano. Las reinfecciones son comunes (4).

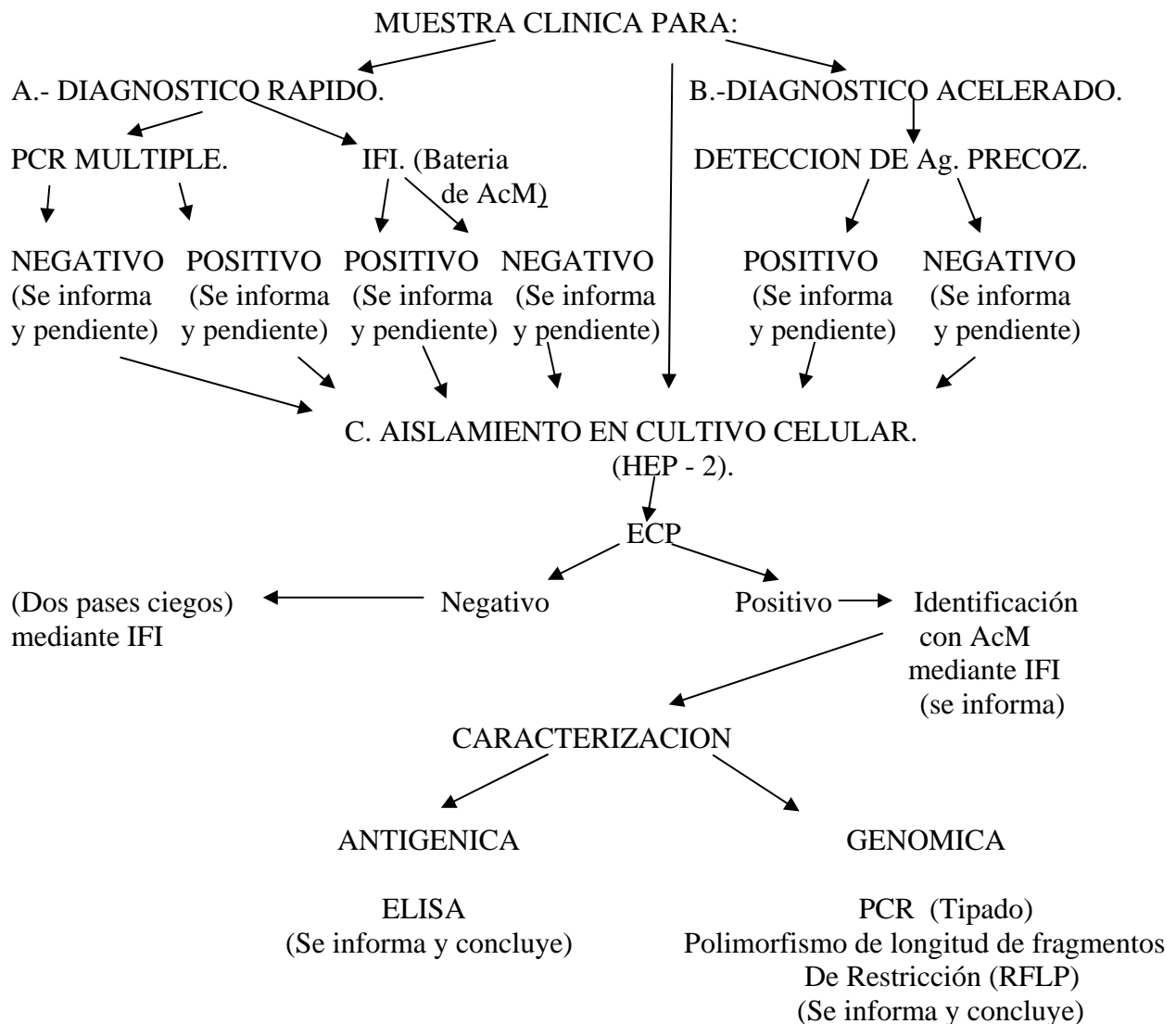
Un diagnóstico presuntivo de la infección por VRSH en niños, debe estar basado en los síntomas clínicos, la edad y otros factores epidemiológicos, pero el diagnóstico definitivo depende del

laboratorio y pudiera dividirse en 2 aspectos fundamentales: detección del virus o de sus componentes y los métodos serológicos. A continuación detallaremos una serie de técnicas del diagnóstico y caracterización de esta entidad nosológica(4).

Referencias

1. Collinis PI, McIntosh K and Chanock R M. Respiratory Syncytial Virus In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM et al Virology . Chapter 44 Third Edition .Philadelphia . Lippicott Raven Publishers 1996 1313-43.
2. Cane P, Pringle C. Molecular epidemiology of human respiratory syncytial virus. Seminars in Virology 1995; 6:371-378.
3. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA, Brooks GF, Brutel JS, Ornton L N. Paramixovirus y Rubeola: En Microbiología Médica Capitulo 40 16 ed Mexico. El manual Moderno, SA de CV ,1999: 520-22.
4. Ribas A, Valdés O, Valdivia A. Paramixovirus y Rubeola. Capitulo 68, En: Microbiología y Parasitología Médica Tomo III. Primera Ed Ciencias Médicas, La Habana 2001.

FLUJO DE TRABAJO.



I.-AISLAMIENTO DEL VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL HUMANO

Este virus sólo puede aislarse en cultivos celulares. Los aislamientos virales se obtienen con mayor facilidad de aspirados nasofaríngeos y con dificultad de hisopados en general (ya sean nasales o faríngeos) (1). El virus crece con relativa facilidad en células epiteliales tales como la línea continua de Carcinoma laríngeo epidermoide Hep-2. Una variedad de células primarias de riñón de mono y los fibroblastos humanos son también sensibles para lograr el aislamiento del Virus Respiratorio Sincital Humano (VRSH). Se plantea que cerca del 20% de las cepas de VRSH no pueden ser recuperadas cuando se usan sólo células epiteliales de línea para su aislamiento. Una combinación de células epiteliales de línea, células primarias de mono y fibroblastos humanos constituyen la combinación ideal para obtener mayor cantidad de aislamientos a partir de muestras clínicas (2).

Otro factor que influye en el aislamiento de VRSH es la composición del medio de cultivo. La adición de glutamina al medio de mantenimiento es necesaria para el desarrollo del efecto citopático (ECP). La multiplicación del virus en cultivos celulares se ve también favorecida cuando se inocula una monocapa celular que tenga entre 50-75% de confluencia. El pH del medio de cultivo constituye otro factor influyente. Debe estar entre 7.2-7.4, ya que el aislamiento de este virus se ve en gran medida afectado por pH ácidos. (2)

El efecto citopático aparece generalmente entre 3 y 7 días, sin embargo, en los casos en que el ECP no aparezca, es recomendable desprender el cultivo y dar un pase ciego al menos por dos ocasiones antes de informar el caso como negativo (3).

Con el objetivo de lograr un mayor porcentaje de recuperación viral, es aconsejable centrifugar los tubos de cultivos inoculados con la muestra clínica a 2000 r.p.m. durante 45 minutos antes de adicionar el medio de mantenimiento (4).

Aunque existen otros, métodos de diagnóstico, es importante, para el laboratorio encontrarse en posesión de los aislamientos virales de las cepas circulantes para futuros estudios epidemiológicos.

Equipos:

Gabinete de seguridad Clase II

Incubadora de 37⁰ C

Congelador de -70⁰ C

Refrigerador de 4⁰ C

Centrífuga con aditamento para centrifugar placas

Microscopio óptico invertido

Materiales y Reactivos:

Batas

Guantes

Pipetas 2 y 5 mL

Micropipetas 200 y 1000 μ L

Puntas de Micropipetas

Rotuladores

Medio Mínimo Esencial (MEM Gibco)

Glutamina al 1%

Antibiótico

Suero Bovino Fetal

Tubos de cultivo 12 x 75 sembrados con 150, 000 cel/mL con Células Hep-2 (ATCC)

Gradillas de tubos de cultivo

I.1.-PROCEDIMIENTO:

Observar los tubos de células Hep-2 para ver si la monocapa celular tiene el 75% de confluencia.

Descartar el medio de cultivo

Inocular por duplicado 200 μ L de la muestras clínica (ver Capítulo IV). Por cada grupo de tubos inoculados el mismo día, se dejan dos controles de células que permiten comparar los cambios morfológicos que se observan en los tubos inoculados (sincitios o células gigantes) y que pueden ser utilizados como control negativo en la prueba de identificación.

Centrifugar los tubos inoculados a 2000 r.p.m. durante 45 minutos a 33⁰ C.

Adicionar el medio de cultivo de mantenimiento* para el aislamiento viral e incubar a 37⁰ C.

Pasadas las primeras 24 horas se realiza un cambio de medio. Esto se hace con el objetivo de proporcionar nutrientes frescos a las células y favorecer el aislamiento viral e incubar a 37⁰ C.

Siguiente día. Observar los tubos detenidamente buscando algún cambio morfológico (focos de sincitios) e incubar nuevamente. Es importante estar atentos a los cambios de pH. Se debe recordar que los pH ácidos no favorecen la multiplicación del VRSH.

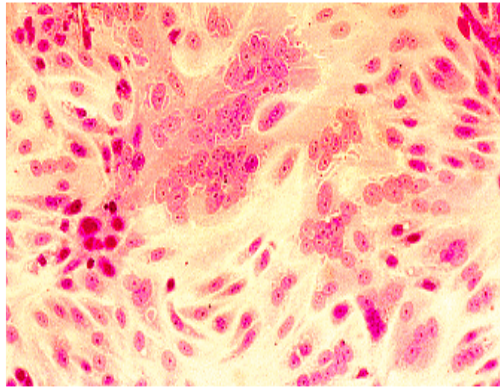
Continuar la observación diaria y si fuera necesario cambiar el medio.

Si el ECP no ha aparecido al día 10, es aconsejable, desprender el cultivo de forma aséptica (con una pipeta de cristal estéril o policía de goma estéril e inocularlo en otro nuevo tubo repitiendo los pasos anteriores (pase ciego).

Cada muestra clínica debe tener al menos 3 pases (1 siembra o inoculación primaria y dos pases ciegos) antes de informar el caso como negativo.

Si el ECP característico de VRSH aparece en algún caso, debe tomarse un tubo para realizar la identificación por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) (ver acápite de IFI) y el duplicado se guardará a -70°C para pases sucesivos.

De cada aislamiento viral debe tenerse, al menos 5 réplicas de 1ml para trabajos posteriores de caracterización antigénica.



Cultivo de células Hep-2 infectado con Cepa long de virus sincitial respiratorio

***I.2.-MEDIO DE MANTENIMIENTO PARA EL AISLAMIENTO DE VRSH EN HEP-2**

Medio MEM

Glutamina 1%

Suero Bovino Fetal (SBF) 2%

Antibiótico 1% de la solución stock

Referencias:

1. Collinis PI, McIntosh K and Chanock R M. Respiratory Syncytial Virus In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM et al Virology. Chapter 44 Third Edition .Philadelphia. Lippicott Raven Publishers 1996 1313-43.

2. Lennette DA. General principles for laboratory diagnosis of viral rickettsial and Chlamydial infections Chapter 1. IN: Diagnostic Procedure for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections 7 ed Washington DC 1995. 3-25.

3. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA, Brooks GF, Brutel JS, Ornton LN. Paramixovirus y Rubeola: En Microbiología Médica Capítulo 16 ed Mexico. El manual Moderno, SA de CV, 1999: 520-22.

4. Ribas A, Valdés O, Valdivia A. Paramixovirus y Rubeola. Capítulo 68, En: Microbiología y Parasitología Médica Tomo III. Primera Ed Ciencias Médicas, La Habana 2001.

II.- TITULACIÓN DE VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL POR EL MÉTODO DE PLACA.

En los laboratorios de diagnóstico es imprescindible contar con un lote de virus de título conocido. Este lote suele emplearse con diversos fines como por ejemplo para la producción de antígenos, neutralización y controles para diversas pruebas.

El título infectivo de un virus puede hacerse en tubos de cultivo haciendo diluciones seriadas y los resultados del mismo son calculados aplicando la fórmula de Reed y Muench (1).

La técnica de placa es más exacta ya que utiliza un medio semisólido como la carboximetilcelulosa (CMC). Las placas virales al ser coloreadas pueden contarse macroscópicamente. El título viral será expresado en unidades formadoras de placas (ufp / mL).

Equipos.

Gabinete de seguridad Clase II

Incubadora de CO₂

Vortex

Congelador de -70 °C

Cámara de 4 °C

Microscopio óptico invertido

Materiales y Reactivos

Viales eppendorf

Pipetas de 1, 5 y 10 mL

Micropipetas 1000, 100-200, 20 µL

Puntas de micropetas estériles

Medio esencial mínimo (MEM)

Suero Bovino Fetal (SBF)

Antibióticos.

MEM 2X (MBA) sin rojo fenol

Carboximetil celulosa (CMC)

Nafthol Blue Black (NBB)

Acetato de Sodio

Acido acético glacial

H₂O destilada

Placas de 24 pocillos

Suspensión de células Hep-2 a 200 000 cel/mL

II.1.-PROCEDIMIENTO:

Preparar un grupo de viales rotulados desde 10^{-1} hasta 10^{-6} (esto depende del título que normalmente posee el virus).

Dispensar de forma estéril 0.9 mL (en el gabinete) del diluyente (medio MEM con 2% de SBF) en cada vial y mantenerlos en un baño de hielo.

Descongelar un vial del virus semilla que se quiere titular. Transferir 0.1mL de virus al primer vial, eliminar la punta, cerrar el vial y mezclar vigorosamente en el agitador (vortex con una punta nueva pasar 0.1mL de la dilución inicial (10^{-1}) al siguiente tubo. Descartar la punta. en cada pase, con el objetivo de evitar el arrastre de la dilución anterior .Continuar así hasta llegar a la última dilución programada.

Adicionar 0.5mL de la suspensión celular de una concentración de 200,000 cel/mL en cada pocillo. Se deben poner cuatro réplicas por dilución viral.

Dejar reposar la placa durante 1 hora a 37° C en una incubadora de CO₂ al 5%.

Inocular 50µL de cada dilución por pozo e incubar 4 horas a 37 °C en incubadora de CO₂ al 5%.

Adicionar 1 mL de medio con CMC (recubrimiento) que debe tener un pH 7.2.

Incubar a 37 °C por 5 días.

Al quinto día. Desechar el medio muy suavemente lavando la placa con agua del grifo.

Teñir las células con el colorante NBB (0.5 mL por pocillo). Esperar 30 minutos.

Lavar la placa con agua del grifo.

Secar con papel de filtro y contar las placas.

II.2.-LECTURA Y CÁLCULO DEL TÍTULO VIRAL

Para la lectura del título viral se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{UFP x mL} = p \times 20 \times 10^X$$

Donde:

P es el promedio del número de placas obtenido en las diluciones en que las placas pudieron contabilizarse.

20 es el factor de corrección para expresar el título en UFP x mL (1000µL /vol inoculado).

10^X representa la última dilución en que se contaron las placas (factor de dilución)

Dilución	# de Placas			Promedio
10^{-1}	NC	NC	NC	NC
10^{-2}	15	19	17	17
10^{-3}	4	3	3	3
10^{-4}	0	0	0	0
10^{-5}	0	0	0	0

NC = No contables

Título será $3 \times 20 \times 10^3 = 6.0 \times 10^4$ UFP x mL

II.3.-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 veces más concentrada de la muestra el número ideal de placas.

Por ejemplo: Si la dilución es 1:10000 se observa un promedio de placas virales entre 20 y 30 (número ideal de placas) la dilución de trabajo adecuada será 1:500

II.4.- MEDIOS Y SOLUCIONES:

MEDIO DE RECUBRIMIENTO

Suero bovino fetal	10 mL
L – Glutamina al 1%	1 mL
2X (MEM) sin rojo fenol	100 mL
Carboximetilcelulosa (CMC) al 3%	50 mL
Antibióticos al 0.1%	0.2 mL

Ajustar a pH 7.2 con solución de bicarbonato de sodio al 7.5% (preparada para cultivo celular).

La carboximetilcelulosa al 3% que se sugiere por dar mejores resultados es Sigma # de catálogo C-48888, ya que posee una viscosidad media.

PREPARACIÓN DE CMC

50 mls de H₂O bidestilada

1.5 grs de CMC

Dejar disolviendo a 4⁰ C durante dos días Poner en autoclave a 121⁰ C 10 minutos.

COLORANTE: NAPHTHOL BLUE BLACK (NBB)

Naphtol Blue Black	1 gr
Acetato de Sodio	13.6 gr
Acido acético	60 mL
H ₂ O a completar	1000 mL

Este puede almacenarse por largos períodos de tiempo.

Referencias:

- 1.-Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent end points. Am J Hyg 1938;27:493
- 2.-Tomado del Folleto de Técnicas de Laboratorio para el diagnóstico y la caracterización del Virus Dengue. Dpto de Virología. Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí. Centro Colaborador de la OPS-OMS para el Estudio de las Enfermedades víricas. Ciudad de la Habana 2001.

III.-DETECCIÓN DE ANTÍGENOS PRECOSES FLUORESCENTES DE VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL HUMANO ("SHELL VIAL ASSAY "MODIFICADO).

Esta técnica fue descrita por primera vez por Gleaves y cols en 1985 (1) para la detección rápida de citomegalovirus. El método consiste en combinar la centrifugación del cultivo celular inoculado lo que, facilita la adhesión viral y permite realizar el diagnóstico a las 48 horas de la inoculación antes de la aparición del efecto citopático (ECP) utilizando un anticuerpo monoclonal y un suero anti ratón conjugado con fluoresceína que detecta la presencia del antígeno precozmente en las células infectadas.

Este ensayo fue adaptado por Smith y cols en 1991(2) para la detección del Virus Respiratorio Sincicial (VRSH) y más tarde modificado por Savón y cols 2000 (3) utilizando placas de 24 pocillos. Este ensayo muestra una sensibilidad de 97.4% y una especificidad de 95.7% al ser comparado con la Inmunofluorescencia y el aislamiento en cultivo celular respectivamente.

Equipos:

Gabinete de seguridad clase II

Centrífuga con aditamento para centrifugar placas de cultivo.

Incubadora de CO₂

Congelador de – 70⁰ C.

Plataforma o balancín

Microscopio invertido de fluorescencia (Aristoplán)

Materiales y Reactivos:

Micropipetas de 100,200 y 1000 µL

Puntas estériles para micropipetas

Placas de 24 pocillos

Batas

Guantes desechables

Papel de filtro

Solución Salina Tamponada de fosfatos (PBS)

Acetona GR

Solución de Sulfato de neomicina al 1%

Anticuerpo monoclonal anti-proteína de fusión (F)

Antisuero anti-ratón conjugado con fluoresceína

Células de Carcinoma Mucoepidermoide humano Hep-2 ATCC)

Medio Mínimo Esencial (MEM)

Solución de L-glutamina al 1%.

Suero Bovino Fetal (SBF)

Bicarbonato de Sodio al 7.5% (Preparado para Cultivo celular).

Control Positivo VRSB con título de 3×10^{-4} ufp x mL

Control negativo

Muestras Clínicas (aspirados nasofaríngeos, hisopados, Lavados faríngeos, en general muestras respiratorias descritas en el capítulo de muestras).

III.1.-PREPARACIÓN DEL CULTIVO

Placas de 24 pocillos sembradas con células Hep-2 a una concentración de 200,000 cél/mL y con 24 horas de incubación.

1. Eliminar el medio de la placa cuidadosamente.
2. Inocular 200µl de la muestra clínica sin diluir por duplicado.
3. Centrifugar a 2000 r.p.m. durante 45 minutos a 33° C.
4. Eliminar el inóculo aspirando con cuidado. Se cambia la punta entre pocillo y pocillo evitando así las contaminaciones.
5. Adicionar 1mL de Medio de mantenimiento. MEM, SBF al 5%+Sulfato de neomicina 0. 1%, Glutamina 1% (ver anexo Preparación de medio de cultivo para el crecimiento de VRSH en Células Hep-2).
6. Incubar a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5%.
7. Pasadas las 48 horas, eliminar el medio de cada pozo incluyendo los controles, teniendo cuidado de cambiar la punta, para evitar contaminaciones.
8. Adicionar 1mL de STF por las paredes del pocillo.
9. Seguidamente aspirar cada pocillo cambiando la punta, finalmente virar la placa sobre el papel de filtro sin golpear para no desprender las células. Repetir la operación. de lavado.
10. Preparar la solución de fijar las células Esta consiste en acetona fría al 80% en PBS pH 7.2 (ver soluciones) este paso todo puede hacerse en la meseta del laboratorio.
11. Adicionar 1mL de solución de fijación a cada pocillo. Esperar 15 minutos a temperatura ambiente.
12. Aspirar la solución de fijación.
13. Añadir a cada pocillo 100µL del anticuerpo monoclonal en dilución de trabajo. Debe titularse el anticuerpo previamente con el control positivo, dispensar y congelar en alicuotas. Solo se debe utilizar en la prueba el lote titulado.
14. Colocar la placa en un balancín o plataforma e incubar durante una hora a 37⁰ C en cámara húmeda.
15. Eliminar cuidadosamente el anticuerpo de cada pozo.
16. Lavar la placa dos veces con PBS.
17. Secar sobre papel de filtro golpeándola suavemente.
18. Añadir 100µL de conjugado anti- ratón fluorosceina en dilución de trabajo, determinada por titulación de cada lote de conjugado.

19. Colocar la placa en el balancín con agitación suave e incubar. 45 minutos a 37⁰ C en Cámara Húmeda
20. Eliminar el conjugado.
21. Repetir pasos 16 y 17.
22. Adicionar 100μLde agua destilada.
23. Observar al microscopio de fluorescencia.

III.2- INTREPRETACIÓN DE LA PRUEBA

La presencia de al menos de una célula con fluorescencia citoplasmática confiere el criterio de positividad.

- 1-3 células fluorescentes equivale a un caso débil positivo.
- 3-5 células fluorescentes equivale a un caso moderadamente positivo.
- 5 ó más células fluorescentes equivale a un caso fuertemente positivo.

III.3.-SOLUCIONES:

Solución de acetona al 80%

Acetona	80mL
PBS	20mL

Solución Salina Tamponada (PBS 1X) pH 7.2

Na Cl	137mM
KCl	2.7mM
Na ₂ PO ₄	8.1mM
KH ₂ PO ₄	1.47mM
CaCl ₂	0.68mM
MgCl	0.5mM
H ₂ O	1000ml

* ajustar pH si fuera necesario

Referencias:

- 1.Gleaves CA, Smith TF, Shuster EA, Pearson GR. Comparison of standard tube and Shell vial cell culture techniques for detection of cytomegalovirus in clinical samples. J Clin Microbiol 1985;21:217.
- 2.-Smith MC,Creutz C Huang YT. Detection of respiratory syncytial virus in nasopharyngeal secretions by shell vial techniques.J Clin Microbiol 1991;21:29.
- 3.-Savón C, Goyenechea A, Valdivia A, Chacón D, Cancio R, Pérez L, González G, Gavilondo J. .Detection of Respiratory Syncytial virus in Nasopharyngeal Secretions by 24 well plate precentrifugation assay using amonoclonal antibody against F Protein .Arch Medical Research 2000; 31:93-96.

IV.-CARACTERIZACION ANTIGÉNICA DE LOS AISLADOS DE VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL (VRSH) UTILIZANDO UN ELISA INDIRECTO Y ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Los VRSH aislados se han clasificado en dos subgrupos antigénicos (A y B) según la reactividad con distintos paneles de anticuerpos monoclonales (1). Las diferencias antigénicas entre las cepas de ambos subgrupos se detectan sobre todo en la proteína G (García-Barreno y cols 1989) así entre la proteína G de ambos subgrupos el grado de relación antigénica estimado de las respuestas en niños es de 5-7%, mientras que las respectivas proteínas F tienen una relación de un 25% (2). Además existe variabilidad antigénica en la proteína G entre los virus del mismo subgrupo (3).

Existen cuatro tipos diferentes de epítomos en la proteína G

- 1) Epítomos conservados**, presentes en todos los virus aislados.
- 2) Epítomos específicos de subgrupo** presentes en todos los virus del mismo subgrupo.
- 3) Epítomos variables**, presentes sólo en algunos virus del mismo subgrupo.
- 4) Epítomos específicos de cepa**, presentes únicamente en el virus que se empleó para obtener los AcM. Ensayos de unión competitiva de los AcM al virus muestran que las últimas categorías de Epítomos están formando parte de áreas antigénicas solapantes (4).

La heterogeneidad antigénica de la proteína G contribuye a la incompleta neutralización de los virus de distintos subgrupos antigénicos. La caracterización antigénica de las cepas aisladas permite estudiar la variabilidad antigénica de las cepas circulantes en diferentes brotes y constituye el primero de los estudios de evolución.

El método de Elisa empleado para la caracterización antigénica; es un ensayo indirecto que puede emplear extractos virales sin purificar, gracias al uso de anticuerpos monoclonales (5, 6).

Equipos

Gabinete de seguridad Clase II

Congelador -70° C

Cámara de 4° C

Centrifuga refrigerada

Incubadora de 37° C

Lector de Elisa

Espectrofotómetro (Titertek multiscan Flow Laboratories)

Materiales y Reactivos:

Batas

Guantes

Células Hep-2 Carcinoma laríngeo humano, American Type culture collection (ATCC L-23).

Cepas de VRSB que se quieren caracterizar.

