

DETECCION DE ANTIGENOS DEL VIRUS DENGUE EN TEJIDOS EMBEBIDOS EN PARAFINA.

La presencia de antígenos en tejidos puede ser evidenciada con el uso de diferentes técnicas. Sin embargo, son las técnicas inmunohistoquímicas (IHQ), y dentro de éstas las que utilizan como enzima la peroxidasa, las más usualmente empleadas.

El uso de sistemas que emplean la afinidad de la avidina por la biotina tienen gran sensibilidad y son en la actualidad los sistemas más usados cuando la señal a buscar necesita ser amplificada para su detección.

En el caso del virus Dengue, el empleo de estas técnicas permiten esclarecer la etiología en aquellos casos fatales con sospecha de infección por este virus. Igualmente puede emplearse para el diagnóstico retrospectivo en muestras incluidas en parafina de archivo o de referencia.

MATERIALES Y REACTIVOS:

Cortes histológicos procesados por parafina (método convencional) de 6 um de grosor de material en estudio, de caso positivo conocido y de otro caso no dengue.

- 1.- Kit StreptABComplex (DAKO)
- 2.- Anticuerpo anti-ratón biotinilado F(ab')₂(Boehringer)
- 3.- Anticuerpo Monoclonal contra virus dengue
- 4.- PBS 0.1 M pH 7,2
- 5.- Xilol
- 6.- Etanol absoluto
- 7.- Peróxido de Hidrógeno 30%
- 8.- Suero de Ternera
- 7.- Hematoxilina de Mayer
- 8.- Tabletas de 6 mg DAB
- 9.- Agua destilada
- 10.- Láminas cubreobjetos
- 11.- Medio de Montaje (Bálsamo de Canadá)

PROCEDIMIENTO

1. Desparafinar e hidratar:

- Se colocan las láminas de tejidos en xilol durante 5 minutos con agitación a temperatura ambiente.
- Se repite el paso anterior haciendo cambio de xilol.
- Pasar el tejido a alcohol; al 100% durante 5 minutos con agitación
- Pasar las láminas a alcohol al 75% durante 5 minutos
- Colocar las láminas en PBS durante 5 minutos.

IMPORTANTE. A partir de este momento impedir que el tejido y sus alrededores se sequen.

2.- Bloqueo de la Peroxidasa endógena.

- Se elimina el exceso de líquido de las láminas alrededor del tejido sin desprenderlo.
- Se añade H₂O₂ al 3% en agua destilada en cantidad suficiente para cubrir el tejido. Se incubaba durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- Realizar un lavado con agua destilada y posteriormente se coloca las láminas en PBS.
- Eliminar el exceso de líquido y se bordea el tejido usando lápiz DAKO-PEN (opcional).

3.- Bloqueo

- Se añade al tejido Suero Bovino al 20% en PBS durante 20 minutos con agitación y a temperatura ambiente. A partir de este paso, las incubaciones se hacen en cámara húmeda.

4.- Anticuerpos

- Eliminar la solución de bloqueo de la lámina
- Sin realizar ningún lavado se añade el anticuerpo primario (AcM anti-dengue) en la dilución de trabajo (1:20) con suero de ternera al 0.5% en PBS. Se agita durante 5 minutos a temperatura ambiente y luego se coloca en cámara húmeda a 4°C toda la noche.
- Se realizan 2 lavados con PBS durante 5 minutos.
- Secar el exceso de líquido y añadir el anticuerpo secundario (anti-ratón biotinilado) diluido 1:500 en PBS. Se incubaba a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación.

IMPORTANTE

Faltando 30 minutos para finalizar la incubación, se preparan los reactivos para agregar el complejo streptavidina-biotina.(StrepABCcomplex)
Por cada 1ml de reacción se necesitan 10 microlitros de A y 10 microlitros de B en PBS.
Se colocan en un vial y se mantiene a 4°C hasta su uso.

5.- Enzima

- Lavar 2 veces en PBS durante 5 minutos y después de eliminar el exceso de líquido añadir

mezcla de StreptABComplex. Se incuba durante 30 minutos.

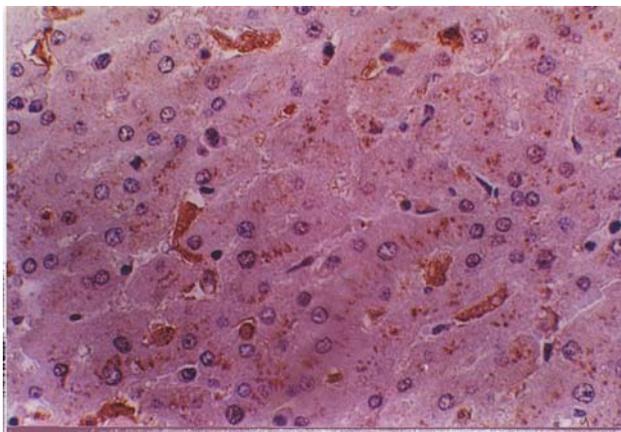
- Lavar 2 veces con PBS

- Añadir sustrato [H_2O_2 6 microlitros, 10 mililitros de H_2O y 1 tableta de Diaminobencidina (6 miligramos)]. Este paso se realiza lámina por lámina y la reacción se controla bajo observación en el microscopio. Se detiene la reacción con un lavado de agua corriente.

6.- Tinción y deshidratación de los tejidos.

- En un vaso copplin con Hematoxilina de Mayer colocar las láminas durante 45 segundos. Los núcleos de las células deben tomar una coloración azul. Colocar bajo agua corriente para eliminar colorante en exceso.
- Deshidratar en alcoholes en orden ascendente: 75%, 90%, 95%, 100%, alcohol-xilol y luego aclarar con 2 pases por xilol.
- Secar y gotear solución de montaje (Bálsamo de Canadá o DAKO Glycergel), colocar cubreobjeto y observar al microscopio.

En cada experiencia se debe contar con controles positivos y negativos para la técnica.



- J.L. Pelegrino, E. Arteaga, A.J. Rodríguez, E. González, M.C. Frontela, M.G. Guzmán. Normalización de técnicas inmunohistoquímicas para la detección de antígenos del virus dengue en tejidos embebidos en parafina. Rev Cub Med Trop Vol 49, # 2, 1997.



