



Organización Panamericana de la Salud
Oficina Regional de la
Organización Mundial de la Salud

División de Desarrollo de Sistemas y Servicios de Salud
Programa de Medicamentos Esenciales y Tecnología
Servicios de Laboratorios y Sangre
2002

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE TECNICAS

PARA EL DIAGNOSTICO DEL DENGUE

Dr. Angel Balmaseda Hechavarría
Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia
Ministerio de Salud. Republica de Nicaragua

Colaboradores:

Lic. Maria Luisa Matute
Laboratorios Secretaría de Salud
Honduras

Lic. Patricia Lissett Mira Gómez
Laboratorio Central
El Salvador

Programa de Reconstrucción Pos-Huracanes
George y Mitch

INDICE

INTRODUCCION	3
BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO	4
ELISA DE CAPTURA DE IGM	7
DETERMINACION DE IGG (ELISA DE CAPTURA)	14
ELISA DE INHIBICION	17
HEMAGLUTINACION E INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION	21
TITULACION DEL VIRUS DEL DENGUE Y NEUTRALIZACION POR REDUCCION DE PLACAS	27
AISLAMIENTO E IDENTIFICACION VIRAL	33
REVERSO TRANSCRIPCION- REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA	39
PRODUCCION DE ANTIGENO POR METODO SACAROSA ACETONA	62
PRODUCCION DE ANTIGENO CELULAR	65
PREPARACION DE CONJUGADO ANTI DENGUE PEROXIDASA	67
Referencias bibliográficas	71

INTRODUCCIÓN

Desde comienzo de la década de los 90 el Dengue se ha convertido en uno de los mayores problemas de salud que enfrentan los países centroamericanos. Anualmente miles de personas padecen de esta enfermedad y un número significativo de ellas presentan las formas mas graves como son, la Fiebre hemorrágica del Dengue y síndrome de Shock, lo que ha llegado a ocasional hasta la muerte de estas personas.

Esta situación que cada vez se hace mas crítica si se tiene en cuenta, que en 10 años han circulado los 4 serotipos del virus del Dengue en la región y los índices de infestación se han mantenido en altos niveles y hasta se han incrementado en varios lugares.

La amenaza del Dengue no se debe, ni se puede enfrentar aisladamente en las actuales condiciones mundiales. Los países centroamericanos deben actuar conjuntamente y de manera coordinada para solucionar este problema. En el caso específico del diagnostico de laboratorio, se debe realizar una integración de la metodología que se utiliza para de esa forma mejorar la calidad de los resultados y dar respuesta oportuna ante una situación emergente. Las nuevas tecnologías deben ser adquiridas de forma rápida y en conjunto, para lo cual es necesario la capacitación constante de los recursos humanos de la región.

Esta guía de diagnostico, elaborada conjuntamente por los países del área y coordinada por el laboratorio de Virología del Centro Nacional de Diagnostico y Referencia del Ministerio de Salud de Nicaragua, tiene como principal objetivo estandarizar el diagnostico de laboratorio de Dengue, para que todos utilicemos metodologías similares y tengamos un manual que nos oriente al momento de realizar una técnica específica.

BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO

En un laboratorio donde se trabaja con microorganismos patógenos o donde se reciban muestras clínicas para realizar diagnóstico de enfermedades infecciosas la seguridad es significativamente importante. Cumplir con las normas de bioseguridad es necesario para proteger la vida de los trabajadores en un laboratorio, además de sus familiares, contactos y población en general. También propicia la realización de las técnicas de la forma más eficiente y correcta.

Cada laboratorio debe adaptar las normas y procedimientos de Bioseguridad, de acuerdo a sus condiciones. Estos procedimientos deben estar escritos y colocados en un lugar visible. El personal del laboratorio debe conocer y entender claramente todas estas normas y lo más importantes seguirlas en cada momento. Una persona del laboratorio debe ser asignada para vigilar el cumplimiento de las normas de bioseguridad y para dirigir las acciones a seguir ante situaciones de accidentes, como exposición a algún agente patógeno.

Los trabajadores del laboratorio deben conocer la forma de transmisión de los agentes con los que trabajan y los peligros de la manipulación de sustancias químicas y biológicas para evitar y disminuir cualquier posibilidad de contagio. Se debe asumir que todo con lo que se trabaja es potencialmente peligroso y mortal y que la seguridad es responsabilidad de cada persona en el laboratorio.

PRINCIPIOS PARA TRABAJAR EN UN LABORATORIO CON ESPECIMENES INFECTADOS CON VIRUS

- Limitar el acceso de personas ajenas al laboratorio.
- Descontaminar las áreas de trabajos antes y después de cada proceso técnico.
- No comer, tomar, fumar y aplicarse cosmético dentro del laboratorio. Las comidas y bebidas deben siempre estar fuera del laboratorio. La institución debe proveer lugares adecuados para estos fines.
- No pipetear con la boca
- Utilizar guantes para trabajar con todo tipo de muestras potencialmente infectada
- Utilizar batas, uniforme u otras prendas apropiadas
- No llevar las ropas de trabajo a otras áreas fuera del laboratorio
- Las jeringas y agujas deben ser descartadas en un recipiente resistente a pinchazos, el cual debe ser autoclaveado.
- Lavarse las manos después de manipular material infeccioso o animales.
- Evitar la formación de aerosoles
- El trabajo con material infeccioso debe realizarse en flujo laminar o gabinete de seguridad.
- Los derrames deben limpiarse rápidamente cubriéndolos con un pedazo de papel mojado en solución desinfectante (hipoclorito de sodio al 0.1%)
- Las centrifugas deben estar equipadas con mecanismos de seguridad para que el material infeccioso no se disemine.
- Usar respiradores o mascarar en los cuartos donde se mantienen animales inoculados.

- El personal de laboratorio debe estar vacunado (de existir la vacuna) contra los agentes que se trabajan.
- Reportar derrames o accidentes. A las personas expuestas se le debe dar un seguimiento y tratamiento preventivo si es necesario y este está disponible.
- Debe existir un manual de prácticas de seguridad en cada laboratorio, las personas deben ser adiestradas de acuerdo a este manual.
- Las puertas del laboratorio deben estar cerradas.
- Deben haber señales indicando el potencial peligro de contaminación a la entrada del laboratorio y la indicación del acceso restringido.
- El estado de salud debe chequearse periódicamente.

NIVELES DE BIOSEGURIDAD

Los laboratorios se clasifican en diferentes tipos según sus niveles de bioseguridad, esta clasificación se fundamenta en la combinación de las prácticas microbiológicas (separación de los microorganismos según su grado de peligro), las facilidades y actividades del laboratorio, el equipo de seguridad y las recomendaciones para trabajarlos diferentes microorganismos. Existen 4 niveles de bioseguridad.

Nivel 1.

Este nivel es apropiado para trabajar con microorganismos no patógenos para seres humanos sanos, como el *Bacillus subtilis*, *Naegleria gruberis* y el virus de la Hepatitis canina, entre otros. La infraestructura es la básica, se trabaja directamente en la mesa de trabajo y por lo general no hay equipos especiales.

Nivel 2

Este nivel es aplicable para el trabajo clínico, de diagnóstico y para enseñanza del más alto nivel. El riesgo individual es moderado, el riesgo comunitario es limitado, se trabaja con agentes patógenos al hombre o a los animales, pero con pocas posibilidades de provocar riesgo grave para el personal de laboratorio, la comunidad y el medio ambiente. Los peligros para el personal en este nivel es el contagio por medio de la autoinoculación accidental, ingestión y exposición a la piel y mucosa de material infeccioso. La infección en el laboratorio puede provocar una enfermedad grave, pero si se dispone de medidas eficaces de tratamiento y prevención, el riesgo es limitado. En este nivel debe haber equipo parcialmente cerrado como son las cabinas de flujo laminar clase 1 y 2. Muchos virus pueden trabajarse a este nivel. Ej. Virus de la Hepatitis A, B y C, dengue, enterovirus, virus respiratorios etc.

Nivel 3

Este nivel es aplicable para el trabajo clínico, de diagnóstico, enseñanza, investigación y producción. Se trabaja con agentes exóticos y peligrosos, la infección puede tener consecuencias graves y mortales. El personal puede contaminarse por autoinoculación accidental e ingestión. A este nivel se trabajan agentes como el *M. Tuberculosis*, el virus de la encefalitis de San Luis y *Coxiella burnetii*.

El laboratorio debe estar separado del resto del edificio, lejos del tráfico normal. La entrada debe constar de 2 puertas porque se necesita un ambiente cerrado protegido por una zona de acceso, entradas y salidas selladas. El acceso es totalmente controlado. En cada laboratorio debe haber un lavatorio para operar con el codo o pie y este debe estar colocado cerca de una puerta, las ventanas deben estar selladas y las puertas que dan acceso al laboratorio deben tener sistema de autocierre.

Debe haber un flujo de aire unidireccional y el aire que pasa por el laboratorio debe ser eliminado hacia el exterior y no recircularlo por el resto del edificio. Es necesario utilizar ropa especial para entrar a la zona de trabajo y se prohíbe usarla fuera del laboratorio. Todo el trabajo obligatoriamente debe hacerse dentro de las cabinas de flujo de aire laminar tipo 1 y 2. Además de los procedimientos de los niveles 1 y 2, las puertas deben estar cerradas todo el tiempo mientras se realiza el trabajo y las autoclaves deben estar dentro del laboratorio. En este nivel la vacunación es obligatoria y sin ella se les niega la entrada a aquellas personas que no están vacunadas.

Nivel 4

En este nivel existe un elevado riesgo individual y comunitario. Puede provocar enfermedad grave en el hombre y los animales y puede propagarse fácilmente de un individuo a otro, directa o indirectamente. Este laboratorio está reservado para agentes exóticos que ponen en peligro de muerte a las personas expuestas y que son altamente contagiosas, como el virus de Ebola, de la fiebre de Lassa. Etc.

Las personas que trabajan en este laboratorio son altamente entrenadas y experimentadas, conocen el tipo de trabajo, el manejo de los equipos de seguridad y todas las facilidades que presenta el edificio. El acceso al laboratorio es totalmente restringido y debe estar en un edificio aparte o en una área de un edificio totalmente independiente y controlado. Toda actividad o trabajo debe llevarse a cabo en las cabinas de seguridad tipo 3 o las cabinas tipo 1 y 2 siempre y cuando se utilicen trajes especiales y con presión positiva, ventilado por un sistema de soporte de vida.

ELISA DE CAPTURA DE IGM

PRINCIPIO DE LA TECNICA

Las tiras serán sensibilizadas con una Inmunoglobulina de carnero anti IgM humana, la cual reaccionara con los anticuerpos de clase IgM presentes en la muestra del paciente. Al adicionar el antígeno del virus del Dengue (VD) este reaccionara con las Inmunoglobulinas M capturadas previamente si estas son específicas para el VD. Posteriormente se adiciona el conjugado, formado por inmuglobulinas anti VD acopladas a la enzima peroxidasa del rábano. Si las reacciones previas han sido específicas el conjugado reaccionará con el antígeno del VD. Cuando se adiciona el substrato este es degradado por la enzima peroxidasa traduciéndose en un cambio de color en la reacción en las muestras positivas.

APLICACIÓN:

La detección de IgM específica contra el virus del Dengue (VD) es un método rápido, sencillo y económico, que tiene una elevada sensibilidad y especificidad, por lo que constituye el sistema de elección para la vigilancia seroepidemiológica del Dengue. Los resultados de esta técnica deben interpretarse con cuidado, porque dependen en gran medida del momento en que se tome la muestra y del tipo infección (primaria o secundaria) que presente la persona afectadas

REACTIVOS:

- Tiras microelisa fondo plano
- Inmunogliobulina de carnero anti IgM humana (SIGMA)
- Antígeno del virus del Dengue
- Suero Humano negativo a Dengue (SHN)
- Inmunoglobulina anti VD acoplada a la enzima peroxidasa del rábano.
- Tetrametil Bencidina (TMB)
- Buffer carbonato Bicarbonato (coating) pH 9.6
- Buffer fosfato salina (PBS) pH 7.4
- Tween 20
- Suero control positivo alto
- Suero control positivo bajo
- Suero control negativo
- Agua destilada
- Acido sulfúrico 2N

MATERIALES E INSTRUMENTOS NECESARIOS:

- Pipeta automática de 1- 10 ul
- Pipeta automática de 5 - 50 ul
- Pipeta automática de 50 - 200 ul
- Pipetas automática de 1 a 5 ml

- Pipeta multicanal de 50 - 200 ul
- Tubos de ensayo de vidrio de 13 x 100 mm.
- Tubos centrífuga 1.5 ml
- Gradillas
- Reloj marcador
- Incubadora a 37°C
- Lector para placas microelisa
- Lavador de placas para ELISA
- Marcadores de Punta fina y punta gruesa
- Probetas de 100 ml
- Beakers de 1000 ml
- Puntas de 1 a 200 ul
- Puntas de 200 a 1000 ul

PREPARACION DE REACTIVOS:

1. Buffer Fosfato-Salina (PBS) pH 7.4

NaCl	8.00 gr
KCl	0.20 gr
KH ₂ PO ₄	0.14 gr
Na ₂ HPO ₄	0.91 gr
Agua Destilada	1000 ml

2. Buffer Carbonato Bicarbonato (Coating) pH 9.6.

Na ₂ CO ₃	1.59 gr
Na HCO ₃	2.39 gr
Agua Destilada	1000 ml

3. IgM de carnero anti Humana (SIGMA).

- Preparar una solución de NaCl 0.15 M y adicionar 1 ml de la misma al frasco de la inmunoglobulina anti IgM humana
- Preparar una solución de agua destilada estéril y glicerol al 50%. Rehidratar con 1 ml de la solución de glicerol al 50% el vial conteniendo 1 mg de anti IgM Humana, cuando esté completamente disuelto preparar alícuotas y guardar en el freezer (Honduras).

4. Suero Humano Normal (SHN):

Obtener sueros de personas que nunca hayan padecido de Dengue adicionarles cloroformo que quede a una dilución final de 10%. Centrifugar durante 10 minutos a 2000 rpm. Extraer el sobrenadante, el cual se utiliza como SHN.