Anticuerpos monoclonales anti prot G

Epítopes Variables de Cepa long 63G, 25G, 68G,78G

Epítoto Específico de Grupo A 021/19G

Epítoto Conservado de grupo A 021/1G

Epítopes Específicos de la cepa Montevideo, 021/5G, 021/8G, 0219G

Frascos de cultivo celular de 75cm²

Medio Mínimo Esencial (MEM)

solución de penicilina sódica – estreptomina

Suero Bovino fetal (SBF)

Tween 20

Albúmina de suero bovino Fracción V (BSA)

Antisueros anti IgG de ratón conjugado con biotina

Estuche de BCA (micro BCA TM Protein Assay Reagent Kit Pierce N° Cat. 23235) para la determinación de proteínas.

Peroxidasa estreptavidina

Agua oxigenada

Ortophnylendiamine (OPD)

Tritón X-100

Tris base

Acido Cítrico

Desoxicolato de sodio

Cloruro de Magnesio
Cloruro de calcio
Cloruro de sodio
Cloruro de potasio
Acido etilen diamino tetracético (EDTA)
Fosfato dibásico de sodio
Fosfato dibásico de potasio
Glutamina al 1%

IV.1 MULTIPLICACIÓN DE LOS VIRUS AISLADOS.

Inocular 2mL de virus aislados en frascos de 75 cm² con monocapas confluentes de células Hep-2.

Incubar una hora a temperatura ambiente (TA) para facilitar la adsorción viral.

Pasada esta hora añadir medio de mantenimiento a las células (MEM+ 2% de Suero Fetal bovino + antibióticos +Glutamina).

Incubar a 37 °C hasta que el efecto citopático alcance un 80% (sincitios).

Desprender las células infectadas con raspadores o perlas de vidrio.

Recoger las células desprendidas conjuntamente con el sobrenadante para la preparación de los extractos virales.

IV.2.-PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS VIRALES Y CÁLCULO DE SU CONCENTRACIÓN.

Centrifugar las células infectadas y los sobrenadantes durante 20 minutos a 2000 r.p.m. a 4°C.

Eliminar el sobrenadante y lavar dos veces el sedimento con PBS.

Resuspender el sedimento en 2ml de PBS.

Añadir 400 µL de tampón lisis y aplicar vortex dos veces, el material que no resulte soluble será eliminado por centrifugación a 10 000 r.p.m. a 4 °C durante 10 minutos.

La concentración de proteínas virales será calculada utilizando el estuche de BCA de acuerdo con las recomendaciones del fabricante y la absorbancia será leída a 460nm.

IV.3.-ELISA PARA CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA.

(Procedimiento de acuerdo al protocolo descrito por Palomo et al 1990 (5))

Recubrir una placa Maxisorb con 50 μ L por pocillo de extracto viral de las cepas a caracterizar y las cepas de referencia, tantas veces como anticuerpos monoclonales se vayan a testar y por duplicado para cada monoclonal a una concentración de 0.33 a 0.5 μ g/mL (diluido en PBS). Se coloca en cámara húmeda a 4 ° C durante 18 horas.

Lavar el recubrimiento una vez con PBS Tween-20 al 0.05%.

Los sitios libres son saturados o bloqueados con una solución de PBS con 1% de Suero bovino fetal (SBF) durante 30 minutos a Temperatura ambiente (TA).

Aspirar el bloqueo.

Preparar las diluciones de los anticuerpos monoclonales (1:200) en PBS con 1% de SBF y añadir 100 μ L por pozo de las diluciones de los monoclonales. e incubar durante una hora a TA .

Lavar 5 veces con agua corriente.

Adicionar el conjugado anti IgG de ratón marcado con biotina a una dilución 1:1000 e incubar 1 hora a TA.

Lavar 5 veces con agua corriente.

Añadir el conjugado estreptavidina peroxidasa (1:2000) e incubar 30 minutos a TA.

Lavar con agua corriente o del grifo 5 veces.

Revelar la reacción con una mezcla de OPD más peróxido de hidrógeno en buffer fosfato citrato de 5 a 10 minutos.

Determinar la absorbancia a 492 nm en un espectrofotómetro de la serie Multiscan.

IV.4.-Intrepretación de los resultados:

Los resultados son expresados en porcentos de actividad con respecto a la respuesta observada para las cepas de referencias .La reactividad se clasifica en:

Baja o ninguna (por debajo de 25 %)

Moderada (entre 26%-50%)

Alta (por encima del 52%).

IV.5.- SOLUCIONES:

Solución tamponada de fosfatos (PBS) pH= 7.2

Na Cl	137mM
KCl	2.7mM
Na ₂ PO ₄	8.1mM
KH ₂ PO ₄	1.47mM
CaCl ₂	0.68mM
MgCl	0.5mM
H ₂ O	1000mL

Tampón de Lisis pH=7.6

NaCl	140mM
EDTA	5mM
Tris-HCL	10mM
Tritón X-100	1%
Desoxicolato de Sodio	1%
H ₂ O	50mL

Tampón Fosfato- Citrato pH =5

Acido cítrico	5.1g
Na ₂ HPO ₄	7.47g
H ₂ O	100mL

Referencias:

- 1.-Mufson MA, OrvellC RafanakB, Norrby E. Two distinct subtypes of human respiratory syncytial virus J. Gen Virol 1985;66:2111-2124.
- 2.-Hendry RM,Burns J C, Walsh EE, Strainspecific serum antibody responses in infants undergoing primary infection with respiratory syncytial virus. J.Infect Dis 1988;157:640-647.
- 3.-Garcia-Barreno B,Delgado T, Melero JA. Genetic instability of the oligo- A sequences of the Gprotein of human respiratory syncytial virus abstracts oh the IX InteARNtional Congress of Virology p 173,1993:167.
- 4.-Rueda P, Garcia -Barreno B, Melero JA. Premature stop codons in the G glycoprotein of human respiratory syncytial virus resistant to neutralization by monoclonal antibodies J Virol;1991;65:3374-3378.
- 5.-Palomo C, Albar JP, Garcia Barreno B, Melero JA. Induction of a Neutralizing Immune response to human respiratory syncytial virus with anti-idiotypic antibodies. J Virol 1990;64:4199-4206.
- 6.-Gonzalez G, Savón C, Cancio R, Valdivia A, Chaco'n D, Miguez J, Goyenechea A. Variabilidad antigénica de cepas de Virus Sincitial Respiratorio aisladas en Ciudad de La Habana mediante ELISA utilizando anticuerpos monoclonales. Rev Biomed 1999;10:77-84.

V.- DETECCION Y CARACTERIZACION DEL VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL (VRSH) MEDIANTE RT/PCR ANIDADA PARA EL GEN DE LA PROTEINA DE FUSIÓN (F) Y PCR ANIDADA PARA EL GEN DE LA PROTEINA (N).

Si bien se recomienda la PCR múltiple desarrollada por Coira et al 2003 (1) para el diagnóstico molecular de los principales virus respiratorios por su especificidad y sensibilidad altas, la RT-PCR-Anidada desarrollada por Pérez-Breña en 1998 (2) es también útil para la detección y tipado del (VRSH) utilizando iniciadores diseñados del gen de la proteína F. Entre sus ventajas está la posibilidad, de continuar estudios de caracterización genómica y definir claramente los genotipos circulantes en cada temporada epidémica, de acuerdo con las variaciones observadas en la proteína F.

Cane y Pringle en 1991 (3) diseñaron unos iniciadores del gen la proteína N que capaces de detectar VRSH de forma total, pero sin llegar a tipificar. Inicialmente fue concebida como una RT-PCR por lo cual su sensibilidad no era tan alta, aunque el tratamiento de los productos de esta PCR con enzimas de restricción permite además definir los genotipos de VRSH A y B. Pérez – Breña en el año 1998 (2), rediseña estos iniciadores y elabora una PCR-anidada en la cual se observa un aumento considerable de la sensibilidad.

Equipos

Gabinete de seguridad

Termociclador

Centrifuga de viales refrigerada

Vortex

Congelador -70°C

Horno microondas

Cámara de electroforesis submarina y fuente de alimentación

Transiluminador de Luz UV y cámara fotográfica

Materiales y Reactivos:

Batas

Guantes

Viales Eppendorf de 1.5 mL

Viales de PCR de 0.5 mL
Micropipetas variables (0.5-10, 10-20, 50-200, 100-1000 μ L)
Puntas de PCR con filtro
Tubos universales de 25 mL (plásticos)
Pipetas pasteur desechables
Rotuladores
Trizol
Etanol Absoluto
Isopropanol
Agua Libre de ARNs
Cloroformo
Kit Rt/Access (Promega)
Amplitaq Pol (Perkin Elmer)
Buffer Taq (Perkin Elmer)
dNTPs (Pharmacia)
EDTA
Glicerol
Tris base
Acido Bórico
Agarosa LE
Agarosa LM
Azul de bromofenol
Bromuro de etidio
Marcador de Peso Molecular (67-1114 pares de bases)
Enzimas de restricción

Gen F

Oligonucleótidos	Posición nucleótidos	Secuencia 5' \rightleftarrows 3'
F4(+)	323---342	ACAATCGRGCCAGAAGAGAA
F5(-)	743----721	GTTACACCTGCATTAACACTRAA
F8 A(+)	364----386	ACACTCAACAATACCAAAAAWAC
F10A(-)	720----700	TTCCCTGGTAATCTCTAGTAG
F12 B(+)	364----386	ACAATCAATACCACAAAAACCT
F14B(-)	720----700	ATTCTCTGGTGATTTCCAACAA

Gen N

Oligonucleótido	Posición nucleótido	Secuencia 5' \rightleftarrows 3'
N17	760---778	CCTATGGTG/TCAGGGCAAGT
N18	846----865	GCAGAAATGGAACAAGTTGT
N23	1033---1015	TTCTTCTGCTGTC/TAAGTCTA

F4 y F5 se utilizan en la primera reacción de amplificación y F8, F10, F12 y F14 son utilizados en amplificación anidada. Los oligonucleótidos del gen N utilizados en la primera amplificación son N17 y N18. En la segunda reacción serán utilizados N18 y N23.

V.1.-PROCEDIMIENTO

Extracción de ARN con Trizol.

La extracción de ARN puede llevarse a cabo con el método que a continuación describimos (Trizol) o por el método propuesto por Casas en 1995 (4), ya descrito en la PCR múltiple para virus respiratorios en capítulos anteriores.

Dispensar 200 μ L de la muestra clínica en un vial eppendorf limpio, estéril y horneado centrifugar 10 minutos 12000 r.p.m. a 4⁰ C.

Eliminar el sobrenadante con pipeta pasteur y resuspender el sedimento con 200 μ l de trizol dando vortex, seguidamente dejarlo reposar 5 minutos.

Adicionar 100 μ L de cloroformo. Dar vortex durante 15 segundos y dejar reposar 3 minutos.

Centrifugar a 15000 r.p.m. durante 15 minutos a 4⁰ C.

Transferir la fase superior a un tubo limpio, teniendo cuidado no tocar la interfase (se transfiere aproximadamente el 75 % de la fase superior).

Añadir 200µL de Isopropanol. Mezclar bien pero suavemente y dejar reposar 10 minutos a – 20 °C.

Centrifugar a 15000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C.

Retirar el sobrenadante. Añadir 1 mL de etanol al 75%, frío y preparado en el momento, sin resuspender el sedimento.

Centrifugar 5 minutos a 15000 r.p.m. a 4°C.

Retirar el sobrenadante. **NO secar en Savant**, es importante que el sedimento no se seque demasiado ya que se vuelve insoluble, debe secarse en el propio gabinete.

Rehidratar con 35 µL de agua libre de libre de ARNsa

V.2.-RT/PCR-ANIDADA DE TIPADO PARA GEN F

V.2.1.-PRIMERA AMPLIFICACIÓN:

Para este primer paso se utilizó el estuche de RT/PCR Access System Promega., Este estuche tiene como ventaja que en un solo tubo de reacción se realiza la RT y la amplificación, gracias a que en el mismo están dos enzimas dos enzimas AMVRT y TFL que utilizan el mismo buffer.

Preparación de la Mezcla de Reacción y programación del Termociclador

Estuche–RT-PCR Access	1 Tubo	10 Tubos			
H2O	21.00 µL	210µL			
Buffer AMVRT/TFL (5X)	10 µL	100 µL	RT	42 ° C	45min
DNTPs(promega 10mM)	1 µL	10 µL		94 ° C	3min
SO4Mg2(25mM)	4 µL	40 µL	PCR x45 ciclos	94 ° C	30seg
F4(0.2µM)	1µL	10 µL		55 ° C	1min
F5(0.2µM)	1µL	10 µL		68 ° C	30seg
AMVRtasa 5u/µL	1µL	10 µL	FINAL	68 ° C	5min
TFLpolimerasa5u/µL	1µL	10 µL		4 ° C	forever
Cantidad total de Mezcla	40µL	400 µL			

Adicionar 10µL de ARN extraído a los tubos de mezcla. Homogeneizar las mezclas una vez que se le adicione el ARN y dar un golpe de centrifuga.

V.2.2.-SEGUNDA AMPLIFICACION:

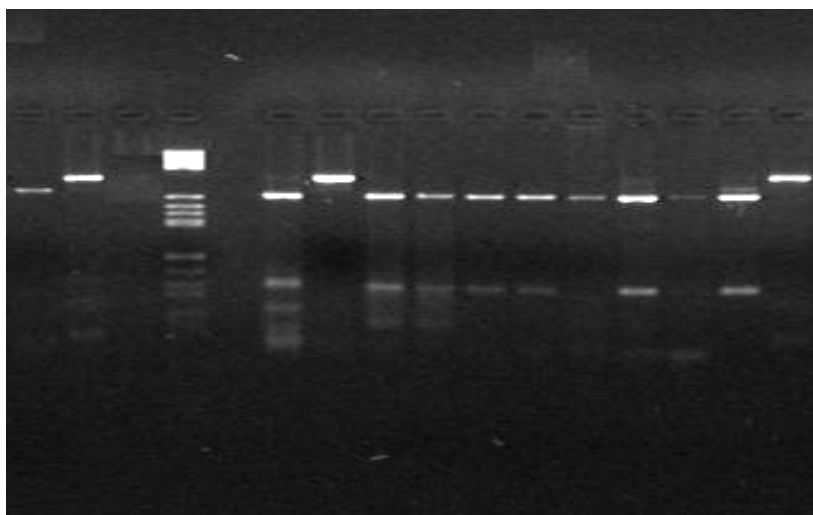
Para la segunda amplificación se añaden 2µL del producto amplificado de la primera reacción.

MEZCLA DE REACCIÓN DE LA SEGUNDA AMPLIFICACIÓN

	1 Tubo	10 Tubos			
H2O	36.35µL	363.5µl			
Buffer 10 X	5µL	50µL			
DNTPs(Pharmacia25mM)	0.4µL	4µL		95 ⁰ C	3min
MgCl 2 (25mM)	6µL	60 µL	PCR x35 ciclos	94 ⁰ C	30seg
F8(0.2µM)	1µL	10 µL		55 ⁰ C	1min
F10(0.2µM)	1µL	10 µL		72 ⁰ C	30seg
F12(0.2µM)	1µL	10 µL	FINAL	72 ⁰ C	10min
F14(0.2µM)	1µL	10 µL		4 ⁰ C	forever
AmplitaqPol	0.25µL	2.5 µL			
Cantidad total de Mezcla	48µL	480 µL			

V.3.-ANALISIS DIRECTO DE LOS PRODUCTOS DE PCR POR ELECTROFORESIS

Se prepara un gel de agarosa al 2% en TBE 1X teñido con bromuro de etidium 0.1µg/mL. En un tubo eppendorf limpio se toman 8µL del producto de PCR y 2µL de tampón muestra 6X y se mezclan bien. La mezcla se aplica al gel de agarosa utilizando el tampón de electroforesis (TBE 1X) en cámara de electroforesis submarina, a 90 V durante una hora..Las bandas de ADN son visualizadas en un Transiluminador de luz UV (LKB), determinando sus pesos moleculares por comparación con las bandas del ADN de los controles positivos y del marcador de peso molecular con un rango entre 67-1114pb. La talla esperada para las bandas de VRSH tipos A y B son de 356 y 294 pb respectivamente.



Gel de agarosa al 2% de izquierda a derecha: Cepa CH 18536, Cepa Long, Control negativo, patrón de peso molecular del 1 al 12 cepas caracterizadas en las cuales se pueden observar dos tallas que definen el grupo A Y B

V.4.-Soluciones:

Tampón de electroforesis.de 5X pH 8.0

TRIS	54g
ACIDO BORICO	27.5g
EDTA 0.5M	20mL
H2O C.S.P.	1000 mL

Nota: para preparar TBE 1X tomar 200 mL de TBE 5X y completar con 800 mL de agua bidestilada.

Tampón muestra 6X

EDTA	500mM
GLICEROL	10%
AZUL DE BROMOFENOL	0.01%
H2O	30%

Gel de Agarosa al 2%

Agarosa	2gr
TBE IX	100 mL
Bromuro de etidio	0.1µg/mL

Fundir preferiblemente en el microondas para evitar evaporación.

El bromuro de etidio debe manipularse en campana de extracción. Sus vapores y contacto con la piel son fuertemente cancerígenos.

VI.-CARACTERIZACIÓN GENOTÍPICA DE CEPAS AISLADAS DE VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL (VRSH). MEDIANTE POLIFMORFISMO DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP) DE LOS GENES F Y N.

El problema de las infecciones respiratorias víricas se ve aumentada por la gran capacidad de los virus respiratorios para producir reinfecciones. Se plantea que los niños pueden presentar entre 6 a 8 episodios respiratorios durante un año de vida (5).

Como es conocido los dos subgrupos de VRSH A y B pueden presentar diferencias no solo entre grupos, sino también entre cepas del mismo grupo. El desarrollo y disponibilidad de nuevas herramientas genéticas y antigénicas, ha permitido demostrar la existencia de la heterogeneidad dentro de los subgrupos A y B del VRSH(6).

La caracterización de las diferentes poblaciones de VRSH de epidemias sucesivas mediante el **Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP)** de los genes N,F y G brindan una información global de los diferentes patrones que circulan por el mundo facilitando así un análisis más completo de la epidemiología molecular de estos (7,8).

Esta técnica se basa; en el estudio de los fragmentos genómicos de determinados genes que fueron previamente amplificados por PCR, con un panel de enzimas de restricción que cortan el fragmento genómico en estudio a diferentes tallas. Este mapeo de restricción de los diferentes productos de PCR permite establecer los genotipos y los resultados más concordantes se obtienen cuando se analizan los tres genes, pudiéndose establecer el genotipo de los virus circulantes en estudio.(3)

Los fragmentos obtenidos producto de la digestión enzimática son visualizados por electroforesis en un gel de agarosa al 4%, constituyendo un patrón de restricción que puede ser sencillamente observado en presencia de luz UV en un transiluminador, sin necesidad del empleo de ningún otro equipo adicional .

VI.1.-Enzimas de Restricción para el análisis del Gen N

Para el análisis del Gen N (278 pb) entre los nucleótidos 954-1131 se mapea con las siguientes enzimas:

Hind III, Bgl-II, Pst-1, Hae III, y RSA-1.

Se han descrito 6 patrones de restricción para el VRSH que son designados desde NP1 hasta NP6 de acuerdo a sus patrones de restricción. Estos se confeccionaron tomando como modelo de corte el fragmento genómico de la cepa Long. Los patrones de corte NP1, NP3 se corresponden con el subgrupo antigénico B, mientras que NP2, NP4 y NP5 se corresponden con las cepas del subgrupo antigénico A. (3,9).

VI.2.-ESQUEMA DE LOS FRAGMENTOS DIGERIDOS POR ENZIMAS DE RESTRICCIÓN GEN N

Cane y Pringle 1991	Hind III	Pst-1	Bgl-II	Hae III	RSA-1
NP-(SubGrupoB)	No corta	No corta	No corta		175+83+20
NP-2(Subgrupo A)	No corta	No corta	No corta	147+31	175+83+20
NP-3(SubgrupoB)	No corta	No corta	190+88	No corta	175+83+20
NP-4(Subgrupo A)	No corta	No corta	190+88	147+31	175+83+20
NP-5(Subgrupo A)	No corta	No corta	190+88	147+31	167+83+20+8

VI.3.-PROCEDIMIENTO: Digestión Enzimática

Transferir 5 µL del producto de PCR amplificado a un tubo de 0.5 mL.

Preparar concentración de trabajo de las enzimas (1 Unidad /µL) ajustando la misma con el buffer correspondiente de la enzima y agua libre de ARNs.

Añadir a los 5 µL del producto amplificado 5µL de la enzima correspondiente.

Incubar 2 horas a 37⁰ C, preferiblemente en el termociclador, aunque puede ponerse en baño de agua bien ajustado.

Adicionar 3µL de tampón muestra para electroforesis.

Preparar un gel de agarosa al 4% con TBE 1X con 0.1 % de bromuro de etidio

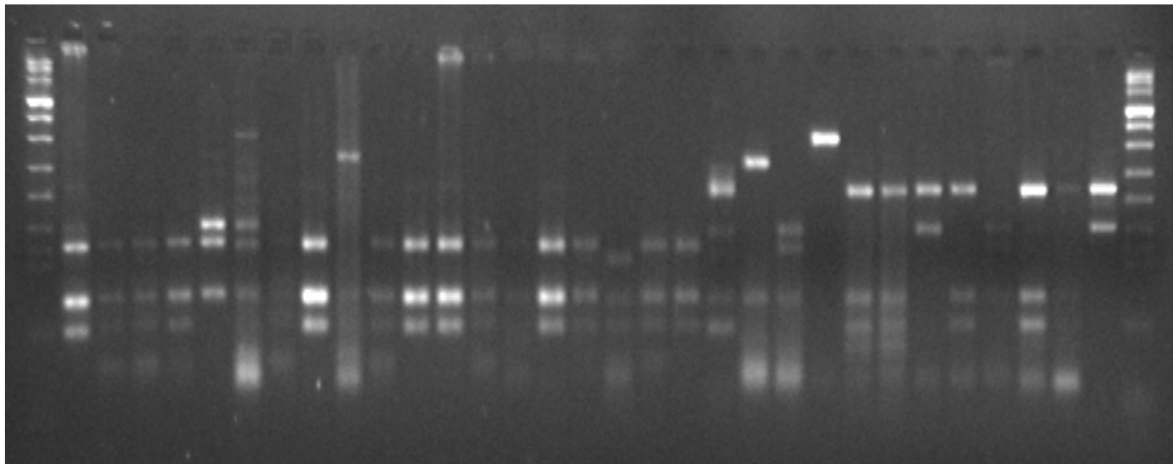
Aplicar la muestra al gel. En cada corrida debe incluirse como modelo la cepa Long (A) y CH 18536 (B) con el objetivo que sirva de patrón de corte. Un Marcador de peso molecular que abarque desde 1000 –100 pb.

Visualizar las bandas en un transiluminador de Luz UV y fotografiar para poder calcular las tallas de las bandas.

VI.4.-ANALISIS DE RESTRICCION PARA EL GEN F

El fragmento amplificado perteneciente al gen F se corresponde a 357 (pb) entre los nucleótidos 364 y 720 incluidos. Después del análisis de las secuencias disponibles, la región se mapea con las siguientes Enzimas de restricción: Hae III, Mbo I, Xho II, Bbv I, PST-1, Mae I, Dde I.

Se definen 10 patrones de restricción. Los patrones de restricción del sub-grupo A se distribuyen desde F1-F7 y sub-grupo B del F8-F10.



Restricción Enzimática Fragmentos Del Gen F. Enzima BbvI

VI.5.-ESQUEMA DE LOS FRAGMENTOS DIGERIDOS POR ENZIMAS DE RESTRICCIÓN GEN F

Pérez-Beña 1998	Hae III	Mbo I	Xho II	Pst-1	Bbv-1	Mae I	Dde I
F 1	357	210+83+64	83+275	287+60	269+88	341+16	232+113+12
F2	357	274+83	357	287+60	269+60+28	213+128+16	244+113
F3	357	274+83	357	357	269+60+28	213+128+16	357
F4	357	274+83	357	287+60	269+60+28	357	357
F5	357	274+83	357	357	269+60+28	213+128+16	357
F6	357	146+128+83	357	357	269+60+28	357	357
F7	357	243+83	357	357	357	213+128+16	357
F8	357	128+82+83+64	357	357	357	357	357
F9	357	128+182+83+64	357	357	357	357	357
F10	357	128+182+83+64	357	357	357	213+128+16	357

* Los números en el cuadro se corresponden a pb en este caso el fragmento mayor es 357 pb y menor 16 pb.

Digestión Procedimiento.

Para esto se seguirá la misma metodología descrita para la digestión del gen N.

VI.6.-Interpretación de los Resultados:

Las cepas serán denominadas de acuerdo al genotipo obtenido. Por ejemplo F1N4, F2N2, F9N1. Con la denominación de estos, será posible establecer los genotipos predominantes en cada temporada epidémica. Cuando se asocian los genotipos que circularon con los cuadros clínicos, es posible comenzar a profundizar en la epidemiología molecular de estos virus.

