

VIII.VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL HUMANO

Dra. Clara Savón Valdés.

INTRODUCCIÓN.

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

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

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

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

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

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

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

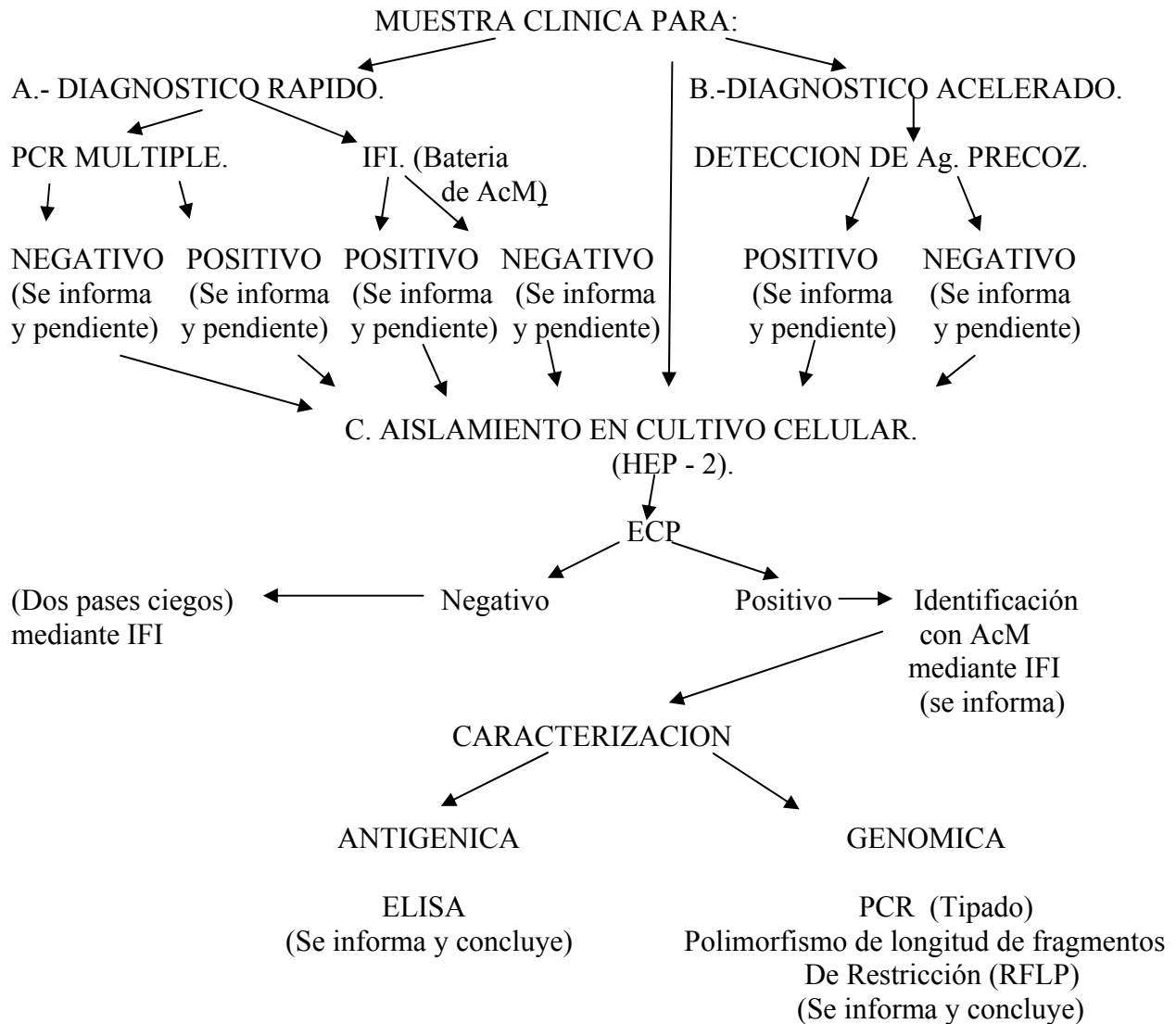
Un diagnóstico presuntivo de la infección por VRS en niños, debe estar basado en los síntomas clínicos, la edad y otros factores epidemiológicos, pero el diagnóstico definitivo depende del

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

Referencias

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

FLUJO DE TRABAJO.



