



TÉCNICAS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO Y LA CARACTERIZACIÓN DE LOS VIRUS DEL DENGUE

**Laboratorio de Arbovirus
Departamento de Virología
Centro Colaborador de la OPS/OMS para el Estudio del Dengue y su
Vector**

**Instituto de Medicina Tropical “Pedro Kourí”
Ministerio de Salud Pública**

**La Habana, Cuba
2013**

INDICE

Seguridad en el Laboratorio.	1
Colecta de muestras para el diagnóstico de dengue.	5
Aislamiento del virus del Dengue.	9
Inmunofluorescencia.	28
Titulación del virus del Dengue y neutralización por reducción del número de placas.	33
Preparación de antígeno por el método de sacarosa - acetona.	42
Hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación.	45
Preparación de conjugado anti-Dengue - peroxidasa.	53
ELISA de captura de IgM.	58
ELISA de Inhibición.	63
Sistema Ultramicro-ELISA PLUS para la detección de Anticuerpos IgM al virus Dengue (UMELISA-DENGUE IgM PLUS).	67
SDS-PAGE / Western Blot	69
Detección de antígenos del virus dengue en tejidos embebidos en parafina.	75
Detección de apoptosis en tejidos embebidos en parafina.	81
Detección de los virus del Dengue mediante Reverso Transcripción/Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT/PCR).	88
Identificación de los subtipos de los virus del dengue mediante restricción enzimática.	101
Detección de la carga de virus dengue mediante reverso transcripción-reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT/PCR-TR ó CV).	104
Amplificación del genoma viral de los virus del dengue para secuenciación nucleotídica.	107
Secuenciación nucleotídica directa del producto de PCR.	110
Ensayo de Linfoproliferación a partir de células humanas de sangre periférica.	116

Ensayo de linfoproliferación a partir de esplenocitos de ratón.	118
Aislamiento de monocitos a partir de células mononucleares de sangre periférica (c.m.s.p.).	120
Detección de citoquinas intracelulares y marcadores celulares de superficie por citometría de flujo en cultivos de células mononucleares murinas estimuladas con antígenos/mitógenos.	121
Ensayo de inmunoamplificación.	123
Procedimiento para ELISPOT de interferón gamma.	125
Determinación del polimorfismo de los genes de citoquinas.	127

INDICE

Seguridad en el Laboratorio.	1
Colecta de muestras para el diagnóstico de dengue.	5
Aislamiento del virus del Dengue.	9
Inmunofluorescencia.	28
Titulación del virus del Dengue y neutralización por reducción del número de placas.	33
Preparación de antígeno por el método de sacarosa - acetona.	42
Hemaglutinación e inhibición de la hemaglutinación.	45
Preparación de conjugado anti-Dengue - peroxidasa.	53
ELISA de captura de IgM.	58
ELISA de Inhibición.	63
Sistema Ultramicro-ELISA PLUS para la detección de Anticuerpos IgM al virus Dengue (UMELISA-DENGUE IgM PLUS).	67
SDS-PAGE / Western Blot	69
Detección de antígenos del virus dengue en tejidos embebidos en parafina.	75
Detección de apoptosis en tejidos embebidos en parafina.	81
Detección de los virus del Dengue mediante Reverso Transcripción/Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT/PCR).	88
Identificación de los subtipos de los virus del dengue mediante restricción enzimática.	101
Detección de la carga de virus dengue mediante reverso transcripción-reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT/PCR-TR ó CV).	104
Amplificación del genoma viral de los virus del dengue para secuenciación nucleotídica.	107
Secuenciación nucleotídica directa del producto de PCR.	110
Ensayo de Linfoproliferación a partir de células humanas de sangre periférica.	116

Ensayo de linfoproliferación a partir de esplenocitos de ratón.	118
Aislamiento de monocitos a partir de células mononucleares de sangre periférica (c.m.s.p.).	120
Detección de citoquinas intracelulares y marcadores celulares de superficie por citometría de flujo en cultivos de células mononucleares murinas estimuladas con antígenos/mitógenos.	121
Ensayo de inmunoamplificación.	123
Procedimiento para ELISPOT de interferón gamma.	125
Determinación del polimorfismo de los genes de citoquinas.	127

SEGURIDAD EN EL LABORATORIO

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

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

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

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

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

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

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

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

Agente patógeno que suele provocar enfermedades humanas o animales graves, pero que de ordinario no se propaga de un individuo infectado a otro. En el laboratorio pueden transmitirse por aerosoles. En general no se dispone de medidas eficaces de tratamiento y prevención.

Grupo de Riesgo 4 (elevado riesgo individual y comunitario)

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

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

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

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

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

En el caso de los Arbovirus se siguen los mismos criterios que para el resto de los agentes patógenos aunque en particular, un Subcomité para la Seguridad

de Laboratorio en Arbovirus (SALS), perteneciente al Comité Americano sobre Arbovirus (ACAV), ha categorizado, acorde con la clasificación de la OMS, a cada uno de los virus registrados en el Catálogo de Arbovirus y Ciertos Otros Virus de Vertebrados.

Las categorizaciones del SALS, periódicamente actualizadas desde 1980, se basan en las evaluaciones de riesgo realizadas a partir de la información proveída por 585 laboratorios que trabajan con arbovirus en todo el mundo. Según esta categorización los virus del dengue han sido asignados al Grupo de Riesgo 2. Antes de 1988 se habían reportado 12 infecciones por dengue adquiridas en el laboratorio; desde 1988 a 1991 se documentaron 4 casos adicionales.

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

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

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

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

- No pipeteo con la boca.
- Uso de guantes para el trabajo con muestras de sangre u otros líquidos orgánicos y siempre que se prevea el contacto con material potencialmente infeccioso.
- Uso de batas, uniformes u otras prendas apropiadas. No se llevará la ropa de trabajo a áreas fuera del laboratorio.
- Descontaminación de jeringas y agujas. Es recomendable el uso de material desechable.
- Evitar la formación de aerosoles y gotas.
- Es aconsejable el empleo de cámaras de seguridad cuando existe un gran riesgo de formación de aerosoles.
- Limpieza rápida de los derrames cubriéndolos con un paño o papel mojado en solución desinfectante (hipoclorito de sodio: 10g en un litro). Debe dejarse actuar el desinfectante por lo menos 30 minutos antes de proceder a la recogida de los materiales y limpieza de las superficies contaminadas.
- Descontaminación diaria de las mesas y superficies al terminar el trabajo.
- Descontaminación de todos los materiales utilizados en el trabajo, incluyendo la ropa.
- Lavado de las manos después de manipular especímenes y siempre antes de salir del laboratorio.
- En caso de inyecciones, cortaduras o abrasiones accidentales, deben quitarse los guantes, lavarse las manos, facilitar el sangrado de la herida, aplicar desinfectante a la piel si procede y consultar a un médico.
- No fumar, comer, beber etc en el área de trabajo.
- No tener alimentos ni bebidas en los refrigeradores del laboratorio.
- Las centrifugas deben estar equipadas con mecanismos de seguridad para que aerosoles potenciales de material infeccioso no se diseminen.
- Para centrifugar deben utilizarse de preferencia tubos plásticos con tapa de rosca.

- Debe existir un reglamento interno de bioseguridad así como un responsable que garantice su cumplimiento. Deben existir un plan de medidas a tomar en caso de accidente.
- El personal del laboratorio debe estar vacunado (de existir las vacunas) contra los agentes que se trabajan.
- El estado de salud de los trabajadores debe chequearse periódicamente.
- Las áreas de trabajo deben estar adecuadamente señalizadas como de "acceso restringido".
- Todos los materiales contaminados, muestras y cultivos, tienen que ser descontaminados antes de su eliminación o limpieza para reutilización (preferiblemente autoclave o incineración).

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

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

COLECTA DE MUESTRAS PARA EL DIAGNOSTICO DE DENGUE

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

Documentación del paciente e identificación

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

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

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

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

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

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

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

Cada contenedor debe tener los siguientes rótulos: URGENTE, FRAGIL, MATERIAL MEDICO, MANTENER EN FRIO, MANTENER EN POSICIÓN VERTICAL.

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

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

AISLAMIENTO DEL VIRUS DEL DENGUE

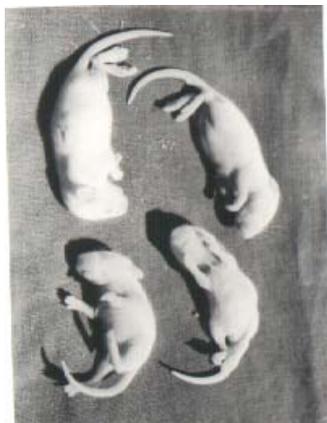
Uno de los sistemas biológicos mas empleados en el aislamiento del virus dengue, a pesar de su baja sensibilidad, ha sido el ratón lactante inoculado por vía intracerebral. También se han utilizado diferentes sistemas celulares de mamíferos entre los que se encuentran las líneas celulares: BSC-1, VERO, BHK-21, LLCMK2.

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

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

Ratón lactante

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



3. Si se observa cualquier signo de enfermedad debe realizarse un pase en el mismo sistema (para adaptar la cepa) y en otro más sensible de ser posible. Para realizar el pase, los ratones son desinfectados con alcohol al 70% y sus cerebros son cosechados guardándose a temperaturas de -70°C ó de lo contrario se prepara una suspensión al 10%(v/v) utilizando medio de cultivo o PBS con 2% de SFB, la que puede almacenarse a igual temperatura o procesarse inmediatamente.
4. La identificación rápida puede hacerse por Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) utilizando Líquidos Ascíticos Hiperinmunes (LAH) y anticuerpos monoclonales (AcM) o por Neutralización. También puede prepararse un antígeno por el método de extracción de sacarosa-acetona para identificar mediante la técnica de Inhibición de la Hemaglutinación (IH).

Células de Mamíferos

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

1. Inocular, en frasco de 25 cm² con monocapa celular confluyente, 0.5 ml del suero previa decantación del medio del frasco. En algunos casos se prefiere diluir la muestra en medio de cultivo (1\20-1\30) para eliminar el efecto tóxico que pueda producir en las células.
2. Incubar a 37°C por una hora y añadir posteriormente el medio de mantenimiento de las células.
3. Observar durante 7 días la aparición de Efecto Citopatógeno (ECP): redondeamiento y desprendimiento de las células.
4. Congelar y descongelar por 3 veces y realizar un pase en el mismo sistema para aumentar el título viral.
5. De no observarse ECP, puede hacerse de rutina un plaqueo viral o una detección por IFI para saber si se ha multiplicado algún virus.

6. La identificación rápida se hace por IFI y la confirmación por reducción del número de placas por neutralización.

Cultivos celulares de mosquitos

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

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

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

Recientemente ha comenzado a utilizarse una sublínea del clono C6\36 capaz de multiplicarse a 34°C. Algunos autores plantean que esta sublínea de alta temperatura (C6\36 HT) resiste sólo varias semanas de mantenimiento bajo estas condiciones y proponen tomar el clono original de 28°C y readaptarlo a crecer a 34°C cada vez que el deterioro provocado por la elevada temperatura lo exija; entre los investigadores de la región se ha propagado esta sublínea C6\36 HT que ha demostrado mayor eficacia para el aislamiento viral al adelantar la detección por IFI (inmunofluorescencia indirecta) y aumentar el número de aislamientos.

Como método general se inocula la muestra, se espera de 10 a 14 días (observando la posible aparición de efecto citopatogénico (ECP)) y se realiza IFI, primero como “screening” utilizando un “pool” de sueros humanos positivos o

líquidos ascíticos hiperinmunes (LAH). En los casos positivos se realiza una IFI utilizando Acs monoclonales específicos a los 4 serotipos del dengue. En ocasiones se presentan dificultades al utilizar estos anticuerpos monoclonales dada la alta especificidad de los mismos, el bajo título viral y el grado de ECP entre otros factores.

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

Inoculación intratorácica de mosquitos

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

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

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

La zona de inoculación en el mosquito depende del sexo y la especie. Generalmente para los machos se usa la membrana del cuello y para las hembras, o bien en el cuello o en la sutura debajo del primer espiráculo torácico. El equipo diseñado por Rosen et al., es de fácil manejo y permite controlar el volumen de suspensión viral a inocular. La parte que más se debe reponer es el capilar-aguja, el cual debe ser aguzado al calor o en un equipo especial. Estos capilares son graduados a distancias de 1mm lo que corresponde a un volumen de 0,17µL

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

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

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

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

Materiales:

- Capilar aguja: Diámetro exterior 0.7-1 mm, diámetro interior aproximadamente 0.5 mm y grosor de la pared 0.2 mm.
- Porta capilar.
- Jeringuilla de 20 cc.
- Tubos de goma.
- Llave de 3 salidas.
- Microscopio estereo.

Método:

1. Preparar el sistema de inoculación y materiales a utilizar.
2. Colocar los mosquitos en tubo de cristal y dentro de un baño de hielo por espacio de 10 - 15 minutos.
3. Cargar el capilar con la suspensión del material a inocular evitando que el líquido llegue al porta-capilar.
4. Colocar el mosquito sobre la platina del estereo para localizar el área de inoculación.

5. Introducir aproximadamente 1 mm de la punta del capilar en la zona de inoculación y accionar la jeringuilla de manera tal que deje pasar 1 mm de suspensión viral (0,17 uL).
6. Colocar el mosquito en una pequeña jaula sin tocarlo y sobre esta colocar un algodón embebido en una solución de sacarosa al 10%.
7. La jaula es colocada dentro de una bolsa de plástico transparente como medida de seguridad para evitar el escape de los mosquitos inoculados.
8. Los mosquitos deben ser observados a las 24 horas para detectar la mortalidad ocasionada por la inoculación.
9. El tiempo para colectar los mosquitos después de inoculados dependerá del virus o de los propósitos de investigación.
10. La detección viral se puede realizar por medio de las siguientes técnicas: FC, IFI, neutralización (Nt), ELISA y otras.

LÍNEA CELULAR C6\36

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

Medios y Materiales:

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

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

Se requieren pipetas de 5-10 mL con la punta doblada en ángulo de 90 grados o policia de goma.

Siembra de las células

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

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

Congelación

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

Descongelación

1. Saque el ampula del nitrógeno y échela directamente en agua a 37°C hasta que se descongele su contenido.
2. Desinfecte el ampula (exterior) con alcohol al 70%
3. Con una pipeta de 1 mL extraiga el contenido del ampula y échelo en un frasco de 25 cm² que contenga 4.9 ml de medio de crecimiento. Guarde a 28°C .
4. Cambie el medio a las 24 horas, por medio fresco de crecimiento.

5. Cuando la monocapa esté completa pase las células con split 1:5 inicialmente, luego puede restablecer el split acostumbrado.

Inoculación

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

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

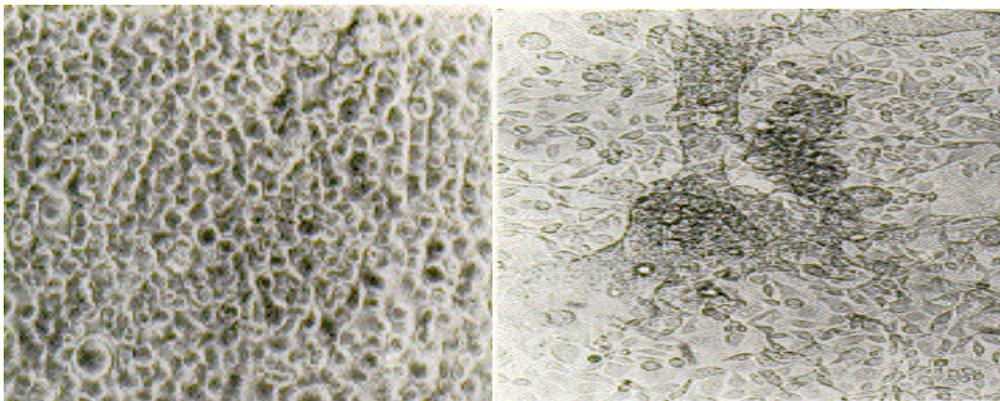


Foto 1

Foto 2

Línea Celular TRA-284-SF

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

Materiales:

- Medio de crecimiento: L-15 + 50 % decaldo Triptosa Fosfato (TBP) al 2.9 %
- Policía de goma
- Dimetil Sulfoxido (DMSO)

Multiplicación de la línea

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

Congelación

1. Coloque un frasco de 10 mL en baño de hielo.
2. Decante el medio del frasco de 25 cm².
3. Añada 1 mL de medio fresco.
4. Desprenda las células con el policía de goma.
5. Con una pipeta de 1 mL tome la suspensión celular y póngala en el frasco sobre el baño de hielo.
6. Añada 0.1mL de DMSO al frasco (del baño de hielo) que contiene la suspensión celular.
7. Ponga en un ampulla de congelación y guárdela a -20° C durante 30 minutos.

8. Manténgala en una caja de poliespuma a -70°C durante toda la noche.
9. Pase el ampulla directamente a nitrógeno líquido (-196°C).

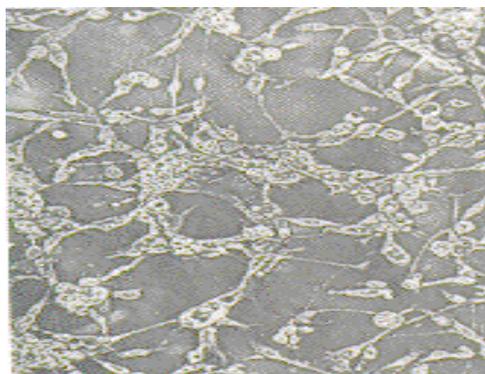
Descongelación

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

Inoculación

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

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



Línea Celular AP-61

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

Materiales:

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

Medio de mantenimiento

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

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

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

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

Medio de crecimiento MM/VP12 combinado:

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

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

Al preparar 1600mL, el pH es de aproximadamente 6.5, llevar hasta 6,8 con 5 ml de KOH 2%.

Propagación de la línea

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

1. Preparar el medio de crecimiento de acuerdo al volumen requerido (para propagar la línea se utiliza el medio de crecimiento).
2. Eliminar el medio del frasco que se va a pasar y añadir 1 mL de medio MMVP12 de crecimiento (para un frasco de 25cm²).
3. Desprender las células usando un policia de goma.
4. Dispersar las células pipeteando varias veces con una pipeta Pasteur o pipeta de 1 mL.
5. Si se usa más de un frasco, hacer un "pool" de células.
6. Contar las células: Usar 1 volumen de la suspensión de células y añadir 1 volumen igual de tripan azul al 0.4 % en solución salina. (Esta dilución de 1:2 debe ser tomado en cuenta en el conteo).

7. Calcular el volumen total de células necesarias de acuerdo a la cantidad de frascos a sembrar (preparar 10 ml extra)
8. Para obtener la monocapa en tres días, sembrar los pases bajos a 5×10^5 células /mL y los pases altos a 4×10^5 células/mL.
9. En la práctica se toma 0,1 mL de la suspensión celular y se añade a un frasco de 25cm² conteniendo 4,9 ml de medio de crecimiento. Incubar a 28°C. La monocapa debe completarse en una semana.
10. Aunque el split de la línea es 1:10 semanal, se debe comenzar desde 1:3 (después de la descongelación) hasta que la misma esté completamente adaptada a las condiciones del laboratorio.

Preparación de células para inocular

1. De un frasco de 25 cm² realizar el desprendimiento celular como se describió anteriormente, utilizando como medio de crecimiento L-15 + 10% TPB (Caldo Triptosa Fosfato en solución al 2,9%) + 10% SFB. El medio de mantenimiento posterior a la inoculación es igual pero con SFB al 2%.
2. Tomar 0,3 mL de la suspensión celular y añadirlo a un frasco plástico de 25cm² que contenga 4,7 mL de medio de crecimiento para la inoculación. La concentración celular aproximada es de 4×10^5 para que la monocapa sea semiconfluyente en 3 días que es el momento idóneo para la inoculación.
3. Incubar a 28°C.

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

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

Congelación

1. Eliminar el medio de un frasco Roux de 3 ó 4 días de sembrado con monocapa celular semiconfluyente.
2. Colocar 4 mL de medio MMVP12 y 1 ml de SFB en un frasco de 10 mL (rotular como # 1 y poner en baño de hielo).
3. Colocar 4 ml de medio MMVP12 y 1 ml de DMSO en otro frasco de 10 mL, rotularlo como # 2 y ponerlo en baño de hielo.

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

Descongelación

1. Extraiga un ampula del nitrógeno y descongélela completamente a 37 C en baño de agua.
2. Extraiga el contenido de la misma con una pipeta de 1 mL y pásela a un frasco de 25 cm² que contenga 4 mL de medio de crecimiento (MMVP12 + 10% de SFB).
3. Incubar a 28° C y cambiar el medio a las 24 h.
4. Pasar con split 1:2 o 1:3 cuando se complete la monocapa.

Aislamiento de virus Dengue en AP61

1. Eliminar el medio a los frascos plásticos de 25cm² sembrados para inocular.
2. Inocular 0,2 mL de suero. Los sueros pueden ser tóxicos para las células por lo que en ocasiones se prefiere diluirlos 1:10 o 1:20. Los sueros hemolíticos frescos, o la sangre congelada son menos tóxicos, pudiendo inocularse 0,2 mL. Las suspensiones de macerados de larvas o mosquitos adultos pueden inocularse en volúmenes de hasta 1mL. Si en lugar de frascos de 25 cm² se utilizan tubos de cultivo, puede inocularse 0,2 mL de la muestra diluida 1:10 en medio de mantenimiento L-15.
3. Incubar por 1 h a 28°C.
4. Añadir el medio de mantenimiento (L-15 + 10% TPB + SFB 2%).
5. Incubar a 28°C por 14 días. Generalmente no se necesita un cambio de medio.