REFERENCIAS:

- 1.-CoIRA MT, Pérez-Breña P, García ML, Casas I. Simultaneous detection of Influenza A, B, And C viruses Respiratory Syncytial Virus and Adenovirus in clinical samples by Multiplex Reverse Transcription Nested PCR Assay. J Virol Methods 2003;69:132-144.
- 2.-Pérez Breña P. Estudio comparativo cepas de virus respiratorios sincitial., seleccionados según criterios clínicos epidemiología. Tesis Doctoral Universidad Complutense de Madrid 1998.
- 3.-Cane PA, Pringle CR Respiratory Syncytial Virus heterogeneity during epidemic analysis by limited sequencing (SH gene) and restriction mapping N gene. J Gen Virol 1991;72 349-357.
- 4.-Casas.I,Powell L, Klapper Pe, Cleator GM New methods for the extraction of viral ARN and ADN from cersipinal fluid for use in polymerase chain reaction. J Virol Methods 1995,53:25-36.

- 5.- Benguigui Y. La situación del control de las infecciones respiratorias en America Latina . Noticias sobre IRA. OPS/OMS 1994 (24) 4-5.
- 6.- Sullender WM. Respiratory Syncytial virus genetic and antigenic diversity Clin Microbiol Rev 2000; 13(1) : 1-5.
- 7.- Roca A, Loscertales M, Quintó LL, Pérez Breña P, Alfonso P et al . Genetic Variability among group A and B of Respiratory Syncytial Virus in Mozambique . Identification of New Cluster of group B isolates . J Gen Virol 2001; 82 103-11.
- 8.- Chou E H, Lee HJ. Genetic Diversity and Molecular Epidemiology of Respiratory Syncytial Viruses Isolated over 9 consecutive Epidemics in Korea. J Infect Dis 2000;181: 1547-1556.
- 9.- Valdivia A, Savón C, Chacón, Sarmiento L , Morier L, Otero A, Soto Y, Goyenechea A.. Analysis of Respiratory Syncytial Virus in clinical samples by Reverse Transcriptase – polymerase chain reaction . Restriction Mapping. Mem Inst Oswaldo Cruz , 1997; 92(3): 389-3

VII.-DIAGNOSTICO SEROLOGICO

VII.1.-SISTEMA ULTRAMICROELISA PARA LA DETECCION DE ANTICUERPOS DE TIPO IgG FRENTE AL VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL (VRSH).

El sistema ultramicroanalítico (SUMA) descrito originalmente para el procesamiento de muestras de laboratorio clínico por Horn y cols 1981, ha sido modificado para realizar ensayos inmunoenzimáticos que permitan el pesquizaje y diagnóstico de enfermedades infecciosas (Citomegalovirus, Dengue, etc).(1)

El Sistema de ultramicroelisa (UMELISA) de VRSH es un ensayo inmunoenzimático en su variante de doble anticuerpo o sándwich que utiliza como primer anticuerpo un monoclonal dirigido frente a la proteína de fusión (F) purificado por Cromatografía de afinidad.

Este anticuerpo aporta como ventaja al sistema, la posibilidad de incluir preparaciones antigénicas crudas en lugar de fracciones purificadas, lo que disminuye notablemente la reactividad obtenida en el control de antígeno.

El sistema aporta entre otras ventajas, la posibilidad de incrementar el número de muestras que pueden ser procesadas por placa. Su comparación con la técnica de fijación del complemento muestra una sensibilidad, coincidencia y especificidad de 97.2%,91.1% y 83.3% respectivamente (2).

La fase sólida del sistema está constituida por tiras de poliestireno de 10 microlitros por pocillo. Además se emplea un sustrato fluorogénico, que será hidrolizado y de forma que la fluorescencia emitida permitirá detectar la presencia de anticuerpos IgG específicos a VRSH.

En la aplicación del ensayo al diagnóstico de muestras de sueros pares, estas se incuban por duplicado en una dilución única de 1:40, la cual fue determinada construyendo una curva patrón

con paneles de sueros conocidos. Las lecturas de fluorescencia son convertidas automáticamente en títulos a punto final (TPF) aplicando la siguiente fórmula. (3)

$$TPF = \text{Exp}(\log \text{Fluorescencia} + BO) / B_1$$

Donde BO es el intercepto y B_1 la pendiente

La lectura se realiza en una Equipo SUMA modelo 521 Centro de Inmunoensayo La Habana Cuba.

VII.2.-PREPARACIÓN DE ANTÍGENO DE UMELISA DE VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL HUMANO

EQUIPOS:

Gabinete de Seguridad clase II

Centrifuga refrigerada

Refrigerador o cámara de 4⁰.C

Congelador de -70⁰.C

Incubadora de 37⁰.C

Espectrofotómetro

Bomba de Vacío

Equipo de Rotación de frascos tipo Roller

Materiales y Reactivos:

Pipetas de 10 mLs.

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

Puntas de micropipetas (5 – 20µL, 25 – 200 µLy 50 – 1000 µL.)

Guantes desechables

Frascos tipo roller sembrados de células Vero a una concentración de 180 000 cel/mL

Medio 199.

Viales tipo Eppendorf

TIRA de poliestireno con soporte

Tubos plásticos con tapa de rosca de 50 mL

Filtros Millipore

Membrana para filtro Millipore clarificante calibre 1.2 μ

Membranas de diálisis

Antibióticos

Estuche de BCA (micro BCA TM Protein Assay Reagent Kit Pierce N° Cat. 23235) para la determinación de proteínas.

Virus Control (Cepa Long)

VII.2.1.-PROCEDIMIENTO:

1- Retirar el medio de los frascos Roller.

2- Inocular 10 mL de virus control o semilla con un título de 5.8×10^6 ufp/mL, por frasco y dejarlo una hora de contacto a 37°C. en el equipo de rotación para frascos Roller .

3- Añadir 125 mL de medio 199 con antibiótico (sulfato de neomicina al 0.1 %).

4- Observar diariamente.

5- Cuando el efecto citopático haya alcanzado el 80% o más, congelar y descongelar 3 veces para la ruptura de las células y salida del virus.

6.- Dispensar en tubos de centrifuga plásticos estériles (de 50 mL y centrifugar a 3500 r.p.m. a 4°C durante 40 minutos para decantar las células).

7.- Decantar y recoger el sobrenadante y pasarlo por una membrana clarificante (1.2 μ) e introducirlo en una membrana de diálisis.

8. Colocar en una bandeja metálica y cubrirlo con sacarosa. Por cambios de presión osmótica, el líquido migrará hacia el exterior quedando en el interior de la membrana, el antígeno concentrado. Este procedimiento debe continuarse hasta que el antígeno haya perdido aproximadamente 90% el líquido inicial. Este paso debe realizarse a 4°C.

9.- Sacar el antígeno de la membrana de diálisis y dispensarlo.

10.- Medir la concentración de proteínas por el método de la BCA. (el antígeno es útil si su concentración es igual a 2mg/ml o más). Alicuotar y guardar a -70°C.

Este procedimiento es valido tanto para el antígeno vírico como para el antígeno empleado como control.

VII.3.-ULTRAMICROELISA DE DOBLE ANTICUERPO PARA LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS IgG AL VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL HUMANO.

Equipos:

Equipo Suma –521 (Centro Inmunoensayo La Habana Cuba)

Incubadora de 37 °C.

Lavador de Equipo Suma Modelo (Centro de Inmunoensayo La Habana Cuba).

Materiales y Reactivos:

Papel de filtro

Guantes

Micropipetas multicanal de 50-200µL.

Puntas de micropipetas multicanal.

Micropipetas de 10, 100, 200,1000µL.

Puntas de Micropipetas

TIRA de poliestireno con soporte

Placas de poliestireno de 96 pocillo fondo U (Costar o similar) para las diluciones de los sueros.

Bandejas metálicas con tapas.

Reloj de laboratorio

Sueros controles positivos y negativos.

Tween 20

Albúmina bovina fracción V

Cloruro de sodio (NaCl)

Cloruro de Potasio (KCl)

Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4)

Fosfato dibásico de sodio anhidro (Na_2HPO_4)

Carbonato de sodio anhidro (Na_2CO_3)

Bicarbonato de sodio (NaHCO_3)

Sacarosa

Suero de carnero (ovino)

Tris base

Inmunoglobulina humana conjugada con fosfatasa alcalina.

Anticuerpo monoclonal anti proteína de fusión (F)

Sustrato fluorescente: 4metil lumberiferil fosfato(Centro de Inmunensayo La Habana Cuba, Sigma o similar).

VII.3.1.-PROCEDIMIENTO:

- 1.-Preparar en tampón de recubrimiento o coating buffer pH 9 con el anticuerpo monoclonal a una concentración 10 µg/mL.
- 2.-Recubrir las tiras de poliestireno con 15µL por pozo y guardar en cámara húmeda a 4⁰ C durante toda la noche.
- 3.-Lavar 4 veces el recubrimiento con PBS-Tween al 0.5%.
- 4.- Adicionar la solución de bloqueo. A razón de 15µL por pozo e incubar una hora a temperatura ambiente en cámara húmeda.
- 5.-Aspirar el bloqueo.
- 6.- Preparar el antígeno vírico y el de control en una concentración de 1mg/ml en buffer de dilución (Tris-tween-+5% de suero de carnero).
- 7.- Dispensar 10µL del antígeno vírico en las posiciones A,C,E y G y del antígeno control en las posiciones B,D,F y H en todas las tiras. Incubar durante 30 minutos en cámara húmeda a 37⁰ C.
- 8.- Lavar 4 veces con buffer de lavado.
- 9.- Diluir los sueros en dilución 1:40 en buffer de Tris-Tween 15mM, Incluyendo los controles positivos y negativos.
- 10.-Dispensar los sueros por duplicado (antígeno virico y control) a razón de 10 µl por pozo e incubar en cámara húmeda a 37⁰ C durante 30 minutos.
- 11.- Lavar 4 veces con Buffer de lavado.
- 12.- Preparar la dilución del conjugado 1:1500 en buffer de dilución. Dispensar 10µl en cada pozo e incubar 30minutos a 37⁰ C en cámara húmeda.
- 13.-Lavar 4 veces con buffer de lavado.
- 14.-Adicionar 10µL de sustrato fluorescente comercial (en dilución 1:10) e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.

15.- Leer en un equipo SUMA modelo 521 aplicando el Programa de Lectura ANSA (Análisis serológico automatizado). Es importante realizar la primera lectura a los 15 minutos ya que en ocasiones las placas pueden estar aptas para ser leídas por el programa antes que concluyan los 30 minutos reglamentarios.

NOTA:

El programa calcula el título a punto final TPF del suero y luego lo transforma en títulos <1: 40,1:40,1:80,1:160,1:640,1:1280 etc.

VII.3.2.-Criterios de lectura:

Sueros pares (primer suero tomado en la fase aguda y el segundo en la fase convaleciente)

Suero positivo ejemplo

<40/40, sero-conversión

40/160 aumento 4 veces del título del primero con respecto al segundo.

Monosueros:

<40 negativo

1:40 o más positivo

VII.4.-SOLUCIONES:

SOLUCIÓN DE LAVADO

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

Tampón de recubrimiento o Coating Buffer pH 9.6

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

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

Solución de bloqueo

Albúmina de suero bovina (fracción V) 0.1% en PBS-Tween
Sacarosa 50mg/mL

Buffer de dilución

Tris-Tween 0.5%+ suero de carnero al 5%

Referencias:

- 1.-Rivas M, Laferté J, Alberti E, Rosario D, González G. Algunas aplicaciones del sistema ultramicroanalítico al diagnóstico de enfermedades infecciosas. Rev Cubana Med Trop 1992;44(3): 226-7.
- 2.-Savón C, Laferté J, Goyenechea A, Valdivia A, Morier L, Tejero Y. Normalización de Un ensayo de UltramicroElisa para la detección de anticuerpos IgG al Virus Sincitial Respiratorio. Rev Cubana Med Trop 1996: 48 (3):161-163.
- 3.-Miguez J, Tejero Y, Savón C, Laferté J, Rodríguez R, Goyenechea A, Gonzalez G, Hernández B. Evaluación de un ultramicroelisa para la detección de la infección por el virus sincitial respiratorio. Rev Biomed 1999;10:7-15.
- 4.- Savón C, Goyenechea A, Gonzalez G, Valdivia A, Hernández B, Oropesa S, Chacón D. Diagnóstico de un brote de bronquiolitis en la Ciudad de Las Tunas por ultramicroelisa. Rev enfermedades Infecciosas y Microbiología 1997;17(4).

IX.-VIRUS PARAINFLUENZA HUMANOS

Lic. Lídice Palerm Caraballo y Lic. Odalys Valdés Ramírez.MsC

INTRODUCCIÓN:

Los virus parainfluenza humanos (VPIh), son miembros del orden **Mononegavirales** y dentro de este pertenecen a la familia **Paramyxoviridae**, subfamilia **Paramyxovirinae**. Los parainfluenza comprenden dos de los cuatro géneros de la familia **Paramyxoviridae**, nombrados **Rubulavirus** y **Respirovirus** (1). Los cuatro tipos están contemplados de la siguiente forma en los dos géneros: el género **Respirovirus** incluye los virus parainfluenza humanos tipos 1 y 3, el virus Sendai (parainfluenza tipo 1 de los ratones) y el parainfluenza tipo 3 bovino; mientras el género **Rubulavirus** contiene el virus parainfluenza humano tipos 2, 4A y 4B, junto con el virus de la parainfluenza canina tipo 2, el virus de la enfermedad de Newcastle, los virus de las parainfluenzas aviarias tipos 2-9 y el virus de las paperas o parotiditis (2).

Estos son virus pleomórficos, poseen de 100-200nm de diámetro, son envueltos y tienen como genoma una simple cadena de ácido ribonucleico (ARN), lineal, de polaridad negativa, no segmentada (2). Los viriones se encuentran rodeados por una bicapa lipídica de la cual sobresalen proyecciones constituidas por la glicoproteína HN que presentan función hemaglutinina y neuraminidasa, actividades que son inseparables. Ellos también poseen proyecciones compuestas por la glicoproteína F, responsables de la acción hemolítica y de fusión, lo cual posibilita la fusión entre células y la hemólisis con ciertos tipos de eritrocitos (3).

Hasta el momento se han identificado los tipos 1, 2, 3, 4a y 4b de virus parainfluenza humanos. Los VPIh tipos 1, 2 y 3 ocupan el segundo lugar dentro de las causas de infecciones respiratorias severas en lactantes y niños pequeños, solo superados por el virus Respiratorio Sincitial (VSR)(4). Actualmente son reconocidos como agentes causales de enfermedades durante toda la vida, provocando consecuencias más marcadas en adultos inmunocomprometidos y ancianos (5).

Los VPIh provocan infecciones respiratorias frecuentes y de gravedad variable que dependen, del tipo viral y sobre todo de la inmunidad del huésped en. Los cuatro serotipos virales pueden causar infecciones respiratorias y reinfecciones particularmente el serotipo 3. Esto ha sido demostrado en niños y adultos (5) aunque de manera general estos agentes infectan preferiblemente a los más jóvenes.

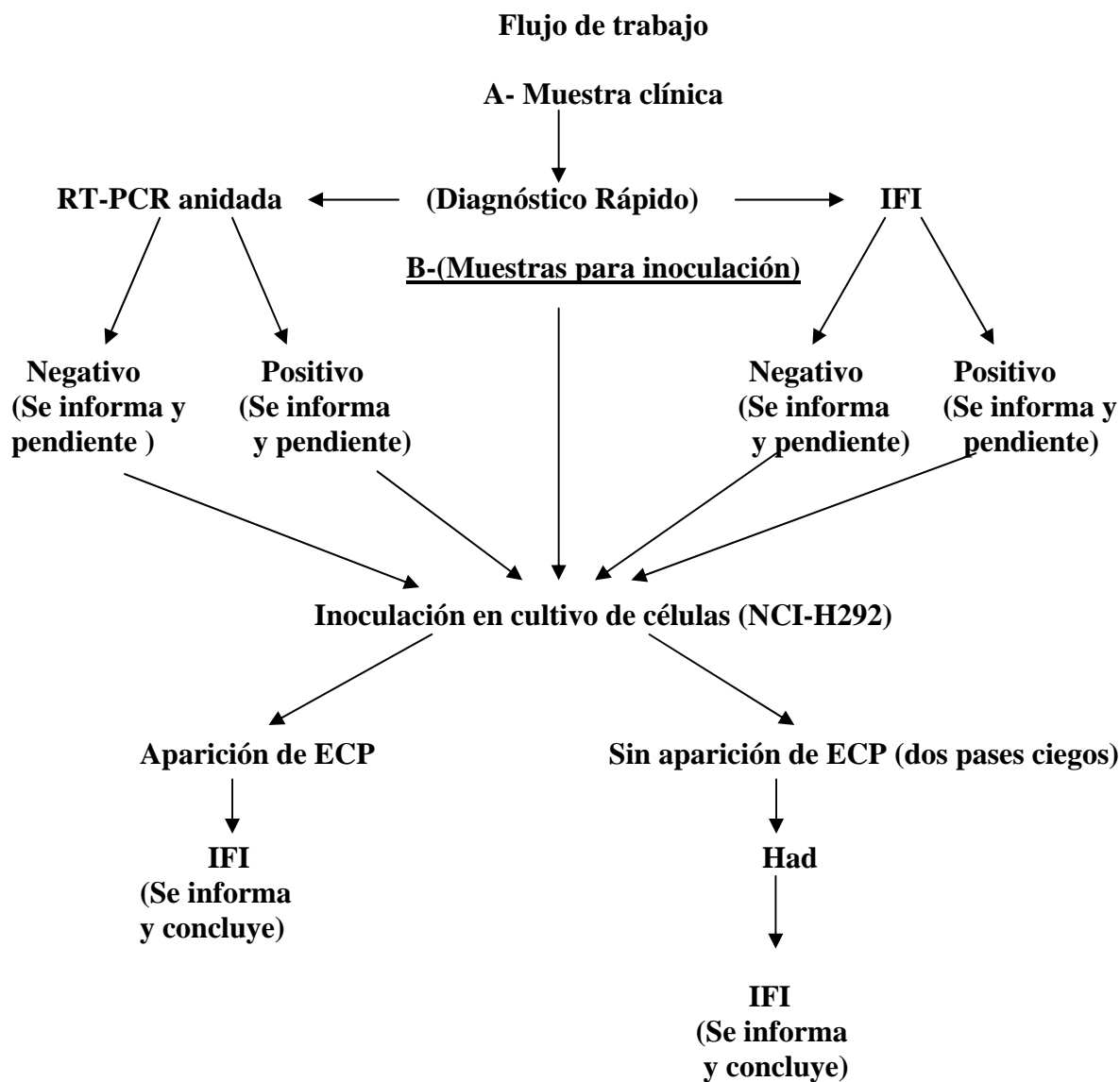
Los niños con infección primaria por VPIh de los tipos 1, 2 y 3 pueden presentar cuadros clínicos graves, que varían desde laringotraqueítis y crup (particularmente los tipos 1 y 2) hasta bronquitis y neumonía (sobre todo con el tipo 3). En lactantes menores de 6 meses se presenta enfermedad grave vinculada principalmente con el tipo 3; el crup es más probable en niños de mayor edad.

Los VPIh tipos 1 y 2 causan epidemias que ocurren en ciclos bianuales en el otoño, en cuanto al tipo 3 las infecciones ocurren anualmente, principalmente en primavera y verano (5). El virus parainfluenza tipo 4 es aislado con muy poca frecuencia por lo que ha sido relativamente poco conocido y caracterizado. Este serotipo se asocia usualmente a grados menos severos de la enfermedad, aunque ha sido reportado en enfermedades del tracto respiratorio bajo (5,6).

Estudios serológicos han encontrado que el 60% de los niños a la edad de dos años ya han sido infectados con VPIh tipo 3 y que aproximadamente el 80% ha sido infectado a los 4 años de edad la mayoría de forma asintomática (7). El alto rango de infección sugiere que el virus se disemina rápidamente. Este es un agente de riesgo tipo 2 el cual se debe trabajar en un gabinete de seguridad clase II (BSLII). El período de excreción viral es generalmente corto, por lo cual estos deben ser aislados de aspirados traqueales o aspirados nasofaríngeos tomados tempranamente en los inicios de la enfermedad.

REFERENCIAS:

- 1- Lamb RA, Collins PL, Kolakofsky D y col. Family Paramyxoviridae. Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL y col. Editors, Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses . Seventh report of the International committee on taxonomy of viruses. San Diego: Academic Press, 2000:549-61.
- 2- Collins, P.B, Chanock, R.M, McIntosh, K. Parainfluenza Viruses. En: Fields, B. N., Kriple, D.M., Howley, P.M, y col., eds. Chapter 41. Fields Virology. Third Edition. 1996; 1205-1241.
- 3- Weissenbacher, M.C., Avila, M.M. Viruses as the cause of upper and lower ARI in children: general characteristics and diagnosis. En: Benguigui, Y., Antuñano, F.J., Schmunis, G., y col, eds. Chapter 5. Respiratory infections in children, 1999; 94-95.
- 4- Glezen WP, Denny FW. Epidemiology of acute lower respiratory disease in children. N Engl J Med. 1973; 288: 498-505.
- 5- Hall CB. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. N Engl J Med. 2001;344(25)
- 6- Lindquist SW, Darnule A, Ista A, Demmler GJ. Parainfluenza virus type 4 infections in pediatric patients. Pediatr Infect Dis J. 1997; 16:34-8.
- 7-Parrot RH, Vargosko AJ, Kim HW, Bell JA, Chanock RM. Myxoviruses: Parainfluenza. Am J Public Health. 1962; 52:907-917.



I.-AISLAMIENTO EN CULTIVO DE CÉLULAS DEL VIRUS PARAINFLUENZA HUMANO:

En el aislamiento de estos agentes se han observado mejores resultados cuando se emplea como muestra clínica el aspirado nasofaríngeo y con mayor dificultad el hisopado. Las muestras clínicas han sido inoculadas en diferentes líneas celulares, siendo las mas utilizadas la LLC-MK2 (línea continua de células de riñón de mono), VERO (línea de riñón de mono verde africano) y especialmente la NCI-H292 (línea derivada de carcinoma mucoepidermoide pulmonar humano). El medio de mantenimiento celular requiere de la adición de tripsina (2-3 µg/mL) en el caso de los VPIh 1 y 2, pero no para los VPIh3 (1, 2).

El aislamiento en cultivo de células como método para el diagnóstico de los VPIh presenta el inconveniente de que estos virus crecen lentamente y producen muy poco efecto citopático (ECP), pudiendo requerirse de 10 días o más después de la inoculación antes de que los cultivos sean positivos, dependiendo de la cantidad de virus presente en la muestra clínica. Cuando no se observa ECP es aconsejable raspar el cultivo y dar pases ciegos antes de informar el caso como negativo. Se recomienda además, que al séptimo día después de la inoculación se proceda a la detección del virus a través de la técnica de hemadsorción (HAd), o mejor por ser un método más rápido y específico es la Inmunofluorescencia (IFI) (ver acápite inmunofluorescencia) (3, 4). Esta técnica permite detectar y tipificar los aislamientos en una sola prueba, además de posibilitar una detección más temprana de los Parainfluenza que la HAd y de detectar muchos cultivos positivos que son HAd negativos (5).

Equipos

Centrífuga

Gabinete de seguridad clase II

Incubadora 37°C

Microscopio óptico invertido.

Congelador de -70°C

Materiales y Reactivos

Tubos de cultivo 12x75cm sembrados con células NCI-H292, LLC-MK2 y VERO a una concentración de 150 000 cel/mL

Gradilla de tubos de cultivo

Pipetas estériles (2-5mL)

Micropipetas

Puntas para micropipetas

Rotuladores

Batas

Guantes desechables

Tripsina

Antibiótico (sulfato de neomicina 0.1%)

Medio Esencial Mínimo (MEM)

Suero bovino fetal (SBF)

Fungisona 2.5Gg/mL

Sustratos celulares:

Células NCI-H292 (medio de cultivo R.P.M.I)

Células VERO (medio de cultivo Parker)

Células LLC-MK2 (medio esencial mínimo con glutamina y aminoácidos no esenciales)

I.1.-Procedimiento.

- Se inoculan 1 o más (hasta 5) tubos con células por cada muestra clínica y se dejan 3 tubos con células sin inocular por cada gradilla. Estos últimos constituyen los controles celulares los cuales permiten comparar y apreciar los cambios morfológicos que se producen en los tubos inoculados. Si se considera necesario pueden inocularse controles positivos.
- Decantar el medio de todos los tubos menos de los que se emplearán como controles positivos, en el caso que los hubiera.
- Inocular 200GL de la muestra clínica en los tubos de cultivo.
- Centrifugar los tubos con las células inoculadas 30 minutos a temperatura ambiente a 1200 revoluciones por minuto (r.p.m.).
- Añadir 1mL de medio de mantenimiento (R.P.M.I si la línea celular utilizada es NCI-H292, 199 si la línea es VERO y MEM con glutamina y aminoácidos no esenciales si las células son LLC-MK2). Al medio se le debe adicionar antibiótico 0.1% (Sulfato de neomicina) y tripsina (2-3µg/mL).
- Realizar cambio de medio pasadas las primeras 24 horas postinoculación con el objetivo, de proporcionar nutrientes frescos a las células y así favorecer el aislamiento viral. El medio empleado dependerá de la línea celular utilizada en el aislamiento.
- Incubar a 37°C.
- Chequear diariamente durante 11 días para detectar si hay aparición o no de ECP, así como cambiar cada tres días el medio o ajustar el pH en caso necesario (7.2-7.4).
- Si se observa algún cambio en la morfología (formación de sincitios, destrucción de la monocapa celular) se debe tomar un tubo y proceder a la identificación por IFI (ver Capítulo VI , acápite 1-4 IFI para virus respiratorios), el resto de los tubo se debe congelar a -70°C para pases sucesivos.