I.-AISLAMIENTO DEL VIRUS RESPIRATORIO SINCITAL HUMANO

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

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

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

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

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

Equipos:

Gabinete de seguridad Clase II

Incubadora de 37⁰ C

Congelador de -70⁰ C

Refrigerador de 4⁰ C

Centrífuga con aditamento para centrifugar placas

Microscopio óptico invertido

Materiales y Reactivos:

Batas

Guantes

Pipetas 2 y 5 mL

Micropipetas 200 y 1000 μ L

Puntas de Micropipetas

Rotuladores

Medio Mínimo Esencial (MEM Gibco)

Glutamina al 1%

Antibiótico

Suero Bovino Fetal

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

Gradillas de tubos de cultivo

I.1.-PROCEDIMIENTO:

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

Descartar el medio de cultivo

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

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

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

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

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

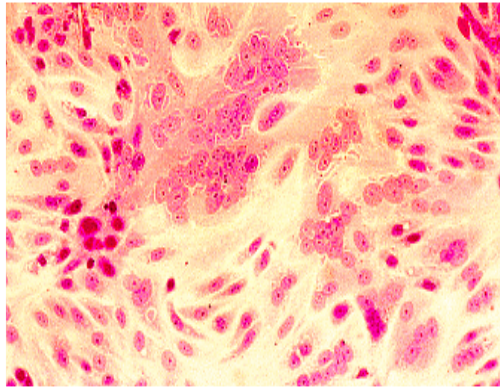
Continuar la observación diaria y si fuera necesario cambiar el medio.

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

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

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

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



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

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

Medio MEM

Glutamina 1%

Suero Bovino Fetal (SBF) 2%

Antibiótico 1% de la solución stock

Referencias:

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

2. Lennette DA. General principles for laboratory diagnosis of viral rickettsial and Chlamydial infections Chapter 1. IN: Diagnostic Procedure for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections 7 ed Washington DC 1995. 3-25.
3. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA, Brooks GF, Brutel JS, Ornton LN. Paramixovirus y Rubeola: En Microbiología Médica Capítulo 16 ed Mexico. El manual Moderno, SA de CV, 1999: 520-22.
4. Ribas A, Valdés O, Valdivia A. Paramixovirus y Rubeola. Capítulo 68, En: Microbiología y Parasitología Médica Tomo III. Primera Ed Ciencias Médicas, La Habana 2001.

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

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

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

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

Equipos.

Gabinete de seguridad Clase II

Incubadora de CO₂

Vortex

Congelador de -70 °C

Cámara de 4 °C

Microscopio óptico invertido

Materiales y Reactivos

Viales eppendorf

Pipetas de 1, 5 y 10 mL

Micropipetas 1000, 100-200, 20 µL

Puntas de micropetas estériles

Medio esencial mínimo (MEM)

Suero Bovino Fetal (SBF)

Antibióticos.

MEM 2X (MBA) sin rojo fenol

Carboximetil celulosa (CMC)

Nafthol Blue Black (NBB)

Acetato de Sodio

Acido acético glacial

H₂O destilada

Placas de 24 pocillos

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

II.1.-PROCEDIMIENTO:

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

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

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

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

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

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

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

Incubar a 37 °C por 5 días.

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

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

Lavar la placa con agua del grifo.

Secar con papel de filtro y contar las placas.

II.2.-LECTURA Y CÁLCULO DEL TÍTULO VIRAL

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

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

Donde:

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

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

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

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

NC = No contables

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

II.3.-CÁLCULO DE LA DILUCIÓN DE TRABAJO DE VIRUS A UTILIZAR

La manera más fácil de calcular la dilución de trabajo es observando el número de placas virales en la placa de titulación y tomando una dilución veces más concentrada de la muestra el número ideal de placas.

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

II.4.- MEDIOS Y SOLUCIONES:

MEDIO DE RECUBRIMIENTO

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

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

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

PREPARACIÓN DE CMC

50 mls de H₂O bidestilada

1.5 grs de CMC

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

COLORANTE: NAPHTHOL BLUE BLACK (NBB)

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

Este puede almacenarse por largos períodos de tiempo.