5. Sustrato Tetrametilbencidina (TMB) SIGMA. Listo para usar.

PROCEDIMIENTO

Prueba rápida (CNDR-MINSA. Nicaragua)

- 1- Las tiras de poliestireno son sensibilizadas con anti IgM humana producidas en carnero a una concentración proteica de 7.5 ug/ml. Se adicionan 100 ul/pozo.
- 2- Incubar a 50° C durante 30 minutos
- 3- Lavar 3 veces con PBS mas Tween 20 al 0.05% (PBS-T).
- 4- Adicionar las muestras de sueros y los controles negativos y positivos diluidos 1/20 en PBS-T. 50 ul/pozo. Utilizar un control positivo bajo y un control positivo alto.
- 5- Incubar 30 minutos a 37° C.
- 6- Lavar 4 veces con PBS-T.
- 7- Adicionar la mezcla de antígeno celular de los 4 serotipos de Dengue, diluidos en PBS-T mas 2.5% de SHN, a una concentración acorde con el título del lote. 50 ul/pozo.
- 8- Incubar 1 hora a 37° C.
- 9- Lavar 4 veces con PBS-T
- 10- Adicionar el conjugado diluido en PBS-T mas 2.5% de SHN, a una concentración acorde con el título del lote. 50 ul/pozo.
- 11- Incubar 30 minutos a 37° C

- 12- Lavar 5 veces con PBS-T
- 13- Adicionar 50 ul/pozo del substrato TMB, listo para usar.
- 14- Incubar de 10 a 15 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad
- 15- Detener la reacción con 50 ul/pozo de H₂SO₄.
- 16- Leer un lector de ELISA a una longitud de onda 450/630 nm.
- 17- Calcular la media de los valores de absorbancias de los controles negativos.
- 18- Validez del procedimiento: Para que la técnica sea considerada válida, se deben cumplir los siguientes criterios:
 - a. El valor de la absorbancia del control positivo bajo debe ser mayor que el valor de corte.
 - b. El valor de la absorbancia del control positivo alto debe ser 5 veces o más superior al valor de absorbancia promedio de los controles negativos.
 - c. El valor de corte es igual a la media de los valores de absorbancias de los controles negativos multiplicado por 2.
 - d. Las muestras con valores de absorbancia igual o mayor al valor de corte serán considerada positivas.

ELISA DE CAPTURA. Procedimiento de 2 días (Metodo realizado en Honduras y El Salvador y estandarizado por CDC de Atlanta. USA)

PROCEDIMIENTO

DETERMINACION IgM-DENGUE POR ELISA (2 DIAS).

1. Preparación de microplacas (fondo plano).
 - a. Lavar la placa una vez con PBS 7.2 o agua destilada.
 - b. Secar la placa golpeándola sobre una toalla.
2. Sensibilizar placa.
 - a. Añadir 100 µl (0.1 ml) de anti IgM-Humano (obtenida en carnero) diluido 1:200 con amortiguador de carbonato pH 9.6.

- b. Incubar 4 horas a temperatura ambiente ó a 4°C, hasta el momento de usarlo (guardar en cámara húmeda). Pueden guardarse por 2 ó 3 semanas.
3. Lavado de Placa.
 - a. Lavar 5 veces con PBS pH 7.2
4. Bloqueo.
 - a. Llenar los pozos hasta el borde con leche descremada al 0.5% en PBS.
 - b. Incubar por 30 minutos a 37°C.
 - c. Lavar 5 veces con PBS.
5. Muestras.
 - a. Añadir 50µl a cada pozo, de sueros desconocidos más controles positivos y negativos, diluidos 1:40 en 0.5% leche-PBS.
 - b. Incubar 2 horas a 37°C.
6. Antígeno (de cerebro de ratón o de cultivo de tejido)
 - a. Lavar 5 veces en PBS.
 - b. Añadir 50µl de antígeno diluido en leche/ PBS 0.5% PBS a cada pozo.
 - c. Incubar hasta el siguiente día a 4°C.
7. Conjugado.
 - a. Lavar 5 veces con PBS.
 - b. Añadir 25 µl a cada pozo de 6 BGC-1 anticuerpo monoclonal acoplado a la peroxidasa de rábano (HRP) diluido 1 :6000 o según título diluido en PBS mas Suero Humano Normal al 20 % ó leche-PBS al 0.5 % . Esta dilución se determina por titulación en bloque.
 - c. Incubar 1 hora 37°C.
8. Substrato.
 - a. Lavar 7 veces con PBS.
 - b. Añadir 100 µl a cada pozo de solución de substrato ABTS (2.2' - azino-di-3-thyl-benzythiazoline sulfonate. Solución A (ABTS)
Solución B (H₂O₂)

- Mezclar 1:1
 - c. Incubar 30 min. a 37°C.
9. Leer en espectrofotómetro a 405 nm.

10. Con este substrato el color es azul-verdoso.

ELISA IPK - DENGUE (CUBA)

Todos los reactivos deben retirarse de la refrigeradora para que alcancen la temperatura ambiente.

MATERIALES, REACTIVOS Y PREPARACION.

- Placas de poliestireno de 96 pocillos separables en tiras. Cuando las tiras no estén en uso guardarlas en la bolsa y mantenerlas en refrigeración.

- **Solución para Lavado (1 x 100 ml).**

Antes de utilizarlo poner en baño de María para disolver cristales. Preparar una solución 1:25 con agua destilada en un volumen de 450 ml por placa. Se utiliza para los lavados de las placas, para diluir el antígeno y conjugado.

- Controles Positivos y Negativos listos para usar.

- **Diluyente de Muestra (1 x 3 ml)**

Se prepara una dilución 1:25 con agua destilada y queda lista para utilizarla en las diluciones de las muestras (preparar según necesidad).

- **Suero Humano Negativo a Dengue (SHN)**

Se utiliza en la preparación de la solución diluyente del antígeno y el conjugado, y se prepara inmediatamente antes de usarlo.

- **Antígeno Liofilizado (6 x 2 ml).**

Antígeno inactivado de virus Dengue (vienen los 4 serotipos) se van a reconstituir los viales necesarios para el uso con 2 ml de solución de lavado conteniendo SHN al 0.5%.

3 ml Solución de lavado / SHN 0.5	0.5 _____	100
2 ml al Vial de Ag	X _____	3 ml
		= 15 µl SHN para 3 ml

S.Lavado

- **Conjugado Antidengue-peroxidasa (1 x 0.2 ml)**

Se prepara una solución de lavado al 5% con SHN.

5 _____ 100 ml 250µl de SHN + 5 ml de Soluc. Lavado
X _____ 5 ml

Para la dilución del conjugado se pone 30 µl de conjugado en 2 ml de la solución de lavado - SHN al 5%. Esto se prepara según necesidad.

• **Sustrato (OPD) Liofilizado (6 x 5 ml)**

Reconstituir cada vial al momento de su uso con 5 ml de agua destilada, esperar hasta su completa disolución y añadir 2 µl de Peróxido de Hidrógeno, homogeneizar.

TECNICA DE ANALISIS

1. Preparar un protocolo de trabajo identificando la posición de cada muestra y los controles.
2. Realizar una dilución 1:20 con el diluyente de muestras 1:25.

10µl de muestra + 190µl de diluyente.
3. Dispensar 50 µl de la dilución 1:20 y 50 µl de los controles: 2 positivos y 4 negativos **Sin diluir.**
4. Incubar 2 horas a temperatura ambiente en Cámara Húmeda.
5. Lavar la placa 5 veces con solución de lavado y secar sobre papel toalla.
6. Dispensar 50µl de antígeno preparado según las instrucciones, incubar toda la noche a 4°C en Cámara Húmeda.
7. Lavar la placa 5 veces con solución de lavado y secar sobre papel toalla.
8. Dispensar 50µl por pozo del conjugado diluido, incubar 1 hora a 37°C en cámara húmeda.
9. Lavar la placa 7 veces con solución de lavado y secar sobre papel toalla.
10. Reconstituir cada vial de sustrato con 5 ml de agua destilada + H₂O₂
11. Dispensar 100µl en cada pozo e incubar 30 minutos, pasado este tiempo detener la reacción adicionando 100µl de Acido Sulfúrico al 12.5% en el mismo sentido en que se añadió el sustrato.
12. Leer la microplaca y medir la D.O. a 492 nm ajustar el blanco contra aire.

CALCULO DE RESULTADOS.

- Calcular la media de la D.O. de los controles negativos y multiplicarlo por 2 (Valor de Corte)
- Calcular la media de la D.O. de los controles Positivos. Es válida la prueba si la media de los controles positivos es mayor o igual a 5 veces el valor de la media de los controles negativos.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS EN LA DETERMINACION DE IgM ESPECIFICA CONTRA EL VIRUS DEL DENGUE

La presencia de IgM específica contra el virus del Dengue en una de muestra de suero significa que esta persona se ha infectado recientemente con este virus. Los resultados negativos deben interpretarse cuidadosamente. Una muestra tomada antes del 7mo día de iniciados los síntomas puede resultar negativa. En este caso debe tomarse una segunda muestra o auxiliarse de otro método diagnóstico. En las infecciones secundarias o terciarias la IgM puede fallar en un porcentaje bajo, en ese caso se puede auxiliar de otros métodos serológicos que determinen fundamentalmente IgG anti virus del dengue.

CONTROL DE CALIDAD

En cada ensayo debe incluirse 3 controles negativos y 2 controles positivos, un positivo alto y un positivo bajo. Los controles negativos deben presentar valores de absorbancia inferiores a 0.2. El control positivo alto debe presentar valores de absorbancia superiores a 1.00 y el control positivo bajo debe resultar siempre con valores de absorbancia superiores al valor de corte.

Periódicamente un panel de sueros conocidos (aproximadamente de 20 muestras) debe procesarse para evaluar el comportamiento de la técnica.

Se debe participar en las pruebas de proficiencia organizadas por IPK y CDC.

**Determinación de IgG
(Elisa de Captura. CDC. Atlanta. USA)**

PROCEDIMIENTO.

1. Lavar los microplatos con PBS 7.2. Secar en papel toalla.
2. Sensibilizar todos los pozos con 100 µl de líquido ascítico Hiperinmune de ratón 1:5000 (mezcla de anti DEN 1, 2,3,4), diluido en buffer carbonato – bicarbonato pH 9.6.
3. Incubar toda la noche a 4°C.
4. Lavar 3 veces los platos con PBS 7.2.
5. Bloquear con diluyente Estándar, incubar 1 hora a 37°C.

Diluyente estándar:

PBS 7.2 -----100 ml
Tween 20----- 0.05 ml
Suero de cabro 3% ----- 3 ml

6. Lavar 3 veces.
7. Preparar el antígeno polivalente (1,2,3,4) en diluyente estándar según el título de los antígenos, agregar 75 µl de la dilución a cada pozo.
8. Incubar por 1 hora a 37°C.
9. Lavar 3 veces con PBS 7.2
10. Diluir las muestras de suero 1:40

0.5 ml de diluyente PBS 7.4/0.05 % tween 20 / leche 3%
+ 12.5 µl de suero.
11. Adicionar 100 µl de la dilución 1:40 en la primera fila (a)
12. Agregar 75 µl del diluyente en los pozos restantes
13. Con pipeta multicanal de 25 µl diluir desde la primera fila hasta la última fila
14. Incubar 1 hora a 37°C

ESQUEMA SEROLOGICO

	C(-)	(++)	(+)	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9
TITULO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
40	A	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
160	B	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
640	C	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
2560	D	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
10,240	E	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
40,960	F	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
163,840	G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
655,360	H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

15. Lavar 3 veces con PBS 7.2

16. Agregar 40 ul de conjugado preparado en PBS/ tween/ leche según título CDC 1/20000.

17. Para preparar el conjugado se diluye 1/100 con PBS/tween/ leche y después se prepara 1/200.

18. Para que quede 1/20000. Ej.

$$1/100 = 1 \text{ ul mas } 99 \text{ ul}$$

$$1/200 = 1 \text{-----} 200$$

$$\times \text{-----} 3 \text{ ml que se necesitan} =$$

15 ul de dilución 1:100 mas 3 ml de diluyente.

19. Incubar 1 hora a temperatura del cuarto.

20. Lavar el plato 7 veces con PBS

21. Agregar 100 ul de substrato ABTS a cada pozo y dejar desarrollar el color por 1 hora hasta que el control positivo alcance una DO de 0.500

22. Leer los platos a 405- 410 nm, cada dilución de suero es blanqueado contra

23. La correspondiente dilución del control negativo.

Notas.

Se debe incluir un control positivo bajo con un punto final de 4 o' 5 diluciones, y un control positivo alto que tenga un punto final de 7 o' 8 diluciones. , un control negativo que se pone en la primera fila que se usa para blanquear todo el plato

Interpretación.

Densidades ópticas > 0.15 son consideradas como positivas, el punto final de cada suero es la más alta dilución que de una reacción positiva

ELISA DE INHIBICION (Realizado en CNDR- MINSA. Estndarizado en IPK. Cuba)

PRINCIPIO DE LA TECNICA

Las placas son sensibilizadas con inmunoglobulinas humanas anti VD. Posteriormente se añade el antígeno del VD el cual reaccionara con las inmunoglobulinas fijadas en la placa. Se adicionan las muestras quienes reaccionan con el antígeno si presentan anticuerpos específicos contra el VD. Cuando se adiciona el conjugado (el mismo que se utiliza en el ELISA de Captura de IgM) este no puede reaccionar con el antígeno del VD porque los sitios antigénicos han sido ocupados por los anticuerpos presentes en la muestra. De esa forma el conjugado es eliminado con los lavados y el substrato no puede reaccionar con su enzima específica. Por lo que no se observa cambio de color en los casos positivos, por el contrario de los casos negativos donde el conjugado encontrará los sitios antigénicos libres, reaccionará con el antígeno del VD y el substrato será degradado por la enzima peroxidasa del rábano observándose un cambio de color en la reacción.