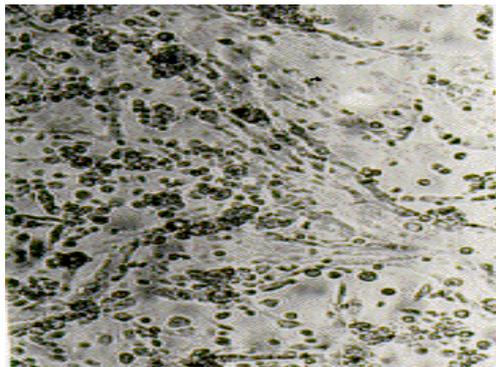
6. Observar al microscopio diariamente y cambiar el medio si se observa toxicidad.

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

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

Para la identificación se debe guardar una alícuota del sobrenadante a -70°C . Las células pueden ser fijadas para inmunofluorescencia o puede realizarse una neutralización por reducción de placas o una fijación de complemento utilizando como antígeno el sobrenadante y como antisuero líquidos ascíticos hiperinmunes específicos de referencia.

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



Línea Celular C6\36 HT

Las células de mosquito se cultivan tradicionalmente a 28°C, sin embargo Zhu y cols., demostraron que el clono C6\36 podía adaptarse a crecer a 36°C pero bajo esas condiciones las células dejan de multiplicarse cuando la temperatura sobrepasa los 35°C. Así, Kuno y Oliver (1989) enuncian que las líneas de células de insectos, altamente sensibles y acostumbrada a crecer a 28°C al adaptarse a temperaturas mas elevadas mejoran su capacidad para la replicación viral (siempre que la temperatura no exceda los 35°C).

Esta sublínea C6\36 HT está adaptada a crecer a 34°C por Kuno y cols. Exhiben el mismo ECP que las C6\36 originales aunque éste se manifiesta mas rápidamente y se obtienen mayores títulos virales que a 28°C.

Materiales:

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

Propagación de las células

1. Elimine el medio de crecimiento de las células del frasco de 25cm².
2. Añada 1ml de medio fresco y desprenda las células golpeando vigorosamente el frasco.
3. Homogenice con pipeta Pasteur o de 1mL.
4. Resuspenda en medio de crecimiento de acuerdo al fin de las células en cultivo:
 - a) Si es para el pase de la línea realizar un split de 1:8 ó ajustando la concentración a 1x10⁴ cel/ml.
 - b) Si se prepara para aislamiento, aplique un split de 1:3-1:4 ó ajustando la concentración 1x10⁵ cel/ml. Podrá utilizarse en 48h. Por tanto de un frasco de 25cm² se pueden preparar 75 tubos aproximadamente.
5. Incubar a 34°C.

Congelación.

Similar a la sublínea C6\36.

Descongelación.

Similar a la sublínea C6\36.

Inoculación en tubos.

1. Decantar el medio de cada tubo.
2. Inocular 100uL de una dilución 1:30 del suero.
3. Incubar por 1h a 34°C si hay evidencias de citotoxicidad, elimine el vehículo.
4. Añadir el medio (1mL) de inoculación o mantenimiento.
5. Incubar a 34°C 9-10 días y observar diariamente.
6. Realizar una IFI antes de dar la muestra como negativa.

AISLAMIENTO DE VIRUS DENGUE EN CÉLULAS C6/36 HT POR EL MÉTODO DE CENTRIFUGACIÓN RÁPIDA (SHELL VIAL)

Muestras para el aislamiento viral: Suero o sangre de pacientes en fase aguda, fragmentos de tejidos obtenidos durante la autopsia de casos fatales (hígado, bazo, cerebro, ganglios linfáticos, pulmón, etc.) y mosquitos infectados.

Sistemas de aislamiento: Cultivos Celulares: LLC-MK₂ (riñón de mono Rhesus), Vero (riñón de mono verde), BHK-21 (riñón de hámster recién nacido), AP-61 (*Aedes pseudoscutellaris*) 28°C, TRA-284 (*Toxorhynchitisamboinensis*) 28°C, C6/36 Sublínea de AAL (*A. albopictus*) 28°C y C6/36HT Sublínea de C6/36 de alta temperatura 34°C

SHELL VIAL. Consiste en la centrifugación de la muestra durante el tiempo de contacto virus-célula sobre una superficie excavada o el fondo de un tubo en el cual se encuentren las células y se realiza a la temperatura óptima para el virus. Tiene como objetivo favorecer la adsorción y la penetración del virus a las células.

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

Método:

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

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

Referencias:

Rodríguez-Roche R, Alvarez M, Guzmán MG, Morier L and Kouri G. Isolation of dengue 2 virus in C636/HT cells by rapid centrifugation/shell vial assay. Comparison with conventional virus isolation method. J Clin Microbiol.2000; 38: 3508-3510.

INMUNOFLUORESCENCIA

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

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

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

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

Principio de la técnica

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

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

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

La extensa variedad de estructuras y propiedades físico-químicas de los antígenos implica que sus requerimientos para ser marcados con el fluorocromo variarán para cada caso en específico, de ahí que se haya generalizado el procedimiento de marcar los anticuerpos (todos los anticuerpos son proteínas). Por ello, la IF se conoce también con el nombre de Técnica de Anticuerpos Fluorescentes.

Microscopio para fluorescencia

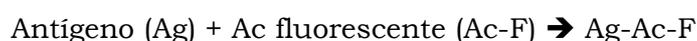
El principio de funcionamiento del microscopio para la fluorescencia es similar al de un microscopio óptico convencional, pero en el caso del primero ha de utilizarse un sistema de excitación que proporcione una energía tal que sea capaz de excitar a los fluorocromos empleados para marcar los anticuerpos.

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

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

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

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



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

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

Ag + Ac primario → Ag-Ac primario

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

Este método, en comparación con el directo, presenta 3 ventajas fundamentales: es más sensible, sirve para detectar tanto Ag como Ac y se puede trabajar una amplia variedad de Ag-Ac siempre que se utilicen sueros de la misma especie.

Preparación del sustrato antigénico para la inmunofluorescencia

Ratón:

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

Células:

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

Procedimiento para la IF Indirecta

1. Sobre la muestra se añade el antisuero específico en la dilución apropiada y en cantidad suficiente para cubrirla por completo (aproximadamente 10 ml de esta solución). El antisuero específico puede ser líquido ascítico hiperinmune de referencia, sueros hiperinmunes, sueros de pacientes en fase convalescente, anticuerpos monoclonales y otros en dependencia del objetivo

de la experiencia. Las láminas se mantienen a 37° C durante una hora en cámara húmeda.

2. Posteriormente se colocan las láminas en los vasos koplín. Se añade PBS que se elimina al instante. Se agrega nuevamente PBS y se realiza un lavado de 5 minutos, se elimina el PBS y de esta misma forma se realizan otros lavados dos lavados.
3. Se extraen las láminas de los vasos koplín, se dejan secar a temperatura ambiente y entonces, se añade el conjugado comercial que ha sido previamente titulado para determinar la dilución de trabajo. Esta dilución se prepara utilizando PBS + Azul de Evans, que servirá de contraste.
4. Las muestras se mantienen en contacto con el conjugado durante 30 min a 37° C en cámara húmeda.
5. Después de lavadas, las láminas se secan a temperatura ambiente y se añaden 2 gotas por lámina de glicerina buferada (9 volúmenes de glicerina + 1 volumen de Tris 100 mM). Sobre la glicerina se coloca cuidadosamente el cubreobjeto con un ángulo de 45 grados con respecto a la superficie de las láminas de forma tal que no se forme burbujas que dificulten considerablemente la observación al microscopio.
6. Se observan las láminas al microscopio para fluorescencia y se determina si las muestras son positivas o negativas teniendo en cuenta lo observado en los controles que deben incluirse en cada experiencia. La IF específica, en el caso del virus dengue, se describe como citoplasmática perinuclear.

Referencias:

1. Henchal EA, McCown JM, Seguin MC, Gentry MK, Brandt WE. Rapid identification of dengue virus isolates by using monoclonal antibodies in an indirect immunofluorescence assay. *Am J Trop Med Hyg* 1983;32(1):164-9.

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

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

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

Título de Dengue por micrométodo

Medios y soluciones:

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

MEM con glutamina 2mM y aminoácidos no esenciales 1%	90 ml
Suero fetal bovino	10 ml
Antibióticos	0.1 mL

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

➤ Medio Overlay:

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

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

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

➤ Colorante: Naphthol Blue Black (NBB)

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

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

Materiales y Equipos:

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

Siembra de células BHK21 Clono 15

1. Frasco Roux de monocapa completa (5 ó 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 durante 5-10 minutos a 37° C (el desprendimiento se hará evidente).
5. Añadir 9 ml de medio de crecimiento. Resuspender las células pipeteando vigorosamente (10-15 veces).
6. Comprobar que la monocapa se ha desprendido completamente.
7. Distribuir 3 ml de células por cada frasco Roux (de cada Roux 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 5-7 días. Aproximadamente a los 4-5 días la monocapa será confluyente y las células crecerán de forma organizada en remolinos.

Preparación de las células para la titulación del virus

1. Calcular el número de células necesarias para la prueba (2.5×10^5 células / ml x 0.5 ml / pozuelo x 24 pozuelos x placa). Hacer una cantidad extra (aproximadamente de un frasco de 75 cm², se obtienen 3-6 x 10 células). Un frasco de 75 cm² de monocapa confluyente (4-5 días) da para 10 placas.
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/pozuelo.

Congelación de las células BHK-21

1. De un frasco Roux 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 r.p.m.
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 dimetilsulfóxido. 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 el medio del frasco # 2 y añadir lentamente, gota a gota y agitando, el contenido del frasco # 2 en el # 1. Siempre en baño de hielo.
6. Distribuir 1 mL de la suspensión (aprox. 1×10 células / mL) por ampula (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 poliestireno y guardar a -70° C por 24 horas. Pasarlas después a nitrógeno líquido.

Descongelación de células BHK-21

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 celular se complete, pasar la línea en split 1:2.

Título de Dengue en células BHK21

1. Preparar un grupo de tubos marcados desde 10^{-1} y hasta 10^{-7} , dependiendo del título viral sospechado.
2. Pipetear asépticamente 0.9 ml del diluyente (medio Hanks + 0.5% STF) en cada uno de los tubos. Mantener en hielo.
3. Descongelar rápidamente un vial del virus (preferiblemente a 37° C). Transferir 0.1 mL del virus al primer tubo con diluyente, eliminar la pipeta
4. Mezclar vigorosamente en el agitador.
5. Transferir con una pipeta nueva 0.1 mL 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 dengue 1, 3 y 4. Para dengue 2 puede encontrarse entre 7- 8,5
12. Incubar a 37° C por 8 días para el dengue 4, 5 días para el dengue 2 y 9 días para el dengue 1 y 3, en incubadora de CO₂ 5%.
13. Descartar el medio. Lavar suavemente con agua corriente. Teñir las células con NBB (0.5 mL por pozuelo). Después de 30 minutos lavar con agua de nuevo. Las placas pueden ser contadas inmediatamente o cuando se sequen.

Neutralización por reducción del número placas

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

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

6. Utilizar una pipeta "Eppendorf" de 100 µL, añadir 100 µL de cada suero o de las diluciones de sueros en estudio. Mezclar 5 veces.
7. Cubrir la placa y mantener a 37°C por 1 hora.
8. Marcar las placas de 24 pozuelos y añadir 0.5 mL de la suspensión de células BHK2.
9. Dejar las células en reposo durante 1 hora a temperatura ambiente.
10. Inocular 50 uL de la mezcla virus-suero a cada pozuelo (por triplicado).
11. Incubar por 4 horas a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂.
12. Añadir a cada pozuelo 0.5 mL del medio overlay.
13. Incubar a 37°C en CO₂ por 8 días para dengue 4, 5 días para dengue 2 y 9 días para dengue 1 y 3.
14. Teñir las placas de la misma forma que se describió en el tópico de titulación viral.

Lectura de las placas

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

$$\text{Título UFP/mL} = \frac{P \times 10^x}{V}$$

Dónde:

P: Promedio del número de placas obtenido en la dilución en que se contaron las placas.

10^x: Dilución en que se contaron las placas (Factor de dilución).

V: Volumen del inóculo expresado en mL

Nota: Siempre que se utilice un volumen de inóculo de 50 µL la fórmula queda de al siguiente forma: **Título UFP/mL = P x 10^x x 20**

Ejemplo:

Dilución	# de placas			Promedio
10 ⁻¹	NC	NC	NC	NC
10 ⁻²	15	19	17	17
10 ⁻³	4	3	2	3
10 ⁻⁴	0	0	0	0

NC - No contable

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

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 más concentrada de la que muestra el número ideal de placas. Por ejemplo: Si en la dilución 1/10000 se observa un promedio de placas virales entre 20 y 30 (número ideal de placas), la dilución de trabajo adecuada será de 1/5000

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

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

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

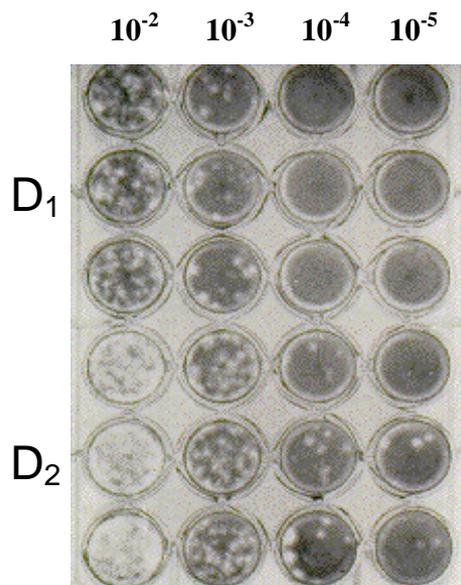
	# de placas			Promedio (P)
Control de Virus (CV)	19	20	21	20
Virus + suero (V+S)	6	4	5	5

$$\% \text{ de reducción} = \left(1 - \frac{P(V+S)}{P(CV)}\right) \times 100 = \left(1 - \frac{5}{20}\right) \times 100 = 75\%$$

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

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



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

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

Referencias

1. Morens, D.M., Halstead, S.B., Repik, P.M., Putvatana, R.P., and Raybourne, N. Simplified plaque reduction neutralization assay for dengue viruses by semimicro methods in BHK-21 cells: Comparison of the BHK suspension test with standard plaque reduction neutralization. *J. Clin. Microbiol.* 1985; 22: 250-54
2. Alvarez M, Rodriguez-Roche R, Bernardo L, Morier L, Guzman G. Improved Dengue Virus Plaque Formation on BHK21 and LLCMK2 Cells: Evaluation of Some Factors. *Dengue Bulletin* 2005;29.

PREPARACIÓN DE ANTÍGENO POR EL MÉTODO DE SACAROSA-ACETONA

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

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

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

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

Materiales y Equipos:

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

Reactivos:

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

Obtención de cerebros de ratones infectados:

1. Inocular por vía intracerebral los ratones lactantes de 1-2 días de nacidos con 0.02 ml de una suspensión de cerebro de ratón infectado con alguno de los serotipos en cuestión. Esta suspensión usualmente se prepara a una dilución 1/50 del cerebro en PBS con 5 % de suero de ternera inactivado por calor y antibióticos. Puede usarse en lugar de PBS, medio 199 u otro.
2. Examinar los ratones inoculados entre el 4to y el 7mo día post inoculación (dependiendo de la cepa y el serotipo inoculado) en busca de los signos de la enfermedad. Cuando la mayoría de los ratones estén enfermos deben congelarse preferiblemente a -20 ó -70° C hasta su uso.
3. Los ratones se desinfectan con alcohol al 70% y se dejan secar. El tejido cerebral de cada ratón se extrae asépticamente por aspiración colocándolo en un frasco con hielo.
4. Para preparar el antígeno pueden utilizarse los cerebros previamente extraídos y guardados a -70 C o pueden guardarse los ratones a -20 ó -70° C hasta el día antes de la preparación del antígeno momento en el cual se dejan durante toda la noche a 4°C para su descongelación y posterior extracción del cerebro.

Extracción del antígeno

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

1. Por cada volumen de cerebro de ratón extraído añadir 4 volúmenes de sacarosa al 8.5 % en agua destilada. Homogenizar la suspensión exhaustivamente en frío.
2. Añadir la suspensión de cerebro a 20 volúmenes de acetona fría (kitasato). Utilizar para esto una aguja #18 larga sumergida en la acetona.
3. Agitar vigorosamente en ambos sentidos y dejar reposar en baño de hielo durante 15 minutos.

4. Aspirar la acetona completamente y añadir otros 20 volúmenes de acetona fría. Romper el precipitado con un agitador de vidrio. Dejar sedimentar el antígeno y reposar en baño de hielo durante 1,5 horas con agitación ocasional durante la primera hora.
5. Aspirar la acetona y secar el precipitado utilizando una bomba de alto vacío (10^{-2} mB) hasta la aparición de un polvo rosado claro (aproximadamente 30 min).
6. Rehidratar con buffer tris-borato salina + 5% sacarosa a 0.5 volúmenes del homogenizado de cerebro-sacarosa (el tris se prepara al 1 M en cloruro de sodio al 0,85% y posteriormente se lleva a 0,1 M en buffer borato-salina pH 9 chequeándose este posteriormente).
7. Dejar rehidratando toda la noche a 4°C con agitación.
8. Centrifugar 30 minutos a 4°C a 3000 rpm y desechar el precipitado.
9. Para inactivar el antígeno se añade BPL para una concentración final de 0.1% para dengue 1, 3 y 4; al 0.19 % para dengue 2. Agitar bien y mantener a 4°C durante 48 horas.
10. Distribuir en alícuotas para guardar a -70°C o para liofilizar y guardar a -20°C.
11. Chequear si la inactivación fue efectiva inoculando con el antígeno inactivado por vía intracerebral dos familias de ratones lactantes y observar por 21 días.
12. Para los virus Dengue la concentración de BPL es crítica de acuerdo al serotipo, ya que concentraciones mayores reducen la actividad del antígeno.
13. Durante el proceso de extracción deben reenvasarse varias ámpulas conteniendo cerebro de ratón solo en suspensión al 10% (en PBS o medio de cultivo + suero de ternera al 5% + 100 U por ml de antibióticos) las cuales se guardarán a -70° C y servirán como virus "semilla" para el próximo pase en ratones y de esta forma mantener el virus.

HEMAGLUTINACIÓN E INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN

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

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

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

Equipos:

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

Reactivos:

- Solución de Alsever

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

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

- Glóbulos rojos de ganso, adulto, macho (sangrar sólo cada 6 semanas). Las hembras no se utilizan ya que los cambios en el ciclo hormonal pueden variar los títulos hemaglutinantes.
- Cloruro de sodio 1.5 M.
- Fosfato dibásico de sodio (Na₂HPO₄.12 H₂O) 0.5 M.
- Fosfato monobásico de sodio (NaH₂PO₄.2H₂O) 1 M.

- Ácido Bórico 0.5 M.
- Solución borato salina pH 9.
- Albúmina bovina (fracción V) al 0.4 % en buffer borato salina, pH 9 (BABS)
- Kaolín (lavado en ácido) al 25% en buffer borato salina (Flow laboratories) del utilizado para el diagnóstico de Rubéola.
- Antígenos (preparados por el método sacarosa-acetona).
- Soluciones stocks:

NaCl (1.5 M).	87.6g en 1000mL de agua destilada
NaH ₂ PO ₄ (anhidro) 1M	120g en 1000 mL de agua destilada
Na ₂ HPO ₄ (anhidro)0,5 M	70.59g en 1000mL de agua destilada

- Solución A (pH 8.8):

- Solución B (pH 4.3):

NaCl(1.5M)	100 mL
NaH ₂ PO ₄ (1 M)	200 mL
Completar con agua destilada	1000 mL

Tabla de Valores de pH

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

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

➤ Soluciones stocks para buffer borato-salina pH 9:

NaOH(1.0M)	40.02g	Completar hasta 1000mL con agua destilada.
BO ₃ H ₃ (0.5 M)	30.912g	Completar hasta 1000mL con agua destilada.
NaCl(1.5 M)	87.6g	Completar hasta 1000mL con agua destilada.

Buffer borato-salina:

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

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

➤ Albúmina bovina 0.4%:

Albúmina bovina	0.8 g
Buffer borato salina pH 9	200 mL

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

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

Preparación de los glóbulos rojos de ganso:

1. Extraer la sangre de forma estéril (1 parte de sangre y 4 de Alsever). Usar una aguja de # 20. Filtrar por gasa estéril.
2. Lavar las células 3 veces en solución salina (0.9g de NaCl en 100 mL de agua destilada) o PBS. Centrifugar en un tubo de fondo redondo y posteriormente de fondo cónico a 1000 rpm por 10 minutos a 4°C. Eliminar el sobrenadante.

3. Para la técnica preparar una solución al 0.5 % de glóbulos en los buffers de diferentes pH previamente ajustados.
4. Si no se emplean los glóbulos inmediatamente pueden ser guardados a 4°C en solución salina o PBS

Tratamiento de los sueros con Kaolín:

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

1. Tomar 0.1 mL de suero.
2. Añadir 0.4 mL buffer borato salina pH 9 (el suero queda diluido 1:5).
3. Añadir 0.5 mL de Kaolín previamente agitado.
4. Agitar la mezcla.
5. Dejar a temperatura ambiente por 20 minutos con agitación ocasional.
6. Centrifugar a 2,500 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente.
7. El suero queda diluido 1:10.

