

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.

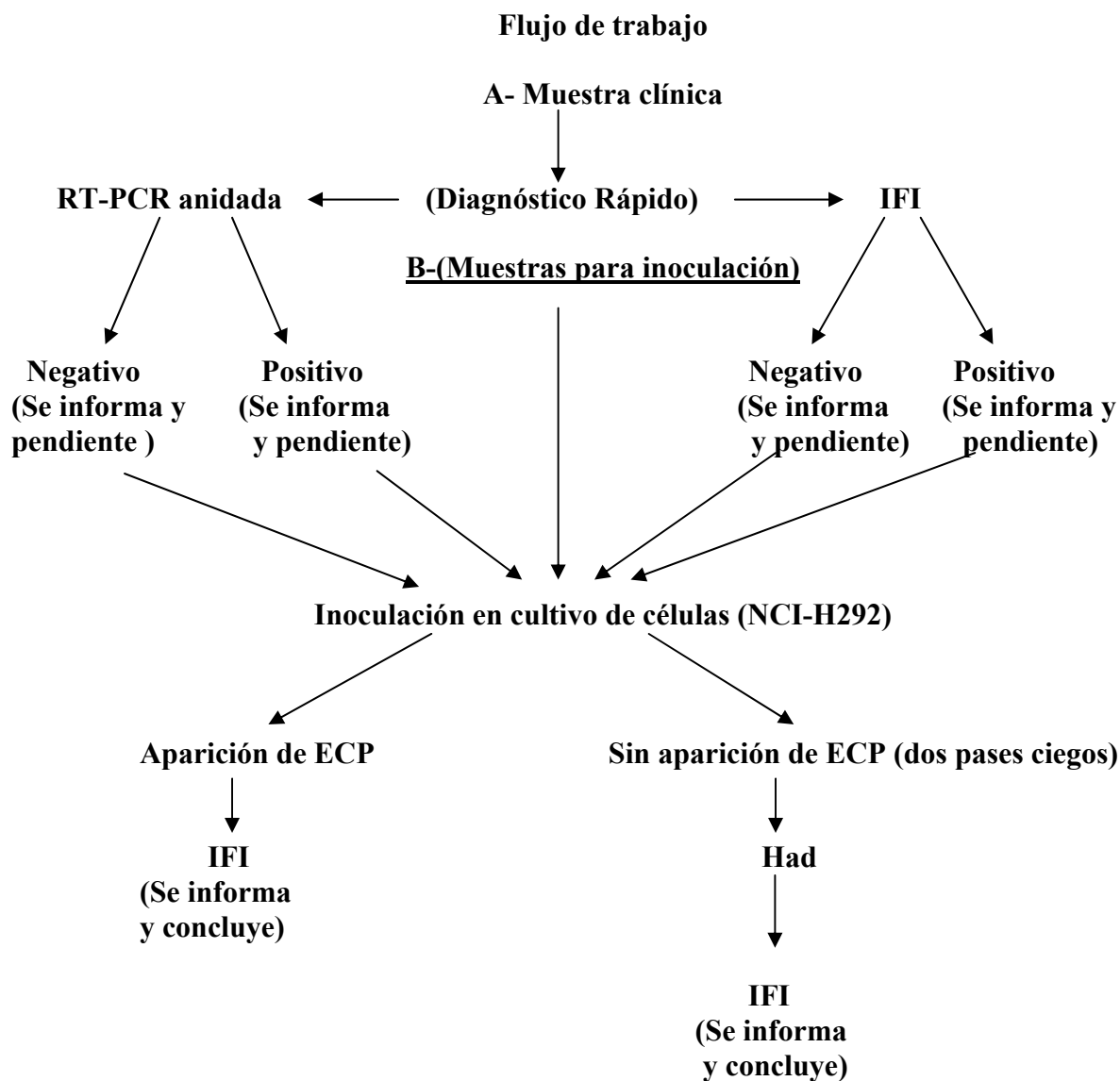
Los niños con infección primaria por VPIh de los tipos 1, 2 y 3 pueden presentar cuadros clínicos graves, que varían desde laringotraqueítis y crup (particularmente los tipos 1 y 2) hasta bronquitis y neumonía (sobre todo con el tipo 3). En lactantes menores de 6 meses se presenta enfermedad grave vinculada 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 más 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 HAAd es positiva a los virus Parainfluenza tipos 1, 2 y 3.
- Si no se observa adhesión de los eritrocitos a la monocapa celular la HAAd 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 interactua 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 emplearán 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	TTAAGCCCTTGTCAACAAC
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	TAAATCTTGTGTGTTGAGATTG
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.