- Al séptimo día después de la inoculación se debe realizar la detección de VPIh a través de la técnica de HAd, en aquellos tubos de cultivo en los que no se haya observado ECP para monitorear si el virus infectó las células.
- Los cultivos en los que se observó hemadsorción, deben ser procesados por IFI para lograr la identificación de antígenos virales.
- Si al 11^{no} día no ha aparecido ECP se recomienda desprender el cultivo (con una pipeta de cristal estéril hasta desprender la monocapa de células inoculadas que se encuentran adheridas a las paredes del tubo de cultivo) e inocularlos en nuevos cultivos repitiendo los pasos anteriores antes de dar el caso como negativo.

REFERENCIAS:

- 1- Castells E, George VG, Hierholzer JC. NCI-H292 as an alternative cell line for the isolation and propagation of the human Paramyxoviruses. Arch Virol 1990; 115:277-288.
- 2- Schepetiuk SK, Kok T. The use of MDCK, MEK and LLC-MK2 cell lines with enzyme immunoassay for the isolation of influenza and parainfluenza viruses from clinical specimens. J Virol Methods. 1993;42:241-150.
- 3- Gardner PS, Mcquilin J, McGuckin R, Ditchburn RK. Observations on clinical and immunofluorescent diagnosis of parainfluenza virus infections. Br Med J. 1971; 2: 7-12.
- 4- Waner JL, Whitehurst NJ, Downs T, Graves DG. Production of monoclonal antibodies against parainfluenza 3 virus and their use in diagnosis by immunofluorescence. J Clin Microbiol. 1985; 22:535-538.
- 5- Kelly, J., Henrickson, M.D. Human parainfluenza viruses. En: Lennette EH, Lennette DA, Lennette ET, eds. Chapter 30. DIAGNOSTIC PROCEDURES FOR VIRAL, RICKETTSIAL AND CHLAMYDIAL INFECTIONS. 7ed. Washington: American Public Health Association, 1995; 481-490.

II.-HEMADSORCIÓN (HAD)

Los virus parainfluenza humanos tienen la capacidad de adherir los eritrocitos de cobayo a las células infectadas, esta actividad es ejercida por la glicoproteína de superficie HN. La hemadsorción se produce cuando esta glicoproteína se une a los receptores específicos presentes sobre la membrana de los eritrocitos (1, 2).

Equipos:

Centrífuga

Incubadora de 37°C

Refrigerador a 4°C

Congelador de -70°C

Microscopio óptico invertido.

Materiales y Animales:

Micropipetas

Puntas de micropipeta

Tubos de centrifuga de 15 y 50 mL

Batas

Jeringuilla de 10mL

Agujas de 20x1 pulgada

Algodón

Alcohol al 70%

Guantes desechables

Animales:

Se emplean curieles machos saludables de más de 450g de peso.

II.1.- :Obtención de sangre de curiel y conservación:

- Esterilizar con alcohol el área cardiaca.
- Pulsar el latido del corazón.
- Puncionar y se extraer la cantidad de sangre deseada (3-5mL) con una jeringuilla de 5 o 10mL y aguja de 20x1 pulgadas.
- Depositar rápidamente la sangre en un tubo de centrifuga de 15mL que contiene igual volumen de Alsever.
- Centrifugar a 1500rpm de 5 a 10 min.
- Eliminar sobrenadante.
- Añadir Alsever en igual volumen.
- Conservar la sangre a 4°C.

II.2.-Soluciones

- PBS 25X

NaCl	200g
Na ₂ HPO ₄	28.75g
KCl	5g
KH ₂ PO ₄	5g
Agua destilada estéril	1000mL

- PBS 1X

Se toman 40mL de PBS 25X y se llevan a un volumen de 1000mL.

- Alsever:

Dextrosa- 20.5g

NaCl- 4.2g

Ácido Cítrico- 0.55g

Citrato de Sodio- 8g

Completar con agua destilada hasta 1000mL y esterilizar en autoclave durante 10 minutos.

II.3.-PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE ERITROCITOS DE CURIEL.

- Lavar la sangre de curiel tres veces con PBS1X, 1500 r.p.m. durante 10 minutos a temperatura ambiente.
- Preparar una suspensión de eritrocitos 0.2-0.4% en PBS1X.
- Tomar para el ensayo un tubo por cada muestra clínica inoculada, así como, un tubo de cultivo no inoculado como control negativo.
- Decantar el medio de los tubos con célula.
- Añadir 1mL de la dilución de eritrocitos preparada.
- Incubar 30 minutos a 4°C moviendo suavemente.
- Lavar la monocapa celular tres veces con PBS1X.
- Observar a través del microscópio.
- Lectura e interpretación de los resultados.

- Si se observan grandes o pequeñas áreas de eritrocitos adheridos a la monocapa celular la HA_d es positiva a los virus Parainfluenza tipos 1, 2 y 3.
- Si no se observa adhesión de los eritrocitos a la monocapa celular la HA_d es negativa, por tanto, se debe añadir 1mL de la suspensión de eritrocitos preparada a los tubos con células e incubar 30 minutos los tubos a 37°C para detectar la presencia de VPIh tipo 4.

REFERENCIAS

- 1- Collins, P.B, Chanock, R.M, McIntosh, K. Parainfluenza Viruses. En: Fields, B. N., Kriple, D.M., Howley, P.M, y col., eds. Chapter 41. Fields Virology. Third Edition. 1996; 1205-1241.
- 2- Choppin PW, Scheid A. The role of viral glicoprotein in adsorption, penetration, and pathogenicity of viruses. Rev Infect Dis.1980; 40-61.

III.-HEMAGLUTINACIÓN (HA).

Los virus parainfluenza humanos son capaces de aglutinar eritrocitos de cobayo, esto ocurre cuando la HN interactúa con los receptores específicos (constituidos por ácido siálico) que se ubican sobre la membrana de los eritrocitos (1, 2).

Equipos:

Incubadora de 37°C
 Refrigerador a 4°C
 Congelador de -70°C
 Centrifuga

Materiales y reactivos:

Micropipetas
 Puntas de micropipeta
 Batas
 Jeringuillas de 10mL
 Agujas de 20x1 pulgada
 Guantes desechables
 Placas de micrométodo de fondo en U
 Animales (ya descrito)
 Obtención de sangre de curiel y conservación (ya descrito)

III.1.-Soluciones

- PBS 25X
- PBS 1X (ya descrito)
- Alsever (ya descrito)

III.2.-PROCEDIMIENTO.

- Se utilizan placas de micrométodo de 96 pozos de fondo en “U”, el ensayo se realiza por duplicado, por tanto, para cada muestra clínica inoculada en los tubos de cultivo se utilizan dos hileras.
- Distribuir 25µL de PBS1X desde el 2^{do} al 10^{mo} pocillo en cuatro hileras de las mismas (por cada caso clínico y su control celular).
- Distribuir 25µL de la muestra y de la línea celular donde se inoculo la muestra , en el 1^{ro} y 2^{do} pocillos.
- Realizar diluciones de la muestra y del control a partir del 2^{do} pocillo y hasta el 10^{mo}.
- Añadir 25µL de PBS en todos los pocillos.
- Añadir en todas los pocillos 50µL de la suspensión de eritrocitos de cobayo al 0.5%.
- Simultáneamente en el ensayo se debe emplear un control de eritrocitos en 4 pocillos donde se adicionan 50µL de PBS y 50µL de la suspensión de eritrocitos utilizada.
- Agitar suavemente.
- Incubar la placa a 37°C durante 1 hora.
- Realizar la lectura.

Se consideran positivas aquellas muestras clínicas donde se observa hemaglutinación (formación de una malla en el fondo de la excavación). Los controles de eritrocitos y de la línea celular no deben mostrar aglutinación sino un botón claramente definido.

REFERENCIAS

- 1- Collins, P.B, Chanock, R.M, McIntosh, K. Parainfluenza Viruses. En: Fields, B. N., Kripe, D.M., Howley, P.M, y col., eds. Chapter 41. Fields Virology. Third Edition. 1996; 1205-1241.
- 2- Choppin PW, Scheid A. The role of viral glicoprotein in adsorption, penetration, and pathogenicity of viruses. Rev Infect Dis.1980; 40-61.

IV.-INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN (IH).

Esta prueba mide los anticuerpos que reaccionan con la hemaglutinina para prevenir la aglutinación de los eritrocitos. La IH es un ensayo moderadamente sensible que se utiliza ampliamente en el diagnóstico de las infecciones virales. Sin embargo, muchos sueros contienen hemaglutininas no específicas así como inhibidores de la aglutinación por lo cual deben ser pretratados para disminuir la actividad no específica (1).

Esta prueba tiene dos elementos fundamentales: antígeno y sueros.

Equipos:

Incubadora de 37°C

Refrigerador a 4°C

Congelados de -70°C

Centrifuga

Materiales y reactivos

Micropipetas

Puntas de micropipetas

Batas

Guantes desechables

Frascos de 25cm²

Frascos tipo Roux

Tubos de cultivo 12x75cm sembrados con células VERO a una concentración de 150 000 cel/mL

Placas de micrométodo de fondo en U con 96 pocillos.

Jeringuillas de 10mL

Agujas de 20x1 pulgada

Tubos de centrifuga de 15 mL

Tubos de cultivo celular

Animales: (ya descrito)

Obtención de sangre de curiel y conservación (ya descrito)

IV.1.-Soluciones

- PBS 25X (ya descrito)

- PBS 1X (ya descrito)

- Alsever (ya descrito)

Antibiótico

Kaolín

Medio Esencial Mínimo (MEM) y Medio de Cultivo Parker

Suero bovino fetal (SBF)

Sustratos celulares:

Células VERO

IV.2.-PREPARACIÓN DEI LOTE DE VIRUS.

- Decantar el medio de cultivo de los frascos de 25cm².
- Inocular 500µL de cada cepa por duplicado en los frascos de 25cm² con la línea celular VERO. Simultáneamente por cada cepa se debe inocular 3 tubos de cultivo con la línea celular VERO (siguiendo la metodología del aislamiento en cultivo de células), esto se realiza con el objetivo de monitorear la replicación viral a través de la hemadsorción.
- Dejar en contacto durante 1 hora a 37°C.
- Añadir 5mL de medio de mantenimiento con antibiótico y suero bovino fetal al 2.5%.
- Incubar a 37°C y observar de 7 a 10 días.
- Realizar la prueba de HAd en los tubos de cultivo al 5^{to}, 7^{mo} y 9^{no} días.
- Más de un 80% de HAd en los tubos es indicativo de que se deben recoger los frascos que correspondan a la cepa y congelarlos a -70°C.

IV.2.1.-PRODUCCIÓN DE ANTÍGENO.

- Descongelar los frascos con el virus crecido como se ha indicado anteriormente.
- Unir el contenido de los frascos de 25cm² que correspondan a una misma cepa.
- Emplear tres frascos Roux por cada una de las cepas y dos Roux como controles negativos.
- Eliminar el medio de cultivo de todos los frascos Roux con excepción de los que no serán inoculados y se emplearan como controles.
- Lavar las células con medio de cultivo Parker sin suero de ternera.
- Inocular 5mL de cada serotipo viral en los Roux. Simultáneamente se deben inocular tres tubos de cultivo por cada cepa para monitorear por Had y dejar tres tubos sin inocular, los que serán empleados como controles negativos

- Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora y mover cada 15 o 20 minutos para que el inóculo se ponga en contacto con la superficie celular.
- Añadir 97mL de medio Parker 199 suplementado con antibiótico pero sin suero bovino fetal en los frascos Roux inoculados y controles. A los tubos de cultivo que se emplean para el monitoreo se le adiciona 1 mL.
- Incubar a 37°C de 7 a 10 días, observar diariamente en el microscopio y cambiar el medio cuando el indicador de pH cambie de color, indicando que no es neutro (7.2-7.4).
- Monitorear al 5^{to}, 7^{mo} y 9^{no} días a través de la HAd o de la IF y si fuera positivo se titulará por hemaglutinación. Para ello se toma cada día un tubo de cultivo celular inoculado correspondiente a cada serotipo y un tubo control.
- Cuando se tenga una HAd >80% y un título hemaglutinante mayor ó igual 1:32 se deben congelar a -70°C los frascos Roux correspondientes a esa cepa.
- Si el monitoreo da positivo a alguno de los serotipos, se debe coleccionar el medio cada vez que se realice el cambio del mismo en los Roux. El medio se debe almacenar como 1ra, 2da y 3ra cosecha respectivamente y reunirse posteriormente según el serotipo, constituyéndose así nuestro lote de antígeno.

IV.2.2.-TITULACIÓN DE LOS ANTÍGENOS.

- Utilizando placas de micrométodo de 96 pocillos de fondo en U distribuir 25µL de PBS desde el 2^{do} al 10^{mo} pocillos en las cuatro hileras de las mismas.
- Distribuir 25µL de cada antígeno y de la línea celular donde se replicó el virus, en el 1^{ro} y 2^{do} pocillos.
- Realizar diluciones de los virus y el control a partir del 2^{do} pocillo y hasta el 10^{mo}.
- Añadir 25 µL de PBS en todos los pocillos.
- Añadir 50 µL de la suspensión de eritrocitos de cobayo al 0.5% en PBS en todos los pocillos.
- Conjuntamente con la prueba se debe realizar un control de eritrocitos en 4 pocillos donde se adicionan 50µL de PBS y 50µL de la suspensión de eritrocitos utilizada.
- Incubar la placa a 37°C durante 1 hora.
- Realizar la lectura.
- Como título de antígeno se toma la última dilución del antígeno donde se observa hemaglutinación (formación de una malla en el fondo de la excavación). Los controles de

eritrocitos y del cultivo celular no deben mostrar aglutinación sino un botón que resbala en forma de lágrima.

IV.2.3.-DOSIS DE TRABAJO DEL ANTÍGENO.

Los antígenos de VPIh se trabajan con 4 unidades hemaglutinantes. Después de conocer el título hemaglutinante de cada antígeno (la última dilución donde hay hemaglutinación y que representa una unidad hemaglutinante) se busca la dilución de los mismos donde hay cuatro unidades hemaglutinantes. Estas cuatro unidades se hallan dividiendo el título hemaglutinante entre cuatro. De acuerdo a los valores hallados se debe preparar la dilución de cada antígeno en solución salina y se debe proceder a su control justo antes de realizar la técnica:

- Utilizando placas de micrométodo de 96 pocillos de fondo en “U”, distribuir 25µl de solución salina desde el 2^{do} al 5^{to} pocillos en 4 hileras.
- Distribuir 25µL del antígeno diluido en el 1^{ro} y 2^{do} pocillos de la hilera correspondiente a cada antígeno.
- Realizar diluciones del 2^{do} al 5^{to} pocillo.
- Añadir 25µL de solución salina en todos los pocillos.
- Adicionar 50µL de suspensión de eritrocitos de cobayo al 0.5% en solución salina en todos los pocillos.
- Conjuntamente realizar control de eritrocitos (como se describe anteriormente en la titulación de antígenos).
- Agitar la placa suavemente en todas las direcciones para asegurar la mezcla perfecta de los eritrocitos. Dejar reposar durante 1 hora a 37°C para permitir la sedimentación de los glóbulos.
- Realizar la lectura de acuerdo a los siguientes criterios:
- Dosis correcta de antígeno: Se considera correcta cuando hay hemaglutinación hasta el tercer pocillo, es decir, la dilución preparada del antígeno contenía cuatro unidades hemaglutinantes en 25µL.
- Dosis débil: Cuando la hemaglutinación no llega al 3^{er} pocillo, contiene menos de cuatro unidades hemaglutinantes en 25µL, por tanto, es necesario añadir antígeno a la dilución.

- Dosis fuerte: Cuando la hemaglutinación pasa el 3^{er} pocillo, contiene más de cuatro unidades hemaglutinantes en 25µL, por tanto, es necesario añadir solución salina.

*En los casos en que la dosis no es la correcta se hace necesario repetir el control de las cuatro unidades siguiendo el mismo procedimiento hasta obtener la dosis exacta.

IV.3.-TRATAMIENTO DE LOS SUEROS.

Con el objetivo de eliminar los posibles inhibidores inespecíficos previo a la prueba de IH, los sueros deben ser tratados con eritrocitos de cobayo y caolín del siguiente modo:

- Mezclar 100µL de suero sin diluir con 400µL de la suspensión de eritrocitos de cobayo al 10% en solución salina.
- Mezclar suavemente y dejar a 4°C durante 30 minutos.
- Centrifugar a 1500 r.p.m. durante 5 minutos a temperatura ambiente y tomar el sobrenadante.
- Añadir 500µL de una suspensión de caolín al 25% en solución salina.
- Colocar la mezcla en un agitador mecánico durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 3000 r.p.m. durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- Tomar el sobrenadante, el cual constituye el suero diluido 1:10.
- Inactivar a 56°C por 30 minutos.

IV.4.-TÉCNICA DE IH POR MICROMÉTODO.

- Se emplean placas de micrométodo de 96 pocillos de fondo en “U”, utilizando tres hileras de cuatro pocillos para cada suero a investigar.
- Distribuir 25µL de solución salina a partir del 2^{do} pocillo y hasta el 4^{to}.
- Distribuir 25µL de cada uno de los sueros en el 1^{ro} y 2^{do} pocillos de las tres hileras.
- Realizar diluciones de cada suero desde el 2^{do} al 4^{to} pocillo (1:80).
- Agregar 25µL de la dilución del antígeno con cuatro unidades hemaglutinantes desde el 1^{ro} al 4^{to} pocillo de las hileras correspondientes. ***
- Dejar las placas en reposo durante una hora a temperatura ambiente.
- Agregar 50µL de la suspensión de eritrocitos de cobayo 0.5% en solución salina a todas las hileras.

- Dejar reposar a 37°C durante una hora.
- Realizar la lectura solo si el resultado de los controles es el adecuado.
- Se considera que son seropositivos aquellos sueros que presentan títulos mayores o iguales que 1:10. Se toma como título de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación, la mayor dilución del suero en la que se forma un botón de eritrocitos que al inclinar ligeramente la placa resbala en forma de una lágrima en el fondo de la excavación.

***Controles empleados en el ensayo:

- Control de eritrocitos: En cuatro excavaciones de una hilera adicione 50µL de solución salina y 50µL de la suspensión de eritrocitos de cobayo. El botón de sedimentación servirá de referencia para los producidos en las diluciones de los sueros, indicando la presencia de anticuerpos inhibidores.
- Control de sueros a investigar: En la 5^{ta} excavación de la primera hilera correspondiente a cada suero adicionar 25µL de solución salina, 25µL de suero a investigar y 50µL de la suspensión de eritrocitos de cobayo.
- Control de sueros a investigar frente al antígeno normal: En la 6^{ta} excavación de la 1^{ra} hilera correspondiente a cada suero, agregar 25µL de suero a investigar, 25µL de antígeno normal y 50µL de la suspensión de eritrocitos.
- Control de sueros positivos y negativos. Deben utilizarse sueros controles de los que se conozca el título de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación frente a cada antígeno.

REFERENCIAS

1- Kenneth, L., Herrmann, M.D., Erdman, D.D. Diagnosis by serologic assays. En: Lennette EH, Lennette DA, Lennette ET, eds. Chapter 6. DIAGNOSTIC PROCEDURES F/VIRAL, RICKETTSIAL AND CHLAMYDIAL INFECTIONS. 7ed. Washington: American Public Health Association, 1995;121-125.

V.-DETECCIÓN DEL VIRUS PARAINFLUENZA HUMANO MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).

Las técnicas moleculares basadas en la amplificación del ácido nucleico tales como la PCR y la transcripción reversa RT-PCR han demostrado ser altamente sensibles, rápidas y específicas en la detección del genoma viral directamente en la muestra, dependiendo de la apropiada elección de los cebadores (1). En los últimos años se ha comenzado a aplicar la PCR en la detección de los virus VPIh con muy buenos resultados reportándose un rango de sensibilidad de 94 a 100% (2). La RT-PCR se desarrolló primeramente hacia la detección de VPIh-1 y VPIh3 o sea a través de ensayos monoespecíficos (2, 3, 4). Sin embargo la utilización de esta técnica para el diagnóstico de un solo agente infeccioso posee la limitante de ser incapaz de establecer una etiología específica cuando el resultado es negativo, son incapaces de detectar infecciones que involucran más de un agente infeccioso, requieren la amplificación separada de cada virus de interés lo que es potencialmente caro especialmente entre los patógenos respiratorios que causan similar síndrome clínico.

Con el fin de solucionar esta limitante a finales de la década de los 90 se comienza a desarrollar una RT-PCR múltiple. Esta técnica se basa en la utilización de una combinación de pares de cebadores diferentes en la misma reacción con el objetivo de producir amplicones diferentes en la misma reacción. Esta técnica consume menos reactivo, muestras y tiempo que los ensayos monoespecíficos y permite la amplificación simultánea de varios virus en una sola reacción. Así, se ha comenzado a utilizar una RT-PCR anidada que permite la amplificación simultánea de los VPIh1-4. En este ensayo los cebadores externos e internos fueron seleccionados a partir de regiones conservadas dentro del gen que codifica para la proteína hemaglutinina-neuraminidasa (HN) (Tabla 1). Esta RT-PCR anidada lleva a cabo un protocolo que utiliza un primer paso de reverso transcripción (RT) y primera amplificación empleando cuatro pares de cebadores los que amplifican un fragmento dentro del gen HN de los cuatro serotipos. El segundo paso de amplificación utiliza cebadores más internos dentro del gen que codifica para la proteína HN y cuyo producto son fragmentos que difieren en su peso molecular y permiten la discriminación de los cuatro serotipos (5).

Equipos:

Centrífuga

Gabinete de seguridad clase II

Termociclador

Transiluminador

Materiales y Reactivos:

Tubos de 500 μ L

Pipeta estériles de cristal (2-5mL)

Micropipetas

Puntas de micropipeta

Rotuladores

Bata

Guantes desechables

Trizol

Cloroformo

Isopropanol

Etanol

Kit Access System (Promega)

Taq Polymerasa (Perkin-Elmer)

Agarosa LE

Tris Base

Acido Bórico

EDTA


Glicerol

Azul de bromofenol

Bromuro de etidio

PCR marker VIII.

Tabla1. Secuencia de los oligonucleótidos empleados.

Cebadores	Posición (nucleótidos)	Secuencia (5'  3')
Primera reacción de amplificación		
PIP1 +	748-768	CCTTAAATTCAGATATGTAT
PIP1 -	1206-1225	GATAAATAATTATTGATACG
PIP2 +	803-822	AACAATCTGCTGCAGCATT
PIP2 -	1291-1310	ATGTCAGACAATGGGCAAAT
PIP3 +	762-781	CTGTAAACTCAGACTTGGTA
PIP3 -	1220-1239	TTAAGCCCTTGTCACAAC
PIP4 +	11-39	CTGAACGGTTGCATTCAGGT
PIP4 -	433-452	AGGACTCATTCTTGATGCAA
Segunda reacción de amplificación		
PIS1 +	780-801	CCGGTAATTTCTCATACCTATC
PIS1 -	1076-1096	CTTTGGAGCGGAGTTGTTAAG
PIS2 +	845-866	CCATTTACCTAAGTGATGGAAT
PIS2 -	1027-1048	GCCCTGTTGTATTTGGAAGAGA
PIS3 +	884-905	ACTCCCAAAGTTGATGAAAGAT
PIS3 -	966-986	TAAATCTTGTTGTTGAGATTG
PIS4 +	158-179	AAAGAATTAGGTGCAACCAGTC
PIS4 -	382-482	GCTGCTTATGGGATCAGACAC
PIS4 A +	226-245	ATGATGGTGGAAACCAAGATT
PIS4 B +	320-339	AACCAGGGAAACAGAGCTC

Procedimiento.

V.1.-EXTRACCIÓN DE ARN.

Se realiza la extracción de ARN viral para cada una de las cepas (VPIh1-4) a partir de cultivo celular en el caso de los controles positivos, directamente de las muestras clínicas y a un tubo de 500µL de agua libre de ARNsa como control negativo.

- Tomar 500µL de cada muestra clínica (exudado nasofaríngeo) a analizar, así como de los controles.
- Centrifugar a 12000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C.
- Eliminar el sobrenadante.
- Resuspender el precipitado en 500µL de trizol y dar vortex hasta resuspender el precipitado.
- Dejar reposar 5 minutos a temperatura ambiente.
- Añadir 100µL de cloroformo, mezclar dando vortex 30 segundos y dejar reposar 3 minutos a temperatura ambiente.