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

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

Hemaglutinación (HA)

1. Hidratar los antígenos liofilizados y mantenerlos a 4°C por al menos 1 hora, pero preferiblemente toda la noche.
2. Preparar diluciones seriadas (al doble) en las placas previamente rotuladas, a los diferentes pH de trabajo (el pH óptimo para el antígeno, el valor superior de pH y el valor inferior). De no conocer el pH óptimo de cada antígeno, debe titularse a todos los pH.
3. Añadir 0,025 mL de BABS a cada pozuelo de la placa.
4. Añadir 0,025 mL del antígeno al primer pozuelo de cada hilera.
5. Hacer diluciones al doble comenzando por el primer pozuelo y utilizando pipetas “multicanal”.
6. Agitar la placa.
7. Añadir 0,025 mL de la solución glóbulos rojos al 0.5% preparados en cada uno de los diferentes pH.
8. Agitar y dejar reposar de 30-40 minutos a temperatura ambiente.
9. Leer la hemaglutinación (una capa fina y bien distribuida de glóbulos).

Para determinar el título hemaglutinante y el pH óptimo de antígeno se usa como punto final la más alta dilución de antígeno que muestra aglutinación completa (título del antígeno). El pH óptimo es aquel donde el título del antígeno es mayor. Para la IH se utiliza una dilución de antígeno que contenga de 4 a 8 unidades hemaglutinantes (UH) por 0,025 ml:

Ejemplo:

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

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

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

Patrón de hemaglutinación:

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

Inhibición de la hemaglutinación (IH)

1. Rotular las placas con el número de los sueros a probar y el antígeno a utilizar. Es recomendable usar una placa por antígeno. Los sueros son probados utilizando 4, 8 ó 12 diluciones de los mismos contra el antígeno; dependiendo esto del tipo de suero, del propósito y de la experiencia del laboratorio en el diagnóstico o encuestas serológicas. Los pares de suero de un paciente deben ser tratados y probados en el mismo ensayo.
2. Añadir 0,025 mL de BABS a cada pozuelo.
3. Añadir 0,025 mL del suero a titular en el primer pozuelo de cada hilera.
4. Diluir los sueros con pipeta “multicanal”.
5. Añadir a cada pozuelo 0,025 mL de la dilución de antígeno que contiene 8 unidades hemaglutinantes.
6. Agitar y dejar reposar a temperatura ambiente durante 45 minutos.
7. Añadir 0,05 ml de glóbulos rojos diluidos en el pH óptimo para el virus.
8. Agitar y dejar reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Lectura:

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

Controles:

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

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

Suero 1 (<20\<20)

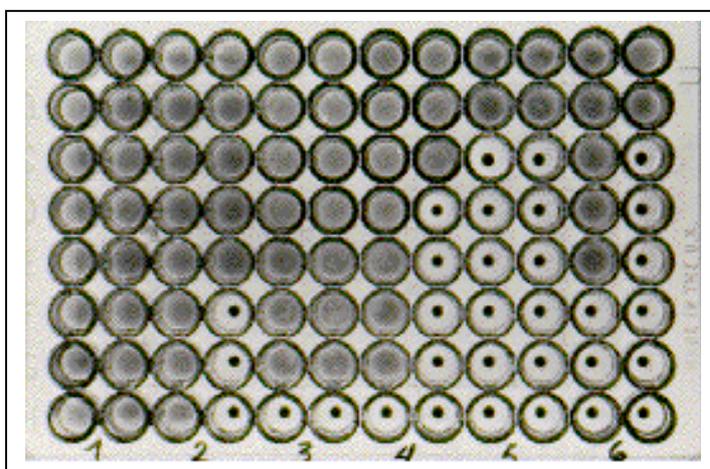
Suero2 (<20\80)

Suero3 (20\20)

Suero4 (20\320)

Suero5 (640\640)

Suero 6 (80\640)



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

Interpretación de los resultados:

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

Interpretación de la respuesta de Acs IH a dengue

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

Referencias

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

PREPARACIÓN DE CONJUGADO ANTI-DENGUE-PEROXIDASA

Desde hace varios años se han desarrollado métodos inmunológicos que han tenido una aplicación creciente en el campo de la virología entre los cuales se destaca el Inmunoensayo Enzimático Sobre Fase Sólida conocido como ELISA, que por reunir características que lo hacen útil para la detección de anticuerpos y antígenos ha reforzado o reemplazado algunos de los métodos clásicos.

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

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

En el proceso de conjugación es importante que tanto la enzima como el anticuerpo o antígeno mantengan al máximo su actividad, además de lograr un óptimo acoplamiento de ambos componentes. Entre los métodos de conjugación más utilizados se encuentran el de Glutaraldehido de 2 pasos y el del Peryodato, siendo este último el que brinda mejores resultados cuando se trabaja con peroxidasa (Nakane PK et al., 1974).

Precipitación de inmunoglobulinas con sulfato de amonio

Materiales:

- Solución saturada de sulfato de amonio (pH 7). La solución debe prepararse con varios días de anticipación para garantizar su saturación y debe ser filtrada antes de usarse.
- Solución salina al 0.85%: 8,5 g en 1L de agua destilada.

Método:

- Adicionar 2 ml de suero humano conteniendo anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación con títulos de 1280 o más contra los 4 serotipos de virus dengue, a 2 mL de solución salina al 0,85%.

- La mezcla es mantenida en agitación con la adición lenta de 4 mL de la solución saturada de sulfato de amonio, continuar la agitación durante 45 minutos.
- La mezcla es centrifugada a 5000 rpm por 30 minutos a 4°C. El sobrenadante es eliminado.
- El precipitado es resuspendido en 2 mL de solución salina. Se adicionan lentamente y agitando, 2 mL de sulfato de amonio, manteniéndose la agitación por unos 5 minutos. Centrifugar nuevamente.
- Se repite el paso anterior.
- Se resuspende con 2 mL de solución salina y se dializa contra grandes volúmenes de dicha solución (3 veces por 1 litro de salina) a 4°C en agitación.
- Determinar la concentración de inmunoglobulinas mediante la lectura de la densidad óptica a 280 y 260 nm.

Concentración de inmunoglobulinas

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

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

Donde: d es el ancho de la cubeta en cm.

Algunos valores de F y R (280 / 260)

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

Conjugación por el método del peryodato de sodio

Materiales:

- Buffer Acetato de sodio 1mM, pH 4.4.

Solución **A**: Acetato de sodio anhidro 0,824 g en 100 mL de agua destilada

Solución **B**: Ácido acético 0,6 mL en 100 mL de agua destilada.

Añadir una parte de A para dos partes de B. Diluir 1:100 con agua destilada para obtener 1mM. Chequear pH 4,4

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

Solución **A**: Carbonato de sodio anhidro 0,2 M 0.212g/10mL de agua destilada.

Solución **B**: Bicarbonato de sodio 0,2 M 0.168g/10mL de agua destilada.

Añada A a B hasta obtener pH 9,5.

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

Carbonato de sodio anhidro 1,59g; Bicarbonato de sodio 2,93g. Disolver en 1 L de agua destilada y ajustar el pH si es necesario. Diluir 1:5 para obtener 0,01 M.

➤ Peryodato de sodio

➤ Borohidruro de sodio.

Método:

1. Disuelva 8 mg de Peroxidasa de Rábano picante (tipo VI) "Sigma" en 1 mL de agua destilada.
2. Prepare solución de peryodato de sodio 0.01 M (21 mg/mL) en agua destilada al momento de su uso. Añada 0.2 mL de esta solución a la de peroxidasa suavemente y agitando, manténgalo en agitación durante 20 min. a temperatura ambiente.
3. La mezcla de peroxidasa y peryodato es dializada toda la noche contra un volumen de 1L de buffer acetato de sodio 1 mM pH 4,4 a 4°C. Se dializa también 1mL de las Igs de dengue a conjugar en concentraciones de 10 mg/mL contra buffer carbonato-bicarbonato 0.01M pH 9,5.
4. Añadir 20 µL de buffer bicarbonato de sodio 0.2M pH 9.5 a la peroxidasa. Chequear pH y añadir otros 20 µL si fuese necesario. Adicione 1mL de Igs dializadas. Agite la mezcla suavemente por 2 horas a temperatura ambiente.
5. Adicione 0.1 mL de borohidruro de sodio (4mg/mL) recién preparada, a la mezcla. Mantenga la agitación por 2 horas a 4°C.
6. Después del tiempo de agitación con el borohidruro añadir al conjugado igual volumen de sulfato de amonio saturado gota a gota y agitando. Dejar 5 minutos en agitación y centrifugar a 5 000 rpm por 10 minutos a 4°C. Eliminar sobrenadante y resuspender el pellet en 1 mL de PBS. Dializar contra PBS a 4°C en agitación toda la noche.
7. Pasar el conjugado a un tubo y agregar albúmina bovina fracción V para una concentración final del 1 % y glicerol a igual volumen del conjugado. Homogeneizar bien.
8. Determinar el título del conjugado mediante la técnica ELISA
9. Envasar en alícuotas y almacenar a -20°C.

Referencias

1. Nakane PK and Kawoi A 1974. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 22: 1084.
2. Vazquez, S., Valdes, O., Pupo, M., Delgado, I., Alvarez, M., Pelegrino, J. L., and Guzman, M. G. (2003). MAC-ELISA and ELISA inhibition methods for detection of antibodies after yellow fever vaccination. *J Virol Methods* **110**(2), 179-84.

ELISA DE CAPTURA DE IgM (MAC- ELISA)

A partir de la década de los 80 se comenzaron a desarrollar los sistemas inmuno enzimáticos conocidos como ELISA, los cuales han sido de gran utilidad en el diagnóstico serológico del virus dengue. El MAC-ELISA aplicado para la detección de anticuerpos IgM a dengue, se ha convertido en una de las pruebas más utilizadas en los laboratorios, brindando un alto grado de sensibilidad y especificidad. Hasta el presente, este sistema es un invaluable método para la vigilancia de la FD y FHD/SCD, considerándose los anticuerpos IgM un importante marcador serológico de las infecciones por dengue. Estos anticuerpos comienzan a ser detectable con la caída de la fiebre, por lo que se recomienda que las muestras de suero utilizadas sean obtenidas después del 5to día de comienzo de los síntomas (1-3).

ELISA DE CAPTURA ANTI-IgM



Materiales:

- Buffer fosfato-salina (PBS) pH 7,4: Cloruro de sodio (NaCl) 8g; Cloruro de potasio (KCl) 0,2g; Fosfato monobásico de potasio (KH₂PO₄) 0,2g; Fosfato dibásico de sodio anhidro (Na₂HPO₄) 1,2g. Disuelva en 1L de agua destilada. Mantenerlo a temperatura ambiente.
- Diluyente de muestra: PBS conteniendo ASB al 0,5%.
- Buffer de Recubrimiento (coating) Carbonato/Bicarbonato 0,05 M pH 9,5
- Carbonato de sodio (Na₂CO₃) anhidro 1,59g ; Bicarbonato de sodio (NaHCO₃) 2,93g. Disuelva en 1L de agua destilada, ajuste pH si es necesario. (Duración máxima de 15 días, mantener a 4°C)

- Inmunoglobulinas anti-IgM humana purificada por cromatografía de afinidad (SIGMA).
- Albúmina bovina sérica fracción V (ABS) al 1% (solución para bloqueo): Disuelva 1g de ABS en 100mL de buffer de recubrimiento (coating). Se requiere 15 mL por placa. Prepararlo al momento de ser usado.
- Suero humano negativo de anticuerpos a virus dengue (SNH): Suero de paciente sano negativo de anticuerpos IgM e IgG a virus dengue
- Antígeno de los cuatro serotipos del dengue obtenidos por el método de sacarosa-acetona: Se prepara una mezcla de los cuatro serotipos a una proporción que contengan 16-32 UH (se calcula según título hemaglutinante) cada uno en PBS conteniendo 5% de SHN. Se requiere 5 mL por placa.
- Conjugado anti-dengue peroxidasa (ver método de conjugación): Se prepara una dilución del conjugado 1:7000 en PBS conteniendo 5% de SHN. Se requiere 5 mL por placa.
- Buffer Fosfato-citrato 0,05M pH 5: Ácido cítrico 5,1g; Fosfato dibásico de sodio anhidro 7,47g. Disuelva en 1L de agua destilada. Ajuste el pH a 5.
- Sustrato: 10 mL de buffer fosfato-citrato; 2,5 mg de Ortofenilendiamina (OPD) + 4 µl Peróxido de hidrógeno (p.a.)₂H₂O₂. Proteger de la luz.

Método:

1. A una placa (NUNC Maxisorp) se le agrega 100 µL por pozo de IgG de carnero anti- IgM humanas a una concentración de 7,5 µg/mL en buffer de recubrimiento (coating). Esta concentración se determina mediante una curva de saturación. La placa es colocada en cámara húmeda a 4°C toda la noche.
2. Lavar 5 veces con PBS.
3. Añadir 150µL por pozo de ABS al 1% en buffer de recubrimiento (coating). Incubar la placa en cámara húmeda por 1 hora a 37°C. Se requiere un total de 15 mL por placa.
4. Lavar 5 veces con PBS.
5. Agregar los sueros a probar diluidos 1/20 en PBS-ABS al 0.5%. 50µL por pozo. Se deben incluir suero positivo (por duplicado) y suero negativo (por cuadruplicado) como controles diluidos también 1/20. Incubar la placa en cámara húmeda por 2 horas a temperatura ambiente.

6. Lavar 5 veces con PBS.
7. Añadir 50µL de la mezcla de antígeno por pozo. Colocar la placa en cámara húmeda a 4°C toda la noche.
8. Lavar 5 veces con PBS.
9. Agregar 50µL del conjugado anti-dengue peroxidasa por pozo e incubar en cámara húmeda 1 hora a 37° C. La dilución del conjugado
10. Lavar 7 veces con PBS.
11. Agregar el sustrato 100 µL por pozo. Mantener la placa en la cámara protegida de la luz durante 30 minutos a temperatura ambiente y detener con 100 µL por pozo de ácido sulfúrico al 12.5%.
12. Leer la placa en un lector de ELISA a 492nm.

Cálculo de los resultados: Determinar la media aritmética de las DO de los controles negativos y multiplicar por 2. Toda muestra que tenga un valor mayor o igual al calculado será positiva (3).

Validez del ensayo: Se determina la media de los valores de densidad óptica (DO) del control positivo y del negativo y se dividen (DOM positivo/DOM negativo) y el valor obtenido debe ser mayor o igual que 10.

Otras aplicaciones del ELISA de captura

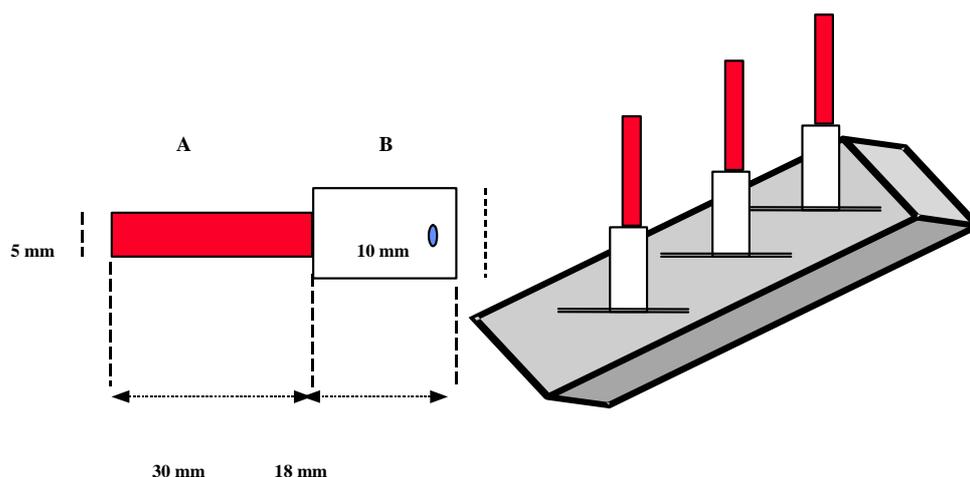
Esta técnica puede ser utilizada para la detección de anticuerpos IgA e IgE. Se emplea el mismo principio y los mismos reactivos excepto la IgG de carnero anti-IgA y anti-IgE que sustituyen a la IgG de carnero anti-IgM (3-4).

Muestras de sangre en papel de filtro

Determinación de la presencia de anticuerpos IgM en muestras de sangre total tomadas en papel de filtro (Blood Sampling Paper, NOBUTO, Toyo Roshi Kaisha, Ltd. Japón): Para la toma de sangre total, se punciona con lanceta estéril el pulpejo del dedo índice dejando absorber la sangre sobre el papel de filtro hasta que el mismo se impregne totalmente por ambos lados (zona A). Previamente, cada papel de filtro debe ser rotulado en la zona B utilizando grafito.

Después que la sangre es totalmente absorbida sobre el papel, esta se deja secar a temperatura ambiente en posición vertical, con la zona B hacia abajo. Posteriormente, se guardan en sobres preferiblemente a 4°C.

PAPEL EMPLEADO EN EL ESTUDIO, SEÑALÁNDOSE LAS ZONAS A (ABSORCION DE SANGRE) Y B (IDENTIFICACION).



Procesamiento

El papel de filtro conteniendo la sangre seca es cortado en varias partes y colocado en un vial de 1.5mL. Posteriormente se añade un volumen del diluyente de muestra (PBS-ASB al 0,5%) en dependencia de la dilución final que se desee (Ejemplo: 400 μ L es equivalente a una dilución de 1/10 de suero; 800 μ L a 1/20). Para el MAC-ELISA se añaden 800 μ L de diluyente para trabajar con la dilución 1/20. Después de añadido el diluyente de muestra y verificar que todo el papel con sangre se encuentra dentro del volumen del diluyente, se deja el vial durante toda la noche a 4°C para facilitar la completa elusión de la muestra. Para la determinación de anticuerpos IgM por MAC-ELISA se sigue el mismo procedimiento que para los sueros, colocando directamente 50 μ L de la sangre eluída en el pozo (4).

Referencias

1. Innis, B. L., Nisalak, A., Nimmannitya, S., Kusalerdchariya, S., Chongswasdi, V., Suntayakorn, S., Puttisri, P., and Hoke, C. H. (1989). An enzyme-linked immunosorbent assay to characterize dengue infections where dengue and Japanese encephalitis co-circulate. *Am J Trop Med Hyg* **40**(4), 418-27.
2. Guzman, M. G., and Vazquez, S. (2002). Apuntes sobre el diagnóstico del laboratorio del virus dengue. *Rev. Cub. Med. Trop.* **54**(3), 180-188.
3. Vazquez, S., Saenz, E., Huelva, G., Gonzalez, A., Kouri, G., and Guzman, M. (1998). Detección de IgM contra el virus del dengue en sangre entera absorbida en papel de filtro. [Detection of IgM against the dengue++ virus in whole blood absorbed on filter paper]. *Rev Panam Salud Publica* **3**(3), 174-8.
4. Vazquez, S., Cabezas, S., Perez, A. B., Pupo, M., Ruiz, D., Calzada, N., Bernardo, L., Castro, O., Gonzalez, D., Serrano, T., Sanchez, A., and Guzman, M. G. (2007). Kinetics of antibodies in sera, saliva, and urine samples from adult patients with primary or secondary dengue 3 virus infections. *IJID* **11**, 256-262.
5. Vazquez, S., Saenz, E., Huelva, G., Gonzalez, A., Kourí, G., and Guzman, M. (1998). Detección de IgM contra el virus del dengue en sangre entera absorbida en papel de filtro. [Detection of IgM against the dengue++ virus in whole blood absorbed on filter paper]. *Rev Panam Salud Publica* **3**(3), 174-8.

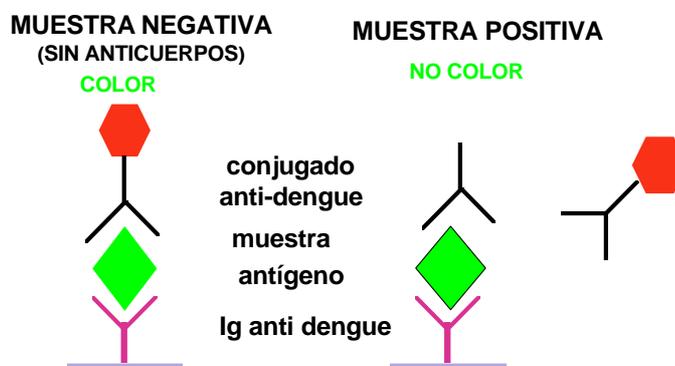
MÉTODO ELISA DE INHIBICIÓN (MEI)

Dos tipos de respuesta serológica se observan principalmente en el dengue: primaria y secundaria. La primaria se presenta en aquellos individuos que no son inmunes a flavivirus. La respuesta secundaria se observa en aquellos individuos con una infección aguda por dengue que han padecido previamente una infección por flavivirus (1). La inmunidad a un serotipo se considera de larga duración y efectiva frente a una segunda infección por el mismo serotipo. La existencia de los cuatro serotipos virales posibilita que se produzcan infecciones terciarias y cuaternarias.

En los individuos que sufren su primoinfección, los anticuerpos IgG antidengue comienzan a incrementarse lentamente a partir del 5^{to}-6^{to} día de comienzo de los síntomas siendo máximos hacia los 15-21 días. Posteriormente declinan permaneciendo detectables prácticamente durante toda la vida. En el transcurso de una infección secundaria, los anticuerpos IgG se elevan casi simultáneamente al comienzo de los síntomas, permaneciendo elevados durante varias semanas declinando posteriormente. Estos altos niveles de anticuerpos IgG permiten un diagnóstico presuntivo en monoseros tomados durante la fase aguda de la enfermedad (1).