REACTIVOS:

- Placa de poliestireno de fondo plano
- Gamma globulina anti virus del Dengue
- Antígeno celular producido en CNDR
- Suero Humano negativo a Dengue (SHN)
- Conjugado producido en CNDR
- TMB
- Buffer carbonato Bicarbonato (coating) pH 9.6
- Buffer fosfato salina (PBS) pH 7.4
- Albúmina Bovina seria fracción V (BSA)
- Tween 20
- Suero control positivo
- Suero control negativo
- Agua destilada

MATERIALES E INSTRUMENTOS NECESARIOS:

- Pipeta automática de 1- 10 ul
- Pipeta automática de 5 - 50 ul
- Pipeta automática de 50 - 200 ul
- Pipetas automática de 1 a 5 ml.
- Pipeta multicanal de 50 - 200 ul
- Tubos de ensayo de vidrio de 13 x 100 mm.
- Tubos centrífuga 1.5 ml
- Gradillas
- Reloj marcador
- Incubadora a 37°C

- Lector para placas microelisa
- Marcadores de Punta fina y punta gruesa
- Probetas de 100 ml
- Beakers de 1000 ml
- Puntas de 1 a 200 ul
- Puntas de 200 a 1000 ul

PREPARACION DE REACTIVOS:

1. PBS pH 7.4

NaCl	8.00 gr
KCl	0.20 gr
KH ₂ PO ₄	0.14 gr
Na ₂ HPO ₄	0.91 gr
Agua Destilada	1000 ml

2. Buffer Coating pH 9.6.

Na ₂ CO ₃	1.59 gr
Na HCO ₃	2.39 gr
Agua Destilada	1000 ml

3. Gamma globulina anti virus del Dengue. (Ver obtención de la inmunoglobulina anti virus del Dengue)

Preparar una solución

Suero Humano Normal (SHN). (Ver ELISA de captura de IgM)

4. Sustrato Tetrametilbencidina (TMB) SIGMA. Listo para usar.

PROCEDIMIENTO

1. Placas de poliestireno de 96 pozos son sensibilizadas con 100 ul/pozo de inmunoglobulina humana anti VD a una concentración proteica de 10 ug/ml.
2. Incubar toda la noche a 4° C.
3. Lavar 3 veces con PBS-T.
4. Bloquear con 150 ul/pozo de BSA al 1% en PBS-T.
5. Incubar a 37° C durante 30 minutos
6. Adicionar 100 ul/pozo de la mezcla de antígeno celular diluida en PBS-T según título
7. Incubar a 37° C durante 1 hora.
8. Lavar 3 v3ces con PBS-T

9. Adicionar las muestras diluidas desde 1/20 hasta 1/20480 en PBS-T mas 0.5% de BSA. 100 ul/pozo. Adicionar el control negativo diluido 1/20 en 4 pozos y el control positivo diluido 1/5120 en 4 pozos.
10. Incubar a 37° C durante 1 hora.
11. Lavar 3 veces con PBS-T
12. Adicionar 100 ul/pozo del conjugado diluido en PBS-T mas 2.5% de SHN, según título.
13. Incubar a 37° C durante 1 hora.
14. Lavar 4 veces con PBS-T
15. Adicionar 50 ul/pozo de TMB.
16. Incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
17. Detener la reacción con 100ul de ácido sulfúrico 2N
18. Leer un lector de ELISA a una longitud de onda 450/630 nm.
19. Calcular la media de los valores de absorbancia de los controles negativos (MCN).
20. Calcular el valor de corte: MCN X 0.5.
21. Validez de la técnica:
 - a. La MCN debe ser igual o mayor a 0.8
 - b. El control positivo debe presentar valores de absorbancia inferior al valor de corte.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

El título de una muestra es la última dilución con valores de absorbancia inferiores al valor de corte.

Un paciente que presente títulos de anticuerpos por ELISA de Inhibición igual o mayor que 2560 se considera un caso probable de Dengue.

Un paciente con una muestra tomada en período convaleciente (7 o mas días después de iniciado los síntomas) y con un título igual o mayor a 5120 se considera como un caso secundario de Dengue.

RELACIÓN ENTRE TÍTULOS 1 ^{ER} Y 2 ^{DO} SUERO	INTERVALO 1 ^{ER} Y 2 ^{DO} SUERO	TÍTULO SUERO CONVALECIENTE	INTERPRETACIÓN
>= 4	>= 7 días	<=1/2560	Infección comprobada primaria
>= 4	>= 7 días	>= 1/5120	Infección comprobada secundaria
>= 4	< 7 días	<=1/2560	Infección comprobada secundaria o primaria
Sin cambio	>= 7 días	>= 1/5120	Presunta infección secundaria
Sin cambio	>= 7 días	< 1/2560	No dengue
Sin cambio	< 7 días	<= 1/2560	Sin interpretación
	Solo una muestra	< 1/2560 = 1/2560	Sin interpretación Caso probable

CONTROL DE CALIDAD DE LA TECNICA

En cada ensayo se incluirán 4 controles negativos o un control negativo cuadruplicado. La MCN debe ser igual o mayor a 0.8

Se incluirá un control positivo con un título de 10480, este control se añadirá en un dilución de 5120. Siempre debe resultar positivo de lo contrario la técnica no es válida.

Periódicamente un panel de sueros conocidos (aproximadamente de 8 muestras) debe procesarse para evaluar el comportamiento de la técnica.

Se debe participar en las pruebas de proficiencia organizadas por IPK y CDC.

HEMAGLUTINACION E INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION (Método de Clark y. Casals, Tomado del manual de procedimientos del IPK. Cuba)

PRINCIPIO DE LA TECNICA

Algunos virus poseen proteínas en sus superficies capaces de aglutinar a eritrocitos de ciertas especies.

El virus del Dengue aglutina a eritrocitos de ganso y humanos del grupo O. Producto de la infección del VD se forman anticuerpos que se unen al virus e inhiben la hemaglutinación

REACTIVOS

- Solución de Alsever
- Glóbulos rojos de gansos adultos machos y de color blanco. Los gansos serán sangrados cada 6 semanas. Las hembras no se utilizan ya que los cambios en el ciclo hormonal pueden variar los títulos hemaglutinantes. La experiencia del CNDR con gansos grises no ha sido satisfactoria.
- Cloruro de Sodio 1.5 M
- Fosfato dibásico de sodio ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) 0.5M
- Fosfato monobásico de sodio ($\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 1M
- Acido Bórico 0.5 M
- Solución Borato Salina pH9
- BSA al 4% en buffer Borato Salina (BABS), pH 9.
- Kaolín (lavado en ácido) al 25% en buffer borato salina.
- Antígenos (preparados por el método sacarosa acetona y comprados al IPK)

EQUIPOS y MATERIALES

- Centrífuga refrigerada
- Placas de Poliestireno de fondo en U
- Pipeta automática de 1- 10 u
- Pipeta automática de 5 - 50 ul
- Pipeta automática de 50 - 200 ul
- Pipetas automática de 1 a 5ml.
- Pipeta multicanal de 50 - 200 ul
- Pipetas Serológicas de 1, 5 y 10 ml
- Pipet Aid
- Tubos de ensayo de vidrio de 13 x 100 mm.
- Tubos centrífuga 1.5 ml
- Gradillas
- Reloj marcador
- Incubadora a 37°C
- Lector para placas microelisa
- Marcadores de Punta fina y punta gruesa
- Probetas de 100 ml
- Beakers de 1000 ml

- Puntas de 1 a 200 ul
- Puntas de 200 a 1000 ul

PREPARACION DE REACTIVOS

- Solución de Alsever

Dextrosa	20.5 g
NaCl.....	4.2 g
Acido Cítrico($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$).....	0.55 g
Citrato de Sodio ($Na_3C_6H_5O_7$).....	8.0 g
Agua Destilada a completar	1000 ml.

Esterilizar en autoclave durante 10 minutos a 10 libras de presión

- Soluciones stocks

NaCl (1.5 M)	87.6g en 1000 ml de agua destilada
NaH ₂ PO ₄ (1M)	156.02g en 1000 ml de agua destilada
Na ₂ HPO ₄ . 12 H ₂ O (0.5 M).....	178.0g en 1000 ml de agua destilada

- Solución A (pH 8.8)

Na Cl (1.5 M)	100 ml
Na ₂ HPO ₄ (0.5 M)	400 ml
Agua destilada a completar	1000 ml

- Solución B (pH 4.3)

NaCl (1.5 M)	100 ml
NaH ₂ PO ₄ (1.0 M)	200 ml
Agua destilada completar.....	1000 ml

Tabla de valores de pH (diluyentes de ajustes para los diferentes de pH con los que se diluyen los glóbulos de ganso).

PH	SOLUCIÓN A	SOLUCIÓN B
5.75	3.95 ml	97 ml
6.0	12.5 ml	87.5 ml
6.2	22 ml	78 ml
6.4	32 ml	68 ml
6.6	45 ml	55 ml
6.8	55 ml	45 ml
7.0	64 ml	36 ml
7.2	72 ml	28 ml
7.4	79 ml	21 ml

Nota: El pH final se obtiene mezclando volúmenes iguales de buffer borato salina pH 9 con cada una de las soluciones. El pH se ajusta con las soluciones A y B. Las soluciones pueden almacenarse a 4° C a excepción de las que presentan pH superiores a 6.8 porque cristalizan.

Soluciones stock para buffer borato salina pH 9

NaOH (1.0 M) 40.02g. completar a 1000 ml con agua

BO₃H₃ (0.5 M)30.912g completar a 1000 ml de agua

NaCl (1.5 ml) 87.6g completar a 1000 ml de agua

Buffer borato salina

NaCl (1. 5 M)..... 80 ml

BO₃H₃ (0.5M) 100 ml

NaOH (1.0 M) 24 ml

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

Albúmina bovina al 0.4%

- Albúmina bovina0.8g

- Buffer borato salina ph9 200 ml

Ajustar el pH a 9 (con NaOH 2N). Puede prepararse una solución al 4% en cantidad de 100 ml y filtrar por millipore (se pueden utilizar membrana de 0.22 o 0.45 um) la que puede guardarse en frío hasta su uso, cuando debe diluirse 10

veces en buffer borato salina pH 9. Una vez preparada debe utilizarse en una semana y guardarse a 4° C.

La albúmina bovina al 0.4% se utiliza para las diluciones de los antígenos y sueros.

PROCEDIMIENTO

Preparación de los glóbulos rojos de ganso

1. Extraer la sangre de forma estéril (1 parte de sangre y 4 de alsever). Utilizar aguja #20. Filtrar por gasa estéril.
2. Lavar las células 3 veces con solución salina o PBS. Centrifugar primeramente en un tubo de fondo redondo para separar el alsever y posteriormente en un tubo de fondo cónico para lavar las células siempre a 1000 rpm por 10 minutos a 4° C.
3. Almacenar a 4° C hasta su uso.
4. Para la técnica preparar una solución al 0.5% en los buffers de diferentes pH previamente ajustados.

Tratamiento de los sueros con Kaolín.

El kaolín se utiliza para eliminar los inhibidores inespecíficos de la hemaglutinación. Pueden existir lotes de kaolín que no ofrezcan resultados satisfactorios.

1. Tomar 0.1 ml de suero y adicionarle 0.4 ml de buffer borato salina pH 9 (dilución 1:5).
2. Adicionar 0.5 ml de Caolín al suero y agitar.
3. Mantener a temperatura ambiente durante 20 minutos agitándolo ocasionalmente.
4. Centrifugar a 2500 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente.
5. El suero queda diluido 1/10
6. Para eliminar las aglutininas inespecíficas se absorben los sueros tratados con glóbulos rojos de ganso:
7. Preparar una suspensión de glóbulos rojos de ganso al 50% en solución salina.
8. Adicional 0.025 ml de la solución anterior al suero tratado y agitar.
9. Mantener a 4° C durante 20 minutos con agitación ocasional
10. Centrifugar a 1500 rpm 10 minutos a 4° C.
11. Guardar en frío (si se transfiere a otro tubo puede mantenerse por varios días a 4° C sin pérdida apreciable del título de anticuerpo). No deben almacenarse por tiempo indefinido ya que los títulos no son estables y las aglutininas específicas pueden reaparecer.

Hemaglutinación

1. Hidratar los antígenos liofilizados y mantenerlos a 4° C por al menos 1 hora, pero preferiblemente toda la noche.
2. Rotular bien la placa para cada pH que se va a probar
3. Añadir 0.025 ml de BABS a cada pozuelo de la placa de fondo en U.
4. Adicionar 0.025 ml de Antígeno en el primer pozo

5. Hacer diluciones seriadas al doble.
6. Agitar la placa
7. Adicionar 0.025 de glóbulos rojos al 0.5% preparados en cada uno de los diferentes pH.
8. Agitar y mantener en reposo la placa durante 30-40 minutos a temperatura ambiente.
9. Determinar el título hemaglutinante de cada pH. El pH óptimo es aquel que presente mayor título hemaglutinante. Para la IHA se utiliza una dilución del antígeno que contenga de 4 a 8 unidades hemaglutinante

Ejemplo si el título hemaglutinante es de 1280:

1280 ----- 1 unidad
 640 ----- 2 unidades
 320 ----- 4 unidades
 160 ----- 8 unidades

Patrón de Hemaglutinación:

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

INHIBICION DE LA HEMAGLUTINACION

1. Rotular las placas con el número de los sueros a probar y el antígeno a utilizar. Los sueros son probados utilizando diluciones desde 1/10 hasta 20480.
2. Añadir 0.025 ml de BABS a cada pozuelo
3. Adicionar 0.025 ml del suero a titular en el primer pozo de cada columna.
4. Realizar las diluciones de los sueros
5. Añadir a cada pozo 0.025ml de las 8 uds del antígeno.
6. Agitar y mantener en reposo a temperatura ambiente durante 45 minutos.
7. Adicionar 0.05 ml de glóbulos rojos diluidos al 0.5% en el pH óptimo.
8. Agitar y dejar reposar a temperatura ambiente. Durante 30 minutos.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

El título de un suero es considerado como la última dilución donde se inhibe la Hemaglutinación.

Un paciente que presente títulos de anticuerpos por IHA igual o mayor que 1280 se considera un caso probable de Dengue.

Un caso de Dengue con una muestra tomada en período convaleciente (7 o más días después de iniciado los síntomas) y con un título igual o mayor a 2560 se considera como un caso secundario de Dengue.

Un caso de Dengue que se encuentre en los 5 primeros días de la enfermedad y presente algún título de anticuerpo se considera como un caso secundario de Dengue.

RELACIÓN ENTRE TÍTULOS 1 ^{ER} Y 2 ^{DO} SUERO	INTERVALO 1 ^{ER} Y 2 ^{DO} SUERO	TÍTULO SUERO CONVALECIENTE	INTERPRETACIÓN
≥ 4	≥ 7 días	$\leq 1/1280$	Infección comprobada primaria
≥ 4	≥ 7 días	$\geq 1/2560$	Infección comprobada secundaria
≥ 4	< 7 días	$\leq 1/1280$	Infección comprobada secundaria o primaria
Sin cambio	≥ 7 días	$\geq 1/2560$	Presunta infección secundaria
Sin cambio	≥ 7 días	$< 1/1280$	No dengue
Sin cambio	< 7 días	$\leq 1/1280$	Sin interpretación
	Solo una muestra	$< 1/1280$ $= 1/1280$	Sin interpretación Caso probable

CONTROL DE CALIDAD

En cada ensayo se debe utilizar:

- Control de glóbulos rojos de ganso: Sólo contiene BABS y glóbulos rojos. Permite detectar aglutinación inespecífica
- Control de sueros positivo
- Control de suero negativo
- Control de célula para cada suero: Contiene una dilución baja de suero (1:10 ó 1:20) y glóbulos rojos de ganso. Permite detectar aglutinación inespecífica
- Control de las unidades hemaglutinante del antígeno.

TITULACION DEL VIRUS DEL DENGUE Y NEUTRALIZACION POR REDUCCION DE PLACAS (Morens et al. Tomado del Manual de Procedimientos del IPK. Cuba)

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

La utilización de células BHK 21 en la técnica de placas (micrométodo) ha brindado resultados satisfactorios y rápidos. La misma es útil, no solo para la identificación viral, sino también para la detección de anticuerpos contra el virus del dengue. Esta línea celular fue obtenida en 1963 a partir de una mezcla de riñones de hámster sirios recién nacidos. La misma ha mostrado ser útil para la multiplicación del virus de la rabia, adenovirus y numerosos arbovirus entre otros.

