

Esp
INCAP
ME
053

INSTITUTO DE NUTRICIÓN DE CENTRO AMÉRICA Y PANAMÁ
ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD



Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri

**MANUAL DE LABORATORIO
PARA EL DIAGNOSTICO
DEL DENGUE**

**INSTITUTO DE NUTRICIÓN DE CENTRO AMÉRICA Y PANAMÁ
ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD**



Instituto de Medicina Tropical Pedro Kouri

**MANUAL DE LABORATORIO
PARA EL DIAGNOSTICO
DEL DENGUE**

1994

ÍNDICE

SEGURIDAD EN EL LABORATORIO	1
Grupo de riesgo I	1
Grupo de riesgo II	1
Grupo de riesgo III	1
Grupo de riesgo IV	1
RECOLECCIÓN DE MUESTRAS PARA EL DIAGNÓSTICO DEL DENGUE	5
Documentación e identificación del paciente	5
Muestras para aislamiento viral	6
Muestras para diagnóstico serológico	6
Envío y transporte de las muestras	6
AISLAMIENTO DEL VIRUS DEL DENGUE	9
Ratón lactante	9
Inoculación intratorácica de mosquitos	9
Células de mamífero	11
Cultivos de mosquitos	12
TITULACIÓN DEL VIRUS DEL DENGUE	23
Título del Dengue por micrométodo	23
NEUTRALIZACIÓN POR REDUCCIÓN DE PLACAS	29
Procedimiento	29
Lectura de placas	30
PREPARACIÓN DEL ANTÍGENO: MÉTODO SACAROSA-ACETONA	33
Procedimiento para la extracción del antígeno	34
HEMAGLUTINACIÓN	37
Materiales y reactivos	37
Procedimiento	40
Lectura de resultados	42
INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN	43
Procedimiento	43
Lectura de resultados	43
Controles	43
Interpretación de los resultados	44
FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO	47
Equipo y Reactivos	48

Preparación de reactivos	49
Titulación de la hemolisina	51
Preparación del sistema hemolítico	52
Titulación del complemento	53
Fijación del complemento	54
INMUNOFLUORESCENCIA	59
Principio de la técnica	59
Microscopio para fluorescencia	60
Preparación del sustrato antigénico	61
Procedimiento para la inmunofluorescencia indirecta	62
Conjugación con FITC	67
Preparación de la columna con Sephadex G-50	68
ENSAYOS INMUNOENZIMÁTICOS	71
Preparación de conjugado anti-dengue-peroxidasa	71
ELISA de Captura de IgM	74
Sistema Ultra-Micro-ELISA para la detección de anticuerpos IgM anti-dengue (UMELISA-Dengue)	77
ELISA de inhibición	77

SEGURIDAD EN EL LABORATORIO

Los microorganismos se clasifican de acuerdo con el riesgo de la siguiente manera:

1.1 Grupo de riesgo I

Escaso riesgo individual y comunitario. Tienen pocas probabilidades de provocar enfermedades humanas o de importancia veterinaria.

1.2 Grupo de riesgo II

Riesgo individual moderado. Riesgo comunitario limitado. Agente patógeno al hombre o a los animales, pero con pocas probabilidades de provocar riesgo grave para el personal de laboratorio, la comunidad, el ganado y el ambiente. La infección en el laboratorio puede provocar una enfermedad grave, pero si se dispone de medidas eficaces de tratamiento y prevención el riesgo de propagación es limitado.

1.3 Grupo de riesgo III

Riesgo individual elevado. Riesgo comunitario escaso. Puede provocar infecciones graves, pero de ordinario no se propaga de una persona a otra.

1.4 Grupo de riesgo IV

Elevado riesgo individual y comunitario. Puede provocar enfermedad grave en el hombre y en los animales y puede propagarse fácilmente de un individuo a otro, directa o indirectamente.

Los virus del Dengue (serotipos 1, 2, 3 y 4) están clasificados dentro del nivel de riesgo II.

Las personas que trabajan con virus u otros agentes infecciosos están expuestas al riesgo de infecciones por accidentes en el laboratorio si no observan las precauciones debidas. El número de infecciones puede reducirse al mínimo si se trabaja con buena técnica y se siguen una serie de recomendaciones generales.

En el laboratorio, las infecciones pueden ocurrir por otras vías diferentes a la natural. Se ha observado que los aerosoles pueden provocar infecciones por arbovirus, que normalmente se adquieren por la picadura de algunos artrópodos.

Las causas más frecuentes de infecciones en el laboratorio son los aerosoles, los pinchazos con agujas infectadas y el pipeteo con la boca. La manipulación de cristalería, materiales y animales contaminados también han provocado infecciones en el laboratorio.

Los principios para trabajar en el laboratorio con especímenes infectados por virus son los siguientes:

- No pipetear con la boca.
- Usar guantes para el trabajo con muestras de sangre u otros líquidos orgánicos.
- Usar batas, uniformes u otras prendas apropiadas. No llevar la ropa de trabajo fuera del área del laboratorio.
- Descontaminación de jeringas y agujas. Es recomendable el uso de material desechable.
- Evitar la formación de aerosoles y gotas.
- Emplear cámaras de seguridad cuando existe un gran riesgo de formación de aerosoles.
- Limpieza rápida de los derrames cubriéndolos con un paño o papel mojado en solución desinfectante (hipoclorito de sodio: 10g en un litro). Debe dejarse actuar el desinfectante por lo menos 30 minutos antes de proceder a recoger los materiales y limpiar las superficies contaminadas.
- Descontaminación diaria de las mesas y superficies de trabajo.
- Descontaminación de todos los materiales utilizados en el trabajo, incluyendo la ropa.
- Lavado de las manos después de manipular especímenes.
- En caso de inyecciones, cortaduras o abrasiones accidentales, quitarse los guantes, lavarse las manos, aplicar desinfectante a la piel si procede, consultar a un médico.
- No fumar, comer o beber en el área de trabajo.
- No tener alimentos ni bebidas en los refrigeradores.
- Es recomendable que exista en los laboratorios presión negativa (cuando se trabaje con agentes de los grupos III y IV), así como puertas que aislen al mismo del resto de los edificios en caso de accidente.
- Las centrifugas deben estar equipadas con mecanismos de seguridad para que el material infeccioso no se disemine.

- Para centrifugar deben utilizarse tubos de tapa de rosca plástica.
- Debe existir un reglamento interno de bioseguridad, así como un responsable que garantice su cumplimiento. Deben existir medidas a tomar en caso de accidente.
- El personal de laboratorio debe estar vacunado (de existir las vacunas) contra los agentes con los cuales trabajan o investigan.
- Verificar periódicamente el estado de salud de los trabajadores.
- Las áreas de trabajo deben estar adecuadamente señalizadas como de "acceso restringido".

1.5 Referencias

Lennette, E.A. and Schmidt, N.J. 1979. Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Infections. 5th.ed. New York, APHA Inc., pp.68-78.

Laboratory Safety at the Center for Disease Control. US Department of Health, Education and Welfare, PHS. Reprint. DHEW Publication CDC 76-8118, 1975.

Laboratory Safety for Arboviruses and Certain Other Viruses of Vertebrates. Amer. J. Trop. Med.& Hyg.1980, 29:1359-1381.

Classification of Etiological Agents on the Basis of Hazard. Reprint. USDHEW, PHS, CDC, Office of Biosafety, Atlanta, 1976

Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. OMS, Ginebra, 1983.