Además del MAC-ELISA para la detección de anticuerpos IgM a dengue, se han desarrollado otros ELISAs para la detección de anticuerpos IgG que son de gran apoyo para el diagnóstico serológico de esta enfermedad (2-4) entre ellos el ELISA de Inhibición ha sido ampliamente aplicado, ya que además de su utilidad en poder confirmar un caso y definir el tipo de infección (primaria o secundaria) puede también ser empleado para estudios sero-epidemiológicos (5-8).

ELISA DE INHIBICION



Materiales:

- Inmunoglobulinas humanas anti-dengue; Pool de sueros humanos conteniendo anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación con títulos mayores o iguales a 1280 contra los diferentes serotipos del virus dengue, precipitados por el método del sulfato de amonio y determinando su concentración mediante la lectura de la densidad óptica a 280 y 260 nm (ver Método de conjugación).
- Antígeno de Dengue 2: Antígeno preparado según el método de sacarosa-acetona (9)
- Buffer de Recubrimiento (coating) Carbonato/Bicarbonato 0,05 M pH 9,5: Carbonato de sodio (Na_2CO_3) anhidro 1,59g ; Bicarbonato de sodio (NaHCO_3) 2,93g. Disuelva en 1L de agua destilada, ajuste pH si es necesario. (Duración máxima de 15 días, mantener a 4°C)
- PBS-Tween 20 (PBS-T) pH 7,4: Cloruro de sodio (NaCl) 8g; Cloruro de potasio (KCl) 0,2g; Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4) 0,2g; Fosfato dibásico de sodio anhidro (Na_2HPO_4) 1,2g. Disuelva en 1L de agua destilada y agregue 0,5 mL de Tween-20. Mantenerlo a temperatura ambiente.
- Fosfato-citrato 0,05M pH 5: Ácido cítrico 5,1g; Fosfato dibásico de sodio anhidro 7,47g. Disuelva en 1L de agua destilada. Ajuste pH a 5.
- Albumina bovina sérica fracción V (ABS) al 1%: Disuelva 1g de ABS en 100mL de buffer de recubrimiento (coating). (Prepararlo al momento de ser usado)
- Sustrato: 10 mL de buffer fosfato-citrato; 2,5 mg de Ortofenilendiamina (OPD) + 4 μl Peróxido de hidrógeno (p.a.) H_2O_2 . Proteger de la luz.

Método:

1. Adsorber en placa de poliestireno (Greiner) IgG humanas anti-dengue en buffer de recubrimiento Carbonato / Bicarbonato pH 9,5 a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (100 μL por pozo). Dejar las placas en cámara húmeda tapada toda la noche a 4° C. Se necesita un volumen de 10 mL por placa.
2. Vaciar el contenido de las placas y hacer un bloqueo con 150 μL en cada pozo de la solución de ABS al 1% en buffer Carbonato/Bicarbonato. Incubar en cámara húmeda a 37°C por 1 hora. Volumen total de 15 mL por placa.
3. Lavar las placas 3 veces con PBS-T.
4. Agregar 100 μl de una dilución 1/50 del antígeno en PBS-T por cada pozo

5. Incubar la placa en cámara húmeda 1 hora a 37°C.
6. Lavar 3 veces con PBS-T.
7. Agregar 100µL por pozo de los sueros diluidos 1/20 hasta 1/10240 en PBS-T, al igual que los sueros controles (positivo y negativo). Agregar en 2 pozos PBS-T a igual volumen que los sueros. Incubar en cámara húmeda a 37° C por 1 hora. Nota: Este método también es útil para detectar anticuerpos IgG en muestras de sangre en papel de filtro (7) siguiendo el mismo procedimiento que en el MAC-ELISA pero eluyendo la muestra en PBS.
8. Lavar 3 veces con PBS-T.
9. Añadir 100 µL por pozo del conjugado anti-dengue-peroxidasa diluido 1/6000 en PBS-T con 2% de suero de ternera. Dejar incubando en cámara húmeda 1 hora a 37°C.
10. Lavar 3 veces con PBS-T.
11. Añadir el sustrato 100µL por pozo. El sustrato debe ser preparado unos minutos antes de su utilización. Esperar 30 minutos de reacción.
12. Detener la reacción agregando 100 µL de ácido sulfúrico al 12,5 % en cada pozo.
13. Determinar los valores de densidad óptica a 492nm en un lector Micro-ELISA.
14. Calcular los % de inhibición para cada muestra según la siguiente fórmula:
% Inhibición = [1-(DO muestra/DO control negativo)] x100

Criterio de positividad

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

Definición del título de anticuerpos: El título de anticuerpos se define como la mayor dilución a la cual cumple el criterio de positividad.

En monosueros: **En pacientes con un diagnóstico clínico de dengue y positivos a IgM podemos definir:**

Criterio de infección primaria: Un caso es considerado como infección primaria si el título de anticuerpo IgG en el suero colectado entre los días 5 y 7 de comienzo de los síntomas es ≤ 20 (8).

Criterio de infección secundaria: Un caso es considerado como infección secundaria si el título de anticuerpo IgG en el suero colectado entre los días 5 y 7 de comienzo de los síntomas es ≥ 1280 (8).

En pares de sueros:

Criterio de infección primaria: Seroconversión en el título de anticuerpos entre los sueros de fase aguda y convaleciente (6).

Criterio de infección secundaria: Incremento del título de anticuerpos en cuatro veces o más entre los sueros de fase aguda y convaleciente o elevación del título de anticuerpos en ambos sueros (6).

Referencias

1. Guzman, M. G., and Vazquez, S. (2002). Apuntes sobre el diagnóstico del laboratorio del virus dengue. *Rev. Cub. Med. Trop.* **54**(3), 180-188.
2. Lam, S. K., and Devine, P. L. (1998). Evaluation of capture ELISA and rapid immunochromatographic test for the determination of IgM and IgG antibodies produced during dengue infection. *Clin Diagn Virol* **10**(1), 75-81.
3. Niedrig, M., Vaisviliene, D., Teichmann, A., Klockmann, U., and Biel, S. S. (2001). Comparison of six different commercial IgG-ELISA kits for the detection of TBEV-antibodies. *J Clin Virol* **20**(3), 179-82.
4. Cordeiro, M. T., Braga-Neto, U., Nogueira, R. M., and Marques, E. T., Jr. (2009). Reliable classifier to differentiate primary and secondary acute dengue infection based on IgG ELISA. *PLoS ONE* **4**(4), e4945.
5. Vazquez, S., Perez, A. B., Ruiz, D., Rodriguez, R., Pupo, M., Calzada, N., González, L., González, D., Castro, O., Serrano, T., and Guzmán, M. G. (2005). Serological markers during Dengue 3 primary and secondary infections. *J. Clin. Virol.* **33**(2), 132-137.
6. Vazquez, S., Cabezas, S., Perez, A. B., Pupo, M., Ruiz, D., Calzada, N., Bernardo, L., Castro, O., Gonzalez, D., Serrano, T., Sanchez, A., and Guzman, M. G. (2007). Kinetics of antibodies in sera, saliva, and urine samples from adult patients with primary or secondary dengue 3 virus infections. *IJID* **11**, 256-262.
7. Vazquez, S., Fernandez, R., and Llorente, C. (1991). Utilización de muestras de sangre en papel de filtro para estudios serológicos de dengue mediante el ELISA de Inhibición. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **33**(4), 309-11.
8. Vazquez, S., Acosta, N., Ruiz, D., Calzada, N., Alvarez, A. M., and Guzman, M. G. (2009). Immunoglobulin G antibody response in children and adults with acute dengue 3 infection. *J Virol Methods* **159**(1), 6-9.
9. Clark, D. H., and Casals, J. (1958). Techniques for hemagglutination inhibition with arthropodborne viruses. *Am. J. Trop. Hyg.* **7**, 561-573.

**SISTEMA ULTRA MICRO ELISA PLUS PARA LA DETECCIÓN DE
ANTICUERPOS IgM AL VIRUS DENGUE (UMELISA-DENGUE IgM PLUS)**

El UMELISA DENGUE IgM plus es un ensayo heterogéneo desarrollado por el Centro de Inmunoensayos, La Habana, Cuba y que utiliza la variante de captura de anticuerpos IgM, empleando las ventajas de la reacción de alta afinidad entre la estreptavidina y la biotina (1).

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

El estuche UMELISA Dengue IgM Plus para la detección de anticuerpos IgM al virus dengue en suero humano es un sistema útil para el diagnóstico y la vigilancia sero-epidemiológica del virus dengue, principalmente en aquellos laboratorios que requieren procesar un gran número de muestras.

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

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

La técnica detallada aparece en el prospecto adjunto al Kit Comercial "**UMELISA-DENGUE IgM Plus**" para la detección de anticuerpos IgM al virus Dengue

Referencias

1. Vazquez, S., Valdivia, I., Sánchez, A., Calzada, N., and Guzmán, M. G. (2007). Evaluación del sistema diagnóstico UMELISA DENGUE IgM PLUS. *Archivos Venezolanos de Medicina Tropical* **5**(1).

SDS-PAGE / Western Blot

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

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

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

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

Materiales:

❖ Tampón separador:

Tris ----- 45.5 g

SDS----- 1g

Ajustar pH 8.8 con HCl

Enrazar a 250 mL

❖ Tampón concentrador:

Tris-----15.14 g

SDS ----- 1 g

Ajustar pH 6.8 con HCl

Enrazar a 250 mL

❖ Acrilamida-Bisacrilamida:

Acrilamida ----- 73 g

Bisacrilamida ----- 2 g

Amberlite HB1----- 2.5 g

Enrazar a 250 mL

Agitación toda la noche a 4°C en oscuridad

Filtrar para eliminar el amberlite.

❖ Tampón muestra:

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

Solución Bromo fenol azul 1% ----- 1 mL

Glicerol ----- 10 mL

H₂O destilada ----- 2.8 mL

❖ Tampón de Corrida:

Tris ----- 3 g

Glicina -----14.4 g

SDS ----- 1 g

Completar a 1 L con H₂O destilada.

- ❖ Tampón de Transferencia:
 - Tris----- 3.03 g
 - Glicina ----- 14.4 g
 - Metanol ----- 100 mL
 - Completar a 1 L de H₂O destilada.

- ❖ Solución Rojo Ponceau S:
 - Rojo Ponceau -----0.5 g
 - Acido acético glacial --- 1 mL
 - Completar a 100 mL con H₂O destilada.

- ❖ Solución de lavado:
 - PBS 1X -----1 L
 - Tween 20----- 0.5 mL

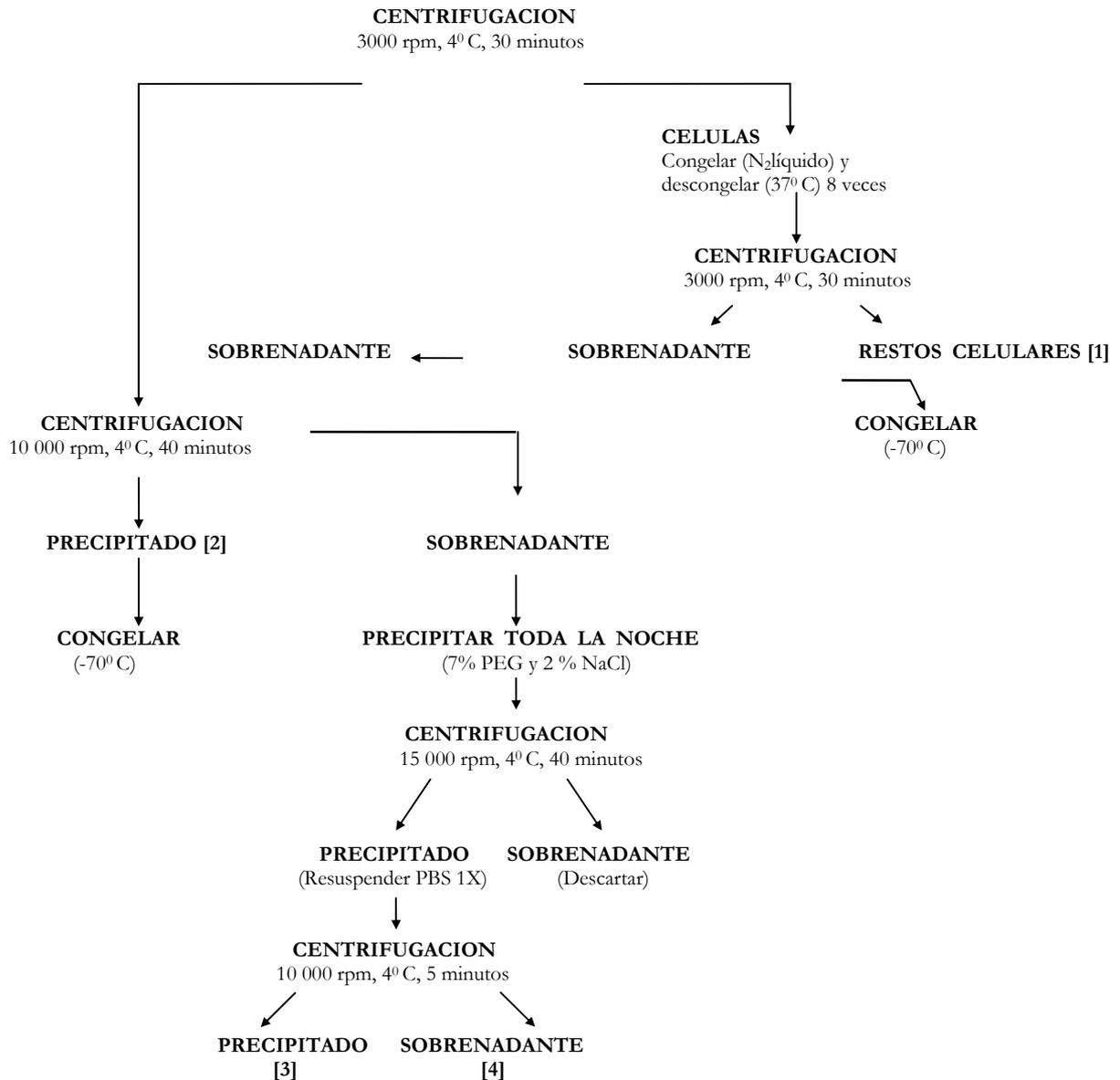
- ❖ Solución Bloqueadora (PBS-T₂₀-leche):
 - Leche -----4 g
 - Diluir en Solución de lavado.

- ❖ Sustrato:
 - 4-cloro-1-naftol ----- 10 mg
 - Diluirlo en 5 ml de Metanol
 - 3.3 diaminobenzidina-tetrahydroclorhídrico ----- 30 mg
 - Diluirlo en 40 mL de PBS 1X.
 - Mezclar ambos y adicionar 25 µL de peróxido.

Procedimiento:

Preparación del material:

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



SDS-PAGE

- ❖ Preparación del gel de acrilamida separador al 10%. Mezclar los reactivos en el siguiente orden:

Tampón separador pH8.8 -----9mL

Acrilamida-Bisacrilamida -----8mL

H₂O destilada -----7mL

Persulfato de amonio 10% -----60μL

TEMED -----30μL

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

❖ Preparación del gel concentrador:

Tampón concentrador pH6.8 ----3.1 mL

Acrilamida-bisacrilamida-----1.9 mL

H₂O destilada -----7mL

Persulfato de amonio 10% -----60μL

TEMED -----30μL

Una vez polimerizado el gel, se procede a la corrida electroforética en presencia de tampón de corrida, preparándose la muestra con la unión del antígeno y el tampón de muestra (100μL de la fracción y 300μL del tampón) y previo calentamiento durante 2 min a 80°C. Se adiciona por cada pozo entre 15-20μL de la mezcla calentada e igual volumen en un pocillo del marcador molecular Raibow™, aplicando una corriente constante de 100 mA durante 1h.

Western Blot

Equilibrar los papeles de filtro, membrana de nitrocelulosa y gel de poliacrilamida 15 min antes en tampón de transferencia.

1. Colocar en el equipo de transferencia en este orden:
 - a) 8 papeles de filtro
 - b) membrana de nitrocelulosa
 - c) gel de poliacrilamida corrido
 - d) 8 papeles de filtro.
2. Aplicar corriente constante de 85 mA por gel durante 1h.
3. Colocar la membrana en solución Rojo Ponceau S durante 15 min.
4. Retirar la solución y lavar la membrana con H₂O destilada hasta visualizar bandas de proteínas (una vez que se verifique la eficiencia de la transferencia se sigue lavando con H₂O destilada hasta que desaparezca de la membrana la coloración rojiza).
5. Colocar la membrana en solución bloqueadora durante 1h en agitación a temperatura ambiente (TA).

6. Retirar solución bloqueadora e incubar con los sueros (dilución de trabajo a partir de 1/50 con PBS-T₂₀-leche) y como controles un líquido ascítico hiperinmune de ratón (control positivo) diluido 1/100 y un suero humano negativo a dengue diluido 1/50 durante 1h en agitación a TA.
7. Lavado de la membrana con PBS-T₂₀. Un lavado rápido y 3 lavados de 10 min. en agitación a TA.
8. Incubar membrana con conjugado humano (anti Ig humana-peroxidasa, Amersham) y conjugado anti-ratón (anti Ig ratón -peroxidasa, Amersham) diluidos 1/2000 y 1/1000 con PBS-T₂₀-leche, respectivamente según corresponda, durante 1h en agitación a TA.
9. Lavado de la membrana similar al anterior.
10. Adicionar sustrato para revelar e incubar durante 5 min. en agitación a TA.
11. Detener la reacción con H₂O destilada.

Referencias

1. Towbin H, Stachelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1979, 76: 4350-4354.
2. Laemmli UK. Cleavage of structure proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680-685.
3. Valdés K, Alvarez M, Pupo M, Vázquez S, Rodríguez R, Guzmán MG. Human Dengue antibodies against structural and nonstructural proteins. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2000; 7(5): 856-57

DETECCIÓN DE ANTÍGENOS DE VIRUS DENGUE EN TEJIDOS EMBEBIDOS EN PARAFINA

El dengue es la arbovirosis más importante en términos de morbilidad y mortalidad. Cada año ocurren a causa de esta enfermedad alrededor de 20 000 muertes en las áreas subtropicales y tropicales del mundo (Calisher 2005).

La confirmación de una infección por virus dengue (VDEN) en los casos fatales es de gran interés. Sin embargo, en la mayoría de estos casos solo se obtiene una única muestra de suero de valor limitado para el diagnóstico virológico (Gubler 1998). En el caso que se logre realizar la autopsia se pueden obtener tejidos fijados en formol y embebidos en parafina (FFEP). En dichos tejidos es posible realizar la detección de antígenos de VDEN mediante inmunohistoquímica (IHQ) que es un método inmunoenzimático de detección de antígenos en tejidos (Hall, Crowell et al. 1991; Miagostovich, Ramos et al. 1997; Jessie, Fong et al. 2004; Rigau-Perez and Laufer 2006; Limonta, Capo et al. 2007). Esta técnica requiere anticuerpos conjugados con enzima peroxidasa (Limonta, Capo et al. 2007) o fosfatasa alcalina (Huerre, Lan et al. 2001) y para aumentar su sensibilidad se pueden utilizar los sistemas biotina/estreptavidina o biotina/avidina (Hall, Crowell et al. 1991; Pelegrino, Arteaga et al. 1997; Couvelard, Marianneau et al. 1999; Jessie, Fong et al. 2004).

Muy recientemente este método de detección de antígenos virales ha servido para estudiar la asociación de la fisiopatología de esta compleja enfermedad con el tropismo del VDEN en diferentes tejidos de fallecidos por dengue hemorrágico y de un modelo experimental murino de dengue (Balsitis, Coloma et al. 2009).

Materiales:

- 3 frascos con xilol y 4 frascos con etanol (95%, 90%, 80%, 70%, respectivamente) frescos
- Buffer de lavado de TBST (Tris-Buffered Saline-Tween 20) de pH 7.4
- Tripsina (Difco)
- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 30% y metanol
- Albúmina bovina sérica (ABS)
- Anticuerpo Policlonal (AcP) anti-Dengue (líquido ascítico hiperimmune) (IPK)

- AcP de conejo anti-ratón conjugado con peroxidasa (DAKO)
- Polvo de 3, 3'-Diaminobenzidina, DAB (Sigma)
- 4 frascos con etanol (70%, 80%, 90%, 95%, etanol absoluto, respectivamente) para deshidratar y 3 frascos con xilol frescos
- Hematoxilina de Mayer y bálsamo de Canadá

Equipos

- Micrótopo con baño histológico a 58 °C
- Estufa a 60 °C
- Estufa a 37 °C con cámara húmeda (CH)
- Cámara fría a 4 °C
- Microscopio de luz

Tejidos controles

Los tejidos FFEP controles positivos de VDEN se obtienen de ratones lactantes como se describiera en el capítulo de aislamiento del VDEN. Brevemente, los cerebros de ratón post-inoculados son extraídos y fijados en solución de formol tamponado neutro (solución al 10% de formol al 40% en solución tampón fosfatada neutra 0.1 M) por 48 horas antes del procesamiento histológico de rutina para inclusión en parafina. Los tejidos cerebrales de ratón empleados como controles negativos son procesados de igual manera que los controles positivos con excepción de que la solución inoculada por vía intracerebral no posee VDEN.

Procedimiento de IHQ por el método indirecto de inmunoperoxidasa

1. Corte y Montaje

- Realizar cortes de los tejidos FFEP de 4 µm de grosor con micrótopo y montarlos en láminas portaobjetos tratadas con silane (3-triethoxisilylpropylamine, Sigma). Incubarlos a 37 ° C toda la noche (o al menos 12 horas) o a 60 ° C por 1 hora.

Nota: Los cortes de los controles positivos y negativos de tejidos deben ser realizados simultáneamente.