Título del Dengue por micrométodo

Medios y Soluciones

1. Medio Hank + 0.5% STF + Antibióticos
2. Solución salina tamponada con fosfato (PBS) pH 7.95
3. Solución de tripsina al 0.25% pH 7.4 – 7.6
4. Solución de versene al 0.02% pH 7.4 – 7.6
5. Medio de crecimiento de las células BHK21 (clono15)

- MEM con glutamina 2mM y aminoácidos esenciales	90 ML
- - Suero Fetal Bovino (STF)	10 ml
- Antibióticos	0.2 ml

-

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

6. Medio Overlay

STF	10 ML
Lglutamina	1 ml
2x MEM (MBA) sin Rojo Fenol	100 ml
Carboximetil celulosa 3% estéril	50 ml
Antibióticos	0.2 ml

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

La CMC SIGMA # C-4888, viscosidad media, se prepara al 3% Ej: A 50 ml de agua bidestilada se añaden 1.5 g de CMC dejándose disolver a 4° C durante 1 ó 2 días

7. Colorante Nafthol Blue Black (NBB)

Nafthol Blue Black	1G
Acetato de Sodio	13.6 g
Acido acético glacial	60 ml
H ₂ O a completar	1000 ml

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

Materiales y Equipos

1. Tubos de dilución (13 x 100) o placas de 96 pocillos.
2. Pipetas de cristal.
3. Placas de 24 pozuelos.
4. Puntas amarillas estériles.
5. Pipetas Eppendorf de 1000,200,100,50, y 20 ul .
6. Incubadora de Dióxido de carbono.

Siembra de células BHK21 Clono 15

1. Frasco de 150 cm² de monocapa completa (5 – 7 días).
2. Decantar el medio.
3. Lavar las células con PBS (10 ml).
4. Añadir 10 ml de tripsina-Versene (1:1). Dejar a temperatura ambiente por 3 minutos. Eliminar el medio e incubar de 5 a 10 minutos a 37° C (el desprendimiento se hará evidente)
5. Añadir 9 ml de medio de crecimiento. Resuspender las células pipeteando vigorosamente (10 a 15 veces).
6. Comprobar que la monocapa se desprendió completamente
7. Distribuir 3 ml de células por cada frasco de 150 cm³ (de cada frasco se obtienen 3 similares, split 1:3 semanal).
8. Completar el volumen de cada frasco a 100 – 120 ml de medio de crecimiento
9. Incubar a 37° C por 5 a 7 días. Aproximadamente a los 4 ó 5 días la monocapa será confluyente y las células crecerán de forma organizada en remolino.

Preparación de las células para la titulación del virus

1. Calcular el número de células necesarias para la prueba (2.5 x 10⁵ células/ml x 0.5 ml/pozuelo x 24 pozuelos x placas). Hacer una cantidad extra (aproximadamente de un frasco de 75 cm², se obtienen 3 – 6 x 10 células). Un frasco de 75 cm² de monocapa confluyente (4 – 5 días) es suficiente para 10 placas.
2. Decantar el medio y lavar con PBS
3. Añadir 4 ml de tripsina- versene y realizar el desprendimiento como se describió anteriormente.
4. Desprender las células en 5 ml de medio de crecimiento.
5. Añadir toda la suspensión celular a un frasco de 200 ml de boca ancha que contenga 120 ml de medio de crecimiento. Este volumen es suficiente para 10 placas a razón de 0.5 ml/pozo.

Congelación de las células BHK21

1. De un frasco de 150 cm² con monocapa casi confluyente (3 – 4 días) desprender las células como se describió anteriormente
2. Colocar la suspensión celular en tubos de centrifuga y centrifugar 3 – 5 minutos a temperatura ambiente a 1000 rpm.
3. Decantar el sobrenadante y resuspender las células en 5 ml de medio MEM + glutamina + aminoácidos no esenciales +1 ml de STF. Colocar en un frasco rotulado con el # 1 que previamente debió estar en baño de hielo.
4. Preparar otro frasco que contenga 4 ml del mismo medio (sin STF) pero añadiendo 1 ml de dimetilsulfoxido. Colocarlo sobre el baño de hielo . Rotular con el # 2. Comprobar que ambos frascos tienen bien mezcladas sus soluciones.
5. Con una pipeta de 5 ml tomar medio del frasco # 2 y añadir lentamente, gota a gota y agitando, el contenido del frasco # 2 en el # 1. Siempre en baño de hielo.
6. Distribuir 1 ml de la suspensión (aproximadamente 1 x 10⁶ células / ml) por ampulas (siempre en frío). Dejar 0.1 ml para la prueba de esterilidad.
7. Guardar durante 1 hora a – 20° C.
8. Colocar las ampulas en una caja de poliespuma y guardar a – 70° C por 24h. Pasarlas después a nitrógeno líquido.

Descongelación de células BHK21

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

Titulación del virus del Dengue en células BHK21

1. Preparar un grupo de tubos marcado desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁷, dependiendo del título viral sospechado.
2. Pipetear asépticamente 0.9 ml de diluyente (medio Hank + 0.5% de STF) en cada uno de los tubos. Mantener en hielo.
3. Descongelar rápidamente un vial del virus (preferiblemente a 37° C). Transferir 0.1ml del virus al primer tubo con diluyente, eliminar la pipeta.
4. Mezclar vigorosamente en el agitador.
5. Transferir con una pipeta nueva 0.1ml de la dilución de virus 10⁻¹ al siguiente tubo y así sucesivamente.
6. Añadir 0.5 ml de la suspensión celular en cada pozuelo de la placa de 24 y dejarlas en reposo 1 hora a temperatura ambiente.
7. Marcar las placas, se toman 3 pozuelos por cada dilución de virus como mínimo
8. Dejar las diluciones virales por 1 hora a 37° C.
9. Inocular 50 ul de cada dilución viral a las células
10. Incubar por 4 horas a 37° C, en incubadora de CO₂, al 5%.

11. Añadir 0.5 ml de medio con CMC. El medio debe tener un pH de 8 – 8.5 para D1,3 y 4. Para D2 puede encontrarse entre 7 – 8.5.
12. Incubar a 37° C por 8 días para D4, 5 días para D2 y 9 días para D1 y D3, en incubadora de CO₂ al 5%.
13. Descartar el medio. Lavar suavemente con agua corriente. Teñir las células con NBB (0.5ml por pozuelo). Después de 30 minutos lavar con agua de nuevo. Las placas pueden ser contadas inmediatamente o cuando se sequen.

Neutralización por reducción del número de placas

1. Preparar las diluciones de los sueros en estudio, usando como diluyente Hank + 2% de SBF. Estas diluciones pueden ser preparadas previamente y mantenidas a 4° C hasta una semana como máximo.
2. Preparar una dilución de trabajo del virus que contenga aproximadamente de 15 a 20 ufp/50 ul. Se prepara una dilución previa de 40 ufp/ 50ul que al ser mezclada con igual volumen, tendrá 20 ufp/50 ul.
3. Calcular el volumen de virus necesario de la dilución de trabajo multiplicando por 100 ul, el número de sueros en estudios mas el número de controles.
4. Realizar las mezclas de virus – sueros en placas de 96 pozos. Cada pozo contendrá la cantidad suficiente de mezcla virus – suero para inocular 3 pozos de la placa de 24 pozos. Incluir en esta última placa 2 pozos como mínimo para el virus control y 2 pozos con una dilución del control de virus 1:10 y 2 pozuelo con una dilución de virus 1:100. Colocar la placa sobre hielo.
5. Añadir 100 ul de trabajo del virus y a los pozos controles de la siguiente forma:

CONTROL DE VIRUS	100 UL DE LA DILUCIÓN DE VIRUS
A la 1:10	100 ul de la dilución 1: 10
A la 1: 100	100 ul de la dilución 1: 100
Al control de células	100 ul de Hanks

6. Marcar las placas de 24 pozos y añadir 0.5 ml de la suspensión de células BHK21
7. Mantener las células en reposo durante 1 hora a temperatura ambiente.
8. Inocular 50 ul de la mezcla virus suero a cada pozo (por triplicado).
9. Incubar 4 horas a 37° C en atmósfera de 5% de CO₂
10. Añadir a cada pozo 0.5ml de medio overlay.
11. Incubar a 37° en CO₂ por 8 días para D4, 5 días para D2 y 9 días para D1 y 3
12. Teñir la placa de la misma forma que se describió en el tópico de titulación viral

Lectura de placas

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

$$P \times 20 \times 10^x = \text{ufp/ml}$$

Donde :

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

20 es el factor de corrección para expresar el título en ufp/ml (1000ul/vol inoc)

10x: representa la dilución en que se contaron las placas (factor de dilución)

Ejemplo:

Dilución	No de placas			Promedio
10 ⁻¹	NC	NC	NC	NC
10 ⁻²	15	19	17	NC
10 ⁻³	4	3	2	3
10 ⁻⁴	0	0	0	0

$$\text{Título: } 3 \times 20 \times 10^3 = 6 \times 10^4 \text{ ufp/ml}$$

Cálculo de la dilución de trabajo de virus a utilizar

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

Cálculo del punto final del 50% de reducción de placas

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

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

	NO DE PLACAS			PROMEDIO
Virus control	20	20	20	20
Virus + suero	6	4	5	5

$$5/20 = 25\% \quad 100\% - 25\% = 75\%$$

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

1. El suero se prueba a una dilución específica frente a una dilución constante de virus. En este caso se obtiene el % de reducción de placas para la

dilución de suero utilizada, lo cual indicaría si el suero tiene o no anticuerpos(% de reducción) Cuando este % de reducción es ≥ 50 se considera que el suero es positivo (presencia de Acs)

2. El suero se prueba en varias diluciones frente a una concentración constante de virus, esto nos permite conocer el título de anticuerpos del suero. Para cada dilución de suero se halla el % de reducción del número de placas. Estos datos se llevan a un papel semilogarítmico, para hallar la dilución que reduce en 50% el número de placas, la cual representa el título del suero. Este método también es utilizada para identificar virus, pues se pone un virus aislado a una concentración constante previamente definida frente a diluciones de un suero hiperinmune conocido.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION VIRAL (Tomado del Manual de Procedimiento del IPK. Cuba y Método que se realiza en CNDR- MINSA. Nicaragua)

I. MULTIPLICACION DE CELULAS C636

1. EQUIPOS

- a. Incubadoras de 28° C
- b. Flujo Laminar
- c. Pipet aids

2. MATERIALES

- a. Policías de hules estériles
- b. Pipetas serológicas de 1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml.
- c. Beakers
- d. Frascos de cultivos de 25 cm².
- e. Marcador permanente
- f. Guantes

3. REACTIVOS

- a. Medio MEM con Suero Bovino Fetal (SBF) al 10% o medio L15 con SBF al 10%. (Medio de crecimiento).
- b. Alcohol al 70%
- c. Cloro al 10%

4. PROCEDIMIENTO

1. Llevar el medio a temperatura ambiente.
2. Preparar el flujo laminar limpiándolo con cloro al 10% y etanol al 70%
3. Preparar los materiales a utilizar
 - Pipetas estériles
 - Pipet aids
 - Mechero
 - Beaker con cloro diluido al 10%
 - Frascos de cultivo de células de 25 cm²
 - Marcador permanente
 - Policías de hule estériles
4. Descartar el medio viejo en el beaker con cloro al 10%
5. Agregar 4 ml de medio a los nuevos frascos y también al frasco que contiene las células (Split 1/5).
6. Desprender las células con un policía de goma. Colocar el policía utilizado en el beaker con cloro.
7. Mezclar las células en el medio nuevo, utilizando una pipeta serológica.

8. Añadir 1 ml de las células desprendidas a los frascos nuevos.
9. Incubar los frascos en una incubadora de 28° C.

II. CONGELACION DE CELULAS C636

1. Adicionar 4 ml de medio de crecimiento y 1 ml de SBF en un frasco de 10 ml rotulado como No 1. Colocarlo en un baño de hielo.
2. Adicionar 4 ml de medio de crecimiento y 1 ml de dimetilsulfoxido en otro frasco rotulado como No 2. Colocarlo en un baño de hielo.
3. Decantar el medio de un frasco de 150 cm² con células C636 (monocapa confluyente)
4. Extraer los 5 ml del frasco No 1 y añadirlo al frasco con células.
5. Desprender las células y adicionar la suspensión celular en el frasco No1.
6. Adicionar con una pipeta de 5 ml el medio del frasco No 2 al frasco No 1. Añadirlo gota a gota y agitando, siempre en baño de hielo.
7. Colocar 1 ml de la suspensión celular en los tubos de congelación y mantenerlos en el baño de hielo. Dejar 0.1 ml para prueba de esterilidad.
8. Guardar los tubos de congelación a -20° C durante 1 hora
9. Guardar los tubos de congelación a -70° C durante toda la noche.
10. Pasar los tubos de congelación a nitrógeno liquido.

III. DESCONGELACION

1. Sacar el tubo de congelación del nitrógeno liquido y pasarlo directamente a un recipiente con agua a 37° C. Hasta que se descongele su contenido.
2. Extraer el contenido del tubo con una pipeta de 1 ml y adicionarlo a un frasco de 25 cm² que contenga 4.9 ml de medio de crecimiento. Incubar a 28° C.
3. Cambiar el medio de crecimiento a las 24 horas por medio de crecimiento fresco.
4. Cuando la monocapa este confluyente pasar las células en un split de 1/5.

IV. AISLAMIENTO VIRAL

1. EQUIPOS

- Incubadora de 28° C.
- Gabinete de seguridad
- Mechero
- Pipet aids
- Pipetas automáticas de 20 a 200 ul

2. MATERIALES

- Frascos de 25 cm² con monocapa celular confluyente.
- Pipetas serológicas estériles de 1 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml.
- Marcador permanente
- Tubos de microcentrífugas de 1.5 ml estériles

- Toallas de papel
- Guantes
- Hielera

3. REACTIVOS

- Medio MEN con SBF al 2% ó L15 con 2% de SBF (medio de mantenimiento)
- Cloro diluido 1/10.
- Etanol al 70%

4. PROCEDIMIENTO

- a. Descongelar las muestras que se van a utilizar, mantenerla sobre hielo.
- b. Preparar el gabinete de seguridad limpiándolo con cloro al 10% y etanol al 70%.
- c. Preparar todo lo que se va a utilizar
 - Medio de mantenimiento
 - Frasco de 25 cm² con monocapa celular confluyente
 - Tubos de microcentrifuga 1.5 ml
 - Pipetas estériles
 - Pipet aids
 - Mechero
 - Beaker con cloro diluido al 10%
 - Marcador permanente
 - Toallas de papel
- d. Rotular los frascos de 25 cm² con el código de la muestra a inocular
- e. Diluir 20 ul del suero a inocular en 180 ml de medio de mantenimiento
- f. Descartar el medio del frasco de cultivo en el beaker con cloro al 10%.
- g. Agregar lentamente los 200 ul del inóculo sobre la superficie de la monocapa celular
- h. Incubar el frasco inoculado a 28° C durante 1 hora.
- i. Adicionar 5 ml de medio de mantenimiento
- j. Incubar a 28° C durante 7 días. Revisar diariamente los frascos.