- Centrifugar en igualdad de condiciones.
- Transferir la fase superior a otro tubo eppendorf, evitar tomar de la interfase.
- Añadir 400µL de Isopropanol, mezclar por agitación manual e incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
- Centrifugar 15 minutos bajo las mismas condiciones.
- Adicionar 500µL de Etanol al 75%.
- Centrifugar 15 minutos en igualdad de condiciones.
- Retirar el sobrenadante y secar el ARN (para ello se deja cada eppendorf abierto en el gabinete de seguridad), es importante que el pellet no se seque demasiado ya que se vuelve insoluble.
- Resuspender en 30µL de agua bidestilada estéril.
- Guardar el ARN a -70°C

V.2.-TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

- Preparar tubos eppendorf de 500µL con la mezcla de reacción que se muestra a continuación:

Reactivos de la mezcla	Cantidad por tubo			
Buffer AMV 5X	10 µL			
MgSO ₄ 25mM	6 µL			
dNTP (A, T, G, C) 10mM	1 µL			
PIP 1+ (5 µM)	1 µL			
PIP 1- (5 µM)	1 µL			
PIP 2+ (5 µM)	1 µL			
PIP 2- (5 µM)	1 µL			
PIP 3+ (5 µM)	1 µL			
PIP 3- (5 µM)	1 µL			
PIP 4+ (5 µM)	1 µL	Ciclos	Temperatura	Tiempo(min.)
		RT	48°C	45min
PIP 4- (5 µM)	1 µL		92°C	2min
AMV RT 5U	1 µL	PCR x 30 ciclos	94°C	1min
Taq Poli 5U	1 µL		50°C	1min
H ₂ O	13 µL		72°C	1min
	40 µL	Final	72°C	7min

- Añadir 10µL del ARN extraído al tubo con la mezcla de reacción para completar un volumen final de 50µL.
- Dar un golpe de centrifuga para que se mezcle bien el ARN con la mezcla de reacción.
- Colocar los tubos en el termociclador bajo las siguientes condiciones:

V.3.- PCR ANIDADA.

- Preparar tubos eppendorf de 500µL con la mezcla de reacción que se muestra a Cuando se tenga una HAd >80% y un título hemaglutinante mayor ó igual 1:32 se deben congelar a – 70°C los frascos Roux correspondientes a esa cepa.

- continuación:

Reactivos de la mezcla	Cantidad por tubo			
Buffer PE 10X	5 µL			
Mg Cl ₂ 1.5mM	6 µL			
dNTP (A, T, G, C) 200 GM	1 µL			
PIS 1+ (5 µM)	1 µL			
PIS 1- (5 µM)	1 µL			
PIS 2+ (5 µM)	1 µL			
PIS 2- (5 µM)	1 µL			
PIS 3+ (5 µM)	1 µL			
PIS 3- (5 µM)	1 µL			
PIS 4+ (5 µM) *	1 µL	Ciclos	Temperatura	Tiempo(min.)
		PCR x 30 ciclos	94°C	2min
PIS 4- (5 µM)	1 µL		94°C	1min
Taq Poli 5U	0.25 µL		58°C	1min
H ₂ O	28.75 µL		72°C	1min
	49 µL	Final	72°C	7min

* si lo que se desea es subtipar el VPIh4, en la mezcla empleada en la segunda reacción de amplificación se debe sustituir el cebador PIS 4+ por los cebadores PIS4 A+, PIS4 B+ y PIS4 -. Para ello se debe utilizar 1µL de cada cebador y ajustar la cantidad de agua, desarrollando la PCR anidada bajo las mismas condiciones empleadas para la PCR anidada anterior.

- Añadir 1µL del producto de la primera reacción (ADN) de amplificación al tubo con la mezcla de reacción para completar un volumen final de 50µL.
- Dar un golpe de centrifuga para que se mezcle bien el ADN con la mezcla de reacción.
- Colocar los tubos en el termociclador bajo las siguientes condiciones:

V.4.-DETECCIÓN DEL PRODUCTO AMPLIFICADO.

- Tomar 8µL de cada uno de los productos de la segunda reacción de amplificación, así como, del marcador de peso molecular (PCR Maker VIII Bioscience) y mezclar con 2µL de tampón de muestra para electroforesis 6X.
- Aplicar en un gel de agarosa al 2% en TBE 1X.
- Realizar la corrida a 90V durante 1hora.
- Exponer el gel a la luz ultravioleta en un transiluminador.

- Realizar la lectura.
- Se consideran positivas aquellas muestras que den la talla esperada para las bandas de VPIh1-4 (317pb para VPIh1, 203pb para VPIh2, 102pb para VPIh3, 246pb para VPIh4, 178pb para VPIh4A y 84pb para VPIh4B).

V.5.-SOLUCIONES.

Tampón de electroforesis. TBE 5X pH 8.0

TRIS	54g
ACIDO BORICO	27.5g
EDTA	20mL *
H2O C.S.P.	1000 mL

*20ml de EDTA 0.5M

Nota :para preparar TBE 1X tomar 200 mL de TBE 5X y completar con 800mL de agua.

Tampón muestra 6X

EDTA	500mM
Glicerol	10%
Azul de Bromofenol	0.01%

Gel de Agarosa al 2%

Agarosa	2gr
TBE IX	100 mL
Bromuro de Etidio*	0.1µg/mL

REFERENCIAS

- 1- Saiki, R. K. Amplification of genomic ADN. En M.A. Innis, D.H. Gelfand, J. J. Sninsky, T.J. White (ed.), PCR protocol: a guide to methods and applications. Academic Press, Inc., NewYork, N. Y. 1990. p. 13-20.
- 2- Gilbert LI, Dakhama A, Bone BM, Thomas EE, Hegele RG. Diagnosis of viral respiratory tract infections in children by using a reverse transcription –PCR- panel. J Clin Microbiol. 1996; 34:140-143.
- 3- Fan JK, Henkinson KJ. Rapid diagnosis of human parainfluenza type 1 infection by quantitative reverse transcription- PCR-enzyme hybridization assay. J Clin Microbiol. 1996; 26:1397-1402.
- 4- Karron RA, Frohlich JL, Bobo L, Belshe RB, Yolken R. Rapid detection of parainfluenza virus type 3 ARN in respiratory specimens: use of reverse transcription –PCR-enzyme immunoassay. J Clin Microbiol. 1994; 32:484-488.

5- Aguilar JC, Pérez BP, García ML, Cruz N, Erdman DD, Echevarría JE. Detection and identification of human Parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4 in clinical samples of pediatric patients by multiplex reverse transcription-PCR. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:1191-1195.

X.-ADENOVIRUS

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

INTRODUCCION.

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

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

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

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

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

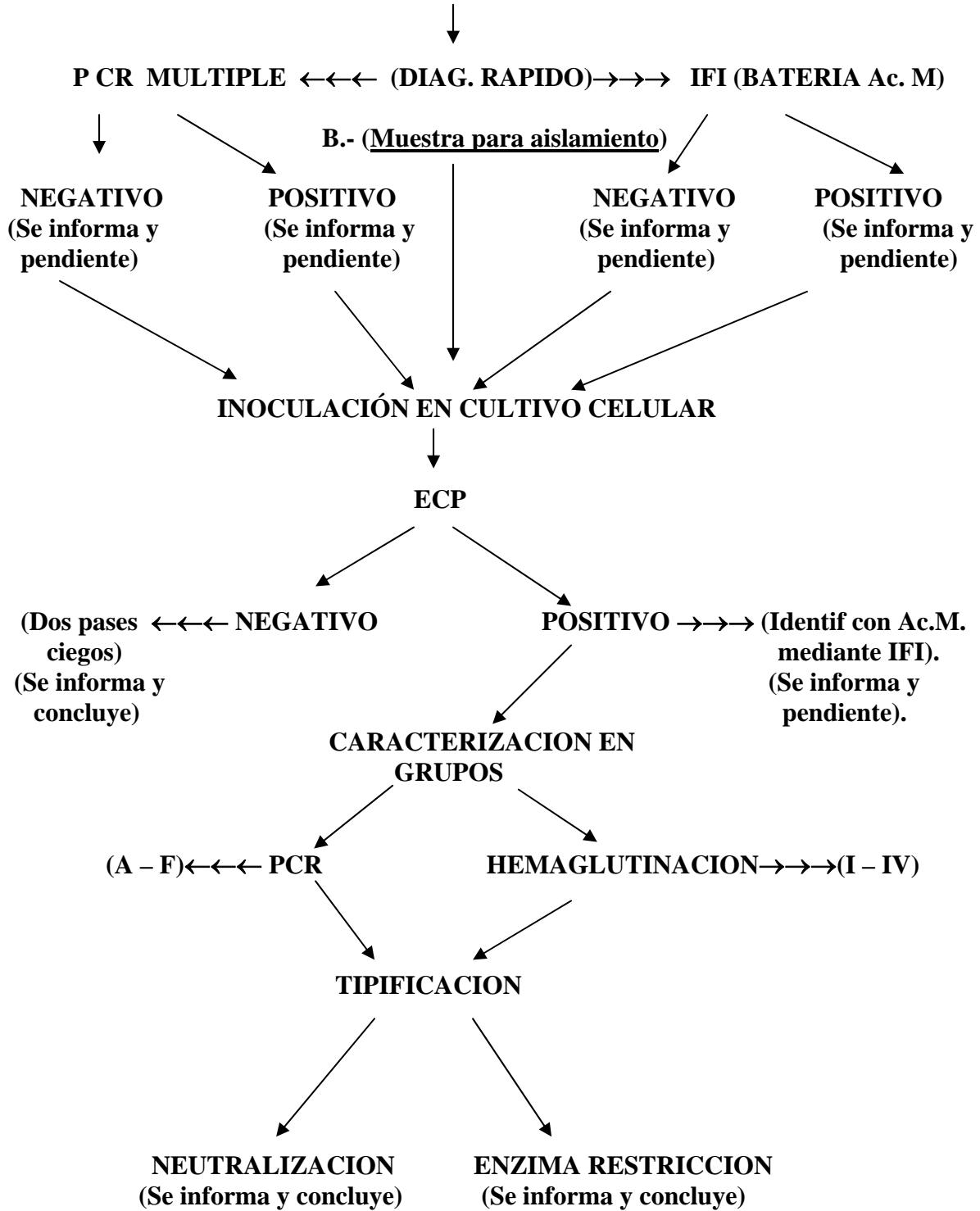
Los Adv son virus estables y pueden recuperarse de muestras clínicas con relativa facilidad.

Referencias:

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

FLUJO DE TRABAJO

A.-Muestra clínica para:



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

Se describe en el Capítulo I.

II.- DIAGNÓSTICO RÁPIDO

II.1- PCR -MÚLTIPLEX.

Se describe en el Capítulo I

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

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

II.2- INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI).

Se describe en un acápite general.

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

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

III.- AISLAMIENTO VIRAL:

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

Referencias:

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

III.1 AISLAMIENTO:

Equipos:

Gabinete de Seguridad Clase II.

Microscopio.

Incubadora de 35°C - 37°C.

Refrigerador a 4°C.

Congelador de -20°C y -70°C.

Materiales y reactivos

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

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

Suero bovina fetal (SBF) al 2%.

Penicilina y estreptomycin

Juego de micropipetas (graduación variable).

Puntas: 50,100,1000 µLs.

Gradilla para los tubos de cultivo celular.

Guantes

Batas.

III.2.-PROCEDIMIENTO

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

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

IV.-IDENTIFICACIÓN

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

Referencias:

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

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

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

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

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

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

Equipos:

Gabinete de Seguridad Clase II

Centrifuga refrigerada para viales.

Bloque térmico o baño de agua.

Termociclador

Cámara y Fuente de electroforesis

Transiluminador

horno microondas

Materiales y Reactivos:

Viales de 0.5mL

Micropipetas

Puntas para micropipetas con filtro

Guantes.

Batas.

PBS estéril

Tampón lisis

Tampón TNE 5X

Fenol – cloroformo

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

Tris-HCl 10 mM pH 8.3

MgCl₂ 1.5 mM

KCl 50mM

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

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

Instrucciones especiales:

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

V.1.1.-Extracción del ADN viral.

Lisado (todo sobre hielo)

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

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

V.1.2.-AMPLIFICACIÓN Y DETECCIÓN

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

Mezcla de Reacción

Buffer Taq Pol 5µL

MgCl₂ (1.5mM) 4µL

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

Agua destilada hasta completar volumen

Se colocan los tubos en el termociclador, según programa

5 min. 94⁰C (desnaturalización previa)

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

5 min. 72⁰C (extensión final)

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

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

V.1.3.-SOLUCIONES:

PBS para 1 litro

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

Tampón Lisis Para un volumen final de 50mL

TRIS-ClH 10mM pH 8.3 0.5 mL

EDTA 10mM 1 mL

NaCl 10mM 0.1 mL

SDS 10% 2.5 mL

TampónTNE 5X Para un volumen final de 25mL

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

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

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

REFERENCIAS:

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

V.2.-HEMAGLUTINACIÓN.

Equipos:

Centrífuga refrigerada.

Incubadora a 37°C

Congeladores de -20°C y -70°C

Materiales y Reactivos:

Placas de microtitulación, de poliestireno, fondo en U

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

Micropipetas.

Puntas: 50,100,1000µL.

Tubos de centrifuga de 15 mL

Jeringuillas de 5, 10 mL

Agujas No. 20 x 1 pulg

Tubos de cultivo de células

Guantes.

Batas.

Cepas controles de Adv 3, 5 y 23.

V.2.1.-Soluciones:

Alsever:

NaCl -----0.42 g

Dextrosa ----- 2.05 g

Ac. Cítrico ----- 0.80 g.

H2O (dest) – 100.0 mL

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

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

.

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

V.2.2.-Preparación de los antígenos hemaglutinantes:

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

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

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

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

V.2.4.-PROCEDIMIENTO:

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

Esquema:

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

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

V.2.5.-Interpretación:

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

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

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

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

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

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

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

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

Referencias:

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

VI.-TIPIFICACIÓN.

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

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

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

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

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

Tipo II: Cortan dentro de la secuencia específica reconocida.

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

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

V11.1.-DIGESTIÓN CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Equipos:

Termociclador

Baño de agua.

Transiluminador de luz UV

Cámara y fuente de electroforesis.(ya descritos)

Materiales y Reactivos:

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

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

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

Colorante de electroforesis (ya descrito)

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

Agarosa al 0.8 – 1.5 % (ya descrito)

TBE (ya descrito).

Bromuro de etidio (ya descrito)

VI.1.2.-PROCEDIMIENTO DE DIGESTIÓN:

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

Referencias:

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

VI.2.-PRUEBA DE NEUTRALIZACIÓN

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

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

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

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

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

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

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

1.- Virus variable --- suero constante:

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

2.- Virus constante --- suero variable:

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

3.- Virus constante --- suero constante:

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

4.- Virus variable --- suero variable:

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

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

PROCEDIMIENTO:

Equipos:

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

Materiales y Reactivos:

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

VI.2.1.1.-PROCEDIMIENTO

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

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

VI.2.1.2.- ANALISIS DE RESULTADOS

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

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

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

A.- DATOS DEL ECP:

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

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

B.- VALORES ACUMULADOS DE LOS DATOS DE ECP:

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

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

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

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

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

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

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

Equipos:

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

Materiales y Reactivos:

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

VI.2.2.1.-PROCEDIMIENTO:

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

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

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

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

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

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

6.- Incubar una hora a temperatura ambiente.

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

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

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

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

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

13.-.- Incubar a 37°C por 5 - 7 días.

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

VI.2.2.2.-Análisis de los Resultados:

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

Resumen del protocolo al 7mo día

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

A.- DATOS DEL ECP:

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

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

B.- VALORES ACUMULADOS DE LOS DATOS DE ECP:

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

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

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

Logaritmo de la dilución mayor al 50% = $3.2 + 0.15$

$$= 10^{-3.35}$$

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

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

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

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

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

PROCEDIMIENTO:

Materiales y Equipos; ya descritos anteriormente.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

4.- Incubar 1 hora a temperatura ambiente.

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

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

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

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

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

10.-Incubar una hora a temperatura ambiente.

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

13.- Incubar a 37°C por 5 - 7 días.

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

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

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

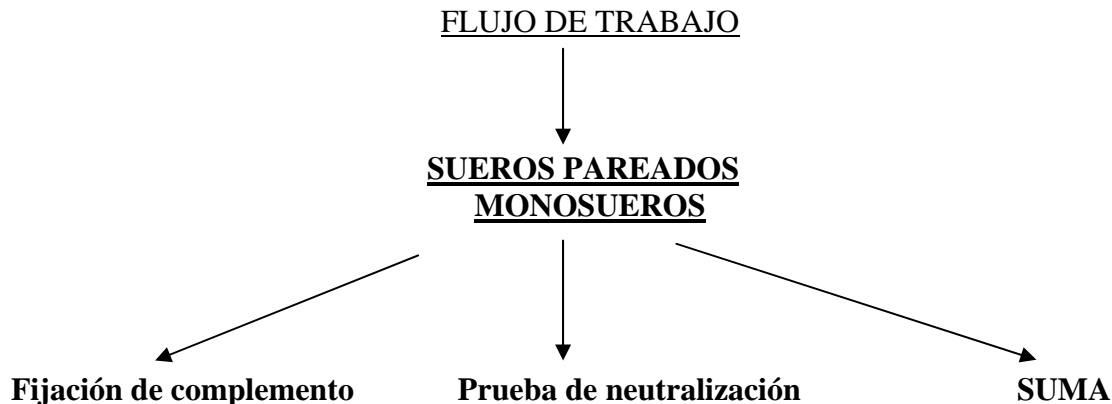
17.- Informar.

Referencias:

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

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

VII.-DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE LOS ADENOVIRUS:



VII.1.-TECNICA DE FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO.

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

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

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

Factores que influyen en la actividad del C':

- Temperatura: es un factor importante, debido a la naturaleza proteica de sus componentes, ya que el C' se inactiva a 56°C en 30 minutos. El procedimiento para su obtención debe realizarse en frío y su conservación a -70°C y si se liofiliza a 4°C.

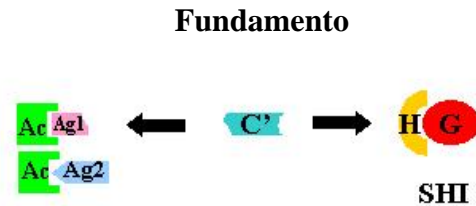
- Fuerza iónica: pH óptimo de 7.2 a 7.4, a mayores o menores el C' pierde su actividad.

Iones de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺: el Ca⁺⁺ juega un papel fundamental en la actividad del C'1 y el Mg⁺⁺ activa el C'2 y C'4.

- Sustancias inhibidoras: aniones de pirofosfato, EDTA, veneno de cólera, levadura, formol, cloroformo, e inhibidores inespecíficos que pueden estar presente en algunos sueros.

VII.2.-Reacción de fijación del complemento:

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



Esta reacción está constituida por dos

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

Suero (anticuerpo) del paciente a investigar.

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

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

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

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

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

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

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

H₂O (dest)----- 1000 mL

Sol B. Mg Cl₂. 6H₂O-----10 g

Ca Cl₂. 2H₂O ----- 4g.

H₂O (dest) ----- 100mL

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

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

VII.3.2- Preparación de los eritrocitos de carnero:

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

NaCl -----0.42 g

Dextrosa ----- 2.05 g

Ac. Cítrico ----- 0.80 g.

H₂O (dest) – 100.0 mL

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

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

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

VII.3.3.- Obtención del Complemento:

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

Si se obtiene en el laboratorio es necesario:

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

Equipos:

Centrífuga normal y refrigerada

Refrigerador a 4°C.

Congelador de -20°C y -70°C.

Materiales y Reactivos:

Pipetas de 5mL y 10 mL

Micropipetas de diferentes graduaciones.

Puntas para micropipetas

Guantes.

Batas.

VII.3.3.1.Procedimiento:

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

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

VII.3.4.- OBTENCIÓN DE LA HEMOLISINA:

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

Si se desea obtener en el laboratorio:

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

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

VII.3.5.- ANTÍGENO ESPECÍFICO Y CONTROL DE ANTÍGENO

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

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

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

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

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

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

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

Junto con la Prueba Principal se realizan los siguientes controles:

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

b)- De las dos unidades del C'

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

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

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

VII.4.1.-Determinación del título del complemento:

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

Equipos:

Incubadora

Centrífuga.

Refrigerador a 4°C

Congelador -20 y -70°C

Materiales y reactivos:

SSM (ya descrita)

Eritrocitos de carnero al 2% (ya descrito)

Hemolisina (2 Uds)

Complemento puro.

Gradilla

Viales de 1.5 mL

Micropipetas.

Puntas para micropipetas.

Placas de microtitulación de fondo en U de 96 excavaciones.

VII.4.1.1.-PROCEDIMIENTO:

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

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

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

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

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

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

Equipos:

Incubadora 37°C

Centrífuga.

Refrigerador a 4°C

Congelador -20 y -70°C

Materiales y Reactivos:

SSM (ya descrita)

Eritrocitos de carnero al 2% (ya descrito)

Hemolisina (pura)

Complemento. (puro).

Gradilla

Viales de 1.5 mL

Micropipetas.

Puntas para micropipetas

Placas de microtitulación fondo en U de 96 excavaciones.

Procedimiento:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Los equipos y materiales ya están descritos anteriormente

VII.5.1.-PROCEDIMIENTO.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

VII.6.1.-PROCEDIMIENTO:

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

3.a)- Diluciones del suero:

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

3.b)- Diluciones del antígeno:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

6.- Incubar toda la noche a 4°C

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

VII.7.-PUEBA PRINCIPAL

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

Los equipos y materiales que se necesitan ya están descritos.

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

Esquema de trabajo:

Prueba Principal

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

VII.7.1.-PROCEDIMIENTO:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

VII.7.2.- CONTROLES Y PROCEDIMIENTOS

Preparar los controles de la prueba en placa de microtitulación:

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

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

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

A todos añadir 25µL de 2 Uds de C'

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

Fila E: Control del antígeno Adenovirus.

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

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

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

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

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

Al día siguiente:

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

Lectura:

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

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

VII.7.3.-LECTURA DE LA PRUEBA PRINCIPAL:

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

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

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

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

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

El caso es NEGATIVO

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

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

El caso es POSITIVO, es una seroconversión

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Para eliminar la actividad anticomplementaria se utilizan varios tratamientos:

VII.8.1- TRATAMIENTO CON COMPLEMENTO:

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

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

Incubar 2 horas a 37°C

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

VII.8.2.- TRATAMIENTO CON CO₂:

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

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

Se deja en reposo a temperatura ambiente 20 minutos.

Las sustancias anticomplementarias precipitan

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

Pasar el sobrenadante a otro tubo

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

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

VII.8.3.- TRATAMIENTO CON CALOR:

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

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

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

VII.8.4.- TRATAMIENTO CON CLOROFORMO:

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

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

Inactivar 56°C durante 30 minutos.

Añadir de 0.3 – 0.5 mL de cloroformo.

Agitar suavemente 3 a 5 veces.

Poner en reposo a temperatura ambiente 20 minutos.

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

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

REFERENCIAS:

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

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

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

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

Equipos:

Gabinete de seguridad Clase II

Centrifuga refrigerada

Refrigerador

Congelador de -70°C

Incubadora de 37°C

Espectrofotómetro

Sonicador

Lector de SUMA

Equipo de rotación de frascos roller

Materiales y Reactivos:

Pipetas de 5 y 10 mL

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

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

Medio 199

Viales (1.5mL)

Tiras de poliestireno

Membranas para filtro miliporo clarificante calibre 1.2 micras

Homogenizador Dounce

Guantes desechables

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

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

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

VII.9.2.-RECUBRIMIENTO DE LAS PLACAS DE UMELISA

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

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

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

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

VII.9.3.-TITULACIÓN DEL CONJUGADO:

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

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

1. Diluir los sueros controles positivos y negativos y las muestras a investigar en buffer de dilución 1:40 por duplicado a razón de 10µL por pocillo e incubar a 37°C en cámara húmeda durante 30 minutos.
2. Lavar 4 veces con tampón de lavado
3. Preparar la dilución del conjugado, previamente titulado en buffer de dilución. y añadirlo a los pocillos a razón de 10µL por pocillo. Incubar a 37°C en cámara húmeda durante 30 minutos.
4. Lavar 4 veces con tampón de lavado.
5. Añadir 10 µL de sustrato fluorescente comercial (dilución 1:10) e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
6. Leer en lector SUMA 521, aplicando el programa de lectura Análisis serológico automatizado (ANSA) en el cual se obtienen los resultados en forma de título (<40, 40, 80, 160, 320, >320). El programa realiza a su vez la validación de la placa de reacción, así como el funcionamiento de los sueros controles.
7. Se consideran positivos los pares de sueros que aumenten su título en al menos 4 veces el 2^{do} suero con respecto al 1^{ro} o que presenten seroconversión o sea que el 1ro suero sea < 1:40 y el 2do 1:40 o más.

VII.9.5.-SOLUCIONES:

PBS-Tween Tampón de Lavado

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

Coating Buffer pH 9.6

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

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

Solución de bloqueo

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

Sacarosa 50mg/mL

Buffer de dilución

Tris-Tween + suero de carnero al 5%

REFERENCIAS:

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

XI.-RINOVIRUS

Dra. Belsy Acosta Herrera.

INTRODUCCION:

Los Rinovirus humanos son la causa de un tercio a la mitad de todas las infecciones agudas del tracto respiratorio aproximadamente y son más comunes en climas templados y durante los meses más fríos del año. La alta incidencia de la infección esta relacionada con la existencia de un gran número de serotipos. Alrededor de 100 serotipos diferentes han sido clasificados y a causa de mutaciones al azar y de la selección inmune natural ocurre la emergencia de nuevos serotipos.

Son virus que pertenecen a la familia *Picoarnviridae*, género Rinovirus. Son virus no envueltos, de forma esférica y con un genoma de ARN de simple cadena de polaridad positiva. Como grupo pueden ser distinguidos por su crecimiento óptimo a temperaturas reducidas (33°C) y su sensibilidad a la inactivación a pH bajo, típicamente entre 3.0 - 4.5 (1,2) La infección se disemina de persona a persona por contacto directo; a través de secreciones respiratorias contaminadas con el virus y a través del contacto con objetos ambientales o superficies contaminadas con dichas secreciones.