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS PARA EL DIAGNÓSTICO DEL DENGUE

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

2.1 Documentación e identificación del paciente

Todas las muestras deben ser rotuladas con el nombre del paciente y la fecha de recolección de la misma y deben llegar al laboratorio con la siguiente información:

Nombre del paciente:		
Edad:	Género:	Raza:
Dirección:		
Fecha inicio síntomas:	Fecha toma de muestra:	
Nombre y dirección del médico:		
Resumen de datos clínicos y epidemiológicos:		
Impresión clínica:		
Tipo de muestra recolectada:		

2.2 Muestras para aislamiento viral

Las muestras para aislamiento viral deben ser colectadas en los tres primeros días del inicio de la enfermedad. Deben recolectarse asépticamente 10 ml de sangre total, la cual será transferida a tubos estériles libres de aditivos o preservantes. Los tubos conteniendo la sangre se colocan en hielo o en el refrigerador (4 °C) lo más pronto posible.

Para asegurar óptimas condiciones para el aislamiento, la separación del suero se realiza el mismo día de la toma de la muestra y en forma aséptica. Los tubos con el suero se congelan y almacenan a temperaturas entre -20 y -70°C. El suero debe enviarse lo antes posible al laboratorio transportándolo siempre congelado.

Para el aislamiento del virus a partir de vísceras (bazo, hígado, ganglios), se homogenizan 20g del tejido en 100ml de PBS o medio de cultivo conteniendo 10% de suero de ternera (inactivado por calor) y antibióticos. Posteriormente se centrifugan a 3000 rpm durante 30 minutos a 4°C y se inocula el sobrenadante en las células para aislamiento. Es conveniente realizar una prueba de esterilidad en cada caso.

2.3 Muestras para diagnóstico serológico

Usualmente se toman dos muestras de suero: una en la fase aguda y otra en la fase convalescente. El suero de fase aguda se extrae durante los primeros cinco días de la enfermedad y el de fase convalescente dos a tres semanas más tarde. Para lograr el máximo rendimiento del suero, la sangre recolectada se deja a temperatura ambiente por una hora y a 4°C (en refrigeración) toda la noche, antes de centrifugar. Después de la centrifugación (1000 rpm por 10 min. a 4°C) el suero se transfiere a un tubo previamente rotulado y se congela a -20° C. El envío al laboratorio debe realizarse preferiblemente en congelación (-20 C) o a 4°C.

2.4 Envío y transporte de las muestras

Durante el envío y transporte de las muestras deben observarse las medidas de seguridad elementales para proteger al personal y a las muestras. El suero debe enviarse dentro de 2 contenedores especiales con tapa de rosca aseguradas con papel adhesivo. Pueden agruparse varios tubos con una liga y guardarse dentro de un contenedor plástico o metálico que deberá envolverse con suficiente papel absorbente para evitar el derrame de líquido en caso de que el recipiente se rompa. Cada contenedor debe enviarse en cajas de poliespuma o termos con hielo seco (los tubos no deben ponerse en contacto directo con el hielo seco). De no tener hielo seco pueden utilizarse refrigerantes o hielo corriente. Debe evitarse la congelación y descongelación repetida de las muestras.

Cada contenedor debe tener los siguientes rotulos:

**URGENTE, FRÁGIL, MATERIAL CLÍNICO, MANTENER EN FRÍO
Y EN POSICIÓN VERTICAL**

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

En el momento del envío debe avisarse al laboratorio (por fax, telex o teléfono) de la llegada del mismo para asegurar que sea recogido inmediatamente a su llegada. Es aconsejable que los envíos no lleguen en día sábado, domingo o días festivos.

2.5 Referencias

Centers for Disease Control. Collection, Handling and Shipment of Microbiological Specimens. Atlanta, 1977. DHEW, PUBL. (CDC) 75-8263.

Madeley, C. R. Guide to the Collection and Transport of Virological Specimens, 1977 WHO Geneva.

AISLAMIENTO DEL VIRUS DEL DENGUE

Uno de los sistemas biológicos más empleados en el aislamiento del virus del dengue, a pesar de su baja sensibilidad, ha sido el ratón lactante inoculado por vía intracerebral. También se han utilizado diferentes sistemas celulares de mamíferos incluyendo: células BSC1, VERO, BHK-21, LLCMK2.

En los últimos años se han desarrollado una serie de líneas de mosquitos que han resultado ser mucho más sensibles a la infección por el virus en comparación con los sistemas anteriores. Dentro de las más utilizadas se encuentran las células AP-61, C636, TRA-284. La elevada sensibilidad de estos sistemas, ha permitido alcanzar un alto índice de aislamiento.

Actualmente se emplea con éxito la inoculación intratorácica de mosquitos, sistema que ha demostrado ser el más sensible.

3.1 Ratón lactante

- Inocular por vía intracerebral y subcutánea en ratón lactante (7 ratones por familia) de uno a tres días de nacidos, 0.02 ml. de la muestra pura y diluída 1:10 y 1:50 en medio de cultivo o PBS con antibióticos y 2% de suero de ternero.
- Observar diariamente durante 21 días (debe producirse un cuadro encefálico, aunque en ocasiones hay cepas que no se adaptan y sólo producen cambios ligeros en los ratones como erizamiento del pelo, marcha en punta de patas, entre otros).
- Si se observa cualquier signo de enfermedad debe realizarse un pase en el mismo sistema (para adaptar la cepa) y de ser posible, en otro más sensible. Para realizar el pase, los ratones se desinfectan con alcohol al 70% y se cosechan sus cerebros. Se prepara una suspensión al 10% utilizando medio de cultivo o PBS con 2% de suero de ternero, inactivado por calor. Esta suspensión, así como los cerebros cosechados, pueden almacenarse a -70°C o procesarse inmediatamente.
- La identificación rápida puede hacerse por inmunofluorescencia indirecta (IFI) utilizando líquido ascítico hiperinmune (LAH) y anticuerpos monoclonales (AcM). También puede prepararse un antígeno sacarosa-acetona para identificar por inhibición de la hemaglutinación (IH).

3.2 Inoculación intratorácica de mosquitos

Dada su elevada sensibilidad, la inoculación de mosquitos es el método de elección en el aislamiento del dengue, principalmente en aquellos casos de FHD/SSD. Es conveniente utilizar los anticuerpos monoclonales en la identificación a partir del cerebro del mosquito infectado. En algunos casos puede haber fluorescencia inespecífica, lo que conlleva a resultados

erróneos. Es conveniente confirmar los resultados por otro método como la fijación de complemento (FC).

Entre las especies de mosquitos utilizadas en el aislamiento se encuentran: *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* y *T. amboinensis*. El Dengue no se replica en *Culex quinquefasciatus*. Como vías de inoculación se utilizan la intracerebral y la intratorácica.

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

La zona de inoculación en el mosquito depende del género y la especie, pero generalmente en machos se usa la membrana del cuello y en las hembras el cuello o la sutura debajo del primer espiráculo torácico.

El equipo diseñado por Rosen y colaboradores es de fácil manejo y permite controlar el volumen de suspensión viral a inocular. La parte que más se debe reponer es el capilar-aguja, el cual debe ser aguzado al calor o en un equipo especial. Estos capilares son graduados a distancias de 1 mm lo que corresponde a un volumen de 0.17 μ l.

