

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 rinde 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
- ⇒ Centrífuga 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:

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.

- 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.
- Añadir la suspensión de cerebro a 20 volúmenes de acetona fría (kitasato). Utilizar para esto una aguja #18 larga sumergida en la acetona.
- Agitar vigorosamente en ambos sentidos y dejar reposar en baño de hielo durante 15 minutos.
- 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.

- 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).
- 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).
- Dejar rehidratando toda la noche a 4°C con agitación.
- Centrifugar 30 minutos a 4°C a 3000 rpm y desechar el precipitado.
- 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.
- Distribuir en alícuotas para guardar a -70°C o para liofilizar y guardar a -20°C.
- Chequear si la inactivación fue efectiva inoculando con el antígeno inactivado por vía intracerebral dos familias de ratones lactantes y observar por 21 días.
- Para los virus Dengue la concentración de BPL es crítica de acuerdo al serotipo, ya que concentraciones mayores reducen la actividad del antígeno.
- 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.

HEMAGLUTINACION E INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACION

Ciertos virus aglutinan 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 pozuelo 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 a los diferentes arbovirus poseen una amplia reactividad de grupo por lo que la prueba de inhibición de la hemaglutinación (IH) se utiliza para clasificar a 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($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)	0.55 g
Citrato de sodio($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$)	8.0 g
H ₂ O destilada a completar	1000 mL

Esterilizar en autoclave durante 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 ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$) 0.5 M.
- ⇒ Fosfato monobásico de sodio ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 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 dest.
NaH_2PO_4 (anhidro) 1M	120g en 1000 mL de agua dest.
Na_2HPO_4 (anhidro)0,5 M	70.59g en 1000mL de agua dest

- ⇒ Solución A (pH 8.8):

NaCl(1.5M)	100 mL
Na_2HPO_4 (0.5M)	400 mL
Completar c/agua dest.	1000 mL

- ⇒ Solución B (pH 4.3):

NaCl(1.5M)	100 mL
NaH_2PO_4 (1 M)	200 mL
Completar c/agua dest.	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 menos 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 1000mL agua dest.
BO ₃ H ₃ (0.5 M)	30.912g	completar 1000mL agua dest.
NaCl(1.5 M)	87.6g	completar 1000mL agua dest.

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 mas de 30 días.

⇒ Albúmina bovina 0.4%:

Albúmina bovina	0.8 g
Buffer borato salina pH 9	200 mL

Ajustar el pH a 9 (con NaOH 2N). Puede prepararse una solución al 4% en cantidad de 100 ml y filtrar por "millipore" 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:

- Extraer la sangre de forma estéril (1 parte de sangre y 4 de Alsever). Usar una aguja de # 20. Filtrar por gasa estéril.
- 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.
- Para la técnica preparar una solución al 0.5 % de glóbulos en los buffers de diferentes pH previamente ajustados.
- 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 brinden resultados no satisfactorios.

- Tomar 0,1 mL de suero.
- Añadir 0,4 mL buffer borato salina pH 9 (el suero queda diluido 1:5).
- Añadir 0,5 mL de Kaolín previamente agitado.
- Agitar la mezcla.
- Dejar a temperatura ambiente por 20 minutos con agitación ocasional.
- Centrifugar a 2,500 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 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:

- Preparar una suspensión de glóbulos rojos de ganso al 50% en solución salina ó PBS.
- Añadir 0,025 mL de la suspensión anterior al suero ya tratado y agitar.
- Mantener a 4°C durante 20 minutos con agitación ocasional.
- Centrifugar a 1,500 rpm 10 minutos a 4°C.
- 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)

- Hidratar los antígenos liofilizados y mantenerlos a 4°C por al menos 1 hora, pero preferiblemente toda la noche.
- 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.
- Añadir 0,025 mL de BABS a cada pozuelo de la placa.
- Añadir 0,025 mL del antígeno al primer pozuelo de cada hilera.
- Hacer diluciones al doble comenzando por el primer pozuelo y utilizando para ello pipetas “multicanal”.
- Agitar la placa.
- Añadir 0,025 mL de la solución glóbulos rojos al 0,5% preparados en cada uno de los diferentes pH.
- Agitar y dejar reposar de 30-40 minutos a temperatura ambiente.
- 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 mas 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)

- 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.
- Añadir 0,025 mL de BABS a cada pozuelo.
- Añadir 0,025 mL del suero a titular en el primer pozuelo de cada hilera.
- Diluir los sueros con pipeta “multicanal”.

- Añadir a cada pozuelo 0,025 mL de la dilución de antígeno que contiene 8 unidades hemaglutinantes.
- Agitar y dejar reposar a temperatura ambiente durante 45 minutos.
- Añadir 0,05 ml de glóbulos rojos diluidos en el pH óptimo para el virus.
- 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 Acs

IH en 6 pares de sueros frente a virus dengue 2.

Suero 1 ($20 \setminus 20$)

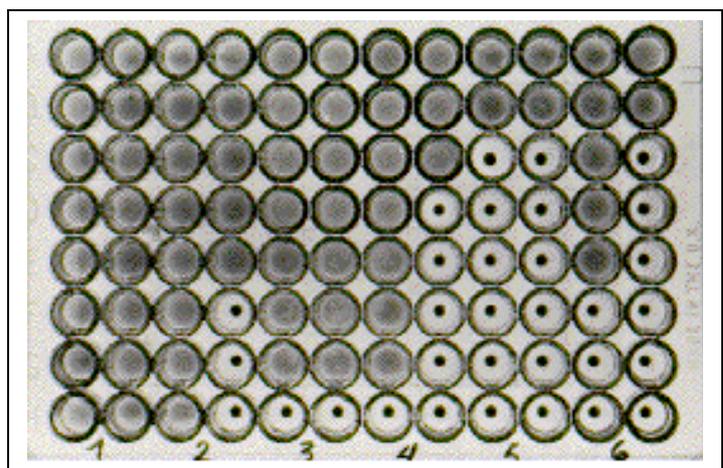
Suero2 ($20 \setminus 80$),

Suero3 ($20 \setminus 20$),

Suero4 ($20 \setminus 320$),

Suero5 ($640 \setminus 640$),

Suero 6 ($80 \setminus 640$).