Referencias:

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

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

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

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

Equipos:

Gabinete de seguridad clase II

Centrífuga con aditamento para centrifugar placas de cultivo.

Incubadora de CO₂

Congelador de – 70⁰ C.

Plataforma o balancín

Microscopio invertido de fluorescencia (Aristoplán)

Materiales y Reactivos:

Micropipetas de 100,200 y 1000 µL

Puntas estériles para micropipetas

Placas de 24 pocillos

Batas

Guantes desechables

Papel de filtro

Solución Salina Tamponada de fosfatos (PBS)

Acetona GR

Solución de Sulfato de neomicina al 1%

Anticuerpo monoclonal anti-proteína de fusión (F)

Antisuero anti-ratón conjugado con fluoresceína

Células de Carcinoma Mucoepidermoide humano Hep-2 ATCC)

Medio Mínimo Esencial (MEM)

Solución de L-glutamina al 1%.

Suero Bovino Fetal (SBF)

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

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

Control negativo

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

III.1.-PREPARACIÓN DEL CULTIVO

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

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

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

III.2- INTREPRETACIÓN DE LA PRUEBA

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

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

III.3.-SOLUCIONES:

Solución de acetona al 80%

Acetona	80mL
PBS	20mL

Solución Salina Tamponada (PBS 1X) pH 7.2

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

* ajustar pH si fuera necesario

Referencias:

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

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

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

Existen cuatro tipos diferentes de epítomos en la proteína G

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

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

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

Equipos

Gabinete de seguridad Clase II

Congelador -70° C

Cámara de 4° C

Centrifuga refrigerada

Incubadora de 37° C

Lector de Elisa

Espectrofotómetro (Titertek multiscan Flow Laboratories)

Materiales y Reactivos:

Batas

Guantes

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

Cepas de VRSH que se quieren caracterizar.

Anticuerpos monoclonales anti prot G

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

Epítoto Específico de Grupo A 021/19G

Epítoto Conservado de grupo A 021/1G

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

Frascos de cultivo celular de 75cm²

Medio Mínimo Esencial (MEM)

solución de penicilina sódica – estreptomina

Suero Bovino fetal (SBF)

Tween 20

Albúmina de suero bovino Fracción V (BSA)

Antisueros anti IgG de ratón conjugado con biotina

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

Peroxidasa estreptavidina

Agua oxigenada

Ortophnylendiamine (OPD)

Tritón X-100

Tris base

Acido Cítrico

Desoxicolato de sodio

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

IV.1 MULTIPLICACIÓN DE LOS VIRUS AISLADOS.

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

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

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

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

Desprender las células infectadas con raspadores o perlas de vidrio.

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

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

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

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

Resuspender el sedimento en 2ml de PBS.

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

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

IV.3.-ELISA PARA CARACTERIZACIÓN ANTIGÉNICA.

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

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

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

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

Aspirar el bloqueo.

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

Lavar 5 veces con agua corriente.

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

Lavar 5 veces con agua corriente.

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

Lavar con agua corriente o del grifo 5 veces.

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

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

IV.4.-Intrepretación de los resultados:

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

Baja o ninguna (por debajo de 25 %)

Moderada (entre 26%-50%)

Alta (por encima del 52%).

IV.5.- SOLUCIONES:

Solución tamponada de fosfatos (PBS) pH= 7.2

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

Tampón de Lisis pH=7.6

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

Tampón Fosfato- Citrato pH =5

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

Referencias:

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

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

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

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

Equipos

Gabinete de seguridad

Termociclador

Centrifuga de viales refrigerada

Vortex

Congelador -70°C

Horno microondas

Cámara de electroforesis submarina y fuente de alimentación

Transiluminador de Luz UV y cámara fotográfica

Materiales y Reactivos:

Batas

Guantes

Viales Eppendorf de 1.5 mL

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

Gen F

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

Gen N

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

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

V.1.-PROCEDIMIENTO

Extracción de ARN con Trizol.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Rehidratar con 35 µL de agua libre de libre de ARNsa