DAKO® Catalyzed Signal Amplification (CSA) System

K1500

Reagent Preparation

For optimal staining results, use of the CSA Ancillary System (Code No. K1499) is recommended. This system includes DAKO Target Retrieval Solution, DAKO Tris Buffered Saline with Tween 20, DAKO Biotin Blocking System and DAKO Antibody Diluent with Background Reducing Components. For staining with primary antibodies from RABBIT use of the DAKO CSA Rabbit Link (Code No. K1498) is recommended as a substitute for the Link Antibody provided (Bottle 4).

- **PREPARE WASH BUFFER SOLUTION**
0.05 M Tris-HCl pH7.6, 0.3 M NaCl, 0.1% Tween 20. DAKO TBST 10 x Concentrate (Code No. S3306 or in K1499) is recommended.

- **PREPARE PRIMARY ANTIBODY NEGATIVE CONTROL REAGENT**

- **PREPARE STREPTAVIDIN-BIOTIN COMPLEX (at least 30 minutes before use)**

<u>number of specimens</u>	<u>1-10</u>	<u>11-20</u>	<u>21-30</u>	<u>31-40</u>	<u>41-50</u>
ml of Streptavidin-Biotin Complex Diluent (Bottle 7)	1	2	3	4	5
<u>drops of Reagent A (Bottle 5)</u>	1	2	3	4	5
<u>drops of Reagent B (Bottle 6)</u>	1	2	3	4	5

- **PREPARE SUBSTRATE-CHROMOGEN SOLUTION**
 - 10 drops S substrate Tris Buffer Concentrate (Bottle 11) in provided 10 ml tube
 - Fill to 10 mL with distilled water
 - add 1 Substrate Tablet (Bottle 10)
 - cap
 - shake to dissolve

<u>number of specimens</u>	<u>1-20</u>	<u>21-40</u>	<u>41-60</u>	<u>61-80</u>	<u>81-100</u>
2 4 6 8 10	1	2	3	4	5

ml of DAB solution

drops of Substrate Hydrogen Peroxide (Bottle 12)

- **PREPARE TARGET RETRIEVAL (IF APPLICABLE)**
DAKO Target Retrieval Solution (Code No. S1699, S1700 or in K1499) is recommended.

- **PREPARE BIOTIN BLOCK**

DAKO Biotin Blocking System (Code No. X0590 or in K1499) is recommended.

DAKO Antibody Diluent with Background Reducing Components (Code No. S3022 or in K1499) is recommended as diluent.

▶ DEPARAFFINIZE AND REHYDRATE SPECIMENS

PERFORM TARGET RETRIEVAL (IF APPLICABLE)

PERFORM BIOTIN BLOCK

1 **APPLY HYDROGEN PEROXIDE (Bottle 1)**
incubate 5 minutes
wash ▪ place in fresh buffer bath

2 **APPLY PROTEIN BLOCK (Bottle 2)**
incubate 5 minutes
do not rinse ▪ blot excess protein block

3 **APPLY PRIMARY ANTIBODY OR NEGATIVE CONTROL REAGENT**
incubate 15 minutes
wash ▪ place in fresh buffer bath

4 incubate 15 minutes
wash ▪ place in fresh buffer bath

APPLY PREPARED STREPTAVIDIN- 5+6+7 BIOTIN COMPLEX

incubate 15 minutes
wash ▪ place in fresh buffer bath

8 **APPLY AMPLIFICATION REAGENT (Bottle 8)**
incubate 15 minutes
wash ▪ place in fresh buffer bath

9 incubate 15 minutes
wash ▪ place in fresh buffer bath

APPLY PREPARED SUBSTRATE- 10+11+12 CHROMOGEN SOLUTION

incubate 5 minutes
wash with water

APPLY STREPTAVIDIN-PEROXIBASE (Bottle 9)

- COUNTERSTAIN
- MOUNT
COVERSLIPS

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

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

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

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

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

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

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

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

1) Los aspectos relacionados con la infección, multiplicación y cosecha se describen en los acápites correspondientes en este mismo folleto.

2) Se monitorea la multiplicación viral mediante IFI. Cuando existe más de un 50% de células fluorescentes, se cosecha 200 µl del sobrenadante del cultivo infectado.

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

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

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

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

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

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

I.3) De muestras de tejidos en bloques de parafina

Desparafinación:

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

Extracción del ARN viral (Método del guanidinium isotiocianato):

- Resuspender el pellet en 300µL de tampón de lisis (100mM Tris-ClH pH 8.5, 0.5M EDTA, 10% SDS, 25mg/ml de Proteinasa K y 20u Rnasin) e incubar por 1h a 56⁰C en baño de agua.
- Añadir 300 µL de fenol-cloroformo e incubar por 10 min a TA utilizando plataforma o balancín. Centrifugar por 5 min a 7000 rpm. Extraer la fase acuosa (superior) y pasarla a un tubo eppendorf nuevo. Repetir la extracción una vez más.
- Añadir 300 µL de cloroformo y realizar un proceso similar al anterior. Repetir por segunda vez la extracción con cloroformo.
- Precipitar el ARN con 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío y acetato de sodio (1\10) durante 18h a -70⁰C.
- Centrifugar por 15 min. a 4⁰C y 12000 rpm, lavar con 1 mL de etanol al 70%, centrifugar en iguales condiciones y dejar secar el pellet en flujo laminar durante 30 min.
- Resuspender el pellet añadiendo 10µL de agua DEPC y mantener en hielo hasta la síntesis del cADN o a menos 70 °C por más tiempo.

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

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

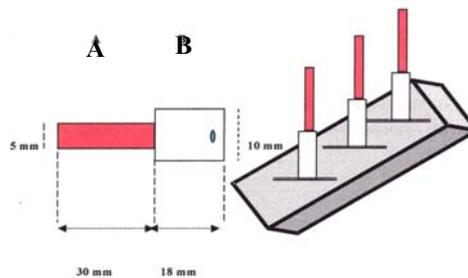


Figura 1. Papel de filtro empleado en el estudio. Izquierda A) Región donde se impregna la sangre infectada. Derecha) Posición de los papeles para el secado de la sangre impregnada.