A partir de la implantación de esta técnica se comenzaron a utilizar mosquitos del género *Toxorhynchites*, que aunque no son vectores debido a que sus estructuras bucales no están acondicionadas para la hematofagia, son excelentes amplificadores de varios arbovirus como el dengue. Al escoger la especie de mosquito para ser inoculada se debe tener en cuenta, que es lo que se quiere aislar o amplificar.

Las principales ventajas del uso de este método son:

- Los mosquitos vivos son más sensibles a la infección que ningún otro método de ensayo.
- No se necesitan grandes recursos ni equipos sofisticados para su empleo.
- La replicación de virus en mosquitos vivos se puede mantener en un rango más amplio de temperatura a diferencia del uso de cultivos celulares.

Materiales

- Capilar aguja: Diámetro exterior 0.7 - 1 mm, diámetro interior aproximadamente 0.5 mm y grosor de la pared 0.2 mm.
- Porta capilar.

- Jeringuilla de 20 cc.
- Tubos de goma.
- Llave de 3 salidas.
- Microscopio estéreo.

Método

- Preparar el sistema de inoculación y materiales a utilizar.
- Colocar los mosquitos en tubo de cristal y dentro de un baño de hielo por espacio de 10-15 minutos.
- Cargar el capilar con la suspensión del material a inocular evitando que el líquido llegue al portacapilar.
- Colocar el mosquito sobre la platina del estéreo para localizar el área de inoculación.
- Introducir aproximadamente 1 mm de la punta del capilar en la zona de inoculación y accionar la jeringuilla de tal manera que deje pasar 1 mm de suspensión viral (0.17 μ l).
- Colocar el mosquito en una pequeña jaula sin tocarlo y sobre ésta colocar un algodón embebido en una solución de sacarosa al 10%.
- La jaula se coloca dentro de una bolsa de plástico transparente como medida de seguridad para evitar el escape de los mosquitos inoculados.
- Los mosquitos deben ser observados a las 24 horas para determinar la mortalidad ocasionada por la inoculación.
- El tiempo para recolectar los mosquitos después de inoculados dependerá del virus o de los propósitos de la investigación.
- La detección viral se puede realizar por medio de las siguientes técnicas: fijación de complemento, inmunofluorescencia, neutralización, ELISA, etc.

3.3 Células de mamífero

El virus dengue es capaz de multiplicarse en varias líneas celulares de mamíferos, como las células BHK21, KB, VERO. No obstante, las más sensibles son las de riñón de mono verde

africano (LLCMK2), útiles no sólo en el aislamiento sino en la identificación, aunque son menos sensibles que las células de mosquitos.

- Inocular 0.5 ml del suero en un frasco de 25 cm con monocapa confluyente, previa decantación del medio. En algunos casos se prefiere diluir la muestra para eliminar el efecto tóxico que pueda producir en las células.
- Incubar a 37°C por una hora y añadir posteriormente el medio de mantenimiento de las células.
- Observar durante siete días la aparición del efecto citopático (ECP), redondeamiento y desprendimiento de las células.
- Congelar y descongelar por tres veces y realizar un pase en el mismo sistema para aumentar el título viral.
- En los casos donde no se observe ECP, puede hacerse de rutina un plaqueo viral o una detección por IFI para saber si se ha multiplicado algún virus.
- La identificación rápida se hace por IFI y la confirmación por neutralización por placas.

3.4 Cultivos de mosquitos

Son las células más sensibles para el aislamiento del dengue. Pueden utilizarse las C636, AP61 y las TRA-284 en este orden creciente de sensibilidad. Cabe señalar que algunas líneas del clono celular C636 se han vuelto menos sensibles a los virus del dengue, sugiriendo que el mismo no es homogéneo. Aún cuando algunas pocas células se infectan, varias cepas no se replican y diseminan al resto de las células lo que influye en la identificación de los virus utilizando anticuerpos monoclonales. Las ventajas de esta línea celular es su facilidad de manipulación y rapidez de crecimiento.

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

La línea celular TRA-284 es la más sensible en el aislamiento del dengue. Son fáciles de manipular y muy económicas ya que crecen en medio libre de suero de ternero fetal aunque su velocidad de crecimiento y *split* no son grandes. Son mayores que las C636 y el tamizaje mediante la IFI es relativamente fácil.

Como método general se inocular la muestra, se espera de 10 a 14 días (observando la posible aparición de ECP) y se realiza la IFI. Esta última se realiza primero como tamizaje

utilizando un pool de sueros humanos positivos o LAH. En los casos positivos se realiza una IFI utilizando AcM específicos a los cuatro tipos de dengue.

En ocasiones, dada la alta especificidad de los AcM, no se puede identificar el virus del dengue, por lo que deben utilizarse diluciones de los LAH a cada uno de los virus del dengue y encontrar el que produce fluorescencia específica a la mayor dilución.

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

3.4.1 Línea Celular C6/36

La línea celular C636 es un clono obtenido de la línea *Aedes albopictus* de Singh (1967), que tiene una alta sensibilidad a los virus del dengue y Chikungunya, aunque en estudios realizados recientemente (Kuno 1985), ha demostrado que resultan menos sensibles en comparación con otras líneas celulares de mosquitos tales como la AP61 y las TRA-284. Aunque algunas cepas de dengue son capaces de producir ECP de tipo sincitial en las C636, este fenómeno no es característico de la línea. Con mucha frecuencia se observa toxicidad en las células a causa de los inóculos empleados.

Medio de cultivo (para 100 ml)

MEM (Earle) 10X	10 ml
STF (inactivado)	10 ml
Aminoácidos no esenciales (100x)	2 ml
Glutamina 200 nM	1 ml

Completar a 100 ml con agua bidestilada y ajustar el pH a 7.2- 7.4. (Este medio puede obtenerse comercialmente de las casas comerciales Gibco y Flow, que ya contienen aminoácidos no esenciales y glutamina y sólo es necesario añadir STF).

Propagación de las células

- Decantar el medio de un frasco Roux con monocapa confluyente.
- Desprender las células en 10 ml de medio de crecimiento de forma tal que el medio caiga perpendicular a la monocapa celular.

- Añadir 1 ml de suspensión celular a cada Roux que contenga de 100-120 ml de medio de crecimiento (*split* 1:10 semanal) 8×10^5 células/ml incubar a 28°C. La monocapa estará completa en cuatro o cinco días.
- Si fuera necesario realizar la inoculación a los tres días de sembradas las células, debe aumentarse la concentración a $2-3 \times 10^6$ cel/ml utilizando para ello un *split* de 1:5-1:6. El medio que se emplea para mantener las células después de inoculadas es igual al medio de crecimiento suplementado con 2% STF.

Congelación

- Vertir 4 ml de medio de crecimiento y 1 ml de STF en un frasco de 10 ml rotulado como #1. Colocarlo en un baño de hielo.
- Vertir 4 ml de medio de crecimiento y 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO) en otro frasco de 10 ml rotulado como #2. Colocarlo en baño de hielo.
- Decantar el medio de una botella Roux (monocapa confluyente).
- Con la pipeta de 5 ml (preferiblemente de punta curva, doblada 90°) extraiga los 5 ml del frasco #1 y desprenda las células del Roux.
- Vierta la suspensión en el frasco #1.
- Añadir con una pipeta de 5 ml el medio del frasco #2 al frasco #1, gota a gota y agitando (siempre en baño de hielo).
- Colocar 1 ml de la suspensión celular ($1-2 \times 10^6$ células/ml) en cada ampolla de congelación y mantenerlas en el baño de hielo. Dejar 0.1 ml para prueba de esterilidad.
- Guardar las ampollas a -20°C durante una hora.
- Pasar las ampollas a una caja de poliespuma y guardarlas a -70°C toda la noche.
- Pase las ampollas a nitrógeno líquido.