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 ($\geq 1:1280$) en un monosero 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

- 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

En los últimos años se han desarrollado métodos inmunológicos que han tenido una aplicación creciente en el campo de la virología. Algunos de estos métodos se han agrupado bajo el nombre de "Métodos rápidos para el diagnóstico virológico", entre los cuales se destaca el Inmunoensayo Enzimático Sobre Fase Sólida conocido como ELISA, que por reunir características que lo hacen muy 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 amplia 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 mas utilizados se encuentran el del Glutaraldehido de 2 pasos y el del Peryodato, siendo este último el que brinda mejores resultados cuando se trabaja con peroxidasa (Nakane PK and Kawoi A 1974. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. J. Histochem. Cytochem. 22: 1084).

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 1/1280 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 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 2 litros de salina) a 4°C.
- 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 8,24 g en 1 L de agua destilada

Solución **B**: Ácido acético 6 ml en 1L de agua destilada.

Añadir 1 parte de A para 2 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/10L de agua destilada.

Solución **B**: Bicarbonato de sodio 0,2 M 0. 16802g/10L 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 ajuste el pH si es necesario. Diluir 1:5 para obtener 0,01 M.

⇒ Buffer Borato, 0,1 M, pH 7,4.

Ácido bórico 24,732 g en 4 L de agua destilada.

Bórax 19,07 g en 500 mL de agua destilada.

Añada aproximadamente 115 ml de bórax a 4 L de ácido bórico, ajuste pH 7,4.

⇒ Peryodato de sodio

⇒ Borohidruro de sodio.

Método:

- Disuelva 8 mg de Peroxidasa de Rábano picante (tipo VI) "Sigma" en 1 mL de agua destilada.
- Prepare solución fresca de peryodato de sodio 0,01 M (21 mg/mL) en agua destilada. Añada 0,2 mL de esta solución a la de peroxidasa suavemente y agitando, manténgalo en agitación durante 20 min. a temperatura ambiente.
- La mezcla de peroxidasa y peryodato es dializada toda la noche contra un exceso de buffer acetato de sodio 1mM pH 4,4 a 4°C. Se dializa también 1mL de las Igs a conjugar en concentraciones de 10 mg/mL contra buffer carbonato-bicarbonato 0.01M pH9,5.
- Añadir 20 uL de buffer bicarbonato de sodio 0.2M pH 9,5 a la peroxidasa. Chequear pH y añadir otros 20µL si fuese necesario. Adicione 1mL de Igs dializadas. Agite la mezcla suavemente por 2 horas a temperatura ambiente.
- Adicione 0,1 mL de borohidruro de sodio (4mg/mL) recién preparada, a la mezcla. Mantenga la agitación por 2 horas a 4°C.

Después del paso del borohidruro se pueden hacer dos variantes para la purificación y/o concentración del conjugado:

Primera variante:

- Dialice la mezcla contra buffer borato pH 7,4 toda la noche a 4°C.

- Para separar el conjugado del no conjugado pasar la mezcla por una columna de Sephadex G-200 equilibrada con buffer borato. Determinar los valores de densidad óptica de cada fracción, a 280 y 403 nm, colectando aquellas donde coincidan los valores máximos para ambas longitudes de onda (concentrar a 1 mL). Agregar albúmina bovina fracción V a concentración final del 1% y glicerol a igual volumen del conjugado. Homogeneizar bien.
- Determinar el título del conjugado mediante la técnica ELISA.
- El título se determina realizando varias diluciones del conjugado, utilizando como dilución de trabajo aquella que presente un valor de densidad óptica cercano a 1,0.
- Envasar en alicuotas y almacenar a -20°C.

Segunda variante

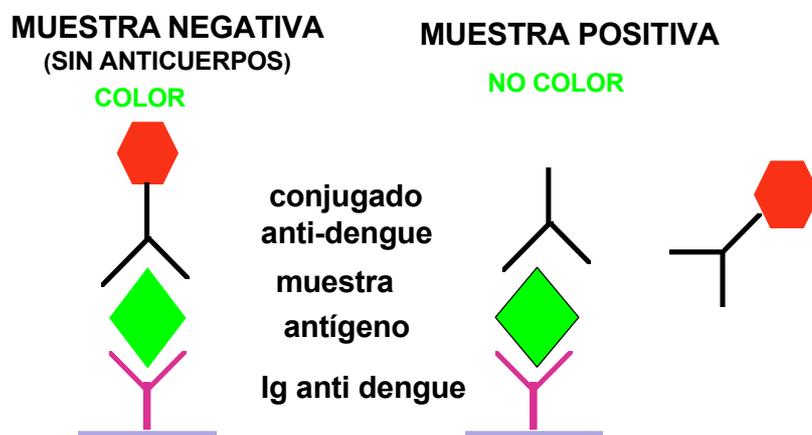
- Precipitación con sulfato de amonio: Después del paso con borohidruro añadir al conjugado igual volumen de sulfato de amonio saturado gota a gota y agitando. Dejar 5 minutos en agitación y centrifugar a 5 000 rpm por 10 minutos. Eliminar sobrenadante y resuspender el pellet en 1 mL de PBS. Dializar toda la noche contra PBS.
- Agregar albúmina bovina fracción V para una concentración final del 1 % y glicerol a igual volumen del conjugado. Homogeneizar bien.
- Determinar el título del conjugado mediante la técnica ELISA.
- El título se determina realizando varias diluciones del conjugado, utilizando como dilución de trabajo aquella que presente un valor de densidad óptica cercano a 1,0.
- Envasar en alicuotas y almacenar a -20°C.

MÉTODO ELISA DE INHIBICIÓN (MEI)

Las técnicas serológicas constituyen un auxiliar imprescindible para el diagnóstico virológico y se les confiere esta importancia por lo difícil que resulta, en la mayoría de los casos, lograr el diagnóstico por aislamiento viral.

Para el diagnóstico de los arbovirus se han aplicado pruebas serológicas que por su amplio uso se consideran como técnicas clásicas; tal es el caso de la Inhibición de la Hemaglutinación (IH), la Fijación del Complemento (FC) y la Neutralización (Nt), sin embargo desde hace varios años se han introducido técnicas de mayor sensibilidad y facilidad de ejecución, que han ido ganando terreno en el campo del diagnóstico en Virología, sobre todo por lograr resultados rápidos. Entre ellas se encuentran los inmunoensayos enzimáticos y de estos, el Inmunoensayo enzimático sobre fase sólida (ELISA), ha sido de gran aplicación en el diagnóstico de otros virus como Hepatitis, Rubéola, Encefalitis B Japonesa, Citomegalovirus y otros.