- Elusión y extracción del ARN viral.
 - ✓ Cortar el área "A" del papel de filtro en 12-15 segmentos pequeños y transferirlos a un tubo eppendorf de 1.5 mL.
 - ✓ Añadir 400 μ L de agua libre ARNasas.
 - ✓ Colocar los tubos a 37⁰C durante 30 min.
 - ✓ Dar un golpe de centrifuga para precipitar los papeles.
 - ✓ Posteriormente transferir la mezcla de sangre y agua a un tubo eppendorf limpio (con pipeta).
 - ✓ 200 μ L de la mezcla del paso anterior se utilizan para continuar el protocolo como se describe en el siguiente acápite (II) para la extracción del ARN viral empleando Trizol.

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

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

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

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

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

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

Componentes del Kit:

Columnas QIAamp, Tubos de colección (2 mL), Buffer AVL, Buffer AW1 (concentrado), Buffer AW2 (concentrado), Buffer AVE, Carrier RNA (poly A).

Preparación de los reactivos del Kit:

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

Procedimiento:

1. En un tubo de micro –centrifuga de 1.5 mL, adicionar:
140 µL de muestra + 560 µL de buffer AVL/RNA carrier, mezclar con vortex e incubar 10 min. a TA, Ctg breve a TA.
2. Adicionar 560 µL etanol (96-100%), mesclar por vortex breve. Ctg breve a TA

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

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

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

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

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

30 min - 42° C (transcripción reversa)

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

5 min - 72 °C (extensión final)

Segunda amplificación o nPCR

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

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

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

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

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

Análisis directo de los productos del PCR por Electroforesis

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

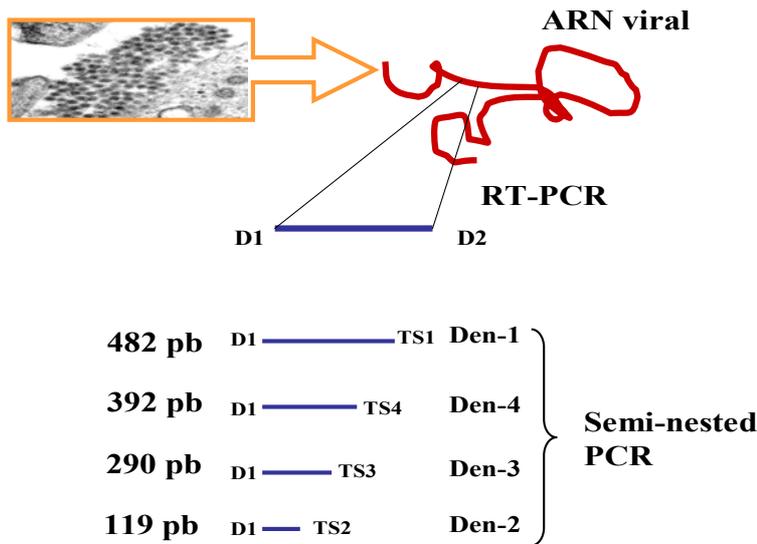
comparación con un marcador de peso molecular de ADN como el DNA Leader 100 pb y PCR Marker (Promega).

Interpretación de los resultados:

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

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

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



✓ **D. Rosario**, M. Alvarez, J. Díaz, R. Contreras, R. Rodríguez, M.G. Guzmán. Rapid detection and typing of Dengue viruses from clinical samples using Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction .. Revista de la Organización Panamericana de la Salud 1998; 3:1-5.

✓ **D. Rosario**, M Alvarez, S Vázquez, N Amin, R Rodríguez K Valdés MG Guzmán. Application of Molecular Methods to the Diagnosis and Characterization of Dengue Outbreak in Cuba. Biotecnología Aplicada 2001;18:203-206.

✓ **D. Rosario**. Diagnóstico molecular de las infecciones por Arbovirus. Libro: Genetic Diagnosis in Medicine, Primera edición, 1998.

✓ Prado I, **Rosario D**, Bernardo L, Alvarez M, Rodriguez R, Vazquez S, Guzman MG. PCR detection of dengue virus using dried whole blood spotted on filter paper. J Virol Methods. 2005 Apr;125(1):75-81.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

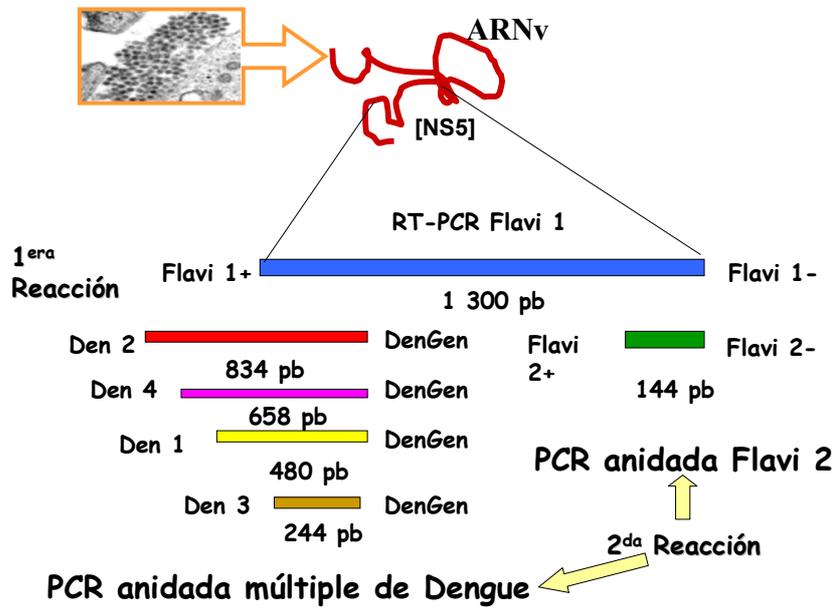
Es posible incorporar en esta reacción además los cebadores Flavi 2+ y Falvi 2-, con similar concentración.

4. Análisis directo de los productos del PCR por Electroforesis:

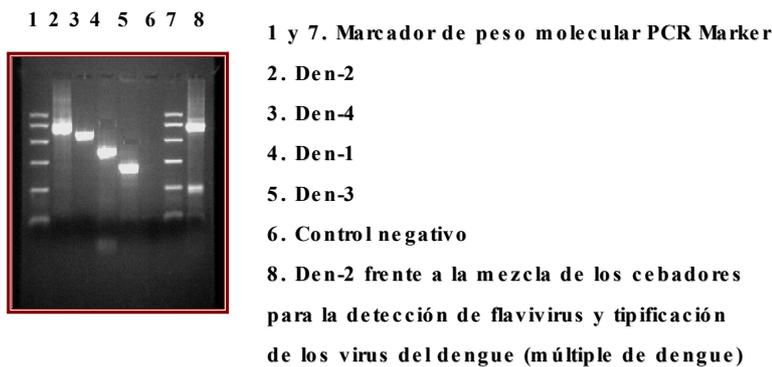
Se sigue el protocolo propuesto para el análisis de la PCR propuesta por Lanciotti y col. 1992.