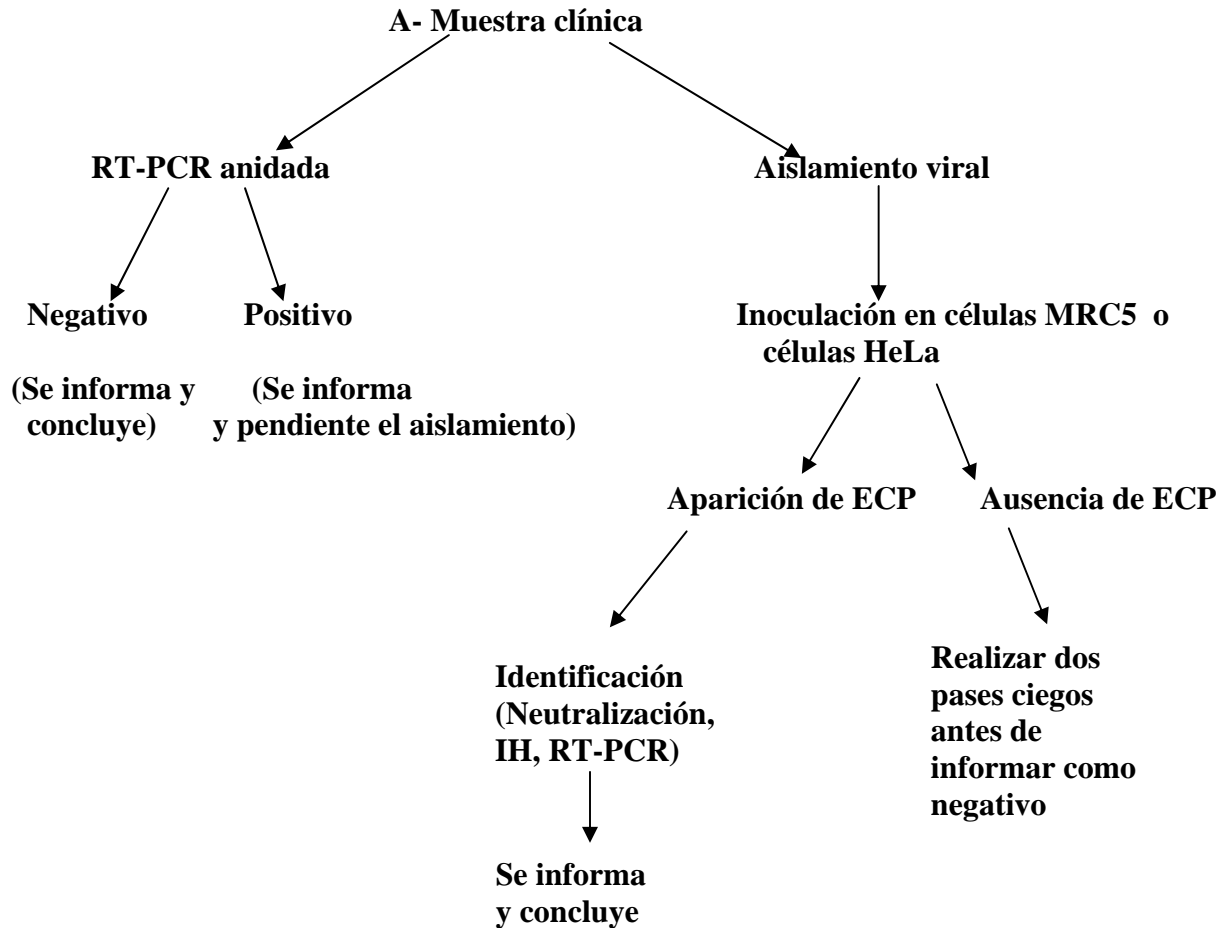
El periodo de incubación comienza con la eliminación de virus en las secreciones nasales y puede ser de 1 a 4 días. (3)

La enfermedad típica que produce la infección por Rinovirus es el resfriado común y se caracteriza clínicamente por la presencia de estornudo, obstrucción y secreción nasal, dolor faríngeo y otros síntomas como cefalea, tos y malestar general. En algunos casos pueden estar involucrados en otitis media aguda, sinusitis e infección del tracto respiratorio inferior. (1,3)

REFERENCIAS:

- 1) **Couch, R. B.** 1996. Rhinoviruses, En : Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JC, Monath TP, et al, eds. *Fields Virology*. 3 ed. Volumen 1. USA : Lippincott-Raven, 1996; 713-734
- 2) **Melnick, J. L.** 1996. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses, En : Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JC, Monath TP, et al, eds. *Fields Virology*. 3 ed. Volumen 1. USA : Lippincott-Raven, 1996; 655-712
- 3) **Monto, A. S.** Studies of the community and family: acute respiratory illness and infection. *Epidemiol. Rev.* 1994;16:351-373

FLUJO DE TRABAJO



I.-DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO:

Estos virus son trabajados en un laboratorio básico con Nivel II de bioseguridad.

Muestras: El virus se encuentra solamente en las secreciones respiratorias, principalmente en la nariz, por lo que es necesario colectar tanta secreción nasal como sea posible. El aspirado o el lavado nasal constituyen métodos excelentes para la toma de estas muestras.

Las secreciones nasofaríngeas obtenidas en el primer o segundo día de la enfermedad constituyen la muestra ideal. (Ver acápite de toma de muestras)

Si el testaje se demora más de 24 horas, las muestras deben ser conservadas a -70°C. (1)

I.1.-AISLAMIENTO VIRAL:

Debido a que existen múltiples serotipos y a que no poseen un antígeno común, la detección de virus es la base del diagnóstico y el cultivo viral es el método establecido.

Son virus que no se multiplican en animales de experimentación ni huevos embrionados.

El sistema empleado para aislar los Rinovirus es el cultivo celular.

El uso de más de un tipo de cultivo celular se requiere para el aislamiento óptimo de estos virus.

El uso de inóculos grandes aumenta el rango de recobrado. El cultivo de células de fibroblastos de embrión humano y la línea celular HeLa son los más empleados.

Equipos

- Microscopio invertido.
- Refrigerador de 4 °C
- Congelador (-20°C , -70°C)
- Incubadora de 33°C
- Gabinete de Seguridad Clase II

Materiales: y Reactivos

- Micropipetas (200 µL, 1000 µL)
- Puntas (200 µL, 1000 µL)
- Tubos plásticos de cultivo de células
- Gradillas de tubos
- Cultivo de células de fibroblastos de pulmón embrionario humano, no infectadas.
- Cultivo de células HeLa no infectadas.
- Rotuladores
- Bata
- Guantes desechables
- Medio de mantenimiento MEM
- Medio RPMI
- Solución salina de Hanks balanceada
- Antibióticos : Penicilina (100 U/mL) y Estreptomicina (100 µg/mL) en el medio de mantenimiento, Gentamicina 50 µg/mL, anfotericín B 2.5 µg/mL y neomicina 1 µg/mL.

- Cloruro de Magnesio 30 mM,
- Glutamina
- Bicarbonato de sodio
- Hidróxido de Sodio
- Solución salina tamponada con fosfato (SSTF) 0,01M pH 7,2).
- Buffer HEPES

I.2.-AISLAMIENTO EN CÉLULAS DE FIBROBLASTOS DE PULMÓN EMBRIONARIO HUMANO

I.2.1.PROCEDIMIENTO:

1. Decantar el medio de crecimiento e inocular por duplicado con 200 μ L de la muestra, los tubos de cultivo con monocapa confluyente de células de fibroblastos de pulmón embrionario humano (MRC5).
2. Añadir 1 mL de medio de mantenimiento.
3. Incubar los tubos a una temperatura de 33 °C.
4. Examinar todos los tubos al día siguiente para la detección de cualquier contaminación, efecto tóxico o fluctuaciones de pH.
5. Realizar un monitoreo diario con microscopio invertido para la detección de efecto citopático que debe aparecer a partir del día 3 de la inoculación. Los cambios en las células infectadas están relacionados con los inducidos por los Enterovirus. Las células se redondean, el núcleo se vuelve picnótico y más tarde se fragmenta (Karyorexis). Las células se convierten en granular o vacuoladas y se desprenden de la superficie del cristal o plástico. Característicamente, el redondeamiento se observa en grupos de células, las cuales son realmente microplacas. Esto progresa hasta afectar un mayor número de células en el curso de varios días. Cuando el crecimiento es lento o el inóculo viral es de bajo título, el efecto citopático puede no ser observado.
6. Cambiar el medio tantas veces como sea necesario para evitar un efecto tóxico y mantener las células saludables. Es necesario realizar las manipulaciones con mucho cuidado para evitar contaminaciones cruzadas entre los tubos.
7. Mantener en incubación el cultivo al menos durante 2 semanas. Si se observa progreso del efecto citopatogénico o por el contrario se ve declinar, el medio es colectado y se pasa a tubos frescos de cultivo. Es necesario realizar los pases para aumentar el título viral y

proceder a realizar pruebas de identificación. No se dará un resultado negativo hasta tener una siembra primaria y dos pases ciegos.

La identificación presuntiva de un aislamiento de Rinovirus puede ser hecha sobre la base del tipo de cultivo de tejidos que soporta el crecimiento, el patrón de efecto citopático y la demostración de la labilidad a pH 3 (1).

I.3.-AISLAMIENTO EN CÉLULAS HELA

I.3.1.-PROCEDIMIENTO:

El proceder es similar al descrito para el aislamiento en fibroblastos de pulmón embrionario humano.

1. Diluir las muestras 1:3 en medio RPMI que contiene 200 µg de neomicina, 200 U de estreptomicina por mL.
2. Incubarlas durante 2 horas a 4°C .
3. Inocular 200 µL de cada dilución de la muestra-RPMI en cada uno de los dos tubos de cultivo e incubados a 33 °C durante 2 horas.
4. Realizar un lavado de los tubos con solución salina de Hanks balanceada.
5. Adicionar 1.5 mL de medio de mantenimiento (MEM)], con 1% de suero de ternera fetal inactivado con calor, 10 mg de neomicina por ml, 1% aminoácidos no esenciales, 0.03 M de MgCl₂, y 1% de glutamina.
6. Incubar los tubos a 33°C durante 10 días y observarlos diariamente para detectar el efecto citopático. Las células se redondean, el núcleo se vuelve picnótico y más tarde se fragmenta (Karyorexis). Las células se convierten en granular o vacuoladas y se desprenden de la superficie del cristal o plástico. Una muestra positiva puede mostrar efecto citopático alrededor del cuarto día.
7. Pasar los cultivos sospechosos para aumentar el título viral antes de proceder a la identificación. Se deben dar hasta dos pases ciegos antes de informar un resultado negativo. (2,3)

Referencias:

1) Couch, R. B. 1996. Rhinoviruses, En : Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JC, Monath TP, et al, eds. *Fields Virology*. 3 ed. Volumen 1. USA : Lippincott-Raven, 1996; 713-734

2) Melnick, J. L. 1996. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses, En : Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JC, Monath TP, et al, eds. *Fields Virology*. 3 ed. Volumen 1. USA : Lippincott-Raven, 1996; 655-712

3) Monto, A. S. Studies of the community and family: acute respiratory illness and infection. *Epidemiol. Rev.* 1994;16:351-373

I.4.-IDENTIFICACIÓN DE VIRUS AISLADOS:

La identificación completa y la serotipificación de estos virus resulta una prueba engorrosa. El aislamiento puede ser identificado mostrando las propiedades físicas y biológicas de los Rinovirus.

I.4.1.-Efecto citopático y sensibilidad a la temperatura.

La presencia de un efecto citopático característico observado por un investigador de experiencia y que no corresponda al de un Adenovirus, o un virus Respiratorio Sincitial, pero si al de un Picoarnvirus y además que no se desarrolle a una temperatura de 37°C es sugestivo de un Rinovirus.

I.4.2.-Resistencia a solventes lipídicos.

Existen múltiples protocolos para realizar esta prueba entre los que se encuentra el siguiente:

1. Mezclar 1 mL del sobrenadante del cultivo infectado con 0.1 mL de cloroformo.
2. Agitar fuertemente y centrifugar.
3. Tratar una segunda muestra de manera similar pero sin añadir el cloroformo.
4. Titular ambas muestras empleando diluciones seriadas en base 10 y realizar el cálculo de la infectividad.
5. Realizar la prueba por duplicado para cada dilución. La prueba debe llevarse a cabo en paralelo empleando otros virus como los Herpesvirus y los Poliovirus como controles negativo y positivo respectivamente.

I.4.3.-Sensibilidad a ácidos débiles.

1. Adicionar 0.2 mL del sobrenadante del cultivo a un tubo que contenga 1.8 mL de buffer HEPES a pH 3 y otros 0.2 mL a un tubo con igual cantidad de buffer HEPES a pH 7 y mantener a 4°C durante 1 hora.
2. Adicionar hidróxido de sodio al tubo con pH ácido hasta ajustarlo a 7 y proceder a calcular la infectividad del virus en ambos tubos.

Si el aislamiento no conocido es un Rinovirus, el título infectivo se reducirá. Un Enterovirus y un Rinovirus conocido deben ser empleados como controles de la prueba. La prueba de sensibilidad

de los Rinovirus a pH ácido resulta positiva si el virus se inactiva a pH 3 y simultáneamente muestra efecto citopático característico a pH 7. (1)

I.4.4.-Serotipificación

Esta prueba requiere que el laboratorio posea un panel de sueros bien caracterizados.

Referencias:

1) Johnston S L., Tyrrell D. A. Rhinovirus. En : Lennette EH, Lennette DA, Lennette ET, eds. **Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections.** 7 ed. Washington : American Public Health Association, 1995; 553-562

II.-DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO:

Los anticuerpos contra estos virus son encontrados en la mayoría de los sueros humanos, pero el título no varía cuando ocurre la infección por Rinovirus y ellos son de insignificante valor diagnóstico.(1,2,3)

II.1-Prueba de neutralización en tubos:

Esta es una prueba de gran valor que puede ser aplicada a cualquier Rinovirus aislado. Además puede ser empleada para medir la actividad de los anticuerpos específicos contra estos virus. El ensayo puede realizarse en cualquiera de los sistemas de cultivo celular empleados para el aislamiento.

Procedimiento:

- 1 Se emplean sueros de la fase aguda y convaleciente.
- 2 Inactivar los sueros a 56 °C durante 30 minutos .
- 3 Realizar diluciones seriadas (desde 1/2 hasta 1/128) en un volumen de 0.5 mL de SSTF.
 - Mezclar las diluciones de los sueros con 0.5 ml de un pool de virus previamente titulado (10 TCID₅₀ en 0.1 mL).
 - Incubar la mezcla durante 30 minutos a temperatura ambiente.
 - Añadir 0.2 ml de la mezcla a cada uno de los dos tubos de cultivo para cada dilución. Debe emplearse una punta para cada mezcla.
 - Titular el virus en paralelo.
 - Inocular la concentración más alta del suero con igual volumen de SSTF para control de la toxicidad celular.
 - Incubar los tubos de cultivo a 33°C y observarlos diariamente para detectar la presencia de efecto citopático a una dilución determinada del suero.

La dilución más alta del suero que muestre neutralización completa (ausencia de efecto citopático) es considerada el título del suero. Una diferencia de 4 diluciones entre el título del suero de la fase convaleciente con respecto al título del suero de la fase aguda; indica infección con un virus relacionado al empleado en la prueba. (Ver neutralización en acápite anteriores).

El efecto citopático también puede ser detectado por lectura del pH del medio de cultivo (prueba de inhibición metabólica). La destrucción de las células infectadas trae consigo un cambio de pH que ocasiona que el indicador del medio de cultivo cambie de rojo púrpura a naranja y posteriormente a amarillo. Esta prueba no es muy usada porque requiere un control muy cuidadoso de las células, el medio y las condiciones de incubación.

REFERENCIAS:

- 1) Couch, R. B. 1996. Rhinoviruses, En : Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JC, Monath TP, et al, eds. *Fields Virology*. 3 ed. Volumen 1. USA : Lippincott-Raven, 1996; 713-734
- 2) Melnick, J. L. 1996. Enteroviruses: polioviruses, coxsackieviruses, echoviruses, and newer enteroviruses, En : Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JC, Monath TP, et al, eds. *Fields Virology*. 3 ed. Volumen 1. USA : Lippincott-Raven, 1996; 655-712
- 3) Johnston S L., Tyrrell D. A. Rhinovirus. En : Lennette EH, Lennette DA, Lennette ET, eds. *Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections*. 7 ed. Washington : American Public Health Association, 1995; 553-562

III.-DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.

Los métodos de diagnóstico convencional para los Rinovirus dependen casi exclusivamente de los métodos de cultivo celular. La poca sensibilidad del cultivo celular y la utilidad limitada de los métodos serológicos para la serotipificación, son entre otras razones las que han motivado el desarrollo de métodos moleculares para la identificación de Rinovirus y estas herramientas ofrecen interesantes perspectivas en el diagnóstico de infecciones respiratorias virales comunes. (1,2)

III.1.-RT-PCR PARA RINOVIRUS

El desarrollo de un ensayo de Reverso Transcripción –Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) para la detección de ARN de Rinovirus es complicado debido a la estrecha homología existente entre el genoma de los Rinovirus y los Enterovirus en la región 5' no codificante que es altamente conservada, región que es utilizada para el diseño de cebadores en la mayoría de los

ensayos de RT-PCR. Steininger C, et.al, 2000, desarrollaron un ensayo de nested-RT-PCR rápido y sensible para la detección específica de Rinovirus en muestras de aspirado nasofaríngeo tomadas de pacientes con infección aguda del tracto respiratorio. (3)

Equipos:

- Horno de 80°C
- Transiluminador de luz ultravioleta
- Termociclador (ADN Thermal Cyclcer)
- Cámara y fuente de electroforesis
- Gabinete de seguridad Clase II

Materiales y Reactivos:

- Muestras de aspirado nasofaríngeo.
- ARN viral (previamente extraído)
- Juego de pipetas (10µL, 20µL, 200µL, 1000µL)
- Puntas con filtros estériles y horneados.
- Microtubos de centrifuga (500µL, 1.7mL), estériles y horneados.
- Inhibidor de ARNsa
- Agua libre de ARNsa
- Kit para la extracción de ARN viral (Qiagen)
- Buffer EZ (5× buffer Gene Amp Kit)
- Mn(OAc)₂ (solución 25 mM)
- MgCl₂ (solución 25 mM)
- *Taq*-Gold ADN polymerase (5 U/µL; 250 U of AmpliTaq Gold ADN polymerase
- Deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dUTP)
- rTth ADN polimerasa (2.5 U/µL [Gene Amp kit)
- AmpErase UNG (1 U/µL)
- H₂O bidestilada estéril
- Colorante de corrida : 6 X.
- SDS (BDH) 0,5%.
- Glicerol (BDH) 50%.

-EDTA (BDH) 10 mM.

-Azul de Bromofenol (BDH) 0,1%.

-Agua bidestilada c.s.p. 5 mL.

- T.B.E. (Tris-ácido bórico) 100 mM EDTA 2,5 mM
- Marcador de peso molecular
- Agarosa NuSieve al 3%
- Bromuro de etidio 10 mg/mL
- Juego de cebadores:

-Cebadores para el primer paso de la PCR que amplifica un fragmento de 106 pares de bases (pb):

Positivo: 5'-CCC CTG AAT G(CT)G GCT AAC CT-3'

Negativo: 5'-CGG ACA CCC AAA GTA GT(CT) GGT C-3'

-Para la PCR anidada se emplean cebadores que amplifican un fragmento de 93 pb .

Positivo: 5'-GAA TG(CT) GGC TAA CCT TAA (AC)CC-3'

Negativo: 5'-CAA AGT AGT (CT)GG TCC C (AG)T CC-3'.

III.1.2.- Extracción de ARN viral.

- 1 Adicionar 1 μ L de inhibidor de ARNsa (Boehringer GmbH, Mannheim, Germany) a una concentración final de 0.01 U/ μ L
- 2 El ARN viral es extraído del sobrenadante del cultivo celular y de aspirados nasofaríngeos empleando un estuche para la extracción de ARN viral (Qiagen, Hilden, Germany).

III.1.3.-Ensayo de RT:

- Se toma una alícuota (10 μ L) del ARN extraído y se adiciona a una mezcla de reacción que consiste en:
- 10 μ L de buffer EZ (5X buffer [Gene Amp Kit; Perkin-Elmer/Cetus Corp., Norwalk, Conn.])
- 4 μ L de Mn(OAc)₂ (solución 25 mM)
- 8 μ L de deoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs: dATP, dCTP, dGTP, dUTP)
- 25 pmol de cada cebador

positivo: 5'-CCC CTG AAT G(CT)G GCT AAC CT-3'

negativo: 5'-CGG ACA CCC AAA GTA GT(CT) GGT C-3'

- 2 μL de rTth ADN polimerasa (2.5 U/ μL [Gene Amp kit; Perkin-Elmer/Cetus])
 - 0.25 μL de AmpErase UNG (1 U/ μL ; catalog no. N808-0068; Perkin-Elmer, Branchburg, New Jersey)
 - 15 μL de H₂O bidestilada estéril
 - volumen final de 50 μL .
- Colocar los tubos en el termociclador bajo las siguientes condiciones:

Ciclos	Temperatura	Tiempo(minutos)
RT	60°C	30 min
PCR x 50 ciclos	94°C	20 s'
	60°C	30 s'
	72°C	9 s'
Final	72°C	8 s'

III.2.-PCR anidada

El segundo paso de amplificación se desarrolla tomando:

- 2 μL de la mezcla de la RT-PCR
- 5 μL de buffer EZ (10 \times buffer; Perkin-Elmer/Cetus)
- 4 μL de MgCl₂ (solución 25 mM)
- 8 μL de dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, and dUTP)
- 25 pmol de cada cebador

Sense: 5'-GAA TG(CT) GGC TAA CCT TAA (AC)CC-3'

Reverse: 5'-CAA AGT AGT (CT)GG TCC C (AG)T CC-3'

- 0.2 μL de *Taq*-Gold ADN polymerase (5 U/ μL ; 250 U of AmpliTaq Gold ADN polymerase; Perkin-Elmer/Cetus)
 - 29 μL H₂O bidestilada estéril
 - volumen final de 50 μL .
- Esta mezcla de reacción es incubada en un equipo termociclador bajo las siguientes condiciones:

Ciclos	Temperatura	Tiempo
RT	95°C	10 min
PCR x 45 ciclos	94°C	15 s'
	60°C	30 s'
	72°C	8 s'
Final	72°C	5 min

Cada ensayo de PCR debe incluir al menos un control positivo y varios controles negativos intercalados entre las muestras clínicas que van a ser testadas.

IV.-ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS:

Para la detección del producto amplificado se aplica en un gel de agarosa NuSieve al 3% (FMC Bioproducts, Rockland, Maine), teñido con 0.5 µg de bromuro de etidio por ml, 10 µl del producto de la última reacción de amplificación, a los cuales se le añadieron 4 µl del colorante de corrida (descrito previamente). La corrida se realiza a 90 volts durante 1 hora.

Las bandas son visualizadas en un transiluminador de luz ultravioleta. Resultarán positivas aquellas muestras en la que se amplifique un fragmento de 93 pares de bases.

REFERENCIAS:

- 1) Couch, R. B. 1996. Rhinoviruses, En : Fields BN, Knipe DM, Howley PM, Chanock RM, Melnick JC, Monath TP, et al, eds. *Fields Virology*. 3 ed. Volumen 1. USA : Lippincott-Raven, 1996; 713-734
- 2) Filipowicz E .Diagnostic methods for detection of respiratory ARN viruses. *Acta Microbiol Pol* 2002;51(1):13-21.
- 3) Steininger C, Stephan W. Aberle, Popow-Kraupp T. Early Detection of Acute Rhinovirus Infections by a Rapid Reverse Transcription-PCR Assay *J. Clin. Microbiol.* January 2001, p. 129-133, Vol. 39, No. 1

XII.-CORONAVIRUS

Dra. Clara Savón Valdés, Prof. Angel Goyenechea Hernández, Dra. Belsy Acosta Herrera, Lic. Odalys Valdés Ramírez MsC, Dra Suset Oropesa Fernández, Lic. Lídice Palerm Caraballo, Lic. Alexander Piñón Ramos.

INTRODUCCION:

Los Coronavirus pertenecen a la familia Coronaviridae, género Coronavirus. Son partículas pleomórficas de 80-160 nm, envueltos con proyecciones superficiales en forma de pétalo que le dan el aspecto de una corona solar. Estos virus son ARN de cadena simple no segmentado, pero sin embargo poseen una frecuencia de recombinación relativamente alta. Esta familia comprende una serie de virus que producen infecciones en los humanos y los animales. Los Coronavirus humanos conocidos son los 299E y OC43, que constituyen los agentes etiológicos del resfriado común. Se ha descrito que su periodo de incubación es de 2 a 5 días, y por lo general los síntomas desaparecen a la semana. Las vías respiratorias inferiores rara vez son afectadas, aunque ocasionalmente se ha observado neumonía en el recién nacido, adulto mayor, pacientes inmunodeprimidos y en reclutas (1, 2).

Los Coronavirus son cosmopolitas, siendo más frecuentes en invierno y primavera. Pueden llegar a constituir el 35% del total de las infecciones respiratorias altas en épocas de alza, la reinfección es común y puede ocurrir a cualquier edad, aunque es más frecuente en los niños.