ELISA DE INHIBICION



Materiales:

⇒ Inmunoglobulinas humanas anti-dengue

Pool de sueros humanos conteniendo anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación con título mayor o igual a 1/1280 contra los virus del complejo 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.

⇒ Antígeno dengue 2

Antígeno preparado según el método de sacarosa.

⇒ Buffer de Recubrimiento (coating) 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.

⇒ Ortofenilendiamina (OPD)

⇒ Peróxido de hidrógeno (p.a.) 100 vol/ 30%

⇒ Albúmina bovina sérica fracción V (ABS) al 1%

1g de ABS en 100mL en buffer de recubrimiento (coating). Prepararlo al momento de ser usado.

⇒ Sustrato

25 mL de buffer fosfato-citrato; 10mg de OPD + 10ul H_2O_2 . Proteger de la luz.

Método:

- Adsorber en placa de poliestireno Igs humanas anti-dengue en buffer carbonato / bicarbonato pH 9,5 a una concentración de 10ug/mL (100uL por pozo). Dejar las placas en cámara húmeda tapada toda la noche a 4° C. Se necesita un volumen de 10 mL por placa.
- Vaciar el contenido de las placas y hacer un bloqueo con 150ul en cada pozo de la solución de ABS al 1% en buffer Carbonato/Bicarbonato. Incubar a 37°C por 1 hora. Volumen total de 15 mL por placa.

- Lavar las placas 3 veces con PBS-T.
- Agregar 100ul de la dilución de trabajo de la suspensión del antígeno en cada pozo (diluido en PBS-T en dependencia del título obtenido).
- Incubar la placa 1 hora a 37°C.

El título del antígeno se determina realizando varias diluciones de este y utilizando como control negativo antígeno de cerebro normal de ratón extraído según el método de sacarosa acetona a las mismas diluciones del antígeno viral, se realiza la curva de dosis-respuesta determinando la dilución de antígeno cuya densidad óptica de cercana a 1,0 y que este valor, al relacionarlo con el del control negativo, sea de 5 a 10 veces mayor. Ejemplo: Si a la dilución de 1/40 da un valor de DO de 1,105 y el control negativo a esa misma dilución da 0,12 entonces la dilución de trabajo del antígeno será 1:40.

- Lavar 3 veces con PBS-T.
- Agregar 100uL por pozo de los sueros diluidos 1/20 en PBS-T, al igual que los sueros controles (positivo por duplicado y negativo por cuadruplicado). Agregar en 2 pozos PBS-T a igual volumen que los sueros. Incubar a 37° C por 1 hora.
- Lavar 3 veces con PBS-T.
- Añadir 100 uL por pozo del conjugado anti-dengue-peroxidasa diluido 1/8000 en PBS-T con 2% de suero de ternero. Dejar incubando 1 hora a 37°C.
- Lavar 3 veces con PBS-T.
- Añadir el sustrato 100uL por pozo. El sustrato debe ser preparado unos minutos antes de su utilización. Esperar 30 minutos de reacción.
- Detener la reacción agregando 100 uL de ácido sulfúrico al 12,5 % en cada pozo.
- Determinar los valores de densidad óptica a 492nm en un lector Micro-ELISA.
- Calcular los % de inhibición para cada muestra según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Inhibición de ELISA} = 1 - (\text{DO de la muestra} / \text{DO de la media del control negativo}) \times 100$$

Criterio de positividad

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

En casos de pares de sueros, se considera seroconversión en aquellos cuyo primer suero sea negativo y el segundo positivo, en los que presenten positividad en ambas sueros evidenciando un aumento de anticuerpos expresado en el aumento del porcentaje de inhibición en un 10% ó más del segundo suero con respecto al primero y aquellos que presenten valores del % de inhibición fijos elevados del 85% ó más. Estos casos deben ser titulados para confirmar positividad, expresándose en un aumento de 4 veces o más en el título de anticuerpos del segundo suero con respecto al primero.

En monosueros:

Se define como caso probable aquel paciente cuyo suero presente un título de Acs. $\geq 1/5120$.

Se define como caso de infección secundaria aquel paciente cuyo suero presente un título de Acs. $\geq 1/10240$.

En pares de sueros:

Se define como caso confirmado aquel paciente que presente seroconversión o elevación de 4 veces el título de Acs. entre los dos sueros.

Se define como caso de infección primaria aquel paciente cuyo segundo suero presente un título de Acs. $\leq 1/5120$.

- S. Vázquez , R. Fernández. Utilización de un método de Inhibición de ELISA en el diagnóstico serológico de dengue. Rev. Cub. Med. Trop. 41, (1) p. 18-26, 1989.
- R.Fernández,S.Vázquez Serological diagnosis of dengue by ELISA Inhibition Method (EIM) Mem.Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro vol 85(3), 347-351,1990.
- S.Vázquez,R.Fernández,C.Llorente Utilidad de sangre almacenada en papel de filtro para estudios serológicos por ELISA de Inhibición Inst. Med.Trop.SaoPaulo vol33 No4 309-312 1991.
- S.Vázquez, J. Bravo, AB Pérez, MG. Guzmán ELISA de Inhibición su utilidad para clasificar un caso de dengue. Rev.Cub. Med. Trop. 49 (2) 1997..
- S. Vázquez, J. Bravo, AB Pérez, MG. Guzmán ELISA de Inhibición . Una alternativa en el estudio serológico de los casos de dengue. Bol. Epidem. OPS vol 18, No 2 pag. 7-8, 1997
- S, Vázquez, O Valdés, Pupo M, Delgado I, Álvarez M, Pelegrino JL and Guzmán MG. MAC-ELISA and ELISA inhibition methods for detection of antibodies in Yellow fever vaccinated individuals. Vázquez J Virol Methods Jun; 110(2):179-84, 2003.

- S. Vázquez., A.B. Perez, D. Ruiz, R. Rodriguez, M. Pupo, N. Calzada, L. González, D. González, O. Castro, T. Serrano, M.G. Guzmán. Serological markers during dengue 3 primary and secondary infections. *J. Clin. Virol.* Vol 33: 132-137.2005

ELISA DE CAPTURA DE IgM (CAM- ELISA)

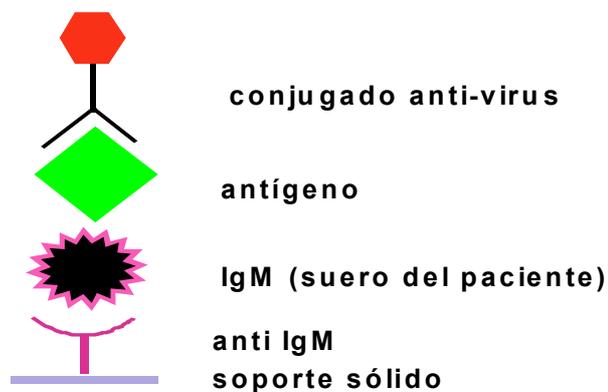
En la infección primaria por cualquier virus del complejo Dengue se produce una respuesta de anticuerpos de la clase IgM, los cuales aparecen en niveles detectables una vez finalizada la fiebre y la viremia, por lo que se recomienda que las muestras utilizadas para la determinación de este anticuerpo sean extraídas después del 5to día de establecimiento de la enfermedad.