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

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



Un ejemplo de los resultados que se pueden obtener se pueden observar en la siguiente foto:



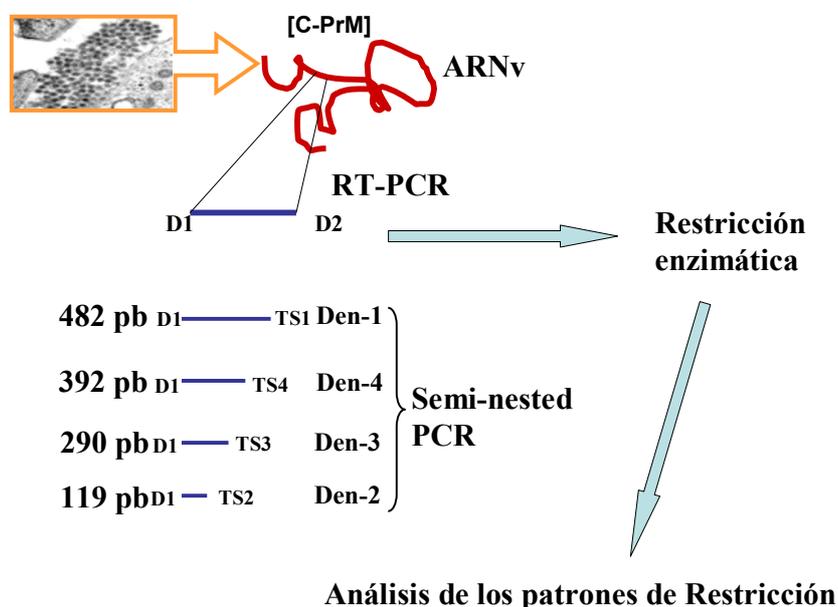
✓ Generis detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control and specific identification by jeans of sequencing. Sánchez-Seco MP, **Rosario D**, Valdes K, Guzmán MG, Tenorio A. J Virol. Method (in press).

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

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

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

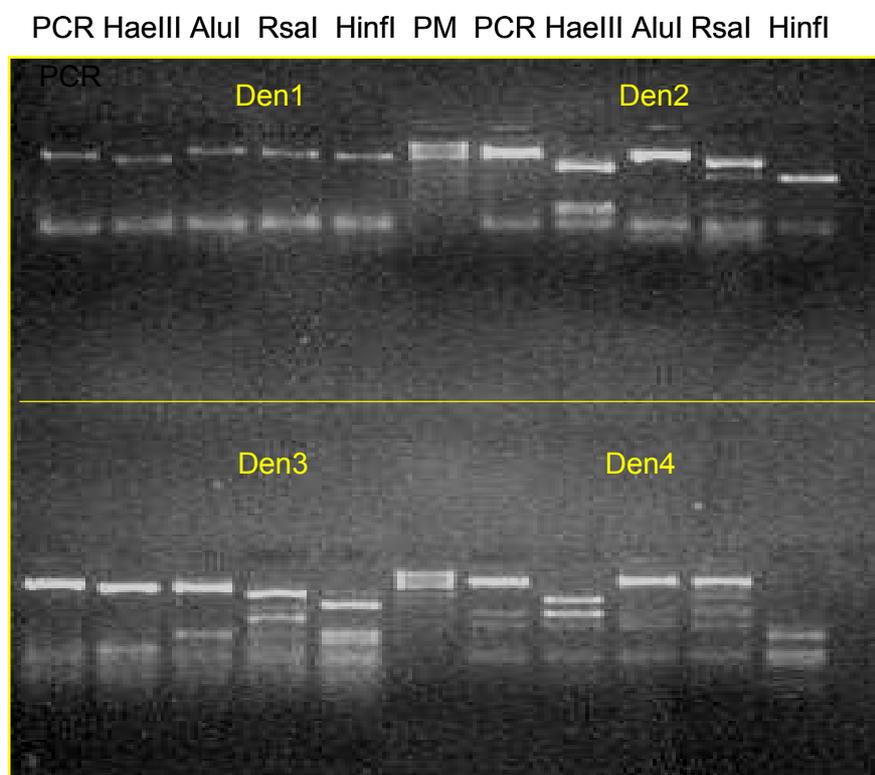
Figura 3. Esquema de la RT-PCR-RE para la determinación de subtipos de los serotipos de los virus dengue



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

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

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



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

Secuenciación nucleotídica directa del producto de la PCR

Secuenciación Manual

1. Purificación del fragmento amplificado:

- Adicionar 10 μ L del producto del PCR a 1 mL de la Resina (**WisardTM clean, Promega**), y 100 μ L del tampón, mezclar invirtiendo el tubo varias veces.
- Aplicar la mezcla ADN/Resina a la barra de una jeringuilla que esta previamente fijada a una minicolumna.
- Gentilmente aplicar el émbolo y desplazarlo dentro de la barra de la jeringuilla.
- De la misma forma, lavar la columna con 2 mL de Isopropanol al 80 %.

- Centrifugar a 10 000 rpm por 30 segs, a T.A.
- Transferir la minicolumna a un tubo eppendorf nuevo.
- Aplicar 50 μ L de agua destilada a la minicolumna. Centrifugar 30 segs.

2. Secuenciación del ADN purificado.

Teniendo en cuenta el protocolo propuesto por el Sequenace PCR Product Sequencing Kit (Amersham).

a. Pre-tratamiento enzimático del producto del PCR:

-5 μ L del producto del PCR

-1 μ L de Exonucleasa 1 (10 U/ μ L)

-1 μ L de Fosfatasa alcalina (2 U/ μ L)

Mezclar e incubar a 37 $^{\circ}$ C por 15 min. Inactivación enzimática, calentando a 80 $^{\circ}$ C, 15 min.

Todas estas incubaciones es conveniente realizarlas en termociclador.

El ADN esta en este momento listo para su secuenciación con este Kit.

b. Preparación de la mezcla de hibridación:

ADN pretratado (1-9 μ L, 0.5 pmoles)

Cebador (5-10 pmoles/ μ l) - 1 μ L

Agua (para ajustar volumen hasta 10 μ L).