2. Desparafinación y rehidratación

- Colocar los cortes histológicos en xilol durante 5 minutos. Repetir en total 3 veces por 5 minutos (3x5min).
- Colocar los cortes histológicos en soluciones de etanol seriados descendentes (etanol absoluto, y al 95%, 90%, 80%, 70% en agua destilada) durante 5 min cada uno.
- Lavado con TBST, 3x5 min.

Nota: a partir de este paso no se debe dejar secar ningún corte histológico o sus bordes para evitar coloración falsa positiva. Circular los cortes con DakoCytomaton Pen o algún producto hidrófobo.

3. Recuperación de antígenos por digestión enzimática

- Incubar los cortes histológicos cubiertos con tripsina 0.1 % con CaCl_2 0.1%, pH 7.8, en agua destilada a 37°C durante 20-30 minutos en CH.
- Lavado con TBST 2x5 min.

4. Bloqueo de la actividad de peroxidasa endógena

- Cubrir los cortes histológicos con una solución de metanol al 90%, H_2O_2 al 5% en agua destilada durante 20 minutos a TA en CH.
- Lavado con TBST 2x5 min.

Nota: el peróxido de hidrógeno es un potente oxidante, evitar su contacto con la piel.

5. Bloqueo de la unión de los anticuerpos a sitios inespecíficos

- Incubar con solución de ABS recién preparada al 5% en TBST durante 30 min. a TA en CH.

Nota: **¡No Lavar** a continuación! Sacudir la lámina con la solución de bloqueo, secar alrededor del tejido y aplicar anticuerpo primario inmediatamente.

6. Aplicación de anticuerpo primario

- Aplicar AcP anti-Dengue diluido 1:100 en Tris/HCL 0.05 M, pH 7.4 con ABS al 1% más Tween 20 al 0.1%. Calcular el volumen final teniendo en

cuenta un volumen de 50-100 μ L por cada corte en dependencia de su tamaño.

- Incubar los cortes histológicos cubiertos con el anticuerpo primario en CH a 37°C durante 30 min. ó a 21-25°C por dos horas ó a 4°C toda la noche.
- Lavado con TBST 3x5 min.

7. Aplicación de anticuerpo secundario (conjugado) (Figura 1)

- Aplicar AcP de conejo anti-ratón conjugado con peroxidasa diluido 1:100 o 1:200 en Tris/HCL 0.05 M, pH 7.4.
- Incubar los cortes histológicos cubiertos con el anticuerpo conjugado en CH a TA durante 1 hora.
- Lavado con TBST 3x5 min.

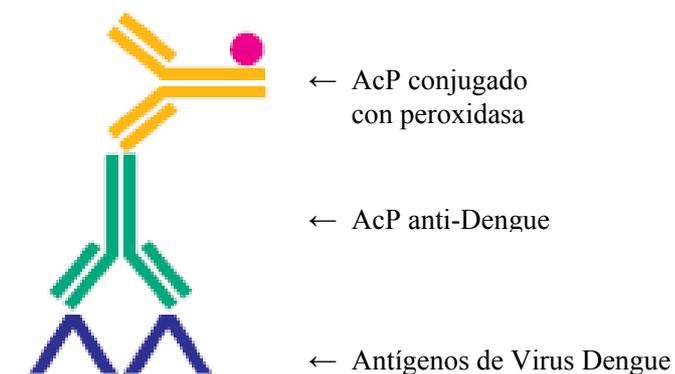


Figura 1. Inmunohistoquímica por el método indirecto de inmunoperoxidasa. El anticuerpo secundario conjugado reacciona con el anticuerpo primario unido a los antígenos del tejido (Boenisch 2001).

8. Revelado

- Diluir la DAB como indique el fabricante. Brevemente, se disuelven 6 mg de DAB en 10 mL de Tris/HCl pH 7.4. Agitar bien para diluir (aconsejable utilizar vortex por 30 segundos), filtrar para eliminar partículas (se sugiere filtro de 0.2 μ m), y luego añadir H₂O₂ al 3% en agua destilada antes de aplicar.

Nota: Controlar bajo microscopio de luz la reacción, lámina a lámina, no debe pasar de 5-10 minutos para evitar el sobre-revelado. Las muestras de pacientes deben observarse al final.

La DAB es cancerígena y su preparación debe ser con guantes y cámara de gases. Para mejores resultados debe ser utilizada la solución de DAB inmediatamente y evitar su exposición a la luz.

- Detener la reacción con agua corriente.

9. Coloración de contraste (opcional) y montaje

- Introducir y extraer inmediatamente las láminas en hematoxilina de Mayer fresca.
- Lavar en agua corriente.
- Deshidratar los cortes en etanoles seriados ascendentes (70%, 80%, 90%, 95%, etanol absoluto) por 2 min.
- Aclarar los cortes en xilol, 2 pases de 2 min.
- Montar cubreobjetos con bálsamo de Canadá.
- Observar bajo microscopio de luz (Figura 2).

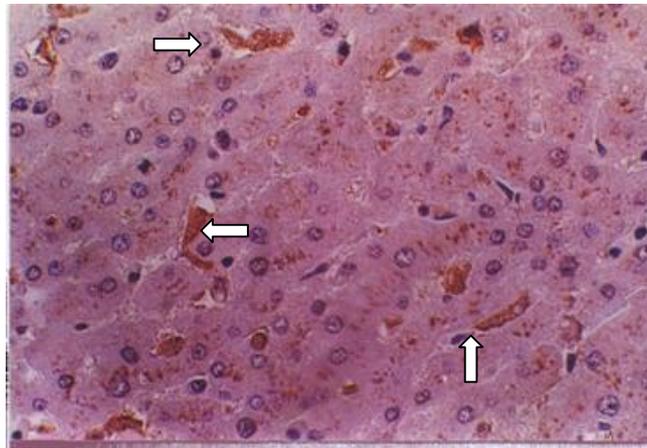


Figura 2. Se observan células de Kupffer positivas (flechas) de antígenos de virus dengue por el método de inmunohistoquímica en un corte de hígado humano.

Referencias

1. Calisher CH. Persistent emergence of dengue. *Emerg Infect Dis* 2005;11(5):738-9.
2. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* 1998;11(3):480-96.
3. Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis* 2004;189(8):1411-8.
4. Miagostovich MP, Ramos RG, Nicol AF, Nogueira RM, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, et al. Retrospective study on dengue fatal cases. *Clin Neuropathol* 1997;16(4):204-8.
5. Rigau-Perez JG, Laufer MK. Dengue-related deaths in Puerto Rico, 1992-1996: diagnosis and clinical alarm signals. *Clin Infect Dis* 2006;42(9):1241-6.
6. Hall WC, Crowell TP, Watts DM, Barros VL, Kruger H, Pinheiro F, et al. Demonstration of yellow fever and dengue antigens in formalin-fixed paraffin-embedded human liver by immunohistochemical analysis. *Am J Trop Med Hyg* 1991;45(4):408-17.
7. Limonta D, Capo V, Torres G, Perez AB, Guzman MG. Apoptosis in tissues from fatal dengue shock syndrome. *J Clin Virol* 2007;40(1):50-4.
8. Huerre MR, Lan NT, Marianneau P, Hue NB, Khun H, Hung NT, et al. Liver histopathology and biological correlates in five cases of fatal dengue fever in Vietnamese children. *Virchows Arch* 2001;438(2):107-15.
9. Couvelard A, Marianneau P, Bedel C, Drouet MT, Vachon F, Henin D, et al. Report of a fatal case of dengue infection with hepatitis: demonstration of dengue antigens in hepatocytes and liver apoptosis. *Hum Pathol* 1999;30(9):1106-10.
10. Pelegrino JL, Arteaga E, Rodriguez AJ, Gonzalez E, Frontela MD, Guzman MG. [Standardization of immunohistochemical techniques for detecting dengue virus antigens in paraffin-embedded tissues]. *Rev Cubana Med Trop* 1997;49(2):100-7.
11. Balsitis SJ, Coloma J, Castro G, Alava A, Flores D, McKerrow JH, et al. Tropism of dengue virus in mice and humans defined by viral nonstructural protein 3-specific immunostaining. *Am J Trop Med Hyg* 2009;80(3):416-24.
12. Boenisch T. *Immunochemical Staining Methods*. 3rd ed. California: DakoCytomation; 2001.

DETECCIÓN DE APOPTOSIS EN TEJIDOS EMBEBIDOS EN PARAFINA

La fisiopatología de la fiebre hemorrágica del dengue/síndrome de choque por dengue (FHD/SCD) es muy compleja y no está completamente dilucidada (Halstead 2007). Sin embargo, existen numerosos estudios que asocian esta compleja enfermedad viral con inmunoamplificación dependiente de anticuerpos heterólogos, células T de memoria de reactividad cruzada, incremento de la producción de citocinas, altas cargas virales, activación del complemento y citotoxicidad dependiente de anticuerpos. la apoptosis, una forma de muerte celular programada, se ha implicado en la patogénesis de la FHD/SCD (Courageot, Catteau et al. 2003; Myint, Endy et al. 2006). Este evento celular se ha demostrado con anterioridad en diferentes líneas celulares inoculadas con virus dengue (Avirutnan, Malasit et al. 1998; Su, Lin et al. 2001; Matsuda, Almasan et al. 2005), cerebro de ratón infectado con virus dengue (Despres, Frenkiel et al. 1998) y en hepatocitos de fallecidos por FHD/SCD (Couvelard, Marianneau et al. 1999; Huerre, Lan et al. 2001). Por otra parte, en un trabajo más reciente se demostró apoptosis de células endoteliales de vasos sanguíneos en un modelo murino de hemorragia por dengue (Yen, Chen et al. 2008). Se ha postulado que la apoptosis puede ser inducida por la replicación viral (Avirutnan, Malasit et al. 1998; Couvelard, Marianneau et al. 1999; Huerre, Lan et al. 2001) o mecanismos inmunes (Lin, Lei et al. 2003; Cardier, Marino et al. 2005; Matsuda, Almasan et al. 2005).

Muy recientemente, se reportó por primera vez apoptosis por el método de TUNEL (marcaje por dUTP de extremos finales de fragmentos mediado por Transferasa deoxinucleotídica Terminal, del inglés **-Terminal deoxynucleotydil Transferase-mediated dUTP nick-end labeling-**) de células endoteliales de la microvasculatura de intestino y pulmón, células cerebrales y leucocitos sanguíneos en tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina (FFEP) de casos fatales de FHD/SCD de una epidemia de dengue en Cuba en el año 1997 (Limonta, Capo et al. 2007; Limonta, Torres et al. 2008) y en el 2001 (Limonta, Gonzalez et al. 2009).

Reactivos

- 3 soluciones de xilol y soluciones de etanol seriados frescos.
- Buffer de lavado de PBS (Phosphate-Buffered Saline) de pH 7.4 y coplin limpios.
- Proteinasa K recombinante (Roche Applied Sciences, No. Cat. 03 115 879 001)
- DNase I, grado I (Roche Applied Sciences, No. Cat. 10 104 132 001)
- Tabletas listas para su uso, NBT/BCIP (Roche Applied Sciences, No. Cat. 1 697 451)
- Hematoxilina

Equipos

Micrótomo, incubadora de 37 °C, cámara húmeda (CH), microscopios de luz y de fluorescencia

Tejidos controles de apoptosis

En cada corrida del protocolo de TUNEL se incluyen controles de tejidos FFEP desparafinados, rehidratados y digeridos con Proteinasa K siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche Applied Sciences). El control positivo de tejido incluye cortes de amígdala humana. Los controles negativos de tejidos están constituidos por tejido de amígdala u otro tejido humano correspondiente al tejido muestra.

Detección *in situ* de células apoptóticas por el método de TUNEL (*In Situ Cell Death Detection Kit, AP, Roche Applied Sciences, No. Cat. 11 684 809 910*) Es un kit para la detección y cuantificación inmunohistoquímica de la apoptosis a nivel celular, basado en la técnica del marcado de fragmentos de ADN (TUNEL)

Contenido del Kit

Vial/tapa	Etiqueta	Contenido
1/Azul	<i>Enzime Solution</i> (Solución de Enzima)	-Transferasa deoxinucleotídica Terminal de timo de ternero (EC 2.7.7.3.1), recombinante de <i>E. coli</i> , en buffer de almacenamiento -10X (5 x 50 µL)
2/Violeta	<i>Label Solution de Marcado</i>	- Mezcla de nucleótidos en buffer de reacción -1 X (5 x 550 µL)
3/Amarillo	<i>Converter-AP</i> (Convertidor-FA)	- Anticuerpo anti-fluoresceína, fragmento de unión al anticuerpo (Fab, del inglés - fragment antibodies binding-) de carnero, conjugado con Fosfatasa Alcalina (FA) (3.5 mL)

Principio de la técnica: La incisión del ADN genómico durante la apoptosis puede producir ADN de doble cadena, fragmentos de ADN de bajo peso molecular (mono y oligo-nucleosomas) así como fragmentos de cadenas de alto peso molecular.

Estos fragmentos de ADN pueden ser identificados en una reacción enzimática a través del marcado de los extremos libres 3'-OH terminales con nucleótidos modificados.

Método

1. Marcaje de los fragmentos de ADN con una Transferasa deoxinucleotídica Terminal (TdT), la cual cataliza la polimerización de nucleótidos marcados a los extremos libres 3'-OH terminales (reacción de TUNEL)
2. Detección de los nucleótidos con fluoresceína incorporados con un fragmento de Fab de anticuerpo anti-fluoresceína de carnero, el cual está conjugado con FA
3. Luego de la reacción del sustrato, las células teñidas pueden ser analizadas con un microscopio de luz

1. Corte y Montaje

Realice cortes de los tejidos FFEP de 4 μm de grosor en micrótomo y móntelos en láminas portaobjetos tratadas con silane (3-triethoxisilylpropylamine, Sigma). Incúbelos a 37 °C overnight (al menos 12 horas) o a 60 °C por 1 hora.

Nota: los cortes de los controles positivos y negativos de tejidos deben ser realizados simultáneamente

2. Desparafinación y rehidratación

- Colocar los cortes histológicos en xilol durante 5 minutos. Repetir 3 veces por 5 minutos (3x5min)

- Colocar los cortes histológicos en soluciones de etanol seriados descendentes (etanol absoluto, y al 95%, 90%, 80%, 70% en agua destilada) durante 5 min cada uno

- Lavado con PBS 3x5 min

Nota: a partir de este paso no se debe dejar secar ningún corte histológico o sus bordes para evitar coloración falsa positiva. Circular los cortes con DakoCytomaton Pen

3. Tratamiento de los tejidos por digestión enzimática

- Incubar las secciones de tejido por 15 minutos a 37°C con la solución de trabajo de Proteinasa K recombinante [10-20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 10mM Tris/HCL, pH 7.4-8]

- Lavar con PBS 2x3 min

4. Procedimiento de Marcaje:

Un par de tubos (vial 1: *Solución de Enzima* y el vial 2: *Solución de Marcado*) son suficientes para colorear 10 muestras al utilizar 50 μL de la *mezcla de reacción de TUNEL* por muestra y 2 controles negativos al utilizar 50 μL de la *Solución de Marcado* por cada control.

Nota: La reacción de TUNEL debe ser preparada inmediatamente antes de su uso y no debe ser almacenada. Mantener la *mezcla de reacción de TUNEL* en hielo hasta su utilización. El control positivo se prepara antes de adicionar la *mezcla de reacción de TUNEL* a las muestras.

- Tome 100 μL de la *Solución de Marcado* (vial 2) para los dos controles negativos
- Adicionar el volumen total (50 μL) de la *Solución de Enzima* (vial 1) a los restantes 450 μL de la *Solución de Marcado* en el vial 2 para obtener 500 μL de la *mezcla de reacción de de TUNEL* (dilución 1:10)
- Mezclar bien para equilibrar los componentes

Controles:

Dos controles negativos y un control positivo deben ser incluidos en cada experimento.

Control Negativo	Incubar los tejidos desparafinados, rehidratados y digeridos en 50 μL de la <i>Solución de Marcado</i> (sin la Transferasa Terminal) en vez de la <i>mezcla de reacción de de TUNEL</i>
Control Positivo	Incubar los tejidos desparafinados, rehidratados y digeridos con DNase I, grado I [1000 U/mL en 50 mM Tris-HCL, pH 7.5, 10 mM MgCl_2 1mg/mL BSA] por 10 minutos a temperatura ambiente para inducir el rompimiento en fragmentos de ADN antes de los procedimientos de marcado.

Procedimiento:

1. Lavar con PBS 2x3
2. Seque el área alrededor de la muestra
3. Adicione 50 μL de la *mezcla de reacción de TUNEL* sobre la muestra.
4. Nota: Para el control negativo adicione 50 μL de la *Solución de Marcado* a cada uno
5. Incube por 60 min a 37°C en CH
6. Lavar con PBS 3x3
7. Las muestras pueden ser analizadas con una gota de PBS bajo un microscopio de fluorescencia en este paso. Utilice una onda de excitación en el rango de 450-500 nm y una de detección en el rango de 515-565 nm (verde)

Revelado y Análisis:

Procedimiento:

1. Seque el área alrededor de la muestra
2. Adicione 50 μ L del *Convertidor-FA* (vial 3) sobre la muestra
3. Incubar la lamina en CH por 30 min a 37°C
4. Lavar con PBS 3x3
5. Adicionar 50-100 μ L de *Solución de Substrato* (1 tb NBT/BCIP en 10 mL de agua bidestilada) justo antes de usar
6. Incubar la lamina por 10 minutos a temperatura ambiente
7. Lavar con PBS 3x3
8. Montar la muestra bajo un cubreobjeto de cristal (con PBS/glicerol) y analizarla bajo el microscopio de luz. Alternativa: las muestras pueden ser contrastadas con Hematoxilina antes del análisis con microscopio de luz.

Nota: Una vez abierto el vial 3 de solución de *Convertidor-FA* debe ser almacenado de 2-8°C (estabilidad máxima de 6 meses) ¡No congelar!

Referencias

1. Avirutnan, P., P. Malasit, et al. (1998). "Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis." *J Immunol* **161**(11): 6338-6346.
2. Balsitis, S. J., J. Coloma, et al. (2009). "Tropism of dengue virus in mice and humans defined by viral nonstructural protein 3-specific immunostaining." *Am J Trop Med Hyg* **80**(3): 416-424.
3. Boenisch, T. (2001). *Immunochemical Staining Methods*. California, DakoCytomation.
4. Calisher, C. H. (2005). "Persistent emergence of dengue." *Emerg Infect Dis* **11**(5): 738-739.
5. Cardier, J. E., E. Marino, et al. (2005). "Proinflammatory factors present in sera from patients with acute dengue infection induce activation and apoptosis of human microvascular endothelial cells: possible role of TNF-alpha in endothelial cell damage in dengue." *Cytokine* **30**(6): 359-365.
6. Courageot, M. P., A. Catteau, et al. (2003). "Mechanisms of dengue virus-induced cell death." *Adv Virus Res* **60**: 157-186.
7. Couvelard, A., P. Marianneau, et al. (1999). "Report of a fatal case of dengue infection with hepatitis: demonstration of dengue antigens in hepatocytes and liver apoptosis." *Hum Pathol* **30**(9): 1106-1110.
8. Despres, P., M. P. Frenkiel, et al. (1998). "Apoptosis in the mouse central nervous system in response to infection with mouse-neurovirulent dengue viruses." *J Virol* **72**(1): 823-829.
9. Gubler, D. J. (1998). "Dengue and dengue hemorrhagic fever." *Clin Microbiol Rev* **11**(3): 480-496.
10. Halstead, S. B. (2007). "Dengue." *Lancet* **370**(9599): 1644-1652.
11. Hall, W. C., T. P. Crowell, et al. (1991). "Demonstration of yellow fever and dengue antigens in formalin-fixed paraffin-embedded human liver by immunohistochemical analysis." *Am J Trop Med Hyg* **45**(4): 408-417.
12. Huerre, M. R., N. T. Lan, et al. (2001). "Liver histopathology and biological correlates in five cases of fatal dengue fever in Vietnamese children." *Virchows Arch* **438**(2): 107-115.
13. Jessie, K., M. Y. Fong, et al. (2004). "Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization." *J Infect Dis* **189**(8): 1411-1418.
14. Limonta, D., V. Capo, et al. (2007). "Apoptosis in tissues from fatal dengue shock syndrome." *J Clin Virol* **40**(1): 50-54.
15. Limonta, D., D. Gonzalez, et al. (2009). "Fatal severe dengue and cell death in sickle cell disease during the 2001-2002 Havana dengue epidemic." *Int J Infect Dis* **13**(2): e77-78.
16. Limonta, D., G. Torres, et al. (2008). "Apoptosis, vascular leakage and increased risk of severe dengue in a type 2 diabetes mellitus patient." *Diab Vasc Dis Res* **5**(3): 213-214.
17. Lin, C. F., H. Y. Lei, et al. (2003). "Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage." *J Med Virol* **69**(1): 82-90.
18. Matsuda, T., A. Almasan, et al. (2005). "Dengue virus-induced apoptosis in hepatic cells is partly mediated by Apo2 ligand/tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand." *J Gen Virol* **86**(Pt 4): 1055-1065.
19. Miagostovich, M. P., R. G. Ramos, et al. (1997). "Retrospective study on dengue fatal cases." *Clin Neuropathol* **16**(4): 204-208.
20. Myint, K. S., T. P. Endy, et al. (2006). "Cellular immune activation in children with acute dengue virus infections is modulated by apoptosis." *J Infect Dis* **194**(5): 600-607.
21. Pelegrino, J. L., E. Arteaga, et al. (1997). "[Standardization of immunohistochemical techniques for detecting dengue virus antigens in paraffin-embedded tissues]." *Rev Cubana Med Trop* **49**(2): 100-107.
22. Rigau-Perez, J. G. and M. K. Laufer (2006). "Dengue-related deaths in Puerto Rico, 1992-1996: diagnosis and clinical alarm signals." *Clin Infect Dis* **42**(9): 1241-1246.
23. Su, H. L., Y. L. Lin, et al. (2001). "The effect of human bcl-2 and bcl-X genes on dengue virus-induced apoptosis in cultured cells." *Virology* **282**(1): 141-153.
24. Yen, Y. T., H. C. Chen, et al. (2008). "Enhancement by tumor necrosis factor alpha of dengue virus-induced endothelial cell production of reactive nitrogen and oxygen species is key to hemorrhage development." *J Virol* **82**(24): 12312-12324.