El inmunoensayo enzimático sobre fase sólida (ELISA) ha sido utilizado como método para el diagnóstico serológico en numerosas enfermedades virales. Uno de los métodos aplicados es el de Captura de IgM, utilizado para demostrar infecciones actuales o recientes. Para ello se emplea Igs anti-IgM humanas las cuales se fijan a la placa.

La detección de anticuerpos IgM al virus Dengue resulta de extrema utilidad tanto en el diagnóstico de casos clínicamente sospechosos como en los sistemas de vigilancia epidemiológica para esta enfermedad.

Gubler describió un método ELISA de captura de IgM para la vigilancia del Dengue y Dengue Hemorrágico. Comparó los resultados del estudio con la IH encontrando una buena sensibilidad y una especificidad muy semejante a la de esta técnica, planteando que dicho método es rápido para determinar infecciones de Dengue en casos hospitalizados de áreas endémicas, siendo aun más útil en la vigilancia en áreas no endémicas ya que se puede estar seguro que cualquier caso positivo indica infección reciente. Es de señalar que se requiere una sola muestra para realizar el diagnóstico.

ELISA DE CAPTURA ANTI-IgM



Materiales:

⇒ Buffer fosfato-salina (PBS) pH 7,4:

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
KH ₂ PO ₄	0,14 g
Na ₂ HPO ₄	0,91 g

Completar con agua destilada hasta 1L.

⇒ Buffer carbonato/bicarbonato pH 9,6:

Na ₂ CO ₃	1,59 g
NaHCO ₃	2,39 g

Completar con agua destilada hasta 1L.

⇒ Inmunoglobulinas anti-IgM humana purificada por cromatografía de afinidad (SIGMA).

⇒ Albúmina bovina sérica fracción V (ABS)

⇒ Antígeno de complejo Dengue obtenido por el método de sacarosa-acetona (ver técnica IH).

⇒ Suero humano negativo de anticuerpos a virus dengue (SNH).

⇒ Conjugado anti-dengue peroxidasa (ver método de conjugación)

⇒ Buffer fosfato-citrato pH 5 (ver ELISA de Inhibición)

⇒ OPD (ver ELISA de Inhibición)

⇒ Peróxido de hidrógeno o urea peróxido (ver ELISA de Inhibición)

⇒ Sustrato (ver ELISA de Inhibición)

Método:

- A una placa (maxisorb) se le agrega 100uL por pozo de Igs anti- IgM humanas a una concentración de 5ug/mL en buffer de recubrimiento (coating); este valor se determina probando el sistema con varias concentraciones de Igs generalmente entre 0,1 y 10 ug/mL obteniéndose la concentración de saturación que se identifica al no presentarse incremento del valor de DO a partir de esa dilución. La placa es colocada a 4°C toda la noche.

- Lavar 5 veces con PBS.
- Añadir 150uL por pozo de ABS al 4% en buffer de recubrimiento (coating) por 30 minutos a 37°C. Se requiere un total de 15 mL por placa.
- Lavar 5 veces con PBS.
- Agregar los sueros a probar diluidos 1/20 en PBS-ABS al 0,5%. 50uL por pozo. Se deben incluir sueros positivos y sueros negativos como controles diluidos también 1/20.
- Lavar 5 veces con PBS.
- Añadir el antígeno preparado para 16 UH (esto se calcula en función del título hemaglutinante y se necesita 5 ml por placa) 50uL por pozo. Este antígeno se prepara en PBS-SNH al 5%. Colocar la placa a 4°C toda la noche. (Se incluye los 4 serotipos)
- Lavar 5 veces con PBS.
- Agregar conjugado anti-dengue peroxidasa diluido en PBS-SNH al 5%, 50uL por pozo y se incuba 1 hora a 37° C. La dilucion del conjugado (1/2500) se calculó realizando varias diluciones y se tomó aquella que establecía diferencia entre el control positivo y el negativo de 5 veces o más.
- Lavar 7 veces con PBS.
- Agregar el sustrato 100 uL por pozo. Mantener la reacción durante 30 minutos su cámara a temperatura ambiente y detener con 100 µL por pozo de ácido sulfúrico al 12,5%.
- Leer la placa en un lector de ELISA a 492nm.

Cálculo de los resultados

Determinar la media geométrica de las D.O. de los controles negativos y multiplicar por 2. Toda muestra que tenga un valor mayor o igual al calculado será positiva. Debe incluirse varias veces el negativo para poder hacer el cálculo, además debe probarse la validez de la prueba dividiendo positivo/negativo y dicho valor debe ser mayor o igual a 5.