Nota: Algunos sueros pueden dar efecto tóxico, causando desprendimiento celular a las 24 horas de inoculados, en estos casos se toma 1 ml de medio del frasco y se inoculara en un frasco nuevo.

V. IDENTIFICACION VIRAL POR INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)

1. EQUIPOS

- Gabinete de seguridad
- Microcentrífuga
- Pipetas automáticas 20 a 1000 ul
- Incubadora de 37° C
- Congelador de -20° C o -70° C.

2. MATERIALES

- Láminas para IFI
- Vasos Koplín
- Puntas de 1 a 200 ul estériles
- Puntas de 200 a 1000 ul estériles
- Tubos de 1.5 ml estériles
- Beaker con cloro al 10%
- Marcadores permanentes
- Lápices
- Cajas para guardar laminas
- Policía de hule estéril
- Guantes
- Toallas de papel

3. REACTIVOS

- PBS
- Acetona a 20° C
- Polilisina diluida al 0.005% en agua bidestilada (opcional)

a. Tratamiento con poli lisina de las laminas para IFI (opcional)

- Sumergir las laminas en una solución de poli lisina al 0.005% durante 20 minutos.
- Lavas las laminas una vez con agua destilada y dejarla secar sobre papel absorbente.
- Almacenar las laminas a - 20° C hasta su uso.
-

A. FIJACION DE LAS CELULAS INFECTADAS

- Descartar el medio de cultivo del frasco inoculado
- Desprender las células del frasco con un policía o con un golpe en el fondo del frasco.
- Resuspender las células en 3 ml de PBS y se trasladan a un tubo centrifuga
- Centrifugar a 1000 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Descartar el sobrenadante y resuspender el precipitado nuevamente en 3 ml de PBS. De esta forma las células se lavan 3 veces con PBS.

- Después de la última centrifugación, eliminar el sobrenadante y resuspender las células en 1 ml de PBS.
- Adicionar 12 a 15 ul de la suspensión celular a cada pozo de la lámina de fluorescencia.
- Secar a temperatura ambiente
- Poner las láminas en un vaso koplín y adicionar acetona fría (-20° C).
- Dejar con acetona durante 15 minutos
- Eliminar la acetona
- Conservar las láminas a -20° C o -70° C hasta su uso

A. IFI

- Descongelar las láminas de fluorescencia. Dejarlas secar bien.
- Diluir los anticuerpos monoclonales según el título que posean
- Adicionar de 12 a 15 ul de los anticuerpos monoclonales
- Incubar las láminas 30 minutos a 37° C.
- Colocar las láminas en un vaso koplín añadir PBS de tal manera que cubra toda la lamina, esperar 15 segundos y descartar el PBS. Realizar dos lavados mas con PBS
- Dejar sacar las láminas
- Agregar de 12 a 15 ul del conjugado (Inmunoglobulina anti ratón con fluoresceína), diluido según título, en una dilución de azul de Evans 1/20000.
- Incubar 30 minutos a 37° C.
- Lavar 3 veces con PBS
- Dejar secar las laminas
- Agregar 3 gotas de glicerina buferada sobre la lámina y cubrirla con un portaobjeto sin hacer burbuja
- Observar las laminas en un Microscopio de Fluorescencia.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

- a. Las células fluorescentes se observarán cuando haya una reacción con el monoclonar específico. Ejemplo: Si el virus aislado es el D2 solo se observará fluorescencia en los pozos donde se añadió el monoclonal anti D2.
- b. Un aislamiento positivo confirma un caso de Dengue.

Nota: la fluorescencia es citoplasmática

PROCEDIMIENTO PARA IFA DIRECTA (Realizado en Honduras. Tomado del CDC Atlanta. USA)

1. Sacar los tubos inoculados a los 14 días de incubación
2. Mezclar las células con agitación
3. Centrifugar los tubos a 15000 X 5 minutos

4. Descartar el sobrenadante en Beaker con cloro
5. Mezclar nuevamente el sedimento de las células y hacer Spots en laminas para inmunofluorescencia.
6. Secar en Flujo laminar
7. Poner en acetona fría X 5 minutos
8. Secar
9. Poner 15 ul de la dilución 1:100 del conjugado para IFA Directa (CDC) 198 ul PBS mas 2 ul de conjugado , o según necesidad.
10. Poner en cámara húmeda a 37 grados x 30 minutos
11. Sacar las laminas de la incubadora y descartar en una toalla de papel el exceso de conjugado.
12. Poner en PBS a T.A X 10 minutos, agitando suavemente.
13. Remover el exceso de PBS en toalla de papel y agregar azul de Evans 1:20000 a cada lámina agitando suavemente y descartar .
14. Dejar secar y agregar 1 gota de Glycerol -/PBS en cada pozo y cubrir con laminilla cuidando que no quede con exceso de Glycerol.

Interpretación.

--- Ninguna célula fluoresce -----Negativo

40 % células Fluoresce-----Positivo +

40% células fluoresce----- Positivo ++

Los cultivos que dieron positivos en la IFA directa se espotean nuevamente en laminas , 1 lamina por cada cultivo positivo dejar secar y fijar en acetona fría x 5 minutos secar y guardar a – 70 grados si no se usan en el momento, El resto de suspensión de células que queda en el tubo se le agrega suero fetal bovino en relación de 1;2 y se almacena a – 70 grados para ocuparlo posteriormente para realizar cosecha de virus o como control de extracción positivo en PCR.

REVERSO TRANSCRIPCION - REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT – PCR)

El PCR es un método "*in vitro*" que usa la síntesis enzimática para replicar selectivamente una región diana dentro de un DNA de doble cadena, de forma similar la amplificación de RNA puede ser hecha proporcionando una copia de DNA complementario (DNAc) que haya sido previamente sintetizada por reverso transcriptasa.

El principio fundamental de PCR es la Amplificación de un fragmento específico de DNA por medio de ciclos sucesivos de multiplicación exponencial hasta llegar a obtener una cantidad adecuada del producto el cual puede ser visualizado por electroforésis. De esta manera, una sola molécula puede generar más de un millón de copias de sí misma luego de 30 ciclos de replicación exponencial ($2^{30}=1,073,741,842$).

Técnicamente está comprendida de tres reacciones consecutivas:

Desnaturalización: Comprende la descomposición del DNA blanco de doble cadena en cadenas sencillas (de acuerdo al modelo de Watson y Crick el DNA está formado por 2 cadenas complementarias) con el fin de que los cebadores puedan encontrar la secuencia específica para unirse. Usualmente se realiza a una temperatura entre los 94°C y 96°C por un tiempo aproximado de 0.5 a 2 minutos.

Hibridación: Una vez desnaturalizado el DNA los cebadores proceden a unirse a la secuencia para la cual fueron diseñados, con cara hacia el extremo terminal 5' de la fracción de DNA a amplificar, esto ocurre en ambas cadenas delimitando la secuencia de DNA blanco a ser amplificado. Esto se realiza a una temperatura comprendida entre los 50°C y 60°C por un tiempo aproximado de 0.5 a 2 minutos, para permitir que los primers o sondas (secuencias específicas complementarias que se añaden a la reacción) se unan a las secuencias blanco buscadas.

Polimerización Elongación o Extensión: Después que los cebadores se han hibridado ocurre el proceso de extensión en el cual el protagonista es una

polimerasa DNA que lleva a cabo la síntesis de nuevo DNA de un cebador hacia el otro en la dirección de 5' a 3'. Este proceso se lleva a cabo a una temperatura de 72°C por un tiempo de 2 minutos.

De esta manera después de varios ciclos el producto predominante de la reacción será aquella pieza de DNA la cual está flanqueada por los cebadores e incluirá a los cebadores por sí mismos.

Los ciclos de calentamiento y enfriamiento pueden ser repetidos y los fragmentos de DNA producidos continuarán acumulándose exponencialmente hasta que los productos de la reacción estén agotados o que la enzima sea incapaz de sintetizar bastante DNA con rapidez.

En este protocolo los procesos de transcripción reversa del ARN del virus de dengue y amplificación del ADN complementario resultante son combinados y llevado a cabo en un tubo. El uso de un primer 5' complementario a una secuencia conservada en los 4 serotipos del virus dengue en combinación con 4 primers 3', que hibridizan a secuencias específicas en el genoma de cada uno de los serotipos, permite la detección simultánea de los 4 serotipos. Los sitios de los primers están designados para generar productos de diferentes tamaño para cada serotipo, lo cual permite distinguirlo fácilmente por medio de electroforesis en gel de agarosa. De esta manera la detección del virus dengue y la identificación del serotipo puede realizarse en un solo tubo, comenzando con el ARN viral.

Tres versiones de RT- PCR son presentada, en la primera se amplifica segmentos de la región de la cápside viral, en la segunda es amplificada parte de la región no estructural del virus, NS3. La tercera versión es el llamado Nested PCR, que está compuesta por 2 PCR, en el primero se aplica una región amplia del virus del Dengue conservada en los 4 serotipos y en el segundo diferentes regiones específicas para cada serotipo.

RT- PCR. Cápside (Harris et al) (Realizado en CNDR-MINSA de Nicaragua)

I. Purificación del ARN viral (Chomczynski et al)

CUARTO GRIS

A. EQUIPOS

- Microcentrifuga
- Calentador o microonda
- Pipetas ajustables 20 ul, 200ul, 1000ul

B. MATERIALES

- Tubos de 1.5 ml
- Puntas de 1 a 200 ul
- Puntas de 200 a 1000 ul
- Tubos plásticos de 15 ml
- Beaker con cloro diluido para desechos
- Marcador permanente
- Cinta de color
- Gradillas para tubos de microcentrifugas
- Guantes.

C. REACTIVOS

- Cloro
- Buffer de lisis*
- Acetato de Sodio 2M pH 4.0
- Fenol equilibrado con agua
- Cloroformo
- Isopropanol
- Etanol al 75% (preparado con agua bidestilada libre de ARNasa)
- Agua bidestilada estéril, libre de ARNasa (comercial o tratada con DEPC).

*Buffer de lisis

Isotiocianato de Guanidinium 6 M

Citrato de Na 50 mM

Sarkosyl 1%

T ARN 20 ug/ml (glucógeno 20 ug/ml)

B- mercaptoetanol 100 mM (agregue inmediatamente antes de usar el buffer)

PROCEDIMIENTO

1. Calcular la cantidad de cada reactivo necesario para el número de muestras que serán procesadas y hacer alícuotas con la cantidad apropiada de cada reactivo en tubos de polipropileno o en tubos de microcentrifuga de 1.5 ml.
2. Adicionar 300 ul de sobrenadante de cultivo de células infectado o suero humano a tubos de microcentrifuga estériles. Como control negativo, utilizar 300 ul de agua destilada o suero negativo. Mantener las muestras en hielo.

DESPUÉS DE MANIPULAR CADA MUESTRA, LIMPIAR LA BARRA DE LA PUNTA DE LA PIPETA CON UNA TOALLA DE PAPEL CON CLORO Y SECARLA CON OTRA TOALLA DE PAPEL LIMPIO.

3. Adicionar a cada muestra 300 ul de buffer de lisis, mezclar bien y mantener las mismas a temperatura ambiente.
4. Adicionar secuencialmente a cada muestra los siguientes reactivos, mezclar por inversión después de añadir cada uno:
 - 60 ul Acetato de sodio 2 M, pH 4.0 (1/10 volumen de la muestra mas buffer lisis).
 - 600 ul fenol equilibrado con agua
 - 240 ul de cloroformo
5. Centrifugar a 14 000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente.
6. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo(previamente rotulado) y colocarlo sobre hielo. Limpiar la punta de la barra de la pipeta entre cada una de las muestras. Descartar la fase orgánica en un deposito para desechos orgánicos.
7. Agregar un volumen igual de isopropanol (aproximadamente 600 ul) y mezclar por inversión.
8. Centrifugar a 14000 rpm por 15 minutos a 4° C.
9. Descartar el sobrenadante, teniendo cuidado de no perder el sedimento. Primero utilizar una punta de 1000 ul para remover la mayoría del sobrenadante y luego una punta de 1 a 200 ul para el resto.
10. Adicionar 500 ul de Etanol al 75%.
11. Centrifugar a 14000 rpm por 10 minutos a 4° C.
12. Descartar el sobrenadante, teniendo cuidado de no perder el sedimento, el cual puede despegarse de las paredes del tubo.
13. Dejar secar el sedimento al aire en una posición horizontal por 10 minutos.
14. Resuspender el sedimento en 25 ul de agua estéril libre de ARNasa.
15. Guardar el ARN a - 20 ó – 70° C hasta su uso.

PREPARACION DE LA MEZCLA PARA RT-PCR DE LA CAPSIDE.

CUARTO BLANCO

EQUIPOS

- Termociclador
- Microcentrífuga
- Pipetas ajustables 20 ul, 200ul, 1000ul.