Descongelación

- Sacar la ampolla del nitrógeno y colocarla directamente en agua a 37°C (baño de Maria) hasta que se descongele su contenido.
- Con una pipeta de 1 ml extraer el contenido de la ampolla y verterlo en un frasco de 25 ml que contenga 4.9 ml de medio de crecimiento. Incubar a a 28°C.

- Cambiar a las 24 horas el medio por un medio fresco para eliminar el DMSO.
- Cuando la monocapa está completa pasar las células con *split* inicial de 1:5.

Inoculación

- Decantar el medio de un frasco de 25 ml con monocapa celular confluyente.
- Inocular 0.2 ml de una dilución 1:20 de la muestra de suero e incubar por una hora a 28°C. En ocasiones se produce efecto tóxico por lo que es necesario inocular la muestra directamente en el medio contenido en el frasco (añadir 0.2 ml de la muestra a los 4 ml del medio del frasco)
- Observar durante 14 días. Cambiar el medio si se produce efecto tóxico.
- Para la identificación, hacer inmunofluorescencia utilizando anticuerpos monoclonales o LAH. También puede utilizarse el sobrenadante como inóculo para neutralización por reducción de placas.

3.4.2 Células TRA-284

La línea celular TRA-284-SF, es una sublínea de la TRA-284 obtenida por G. Kuno a partir de mosquitos *T. amboinensis*. Crece en medio libre de STF y algunas cepas de dengue pueden producir ECP. Estudios recientes han mostrado que es más sensible para el aislamiento del virus dengue que la AP61 y la C636.

Medio de cultivo

Medio de crecimiento: L-15 + 50 % de Triptosa Fosfato (TBP) al 2.9 %

- Policía de goma
- Dimetilsulfóxido (DMSO)

Propagación de la línea

- Decantar el medio de un frasco de 25 ml.
- Añadir 0.3 ml de medio de crecimiento al frasco.
- Desprender las células con el policía de goma.

- Pipetear delicadamente con pipeta de 1 ml la suspensión celular para disgregar los grumos.
- Añadir 0.1 ml de la suspensión celular a un frasco de 25 ml que contenga 4.9 ml de medio de crecimiento (*split* máximo semanal de 1:3). Incubar a 28°C.
- A las 24-48 horas, si no hay buena adhesión o en los grumos celulares no se observa crecimiento, cambiar la mitad del medio de crecimiento de cada frasco por medio fresco. La monocapa tiene aspecto poroso, y raras veces es completamente confluyente.

Congelación

- Colocar un frasco de 10 ml en baño de hielo.
- Decantar el medio del frasco de 25 ml.
- Añadir 1 ml de medio fresco.
- Desprender las células con el policía de goma.
- Con una pipeta de 1 ml tomar la suspensión celular y ponerla en el frasco sobre el baño de hielo.
- Añadir 0.1 ml de DMSO al frasco en el baño de hielo que contiene la suspensión celular.
- Poner en un ampolla de congelación y guardarla a -20°C.
- Mantener la ampolla en una caja de poliespuma a -70°C durante toda la noche.
- Pasar la ampolla directamente a nitrógeno líquido.

Descongelación

- Sacar la ampolla del nitrógeno directamente a un baño de agua a 37°C hasta que se descongele su contenido.
- Con pipeta de 1 ml sacar el contenido de la ampolla y verterlo en un frasco de siembra de 25 ml que contenga 4.9 ml de medio de crecimiento. Incubar a 28°C.
- A las cuatro horas cambiar la mitad del medio por medio fresco. Tener cuidado de no llevarse las células. Para ello, parar el frasco durante 1-2 minutos y dejar sedimentar las células que aún no se han adherido y sacar el medio de la mitad superior.

- Incubar a 28°C y cambiar nuevamente el 50% de medio a las 24-48 horas.

Inoculación

- Inocular 0.05 ml de la muestra (suero) en un frasco de 25 ml con capa celular casi confluyente al que previamente se le ha quitado el medio de crecimiento.
- Incubar a 28°C por una hora.
- Añadir 3 ml de medio.
- Incubar a 28°C por 10 días. En algunos casos se puede producir ECP.
- La identificación se realiza por medio de inmunofluorescencia utilizando LAH, AcM o neutralización por reducción del número de placas.

3.4.3 Células AP61

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

Materiales

- Medio de crecimiento MMVP/12 o L-15 (ver preparación a continuación).
- Medio de mantenimiento MMVP/12 o L-15.
- Policía de goma.
- Suero de ternero fetal (inactivado a 56°C por 30 minutos).
- Antibióticos.
- Incubadora a 28°C.
- Unidad de filtración.

- **Cristalería preparada para cultivo de tejidos.**

Medios de cultivo

El medio de mantenimiento puede obtenerse comercialmente y está constituido de medio Leibovitz (L-15) al que se agrega caldo triptosa fosfato, suero bovino fetal y antibióticos. Se prepara de la siguiente forma:

- **Filtrar el medio L-15 por membrana 0.22 um.**
- **Realizar prueba de esterilidad.**
- **Suplementar el Medio L-15 base de la siguiente manera:**

Medio L-15

	Crecimiento	Mantenimiento
L-15 (con L-glutamina)	74 ml	84 ml
Triptosa fosfato (TPB)	10 ml	10 ml
STF(inactivado 56°C, 30 min)	15 ml	5 ml

Antibióticos (0.1 ml/100ml total de medio).

Medio MM/VP12

	para 800 ml	para 1,600 ml
NaCl	5,060 mg	10,120 mg
NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	320 mg	640 mg
MgCl ₂ 6H ₂ O	490 mg	980 mg
MgSO ₄ 7H ₂ O	480 mg	960 mg
KCl	320 mg	640 mg
CaCl ₂ 2H ₂ O	260 mg	520 mg
NaHCO ₃	260 mg	520 mg
Glucosa (anhidra)	2,800 mg	5,600 mg

Cloruro de colina	100 mg	200 mg
Inositol	160 mg	320 mg
Hidrolizado de lactoalbúmina (HLA)	5,250 mg	10,500 mg
Albúmina bovina (V)	400 mg	800 mg
Yestolate (extracto de levadura)	2,500 mg	5,000 mg
Glutamina (200 mM)	2.4 ml	4.8 ml
BME vitamina (100x)	8 ml	16 ml
Agua destilada	789.6 ml	1,579.2 ml

Ajustar el pH a 6.8 con KOH 2% (aprox. 2-5 ml.)

Propagación de la línea

Si se aumenta la concentración de células se puede producir una monocapa celular completa en tres días, lista para inocular con el virus. Con las AP61 hay un mejor efecto citopático cuando se siembran en superficies plásticas, por eso se utilizan frascos "Corning" de 25 cm².

La densidad de siembra debe ser de 4x10⁵ células/ml para inocular en dos o tres días y de 1-2x10⁶ células/ml para mantener la línea y pasar semanalmente.

El volumen de medio por frasco de 25 cm² es de 4 ml y el total de células de 1.6x10⁵. El *split* es de 1:10.