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

V.2.1.-PRIMERA AMPLIFICACIÓN:

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

Preparación de la Mezcla de Reacción y programación del Termociclador

Estuche–RT-PCR Access	1 Tubo	10 Tubos			
H2O	21.00 µL	210µL			
Buffer AMVRT/TFL (5X)	10 µL	100 µL	RT	42 ⁰ C	45min
DNTPs(promega 10mM)	1 µL	10 µL		94 ⁰ C	3min
SO4Mg2(25mM)	4 µL	40 µL	PCR x45 ciclos	94 ⁰ C	30seg
F4(0.2µM)	1µL	10 µL		55 ⁰ C	1min
F5(0.2µM)	1µL	10 µL		68 ⁰ C	30seg
AMVRtasa 5u/µL	1µL	10 µL	FINAL	68 ⁰ C	5min
TFLpolymerasa5u/µL	1µL	10 µL		4 ⁰ C	forever
Cantidad total de Mezcla	40µL	400 µL			

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

V.2.2.-SEGUNDA AMPLIFICACION:

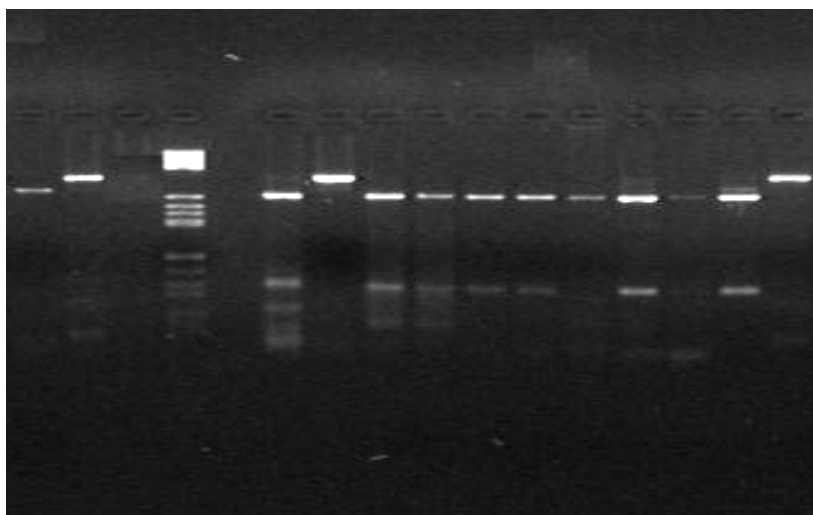
Para la segunda amplificación se añaden 2µL del producto amplificado de la primera reacción.

MEZCLA DE REACCIÓN DE LA SEGUNDA AMPLIFICACIÓN

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

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

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



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

V.4.-Soluciones:

Tampón de electroforesis.de 5X pH 8.0

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

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

Tampón muestra 6X

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

Gel de Agarosa al 2%

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

Fundir preferiblemente en el microondas para evitar evaporación.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

VI.3.-PROCEDIMIENTO: Digestión Enzimática

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

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

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

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

Adicionar 3µL de tampón muestra para electroforesis.

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

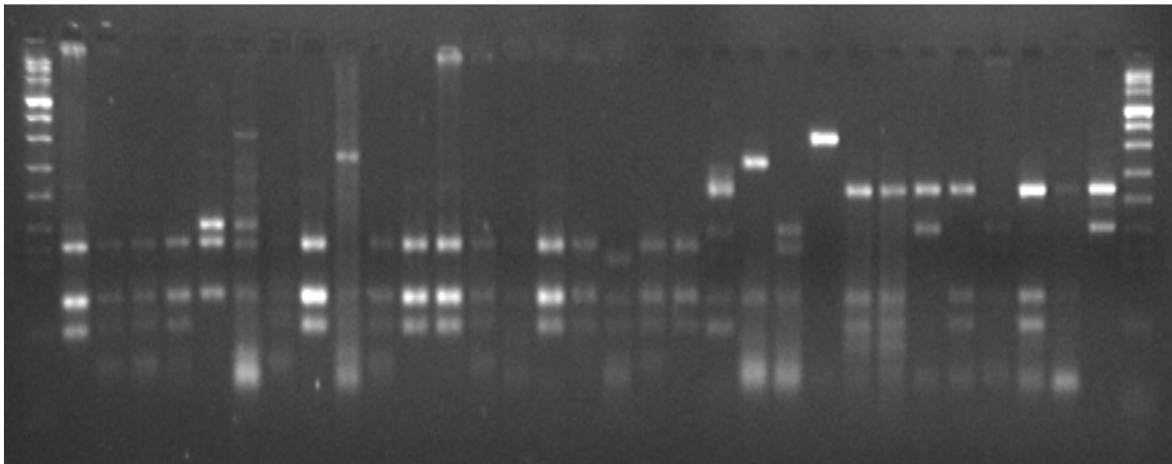
Aplicar la muestra al gel. En cada corrida debe incluirse como modelo la cepa Long (A) y CH 18536 (B) con el objetivo que sirva de patrón de corte. Un Marcador de peso molecular que abarque desde 1000 –100 pb.