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

Los 4 serotipos de los virus del Dengue son miembros del género *Flavivirus*, Familia *Flaviviridae*. El dengue es la más importante enfermedad viral transmitida por artrópodos, con un estimado de más de 50 millones de casos anualmente, con mas de 250 000 casos de FHD 70 000 fallecidos (Gibbons and Vaughn, 2002). Sólo en las Américas estos virus afectaron a más personas durante el año 2002 que durante toda la década de los 80 (Guzmán y Kourí, 2003). El diagnóstico de la infección por estos virus se realiza mediante el aislamiento viral en cultivo celular, los estudios serológicos de detección de anticuerpos específicos tipo IgM y de IgG, así como a partir de los años 90 la introducción rápida de diversos protocolos para la detección del ARN viral mediante la técnica de la PCR, que en el caso de los virus ARN como estos resulta imprescindible realizar previamente la reverso transcripción (RT) del genoma en un ADN copia (ADNc) (Morita et al 1991, Lanciotti et al 1992, Rosario et al 1998, Harris et al 1999).

En este folleto nosotros le proponemos el protocolo del método por Lanciotti y col, 1992, con algunas modificaciones (Rosario y col, 1998) que durante más de 8 años hemos empleado para el diagnóstico molecular en nuestro laboratorio. En su desarrollo se realiza la amplificación del fragmento genómico que comprende parte de los genes C-prM. Este fragmento está flanqueado por una secuencia conservada entre todos los virus del Dengue, que permite la amplificación genómica usando cebadores universales de dengue. El serotipo es entonces identificado mediante el uso de primer serotipo- específico en un semi-nested PCR (nPCR).

Además proponemos el protocolo más reciente de PCR empleado en nuestro laboratorio en el que se usan primers degenerados que permiten la detección de los virus miembros del género *Flavivirus* y la identificación mediante una nPCR de los 4 serotipos de los virus dengue.

A. Extracción del ARN viral RT-PCR/nPCR para la tipificación de los virus del dengue según Lanciotti y col, 1992.

Extracción del ARN viral. Para la extracción del ARN viral están disponibles en la bibliografía un gran número de protocolos. En este manual se detallan los protocolos que hemos utilizado con mayor frecuencia:

- I. Extracción del ARN viral mediante el método del Guanidinium isotiocianato**
- II. Extracción del ARN viral mediante el método del Trizol**
- III. Extracción del ARN viral mediante el Kit**

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

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

I.2. En muestras de suero se realiza a partir de 200 µL de suero o plasma (Igual volumen que de sobrenadante de cultivo infectado, etc.), el resto del procesamiento es idéntico en todos los casos.

- Transferir los 200 µL a un tubo eppendorf y se le adiciona igual volumen de 1x Tampón lisis (4M guanidinium isotiocianato, 25mM de tampón de citrato de sodio, pH 7.0, 0.5% sarkosyl, 100mM de 2-mercaptoetanol y 1µg/mL de tRNA de levadura). Agitar manualmente y adicionar secuencialmente:

- 40 µL de 2M acetato de sodio, pH 4.0, agitación manual.
- 500 µL de fenol equilibrado con agua (libre de RNasas*), agitación manual, 30 seg.
- 150 µL de cloroformo (cloroformo: alcohol isoamílico; 49:1), agitación manual vigorosa.

- Mantener en hielo 15 minutos, y centrifugar a 10 000 -13 000 r.p.m., 15 min. 4°C.

- Remover la fase acuosa, pasándola a un tubo nuevo, y adicionar igual volumen de Isopropanol, mantener a menos 20 ° C al menos 1 hora (se puede dejar en este paso a -20°C toda la noche y se puede conservar así el ARN por varios días.
- Centrifugar en iguales condiciones por 20 min. Descartar el sobrenadante y adicionar 1 mL de Etanol al 75% al precipitado resultante en el fondo del tubo (pellet), centrifugar en iguales condiciones 5 min.
- Remover el etanol con mucho cuidado (con pipeta) y poner a secar el precipitado colocando al tubo en posición invertida, abierto sobre un papel estéril, e irradiado con luz UV.
- Resuspender el pellet en 20 µL de agua (libre de RNasas*).

*Agua libre de RNasas: es agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC): agua destilada estéril se le añade 1ml de dietil pirocarbonato por cada litro de agua a tratar, se deja en agitación por 16-18 horas y se esterilizar para inactivar el DEPC. Se hacen alícuotas según el uso.

I.3 De muestras de tejidos en bloques de parafina

Desparafinación:

- Realizar cortes seriados entre 15-20 micras utilizando un micrótopo horizontal LEICA. Colocar los cortes en viales eppendorf de 1.5L
- Adicionar 1mL de xilol y mantener por 10 min. a temperatura ambiente (TA) en una plataforma con movimientos suaves.
- Centrifugar por 3 min. a 10000 rpm.
- Eliminar el sobrenadante y repetir este proceso 2 veces mas hasta no observar restos de parafina.
- Adicionar 1ml de etanol absoluto y mantener durante 5 min. a TA y posteriormente al 95% y al 70% durante igual período con centrifugaciones entre cada paso de 3 min. a 10000 rpm.
- Dejar secar el tejido en flujo laminar hasta eliminar los restos de etanol (mediante evaporación). Aproximadamente durante 30-45 min.

Extracción del ARN viral (Método del guanidinium isotiocianato):

- Resuspender el pellet en 300µL de tampón de lisis (100mM Tris-CIH pH 8.5, 0.5M EDTA, 10% SDS, 25mg\ml de Proteinasa K y 20u Rnasin) e incubar por 1h a 56°C en baño de agua.
- Añadir 300 µL de fenol-cloroformo en incubar por 10 min a TA utilizando plataforma o balancín. Centrifugar por 5 min a 7000 rpm. Extraer la fase acuosa (superior) y pasarla a un tubo eppendorf nuevo. Repetir la extracción una vez más.
- Añadir 300 µL de cloroformo y realizar un proceso similar al anterior. Repetir por segunda vez la extracción con cloroformo.
- Precipitar el ARN con 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío y acetato de sodio (1\10) durante 18h a -70°C.
- Centrifugar por 15 min. a 4°C y 12000 rpm, lavar con 1 mL de etanol al 70%, centrifugar en iguales condiciones y dejar secar el pellet en flujo laminar durante 30 min.
- Resuspender el pellet añadiendo 10µL de agua DEPC y mantener en hielo hasta la síntesis del cADN o a menos 70 °C por más tiempo.

I.4. De Sangre total seca en papel de filtro

- Toma y colecta de la muestra:
 - ✓ Obtener la sangre total por punción capilar hasta un volumen de 100 µL.
 - ✓ Impregnar la región A de cada papel de filtro (Blood Sampling Paper, NOBUTO, Toyo Roshi Kaisha, Ltd. Japan, Type I).
 - ✓ Colocar los papeles de filtro a TA hasta su completo secado (Figura 1).
 - ✓ Almacenar los papeles en un lugar seco a TA, para prevenir la humedad y la contaminación, envolverlos en papel de aluminio cada uno por separado.

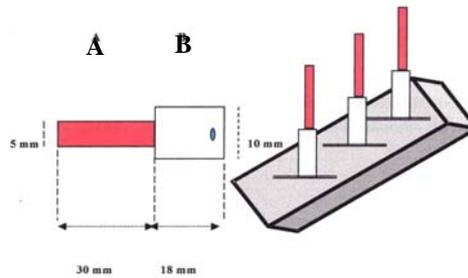


Figura 1. Papel de filtro empleado en el estudio. Izquierda A) Región donde se impregna la sangre infectada. Derecha) Posición de los papeles para el secado de la sangre impregnada.

- Elusión y extracción del ARN viral.
 - ✓ Cortar el área "A" del papel de filtro en 12-15 segmentos pequeños y transferirlos a un tubo eppendorf de 1.5 mL.
 - ✓ Añadir 400 μL de agua libre ARNasas.
 - ✓ Colocar los tubos a 37°C durante 30 min.
 - ✓ Dar un golpe de centrifuga para precipitar los papeles.
 - ✓ Posteriormente transferir la mezcla de sangre y agua a un tubo eppendorf limpio (con pipeta).
 - ✓ 200 μL de la mezcla del paso anterior se utilizan para continuar el protocolo como se describe en el siguiente acápite (II) para la extracción del ARN viral empleando Trizol.

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

- En un tubo eppendorf de 1.5 mL con 200 μL de sobrenadante de cultivo celular infectado, homogenizado de tejido cerebral o suero, se añade 1 mL de Trizol.
- Agitar manualmente, incubar 10 min. a TA.
- Adicionar 200 μL de cloroformo, agitar manualmente 15 seg., incubar 15 min a TA.

- Centrifugar a 12 000 rpm, 10 min., a 4°C.
- Transferir la fase acuosa a un nuevo tubo, agrega 500 µL o igual volumen de la fase acuosa transferida, de isopropanol, incubar 10 min. a TA.

EN ESTE PASO SE PUEDE CONSERVAR A -20 °C POR MÁS HORAS O VARIOS DÍAS

- Centrifugar a 12 000 rpm, 10 min., 4°C.
- Descartar la fase acuosa y al precipitado obtenido se le adiciona 1 mL de etanol al 75%, se mezcla manualmente con suavidad y se centrifugar a 12 000 rpm, 5 min. a 4°C.
- Remover el etanol con mucho cuidado (con pipeta) y poner a secar el precipitado colocando al tubo en posición invertida, abierto sobre un papel estéril, e irradiado con luz UV.
- El material seco se resuspende en 20-50 µL de agua DEPC.

III. Extracción del ARN viral mediante el QIAamp Viral RNA Mini Kit Handbook

Componentes del Kit:

Columnas QIAamp, Tubos de colección (2 mL), Buffer AVL, Buffer AW1 (concentrado),

Buffer AW2 (concentrado), Buffer AVE, Carrier RNA (poly A).

Preparación de los reactivos del Kit:

- Buffer AVL, calentar a 80° C para disolver y adicionar 1 mL al Carrier (liofilizado): pasar al Frasco Buffer AVL/ RNA carrier y conservar a 2-8 °C.
- Buffer AW1: 175 mL + 230 mL Etanol
- Buffer AW2: 127 mL + 300 mL Etanol

Procedimiento:

1. En un tubo de micro –centrifuga de 1.5 mL, adicionar:
140 µL de muestra + 560 µL de buffer AVL/RNA carrier, mezclar con vortex e incubar 10 min. a TA, Ctg breve a TA.

2. Adicionar 560 μ L etanol (96-100%), mezclar por vortex breve. Ctg breve a TA
3. A un QIAamp columna incertada en un tubo de colección de 2 mL, aplicar 630 μ L de la solución que se obtiene en el paso 3. Cerrar la tapa, Ctg 8000 rpm, 1 min
4. Colocar la columna en otro tubo de colección nuevo y descartar el anterior. Cuando se trabajan varias extracciones es prudente cerrar cada columna, según se trabajen para evitar contaminaciones cruzadas.
5. Adicionar a la columna 500 μ L del buffer AW1, Ctg a 8000 rpm, 1 min.
6. Repetir el paso 7
7. Adicionar 500 μ L del buffer AW2, Ctg a 13 000 rpm, 3 min.
8. Descartar el tubo de colección con el filtrado. Colocar la columna en un tubo de micro-centrifuga 1.5 mL. Adicionar 60 μ L del buffer AVE. Cerrar la tapa de la columna. Incubar a TA 1 min, Ctg. 8000 rpm, 1 min.
9. Recuperar el RNA eluido en el tubo de 1.5 mL, guardar a - 70 °C, o emplear directamente para la amplificación mediante RT-PCR.

B. RT/PCR (Protocolo propuesto por Lanciotti y col 1992 y modificado por Rosario y col, 1998.)

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

- Tampón 10x [50 mM KCl, 10mM Tris (pH 8.5), 1.5 mM MgCl₂, 0.01% gelatina]
- 200 μ M de cada uno de los 4 deoxinucleotidos trifosfatos (ATP, CTP, GTP y TTP)
- 100 mM ditiotreititol (DTT)
- 50 pmoles de cada uno de los cebadores D1 y D2 (cebadores universales). Ver Tabla 1.
- 10 U de AMV-RT (Promega)
- 2.5 U de Taq DNA polimerasa (Promega)
- Agua DEPC (hasta completar 90 μ l)
- Se adiciona a cada tubo con la mezcla anterior 10 μ L del ARN.

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

30 min - 42° C (transcripción reversa)
 30 seg - 94 °C (desnaturalización del ADN)
 30 ciclos 1 min - 55 °C (hibridación de los cebadores/ADN)
 2 min - 72 °C (elongación de la cadena)
 5 min - 72 °C (extensión final)

Segunda amplificación o nPCR

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

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

Después del ciclaje, mantener las muestras a 72 °C 5 minutos extras.

Tabla 1. Cebadores empleado en el diagnóstico de dengue según Lanciotti et al, 1992.

Cebado	Secuencia nucleotídica	Talla del producto
D1	5' TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG 3'	511 bp
D2	5' TTGCACCAACAGTCAATGTCTTCAGGTTC 3'	511 bp
TS1	5' CGTCTCAGTGATCCGGGG 3'	482 bp (D1 and TS1)
TS2	5' CGCCACAAGGGCCATGAACAG 3'	119 bp (D1 and TS2)
TS3	5' TAACATCATCATGAGACAGAGC 3'	290 bp (D1 and TS3)
TS4	5' CTCTGTTGTCTTAAACAAGAGA 3'	392 bp (D1 and TS4)

Análisis directo de los productos del PCR por Electroforesis

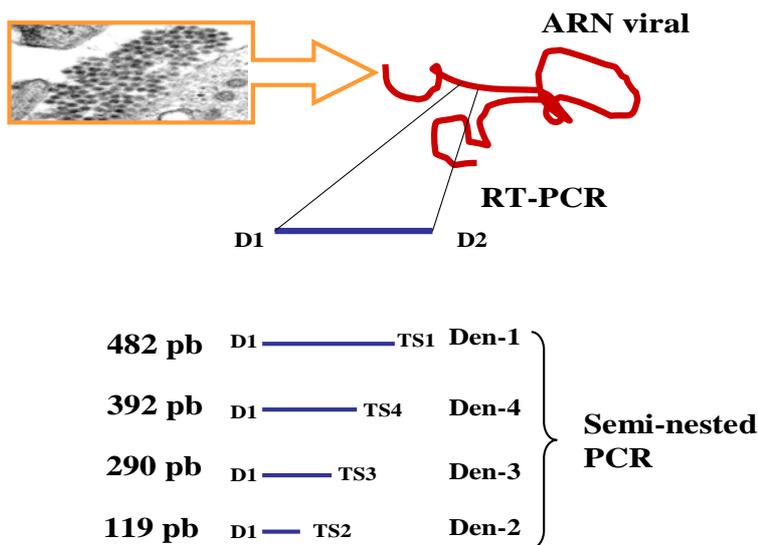
Preparar un gel de agarosa al 2 % en tampón TBE 1X (0,4M de Tris, 0,5 M de ácido bórico y 0,01 M de ácido etilendiamín tetracético), teñido con bromuro de etidio (0.5µg/mL). A 10µL del producto amplificado se le adiciona 2 µL de tampón de corrida (Tampón Loading 6X, Promega) se someten a electroforesis en el gel de agarosa, en cámara de electroforesis sub-marina (LKB) utilizando para ello como tampón de corrida el TBE 1X , a 100 V, durante 1 hora. Al finalizar, las bandas del ADN amplificado son visualizadas mediante un transiluminador de luz UV, determinando sus tallas por comparación con un marcador de peso molecular de ADN como el DNA Leader 100 pb y PCR Marker (Promega).

Interpretación de los resultados:

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

La talla del producto del nPCR, depende del serotipo que se este amplificando (Fig.1).

Figura 1. Esquema de la RT-PCR/n PCR según Lanciotti y col, 1991.



Referencias

1. D. Rosario, M. Alvarez, J. Díaz, R. Contreras, R. Rodríguez, M.G. Guzmán. Rapid detection and typing of Dengue viruses from clinical samples using Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction. *Revista de la Organización Panamericana de la Salud* 1998; 3:1-5.
2. D. Rosario, M Alvarez, S Vázquez, N Amin, R Rodríguez K Valdés MG Guzmán. Application of Molecular Methods to the Diagnosis and Characterization of Dengue Outbreak in Cuba. *Biotecnología Aplicada* 2001; 18:203-206.
3. D. Rosario. Diagnóstico molecular de las infecciones por Arbovirus. Libro: *Genetic Diagnosis in Medicine*, Primera edición, 1998.
4. Prado I, Rosario D, Bernardo L, Alvarez M, Rodriguez R, Vazquez S, Guzman MG. PCR detection of dengue virus using dried whole blood spotted on filter paper. *J Virol Methods*. 2005 Apr; 125(1):75-81.

C. RT-PCR/ nPCR genérico para la detección de los Flavivirus y tipificación de los virus del dengue.

Tabla 2. Cebadores empleados en la RT/PCR genérica de Flavivirus y PCR m de dengue.

Talla del ADN	Cebadores	Secuencia de bases (5'-3')
RT-PCR genérico Flavi 1 (1300 pb)	Flavi 1+	GAYYTIGGITGYGGIIGIGIGGMTGG
PCR genérico Flavi 2 (144 pb)	Flavi 1- Flavi 2+	CCASTGITCYKCRTTIAIRAAICC TGYRTITAYAACAYSATGGG
PCR múltiple de Dengue (480 pb)	Flavi 2- Dengen	TCCAICCCIGCIRTRTCRTCIGC AGICCTTCYCCTTCYACTCCAC
(834 pb)	Den 1	GTGGTTATGGGGTTTCTCTCTAG
(244 pb)	Den 2	CCGYAAYATYGGRATTGAAAGTGA
(658 pb)	Den 3	GAGCTGCTGTTGAGGACGARGAATT
	Den 4	ATGAACCTCCTTCGACAGGCTCTCC

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

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

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

El programa para la RT-PCR es el mismo que se emplea para la RT-PCR propuesta por Lanciotti y col, 1992.

nPCR Flavivirus (PCR Flavi 2) y PCR múltiple de Dengue (PCRm Dengue)

PCR Flavi 2: Un 1 μ L del producto de la RT-PCR Flavi 1 se emplea como molde para la PCR Flavi 2. La mezcla para la reacción (en volumen final de 100 μ l) consiste de los mismos componentes del tampón de reacción empleado para la RT-PCR, 50 pMoles de los cebadores Flavi 2+ y Flavi 2-, 200 μ M de los dNTP y 2,5U de Taq DNA polimerasa.

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

PCRm Dengue: 1 μ L del producto de la RT-PCR Flavi 1 se utiliza también como molde de ADN para esta reacción, empleando las mismas condiciones que la PCR Flavi 2 pero en este caso 50 pMoles de los cebadores DenGen, Den1, Den2, Den3 y Den4 y sometidos al mismo ciclaje que la PCR Flavi 2.

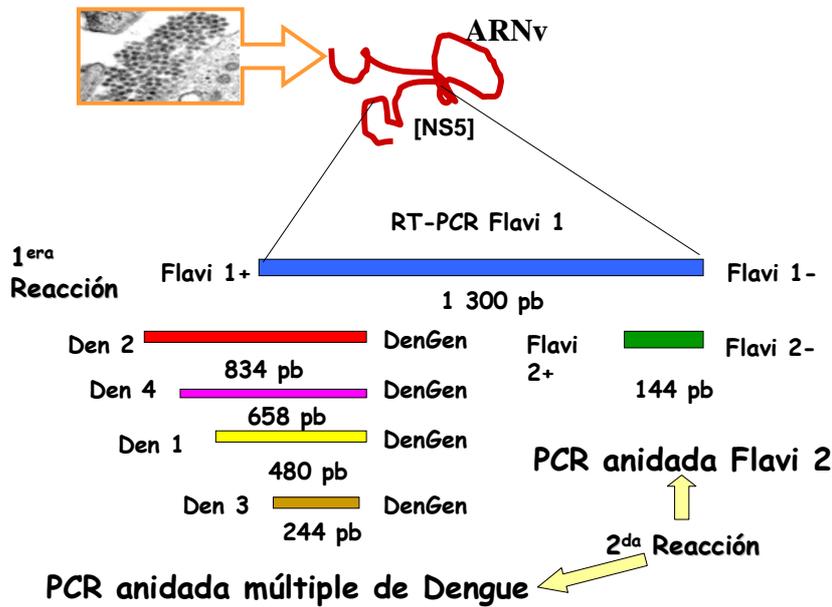
Es posible incorporar en esta reacción además los cebadores Flavi 2+ y Falvi 2-, con similar concentración.