- Preparar el medio de crecimiento de acuerdo con el volumen requerido (para propagar la línea se utiliza el medio de crecimiento).
- Eliminar el medio del frasco que se va a pasar y añadir 1 ml de medio MM/VP12 de crecimiento (para un frasco de 25cm²).
- Desprender las células usando un policia de goma.
- Dispersar las células pipeteando varias veces con una pipeta Pasteur o pipeta de 1 ml.
- Si se usa más de un frasco, hacer un pool de células.

- **Contar las células:** usar un volumen de la suspensión de células y añadir un volumen igual de azul de tripán al 0.4 % en solución salina. (Esta dilución de 1:2 debe ser tomada en cuenta en el conteo).
- **Calcular el volumen total de células necesarias de acuerdo con la cantidad de frascos a sembrar.** (Preparar 10 ml extra).
- **Para obtener la monocapa en tres días, sembrar pases bajos de 6×10^5 células/ml y los pases altos a 5×10^5 células/ml.**
- **En la práctica, se toma 0.1 ml de la suspensión celular y se añade a un frasco de 25 ml conteniendo 4.9 ml de medio de crecimiento. Incubar a 28°C. La monocapa debe completarse en una semana.**

Aunque el *split* de la línea es 1:10 semanal, se debe comenzar desde 1:3 después de la descongelación, hasta que la misma esté completamente adaptada a las condiciones del laboratorio.

Congelación

- **Eliminar el medio de un frasco Roux de tres o cuatro días de sembrado con monocapa celular semiconfluente.**
- **Poner 4 ml de medio MM/VP12 y 1 ml de suero de ternera fetal en un frasco de 10 ml (rotular como #1 y poner en baño de hielo).**
- **Poner 4 ml de medio MM/VP12 y 1 ml de DMSO en otro frasco de 10 ml, rotularlo como #2 y ponerlo en baño de hielo.**
- **Vertir los 5 ml del frasco #1 en el Roux y desprender la monocapa con plicia de goma.**
- **Homogenizar la suspensión con pipeta de 5 ml y pasarla al frasco #1 en el baño de hielo.**
- **Con pipeta de 5 ml añadir el medio del frasco #2 sobre el frasco #1 gota a gota y con agitación manual. Mantenerlo en baño de hielo.**
- **Con pipeta de 1 ml dispensar la suspensión celular colocando 1 ml por cada ampolla. Mantener en frío. Dejar 0.1 ml para la prueba de esterilidad.**
- **Guardar las ampollas a -20°C durante 1 hora.**
- **Guardar las ampollas en cajas de poliespuma durante toda la noche a -70°C.**
- **Pasar a nitrógeno líquido.**

Descongelación

- Extraer una ampolla del nitrógeno y descongelarla completamente a 37°C en baño de agua.
- Extraer el contenido de la misma con una pipeta de 1 ml y pasar a un frasco de 25 ml que contenga 4 ml de medio de crecimiento MM/VP12 + 10% de STF.
- Incubar a 28°C y cambiar el medio a las 24 horas.
- Pasar con *split* 1:2 o 1:3 cuando se complete la monocapa.

Inoculación

- Eliminar el medio a los frascos plásticos de 25 ml para inocular.
- Inocular 0.1 ml de suero. Los sueros pueden ser tóxicos para las células, por lo que en ocasiones se prefiere diluirlos a 1:10 ó 1:20. Los sueros hemolíticos frescos, o la sangre congelada son menos tóxicos, pudiendo inocularse 0.2 ml. Las suspensiones de larvas o mosquitos adultos pueden inocularse en volúmenes hasta 1 ml. Si en lugar de frascos de 25 ml se utilizan tubos de cultivo, puede inocularse 0.2 ml de la muestra diluida 1:10 en medio de mantenimiento L-15¹.
- Incubar por 1 hora a 28°C.
- Añadir el medio de mantenimiento L-15 + 10% TPB + STF 2%.
- Incubar a 28°C por 14 días. Generalmente no se necesita un cambio de medio.
- Observar al microscopio diariamente y cambiar el medio si se observa toxicidad.
- El virus del dengue induce ECP de tipo sincitial al cuarto o quinto día de la inoculación. Se observan áreas alargadas de sincitios que en tres o cinco días muestran una fusión completa de la monocapa celular, seguido por retracción y formación de grandes masas de células. Los cultivos que no presentan efecto citopático pueden pasarse de nuevo al 14 día, previa congelación y descongelación.
- Para la identificación se debe guardar una alícuota del sobrenadante a -70°C (para conservar el virus). Hacer un pase en células AP61 utilizando el mismo sobrenadante y fijar las células del frasco para inmunofluorescencia o bien realizar una neutralización

¹La contaminación bacteriana de la muestra puede eliminarse diluyendo la misma en 1-2 ml de medio y filtrando por membrana de 0.22 μ m. Las membranas deben ser pretratadas con PBS + 10 % de STF para prevenir la pérdida de virus.

por reducción de placas o una fijación de complemento utilizando como antígeno el sobrenadante y como antisuero líquidos ascíticos hiperinmunes específicos.

3.5 Referencias

Rosen L. and Gubler D. The use of mosquitoes to detect and propagate dengue viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 23 : 1153-1160, 1974.

Merrill, M. H. and Tenbroeck, C. The transmission of Equine Encephalomyelitis virus by *Aedes aegypti*. *J. Exp. Med.* 62: 687-695, 1935.

Rosen, L. - The use of *Toxorhynchites* mosquitoes to detect and propagate dengue and other arbovirus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30: 177-183, 1981.

Varma MGR, Pudney, M y Leake, CJ.1974. Cell lines from larvae of *Aedes (Stegomyia) malayensis* Colless and *Aedes (S.) pseudoscute-llaris* (Theobald) and their infection with some arboviruses. *Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.* 8:374-382.

Varma, MGR y Pudney, M. 1969. The growth and serial passage of cell lines from *Aedes aegypti* (L.) larvae on different media. *J. Med. Entomol.* 6:432-439.

TITULACIÓN DEL VIRUS DEL DENGUE

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

Recientemente se ha descrito la utilización de las células BHK21 en la técnica de placas (en micrométodo) brindando resultados satisfactorios y rápidos. La misma es útil, no solo en la identificación, sino en la detección de anticuerpos a virus del dengue. Esta línea celular se obtuvo en 1963 a partir de un pool de riñones de hamsters sirios recién nacidos. La misma ha mostrado ser útil para la multiplicación de virus de rabia, adeno y numerosos arbovirus.

4.1 Título del Dengue por micrométodo

Materiales

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

MEM con glutamina 20mM	90 ml
Suero fetal de ternero	10 ml
aminoácidos no esenciales	1 ml
antibióticos	

Ajustar pH a 7.2-7.4 con bicarbonato de sodio 7.5%
- Medio Overlay

STF	10 ml
L-Glutamina	1 ml
Antibióticos	
MEM 2x (MBA) sin Rojo de Fenol	100 ml
Carboximetilcelulosa 3% estéril ²	50 ml

²Carboximetilcelulosa SIGMA # C-4888, viscosidad media: se prepara al 3 % añadiendo 1.5 g a 50 ml de agua bidestilada y dejando que se disuelva a 4°C durante uno o dos días.

■ **Colorante (Naphthol Blue Black/Matheson Coleman y Bell)**

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

Puede almacenarse por largos períodos, no necesita esterilizarse.