Otras aplicaciones del ELISA de captura

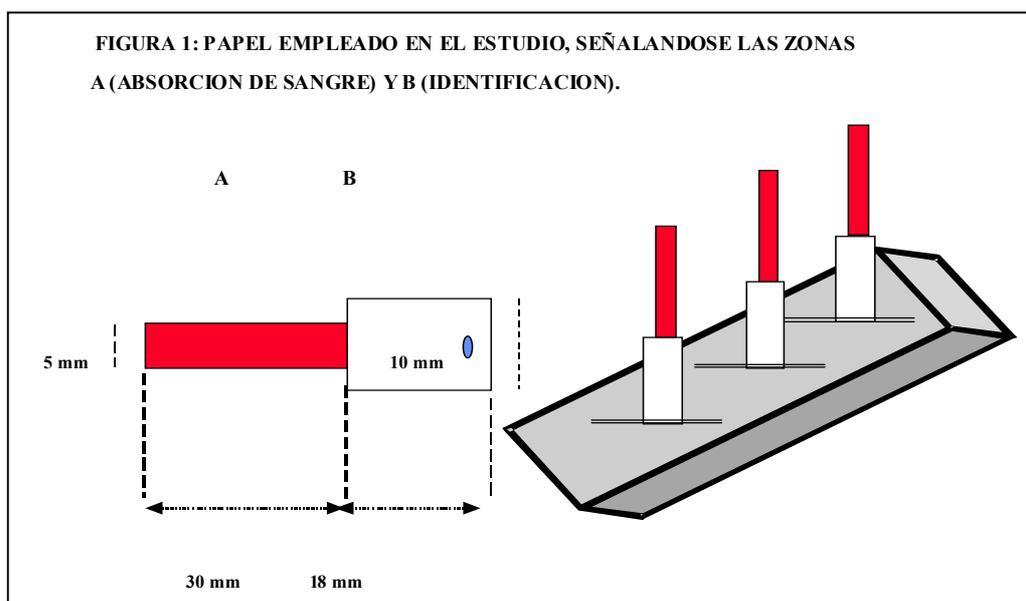
Esta técnica puede ser utilizada para la detección de anticuerpos IgA e IgE empleando el mismo principio y los mismos reactivos excepto las Igs anti-IgA e anti-IgE que sustituyen a las Igs anti-IgM. (S. Vázquez., A.B. Perez, D. Ruiz, R. Rodriguez, M. Pupo, N.

Calzada, L. González, D. González, O. Castro, T. Serrano, M.G. Guzmán. Serological markers during dengue 3 primary and secondary infections. J. Clin. Virol. Vol 33: 132-137.2005)

Muestras de sangre en papel de filtro

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

Después que la sangre es totalmente absorbida sobre el papel se deja secar a temperatura ambiente en posición vertical con la zona B hacia abajo. Posteriormente, se guardan en sobre preferiblemente a 4⁰C.



Procesamiento

Las muestras de sangre total capilar colectadas en papel de filtro son eluidas durante toda la noche a 4⁰C en 400uL de solución fosfato-salina (PBS) conteniendo albúmina bovina al 0,5% (correspondiente a una dilución de suero de 1/10). Posteriormente, a cada muestra se

le determina la presencia de anticuerpos IgM a virus dengue en forma similar a como se procesan los sueros.

- S. Vázquez, MG. Guzman y col. Detección de IgM contra virus del dengue en sangre total absorbida en papel de filtro. Rev. Pan. Salud Pub. Pan. Am. J. Pub. Health. vol 3 No 3 1998.

"Kit Diagnóstico": Dengue* IgM

El "kit Diagnóstico Dengue* IgM se conformó para realizar un total de 180 determinaciones, ya sea en placas completas o en grupos de 4 tiras desmontables, siendo los componentes del sistema los siguientes:

- ◆ 2 Placas de poliestireno sensibilizadas con anti-IgM
- ◆ 1 Frasco de diluyente de muestra 25X (3mL)
- ◆ 2 frascos de control positivo (1mL c/u) y 2 de negativo (1.5mL c/u) listos para usar.
- ◆ 1 frasco de solución de lavado 25X (100mL)
- ◆ 1 frasco de suero humano negativo (2mL)
- ◆ 6 frascos de antígeno inactivado liofilizado conteniendo los 4 serotipos (2mL c/u).
- ◆ 1 frascos de conjugado prediluido.
- ◆ 6 frascos de sustrato liofilizado (5mL c/u)
- ◆ 1 frasco de peróxido de hidrógeno (200uL)

El antígeno de dengue, los controles positivos y negativos y el suero humano negativo (SHN) se encuentran inactivados. Los controles y el suero humano negativo son no reactivos para los virus VIH 1 y 2, y para HBAGs. No obstante deben manejarse con precaución.

Procedimiento:

1. Retirar del estuche las placas o tiras a utilizar según el número de muestras a procesar. Se recomienda confeccionar un esquema de trabajo identificando correctamente la posición de cada muestra y los controles.
2. Dispensar 50 uL del diluyente de muestra 1X en todos los pocillos con excepción de los pocillos para los controles positivos y negativos. Añada entonces siguiendo el esquema de distribución 2,5 uL de cada suero, agitando ligeramente la placa para homogenizar la dilución. Se recomienda utilizar no menos de 2 pocillos para el control positivo y 4 para el negativo.
3. Incubar en cámara húmeda 2 horas a temperatura ambiente.

4. Lavar la placa 5 veces con la solución de lavado 1x, utilizando un volumen de 250-300 uL por pozo. Si se dispone de lavador automático seguir similar procedimiento. Secar la placa invirtiéndola sobre papel de filtro.
5. Dispensar 50 ul de antígeno por pozo, reconstituido previamente con 2 mL de solución de lavado conteniendo SHN al 5%. Incubar a 4° C durante toda la noche.
6. Lavar 5 veces con solución de lavado como en el punto 4.
7. Dispensar 50 uL por pozo del conjugado previamente diluido (80uL de conjugado + 100uL de SNH + 1.82mL de PBS). Incubar 1 hora a 37° C en cámara húmeda.
8. Lavar 7 veces con solución de lavado como en el punto 4.
9. Añadir 100 uL del sustrato reconstituido previamente con 5 mL de agua destilada, adicionando 2 uL de peróxido de hidrógeno. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
10. Detener la reacción adicionando 100 uL por pozo de la solución de ácido sulfúrico al 12,5% en el mismo sentido en que se añadió el sustrato.
11. Realizar la lectura de la densidad óptica utilizando un filtro de 492 nm y ajustando blanco con el aire.

Cálculo de los resultados:

1. Calcular la media de la densidad óptica de los controles negativos (X_n)
2. Calcular la media de la densidad óptica de los controles positivos (X_p)

Validez de la prueba: $X_p > 5X_n$; Valor limite = $2X_n$

El valor de corte se establece en función de la media del control negativo considerando como positivos aquellos sueros que presenten un valor de densidad óptica mayor o igual a dos veces la media del negativo. La validez del sistema se establece por la relación de la media de los positivos y los negativos la cual debe ser igual o mayor de 5.

IMPORTANTE: Un resultado negativo a la presencia de IgM contra dengue no excluye la posibilidad de exposición anterior a este virus por lo que en caso de síntomas clínicos compatibles, se recomienda probar una nueva muestra varios días después.

Almacenaje y Estabilidad:

Cuando no se encuentran en uso, los reactivos deben almacenarse a una temperatura de 2 a 8° C. Los reactivos y placas así conservadas tendrán una estabilidad garantizada durante 6 meses. Verifique la fecha de expiración reflejada en las etiquetas antes utilizar el Kit.