Desnaturalizar por calor 2-3 min, 100 $^{\circ}$ C, y enfriar de inmediato en un baño de hielo, por 5 min. Centrifugar brevemente y mantener en hielo hasta el paso 6.

c. Marcar una serie de tubos de 0.5 mL con A, C, G y T. Agregarle 2.5 μ L de la mezcla de terminación. Mantener tapados a T. A. hasta los pasos 5 y 7.

d. Diluir LA MEZCLA DE MARCAJE 1:5 en agua.

e. Calentar a 37 $^{\circ}$ C, 1 min, los tubos del paso 3 (A, C, G y T).

f. Reacción de marcaje:

-10 μ L de la mezcla de hibridación del ARN (mantener en baño de hielo)

-2 μ L del tampón de reacción

- 1 μL DTT (0.1M)
- 2 μL labeling mix (1:5)
- 0.5 μL [^{33}P] o [^{35}S] (5 uCi)
- 2 μL de Secuenasa ADN polimerasa
- 17.5 μL en Total.

Mezclar y encubar a T.A. 5 min.

g. Reacción de terminación:

Transferir 3.5 μL de reacción de marcaje a cada tubo de terminación (A, C, G y T) mezclar y continuar incubando a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 5-10 min.

h. Detener la reacción adicionando 4 μL de la solución de parada a cada tubo.

i. Calentar las muestras a 75 $^{\circ}\text{C}$, 2 min inmediatamente antes de aplicar en el gel de secuencia. Aplicar 2-3 μL en cada línea.

3. Preparación del gel de secuencia

-Preparación de los cristales: Lavar cada cristal con agua y detergente abundante y tratar el cristal grande con Bind-silano y el cristal pequeño con Repel- Silano.

-Montar los cristales empleando espaciadores plásticos de 0.53 mm.

-Preparar la Acrilamida al 8% en un Beaker:

-Mezclar:

-Urea: 35.3 g

-Acrilamida/Bis (40/2): 12.5 ml

-TBE 10X: 8.4 mL

-Agua destilada: 36.2 mL

Inmediatamente antes de aplicar:

-Persulfato de amonio 15%: 600 μL

-TEMED: 60 μL

- Aplicar el gel inmediatamente entre las placas de cristal, precionando a cada lado con una presilla de presión. Dejar que el gel polimerise en posición horizontal durante 2 horas.

- Insertar los cristales con el gel en el aparato secuenciador, y aplicar TBE 1X en cada una de las 2 cámaras. Poner a pre-correr antes de aplicar, durante aproximadamente 30 min, con las mismas condiciones de corrida.
- Desnaturalizar las muestras a 80⁰C, 5 min (en bloque térmico), y aplicar inmediatamente.
- Aplicar las muestras en el orden A, C, G y T, con una pipeta Eppendorf.
- Correr a voltaje constante ~ 1600 vols, hasta que el azul de bromofenol llegue al final del gel
- Quitar los cristales del aparato y remover cuidadosamente el cristal mas pequeño.
- Enjuagar el gel fijado al cristal más largo, con una solución de Metanol 12%/ Ácido acético 10%, durante 10 min.
- Secar en horno a ~ 80⁰ C, y exponer en cámara oscura, a T. A. un tiempo que varia de acuerdo al isótopo empleado.
- Revelado: En condiciones semejantes a las empleadas para revelar cualquier placa de Rayos X. Lectura de la secuencia.

Secuenciación Automática

Para ello se emplea:

El equipo de secuenciación automática: **ALFexpress™ II (Amersham Biosciences)** y para realizar la reacción de secuencia a partir de producto de PCR el **Termo Sequenase Cy5 Dye Terminador Cycle Sequencing Kit**.



Para realizar la purificación del producto de la PCR y la reacción de secuencia se siguen estrictamente las instrucciones del manual del Kit.

ALFexpress II DNA Analyser, está diseñado para la detección automática de moléculas de DNA separadas por electroforesis.

En relación con el método de secuenciación tradicional de Sanger, las diferencias básicas son el uso de un primer o dNTP marcado fluorescente.

El Sistema ALFexpress II DNA Analyser consiste en:

- Un sistema de electroforesis y detección de laser fluorescente

- Una computadora externa con un software disponible para el control de la corrida electroforetica, análisis y almacenamiento de los datos.
- Otros accesorios necesarios para la operación del sistema.
- Otros elementos opcionales como reactivos de secuenciación y accesorios de hardware and software.

La preparación de los cristales, el gel y la corrida electroforetica se realizan siguiendo estrictamente las instrucciones del manual del equipo.



SISTEMA DE EXPRESION DIFERENCIAL DE mRNA
(“RNAimage Kit: mRNA DIFFERENTIAL DISPLAY SYSTEM”)

La tecnología de expresión diferencial de mRNA es una poderosa herramienta para la identificación y la clonación de genes diferencialmente expresados. Este método comprende:

- la transcripción inversa de mRNA con cebadores de oligo-dT que se incorporan a la cola de poli(A),
- la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) en la presencia de un segundo cebador corto cuya secuencia es arbitraria,
- la corrida electroforética, en un gel de secuenciación de DNA, de las subpoblaciones de cDNA amplificadas.

El análisis de las muestras de mRNA puestas una al lado de la otra permite identificar genes expresados diferencialmente y la recuperación de estos para ser usados como sondas y para la clonación de su cDNA o de su DNA genómico.

Materiales:

- ⇒ tampón de transcripción inversa 5X
- ⇒ transcriptasa inversa MMLV (100 u/μl)
- ⇒ dNTP (250 μM)
- ⇒ H-T₁₁G (2 μM)
- ⇒ H-T₁₁A (2 μM)
- ⇒ H-T₁₁C (2 μM)
- ⇒ tampón de RCP 10X
- ⇒ dNTP (25 μM)
- ⇒ H-AP1 (2 μM)
- ⇒ H-AP2 (2 μM)
- ⇒ H-AP3 (2 μM)
- ⇒ H-AP4 (2 μM)
- ⇒ H-AP5 (2 μM)

- ⇒ H-AP6 (2 μ M)
- ⇒ H-AP7 (2 μ M)
- ⇒ H-AP8 (2 μ M)
- ⇒ control de RNA (1 μ g/ μ L)
- ⇒ glucógeno (10 mg/mL)
- ⇒ H₂O destilada (H₂Od)
- ⇒ colorante de corrida
- ⇒ Taq DNA polimerasa (5 u/ μ L) o AmpliTaq DNA polimerasa (5 u/ μ L)
- ⇒ α -[³³P]dATP (2 000 Ci/mmol) o α -[³⁵P]dATP (1 000 Ci/mmol)

El sistema RNAimage fue optimizado usando Taq DNA polimerasa de Qiagen o Perkin Elmer y α -[³³P]dATP de New England Nuclear. DNA polimerasas termoestables producidas por otras casas comerciales pueden no ser compatibles con el sistema RNAimage.