- Tubos de dilución (100 x 13mm)
- Pipetas
- Placas de 24 pozuelos
- Puntas amarillas estériles
- Pipetas *Eppendorf* de 100 μ l y 50 μ l
- Incubadora de CO₂
- Agitador

4.1.1 Células BHK21 Cl 15 (Frasco Roux de monocapa completa de cinco o siete días)

- Decantar el medio.
- Lavar las células con PBS (10ml).
- Añadir 10 ml de tripsina-verseno (1:1). Dejar a temperatura ambiente por 3 minutos. Eliminar el medio e incubar durante 5-10 minutos a 37°C (el desprendimiento se hará evidente).
- Añadir 9 ml de medio de crecimiento. Resuspender las células pipeteando vigorosamente (10-15 veces).
- Comprobar que la monocapa esté completamente desprendida.
- Distribuir 3 ml por cada frasco Roux (*split* 1:3 semanal).
- Completar el volumen de cada frasco a 100-120 ml de medio de crecimiento.
- Incubar a 37°C por 5-7 días. Aproximadamente a los 4-5 días la monocapa será confluyente y las células crecerán de forma organizada en remolinos.

Preparación de las células para la titulación

- Calcular el número de células necesarias para la prueba (3.0×10^5 células/ml x 0.5 ml/pozuelo x 24 pozuelos x placa). Hacer una cantidad extra (de un frasco de 75 ml, se obtienen aproximadamente $3-6 \times 10^6$ células). Un frasco de 75 ml de monocapa confluyente (4-5 días) da para 10 placas.
- Decantar el medio y lavar con PBS.
- Añadir 4 ml de tripsina-versene y realizar el desprendimiento como se describió anteriormente.
- Desprender las células en 5 ml de medio de crecimiento.
- Añadir toda la suspensión celular a un frasco de 200 ml de boca ancha que contenga 120 ml de medio de crecimiento. Es suficiente para 10 placas a razón de 0.5 ml/pozuelo.
- Distribuir 0.5 ml de medio con las células en cada pozuelo de las placas. Puede hacerse con pipeta de 5 ml o con jeringuilla Cornwall.

Congelación

- De un frasco Roux con monocapa casi confluyente (3-4 días) desprender las células como se describió anteriormente.
- Colocar la suspensión celular en tubos de centrifuga y centrifugar 3-5 minutos a temperatura ambiente a 1000 rpm.
- Decantar el sobrenadante y resuspender las células en 5 ml de medio MEM + glutamina + aminoácidos no esenciales + 1 ml de STF. Colocar en un frasco rotulado #1 y colocar en baño de hielo.
- Preparar otro frasco que contenga 4 ml del mismo medio (sin STF) pero añadiendo 1 ml de dimetilsulfóxido. Colocarlo sobre el baño de hielo. Rotular con el #2. Comprobar que ambos frascos tienen bien mezcladas sus soluciones.
- Con una pipeta de 5 ml tomar el medio del frasco #2 y añadir lentamente, gota a gota y agitando, el contenido del frasco #2 en el #1. Siempre en baño de hielo.
- Distribuir 1 ml de la suspensión (aproximadamente 1×10^5 células/ml) por ampolla (siempre en frío). Dejar 0.1 ml para la prueba de esterilidad.
- Guardar durante 1 hora a -20°C .

- Colocar las ampollas en una caja de poliespuma y guardar a -70 C por 24 horas. Pasarlas después a nitrógeno líquido.

Descongelación

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

Título de dengue en células BHK-21

- Preparar un grupo de tubos marcados de 0 a 10, dependiendo del título viral sospechado.
- Pipetear asépticamente 0.9 ml del diluyente (medio Hank's + 0.5% STF) en cada uno de los tubos. Mantener en hielo.
- Descongelar rápidamente un vial del virus (preferiblemente a 37°C). Transferir 0.1 ml del virus al primer tubo con diluyente.
- Mezclar vigorosamente en el agitador.
- Transferir con una pipeta nueva 0.1 ml de la dilución de virus 10 al siguiente tubo y así sucesivamente.
- Marcar las placas tomando tres pozuelos por cada dilución de virus como mínimo.
- Dejar las diluciones virales por una hora a 37°C en baño de agua.
- Inocular 50 µl de cada dilución viral a las células.
- Incubar por cuatro horas a 37°C en incubadora de CO₂ 5%.
- Añadir 0.5 ml de medio con CMC.
- Incubar a 37°C por siete días (cinco para el dengue 2) en incubadora de CO₂ 5%.

- **Descartar el medio. Lavar suavemente con agua de la pila. Teñir las células con azul negro de naftol (NBB), 0.5 ml por pozuelo. Después de 10-15 minutos, lavar de nuevo con agua. Las placas pueden ser contadas inmediatamente o cuando se sequen.**

NEUTRALIZACIÓN POR REDUCCIÓN DE PLACAS

5.1 Procedimiento

- Preparar las diluciones de los sueros a probar en PBS pH 7.9 con 0.5% de gelatina. Esto puede ser realizado previamente y mantener las diluciones a 4°C.
- Preparar las diluciones de trabajo del virus que contengan aproximadamente de 15 a 20 ufp/50µl. Para esto se prepara una dilución de trabajo de 40 ufp/50µl, para que cuando se mezclen con el suero de las 20 ufp.
- Calcular el volumen de virus necesario de la dilución de trabajo multiplicando el número de sueros a probar más los controles por 100µl.
- Realizar la mezcla de virus-suero en placas de 96 pozuelos. Cada pozuelo en la placa de 96 pozos, contendrá una mezcla de virus-suero en cantidad suficiente para inocular tres pozuelos de la placa de 24 pozos. Por tanto, cada pozo de la placa de 96 será probado en triplicado en la placa de 24. Incluir en esta placa como mínimo dos pozuelos con el virus control y dos con una dilución del control de virus de 1:10 y dos de 1:100. Colocar la placa sobre hielo.
- Añadir 100µl de la dilución de trabajo del virus y a los pozos controles de la forma siguiente:

Control de virus	100µl de la dilución de virus
1:10	100µl de la dilución de 1:10
1:100	100µl de la dilución de 1:100
Control de células	100µl de PBS

- Utilizar una pipeta *Eppendorf* de 100µl, añadir 100µl de cada suero o de las diluciones de suero a probar. Mezclar 5 veces.
- Cubrir la placa y mantener a 37°C por una hora.
- Marcar las placas de 24 pozuelos y añadir 0.5 ml de la suspensión de células BHK21
- Incubar las células por una hora en incubadora de CO₂ al 5% y a 37°C.
- Inocular 50 µl de la mezcla virus-suero a cada pozuelo (por triplicado).
- Incubar por cuatro horas a 37°C en atmósfera de CO₂.
- Añadir a cada pozuelo 0.5 ml del medio *overlay*.

- Incubar a 37°C en CO₂ por siete días (cinco para el virus Dengue 2)
- Teñir las placas de la misma forma como se describió en titulación viral.

5.2 Lectura de placas

Para conocer el título de un virus se aplica la siguiente formula:

$$P \times 20 \times 10 = \text{UFP/ML}$$

donde:

P = promedio del número de placas obtenido en la dilución donde se realizó el conteo.