MATERIALES

- Tubos de 1.5 ml estériles
- Tubos de 0.6 ml estériles
- Puntas de 200 ul a 1000 ul estériles
- Puntas de 1 ul a 200 ul estériles
- Marcador permanente
- Gradillas para tubos de microcentrífuga
- Beakers con cloro diluido
- Recipiente con hielo
- Guantes

REACTIVOS

- Buffer dengue 10x *
- dNtPs (5 mM de cada uno, dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 20 mM dNTPs en total)
- Primers (10 uM):

D1: 5'- TCA ATA TGC TGA AAC GCG CGA GAA ACC G

TS1: 5'- CGT CTC AGT TGA TCC GGC GG

TS2: 5'- CGC CAC AAG GGC CAT GAA CAG

TS3: 5'- TAA CAT CAT CAT GAG ACA GAG C

DEN 4: 5'-TGT TGT CTT AAA CAA GAG AGG TC

- DTT (100 Mm)
- Cloruro de Tetrametil amonio (TMAC 1 M)
- Betaine (4 M SIGMA chemical co; B-2629)
- MgCl 25 mM
- Agua bidestilada libre de ARNasa
- Taq polimerasa (5 u/ul)
- Transcriptasa reversa rav-2 (Amersham corporation)
- Aceite mineral
- Control positivo ARN viral (de los 4 serotipos)

*Buffer dengue 10x

KCl 500 mM

Tris- HCl 100 mM pH 8.5

Gelatina 0.1%

PROCEDIMIENTO

1. Calcular la cantidad de la mezcla de PCR necesaria para el número deseado de reacciones, cada una conteniendo 20 ul de mezcla.
2. Llenar la hoja de trabajo de PCR de acuerdo con la siguiente tabla:

REACTIVO	CONCENTRACION	VOLUMEN	CON.FINAL
10X Buffer	10x	2.5ul	1x
DNTPs	20mM	1ul	0.8mM
D1	10uM	2.5ul	1uM
TS1	10uM	2.5ul	1uM
TS2	10uM	1.25ul	0.5uM
TS3	10uM	1.25ul	0.5uM
DEN4	10uM	1.25ul	0.5uM
DTT	100mM	1.25ul	5mM
TMAC	1M	0.75ul	0.03M
BETAINE	4M	3.125ul	0.5M
MgCl	25mM	1ul	1mM
RAV-2	1U/ul	0.125ul	0.005U/ul
Amplitaq	5U/ul	0.125ul	0.025U/ul
Agua Sigma		1.5ul	
VOL.MIX		20ul	
MUESTRA		5ul	
TOTAL		25ul	

Nota : Mantener siempre los ingredientes y tubos sobre hielo

3. Marcar los tubos adecuados para el Termociclador (tubos de 0.5 ml).
4. Descongelar las alícuotas de cada reactivo. Mezclar bien cada solución con vortex (Mantener siempre los ingredientes y tubos sobre hielo).
5. En el cuarto blanco utilizando pipetas de ese cuarto, preparar la mezcla de PCR con todos los ingredientes excepto las enzimas (Taq polimerasa y la reverso transcriptasa rav-2). Tachar cada ingrediente después de agregarlo a la mezcla.
6. Mezclar bien usando un vortex.
7. Agregar las enzimas y mezclar bien. Tener cuidado de no producir burbujas.
8. Distribuir 20 ul de la mezcla de PCR en cada tubo marcado.
9. Agregar 1 gota de aceite mineral (si el Termociclador es de tapa caliente este reactivo no se utiliza).
10. Agregar 5 ul de agua bidestilada al primer tubo para preparar el control negativo del cuarto blanco.
11. Transferir los tubos de la hielera blanca a una hielera gris.
12. En el cuarto gris adicionar 5 ul de cada ARN purificado a los 20 ul de la mezcla en el tubo correspondiente a cada muestra.

AMPLIFICACION DE LA MUESTRA

CUARTO NEGRO

EQUIPOS

- Termociclador
- Microcentrifuga

PROGRAMA DE AMPLIFICACION:

42° C	1 hora	1 ciclo	Reversotranscripción
94° C	30 seg	40 ciclos	Desnaturalización
55° C	1 min	40 ciclos	Hibridación
72° C	2 min	40 ciclos	Extensión
72° C	5 min	1 ciclo	Extensión final

ANALISIS DEL PRODUCTO

CUARTO NEGRO

EQUIPOS

- Microcentrífuga
- Balanza
- Balanza analítica
- Microonda
- Fuente de poder
- Transiluminador de LUV
- Cámara polaroid con filtro naranja y campana
- Vortex
- Pipetas ajustables 20 ul, 200 ul.

MATERIALES

- Molde para gel
- Cámara de electroforesis
- Peine de la cámara para la cámara de electroforesis
- Tubo de 1.5 ml estériles
- Frasco Erlenmeyer de 250 ml
- Probetas de 100 ml, 250 ml, 1000 ml.
- Papel para pesar
- Cinta adhesiva de color
- Puntas de pipetas 1 a 200 ul
- Beaker con cloro diluido
- Marcador Permanentes
- Gradilla para tubos de microcentrífuga
- Guantes
- Papel parafilms
- Lentes protectores contra LUV

REACTIVOS

- TBE 1X (Buffer de corrida Tris, Borato, EDTA)
- Agarosa
- Colorante
- Marcador de ADN.
- Bromuro de etidium (10 mg/ml)
- Película polaroid 667

Nota: Utilice guantes todo el tiempo que maneje el carcinógeno bromuro de etidium

PROCEDIMIENTO

1. Para cada gel, preparar una solución de 1.5% de agarosa en TBE 1X y calentar hasta disolver la agarosa
2. Dejar enfriar la solución hasta aproximadamente 55° C. Agregar bromuro de etidium (10 mg/ml) a una dilución de 1/20000 (Concentración final 0.4 ug/ml).
3. Preparar el gel vertiendo la solución en el molde con cuidado de no hacer burbujas.
4. Preparar buffer de TBE 1X para el gel con bromuro de etidium a una concentración final de 0.5 ug/ml.
5. Preparar un esquema mostrando el orden de las muestras en el gel.

Nota: Descartar las puntas en un beaker con cloro.

6. Cubrir una gradilla para tubos de microcentrífuga con un pedazo de parafilms. Hacer depresiones en el parafilms sobre los hoyos. Marque el número de las reacciones sobre el parafilms en el orden predeterminado.
7. Preparar las muestra para el gel en el orden estipulado:

10 ul del producto
2 ul de colorante
8. Preparar el marcador de Peso Molecular (PM) de ADN:
9. Poner el gel en la cámara de electroforesis y cubrirlo con TBE 1X.
11. Adicionar las muestras en el gel según el orden predeterminado.
12. Correr el gel aproximadamente 100 voltio hasta que el azul de bromofenol haya migrado aproximadamente 70 a 80% a lo largo del gel.
13. Tomar fotografía utilizando el transiluminador y la cámara con película polaroid 667.

Tamaño de los productos

- 482 pares de base (Dengue 1: D1- TS1)
- 119 pares de base (Dengue 2 : D1- TS2)
- 290 pares de base (Dengue 3 : D1- TS3)
- 389 pares de base (Dengue 4: D1- Den 4)

RT- PCR. NS3 (Seah et al) (Método que se realiza en CNDR-MINSA de Nicaragua)

Purificación del ARN viral (Ver RT- PCR Cápside)

PREPARACION DE LA MEZCLA PARA RT-PCR NS3.

CUARTO BLANCO

EQUIPO

- Termociclador
- Microcentrífuga
- Pipetas ajustables 20 ul, 200ul, 1000ul.

MATERIALES

- Tubos de 1.5 ml estériles
- Tubos de 0.6 ml estériles
- Puntas de 200 ul a 1000 ul estériles
- Puntas de 1 ul a 200 ul estériles
- Marcador permanente
- Gradillas para tubos de microcentrífuga
- Beakers con cloro diluido
- Recipiente con hielo
- Guantes

REACTIVOS

- Buffer dengue 10x *
- dNtPs (5 mM de cada uno, dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 20 mM dNTPs en total)
- Primers (10 uM):

DV 1 : 5'- GGR ACK TCA GGW TCT CC- 3'

DSP1: 5'- AGT TTC TTT TCC TAA ACA CCT CG- 3'

DSP2: 5'- CCG GTG TGC TCR GCY CTG AT- 3'

DSP3: 5'- TTA GAG TYC TTA AGC GTC TCT TG- 3'

DSP4: 5'-CCT GGT TGA TGA CAA AAG TCT TG- 3'

- DTT (100 Mm)
- Cloruro de Tetrametil amonio (TMAC 1 M)
- Betaine (4 M SIGMA chemical co; B-2629)
- MgCl 25 mM
- Agua bidestilada libre de ARNasa
- Taq polimerasa (5 u/ul)
- Transcriptasa reversa rav-2 (Amersham corporation)
- Aceite mineral
- Control positivo ARN viral (de los 4 serotipos)

REACTIVO	CONCENTRACION	VOLUMEN	CON.FINAL
10X Buffer	10x	2.5ul	1x
DNTPs	20mM	1ul	0.8mM
DV1	10uM	2 ul	0.8uM
DSP1	10uM	1.25ul	0.5uM
DSP2	10uM	1.25ul	0.5uM
DSP3	10uM	1.25ul	0.5uM
DSP4	10uM	1.25ul	0.5uM
DTT	100mM	1.25ul	5mM
TMAC	1M	0.75ul	0.03M
BETAINE	4M	3.125ul	0.5M
MgCl	25mM	1.6ul	1.6mM
RAV-2	1U/ul	0.125ul	0.005U/ul
Amplitaq	5U/ul	0.125ul	0.025U/ul
Agua Sigma		1.5ul	
VOL.MIX		20ul	
MUESTRA		5ul	
TOTAL		25ul	

- Buffer dengue 10x

KCl 500 mM
Tris- HCl 100 mM pH 8.5
Gelatina 0.1%

PROCEDIMIENTO

1. Calcular la cantidad de la mezcla de PCR necesaria para el número deseado de reacciones, cada una conteniendo 20 ul de mezcla.
2. Llenar la hoja de trabajo de PCR de acuerdo con la siguiente tabla:

Nota : Mantener siempre los ingredientes y tubos sobre hielo

3. Marcar los tubos adecuados para el Termociclador (tubos de 0.5 ml).

4. Descongelar las alícuotas de cada reactivo. Mezclar bien cada solución con vortex (Mantener siempre los ingredientes y tubos sobre hielo).
5. En el cuarto blanco utilizando pipetas de ese cuarto, preparar la mezcla de PCR con todos los ingredientes excepto las enzimas (Taq polimerasa y la reverso transcriptasa rav-2).
6. Mezclar bien usando un vortex.
7. Agregar las enzimas y mezclar bien. Tener cuidado de no producir burbujas.
8. Distribuir 20 ul de la mezcla de PCR en cada tubo marcado.
9. Agregar 1 gota de aceite mineral (Si el Termociclador es de tapa caliente este reactivo no se utiliza).
10. Agregar 5 ul de agua bidestilada al primer tubo para preparar el control negativo del cuarto blanco.
11. Transferir los tubos de la hielera blanca a una hielera gris.
12. En el cuarto gris adicionar 5 ul de cada ARN purificado a los 20 ul de la mezcla en el tubo correspondiente a cada muestra.

AMPLIFICACION DE LA MUESTRA

CUARTO NEGRO

EQUIPOS

- Termociclador
- Microcentrífuga

PROGRAMA DE AMPLIFICACION:

50° C	15 min	1 ciclo	Reversotranscripción	
95° C	1 min	1 ciclo	Desnaturalización Inicial	
95° C	30 seg	10 ciclos	Desnaturalización	Ramp 1min
50° C	1 min	10 ciclos	Hibridación	Ramp 1min
72° C	2 min	10 ciclos	Extensión	Ramp 1min
95° C	30 seg	25 ciclos	Desnaturalización	Ramp 30 seg
50° C	30 seg	25 ciclos	Hibridación	Ramp 30 seg
72° C	30 seg	25 ciclos	Extensión	Ramp 30 seg
72° C	5 min	1 ciclo	Extensión final	

ANALISIS DEL PRODUCTO

CUARTO NEGRO

EQUIPOS

- Microcentrífuga
- Balanza
- Balanza analítica
- Microonda
- Fuente de poder
- Transiluminador de LUV
- Cámara polaroid con filtro naranja y campana
- Vortex
- Pipetas ajustables 20 ul, 200 ul.

MATERIALES

- Molde para gel
- Cámara de electroforesis
- Peine de la cámara para la cámara de electroforesis
- Tubo de 1.5 ml estériles
- Frasco Erlenmeyer de 250 ml
- Probetas de 100 ml, 250 ml, 1000 ml.
- Papel para pesar
- Cinta adhesiva de color
- Puntas de pipetas 1 a 200 ul
- Beaker con cloro diluido
- Marcador Permanentes
- Gradilla para tubos de microcentrífuga
- Guantes
- Papel parafilms
- Lentes protectores contra LUV

REACTIVOS

- TBE 1X (Buffer de corrida Tris, Borato, EDTA)
- Agarosa
- Colorante
- Marcador de ADN.
- Bromuro de etidium (10 mg/ml)
- Película polaroid 667

Nota: Utilice guantes todo el tiempo que maneje el carcinógeno bromuro de etidium

PROCEDIMIENTO

1. Para cada gel, preparar una solución de 1.5% de agarosa en TBE 1X y calentar hasta disolver la agarosa
2. Dejar enfriar la solución hasta aproximadamente 55° C. Agregar bromuro de etidium (10 mg/ml) a una dilución de 1/20000 (Concentración final 0.4 ug/ml).
3. Preparar el gel vertiendo la solución en el molde con cuidado de no hacer burbujas.
4. Preparar buffer de TBE 1X para el gel con bromuro de etidium a una concentración final de 0.5 ug/ml.
5. Preparar un esquema mostrando el orden de las muestras en el gel.

Nota: Descartar las puntas en un beaker con cloro.

6. Cubrir una gradilla para tubos de microcentrífuga con un pedazo de parafilms. Hacer depresiones en el parafilms sobre los hoyos. Marque el número de las reacciones sobre el parafilms en el orden predeterminado.
7. Preparar las muestra para el gel en el orden estipulado:

10 ul del producto
2 ul de colorante

8. Preparar el marcador de PM de ADN:
9. Poner el gel en la cámara de electroforesis y cubrirlo con TBE 1X.
10. Adicionar las muestras en el gel según el orden predeterminado.
11. Correr el gel aproximadamente 100 voltio hasta que el azul de bromofenol haya migrado aproximadamente 70 a 80% a lo largo del gel.
12. Tomar fotografía utilizando el transiluminador y la cámara con película polaroid 667.

Tamaño de los productos

169 pares de base (Dengue 1: DV1- DSP1)
362 pares de base (Dengue 2: DV1- DSP2)
265 pares de base (Dengue 3: DV1- DSP3)
426 pares de base (Dengue 4: DV1- DSP4)

RT- PCR NESTED (Lanciotti et al)

PREPARACION DE LA MEZCLA .

CUARTO BLANCO EQUIPOS

- Termociclador
- Microcentrífuga
- Pipetas ajustables 20 ul, 200ul, 1000ul.