- ⇒ MessageCleanKit de la Corporación GenHunter. El RNA total debe ser purificado de contaminantes de DNA cromosomal con este sistema, antes de su uso en differential display.

Métodos:

- Transcripción inversa del mRNA

1. Descongelar los siguientes componentes y poner en hielo:

Para un volumen final de 20 μ L	μ L
H ₂ Od	9.4
tampón de transcripción inversa 5X	4.0
dNTP (250 μ M)	1.6
RNA total (libre de DNA)	2.0 (0.1 μ g/ μ L, diluido en el momento de ser usado.)
H-T ₁₁ M* (2 μ M)	2.0
Total	19.0

*(la M puede ser G, A o C)

2. Programar su termociclador a 65° C por 5 minutos → 37° C por 60 minutos → 75° C por 5 minutos → 4° C. Cuando los tubos de RCP tengan 10 minutos a 37° C, parar el termociclador y añadir 1 µL de transcriptasa inversa MMLV a cada tubo (usar P10 o una pipeta Gilford con micropuntas para evitar errores en la carga de pequeños volúmenes) y mezclar bien golpeando con el dedo antes de continuar la incubación. Al final de la transcripción inversa, centrifugar brevemente cada tubo para recoger la condensación. Poner los tubos en hielo para la RCP o guardar a -20° C para su uso posterior.

Nota: El período de incubación de 75° C está previsto para inactivar la transcriptasa inversa MMLV sin desnaturalizar el dúplex mRNA/ cDNA, de manera que se evitan errores de apareamiento iniciales de los cebadores en la mezcla de reacción de la RCP.

El control de RNA (libre de DNA) es el RNA total aislado de fibroblastos transformados de embrión de rata y está previsto que sirva como un control de la amplificación de mRNA dependiente de la transcripción inversa y con cualquiera de las combinaciones de cebadores. El control de RNA debe ser diluido justo antes de su uso, por adición de 9 µl de H₂O_d o agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC.)

- PCR

1. Descongelar los componentes indicados abajo y ponerlos en hielo. Preparar las reacciones de RCP a temperatura ambiente en tubos de reacción de paredes finas. Los tubos de paredes gruesas son una de las fuentes principales de falsos positivos debido a transferencia de calor desigual entre los tubos.

20 μ L de volumen final para cada combinación de pares de cebadores	μ L
H ₂ O	10.0
tampón de RCP 10X	2.0
dNTP (25 μ M)	1.6
cebador H-AP (2 μ M)	2.0
H-T ₁₁ M (2 μ M)	2.0
mezcla de transcripción inversa del paso 1 (debe contener el mismo H-T ₁₁ M usado para la PCR)	2.0
α -[³³ P]dATP (2 000 Ci/mmol)	0.2
Taq DNA polimerasa (Qiagen)	0.2
Total	20.0

Nota: Puede usarse 1 μ l de α -[³⁵P]dATP (1 000 Ci/mmol) en lugar de α -[³³P]dATP (2 000 Ci/mmol). Ajustar el volumen total con H₂O.

2. Mezclar bien por carga y descarga sucesivas con pipeta. Adicionar 25 μ L de aceite mineral si es necesario. RCP a 94° C por 30 segundos \longrightarrow 40° C por 2 minutos \longrightarrow 72° C por 30 segundos, por cuarenta ciclos seguidos por 72° C por 5 minutos \longrightarrow 4° C. (Para termocicladores Perkin Elmer 9 600 se recomienda que la temperatura de desnaturalización sea reducida a 15 segundos y que los restantes parámetros permanezcan sin cambio.)

Electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida a 6 %.

1. Preparar un gel desnaturalizante de poliacrilamida a 6 % en tampón TBE. Dejar polimerizar por al menos 2 horas antes de su uso. Poner a correr el gel durante 30 minutos. Es crucial que la urea en los pozos sea completamente lavada justo antes de

correr sus muestras. Para una mejor resolución, lavar cada cuatro a seis pozos durante la adición de las muestras, mientras se trata de no afectar las muestras que ya han sido adicionadas.

2. Mezclar 3.5 μ l de cada muestra con 2 μ l de colorante de corrida e incubar a 80° C por 2 minutos inmediatamente antes e adicionarlas a un gel de secuenciación de DNA al 6 %. Poner a correr durante 3.5 horas a 60 watts (el voltaje no debe exceder de 1700) hasta que el colorante de xileno (de menor movilidad en el gel) alcance el borde inferior del gel. Apagar la fuente de energía y secar el gel sobre un papel 3M. Cubrir el gel con una envoltura plástica y secarlo al vacío en un secador de geles a 80° C por 1 hora. (Debido a que el DNA es sensible a ácidos, no fijar el gel con metanol/ ácido acético debido a que esto puede conducir a problemas en la reamplificación.)

Reamplificación de las sondas de cDNA.

1. Orientar el autorradiograma y el gel seco con tinta radioactiva o con un corte en un extremo antes de exponerlos a la película de rayos-X.
2. Después de revelar la película (el tiempo de exposición puede variar desde toda la noche hasta 72 horas), orientar el autorradiograma con el gel. Marcar las bandas de interés por perforación a través de la película con una aguja en los cuatro extremos de cada banda de interés. (Manipular el gel seco con guantes y guardarlo entre dos hojas de papel limpio.) Extraer las bandas marcadas con un bisturí limpio.
3. Poner los fragmentos de gel en tubos y añadir tampón de RCP 2X.
4. Hervir los tubos con la tapa bien cerrada (con parafilm) durante 15 minutos.
5. Centrifugar durante 2 minutos para recoger la condensación y precipitar los desechos de gel.

6. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrífuga. Añadir 10 μL de acetato de sodio 3M, 5 μL de glucógeno (10 mg/mL) y 450 μL de EtOH a 100%. Dejar durante 30 minutos en hielo seco o en un congelador de -80°C .