Actualmente se aplican métodos de detección de antígenos por inmunofluorescencia y ELISA y PCR (3).

El aislamiento es muy difícil en cultivos celulares y se realiza en cultivos de células embrionarios, en las últimas décadas se han logrado adaptar su crecimiento en algunas líneas celulares. El diagnóstico serológico más utilizado hasta el momento es por fijación del complemento y ELISA en sueros pareados.

I.-CORONAVIRUS COMO AGENTE ETIOLOGICO DEL "SARS "

Dentro de las infecciones respiratorias agudas (IRA) los cuadros más importantes son producidos por el virus de Influenza, pues son los que causan el mayor número de casos y fallecidos. No obstante recientemente han aparecido cuadros de infección respiratoria aguda emergentes causados por nuevos agentes. Albert Osterhaus en el 2001 (4) reporta una infección respiratoria severa en lactantes, ancianos e inmunocomprometidos con un cuadro clínico-epidemiológico

compatible con el producido por el Virus Respiratorio Sincitial, pero se llega a la conclusión de que constituye un nuevo agente etiológico el Metapneumovirus humano.

Desde el pasado mes de noviembre del 2002 comienza a presentarse en China en la Provincia de Guangdong un brote de enfermedad respiratoria aguda caracterizada, por fiebre de 38⁰ C, asociada a tos seca y disnea progresiva, demostrándose en los Rx de Tórax una Neumonía Atípica llevando al paciente a un Distress Respiratorio y la muerte. Otros síntomas asociados son la cefalea, mialgia, anorexia, debilidad, confusión, rash cutáneo y diarrea y su período de incubación ha sido descrito entre los 2-10 días. Este cuadro clínico no respondió al tratamiento con antibióticos, este síndrome respiratorio agudo severo fue nombrada como SARS por primera vez el 12 de Marzo 2003 después que comenzaran a aparecer brotes con similares características en Vietnam, Canadá y Hong Kong, activándose un sistema de Vigilancia Global por la OMS, (5). El aislamiento de un agente infeccioso en pacientes con SARS y su posterior identificación llevaron a la comunidad científica internacional a concluir de que el agente etiológico del SARS lo constituye un Coronavirus nuevo que no está relacionado con los Coronavirus humanos conocidos o animal hasta el momento (6).

Se plantea que el Coronavirus SARS se transmite a través de los aerosoles que se producen al toser o estornudar el paciente, pero también la infección puede diseminarse por vial fecal oral y superficies contaminadas. Este virus es estable en orina a temperatura ambiente por 24 a 48 horas, en las heces fecales por un espacio de 1-4 días a pH básicos en pacientes con diarrea, en saliva a temperatura ambiente por cinco días pero se inactiva en 5 minutos con acetona, formaldehído y paraformaldehído al 10%, etanol al 75%, fenol al 2% y desinfectantes comerciales como el chlorax al 10%. (7).

La mortalidad de este virus emergente fluctúa con la edad de acuerdo con los criterios emitidos recientemente por la Organización Mundial de la Salud, así se ha observado una mortalidad de 1% en los niños de 1 a 14 años de edad, 6% en las edades comprendidas entre 15 a 44 años, 15% en las edades de 45 a 64 y 50% en los pacientes de 65 años ó más (8).

II.-CRITERIOS DE DEFINICION E INCLUSIÓN DE CASO DE SARS

Caso sospechoso

1. Toda persona que **después del 1 de noviembre de 2002**¹ haya presentado fiebre (temperatura >38°C) y uno o más de los siguientes signos y síntomas:

- tos o dificultad respiratoria
- y se ha expuesto a una o más de las siguientes situaciones durante los 10 días anteriores a la aparición de síntomas:
- **contacto directo**² con un caso sospechoso o probable de SARS;
 - antecedente de viaje internacional, a un **área afectada**³ en la cual se ha informado foco de de SARS;
 - residencia en **el área afectada**.³

2. Toda persona que fallece a causa de una enfermedad respiratoria aguda de etiología desconocida **después del 1 de Noviembre de 2002**¹ en la que no se ha podido realizar ninguna autopsia y que se ha expuesto a una o más de las siguientes situaciones durante los 10 días anteriores a la aparición de síntomas:

- **contacto directo**² con un caso sospechoso o probable de SARS;
- antecedente de viaje internacional, a una **área afectada**³ en la cual se ha informado foco de transmisión de SARS;
- residencia en **el área afectada**.²

Caso probable

1. Caso sospechoso con radiografía de tórax que presenta evidencia de infiltrados compatibles con neumonía o síndrome de dificultad respiratoria.
2. Casos sospechoso con hallazgos anatomopatológicos consistentes con un síndrome de dificultad respiratoria de etiología desconocida.

Criterios de exclusión: El caso puede ser excluido cuando método (s) de diagnóstico (s) determine (n) la causa de la enfermedad.

El periodo de vigilancia se inicia el 1 de noviembre de 2002 para que abarque los casos de neumonía atípica registrados en China que ahora se consideran como casos de SARS. La transmisión internacional del SARS se notificó por primera vez en marzo de 2003 (se trataba de casos aparecidos en febrero de 2003).

² **Contacto directo:** Se refiere a cualquier acercamiento cercano o exposición a fluidos corporales o secreción respiratoria que el paciente pudo tener con un caso sospechoso o probable de SARS.

³ **Área afectada:** Se define como un área en la cual se notificó transmisión local. Para información actualizada sobre las Áreas afectadas, consulte la siguiente página Web: <http://www.who.int/csr/sars/en/>.

II.1.-Reclasificación de casos:

El SARS actualmente se diagnostica por exclusión. La clasificación del caso está sujeta a constantes cambios a medida que nuevas informaciones se van acumulando. No obstante, el manejo terapéutico del paciente se realizará de acuerdo a la presentación clínica del mismo.

En cuanto a la reclasificación de casos se pueden presentar las siguientes situaciones:

- Un caso inicialmente clasificado como sospechoso o probable se considera descartado cuando a través de un diagnóstico alternativo se explica la causa de su enfermedad.

- Un caso inicialmente clasificado como sospechoso es reclasificado como probable cuando después de una exhaustiva investigación cumple con la definición de caso probable.
- Un caso sospechoso en el cual la recuperación es adecuada pero en el que la causa de su enfermedad no ha sido suficientemente explicada por un diagnóstico alternativo debe seguir siendo considerado como sospechoso.
- Un caso sospechoso que fallece a causa de su enfermedad debe seguir siendo considerado como sospechoso cuando no ha podido realizarse la autopsia. Sin embargo, si el caso es identificado como parte de la cadena de transmisión del SARS, el caso debe ser reclasificado como probable.
- Cuando la autopsia determine que no existe evidencia anatopatológica de SDR el caso debe ser descartado.
- Un caso sospechoso con radiografía de tórax (RX) normal debe ser tratado y se le debe hacer un seguimiento de por lo menos siete días. Aquellos en los que la recuperación no es total deben ser re evaluados por RX.

Fuente: Organización Mundial de la Salud (OMS), 1 de abril de 2003.

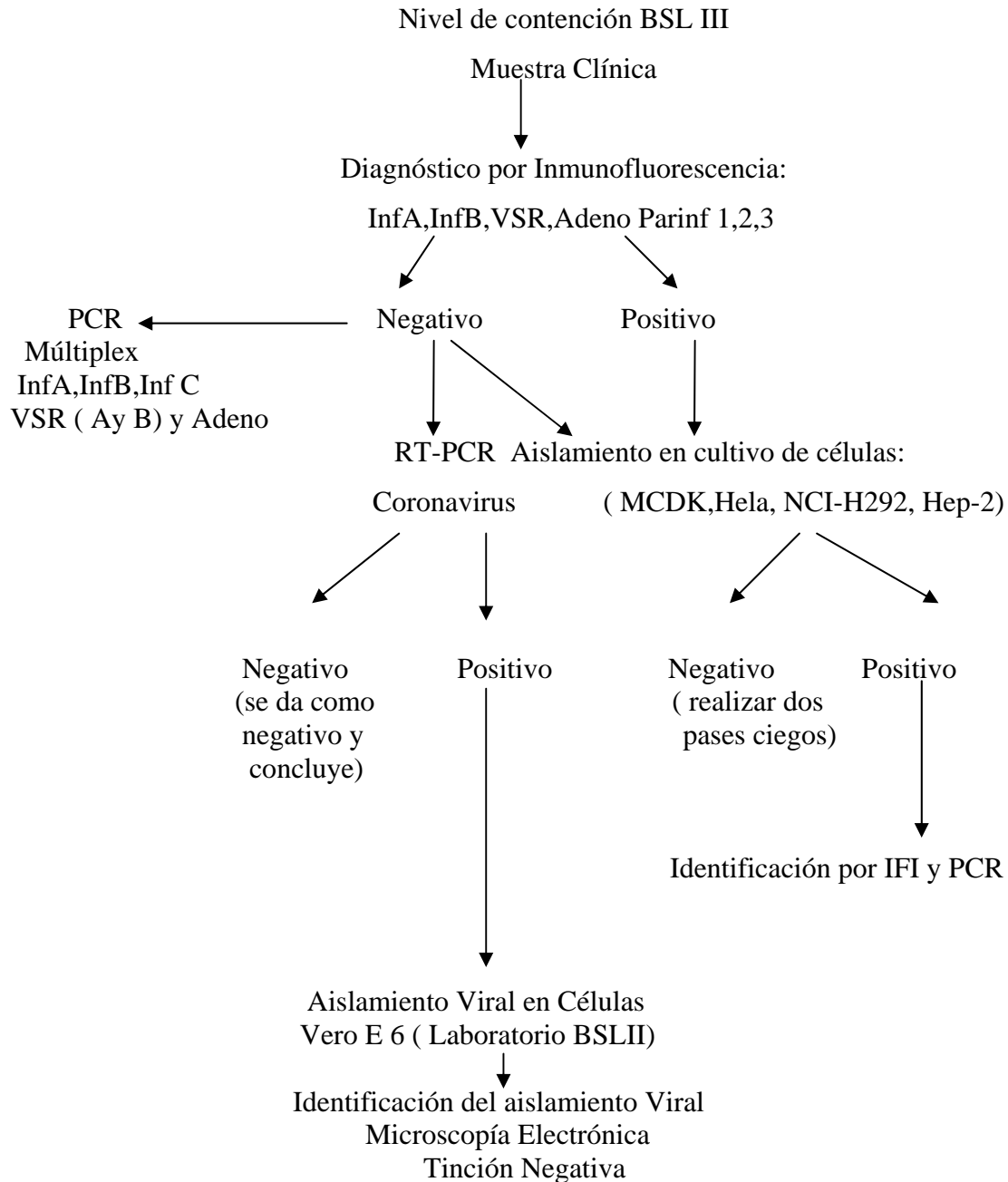
II.2.-RECOMENDACIONES ESPECIALES:

Todo caso sospechoso de SARS deberá obligatoriamente ser reportado por las autoridades de Salud Nacionales a la Organización Mundial de la Salud de forma sistemática.

REFERENCIAS:

- 1.- El Sahly; Aumar RL,; Glezen WP, Greenberg SB. Spectrum of clinical illness in hospitalized patients with Common Cold virus infections. Clin Infect Dis 2000;31:96-100.
- 2.- Wenzel RP, Hendley J O; Davis J A; Gwaltney J M. Coronavirus infections in military recruits: three years study with coronavirus strain OC43 and 229 E. Am Rev Resp Dis 1984;109:621-24.
- 3.- Pitkaranta A; Virolainen; Jero J; Arruda E; Hayden F G. Detection of Rhinovirus, Respiratory Syncytial Virus, and Coronavirus infections in Acute Otitis Media by Polymerase Chain Reaction. Pediatrics 1998;102(2):290-294.
- 4.- Van der Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T. De Groot R, Fouchier R A, Osterhaus A D. A Newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. 2001
- 5.- Severe Acute respiratory syndrome (SARS. Wkly Epidemiol Rec 2003;78:81-3.
- 6.- World Health Organization . SARS Laboratory Network. Conference April 16 2003.
- 7.- Seto W H; Tsang D; Yung R WH; Ching T Y; Ng T K; Ho M et al. Effectiveness of precautions against droplets and contact prevention of nosocomial transmission of severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) The Lancet May 3, 2003; 361(9368).
- 8.- OMS EURO MED SARS May 5 2003.

III.-FLUJO DE TRABAJO DEL CORONAVIRUS SARS



IV.-DIAGNOSTICO DE LABORATORIO:

Debido a la naturaleza de esta entidad y teniendo en cuenta que su vía de transmisión es de persona a persona se recomienda que toda muestra clínica de paciente sospechoso de SARS deben ser manipuladas con un nivel de bioseguridad III. Las muestras deberán ser alicuotadas en cabinas de seguridad dentro de los laboratorios BSL-III. Los sueros que serán testados deberán

irradiarse con radiaciones gamma 2×10^6 rad mientras se congelan en hielo seco antes de ser trasladados a otra área de trabajo fuera del BSL III. La extracción de ácido nucleicos se debe realizar por columnas ya que es un método más rápido y con menores posibilidades de producirse aerosoles que pudieran contaminar al personal de laboratorio.

IV.1.-Muestras Clínicas útiles para el diagnóstico de SARS:

Las muestras clínicas para el diagnóstico de SARS son las ya descritas para la toma de muestra de cualquier entidad respiratoria (Acápites de toma de muestras). Debe cumplirse estrictamente para su traslado el Sistema de Triple Empaque propuesto por la OMS para el traslado de muestras peligrosas.

IV.2.-DIAGNÓSTICO DE CORONAVIRUS SARS MEDIANTE LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERSA (PCR).

La emergencia del Coronavirus SARS y la creación de una red de laboratorios para encontrar métodos diagnósticos eficaces ha dado como resultado que se hayan desarrollado diferentes protocolos de trabajo que permitan el diagnóstico mediante la reacción en cadena de la polimerasa. (1) Entre los científicos más destacados en esta labor se encuentra Drosten (2) el cual desarrolló un protocolo de PCR utilizando iniciadores a partir del gen de la polimerasa para el diagnóstico de muestras clínicas de pacientes sospechosos de SARS que a continuación detallaremos.


Equipos:

- Laboratorio BSL III
- Gabinete de Seguridad Clase II
- Centrifuga de viales con rotor con protección para muestras de alto riesgo
- Congelador -70°C
- Refrigerador 4°C
- Autoclave
- Termocilador
- Transiluminador
- Cámara de electroforesis submarina
- Vortex


Materiales y Reactivos:

- Tapa bocas tipo NP -96
- Pijamas de laboratorio
- Sobrebatas desechables
- Guantes.
- Gorros
- Botas desechables
- Micropipetas de 0.2,10-20,50-100,100-1000 μ L
- Puntas con filtro de algodón para micropipetas
- Viales de 0.5 mL
- Viales 1.5mL
- Kit de RT PCR -Access Promega
- TBE 1X
- Estuche de Extracción de ARN (QIA Amp Viral ARN mini Kit Qiagen)
- Iniciadores (ver tabla)
- Amplitaq Pol (Perkin Elmer)
- Buffer Amplitaq Pol (Perkin Elmer)

IV.2.1.-Oligonucleótidos de la Primera Reacción de Amplificación

Oligonucleotidos	Posición	Secuencia (5'  3')
BNI extremo (+)	18153-18176	ATGAATTACCAAGTCAATGGTTAC
BNIextremo (-)	18321-18342	CATAACCAGTCGGTACAGCTAC

IV.2.2.- Oligonucleótidos de la Segunda Reacción de Amplificación

Oligonucleotidos	Posición	Secuencia (5'  3')
BNI interno(+)	18201-18220	GAAGCTATTCGTACGTTTCG
BNIinterno (-)	18288-18309	CTGTAGAAAATCCTAGCTGGAG

IV.3- Extracción de ARN Viral (QIA Amp Viral RNA mini Kit Qiagen)

IV.3.1-PROCEDIMIENTO:

Este se realiza de acuerdo con las instrucciones propuesta por el fabricante

- Tomar un vial de 1.5 mL y añadir 140µL de muestra clínica más 560 µL de Buffer AVL 1 y 3.5µL de β mercaptoetanol.
- Dar vortex durante 15´ segundos.
- Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Dar un golpe de centrifuga.
- Adicionar 560µL de etanol absoluto mezclar en vortex durante 15 segundos y luego dar un golpe de centrifuga.
- Tomar 630 µL y aplicar en toda la membrana de la columna.
- Centrifugar a 8 000 r.p.m. durante 1 minuto a temperatura ambiente (TA).
- Descartar filtrado.
- Añadir 500µL de buffer AW1 y centrifugar a 8000 r.p.m. a TA durante un minuto.
- Descartar el filtrado.
- Adicionar 500µL de buffer AW2 y centrifugar a 13 000 r.p.m. durante 3 minutos a TA.
- Descartar el filtrado.
- Colocar la columna en vial eppendorf de 1.5mL y añadir 60 µL de AVE e incubar un minuto a temperatura ambiente.
- Centrifugar a 8000 r.p.m. durante un minuto a TA, el filtrado así obtenido constituye el ARN Viral extraído.

IV.4.-Primera Reacción de Amplificación o RT-PCR

- Preparar tubos eppendorf de 500µL con la mezcla de reacción que se muestra a continuación:

Reactivos de la mezcla	Cantidad por tubo
Buffer AMV 5X	10µL
MgSO ₄ 50mM	6µL
BNI extremo (+)10µm	1µL
BNIextremo (-)10µm	1µL
dNTP(A, C, G, T) 100mM	1µL
AMVRT 5u /µL	1µL
TFL 5u/µL	1µL
H ₂ O	19µL
Cantidad total de mezcla	40µL

- Añadir 10µL del ARN extraído al tubo con la mezcla de reacción para completar un volumen final de 50µL.
- Dar un golpe de centrifuga para que se mezcle bien el ARN con la mezcla de reacción.
- Colocar los tubos en el termociclador bajo las siguientes condiciones.

Ciclos	Temperatura	Tiempo(minutos)
RT	45 ⁰ C	30min
	95 ⁰ C	3min
PCR x 10 ciclos	95 ⁰ C	10segundos
	60 ⁰ C	10segundos
	72 ⁰ C	20segundos
PCR x 40 ciclos	95 ⁰ C	10segundos
	56 ⁰ C	20segundos
	72 ⁰ C	20segundos

IV.5.- Segunda reacción de amplificación o PCR Anidada

- Preparar tubos eppendorf de 500µL con la mezcla de reacción que se muestra a continuación:

Reactivos de la mezcla	Cantidad por tubo
Buffer AmpliTaqPol 10X	5µL
MgCl ₂ 50mM	2.5µL
dNTP(A, T, G, C) 200µM	4µL
BNI interno(+) 10µM	1µL
BNIinterno (-) 10µM	1µL
Ampli Taq Pol	0.25µL
H ₂ O	24.25µL
Cantidad total de mezcla	48µL

- Añadir 2µL del producto de la primera reacción de amplificación al tubo con la mezcla de reacción para completar un volumen final de 50µL.
- Dar un golpe de centrifuga para que se mezcle bien el ADN con la mezcla de reacción.
- Colocar los tubos en el termociclador bajo las siguientes condiciones:

Ciclos	Temperatura	Tiempo
PCR	95 °C	3minutos
PCR x 10 ciclos	95 °C	10segundos
	60 °C	10segundos
	72 °C	20segundos
PCR x 25 ciclos	95 °C	10segundos
	56 °C	10segundos
	72 °C	20segundos

IV.6.-Detección del producto amplificado.

- Tomar 8µL de cada uno de los productos de la segunda reacción de amplificación, así como, del marcador de peso molecular (Marker V Bioscience) y mezclar con 2µL de tampón de muestra para electroforesis 6X.
- Aplicar en un gel de agarosa al 2% en TBE 1X.
- Realizar la corrida a 90V durante 1hora.
- Exponer el gel a la luz ultravioleta en un transiluminador.
- Realizar la lectura.

* Se consideran positivas aquellas muestras cuyo tamaño de banda sea de 110 pb.

SOLUCIONES :

Tampón de electroforesis. TBE 5X pH 8.0

TRIS	54g
ACIDO BORICO	27.5g
EDTA	20mL *
H2O C.S.P.	1000 mL

*20mL de EDTA 0.5M

Nota :para preparar TBE 1X tomar 200mL de TBE 5X y completar con 800 mL de agua.

Tampón muestra 6X

EDTA	500mM
Glicerol	10%
Azul de Bromofenol	0.01%

Gel de Agarosa al 2%

Agarosa	2gr
TBE IX	100 mL
Bromuro de etidio	0.1µg/mL

Referencias:

- 1.- Peiris J S M ;Lai S T; Poon L IM, Guan Y, Yam L Y C, Nichols J et al . Coronavirus as possible of severe acute respiratory syndrome. The Lancet online April 8, 2003.
- 2.-Drosten C; Gunther S, Preiser W; van der Werf S; Brodt H R;Becker S et al. Identification of a Novel Coronavirus in patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. New England Journal of Medicine online April 23 ,2003.

V.-AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL CORONAVIRUS SARS.

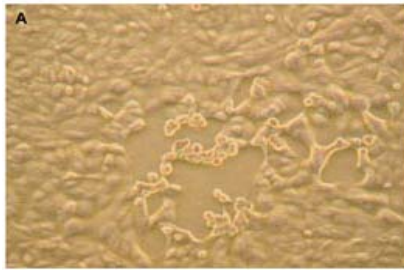
Como ya ha sido descrito en epígrafes anteriores toda muestra clínica de un paciente sospechoso o probable de SARS se debe trabajar en un laboratorio de contención tipo BSL -III.

El aislamiento del Coronavirus asociado al SARS se puede obtener a partir de muestras de sangre, suero, exudados nasofaríngeos, esputo y fragmentos de órganos de pacientes fallecidos. Estas muestras pueden ser inoculadas en una gran variedad de líneas celulares continuas tales como; Vero E 6, NCI-H292, MDCK, LLC-MK2, esta diversidad de líneas celulares permite obtener el aislamiento de cualquier Virus Respiratorio, ya que la presentación clínica inicial de la enfermedad es perfectamente compatible con el cuadro clínico producido por otros virus respiratorios.

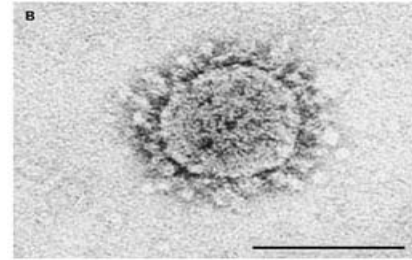
Sin embargo los estudios realizados por Ksiazek y cols en el 2003 corroboran que la línea celular de elección es la Vero E 6, donde se reporta un efecto citopático al quinto día después de la inoculación. ECP inicialmente se manifiesta como un efecto focal de redondeamiento celular, refringencia, que más tarde se extiende afectando toda la monocapa celular y entre las 24 a 48 horas después de la aparición del foco se observa un desprendimiento de la misma. Una vez

logrado el aislamiento viral, al realizar pases sucesivos el ECP total se observa entre 24 a 48 horas. (1, 2).

La identificación del agente aislado puede realizarse por Microscopía Electrónica empleando la técnica de tinción negativa. La observación de partículas virales de 80 a 140nm de diámetro, con proyecciones que la rodean y le confieren un aspecto de corona nos permite plantear que estamos en presencia de un Coronavirus.(3).



A



B

A. Efecto citopático en células VERO E6

B. Imagen de microscopía electrónica por tinción negativa del Coronavirus SARS.

Equipos:

Laboratorio BSL-III

Gabinete de seguridad Clase II

Incubadora de 37⁰ C

Centrífuga de tubos de cultivos con rotor protegido

Microscopio óptico invertido

Materiales y Reactivos:

Batas

Tapa bocas con filtro NP 96

Guantes

Piyamas

Sobrebatas desechables

Gorros

Botas

Pipetas 2 y 5 mL

Micropipetas 200 y 1000µL

Puntas de Micropipetas

Rotuladores

Medio 199 ó Parker

Antibiótico

Suero Bovino Fetal

Tubos de cultivo 12 x 75 sembrados con 150,000 cel/mL con Células Vero E 6

Gradillas de tubos de cultivo

V.1.-PROCEDIMIENTO:

Observar los tubos para ver si la monocapa celular tiene el 75% de confluencias.

A los tubos sembrados con células Vero E 6. Descartar el medio de cultivo.

Inocular por duplicado 200µL de la muestras clínica (ver acápite de muestras clínicas). En cada gradilla se dejan dos controles de células permiten que comparar los cambios morfológicos que se observan en los tubos inoculados (células redondas). Y que pueden ser utilizados como control negativo en la prueba de identificación.

- Centrifugar los tubos inoculados a 2000 r.p.m. durante 45 minutos a 33⁰ C.
- Adicionar el medio de cultivo de mantenimiento para el aislamiento viral e incubar a 37⁰ C.
- Pasadas las primeras 24 horas se realiza un cambio de medio. Esto se hace con el objetivo de proporcionar nutrientes frescos a las células y favorecer el aislamiento viral e incubar a 37⁰ C.
- Siguiendo día. Observar los tubos detenidamente buscando algún cambio morfológico (focos) e incubar nuevamente. Es importante estar atentos a los cambios de pH.
- Continuar la observación diaria y si fuera necesario cambiar el medio.
- Si el ECP no ha aparecido al día 14, es aconsejable, desprender el cultivo celular de forma aséptica (con una pipeta de cristal estéril o plicia de goma estéril) e inocular de nuevo repitiendo los pasos anteriores.
- Cada muestra clínica debe tener al menos 3 pases (una siembra o inoculación primaria y dos pases ciegos) antes de informar el caso como negativo.