MATERIALES

- Tubos de 1.5 ml estériles
- Tubos de 0.6 ml estériles
- Puntas de 200 ul a 1000 ul estériles
- Puntas de 1 ul a 200 ul estériles
- Marcador permanente
- Gradillas para tubos de microcentrífuga
- Beakers con cloro diluido
- Recipiente con hielo
- Guantes

REACTIVOS

- Buffer dengue 10x *
- dNtPs (5 mM de cada uno, dATP, dCTP, dGTP, dTTP; 20 mM dNTPs en total)
- Primers

D1: 5'- TCA ATA TGC TGA AAC GCG CGA GAA ACC G 3'

D2: 5' – TTG CAC CAA CAG TCA ATG TCT TCA GGT TC 3'

TS1: 5'- CGT CTC AGT TGA TCC GGG GG 3'

TS2: 5'- CGC CAC AAG GGC CAT GAA CAG 3'

TS3: 5'- TAA CAT CAT CAT GAG ACA GAG C 3'

TS4: 5'- CTC TGT TGT CTT AAA CAA GAG A 3'

- DTT (100 Mm)
- MgCl 25 mM
- Agua bidestilada libre de ARNasa
- Taq polimerasa (5 u/ul)
- Transcriptasa reversa rav-2 (Amersham corporation)
- Aceite mineral
- Control positivo ARN viral (de los 4 serotipos)

*Buffer dengue 10x

KCl 500 mM

Tris- HCl 100 mM pH 8.5

Gelatina 0.1%

PROCEDIMIENTO RT- PCR (Primer round)

1. Calcular la cantidad de la mezcla de PCR necesaria para el número deseado de reacciones, cada una conteniendo 90 ul de mezcla.
2. Llenar la hoja de trabajo de PCR de acuerdo con la siguiente tabla:

REACTIVO	CONCENTRACION	VOLUMEN	CON.FINAL
10X Buffer	10x	10ul	1x
DNTPs	20mM	4ul	0.8mM
D1			50 pmoles
D2			50 pmoles
DTT	100mM	5 ul	5mM
MgCl	25mM	6 ul	1mM
RAV-2	1U/ul	2.5 ul	0.005U/ul
Amplitaq	5U/ul	0.5 ul	0.025U/ul
VOL.MIX		90 ul	
MUESTRA		10 ul	
TOTAL		100 ul	

Nota : Mantener siempre los ingredientes y tubos sobre hielo

3. Marcar los tubos adecuados para el Termociclador (tubos de 0.5 ml).
4. Descongelar las alícuotas de cada reactivo. Mezclar bien cada solución con vortex y baje líquidos con un golpe de centrifuga (Mantener siempre los ingredientes y tubos sobre hielo).
5. En el cuarto blanco utilizando pipetas de ese cuarto, preparar la mezcla de PCR con todos los ingredientes excepto las enzimas (Taq polimerasa y la reverso transcriptasa rav-2).
6. Mezclar bien usando un vortex.

7. Agregar las enzimas y mezclar bien. Tener cuidado de no producir burbujas.
8. Distribuir 90 ul de la mezcla de PCR en cada tubo marcado.
9. Agregar 1 gota de aceite mineral (si el Termociclador es de tapa caliente este reactivo no se utiliza).
10. Agregar 10 ul de agua bidestilada al primer tubo para preparar el control negativo del cuarto blanco.
11. Transferir los tubos de la hielera blanca a una hielera gris.
12. En el cuarto gris adicionar 10 ul de cada ARN purificado a los 90 ul de la mezcla en el tubo correspondiente a cada muestra.

PROGRAMA DE AMPLIFICACION:

42° C	1 hora	1 ciclo	Reversotranscripción
94° C	30 seg	35 ciclos	Desnaturalización
55° C	1 min	35 ciclos	Hibridación
72° C	2 min	35 ciclos	Extensión

NESTED PCR (Segundo round)

1. Calcular la cantidad de la mezcla de PCR necesaria para el número deseado de reacciones, cada una conteniendo 90 ul de mezcla.
2. Llenar la hoja de trabajo de PCR de acuerdo con la siguiente tabla:

REACTIVO	CONCENTRACION	VOLUMEN	CON.FINAL
10X Buffer	10x	10ul	1x
DNTPs	20mM	4ul	0.8mM
D1			50 pmoles
TS1			50 pmoles
TS2			50 pmoles
TS3			50 pmoles
TS4			50 pmoles
MgCl	25mM	6 ul	1mM
Amplitaq	5U/ul	0.5 ul	0.025U/ul
VOL.MIX		90 ul	
MUESTRA		10 ul	
TOTAL		100 ul	

Nota : En este PCR no se utiliza DTT y Rav 2.

3. Marcar los tubos adecuados para el Termociclador (tubos de 0.5 ml).
4. Descongelar las alícuotas de cada reactivo. Mezclar bien cada solución con vortex y baje líquidos con un golpe de centrifuga (Mantener siempre los ingredientes y tubos sobre hielo).
5. En el cuarto blanco utilizando pipetas de ese cuarto, preparar la mezcla de PCR con todos los ingredientes excepto la enzima Taq polimerasa.
6. Mezclar bien usando un vortex.

7. Agregar la taq polimerasa y mezclar bien. Tener cuidado de no producir burbujas.
8. Distribuir 90 ul de la mezcla de PCR en cada tubo marcado.
9. Agregar 1 gota de aceite mineral (si el Termociclador es de tapa caliente este reactivo no se utiliza).
10. Agregar 10 ul de agua bidestilada al primer tubo para preparar el control negativo del cuarto blanco.
11. Transferir los tubos de la hielera blanca a una hielera gris.
12. En el cuarto gris adicionar 10 ul de cada producto amplificado diluido 1:100 a los 90 ul de la mezcla en el tubo correspondiente a cada muestra.

PROGRAMA DE AMPLIFICACION:

94° C	30 seg	20 ciclos	Desnaturalización
55° C	1 min	20 ciclos	Hibridación
72° C	2 min	20 ciclos	Extensión

ANALISIS DEL PRODUCTO

CUARTO NEGRO

EQUIPOS

- Microcentrífuga
- Balanza
- Balanza analítica
- Microonda
- Fuente de poder
- Transiluminador de LUV
- Cámara polaroid con filtro naranja y campana
- Vortex
- Pipetas ajustables 20 ul, 200 ul.

MATERIALES

- Molde para gel
- Cámara de electroforesis
- Peine de la cámara para la cámara de electroforesis
- Tubo de 1.5 ml estériles
- Frasco Erlenmeyer de 250 ml

- Probetas de 100 ml, 250 ml, 1000 ml.
- Papel para pesar
- Cinta adhesiva de color
- Puntas de pipetas 1 a 200 ul
- Beaker con cloro diluido
- Marcador Permanentes
- Gradilla para tubos de microcentrífuga
- Guantes
- Papel parafilms
- Lentes protectores contra LUV

REACTIVOS

- TBE 1X (Buffer de corrida Tris, Borato, EDTA)
- Agarosa
- Colorante
- Marcador de ADN.
- Bromuro de etidium (10 mg/ml)
- Película polaroid 667

Nota: Utilice guantes todo el tiempo que maneje el carcinógeno bromuro de etidium

PROCEDIMIENTO

8. Para cada gel, preparar una solución de 1.5% de agarosa en TBE 1X y calentar hasta disolver la agarosa
9. Dejar enfriar la solución hasta aproximadamente 55° C. Agregar bromuro de etidium (10 mg/ml) a una dilución de 1/20000 (Concentración final 0.4 ug/ml).
10. Preparar el gel vertiendo la solución en el molde con cuidado de no hacer burbujas.
11. Preparar buffer de TBE 1X para el gel con bromuro de etidium a una concentración final de 0.5 ug/ml.
12. Preparar un esquema mostrando el orden de las muestras en el gel.

Nota: Descartar las puntas en un beaker con cloro.

13. Cubrir una gradilla para tubos de microcentrífuga con un pedazo de parafilms. Hacer depresiones en el parafilms sobre los hoyos. Marque el número de las reacciones sobre el parafilms en el orden predeterminado.

14. Preparar las muestra para el gel en el orden estipulado:

10 ul del producto
2 ul de colorante

8. Preparar el marcador de PM de ADN:

9. Poner el gel en la cámara de electroforesis y cubrirlo con TBE 1X.

14. Adicionar las muestras en el gel según el orden predeterminado.
15. Correr el gel aproximadamente 100 voltio hasta que el azul de bromofenol haya migrado aproximadamente 70 a 80% a lo largo del gel.
16. Tomar fotografía utilizando el transiluminador y la cámara con película polaroid 667.

Tamaño de los productos

Primer PCR

511 pares de base (D1- D2)

Segundo PCR

482 pares de base (Dengue 1: D1- TS1)
119 pares de base (Dengue 2 : D1- TS2)
290 pares de base (Dengue 3 : D1- TS3)
389 pares de base (Dengue 4: D1- TS 4)

MEDIDAS PARA EVITAR LA CONTAMINACION EN EL PCR

1. Utilizar tres áreas diferentes, cada uno designado para una función específica.
Cuarto Gris: Preparación y almacenamiento de la muestra y DNA purificado. Adición de las muestras a las alícuotas con mezcla (preparación de las reacciones).

Cuarto Blanco: almacenamiento de los ingredientes de la reacción del PCR. Preparación de la mezcla y distribución de las alícuotas.

Cuarto Negro: Amplificación y detección de los productos. Almacenamiento de los productos del PCR.

2. Para evitar contaminación de los stocks concentrados, siempre trabajar con alícuotas pequeñas. De tal forma que si se contamina el stock, se puede descartar sin gastar demasiado.
3. Siempre lavarse las manos después de analizar el producto y antes de entrar al cuarto blanco.
4. Siempre use guantes y bata.
5. Periódicamente dejar en remojo las barras de las pipetas por 10 minutos en cloro al 20%, enjuagar en agua destilada y secar. Además todas las superficies de trabajo tienen que ser limpiadas periódicamente (antes y después de trabajar) con cloro al 20%.
6. Se puede usar puntas de pipetas ART (con barreras que previenen aerosolización del DNA) para la adición de DNA a las reacciones.
7. No tocar las puntas de pipetas con la punta de los dedos (ni con guantes).
8. No meter las manos dentro de las bolsas o beackers de tubos.
9. Hay varios tratamientos a las reacciones que eliminan específicamente los productos de amplificación anteriores antes de empezar el PCR. Sin embargo, el DNA blanco queda intacto. Estos métodos incluyen el uso de psoralina dUTP/N-Uracil Glicosalina y luz ultravioleta.

CONTROLES DE LA TECNICA

Numerosos controles deben utilizarse en el PCR para asegurar resultados confiables, a continuación se enumeran los mas utilizados:

- 1- Control de Agua Gris: Control del agua que se utiliza durante la purificación del ácido nucleico. No debe aparecer ninguna banda de amplificación a nivel de este control.
- 2- Control Negativo de Extracción: Muestra negativa a la cual se le realiza todo el proceso de purificación de ácido nucleico y PCR. No debe aparecer ninguna banda de amplificación a nivel de este control.
- 3- Control Positivo de Extracción: Muestra positiva que se le realiza todo el proceso desde el principio. Debe aparecer una banda con el Peso molecular esperado.
- 4- Control de Agua Blanca: Control del agua que se utiliza durante el proceso de la mezcla para el PCR. No debe aparecer ninguna banda de amplificación a nivel de este control.
- 5- Control de Amplificación: Control positivo al cual solamente se le realiza el proceso de PCR. Debe aparecer una banda con el Peso molecular esperado.
- 6- Control de Inhibición: Este control consiste en adicionar ARN viral al ácido nucleico purificado de una muestra negativa, de existir algún inhibidor de la actividad de la polimerasa del DNA la banda esperada no aparecerá.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Una muestra positiva es aquella donde se logra amplificar un fragmento de cADN con el tamaño esperado. Un caso positivo por RT- PCR de Dengue es un caso confirmado de Dengue.

PREPARACION DE LOS REACTIVOS DE PCR

PREPARACION DEL FENOL EQUILIBRADO EN AGUA

1. Poner el frasco de fenol en un baño María a 55 grados hasta que se vuelva líquido, no dejarlo mucho tiempo en el baño.
2. Si el frasco es de 100g agregarle 100ml de agua con DEPC agitarlo bien y dejarlo toda la noche en reposo hasta el día siguiente.
3. Descartare el sobrenadante y volver agregarle 100ml de Agua DEPC y 0.01g (por cada 100ml)de Antioxidante (8 hydroxyquinoline) agitarlo bien y volver a dejar el frasco en reposo toda la noche

Nota los tiempos de toda la noche se pueden sustituir por centrifugación de 3500 r.p.m./5min.

TBE 10X:

108g de tris base
55g de Acido Bórico
7.44g de EDTA

Diluir en 1000 ml de Agua
Diluir 1/10 antes de usarlo

BUFER LISIS:

6M de GITC
50mM de Citrato de sodio
1% de sarcosil
20ug/ml de tRNA.
Bmercaptoetanol 100 mM (agregue inmediatamente antes de usar el buffer)

BETAINE 4M en agua libre de ARNasa

TMAC 1M en agua libre de ARNasa

DTT 100mM en agua libre de ARNasa

BROMURO DE ETHIDIO 10mg/ml en agua DEPC

AGUA con DEPC:

POR CADA 1000ml DE Agua agregar 1ml de DEPC, dejarlo toda la noche en agitación

Autoclavear al día siguiente.

Dejar enfriar antes de usarla.

PRODUCCION DE ANTIGENO POR EL METODO SACAROSA ACETONA (Tomado del manual de procedimientos del IPK)

Este método rinde antígeno hemaglutinante y fijadores del complemento por lo que pueden utilizarse en ambas técnicas. También es útil en los sistemas de ELISA.

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

EQUIPOS

- Gabinetes de seguridad
- Centrifuga refrigerada
- Homogenizador mecánico o eléctrico
- Cristalería

REACTIVOS

- Sacarosa
- Acetona (Calidad reactiva a – 70° C)
- Solución Borato salina pH 9 (BS)
- Tris (hidrometil aminometane Gibco 130910)
- B propialactona (BPL) (B prone, Fellows Testaga, Detroid. Michigan)
- Alcohol 70° C

OBTENCION DE CEREBRO DE RATONES INFECTADOS:

- Inocular por vía intracerebral los ratones lactantes de 1 a 2 días de nacido con 0.02 ml de una suspensión de cerebro de ratón infectado con algunos de los serotipos en cuestión. Esta suspensión se prepara a una dilución 1/50 del cerebro en PBS con 5% de Suero bovino inactivado por calor y antibiótico. Puede usarse Medio 199 u otros en lugar de PBS.
- Examinar los ratones inoculados al menos 2 veces al día en busca de los signos de enfermedad, cuando la mayoría de los ratones estén enfermo deben congelarse a –20 ó –70° C hasta su uso.
- Colocar a los ratones a 4° C toda la noche el día antes de su utilización.
- Los ratones se desinfectan con alcohol al 70% y se dejen secar. El tejido cerebral de cada ratón se extrae asépticamente por aspiración colocándolo en un frasco con hielo.

EXTRACION DEL ANTIGENO

El antígeno se prepara de forma aséptica en un gabinete de seguridad nivel 2, tanto el antígeno como la acetona utilizada son infecciosas, por lo que se debe manipular con extremo cuidado. Debe evitarse el uso de mechero durante el proceso.