7. Centrifugar durante 10 minutos a 4°C para precipitar el DNA. Eliminar el sobrenadante y lavar el precipitado con 200 μl de EtOH frío (temperatura de hielo) a 85% (el DNA puede perderse si se usa EtOH menos concentrado.) Centrifugar brevemente y extraer el etanol residual.

8. Disolver el precipitado en 10 μL de H_2O y usar 4 μL para la reamplificación. Guardar el resto a -20°C .

9. La reamplificación debe ser realizada con el mismo juego de cebadores y en las mismas condiciones de la RCP, excepto que las concentraciones de dNTP deben ser de 20 μM (usar la mezcla de dNTP de 250 μM) en lugar de 2 a 4 μM y que no se añaden isótopos. Se recomienda que el volumen de la reacción de reamplificación sea de 40 μL .

	μl
H ₂ O	20.4
tampón de la Taq DNA polimerasa 2X	4.0
dNTP (250 μM)	3.2
cebador H-AP (2 μM)	4.0
H-T ₁₁ M (2 μM)	4.0
molde de cDNA del paso 8	4.0
Taq DNA polimerasa (Qiagen)	0.4
Total	40.0

Se corren treinta microlitros de las muestras de RCP en un gel de agarosa a 1.5 % y se tiñen con bromuro de etidio. Si usted falla en reamplificar la sonda de cDNA en una

primera ronda de RCP, puede usar 4 μ l de una dilución 1:100 de la muestra de la primera ronda de RCP como molde para otra amplificación de 40 ciclos. Aproximadamente 90 % de las sondas debe ser visible en geles de agarosa después de la primera ronda de RCP. Guardar el resto de las muestras de RCP a -20° C para clonación.

10. Verificar que la talla de los productos de RCP reamplificados se corresponden con sus tallas en el gel de secuenciación del DNA. Extraer la sonda de cDNA reamplificada del gel de agarosa mediante un sistema QIAEX de Qiagen.

11. Analizar la identidad de la sonda por hibridación Northern antes de la clonación o de forma más eficiente por hibridación inversa Northern después que la sonda ha sido clonada (PCR-TRAP Cloning System and ReversePrime cDNA labeling kit de la Corporación GenHunter.) El segundo de estos métodos permite la verificación simultánea de múltiples sondas.

12. Clonar la sonda de cDNA usando PCR-TRAP Cloning System de la Corporación GenHunter.

13. Analizar la identidad de la sonda de cDNA clonada mediante hibridación Northern o, de forma más eficiente, por hibridación inversa Northern, y secuenciar la sonda de cDNA clonada mediante AidSeq Kit C de la Corporación GenHunter.

14. Clonar el cDNA de talla completa mediante su localización en una genoteca de cDNA siguiendo el procedimiento estándar.

- Peng Liang and Arthur B. Pardee: Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction (1992) Science 257: 967-971.

ENSAYO DE LINFOPROLIFERACIÓN A PARTIR DE CÉLULAS HUMANAS DE SANGRE PERIFÉRICA

Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica.

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

Cel. Contadas x Dilución en colorante. 10^4

Cel/ml de medio =

cuadrantes contados

Ensayo de linfoproliferación:

- Ajuste de células a la concentración de 1×10^6 /ml en medio RPMI-1640 suplementado.
 - Dispensar 100uL de células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos, fondo en U(Costar/Falcon).
 - Añadir antígenos (virus dengue purificado a partir de cerebro de ratón lactante) o mitógenos como PHA o medio en control de síntesis espontánea por triplicados, a concentraciones deseadas, en un volumen de 100 uL/pozo.
 - Incubar placas a 37^0 C, atmósfera húmeda, 5% de CO_2 durante 6 días para antígenos y 3 días para mitógenos.
 - Dar pulso con timidina tritiada 6 horas antes de completar el tiempo de incubación a 1uCi/pozo.
 - Tras completar el tiempo de incubación congelar la placa a -70^0 C hasta su cosechamiento.
 - Cosechar las células con Cosechador automático (Cell harvester, Skatron)sobre papel de fibra de vidrio(Skatron).
 - Poner a secar el papel a temperatura ambiente durante toda la noche, a 37^0 C durante 3 horas o a 60^0 C durante durante 30 minutos.
 - Dispensar los discos en papel de fibra de vidrio en viales de centelleo.
 - Añadir Coctel líquido de centelleo (Scitran)1mL en viales pequeños o 5ml en viales grandes.
 - Contar en contador de centelleo líquido(LKB) a 1 min./vial.
 - Cálculo del I.E.: $IE = \frac{\text{cpm media del triplicado}}{\text{cpm media síntesis espontánea}}$
- Bojum A. (1968) Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose dextran and Ficoll as erythrocyteaggregating agents. Scand J. Clin Lab. Invest 21 supplement 97, 31-50.

ENSAYO DE LINFOPROLIFERACIÓN A PARTIR DE ESPLENOCITOS DE RATÓN

Aislamiento de esplenocitos

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

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

- Ajuste de células a la concentración de 2×10^6 /ml en medio RPMI-1640 suplementado.
- Dispensar 100ul de células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos, fondo en U(Costar/Falcon).
- Añadir antígenos o mitógenos (o medio en control de síntesis espontánea) por triplicados, a concentraciones deseadas, en un volumen de 100 ul/pozo.
- Incubar placas a 37° C, atmósfera húmeda, 5% de CO₂ durante 4 días para antígenos y 3 días para mitógenos.