Medidas de Bioseguridad:

Al manipular sueros humanos para su testaje mediante la prueba deben observarse las precauciones requeridas para evitar infecciones por el virus de la Inmunodeficiencia humana (VIH), Hepatitis B u otros agentes similares.

SISTEMA ULTRA MICRO ELISA PARA LA DETECCIÓN DE **Acs Ig M AL VIRUS DENGUE (UMELISA-DENGUE)**

El UMELISA-DENGUE es un análisis inmunoenzimático heterogéneo, en su variante de captura, en el cual se utiliza como fase sólida una placa de ultramicroELISA (10 microlitros por pocillo) revestida previamente con anticuerpos contra IgM humana.

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 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"

Para la detección de anticuerpos IgM
al virus Dengue

AuBioDOT™ IgM anti-Dengue

96 pruebas

Sistema diagnóstico visual para la detección de anticuerpos IgM contra el virus del Dengue basado en el uso de anticuerpos monoclonales

CARACTERISTICAS PRINCIPALES

El **AuBioDOT™ IgM anti-Dengue** es un inmunoensayo que usa un anticuerpo monoclonal conjugado con oro coloidal y amplificación con reveladores de plata, para la detección en suero de anticuerpos IgM contra el virus del Dengue (IgM anti-Dengue) en pacientes con 5 o más días de evolución de la enfermedad.

El sistema emplea anticuerpos y antígenos que aseguran una buena sensibilidad y especificidad del sistema, según estudios realizados con paneles de muestras positivas y negativas, caracterizadas mediante técnicas inmunoenzimáticas.

El **AuBioDOT™ IgM anti-Dengue** es un sistema especialmente desarrollado para la operación manual y lectura visual de los resultados, por lo que su empleo es recomendable para:

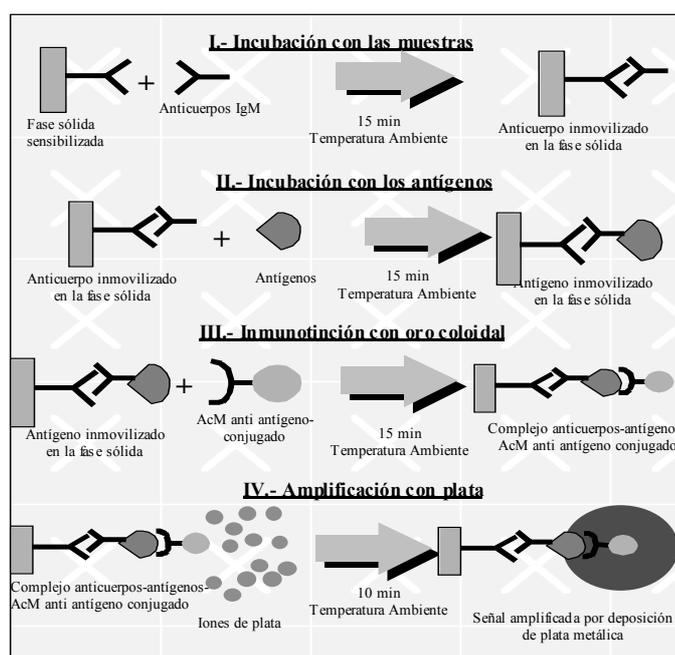
- El diagnóstico serológico de infección por el virus Dengue en diferentes niveles de salud que realicen una vigilancia activa, principalmente en áreas con condiciones mínimas de laboratorio
- Para el diagnóstico rápido a virus dengue en caso de brotes y/o epidemias.

PRINCIPIO DEL METODO

El inmunoensayo consiste en el uso de soportes de poliestireno blanco opaco con excavaciones circulares, sensibilizadas con un anticuerpo IgG que tiene selectividad por anticuerpos del tipo IgM humanos.

Las muestras son incubadas en dichas excavaciones y los anticuerpos IgM presentes en la muestra se fijaran a la fase sólida. Después del lavado del exceso de los reactivos, se añade una preparación de 4 antígenos de dengue los cuales serán reconocidos específicamente por los anticuerpos IgM de los individuos enfermos. Después del lavado del exceso de los reactivos, se añade un anticuerpo conjugado con oro coloidal dirigido contra los antígenos. Después de la incubación las tiras son lavadas y la reacción es finalmente amplificada por la adición de reveladores físicos basados en iones de plata, produciéndose *in situ* reacciones coloreadas insolubles de color pardo claro a oscuro, cuya intensidad es proporcional a la concentración de anticuerpos presentes en las muestras.

La lectura se realizará directamente en los pocillos de las placas mediante simple inspección visual y las mismas pueden ser archivadas para el registro permanente de los resultados.



PRESENTACION

Sistema para 96 determinaciones cualitativas, compuesto por:

- 1 bolsa metálica conteniendo una placa **de poliestireno** blanco opaco sensibilizada con un anticuerpo monoclonal. Cada placa puede dividirse en tiras de 8 determinaciones.
- 1 frasco con 3 mL de tampón de dilución del conjugado.
- 1 frasco con 0,3 mL del **Conjugado del anticuerpo monoclonal - oro coloidal**. Este frasco contiene conjugado líquido para diluir 10 veces con tampón de dilución del conjugado.
- 6 bulbos con la mezcla de antígenos liofilizados
- 1 frasco (rótulo negro) con 1,4 mL de **Solución Amplificadora** (reactivo A del revelador físico).
- 1 frasco (rótulo blanco) con 1,4 mL de **Solución Iniciadora** (reactivo B del revelador físico).
- 1 frasco con 0,3 mL de **Suero de Control Negativo** listo para usar no reactivo para IgM anti-Dengue, AgsHB, anti HCV, anti HIV, VDRL.
- 1 frasco con 0,3 mL de **Suero de Control Positivo** listo para usar (inactivado por calor, no reactivo para AgsHB, HCV, anti HIV, VDRL).
- 1 plástico con 9,55 g de **Sales mezcladas**, en cantidad para reconstituir tampón de lavado PBS en 500 mL de agua destilada. La solución tampón contiene azida de sodio como preservativo.
- 1 vial con 0,5 mL de **Tween-20**.

MATERIALES ADICIONALES REQUERIDOS

- Agua destilada para la reconstitución del Tampón de lavado.
- Micropipetas automáticas y puntas desechables para dispensar volúmenes de 20; 100; 500 μ L respectivamente.
- Papel de filtro para el secado de las tiras.
- Viales o tubos para preparar el volumen exacto del revelador físico a utilizar.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Los componentes del sistema **AuBioDOT™ IgM anti-Dengue** en su forma original de presentación, mantienen la estabilidad hasta la fecha de vencimiento impresa en el envase, si son debidamente conservados de 2 a 8 °C.