- Si el ECP característico de Coronavirus aparece en algún caso, debe tomarse un tubo para realizar la identificación por Microscopía Electrónica y el duplicado se guardará a -70° C para pases sucesivos.
- De cada aislamiento viral debe tenerse, al menos 5 réplicas de 1mL para trabajos posteriores de caracterización genómica.

REFERENCIAS:

- 1.-Ksiazek T G; Erdman D; Goldsmith C; Zaki S; Peret T; Emery S et al . A novel coronavirus associated with Severe Acute Respiratory Syndrome. New JouARNl of Medicine May 2003 ;348(20):19531965.
- 2.- Drosten C; Gunther S, Preiser W; van der Werf S; Brodt H R;Becker S et al. Identification of a Novel Coronavirus in patients with Severe Acute Respiratory Syndrome. New England Jouarnl of Medicine online April 23 ,2003.
- 3.. Peiris J S M ;Lai S T; Poon L IM, Guan Y, Yam L Y C, Nichols J et al . Coronavirus as possible of severe acute respiratory syndrome. The Lancet online April 8, 2003.

XIII. HANTAVIRUS

Prof. Angel Goyenechea Hernández y Lic. Odalys Valdés Ramírez MsC

I.-Definición de un caso clínico:

Aparición de una enfermedad febril (temperatura de 38.3°C (101°F) que requiere administración de oxígeno suplementario.

Edema intersticial difuso bilateral que se parece al síndrome de insuficiencia respiratoria del adulto (SIRA), y

Que se presenta en el término de 72 horas de la hospitalización, en una persona que había estado sana ó

Enfermedad inexplicable que culmina en la muerte, y un estudio de necropsia que señala la presencia de edema pulmonar no cardiogénico sin una causa específica e identificable de muerte.

I.1.-Clasificación de casos:

SOSPECHOSO: Caso compatible con la descripción clínica.

CONFIRMADO: Caso sospechoso del que se tiene confirmación por estudios de laboratorio.

II.-Criterios para confirmar el diagnóstico por Laboratorio:

Presencia de anticuerpos IgM específicos contra hantavirus, o un incremento de cuatro veces o mayor en los títulos de anticuerpos IgG, o

Positividad de los resultados de la transcriptasa inversa-reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) respecto al ARN de hantavirus. ó

Resultados inmunohistoquímicos positivos de la presencia de antígeno de hantavirus.

III.-Situación Epidemiológica en la Región:

En la primavera de 1993, en el sudeste de E.U. en la zona conocida por “Four Corner”, se produjo un brote epidémico de una enfermedad desconocida hasta el momento. Debido a las manifestaciones pulmonares y ser causada por un hantavirus, fue denominada Síndrome Pulmonar por Hantavirus (SPH) y al hantavirus se le denominó “Virus Sin Nombre”(VSN).

Esta situación fue consecuencia de un aumento de la población de roedores en contacto con el hombre y se debió a cambios climáticos y condiciones ecológicas.

Esta no es una enfermedad nueva sino que su identificación es reciente. Probablemente, las cepas de hantavirus habían estado viviendo en los roedores hospederos durante miles de años.

A partir de ese momento, además de los E.U. otros países han reportado casos de SPH: Canadá, Argentina, Chile, Brasil, Uruguay, Bolivia, Paraguay y mas recientemente en el año 2000 Panamá.

Los hantavirus constituyen un género dentro de la Familia Bunyaviridae. Son virus de envoltura lipídica con un genoma de ARN de sentido negativo, trisegmentado, es decir, está compuesto por tres segmentos de ARN de cadenas negativa, uno largo (L) que codifica la Polimerasa, uno mediano (M) que codifica las Glicoproteínas G1 y G2 y uno pequeño (S) que codifica la proteína de la Nucleocápside. Tiene forma esférica u ovalada de 95 a 110 nm de diámetro. Son susceptible a la mayoría de los desinfectantes: soluciones de hipoclorito diluido, fenoles, detergentes, formalina alcohol y pH ácidos.

En la Región hasta el momento se han detectado distintas especies del hantavirus, con diferentes reservorios en diferentes regiones geográficas, lo que significa que pueden haber otras especies por detectar.

Especies de Hantavirus productores del Síndrome Pulmonar por Hantavirus:

Espece	Reservorio	Distribución geográfica	Distribución del reservorio
Sin Nombre (SN)	Peromyscus maniculatus	E. U.	Alaska, Canadá, E.U, México.
New York (NY)	Peromyscus leucopus	E.U.	EU, Canadá, Costas del Caribe, Venezuela
Black Creek Canal (BCC)	Sigmodon hispidus	E. U.	EU, México, Centro América Colombia, Venezuela.
Andes (AND)	Olygoryzomus longicudatus	Argentina	Los Andes, Chile, Argentina.
Sin nombrar	Calomys laucha	Paraguay	Argentina, Uruguay, Bolivia, Paraguay, Brasil.
Nuevo tipo	Sigmodon	Panamá	

IV.-ASPECTOS CLÍNICOS

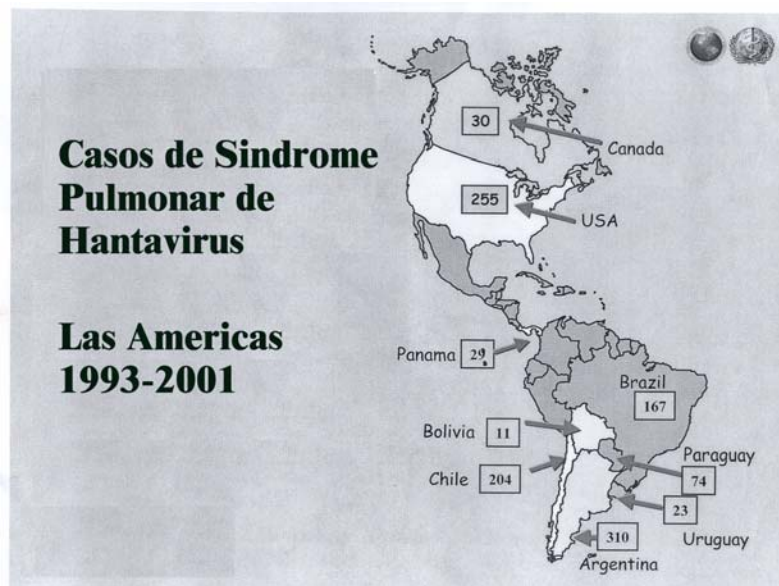
Fase inicial: o prodrómica: dura entre 3 – 6 días y sus síntomas son muy semejantes a los de un cuadro gripal (fiebre de iniciación brusca sobre 38°C, cefalea, osteomiálgias generalizada, coriza, tos, vómitos y náuseas, diarrea y dolor abdominal).

Compromisos respiratorios: el cuadro se agrava rápidamente con complicaciones cardiopulmonares, caracterizado por aumento de la fiebre, taquicardia, taquipnea. El compromiso respiratorio puede continuar progresando desde una baja saturación de Oxígeno y edema pulmonar intersticial, hasta llegar a un cuadro semejante al Síndrome de Distress Respiratorio (SDR) y evoluciona a una insuficiencia respiratoria severa en pocas horas. El tiempo medio entre la aparición de los primeros síntomas cardiopulmonares y la muerte es de 8 días (rango 2 – 6).

IV.1.-Diagnóstico diferencial:

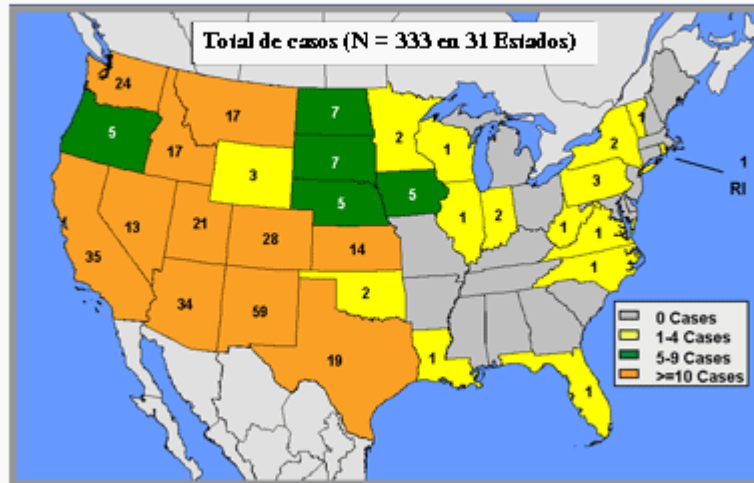
Al inicio y antes de la identificación del agente causal, hacer el diagnóstico diferencial con enfermedades enzoóticas propias de las Américas: leptospirosis, turalemia, tífus murino, fiebre recurrente de *Borrelia hermesii*, dengue clásico y hemorrágico, gripe, así como las enfermedades por parvovirus y arenavirus.

En el mapa 1 se presenta un resumen de la distribución de los casos de SPH en la región de Las Américas, con un total de 1103 casos en 9 países.



En el mapa 2 se presentan los casos reportados en los Estados Unidos. De 333 casos reportados falleció el 38%.

Casos de Síndrome Pulmonar de Hantavirus reportados en Estados Unidos. Abril/1993-Enero/2003.



IV.2.-Diagnóstico virológico:

Muestras: sangre (el coágulo para PCR y el suero para serología).

Casos fallecidos: tejidos de pulmón.

De roedores se investigaran las mismas muestras.

Para la toma de muestras, conservación y traslado, se tomarán todas las medidas de Bioseguridad que ya han sido señaladas anteriormente, al igual que para su manipulación e investigaciones que se realicen en el Laboratorio.

V.-Determinación de anticuerpos humanos IgM contra Hantavirus por ELISA de captura:

Equipos:

- Gabinete de seguridad Vertical (Clase IIABb3)
- Lavador de placas.
- Lector de placas.
- Incubadora de 37°C.
- Congelador de -20°C.
- Congelador de -70°C.

Materiales y Reactivos:

- Pipetas (20, 200, 1000µL).

- Pipetas multicanales de 10 – 50 y de 100 - 500 μ L
- Puntas de pipetas de 20, 200, 1000 μ L).
- Placas de ELISA de 96 pocillos, Dinotech cat.No. 001-010-2101 o F8 NUNC Maxisorp o PVC flexible Falcon cat. 3911 fondo en U.
- Guantes desechables.
- Batas.
- Tubos (Titertubes o gradillas de microtubos cat223 – 9390, Biorad)
- Toallas adsorbentes (Benchmate).
- PBS 0.01 M pH 7.4 con Tween 20 (0.1%). ph 7.4 con o sin timerosal.
- Diluyente de sueros: Regulador de lavado con 5% de leche descremada, pH 7.4 y timerosal 1:10,000.
- Capturador: goat anti-human IgM (Kirkegaard and Perry cat. 475 – 1008).
- Antígeno recombinante SNV obtenido del CDC.
- Antígeno control obtenido del CDC.

Sueros:

- Positivos: sueros convalecientes
- Negativo: utilice por lo menos 5 – 6 de personas conocidas como negativas para hantavirus.
- Conjugado antihumano: Inmunoglobulina anti- mouse IgG en cabra (cadena H&L) conjugada con peroxidasa (Pierce cat. No. 31446).
- Sustrato para peroxidasa ABTS (Kirkegaard and Perry cat. No. 506201). Combinados 1:1
- Suero humano normal (sin anticuerpo contra hantavirus)

V.1.-Instrucciones Especiales:

Mantener controlada la temperatura del cuarto, recordando que las determinaciones son enzimáticas.

- 1.- Los sustratos ABTS y soluciones B deben mantenerse a 4°C, los antígenos reconstruidos a -70°C y todos los demás deben almacenarse a -20°C.
- 2.- Utilice de 5 – 6 sueros negativos cada vez que realice la prueba. El promedio y las desviaciones estándar de los valores de las DO.ajustadas de estos sueros se acumulan y usan para

calcular un valor igual al promedio mas 3 desviaciones estándar y ello representa el valor de corte (cut off) de la prueba.

3.- Las puntas de las pipetas utilizadas en la preparación de las diluciones de sueros deben descartarse en recipientes con hipoclorito de sodio recién preparado.

4.- Prediluya los sueros 1:25.

5.- Se utilizan volúmenes de 100µL.

6.- Sea conservador(a) al interpretar los ensayos de IgM, valores marginales pueden indicar reacciones cruzadas con otros virus o ruidos en el sistema.

V.1.1.-PROCEDIMIENTO:

1.- Cubra toda la microplaca con 100µL de anti-human IgM 1:500 en PBS pH 7.4 y mantenga sellada con parafina.

2.- Absorba a 4°C toda la noche.

3.- Lave de cuatro a seis veces con regulador de lavado.

4.- Añada a todo el microplato 100µL del diluyente del suero.

5.- Tome 33µL de la predilución del suero de cada suero (positivo, negativo y desconocidos) y añadirlo a la columna A del microplato con el captador anti IgM y pasar sucesivamente 33µL hasta la columna D. Descartar los últimos 33µL y cargar nuevamente con la misma punta de pipeta 33µL de la predilución 1:25 para agregar a la columna E y pasar sucesivamente 33µL hasta la columna H. Así tenemos los sueros diluidos 1:100,

1: 400, 1:1600, 1: 1:6400.

6.- Incube a 37°C por una hora en cámara húmeda.

7.- Lave de cuatro a seis veces con el regulador del lavado.

8.- Diluya 1:2 los antígenos recombinantes y control .El diluyente de los antígenos debe tener suero humano normal a una concentración de 1:50.

9.- Agregar 100µL del antígeno normal a las columnas de la E a la F. Puede utilizar las mismas puntas de pipeta para agregar el antígeno recombinante de las columnas de la A a la D.

10.-Incube a 37°C por una hora en cámara húmeda.

11.- Lave de cuatro a seis veces con el regulador de lavado.

12.- Añada el suero hiperinmune de ratón (anti-FCV) diluido 1: 2000 en PBS con 0/1% de Tween 20, 5% de leche descremada y timerosal al 1%.

13.- Incube a 37°C por una hora en cámara húmeda.

14.- Lave de cuatro a seis veces con el regulador del lavado.

15.- Añada el conjugado anti-ratón en cabra 1: 8000.

16.- Incube a 37 por una hora.

17.- Lave de cuatro a seis veces.

18.- Añada el sustrato.

19.- Incube a 37°C por 30 minutos.

Observe el desarrollo de color (la cantidad de color que se desarrolla será proporcional a la cantidad de anticuerpo IgM que se ha unido al antígeno en la fase sólida)

20.- Lea a 410 nm (a 490 nm para la lectura dual)

21.- Recuerde sustraer las D.O. del antígeno normal a las D.O. del antígeno positivo para tener un valor ajustado positivo neto.

22.- Determinar los positivos en base al valor de corte.

V.2.-Determinación de anticuerpos humanos IgG contra Hantavirus por ELISA de captura:

Equipos:

- Gabinete de seguridad (Clase IIABb3)
- Lavador de placas.
- Lector de placas.
- Incubadora de 37°C.
- Congelador de -20°C.
- Congelador de -70°C.

Materiales y Reactivos:

- Pipetas (20, 200, 1000µL).
- Pipetas multicanales de 10 – 50 y de 100 - 500µL
- Puntas de pipetas de 20, 200, 1000µL).
- Placas de ELISA de 96 pocillos, Dinotech cat.No. 001-010-2101 o F8 NUNC Maxisorp o PVC flexible Falcon cat. 3911 fondo en U.

- Guantes desechables.
- Batas.
- Tubos (Titertubes o gradillas de microtubos cat223 – 9390, Biorad)
- Toallas adsorbentes
- PBS 0.01 M pH 7.4
- Diluyente de sueros: Regulador de lavado con 5% de leche descremada, pH 7.4 y timerosal 1:10,000.
- Antígeno recombinante SNV obtenido del CDC.
- Antígeno control obtenido del CDC.

Sueros:

- Positivos: sueros convalecientes
- Negativo: utilice por lo menos 5 – 6 de personas conocidas como negativas para hantavirus.
- Conjugado antihumano: Inmunoglobulina anti-IgG humana en cabra purificada por cromatografía de afinidad conjugada con peroxidasa (Kirkegaard & Perry o mouse anti-human conjugated. Accurate cat. No. JMHO35103).
- Sustrato para peroxidasa ABTS (Kirkegaard and Perry cat. No. 506400 & 506500). Combinados 1:1

V.2.1.-Instrucciones Especiales:

Mantener controlada la temperatura del cuarto, recordando que las determinaciones son enzimáticas.

- 1.- Los sustratos ABTS y soluciones B deben mantenerse a 4°C, los antígenos reconstruidos a -70°C y todos los demás deben almacenarse a -20°C.
- 2.- Utilice de 5 – 6 sueros negativos cada vez que realice la prueba. El promedio y las desviaciones estándar de los valores de la D O. ajustadas de estos sueros se acumulan y usan para calcular un valor igual al promedio mas 3 desviaciones estándar y ello representa el valor de corte (cut off) de la prueba.
- 3.- Las puntas de las pipetas utilizadas en la preparación de las diluciones de sueros deben descartarse en recipientes con hipoclorito de sodio recién preparado.
- 4.- Prediluya los sueros 1:25.
- 5.- Se utilizan volúmenes de 100µL.

6.- Sea conservador(a) al interpretar los ensayos de IgG, valores marginales pueden indicar reacciones cruzadas con otros virus o ruidos en el sistema..

V.2.2.-Procedimiento:

1.- Cubra la mitad de la microplaca (columnas de la A a la D) con el antígeno de hantavirus (1:2000 diluído en PBS) y la otra mitad de la microplaca (de la E a la H) con el antígeno control a la misma dilución. Cubrir con un film plástico. (Esto constituye la aplicación del antígeno en la fase sólida).

2.- Adsorba a 4°C toda la noche.

3.- Lave cuatro a seis veces con el regulador de lavado.

4.- Añadir a todo la microplaca 100µL del diluyente del suero.

5.- A partir de la dilución 1:25 de cada suero (positivo, negativo y desconocido), tomar 33µL y añadirlo a la columna E del microplato con el antígeno control y pasar sucesivamente 33µL hasta la columna H. Descartar los últimos 33µL y cargar nuevamente con la misma punta de pipeta 33µL de la predilución 1:25 para agregar a la columna A y pasar sucesivamente 33µL hasta la D. Descartar los últimos 33µL de la predilución 1:25 para agregar a la columna A y pasar sucesivamente 33µL hasta la columna D (pocillo con el antígeno recombinante). Así tenemos los suero diluidos 1:100, 1:400, 1:1600, 1:6400.

6.- Incubar a 37°C por una hora en cámara húmeda.

7.- Lavar cuatro a seis veces con el regulador de lavado.

8.- Añada 100µL del conjugado anti-humano diluido según las indicaciones de la casa comercial.

9.- Incube a 37°C por una hora en cámara húmeda.

10.- Lava cuatro a seis veces con el regulador de lavado.

11.- Añada 100µL del sustrato diluido 1:1.

12.- Incube a 37°C por 30 minutos en cámara húmeda (observe desarrollo del color, la cantidad de color que se desarrolla será proporcional a la cantidad de IgG que se ha unido al antígeno en la fase sólida).

13.- Lea a 410 nm, (a 490 nm para la lectura dual).

14.- Recuerde sustraer las D.O. del antígeno normal a las D.O. del antígeno recombinante para tener un valor ajustado positivo neto.

15.- Determine los positivos en base al valor de corte (cut off).

VI.-Detección de Hantavirus mediante la Transcripción Reversa - Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR) y PCR anidada.

La RT-PCR, PCR anidada permite la detección del ARN viral directamente de la muestra clínica, utilizando cebadores genéricos específicos que amplifican un fragmento del gen que codifica para la Nucleocápside.

Equipos:

- Centrífuga
- Gabinete de seguridad clase II
- Termociclador.
- Transiluminador
- Horno microondas

Materiales y Reactivos

- Tubos de 500 μ L
- Micropipetas
- Puntas de micropipeta
- Rotuladores
- Bata
- Guantes desechables.
- Trizol
- Cloroformo
- Isopropanol
- Etanol
- Kit Access System
- Kit Taq Polymerasa
- Agarosa LE
- Tris base
- Acido Bórico
- EDTA
- Glicerol
- Azul de bromofenol

- Bromuro de etidio
- PCR marker VIII

VI.1.-Extracción de ARN utilizando el método del TRIZOL.

- Añadir a 300 µL de muestra clínica (suero) 300 µL de TRIZOL, agitar por vortex 15 seg., dejar reposar 5 min. a temperatura ambiente (TA).
- Añadir 100 µL de Cloroformo, agitar por vortex 15 seg., dejar reposar 3 min. a TA.
- Centrifugar a 15 000 r.p.m., durante 20 min a 4°C.
- Transferir la fase superior aun tubo limpio, añadir 300 µL de Isopropanol, mezclar por inversión, dejar reposar 10 min. a TA.
- Centrifugar en las condiciones descritas anteriormente.
- Eliminar el sobrenadante, lavar el precipitado con 300 µL de Etanol al 75%.
- Centrifugar a 15 000 r.p.m. durante 5 min a 4°C.
- Eliminar el sobrenadante, secar el ARN y resuspender en 20 µL de agua bidestilada estéril.

VI.1.2.-RT/PCR anidada que amplifica un fragmento del gen que codifica para la nucleocapside.

Oligonucleótidos utilizados en la RT/PCR, tamaño del fragmento amplificado 601nt.

SS143C-N TGGA(C/G)CCIGATGAIGTTAACAA
 SS743R-N TCIATCCA(G/A)TC(C/T)TTIACAAA

Oligonucleótidos utilizados en la PCR anidada, tamaño del fragmento amplificado 434 nt.

SS283C-N CCAACAGGGITTGA(A/G)CC(T/A)GATGA
 PPT716R AAICCIATIACICCCAT

TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA

- Preparar tubos eppendorf de 500µL con la mezcla de reacción que se muestra a continuación:

Reactivos de la mezcla	Cantidad por tubo
Buffer AMV 5X	10 µL
MgSO ₄ 25mM	6 µL
dNTP 10mM	1 µL
SS143C-N (100 ng)	1 µL
SS743R-N (100 ng)	1 µL
AMV RT 5U	1 µL
Taq Poli 5U	1 µL
H ₂ O	13 µL
	40 µL

- Añadir 10 µL del ARN extraído al tubo con la mezcla de reacción para completar un volumen final de 50 µL.
- Dar un golpe de centrífuga para que se mezcle bien el ARN con la mezcla de reacción.
- Colocar los tubos en el termociclador bajo las siguientes condiciones:

Ciclos	Temperatura	Tiempo(minutos)
RT	42°C	45min
	92°C	2min
PCR x 30 ciclos	94°C	1min
	50°C	1min
	72°C	1min
Final	72°C	7min

PCR anidada.

- Preparar tubos eppendorf de 500µL con la mezcla de reacción que se muestra a continuación:

Reactivos de la mezcla	Cantidad por tubo
Buffer PE 10X	5 µL
Mg Cl ₂ 1.5mM	6 µL
dNTP 200 GM	1 µL
SS283C-N (100 ng)	1 µL
PPT716R (100 ng)	1 µL
Taq Poli 5U	0.25 µL
H ₂ O	28.75 µL
	49 µL

- Añadir 1µl del producto de la primera reacción (ADN) de amplificación al tubo con la mezcla de reacción para completar un volumen final de 50µL
- Dar un golpe de centrifuga para que se mezcle bien el ADN con la mezcla de reacción.
- Colocar los tubos en el termociclador bajo las siguientes condiciones:

Ciclos	Temperatura	Tiempo (minutos)
	94°C	2 min
PCR x 30 ciclos	94°C	1 min
	48°C	1 min
	72°C	1 min
	72°C	7 min
Final	72°C	7 min

Detección del producto amplificado.

- Tomar 8 µL de cada uno de los producto de la segunda reacción de amplificación, así como, del marcador de peso molecular (PCR Maker VIII) y mezclar con 2 µL de tampón de muestra para electroforesis 6X.
- Aplicar en un gel de agarosa al 2% en TBE 1X.
- Realizar la corrida a 90V durante 1hora.
- Exponer el gel a la luz ultravioleta en un transiluminador.
- Realizar la lectura.
- Se consideran positivas aquellas muestras cuyo tamaño de banda sea 434 pb.

Referencias:

- 1.- Hjelle B, Jenison S, Goade D, Green W, Feddersen R ,Scott A. Hantaviruses. Clinical, Microbiologic, and Epidemiologic Aspects. Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences.1995; 32(5): 469 – 508.
- 2.- Manual de Procedimientos Diagnóstico de Hantavirus. Instituto Conmemorativo Gorgas de Estudios de la Salud. Centro de Investigaciones para el Control de Enfermedades. . Departamento de Virología. Ministerio de Salud Pública. Panamá. 2001.
- 3.-MMWR 48(24) 521 – 25.
- 4.- CDC “ All About Hantavirus” Case Information: Hantavirus Pulmonary Syndrome Case Count and Descrip Statistics as of April 2001.
- 5.- CDC “ All About Hantavirus” Case Information: Hantavirus Pulmonary Syndrome Case Count and Descrip Statistics as of January 2003.
- 6.- OPS. 1999. Guia para el Diagnóstico, el tratamiento, la prevención y el control de Hantavirus en las Américas . Cuaderno Técnico No. 47.