- Pulso con 1 μ Ci/pozo de timidina tritiada (Amershan) por 18 horas.
- Añadir Timidina tritiada a la concentración de 1 μ Ci/pozo.
- Incubar 6 horas.
- Congelar a -70⁰C.
- Descongelamiento.
- Cosechamiento
- Conteo de cpm

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

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

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

- Preparación de gelatina al 3% en agua . Seguidamente esterilizar y disolver por autoclave.
- Colocar sobre los frascos 10mL e incubarlos toda la noche a 50⁰C.
- Aislar las CMSP según el método de Boyum,A. (Isolation of leucocytes from human blood. Isolation of mononuclear cell by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. (SCAND.J Lab. Invest **1968**; 21 (97): 77-89).
- Colectar el anillo así como el plasma.
- Añadir 15 mL de plasma .
- Incubar 1hora a 37⁰C.
- Absorber el plasma y lavar dos veces con RPMI sin suplementar (10mL /frasco).Observar la limpieza al Microscopio.
- Colocar las CMSP en RPMI al 10%STF
- Incubar de 60-90 minutos, 37⁰C, 5%CO₂.
- Extraer células que no se pegaron: Lavar con RPMI 2 veces y chequear al microscopio
- Añadir sln salina fría (20 mL).
- Incubar 5
- Centrifugar 7 minutos 4⁰C
- Resuspender en RPMI al 2% de STF, si el objetivo siguiente es infectarlas (la infección se realiza empleando la técnica ya descrita de Shell vial).
- Ajustar a 500x 10⁶ células minutos a 4⁰C.
- Desprender
- Tomar todo

Detección de Citoquinas Intracelulares y Marcadores Celulares de Superficie por Citometría de Flujo en cultivos de Células mononucleares murinas estimuladas con antígenos/mitógenos.

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

- Se emplea un Ac anti receptor FC \square II/III, 1 μ g/10⁶ en 100 μ l de tampón de marcaje (PBS-Dulbecco, STF 1% inactivado, Azida Sódica 1%, pH 7.4-7.6) filtrado; (TM)
- Incubar 30 minutos a 4 °C.

Marcaje de Antígenos de Superficie.

- Depositar 10⁶ células en 100 μ L de Tm en tubos precubiertos con ACM específico conjugado a fluorocromos(0,5 μ g)
- Incubar 30 minutos a 4 °C .
- Lavar 2 veces con TM 1 mL/tubo 250 x g, 10 minutos.
- Desagregar por vortex.

Fijado y Permeabilización de las células.

- Resuspender las células en 200 μ l de solución de fijado y permeabilización.
- Incubar 20 minutos a 4 °C.
- Lavar en iguales condiciones

Marcaje de citoquinas intracelulares.

- Depositar 10⁶ células en 100 μ L de Tm en tubos pretratados con ACM específico conjugado a fluorocromos (5 μ g)
- Incubar 30 minutos a 4 °C
- Lavar en las mismas condiciones

Análisis Citométrico.

- Control de marcaje para citoquinas intracelulares: Después de paso 3.
 - Depositar 10⁶ células en 50 μ L de Tm en tubos pretratados con ACM específico NO conjugado a fluorocromos (5 μ g), del mismo clon del conjugado.
 - Añadir el ACM específico conjugado a fluorocromos (5 μ g) en 50 μ L.
 - Incubar 30 minutos a 4 °C
 - Lavar en idénticas condiciones.
- Haynes J. L. (1988) Principles of flow cytometry. Cytometry supplement 3: 7-17.
 - Prussin C. (1992) Cytokine flow cytometry : Understanding Cytokine Biology at the single cell level. Journal of Clinical Immunology vol 17 No 3.

ENSAYO DE INMUNOAMPLIFICACIÓN

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

Materiales:

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

Preparación de las células K₅₆₂.

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

Preparación de las mezclas de reacción

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

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

- Cada mezcla virus-suero o virus-RPMI debe ser titulada, sin diluir y por duplicado, en células BHK21 (para el método de titulación ver p. 34.)

Se considera que se ha producido ADA si:

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

x₁ – número de placas del virus con suero

x₀ – número de placas del control de virus

PROCEDIMIENTO PARA ELISPOT DE INF GAMMA

1. Recubrir la placa con el anticuerpo primario (Ac anti IFN gamma): concentración de trabajo 3ug/ml de PBS para una placa (100 ul/pozo 10ml PBS + 30 ug de Ac anti IFN gamma).
2. Aislamiento de PBMC según el protocolo habitual.
3. Lavar tres veces con 200 ul /pozo de PBS estéril o RPMI.
4. Bloquear la placa con 200 ul de PBS / BSA : 5g de BSA fracción V en 500 ml de PBS y filtrar por 0.2um o RPMI 10% FCS + 1% P/S de 1 a 4 horas a TA.
5. Ajustar las PBMC a 3×10^6 (300 000/pozo) o 5×10^6 (500 000/pozo).
6. Añadir los antígenos que se usaran para estimulación: Péptidos (diluir los péptidos a una concentración de 20 ug/ml en RPMI (5 mg/ml stock: 0.4 ul/100 ul). Virus
7. Eliminar el bloqueo aspirando el contenido de los pozos.
8. Lavar 3 veces con 200ul de PBS, (puede no lavarse).
9. Dispensar las células 100 ul y los antígenos 100ul para un total de 200 ul / pozo.
10. Cultivo: 24h, 48h u over nighth.
11. Lavar 3 veces 200 ul PBS y 3 veces con 200 ul PBS Tween 20al 0.05 % o 6 veces con PBS Tween al 0.05%.
12. Incubar 10 min con PBST 20 0.05%. Eliminar bien el detergente con cuidado de no tocar el fondo del pozo.
13. Preparar el segundo anticuerpo a 2mg/ml en PBS Tween- BSA.
14. Incubar over night a 4 grados
15. Lavar 4 veces con PBS Tween 105 ul /pozo.
16. Preparar estreptavidina 1/2000: 5ul para 10 ml.
17. Incubar 2 horas a TA.
18. Lavar 3 veces con PBS T y 3 con PBS.
19. Sustrato aminoetil carbazol: 12 ml de buffer +0.4 ml de AEC+ 12 ul de H2O2.
20. Añadir 200 ul por pozo y dejar de 1 a 5 min.
21. Interrumpir la reacción lavando con abundante agua de la pila.
22. Dejar las placas secar over night y contar manchas usando un microscopio de disección.

IL-10 levels in dengue patients. Some findings from the exceptional epidemiological conditions of Cuba. Pérez AB, García G, Sierra B, Alvarez M, Vázquez S, Cabrera MV, Rodríguez R, Rosario D, Martínez E, Denny T, Guzmán MG. *Journal of Medical Virology* **2004**, 73: 230-234.

Long term memory cellular immune response to dengue virus after a natural primary infection. Sierra B, García G, Pérez AB, et al. *International Journal of infectious Diseases* **2002**; 6 (2):125-128.

IL-2 levels in past dengue infection. Gissel García, Beatriz Sierra, Luis Morier ,Miguel Guzmán, Mayling Alvarez, Ana B. Pérez amd María G.Guzmán.*Dengue Buletin*, Vol 25, **2001**, pag 65-68.