20 es el volumen del inóculo

10 es el factor de dilución

Ejemplo:

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

*NC = no contables

Título: $3 \times 20 \times 10 = 6.0 \times 10$ ufp/ml

- Cálculo de la dilución de trabajo viral a utilizar:

Generalmente se necesita una dilución que contenga aproximadamente 30-40 ufp/0.05 ml. Si el título viral después de una hora de incubación a 37°C es de 8×10 ufp/ml (equivalente a 4×10 ufp/0.05), es decir que una dilución de 4×10 contendría 1 ufp/0.05 ml, así una dilución de 10 contendría 4 ufp/0.05 ml y una dilución 10 contendrá 40 ufp. Por tanto la dilución de trabajo sería 10.

La manera más fácil de calcular la dilución de trabajo es observar el número de placas en la placa de titulación y tomar una dilución dos veces por debajo de la que muestra el número ideal de placas.

- Para calcular el punto final del 50% de reducción de placas:
 - Calcular el promedio del número de placas en el control de virus, o en su lugar, en el control de virus con suero negativo.
 - Calcular el porcentaje de reducción de placas para cada mezcla virus-suero en relación con el promedio del virus control.

Ejemplo:

VC:	20	20	20	promedio:	20
suero:	6	4	5		5
$5/20 = 25\%$ $100\% - 25\% = 75\%$ de reducción					

Para conocer el título de anticuerpos de un suero se pueden utilizar dos métodos:

- El suero se prueba a una dilución específica frente a una dilución constante de virus. En este caso se obtiene el porcentaje de reducción de placas a la dilución utilizada de suero, lo que indica si el suero tiene o no anticuerpos (% de reducción). Se consideran positivo si se reduce por lo menos en 50%.
- El suero se prueba en varias diluciones frente a una concentración constante de virus, esto nos permite conocer el título de anticuerpos del suero. Para cada dilución de suero se encuentra el porcentaje de reducción del número de placas. Estos datos se llevan a papel semilogarítmico para encontrar la dilución que reduce en un 50% el número de placas, la que representa el título del suero. Este método se utiliza también para identificar virus, para lo cual se pone el virus en cuestión a una concentración constante conocida frente a diluciones de un suero hiperinmune conocido.

En la neutralización puede utilizarse el método de diluciones variables de virus frente a diluciones constantes de suero. La dilución de virus que infecta el 50% del hospedero se considera el punto final. Los resultados obtenidos se comparan con el título del virus solo y se determina el índice de neutralización. Una diferencia de por lo menos dos en el logaritmo de 10 se considera como una neutralización significativa. Este método puede ser utilizado para identificar virus (frente a un suero hiperinmune conocido a una dilución constante) o para conocer diferencias en el título neutralizante entre un suero agudo y uno convalesciente.

El método de neutralización de dilución variable de virus con dilución variable de suero debe ser utilizado con cautela. En este caso no se conocen los títulos del virus o del antisuero,

por lo que se hacen diluciones variables de ambos y se combinan. Dada su complejidad no se utiliza en la práctica.

PREPARACIÓN DEL ANTÍGENO: MÉTODO 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 que proporciona antígenos estables con títulos altos.

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

Este método rinde antígenos hemaglutinantes y fijadores del complemento por lo que pueden utilizarse en 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. La relación entre las concentraciones de sacarosa, cerebro, acetona y agua parecen ser críticas en el rendimiento viral.

Es importante destacar que los antígenos obtenidos son infectivos por lo que la manipulación debe realizarse guardando las normas de seguridad.

Materiales

Equipo

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

Reactivos

- Sacarosa
- Acetona (calidad reactiva, en frascos de cristal) 4°C
- Solución Borato Salina pH 9 (BS)
- Tris (*hydroxymethyl aminomethane*, Gibco 130910)
- Beta propiolactona (BPL) (Betaprone, Fellows Testagar, Detroit, Michigan)

- Alcohol 70%

6.1 Procedimiento para la extracción del antígeno

6.1.1 Inoculación de cerebros de ratón

- Inocular por vía intracerebral los ratones lactantes de uno o dos días de nacidos con 0.02 ml de una suspensión de cerebro de ratón infectado. 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. En lugar de PBS, puede usarse Medio 199 u otro.
- Examinar los ratones inoculados por lo menos dos veces al día en búsqueda de los signos de la enfermedad. Cuando la mayoría de los ratones estén enfermos deben congelarse, preferiblemente a -70°C, hasta su uso.
- Un día antes de la extracción, dejar los ratones toda la noche a 4°C para que se descongelen. Desinfectarlos con alcohol al 70% y dejar secar. Extraer asépticamente por aspiración cada cerebro y colocarlos en un frasco con hielo. Si no se va a continuar el procedimiento el mismo día, guardar los cerebros extraídos a -70°C.

6.1.2 Extracción del antígeno

El antígeno se prepara asépticamente, preferiblemente en un gabinete de seguridad grado 2. 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 (en frío) en 3 ciclos de un minuto permitiendo al material sedimentar entre cada ciclo.
- Añadir la suspensión de cerebro a 20 volúmenes de acetona fría evitando que la misma se hidrate. Utilizar para esto una aguja #18 larga sumergida en la acetona. Este proceso debe realizarse lo más rápido posible.
- 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. Previamente romper el precipitado con un agitador de vidrio. Dejar sedimentar el antígeno y reposar en baño de hielo durante 1.5 horas.
- Aspirar la acetona y transferir el antígeno a un frasco de secado (kitasato). Finalizar la aspiración de la acetona.

- Secar el antígeno utilizando una bomba de vacío durante aproximadamente una hora.
- Rehidratar con buffer tris-borato salina usando 0.4 volúmenes del homogenizado de cerebro-sacarosa. (El tris se prepara al uno molar en cloruro de sodio al 0.85% y posteriormente se lleva a 0.1 M en buffer borato-salina pH 9, verificar el pH).
- Dejar rehidratando toda la noche a 4°C.
- Centrifugar por 30 minutos a 4°C a 3,000 rpm.
- Para inactivar el antígeno añadir BPL (1% en borato salina pH 9) para una concentración final de 0.1%. Agitar bien y mantener a 4°C durante 24 horas.
- Distribuir en alícuotas para guardar a -70°C o para liofilizar y guardar a -20°C³.
- Verificar si la inactivación fue efectiva inoculando con el antígeno inactivado por vía intracerebral dos familias de ratones lactantes.
- Para los virus del dengue la concentración de BPL de 0.1% es crítica ya que concentraciones mayores reducen la actividad del antígeno.
- Durante el proceso de extracción deben reenvasarse varias ampollas conteniendo cerebro de ratón en suspensión al 10% (en PBS o medio de cultivo con 5% de suero de ternera y antibióticos) las cuales se guardan a -70°C y sirven como virus "semilla" para el pase en ratones, así como para el mantenimiento del virus.

6.2 Referencias

Clarke, D.H. and Casals, J. 1958. Techniques for Hemagglutination and Hemagglutination-Inhibition with Arthropod-Borne Viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 7: 561-573.

Hammon, W.Mc.D. and Sather, G.E. Arboviruses. In, *Diagnostic Procedures for Viral and Rickettsial Infections. Fifth Edition*, 1979.

³Los antígenos elaborados por el método sacarosa acetona que fueron almacenados a -70°C sin liofilizar, deben descongelarse la noche anterior a su uso y mantenerse a 4°C. De forma similar, aquellos antígenos que fueron liofilizados, deben rehidratarse la noche anterior y mantenerse a 4°C hasta ser utilizados.

HEMAGLUTINACIÓN

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 contra 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 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.