- Por cada volumen de cerebro de ratón extraído adicionar 4 volúmenes de sacarosa al 8.5% en agua destilada. Homogeneizar la suspensión exhaustivamente en frío.
- Añadir la suspensión de cerebro a 20 volúmenes de acetona fría (kitasato). Utilizar para esto una aguja larga # 18 sumergida en acetona.
- Agitar vigorosamente en ambos sentidos y dejar reposar en baño de hielo durante 15 minutos.
- Aspirar la acetona completamente y adicionar otros 20 volúmenes de acetona fría. Previamente romper el precipitado con un agitador de vidrio. Dejar sedimentar el antígeno y reposar en baño de hielo durante 1.5 horas con agitación ocasional durante la primera hora.
- Aspirar la acetona y secar el precipitado utilizando una bomba de alto vacío (10-2 mB) hasta la aparición de un polvo rosado claro (aproximadamente 30 minutos).
- Rehidratar con buffer Tris borato salina mas 5% de sacarosa a 0.5 volúmenes del homogeneizado de cerebro sacarosa. (El tris se prepara 1 M en NaCl al 0.85% y posteriormente se lleva a 0.1M en buffer borato salina pH9, chequeándose repetidamente).
- Dejar rehidratando toda la noche a 4° C con agitación.
- Centrifugar 30 minutos a 4° C 3000 rpm y descartar el precipitado.
- Para inactivar el antígeno se añade BPL a una concentración final de 0.1% para Dengue 1, 3 y 4; al 0.19% para Dengue 2. Agitar bien y mantener a 4°C durante 48 horas.
- Distribuir en alícuotas para guardar a – 70° C o para liofilizar y guardar a – 20° C.
- Verificar si la inactivación fue efectiva inoculando con el antígeno inactivado por vía intracerebral dos familias de ratones lactante y observar por 21 días.
- Para los virus dengue la concentración de BPL es crítica de acuerdo al serotipo, ya a que concentraciones mayores se reduce la actividad del antígeno.

- Durante el proceso de extracción deben reenvasarse varias amputas conteniendo cerebro de ratón sólo en suspensión al 10% (en PBS o medio de cultivo mas suero bovino al 5% y 100 Uds./ml de antibiótico) las cuales se almacenarán a -70° C y servirán como virus semillas para el próximo pase en ratones y de esta forma conservar el virus.

PRODUCCION DE ANTIGENO CELULAR (Método que se realiza en CNDR-MINSA de Nicaragua)

Este método utilizado en el laboratorio de Virología del CNDR es rápido y especialmente muy sencillo, capaz de realizarse en cualquier tipo de laboratorio que cuente con cultivo de células. Ofrece antígenos con títulos satisfactorios para ELISA de Captura de IgM y ELISA de Inhibición, no es útil para Inhibición de la Hemaglutinación.

EQUIPOS

- a. Incubadoras de 28° C
- b. Flujo Laminar
- c. Pipet aids

MATERIALES

- a. Policías de hules estériles
- b. Pipetas serológicas de 1 ml, 5 ml, 10 ml, 25ml.
- c. Beakers
- d. Frascos de cultivos de 25 cm².
- e. Marcador permanente
- f. Guantes

REACTIVOS

- a. Medio MEM con Suero Bovino Fetal (SBF) al 10% o medio L15 con SBF al 10%. (Medio de crecimiento).
- b. Alcohol al 70%
- c. Cloro al 10%

PROCEDIMIENTO

1. Inocular 4 frascos de 150 cm² (monocapa confluyente de C636) con 1 ml de sobrenadante de cultivos infectados con cada uno de los serotipos del virus del Dengue (un serotipo por cada frasco).
2. Incubar a 28° C durante 7 días.
3. Descartar el sobrenadante.
4. Lavar la monocapa con PBS
5. Adicionar 1 ml de PBS a cada frasco
6. Congelar y descongelar 7 veces cada frasco
7. Pasar la suspensión celular a un tubo centrifuga.

8. Adicionar Tween 20 de tal forma que quede a una concentración final de 1%.
9. Mantener a 4° C durante 20 minutos.
10. Centrifugar a 2500 rpm por 10 minutos
11. Mezclar sobrenadante con sedimento.
12. Mezclar los 4 antígenos pertenecientes a los 4 serotipos del dengue.
13. Medir volumen final
14. Adicionar BSA a una concentración final de 1%
15. Adicionar igual volumen de glicerol
16. Alicuotar en volúmenes de 1 ml.
17. Almacenar en a -70° C hasta su uso.
18. Titular por ELISA de captura o ELISA de Inhibición desde 1/5 hasta 1/100 con una dilución constante del conjugado.
19. Título del antígeno se considera como la última dilución donde el control positivo presente un valor de absorbancia cercano a 1, y haya buena discriminación entre positivo y negativo en el caso de ELISA de captura de IgM, y con respecto a ELISA de Inhibición se considera el título del antígeno como la última dilución donde el control negativo presente un valor de absorbancia cercano a 1, y haya buena discriminación entre negativo y positivo.

PREPARACION DE CONJUGADO ANTI DENGUE PEROXIDASA (Wilson B and Nakane P. Método que se realiza en CNDR – MINSA de Nicaragua)

Uno de los componentes fundamentales de los sistemas ELISA, lo constituyen los conjugados, los cuales están formado por una enzima ligada a un antígeno o a un anticuerpo determinado. Existe una gran variedad de enzimas que han sido utilizadas por ser estables, altamente reactivas y puras, entre las que se encuentran: La acetilcolinesterasa, citocromo c, B galactosidasa y otras. Sin embargo la fosfatasa alcalina y la peroxidasa han sido las mas utilizadas por su bajo costo, fácil conjugación y amplia variedad de sustratos.

En el proceso de conjugación es importante que tanto la enzima como el anticuerpo o antígeno mantengan al máximo su actividad, además de lograr un óptimo acoplamiento de ambos componentes. Entre los métodos de conjugación mas utilizado se encuentra el glutaraldehido de dos pasos y el peryodato de un solo paso, siendo este último más eficiente para la peroxidasa.

PRECIPITACION DE INMUNOGLOBULINA CON SULFATO DE AMONIO

REACTIVOS

- Solución saturada de sulfato de amonio (pH7). La solución debe prepararse con varios días de anticipación antes de su uso y debe de ser filtrada para garantizar su saturación.
- Solución salina 0.85% o PBS
- Suero humano con altos títulos hemaglutinante contra el virus del Dengue.

PROCEDIMIENTO

- Adicionar 2 ml de suero humano con altos títulos hemaglutinante contra el virus del Dengue a 2 ml de PBS.
- Mantener en agitación y adicionar lentamente 4 ml de sulfato de amonio
- Continuar agitación durante 30 minutos
- Centrifugar a 5000 rpm 15 minutos a 4° C
- Descartar el sobrenadante
- Adicionar 2 ml de PBS para resuspender el precipitado.
- Adicionar 2 ml de sulfato de amonio lentamente
- Agitar 30 minutos
- Centrifugar a 5000 rpm a 4° C por 15 minutos

- Descartar el sobrenadante
- Adicionar 2 ml de PBS para resuspender el precipitado.
- Adicionar 2 ml de sulfato de amonio lentamente
- Agitar 30 minutos
- Centrifugar a 5000 rpm a 4° C por 15 minutos
- Descartar el sobrenadante
- Adicionar 1 ml de PBS.
- Determinar la concentración de proteína mediante la lectura en un espectrofotómetro a una densidad óptica de 280 nm y 260 nm.

CONCENTRACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS

Se determina mediante la lectura en espectrofotómetro a densidades ópticas de 280 nm y 260 nm. Aplicando la siguiente fórmula:

$$F: = 2.303/0.28 \times \%proteína/100$$

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

$$\text{Concentración de Proteínas (mg/ml)} = F \times 1/d \times DO_{280} \times \text{la dilución}$$

Donde d es el ancho de la cubeta en centímetro

Valores de F y R (280/260)

R 280/260	Porcentaje de ácido nucleico	F
1.75	0.00	1.116
1.63	0.25	1.081
1.52	0.50	1.051
1.40	0.75	1.023
1.36	1.00	0.924
1.30	1.25	0.970
1.25	1.50	0.944
1.16	2.00	0.890
1.09	2.50	0.852
1.03	3.00	0.814
0.979	3.50	0.770
0.939	4.00	0.743
0.874	5.00	0.682

0.846	5.50	0.650
0.822	6.00	0.632
0.801	6.50	0,607
0.781	7.00	0.585
0.767	7.50	0.565
0.753	8.00	0.545
0.730	9.00	0.506
0.705	10.00	0.478
0.671	12.00	0.422
0.644	14.00	0.377
0.615	17.00	0.322
0.505	20.00	0.278

CONJUGACION POR EL METODO DEL PERYODATO DE SODIO

REACTIVOS

- Buffer acetato de sodio 1 mM pH 4.4
- Solución A
- Acetato de sodio anhidro 8.24 g/1 litro de H₂O destilada.
- Solución B
- Acido Acético 6 ml en 1 litro de H₂O destilada.

Añadir 1 parte de A para 2 partes de B

Diluir 1/100 con agua destilada para obtener 1 mM. Verificar pH 4.4

- Buffer bicarbonato de sodio anhidro 0.2 M. pH 9.5
- Solución A
- Carbonato de sodio anhidro 0.2 M. 21.2g/litro de H₂O destilada.
- Solución B
- Bicarbonato de sodio 0.2 M. 16. 802g/litro de H₂O destilada

Adicionar A a B hasta obtener pH 9.5.

- Buffer carbonato bicarbonato. 0.01 M pH 9.5
 - Carbonato de sodio anhidro 1.59 g
 - Bicarbonato de Sodio 2.93g
- Disolver en 1 litro de H₂O destilada y ajustar el pH si es necesario
Diluir 1/5 para obtener 0.01 M.

- Buffer Borato 0.1 M pH 7.4
- Acido Bórico 24. 732 g en 4 litros de agua destilada
- Bórax: 19.07 g en 500 ml de agua destilada.

Añada aproximadamente 115 ml de Bórax a 4 litros de ácido bórico. Ajuste pH 7.4.

- Peryodato de Sodio
- Borohidruro de sodio
- Peroxidasa fracción VI
- Inmunoglobulina anti Dengue

PROCEDIMIENTO

- 1- Dializar 1 ml de inmunoglobulina anti Dengue a una concentración de 10 mg/ml, diluida en PBS durante toda la noche frente 1 litro de buffer carbonato- bicarbonato pH 9.6
- 2- Diluir 8 mg de enzima peroxidasa en 1 ml de agua destilada y adicionarle 0.2 ml de Peryodato de sodio.
- 3- Agitar esta mezcla lentamente durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- 4- Dializar frente a 1 litro de Acetato de sodio, pH 4.4 a 4°C durante toda la noche.
- 5- Al siguiente día, añadir 20 ul de buffer Bicarbonato pH 9.6 a la peroxidasa.
- 6- Mezclar la peroxidasa con la inmunoglobulina anti VD.
- 7- Mantener la mezcla en agitación lenta a temperatura ambiente durante 2 horas.
- 8- Adicionar 0.1 ml de Borohidruro de sodio.
- 9- Mantener en agitación lenta durante 2 horas a 4°C.
- 10- Precipitar el conjugado ya constituido con 1 ml de sulfato de amonio y se mantiene en agitación por 15 minutos.
- 11- Centrifugar a 3000 rpm por 30 minutos. A 4° C.
- 12- Descartar el sobrenadante y diluir el sedimento en 1 ml de PBS.
- 13- Dializar el conjugado frente a grandes volúmenes de PBS por 3 días.
- 14- Adicionar al conjugado, albúmina bovina sérica a 1% y glicerol a 50% y se almacena a -20 °C hasta su uso.

Referencias bibliográficas

1. Kuno, G., Gomez, I., and Gubler, D.J. (1991) An ELISA procedure for the diagnosis of dengue infections. *J Virol Meth*, **33**:101-113.
2. Tecnicas de Laboratorio para el diagnostico y la caracterización del virus del Dengue. Instituto de Medicina Tropical " Pedro Kouri" (IPK)
3. Clarke. D. H. And Casals, J. (1958). Tecnicas for hemaglutination and hemaglutination inhibition with athropod- borne virus. *Amer. J. Trop. Med. Hyg*, **7**. 561-573.
4. Burke DS, Nisalak A, and Ussery MA. Antibody capture immunoassay detection of immunoglobulin M and G antibodies in cerebrospinal fluid. *Journal of Clinical Microbiology*. 1992;16: 1034-1042.
5. Fernandez R. Vazquez S. (1990) Serological diagnosis of Dengue by an ELISA Inhibition method. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro*. **85**: 347-351.
6. Cardoso M.J. Tio P.H. Nimmannityas S. Nisalak A. Innis B.(1992) IgM capture ELISA for detection antibodies to Dengue virus: Comparison of two format. Using hemagglutinins and cell culture derived antigens. *Southeast Asian J. Trop. Med Public Health*. **23**(4): 726 -729.
7. Wilson B and Nakane P.(1984). Recent development in the periodate method of conjugating Horseradish peroxidasa (HRPO) to antibodies. *The J. Histochemistry and Cytochemistry*. **22**(12): 1079- 1089.
8. Morens, DM, Halstead S.B., Repik P.M., Putvatana R.P. and Raybourne, N. (1985) Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semimicro method in BHK-21 cells: Comparison test with standard plaque reduction neutralization. *J. Clin. Microbiol*, **22**: 250 -254.
9. Henchal, E.A. Gentry, M.K. McCown, J.M. and Brandt, W.E. (1982) Dengue virus specific and flavivirus group determinants identified with monoclonal antibodies by indirect immunofluorescence. *American Journal of tropical Medicine and Hygiene* **31**, 830-836. et al ,1982
10. Igarashi A (1978) Isolation of a singh's *Aedes albopictus* cell clone sensitive to dengue and chikunguya viruses. *J. Gen. Virol* **40**, 531 - 544.
11. Gubler DJ, Kuno G, Sather G.E. (1984). Mosquito cell cultures and specific monoclonal antibodies in surveillance for dengue viruses. *American J. Trop. Med and Hyg* **33**, 158 - 165.
12. Henchal E. A. Mc Cown J.M and Brand (1983). Rapid identification of Dengue virus isolate by using monoclonal antibodies in an direct immunofluoresence assay. . *American J. Trop. Med and Hyg* **23**, 164-169

13. Chomczynski P and Sacchi N (1987) Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162, 156-159.
14. Harris E, Robert G, Smith L, Selle J, Valle S, Sandoval E and Balmaseda A (1998). Typing of Dengue in clinical specimens and mosquitoes by single tubes multiplex RT-PCR. *J. Clin Microbiol.* 2634 - 2639.
15. Seah C.L., Chow. T. CH. (1994) Rapid single step RT-PCR of dengue virus using five NS3 gene primers. *J. Med. Virol*, 51, 193 - 200.
16. Balmaseda A, Téllez L, Sandoval E, Pérez L, Gutierrez CM, Videz E, Téllez Y, Gonzalez A, Harris E, Estandarización y aplicación del diagnóstico serológico del dengue en Nicaragua. :Submitted for publication.
17. Lanciotti R.S. Calisher C.H. Gubler DJ and Vorndam V. (1992). Rapid and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 545 - 551.
18. Centers for Disease Control and Prevention. Case definitions for public health surveillance. *MMWR.* 1990; 39 (RR-13):10-11.