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

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

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

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



Restricción Enzimática Fragmentos Del Gen F. Enzima Bbv1

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

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

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

Digestión Procedimiento.

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

VI.6.-Interpretación de los Resultados:

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

REFERENCIAS:

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

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

VII.-DIAGNOSTICO SEROLOGICO

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Donde BO es el intercepto y B_1 la pendiente

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

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

EQUIPOS:

- Gabinete de Seguridad clase II
- Centrifuga refrigerada
- Refrigerador o cámara de 4⁰.C
- Congelador de -70⁰.C
- Incubadora de 37⁰.C
- Espectrofotómetro
- Bomba de Vacío
- Equipo de Rotación de frascos tipo Roller

Materiales y Reactivos:

- Pipetas de 10 mLs.
- Micropipetas (5 – 20µL, 25 – 200µL y 50 – 1000 µL.)
- Puntas de micropipetas (5 – 20µL, 25 – 200 µLy 50 – 1000 µL.)
- Guantes desechables
- Frascos tipo roller sembrados de células Vero a una concentración de 180 000 cel/mL
- Medio 199.
- Viales tipo Eppendorf
- TIRA de poliestireno con soporte
- Tubos plásticos con tapa de rosca de 50 mL

Filtros Millipore

Membrana para filtro Millipore clarificante calibre 1.2 μ

Membranas de diálisis

Antibióticos

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

Virus Control (Cepa Long)

VII.2.1.-PROCEDIMIENTO:

1- Retirar el medio de los frascos Roller.

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

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

4- Observar diariamente.

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

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

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

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

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

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

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

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

Equipos:

Equipo Suma –521 (Centro Inmunoensayo La Habana Cuba)

Incubadora de 37 °C.

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

Materiales y Reactivos:

Papel de filtro

Guantes

Micropipetas multicanal de 50-200µL.

Puntas de micropipetas multicanal.

Micropipetas de 10, 100, 200,1000µL.

Puntas de Micropipetas

TIRA de poliestireno con soporte

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

Bandejas metálicas con tapas.

Reloj de laboratorio

Sueros controles positivos y negativos.

Tween 20

Albúmina bovina fracción V

Cloruro de sodio (NaCl)

Cloruro de Potasio (KCl)

Fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4)

Fosfato dibásico de sodio anhidro (Na_2HPO_4)

Carbonato de sodio anhidro (Na_2CO_3)

Bicarbonato de sodio (NaHCO_3)

Sacarosa

Suero de carnero (ovino)

Tris base

Inmunoglobulina humana conjugada con fosfatasa alcalina.

Anticuerpo monoclonal anti proteína de fusión (F)

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

VII.3.1.-PROCEDIMIENTO:

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

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

NOTA:

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

VII.3.2.-Criterios de lectura:

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

Suero positivo ejemplo

<40/40, sero-conversión

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

Monosueros:

<40 negativo

1:40 o más positivo

VII.4.-SOLUCIONES:

SOLUCIÓN DE LAVADO

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

Tampón de recubrimiento o Coating Buffer pH 9.6

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

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

Solución de bloqueo

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

Buffer de dilución

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

Referencias:

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