No congelar ninguno de los componentes. Mantener las placas de poliestireno bien cerradas todo el tiempo y junto a la bolsa de gel de sílice. Antes de comenzar la prueba deje que los reactivos alcancen la temperatura ambiente para evitar la condensación.

El conjugado reconstituido mantiene la máxima actividad biológica hasta 30 días, si es conservado de 2 a 8 °C .

PRECAUCIONES Y RECOMENDACIONES

- Evite tocar con los dedos los pocillos de las placas. Todos los componentes de la sangre y materiales biológicos deben ser considerados como potencialmente infecciosos, por lo que debe tomarse precaución durante la manipulación de los mismos. Es recomendable usar guantes durante la realización de la prueba.
- Las muestras deben ser frescas y estar libres de partículas extrañas y contaminantes por lo que se aconseja previa centrifugación. Evite la contaminación entre los reactivos usando puntas diferentes para cada uno.
 - Si se desean archivar las tiras plásticas o las placas como registro permanente de los resultados, se recomienda una inmersión previa de las mismas en una solución alcohólica al 70 % .
- No mezcle los reactivos de diferentes lotes y no utilice reactivos vencidos.
- La azida puede reaccionar con el cobre o el plomo utilizado en determinadas tuberías y formar sales explosivas. Aunque las cantidades utilizadas en este juego son pequeñas, cuando se deseché material que contenga azida deber eliminarse con abundante agua.

INSTRUCCIONES PARA EL USO

A) PREPARACION DE REACTIVOS:

- **Placas sensibilizadas:** Evitar el contacto de los dedos con las áreas circulares sensibilizadas con el anticuerpo.

- **Conjugado Anticuerpo monoclonal - oro coloidal:** En dependencia del número de muestras a estudiar deberá hacerse una dilución previa de 1/10 del conjugado 10X en tampón de dilución del conjugado.

No. de ensayos	Vol. de conjugado (µl)	Vol. de diluyente (µl)
16	35	315
24	50	45
48	100	900
72	150	1350
96	200	1800

- **Tampón de lavado:** Preparar el tampón PBS - Tween 20, mediante disolución de las sales contenidas en el frasco de Sales Mezcladas en 500 mL de agua destilada. Adicionar posteriormente el reactivo Tween-20, enjuagando repetidas veces el vial hasta la completa disolución del contenido. Conservar de 2 a 8°C hasta su uso.
- **Muestras:** Se utilizarán muestras frescas, puras y previamente centrifugadas.
- **Antígenos:** Reconstituir el bulbo en 0,4mL de agua destilada. Después de reconstituida la preparación antigénica queda lista para ser usada.
- **Revelador:** El volumen exacto de revelador físico debe ser preparado al momento de su empleo, en el paso de la amplificación argéntica de la reacción. La preparación del revelador deberá hacerse en un tubo limpio y se deben usar puntas plásticas diferentes para cada solución.

No. de ensayos	Vol. de solución A (µl)	Vol. de solución B (µl)
16	170	170
24	250	250
48	500	500
72	730	730
96	1000	1000

B) PROCEDIMIENTO

1.- PRELAVADO DE LAS LAMINAS.

Sumerja las placas a utilizar en tampón de lavado por 5 min, para eliminar el preservativo.

2.- INCUBACION DE LAS MUESTRAS.

Colocar 20 µL de las muestras y los controles sobre las correspondientes áreas de reacción. Incubar durante 15 min a temperatura ambiente y en cámara húmeda.

3.- LAVADO.

Eliminar previamente el exceso de reactivos mediante abundante goteo o enjuague directo de las placas con agua. Transferir las mismas a un recipiente adecuado que contenga la solución de lavado, para continuar el lavado durante 5 min a temperatura ambiente, o hacer cuatro lavados usando un frasco lavador. Eliminar el exceso de líquido invirtiendo y golpeando la placa ligeramente contra un papel de filtro, evitando el contacto con la áreas de reacción.

4.- INCUBACION CON LOS ANTIGENOS

Colocar 20 µL de los antígenos sobre las correspondientes áreas de reacción. Incubar durante 15 min a temperatura ambiente y en cámara húmeda.

6.- LAVADO.

Repetir las operaciones de lavado como en el paso 3.

7.- INMUNOTINCION.

Colocar 20 µL del conjugado diluido sobre cada área de reacción e incubar durante 15 min a temperatura ambiente y en cámara húmeda.

8.- LAVADO.

Repetir las operaciones de lavado como en el paso 3.

9.- AMPLIFICACION ARGENTICA.

Depositar 20 µL de la mezcla reveladora. Incubar durante 10 min (temperatura ambiente y cámara húmeda).

10.- LAVADO.

Eliminar el exceso de reactivos mediante suficiente goteo o enjuague directo de las placas con agua destilada.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Los resultados son interpretados directamente por simple inspección visual sobre las áreas de reacción.

La muestra se considera REACTIVA cuando se produce *in situ* una coloración pardo claro a oscuro, que abarca toda el área circular de reacción. La intensidad de la coloración dependerá de la concentración de anticuerpos presentes en las muestras.

La muestra se considera NEGATIVA cuando no evidencia señales de coloración respecto a la textura blanca de la superficie sólida. Si alguna muestra presenta efectos muy débiles de coloración de fondo, la intensidad de la misma, visualmente comparada, debe ser igual o menor al control negativo correspondiente. Para muestras con resultados dudosos, se recomienda repetir la prueba con otro suero del paciente con más días de evolución de la enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

1. Sánchez Vizcaino, JM. Técnicas inmunoenzimáticas en patología animal y vegetal . Madrid 1981.
2. Peterson D L., Nath N., Gavilans F. Structure of Hepatitis B Surface Antigen. J. of Biol. Chem. Vol. 257 pp 10 414-10 420, 1982.
3. Santiso C. Resúmenes del III Seminario Internacional Ingeniería Genética y Biotecnología, 1989.
4. Miranda, A. et al. A comparison of VDRL and immunoassays develop with a recombinant TmpA antigen in the screening of antibodies to *Treponema pallidum* , 1997.