Análisis directo de los productos del PCR por Electroforesis:

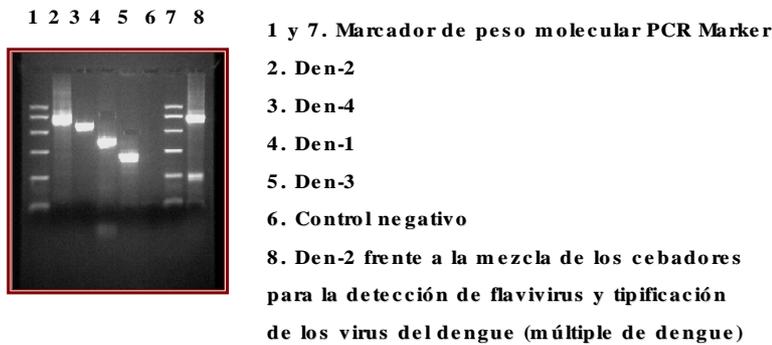
Se sigue el protocolo propuesto para el análisis de la PCR propuesta por Lanciotti y col. 1992.

Para la interpretación de los resultados, se determina el serotipo empleando el patrón de peso molecular incluido en la electroforesis y conociendo las tallas para cada uno de los serotipos como se indica en la Tabla 2 y en la Figura 2.

Figura 2. Esquema de la PCR para la detección de los miembros del género Flavivirus y tipificación de los virus del Dengue



Un ejemplo de los resultados se puede observar en la siguiente foto:



Referencias

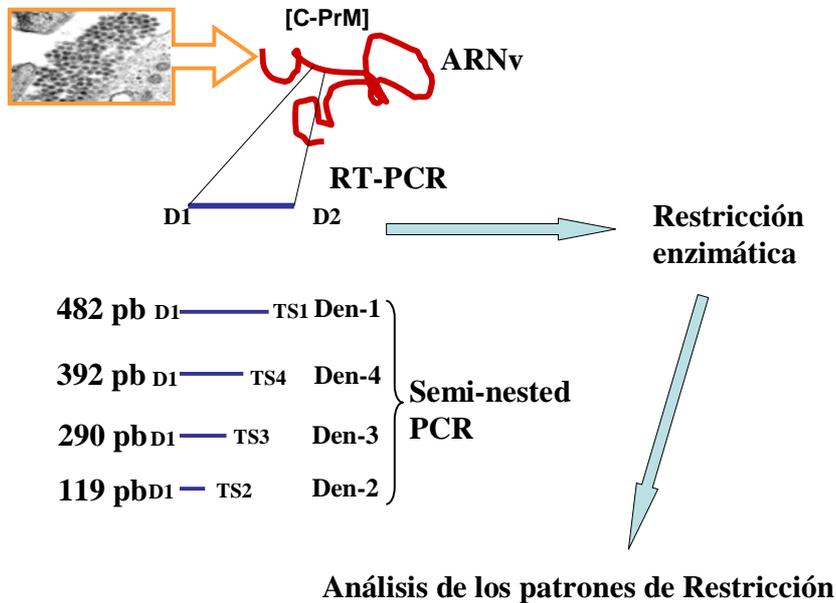
1. Generic detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control and specific identification by means of sequencing. Sánchez-Seco MP, Rosario D, Valdes K, Guzmán MG, Tenorio A. J Virol. Method 2005, 126(1-2):101-109.

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

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

En este estudio, se digiere el fragmento genómico del virus del Dengue obtenido por RT/PCR usando los primer universales de dengue D1 y D2, con un panel de enzimas de restricción (Figura 3). Los fragmentos producto de la digestión son visualizados por electroforesis de agarosa, constituyendo un patrón de restricción, que puede ser observado en presencia de luz UV, y analizado de esa forma sin necesidad de un aditamento adicional o programa computarizado. El procedimiento es útil para estudiar aislamientos de cepas de dengue, debido a que la banda de amplificación de la RT-PCR a partir de muestras clínicas, generalmente no se visualiza, por lo que no es útil para su restricción con enzimas y definir patrones (Rosario y col 1998).

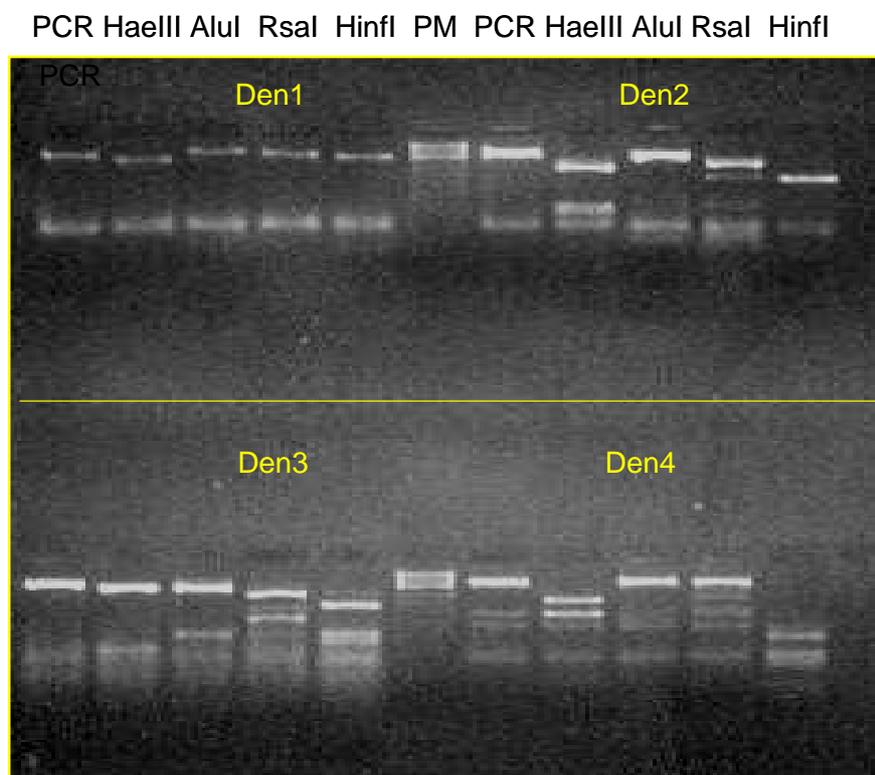
Figura 3. Esquema de la RT-PCR-RE para la determinación de subtipos de los serotipos de los virus dengue



Restricción enzimática del producto de la RT-PCR (511 pb).

1. Rotular 5 tubos eppendorf de 0.5 mL (1 con el nombre de cada enzima empleada y 1 tubo control, al que no se le añade ninguna de las enzimas. Adicionar secuencialmente:
2. 8 μ L del producto amplificado del RT/PCR
3. 1 μ L del tampón de la enzima de restricción correspondiente
4. 1 μ L de la enzima de restricción según el rotulo (HaeIII, AluI, RsaI, HinfI) o 1 μ L de agua (Control).
5. Incubar a 37 ° C, 1 hora
6. 2 μ L de tampón de aplicación para electroforesis
7. Preparar un gel de agarosa al 4 % con TBE 1X con 1 μ g/mL de bromuro de etidio (igual procedimiento al descrito en IV.1.)
8. Aplicar todo el volumen de la reacción con cada enzima, en un orden fijo en el gel
9. Visualización de las bandas a través de luz UV (Fig.4).

Figura 4: Los patrones de restricción con las 4 enzimas en cepas prototipos de los 4 serotipos de los virus del dengue.



Referencias

1. Los Métodos Moleculares para el Diagnóstico y Caracterización de los Virus del Dengue. D Rosario. Rev Latinoam Microbiol 2002; 4 (4): suppl. Versión electrónica.

**DETECCIÓN DE LA CARGA DE VIRUS DENGUE MEDIANTE REVERSO
TRASCRIPTIÓN- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO
REAL (RT/PCR-TR Ó CV).**

1. Extracción del ARN viral mediante el QIAamp Viral RNA Mini Kit.: Se realiza siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante. (Ver acápite A-III)

2. Transcripción reversa.

El ADN copia (ADNc) es obtenido a partir de 8 μ L de ARN extraído, que se adicionan a una mezcla de reacción que contiene: 200ng de cebador al azar (en inglés, *random hexamers*) (Roche), dNTP 10mM (Qiagene) y agua libre de nucleasas (Sigma), para un volumen final de 13 μ l. Esta mezcla es llevada al termociclador (Mastercycler, Eppendorf), donde se somete a 65 °C por 5 min. Seguidamente se colocan los viales en hielo por un minuto y a esta mezcla se le añade una segunda que contiene: 4 μ L del tampón 5x, DTT 5mM, 16U RNAsa Inhibitor, 40U Superscript III-RT (Invitrogen) y agua libre de nucleasas, cantidad suficiente para 20 μ l de reacción. La transcripción reversa se llevó a cabo en el mismo termociclador con el siguiente programa: durante 5 min a 25° C, seguido de 1h a 50° C y por último 70° C por 15 min. El ADNc obtenido puede ser guardado a 4° C hasta su utilización, por corto tiempo (no más de una semana) o utilizarlo directamente en el próximo paso.

3. Ensayo TaqMan.

Para la realización del ensayo TaqMan se emplean las sondas y los cebadores específicos para cada serotipo, propuestos por Laue y col. en 1999, que amplifican parte de la región del genoma viral que codifica para la proteína no estructural NS5, con modificaciones realizadas en la unidad en la Universidad de Oxford del Hospital Ho Chi Minh de Vietnam (Simmons C, datos no publicados) y empleando las concentraciones propuestas por esta institución.

Para la realización de esta técnica se siguieron los siguientes pasos:

1. Se añaden 5 μ L del ADNc a cada capilar de cristal (Roche) que contiene: 4 μ l de la mezcla de reacción (Taq FastStart DNA polimerasa, tampón de

reacción, MgCL₂ y mezcla de dNTP, con dUTP en lugar de dTTP, contenido en el estuche comercial *LightCycler TaqMan Master PCR*, Roche), los cebadores específicos según el serotipo a una concentración final de 0,75 μM, la sonda TaqMan según el serotipo a una concentración final de 0,25 μM para los virus DEN-1, DEN-2 y DEN-4 y 0,3 μM para el virus DEN-3 (**Tablas 1 y 2**) y agua libre de nucleasas, cantidad suficiente para un volumen final de 20 μl. Estos capilares se colocan en una gradilla con soportes para capilares, previamente refrigerada.

2. Los capilares en su soporte se someten a una centrifugación durante 1 min a 1300 rpm.
3. Posteriormente, cada capilar conteniendo la mezcla de reacción se coloca en el carrusel del equipo LightCycler 1.5 (Roche) y se inicia el programa siguiente: 95°C por 14 min, 45 ciclos (95°C, 15 seg; 60°C, 1 min; 72°C, 1 seg) y 5 min a 72°C.

Tabla 1. Cebadores empleados para el ensayo TaqMan, secuencia de bases y talla del producto amplificado.

	CEBADOR POSITIVO	CEBADOR NEGATIVO	TALLA (pb)
DEN-1	5'ATCCATGCCACCAAYCAATG 3'	5'CAGGGATCCACACCAAYTGATC 3'	162
DEN-2	5'ACAAGTCGAACAACCTGGTCCAT 3'	5'GCCGCACCATTGGTCTTCTC 3'	177
DEN-3	5'TTTCTGCTCCCACTTTTCAT 3'	5'TGGCGTTGGATGCYAGTCT 3'	229
DEN-4	5'GYGTGGTGAAGCCYCTRGAT 3'	5'AGTGARCGGCCATCCTTCAT 3'	186

Tabla 2. Sondas utilizadas para el ensayo TaqMan y secuencia de bases de las mismas.

SEROTIPO	SONDAS
DEN-1	5'FAM-TCAGTGTGGAATAGGGTTTGGATAGAGGAA-3'TAMRA
DEN-2	5'FAM-GTTTTGTCTTCCATCCA-3'BHQ-1
DEN-3	5'FAM-AAGAAAGTTGGTAGTTCCTGCAGACCCCA-3'TAMRA
DEN-4	5'FAM-ACTTCCCTCCTCTTYTTGAACGACATGGGA-3'TAMRA

4. Cálculos

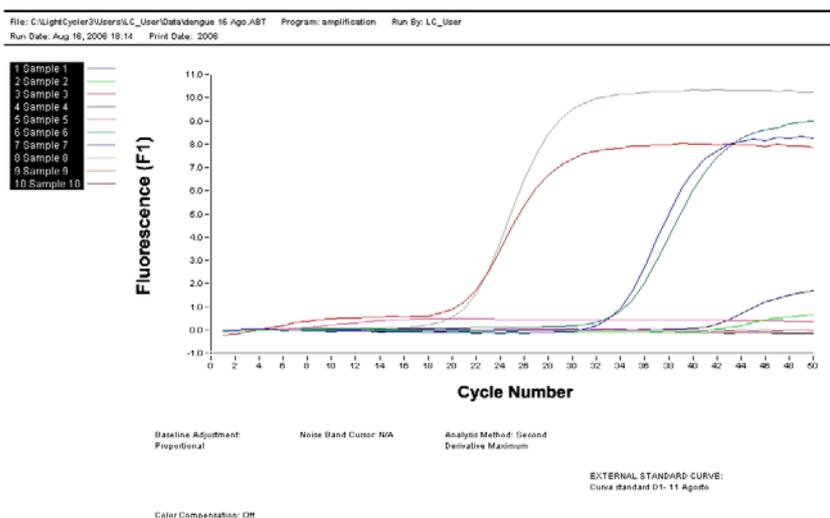
Por las características de este tipo de ensayo, mientras transcurre el ciclado se puede observar en pantalla las muestras que comienzan a mostrar un resultado positivo de acuerdo a la lectura de fluorescencia que va haciendo el equipo de cada muestra debidamente individualizada.

Análisis de los resultados: para el análisis del resultado por TaqMan se utiliza el programa 3.5.3 (modo aritmético del método SDMM) del LightCycler 1.5.

Criterio de positividad y de negatividad: se considera positiva toda muestra de suero o de sobrenadante de cultivo celular infectado, cuya señal de fluorescencia es detectada por el LightCycler y como negativa aquella que no detecta señal.

Cuantificación de amplicones en muestras clínicas: para la cuantificación del ADNc amplificado en cada muestra de suero, se importa la curva estándar correspondiente según el serotipo.

Al concluir el programa de corrida se puede cuantificar la carga viral presente en la muestra importando una curva estándar previamente realizada y guardada en el programa o empleando los valores de la curva que ha corrido en el mismo ensayo con las muestras clínicas. Los resultados de carga viral se cuantifican en UFP/mL, como se establecieron durante la estandarización de la técnica, acorde a las unidades que tienen cada punto de la curva. Otros parámetros del programa pueden ser chequeados para conocer que los resultados son válidos.



Referencias

1. Laue T, Emmerich P, Schmitz H. Detection of dengue virus RNA in patients after primary or secondary dengue infection by using the TaqMan automated amplification system. J Clin Microbiol. 1999 Aug; 37(8):2543-7.

AMPLIFICACIÓN DEL GENOMA VIRAL DE LOS VIRUS DEL DENGUE PARA SECUENCIACIÓN NUCLEOTÍDICA

I. Extracción del ARN viral:

Se utiliza muestras virémicas de suero, macerados de tejidos (obtenidos durante la autopsia de casos fatales de dengue) y sobrenadante de cultivo de células infectadas con virus dengue.

Se emplea el estuche comercial: QIAamp Viral RNA Mini Kit, QIAGEN, siguiendo las instrucciones del fabricante, descritas en el acápite anterior.

II. Obtención del ADN copia mediante Transcripción Reversa (RT):

Se utilizan los estuches comerciales:

1. Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit, Roche (05 081 963 001)

La reacción de RT se lleva a cabo en un volumen total de 20 μ L. Mezcle 8 μ L del ARN extraído, 2 μ L de dNTP (10mM) y 2 μ L del cebador correspondiente a una concentración de 10 pmol/ μ L. Para la reacción con el cebador específico, se calienta la mezcla a 65°C por 5 min y se enfría en hielo por 1 min. Luego se añade una mezcla de 8 μ L que contiene: 2 μ L de DTT (0.1 mM), 1 μ L de RNAsin (40 unidades/ μ L), 4 μ L buffer de reacción 5x y 1 μ L de Transcriptasa Reversa (Roche). La mezcla final se coloca en el termociclador a 50°C por 50 min y posteriormente se inactiva la enzima a 85°C por 5 min. Cuando se utilice el Random primer el procesamiento es similar aunque es necesaria una incubación de la mezcla final a 25°C por 5 min antes de comenzar con la reacción de transcripción reversa a 50°C.

2. SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR, Invitrogen (18080-051)

La reacción de RT se lleva a cabo en un volumen total de 20 μ L. Mezcle 8 μ L del ARN extraído, 1 μ L de dNTP (10mM) y 1 μ L del cebador correspondiente a una concentración de 10 pmol/ μ L para primer específico y 100 μ mol/ μ L para random primer. Para la reacción con el cebador específico, se calienta la mezcla a 65°C por 5 min y se enfría en hielo por 1 min. Luego se añade una mezcla de 10 μ L que contiene: 2 μ L de DTT (0.1 mM), 1 μ L de RNAsin (40 unidades/ μ L), 4 μ L de MgCl₂

25 mM, 2 μ L del buffer de reacción 10x y 1 μ L de Transcriptasa Reversa Superscript III (200U/ μ L) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA). La mezcla final se coloca en el termociclador a 50°C por 50 min y posteriormente se inactiva la enzima a 85°C por 5 min. Cuando se utilice el Random primer el procesamiento es similar aunque es necesaria una incubación de la mezcla final a 25°C por 5 min antes de comenzar con la reacción de transcripción reversa a 50°C.

III. Amplificación de fragmentos del genoma viral de hasta 3000 pb.

Se utiliza el estuche **Expand High Fidelity PCR system** (500U), Roche (11 732 650 001) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Mix 1	
MgCl ₂	2 μ L
Buffer 10x	2.5 μ L
dNTPs	0.6 μ L
DMSO	1.25 μ L
Primer +	1 μ L
Primer -	1 μ L
H ₂ O	8.65 μ L
Total	17 μL
cDNA	3 μL
Total	20 μL
Mix 2	
Taq Pol	0.4 μ L
H ₂ O	4.6 μ L
Total	25 μL

Cuando se preparan varias reacciones de PCR es recomendable añadir la enzima al final, por eso aparece como una segunda mezcla.

Para genotipificación de los virus del dengue a partir del gen completo de la Envoltura viral están disponibles diversos protocolos, donde se utilizan diferentes juegos de primers de acuerdo con el serotipo que se quiera amplificar (**Rodriguez-Roche et al., 2005a, Rodriguez-Roche et al., 2005b, Uzcategui, Comach et al. 2003**).

Por otra parte, con fines de investigación es útil la amplificación del genoma viral completo. En este momento nuestro laboratorio utiliza los primers descritos por **Christenbury, Aw et al. 2010**, con algunas modificaciones (**Rodriguez-Roche et al., publicación en preparación**). Este protocolo permite la amplificación del genoma viral completo en 5 fragmentos solapados (F1, F2, F3, F4 y F5). El fragmento **F1** es útil para amplificar los genes que codifican para las proteínas estructurales partiendo de la región 5' UTR. Todos los primers se utilizan en concentraciones de 10 pmoles/ μ L.

Referencias

1. Christenbury, J. G., P. P. Aw, et al. (2010). "A method for full genome sequencing of all four serotypes of the dengue virus." J Virol Methods doi:10.1016/j.jviromet.2010.06.013.
2. Rodriguez-Roche, R., M. Alvarez, et al. (2005a). "Virus evolution during a severe dengue epidemic in Cuba, 1997." *Virology* 334(2): 154-159.
3. Rodriguez-Roche, R., M. Alvarez, et al. (2005b). "Dengue virus type 2 in Cuba, 1997: conservation of E gene sequence in isolates obtained at different times during the epidemic." *Arch Virol* 150(3): 415-425.
4. Uzcategui, N. Y., G. Comach, et al. (2003). "Molecular epidemiology of dengue virus type 3 in Venezuela." *J Gen Virol* 84(Pt 6): 1569-1575.

SECUENCIACIÓN NUCLEOTÍDICA DIRECTA DEL PRODUCTO DE PCR

Se emplea el equipo de secuenciación automática: CEQ 8800, Beckman Coulter



El sistema de análisis genético CEQ 8800 es totalmente automatizado y capaz de determinar la secuencia nucleotídica del ADN problema mediante la separación por electroforesis capilar de los fragmentos obtenidos durante la reacción de secuencia. Se basa en el método de Sanger-Coulton o de terminación de la cadena, con el empleo de dideoxinucleótidos marcados que emiten fluorescencia a diferentes longitudes de onda, de modo que es posible diferenciar cada una de las bases (A,G,C,T).

El equipo permite el procesamiento continuo de dos placas de 96 pocillos y cuenta con un arreglo de 8 capilares, por lo que es posible realizar un método de separación diferente en cada una de las columnas de 8 pocillos.

El procesamiento ocurre de forma consecutiva de columna en columna de la placa. Primero ocurre la desnaturalización y luego la separación por electroforesis capilar. El gel de separación es reemplazado automáticamente en los ocho capilares después de cada separación. El cartucho de gel es reemplazable y contiene la cantidad suficiente para dos microplacas completas.

La detección se realiza por fluorescencia inducida por láser en cuatro canales espectrales. Los datos de cada columna de 8 muestras se procesan automáticamente para brindar la secuencia y los cromatogramas correspondientes que se almacenan en una base de datos y también pueden ser exportados en formatos compatibles con diferentes aplicaciones de análisis de secuencia. En el IPK se realiza el procesamiento de las secuencias y el ensamblaje de varios fragmentos utilizando el programa Sequencher 4.8, Gene Codes Corporation.

Para las reacciones de secuencia se utiliza un estuche comercial (CEQ DTCS quick start kit, Becton Coulter). Este estuche incluye una mezcla lista para usar que contiene la enzima, dNTPs, dideoxinucleóticos marcados y buffer de reacción para 96 reacciones de secuencia.