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

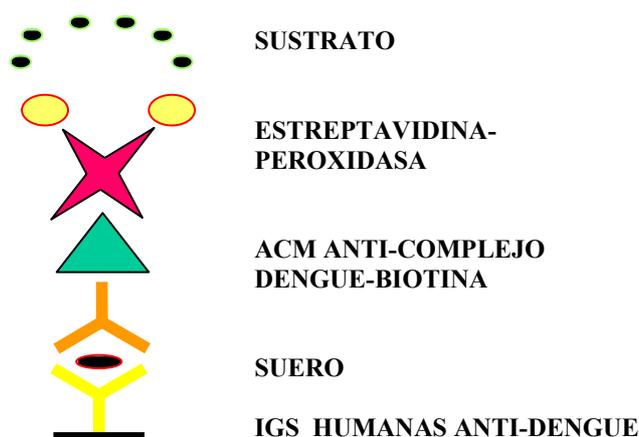
P.O. Box 6162, La Habana, Cuba
Teléfonos: (53-7) 21 8008, 21 8039
Fax: (53-7) 33 6008, 21 8070
Telex: 51 2330

Instituto Pedro Kouri

P.O. Box: 601 Marianao, La Haban, Cuba
Teléfonos:(53-7)220426
Fax:(53-7)220633
Telex: 51 1902cuipk

DETECCIÓN DE ANTÍGENO A DENGUE MEDIANTE UN ELISA DE AMPLIFICACIÓN BIOTINA-ESTREPTAVIDINA (ELISA-BE)

La detección directa del virus dengue en muestras de suero mediante sistemas inmunoenzimáticos, es una alternativa útil para el diagnóstico temprano de la enfermedad. Se han desarrollado algunos sistemas que incluyen la amplificación mediada por biotina-estreptavidina, la cual permite establecer un método de alta sensibilidad y especificidad, lográndose esto último, al incluir el uso de anticuerpos monoclonales.



Materiales:

- Placas de poliestireno Maxisorb (NUNC), constituidas por 12 tiras de 8 pozos cada una.
- Inmunoglobulinas humanas anti-dengue Pool de sueros humanos conteniendo anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación con títulos mayores o iguales a 1/1280 contra los virus del complejo dengue, precipitados por el método del sulfato de amonio y determinada su concentración mediante la lectura de DO a 280 y 260 nm.
- Anticuerpo monoclonal anti-complejo dengue conjugado con biotina
- Conjugado estreptavidina peroxidasa (Amersham)
- Buffer de Recubrimiento (coating) 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.
- PBS-Tween (PBS-T) 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 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.

- Ortofenilendiamina (OPD)
- Peróxido de hidrógeno (p.a.) 100 vol/ 30%
- Albúmina bovina sérica fracción V (ABS) al 3%

3 g de ABS en 100ml en buffer de recubrimiento (coating). Prepararlo al momento de ser usado.

- Sustrato

25 mL de buffer fosfato-citrato; 10mg de OPD + 10ul H₂O₂. Proteger de la luz.

Método:

- Adsorber en placa de poliestireno Igs humanas anti-dengue en buffer carbonato / bicarbonato pH 9,5 a una concentración de 5ug/ml (100uL por pozo). Dejar las placas en cámara húmeda tapada toda la noche a 4° C. Se necesita un volumen de 10 mL por placa.
- Vaciar el contenido de las placas y hacer un bloqueo con 150uL en cada pozo de la solución de ABS al 3% en buffer Carbonato/Bicarbonato. Incubar a 37°C por 1 hora. Volumen total de 15 mL por placa.
- Lavar las placas 3 veces con PBS-T.
- Agregar 100uL de una dilución de la muestra de suero 1/20 en PBS-T. Se incluirá un control negativo por cuadruplicado y uno positivo por duplicado. Incubar la placa 2 horas a 37°C.
- Lavar 3 veces con PBS-T.
- Agregar 100uL por pozo del AcM conjugado a Biotina diluido 1/500 en PBS-T + 2% de STF. Incubar a 37° C por 1 hora.
- Lavar 3 veces con PBS-T.

- Añadir 100 uL por pozo del conjugado estreptavidina-peroxidasa diluido 1/2000 en PBS-T + 2% de STF. Dejar incubando 1 hora a 37°C.
- Lavar 3 veces con PBS-T.
- Añadir el sustrato 100uL por pozo. El sustrato debe ser preparado unos minutos antes de su utilización. Esperar 30 minutos de reacción.
- Detener la reacción agregando 100 uL de ácido sulfúrico al 12,5 % en cada pozo.
- Determinar los valores de densidad óptica a 492nm en un lector Micro-ELISA.

Valor de corte (VC): Se calculará la media de las DOs y desviación estándar del control negativo, estableciéndose como $VC = \text{media de las DO} + 3 \text{ veces la desviación estándar}$.

Toda muestra que tenga un valor de DO mayor o igual al VC será considerada positiva.

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 proteína 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 TM, 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 una 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 Bromofenolazul 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 Figura 1. 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 (100 μ L de la fracción y 300 μ L del tampón) y previo calentamiento durante 2 min. a 80°C. Se adiciona por cada pozo entre 15-20 μ L de la mezcla calentada e igual volumen en un pocillo del marcador molecular RaibowTM, aplicando una corriente constante de 100 mA durante 1h.

3. Western Blot:

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

- 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.
- Aplicar corriente constante de 85 mA por gel durante 1h.
- Colocar la membrana en solución Rojo Ponceau S durante 15 min.
- 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).
- Colocar la membrana en solución bloqueadora durante 1h en agitación a temperatura ambiente (TA).
- 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) diluído 1/100 y un suero humano negativo a dengue diluído 1/50 durante 1h en agitación a TA.
- Lavado de la membrana con PBS-T₂₀. Un lavado rápido y 3 lavados de 10 min. en agitación a TA.

- Incubar membrana con conjugado humano (anti Ig humana-peroxidasa, Amersham) y conjugado anti-ratón (anti Ig ratón –peroxidasa, Amersham) diluïdos 1/2000 y 1/1000 con PBS-T₂₀-leche, respectivamente segùn corresponda, durante 1h en agitación a TA.
- Lavado de la membrana similar al anterior.
- Adicionar sustrato para revelar e incubar durante 5 min. en agitación a TA.
- Detener la reacción con H₂O destilada.
- 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.
- Laemmli UK. Cleavage of structure proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. Nature 1970; 227: 680-685.
- Valdés K, Alvarez M, Pupo M, Vázquez S, Rodriguez R, Guzmán MG. Human Dengue antibodies against structural and nonstructural proteins. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2000; 7(5): 856-57