Dependiendo del tamaño del gen que se desee secuenciar se deben diseñar primers cada 400 pb aproximadamente (sentido y antisentido) para secuenciar tanto la cadena positiva como la negativa. De forma usual en nuestro laboratorio se amplifica el gen de la Envoltura viral para cada uno de los serotipos de dengue, con vistas a la genotipificación viral. En este protocolo se utilizan 8 primers de secuencia para cada serotipo. Con fines de investigación se amplifica el genoma viral completo a partir de 5 fragmentos como se describió en acápite anterior. Dichos fragmentos son secuenciados empleando alrededor de 40 primers en total para cada serotipo.

Materiales suministrados por Beckman Coulter:

1. Formamida (conservar a -20°C)
2. Aceite mineral (conservar a 4°C)
3. Glucógeno (conservar a -20°C)
4. Genome Lab Separation gel LPA-1 20ml (conservar a 4°C)
5. Genome LAB DNA Sequencing capillary array 33cm (conservar a 4°C)
6. Buffer de separación (conservar a 4°C)
7. Placas para muestras
8. Placas para buffer

Materiales requeridos no suministrados por Beckman Coulter

1. Tubos eppendorf de 0.2 mL y 1.5 mL
2. Puntas para micropipetas
3. Primers o cebadores diseñados para el estudio en concentraciones de 5 pMoles/ μ L

4. Agua estéril

El agua se utiliza en las reacciones de secuenciación en el CEQ, debe ser desionizada y esterilizar. NO debe tratarse con DEPC. El DEPC residual interfiere con las reacciones enzimáticas y puede provocar una señal baja y corriente inestable.

5. Etanol al 95% diluido con agua; etanol al 70% diluido con agua.

Estos reactivos se utilizan para precipitar las reacciones CEQ después de la secuenciación cíclica. El etanol debe ser puro, 100% (grado biológico molecular) y la solución se debe almacenar y utilizar a -20°C . Use agua estéril para diluir el etanol a la concentración deseada, como se describió anteriormente.

6. Acetato de Sódio - 3M (pH 5,2)

El acetato sódico se utiliza como componente de la solución terminadora. El pH es muy importante. Asegúrese de que el acetato sódico sea del pH correcto. De lo contrario, los disedoxinucleótidos no incorporados no se eliminarán eficientemente. La solución de Acetato de Sodio 3M, pH 5,2 puede obtenerse de Sigma (100 ó 500mL, Referencia S7899).

7. Na₂ EDTA - 100 mM (pH 8,0)

Este es el segundo componente de la solución terminadora requerida para la purificación que sigue a la reacción. Además, la solución terminadora debe prepararse fresca a partir de las bases; de no hacerlo, es posible que las sales precipiten. La solución de Na₂EDTA 0,5M (~ pH 8-8,5) puede obtenerse de Sigma (100mL, Referencia E7889).

Preparación de las reacciones de secuencia:



1. Para las reacciones de secuencia se prepararan las siguientes mezclas:

Componentes	Cantidades
ADN (producto de PCR purificado)*	25-100 fmoles
Primer	5 pmoles (1 μ l)
Master Mix	8 μ l
Agua	Completar hasta 20 μ l

*Purificar el producto de PCR utilizando el QIAquick PCR purification protocol, QIAGEN

2. La mezcla final se coloca en un termociclador y la reacción de secuencia se lleva a cabo siguiendo 30 ciclos del siguiente programa:

96 °C 20 seg

50 °C 20 seg

60 °C 4 min

3. Posteriormente se procede a la purificación de los productos de la reacción de secuencia mediante el método de precipitación con etanol:

a) Prepare un microtubo estéril etiquetado de 1,5mL para cada muestra.

b) A cada tubo etiquetado, añada 5 μ L de solución terminadora (2 μ L de NaOAc 3M + 2 μ L EDTA 100mM (soluciones base mencionadas anteriormente) y 1 μ L de glucógeno 20mg/mL (suministrado en el estuche).

Asegúrese de preparar la solución terminadora en el momento de usarla y mantenerla a temperatura ambiente. Si la solución terminadora se refrigera o se deja a temperatura ambiente durante demasiado tiempo, el EDTA se precipitará. El glucógeno se debe almacenar a -20°C con el estuche.

c) Transfiera las reacciones para secuenciación a los tubos etiquetados correspondientes y mézclelas completamente.

d) Añada $60\mu\text{L}$ de etanol al 95% diluido con agua (v/v) que ha sido refrigerado a -20°C y mezcle completamente. Inmediatamente, centrifugue a $14,000\text{rpm}$ a 4°C durante 25 minutos. Con cuidado, retire el sobrenadante con una micropipeta.

Nota: Para muestras múltiples, siempre añada la solución fría de etanol /agua inmediatamente antes de centrifugar.

En esta etapa, es muy importante mezclar completamente. Si no se mezcla suficientemente, la precipitación no será óptima. También puede ser perjudicial si las muestras se dejan reposar a -20°C después de añadir el etanol.

e) Lave el precipitado 2 veces con $200\mu\text{L}$ de etanol diluido con agua al 70% (v/v) que fue almacenado en un congelador a -20°C . Para cada lavado, centrifugue inmediatamente a $14,000\text{rpm}$ a 4°C durante un mínimo de 2 minutos. Después de centrifugar, retire con cuidado todo el sobrenadante con una micropipeta.

Cuando se eliminan las sales, es posible que el precipitado no sea visible. No rompa el pellet cuando agregue la dilución de etanol al 70. Después de centrifugar, elimine tanto etanol como sea posible. Tenga cuidado de no aspirar el precipitado en la punta de la pipeta.

f) Deje secar el precipitado por un tiempo breve, el sobresecado de los mismos impide que la muestra se resuspenda adecuadamente en el paso siguiente.

g) Resuspenda el precipitado (casi transparente) en $40\mu\text{L}$ de formamida (suministrada con el kit y que se conserva a -20°C en alícuotas de $350\mu\text{L}$). Aproximadamente 15 minutos después, asegúrese de resuspender nuevamente el precipitado utilizando vortex. No se recomienda calentar las muestras para volverlas a suspender. Las muestras resuspendidas se pueden almacenar hasta

un mes en tubos cerrados a una temperatura de -20°C. ¡NO ALMACENE LAS MUESTRAS EN FORMA DE PRECIPITADO!

Preparación de las muestras para cargarlas en el CEQ 8800

a) Transfiera las muestras resuspendidas a los pocillos apropiados de la placa de muestras del CEQ. NO ES POSIBLE USAR ningún otro tipo de placa.

b) Cubra todas las muestras resuspendidas con una gota de aceite mineral (suministrada en el estuche).

El aceite mineral protege las muestras. Debido a esto, es posible colocar las muestras de una placa en el CEQ y volver a reinyectarlas más tarde, si se desea.

c) Cargue la placa de muestras en el CEQ e inicie el método de separación deseado.

El plato tiene “muescas” en una esquina y puede colocarse en el soporte del plato solamente en una posición. Al cargar el plato de muestras en el CEQ, se debe tener cuidado de no dañar las puntas de los capilares que están expuestas.

d) Cargue la placa de buffer de corrida y verifique que la cubeta de agua (wetting tray) contiene la cantidad adecuada. Asegúrese de que cuenta con la cantidad de gel necesaria para la corrida y que los capilares han sido colocados.

Referencias

1. www.beckmancoulter.com

ENSAYO DE LINFOPROLIFERACIÓN A PARTIR DE CÉLULAS HUMANAS DE SANGRE PERIFÉRICA

Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica.

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

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

Ensayo de linfoproliferación:

1. Ajuste de células a la concentración de 1×10^6 /ml en medio RPMI-1640 suplementado.
2. Dispensar 100uL de células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos, fondo en U(Costar/Falcon).
3. Añadir antígenos (virus dengue purificado a partir de cerebro de ratón lactante) o mitógenos como PHA o medio en control de síntesis espontánea por triplicados, a concentraciones deseadas, en un volumen de 100 uL/pozo.
4. Incubar placas a 37° C, atmósfera húmeda, 5% de CO₂ durante 6 días para antígenos y 3 días para mitógenos.
5. Dar pulso con timidina tritiada 6 horas antes de completar el tiempo de incubación a 1uCi/pozo.
6. Tras completar el tiempo de incubación congelar la placa a -70 °C hasta el momento de su cosecha.
7. Cosechar las células con Cosechador automático (Cell harvester, Skatron) sobre papel de fibra de vidrio (Skatron).
8. Poner a secar el papel a temperatura ambiente durante toda la noche, a 37°C durante 3 horas o a 60°C durante durante 30 minutos.
9. Dispensar los discos en papel de fibra de vidrio en viales de centelleo.
10. Añadir Coctel líquido de centelleo (Scitran) 1mL en viales pequeños o 5ml en viales grandes.
11. Contar en contador de centelleo líquido (LKB) a 1 min/vial.

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

Referencias

1. Bojum A. (1968) Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose dextran and Ficoll as erythrocyteaggregating agents. Scand J. Clin Lab. Invest 21 supplement 97, 31-50.

ENSAYO DE LINFOPROLIFERACIÓN A PARTIR DE ESPLENOCITOS DE RATÓN

Aislamiento de esplenocitos

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

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

10. Ajuste de células a la concentración de 2x10⁶/ml en medio RPMI-1640 suplementado.
11. Dispensar 100ul de células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos, fondo en U (Costar/Falcon).
12. Añadir antígenos o mitógenos (o medio en control de síntesis espontánea) por triplicados, a concentraciones deseadas, en un volumen de 100 ul/pozo.
13. Incubar placas a 37° C, atmósfera húmeda, 5% de CO₂ durante 4 días para antígenos y 3 días para mitógenos.
14. Pulso con 1uCi/pozo de timidina tritiada (Amershan) por 18 horas.

15. Añadir Timidina tritiada a la concentración de 1 μ Ci/pozo.
16. Incubar 6 horas.
17. Congelar a -70°C.
18. Descongelación.
19. Cosecha.
20. Conteo de cpm.

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

Referencias

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

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

1. Preparación de gelatina al 3% en agua. Seguidamente esterilizar y disolver por autoclave.
2. Colocar sobre los frascos 10 mL e incubarlos toda la noche a 50 °C.
3. Aislar las CMSP según el método de Boyum et al., 1968.
4. Colectar el anillo así como el plasma.
5. Añadir 15 mL de plasma.
6. Incubar 1 hora a 37°C.
7. Absorber el plasma y lavar dos veces con RPMI sin suplementar (10mL /frasco). Observar la limpieza al Microscopio.
8. Colocar las CMSP en RPMI al 10 % STF
9. Incubar de 60-90 minutos, 37°C, 5%CO₂.
10. Extraer células que no se pegaron: Lavar con RPMI 2 veces y chequear al microscopio.
11. Añadir sln salina fría (20 mL).
12. Incubar 5 minutos.
13. Desprender y centrifugar 7 minutos 4°C a 1500 rpm.
14. Resuspender en RPMI al 2% de STF, si el objetivo siguiente es infectarlas (la infección se realiza empleando la técnica de Shell vial descrita previamente).
15. Ajustar a 5x 10⁸ células.

Referencias

1. Boyum et al. Isolation of leucocytes from human blood. Isolation of mononuclear cell by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. SCAND.J Lab. Invest **1968**; 21 (97): 77-89.

**DETECCIÓN DE CITOQUINAS INTRACELULARES Y MARCADORES
CELULARES DE SUPERFICIE POR CITOMETRÍA DE FLUJO EN CULTIVOS DE
CÉLULAS MONONUCLEARES MURINAS ESTIMULADAS CON
ANTÍGENOS/MITÓGENOS.**

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

- Se emplea un Ac anti receptor FC γ II/III, $1\mu\text{g}/10^6$ en 100 μl de tampón de marcaje (PBS-Dulbecco, STF 1% inactivado, Azida Sódica 1%, pH 7.4-7.6) filtrado; (TM)
- Incubar 30 minutos a 4 °C.

2. Marcaje de Antígenos de Superficie.

- Depositar 10^6 células en 100 μL de Tm en tubos precubiertos con ACM específico conjugado a fluorocromos (0,5 μg)
- Incubar 30 minutos a 4 °C.
- Lavar 2 veces con TM 1 mL/tubo 250 x g, 10 minutos.
- Desagregar con vortex.

3. Fijado y Permeabilización de las células.

- Resuspender las células en 200 μl de solución de fijado y permeabilización.
- Incubar 20 minutos a 4 °C.
- Lavar en las mismas condiciones que en el paso 2.

1. Marcaje de citoquinas intracelulares.

- Depositar 10^6 células en 100 μL de Tm en tubos pretratados con AcM específico conjugado a fluorocromos (5 μg)
- Incubar 30 minutos a 4 °C
- Lavar en las mismas condiciones que en el paso 2.

5. Análisis Citométrico.

- Control de marcaje para citoquinas intracelulares: Después de paso 3.

- Depositar 10^6 células en 50 uL de Tm en tubos pretratados con ACM específico NO conjugado a fluorocromos (5 ug), del mismo clon del conjugado.
- Añadir el AcM específico conjugado a fluorocromos (5 ug) en 50 uL.
- Incubar 30 minutos a 4 °C.
- Lavar en idénticas condiciones que en el paso 2.

Referencias

1. Haynes J. L. (1988) Principles of flow cytometry. Cytometry supplement 3: 7-17.
2. Prussin C. (1992) Cytokine flow cytometry: Understanding Cytokine Biology at the single cell level. Journal of Clinical Immunology vol 17 No 3.

ENSAYO DE INMUNOAMPLIFICACIÓN

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

Materiales:

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

Preparación de las células K₅₆₂.

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

Preparación de las mezclas de reacción

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

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

Cada mezcla virus-suero o virus-RPMI debe ser titulada, sin diluir y por duplicado, en células BHK21 (para el método de titulación ver p. 33.)

Se considera que se ha producido ADA si:

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

x₁ – número de placas del virus con suero

x₀ – número de placas del control de virus

PROCEDIMIENTO PARA ELISPOT DE INF GAMMA

1. Recubrir la placa con el anticuerpo primario (Ac anti IFN gamma): concentración de trabajo 3ug/ml de PBS para una placa (100 ul/pozo 10ml PBS + 30 ug de Ac anti IFN gamma).
2. Aislamiento de PBMC según el protocolo habitual.
3. Lavar tres veces con 200 ul /pozo de PBS estéril o RPMI.
4. Bloquear la placa con 200 ul de PBS / BSA: 5g de BSA fracción V en 500 ml de PBS y filtrar por 0.2um o RPMI 10% FCS + 1% P/S de 1 a 4 horas a TA.
5. Ajustar las PBMC a 3×10^6 (300 000/pozo) o 5×10^6 (500 000/pozo).
6. Añadir los antígenos que se usaran para estimulación: Péptidos (diluir los péptidos a una concentración de 20 ug/ml en RPMI (5 mg/ml stock: 0.4 ul/100 ul).
7. Eliminar el bloqueo aspirando el contenido de los pozos.
8. Lavar 3 veces con 200ul de PBS, (puede no lavarse).
9. Dispensar las células 100 ul y los antígenos 100ul para un total de 200 ul / pozo.
10. Cultivo: 24h, 48h o toda la noche.
11. Lavar 3 veces 200 ul PBS y 3 veces con 200 ul PBS Tween 20 al 0.05 % o 6 veces con PBS Tween al 0.05%.
12. Incubar 10 min con PBST 20 0.05%. Eliminar bien el detergente con cuidado de no tocar el fondo del pozo.
13. Preparar el segundo anticuerpo a 2mg/ml en PBS Tween- BSA.
14. Incubar over night a 4 grados
15. Lavar 4 veces con PBS Tween 105 ul /pozo.
16. Preparar estreptavidina 1/2000: 5ul para 10 ml.
17. Incubar 2 horas a TA.
18. Lavar 3 veces con PBS T y 3 con PBS.

19. Sustrato aminoetil carbazol: 12 ml de buffer +0.4 ml de AEC+ 12 ul de H₂O₂.
20. Añadir 200 ul por pozo y dejar de 1 a 5 min.
21. Interrumpir la reacción lavando con abundante agua de la pila.
22. Dejar las placas secar toda la noche y contar manchas usando un microscopio de disección.

Referencias

1. IL-10 levels in dengue patients. Some findings from the exceptional epidemiological conditions of Cuba. Pérez AB, García G, Sierra B, Alvarez M, Vázquez S, Cabrera MV, Rodríguez R, Rosario D, Martínez E, Denny T, Guzmán MG. *Journal of Medical Virology* 2004, 73: 230-234.
2. Long term memory cellular immune response to dengue virus after a natural primary infection. Sierra B, García G, Pérez AB, et al. *International Journal of infectious Diseases* 2002; 6 (2):125-128.
3. IL-2 levels in past dengue infection. Gissel García, Beatriz Sierra, Luis Morier, Miguel Guzmán, Mayling Alvarez, Ana B. Pérez and María G. Guzmán. *Dengue Buletin*, Vol 25, 2001, pag 65-68.

DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO DE LOS GENES DE CITOQUINAS

1. Extracción de ADN

El ADN genómico se extrae del plasma utilizando un Kit de Extracción de ADN (QIAmp DNA mini Kit and QIAmp DNA Blood mini kit, Qiagen, 2003) y se almacena a -20°C para posterior análisis de genes. Brevemente se mezcla 200 μl de sangre venosa periférica con 20 μl de proteinasa K, se mezcla vigorosamente y se añaden 200 μl del buffer AL. Se mezcla vigorosamente y se incuba a 56°C al menos 10 minutos. Tras un golpe de centrifuga se añade 200 μl de etanol absoluto, se mezcla, y tras otro golpe de centrifuga se añade sobre la columna que contiene una membrana de alta avidéz por el DNA. Se decanta el contenido y se pone sobre un vial limpio. Se lava la columna con 500 μl de buffer AW1, y 500 μl de AW2, con centrifugacion intermedia de 1 minuto a 8000 RPM y una final de 5 minutos 13000 RPM. Tras centrifugar 2 minutos a 13000 para secar la columna esta se pone sobre un vial limpio y se procede a la elución del ADN añadiendo 20 μl de agua destilada en el centro de la membrana, incubando 10 minutos a TA y centrifugando 10 minutos a 13000.

2. PCR para tipicación de genes polimórficos

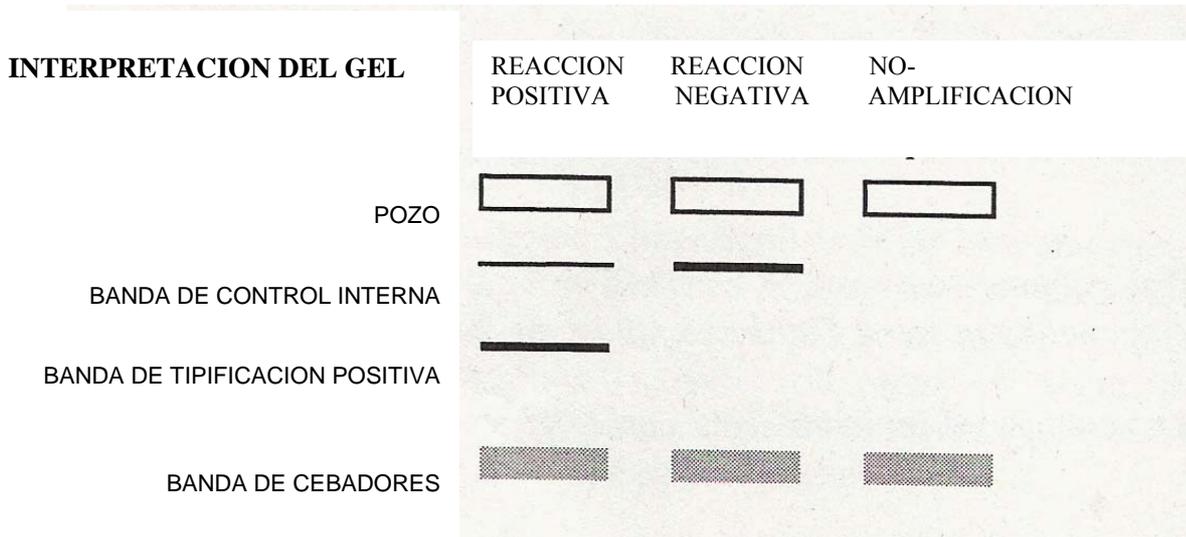
El ADN se tipifica por PCR para identificar los alelos polimórficos de los genes de citoquinas IL-10, TGF β 1, IFN γ , TNF- α e IL-6 (One Lambda Inc Kit, Cytokine Genotyping Tray) de acuerdo a las instrucciones del productor. Brevemente, se prepara la mezcla de 7 μl de D-Mix, 2 μl de cebadores de la citoquina correspondiente, y 0,05 de Taq polimerasa. Se adiciona 1 μl de ADN más 9 μl de la mezcla. Se lleva al termociclador por 1 hora 20 minutos con el programa correspondiente.

3. Electroforesis

Se prepara un gel de agarosa al 2% (50ml de buffer TAE y 1g de agarosa).

Se aplican 10 μl del producto de PCR en los pozos del gel y se dejan correr 15 min a 140V en buffer TAE según el Cytokine Genotyping Tray, One Lambda Inc Kit empleado en el genotipaje.

La banda de control interna y la banda ancha de cebador no incorporado se emplean como marcadores de talla. Cualquier banda entre las dos marcadores deben ser considerados como bandas de tipo positivo (Figura 1).



Referencias

1. Mattar R, de Souza E, Daher S. Preterm delivery and cytokine gene polymorphisms. *J Reprod Med* 2006;51(4):317-20.