7.1 Materiales y reactivos

Equipo

- Centrífuga refrigerada
- Equipo de microtitulación
- Placas desechables en fondo U
- Goteadores de 0.025 y 0.050 ml; peras de goma y filtros.
- Asas dilutoras de 0.025 ml, porta dilutores

Reactivos

- 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. Inmediatamente después de extraerlos, colocar en solución de Alsever.

■ **Solución de Alsever**

Dextrosa	20.5 g
NaCl	4.2 g
Acido cítrico ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)	0.55 g
Citrato de sodio($Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$)	8.0 g
H ₂ O destilada (completar hasta)	1,000 ml

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

■ **Cloruro de sodio 1.5 M (87.6 g en 1,000 ml de agua)**

■ **Fosfato dibásico de sodio ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) 0.5 M (178.0 g en 1,000 ml de agua; sin anhídrido, 70.59g/1,000ml)**

■ **Fosfato monobásico de sodio ($NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$) 1 M (156.02 g en 1,000 ml de agua; sin anhídrido, 120g/1000ml)**

■ **Soluciones stocks⁴:**

Solución A (pH 8.8)

NaCl(1.5M)	100 ml
Na_2HPO_4 (0.5M)	400 ml
Agua hasta completar	1,000 ml

Solución B (pH 4.3)

NaCl(1.5M)	100 ml
NaH_2PO_4 (1.0M)	200 ml

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

Agua hasta completar 1,000 ml

Cuadro de Valores de pH

Diluciones de ajuste para los diferentes pH con los que se diluyen los glóbulos de ganso.

pH	Solución A	Solución B
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

- Acido bórico 0.5 M
- Solución borato salina, pH 9

Soluciones stocks para buffer borato-salina, pH 9:

NaOH(1.0M) 40.02 g llevar a 1,000 ml con agua
 BO₃H₃(0.5 M) 30.912 g llevar a 1,000 ml con agua
 NaCl(1.5 M) 87.6 g llevar a 1,000 ml con agua

Buffer borato-salina:

NaCl(1.5 M) 80 ml
 BO₃H₃(0.5 M) 100 ml
 NaOH(1 M) 24 ml

Completar a 1,000 ml con agua destilada y ajustar el pH a 9. No debe usarse después de 30 días.

- Albúmina bovina (fracción V) al 0.4 % en buffer borato-salina (BABS), pH 9. (0.8 g de albúmina bovina en 200 ml de buffer borato-salina pH 9. Ajustar el pH a 9 (con NaOH 2N). Puede prepararse una solución al 4% en 100 ml y filtrar⁵ por "millipore" y guardarse en frío hasta su uso. Para usarla, diluir⁶ 10 veces en buffer borato-salina pH 9. Una vez diluída, debe utilizarse en una semana y mantenerse a 4°C.
- Kaolín (lavado en ácido) al 25% en buffer borato-salina (Merieux para diagnóstico de Rubeola).
- Antígenos (preparados por el método sacarosa-acetona).

7.2 Procedimiento

7.2.1 Preparación de los glóbulos rojos de ganso

- Extraer la sangre estérilmente (1 parte de sangre y 4 de Alsever). Usar una aguja # 20. Filtrar por gasa estéril.
- Lavar las células tres veces en solución salina (0.9 g de NaCl en 100 ml. de agua) o PBS centrifugando en un tubo de fondo redondo y posteriormente en tubo de fondo cónico a 1000rpm por 10 minutos a 4°C.
- Guardar a 4°C hasta su uso.
- Para la técnica, preparar una solución al 0.5 % en los buffers de diferentes pH previamente ajustados.

7.2.2 Tratamiento de los sueros con kaolín

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

- Tomar 0.1 ml de suero.
- Añadir 0.4 ml buffer salina-borato pH 9 (el suero queda diluído 1:5).
- Añadir 0.5 ml de kaolín previamente agitado.
- Agitar.

⁵El filtro se esteriliza en autoclave por 35 minutos, 115°C. Pueden usarse membranas de 0.22 o 0.45 µm.

⁶Las diluciones de antígenos y sueros se preparan con albúmina bovina 0.4%.

- Dejar a temperatura ambiente por 20 minutos con agitación ocasional.
- Centrifugar a 2,500 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- El suero queda diluído 1:10.

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

- Preparar una suspensión de glóbulos rojos de ganso al 50% en solución salina.
- Añadir 0.025 ml de la dilución anterior al suero ya tratado y agitar.
- Mantener a 4°C durante 20 minutos con agitación ocasional.
- Centrifugar a 1,500 rpm por 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.

7.2.3 Hemaglutinación

- Hidratar los antígenos liofilizados y mantenerlos a 4°C por lo menos una hora, pero preferiblemente toda la noche
- En placas de 96 pozoso previamente rotuladas, preparar diluciones seriadas (al doble), con los diferentes pH de trabajo (el pH óptimo para el antígeno es el valor superior e inferior). De no conocer el pH óptimo de cada antígeno, titular 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 fila.
- Hacer diluciones al doble comenzando por el primer pozuelo y utilizando para ello las asas dilutoras de 0.025 ml.
- Agitar la placa.
- Añadir 0.025 ml de la solución de 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 más alta dilución de antígeno que muestra aglutinación completa (título del antígeno). El pH óptimo es aquel donde el título del antígeno es mayor. Para la IHA se utiliza una dilución de antígeno que contenga de cuatro a ocho unidades por 0.025 ml:

Si el título del antígeno es 1:2,560, entonces

2,560	1 unidad HA
1,280	2 unidades HA
640	4 unidades HA
320	8 unidades

Por tanto, debe prepararse una dilución del antígeno de 1:320 que dará las ocho unidades HA/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 ocho unidades HA.

7.3 Lectura de resultados

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

8.1 Procedimiento

- 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 cuatro, ocho o 12 diluciones de los mismos contra el antígeno (esto dependerá 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 al mismo tiempo.
- 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 las asas dilutoras.
- Añadir a cada pozuelo 0.025 ml de la dilución de antígeno que contiene ocho unidades hemaglutinantes.
- Agitar y dejar reposar a temperatura ambiente durante 45 minutos.
- Añadir 0.05 ml de glóbulos rojos diluídos en el pH óptimo para el virus.
- Agitar y dejar reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos.

8.2 Lectura de resultados

La inhibición de la hemaglutinación presenta un patrón de no hemaglutinación. El título inhibitor 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, por ejemplo: 1:160. Como el patrón de aglutinación puede cambiar con el tiempo, el punto final puede ser marcado sobre la placa con un marcador tan pronto como se forme.

8.3 Controles⁷

- Control de glóbulos rojos de ganso (permite detectar aglutinación inespecífica de las células en ausencia de suero y antígeno); sólo contiene BABS y glóbulos rojos.

⁷En 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 con los virus que circulen en el área.

- 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 ó 1:20 y glóbulos rojos.
- Control de las unidades hemaglutinantes del antígeno.

8.4 Interpretación de los resultados

Para el diagnóstico deben utilizarse sueros pareados, ya que los monosueros no son útiles. 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:

8.4.1 *Negativa*

Sin niveles detectables de anticuerpos en las muestras.

8.4.2 *Positiva*

Respuesta primaria: cuando el individuo se pone en contacto por primera vez con alguno de los serotipos.

Respuesta monotípica: cambio de cuatro o más veces en el título de anticuerpos a uno de los serotipos del dengue.

Respuesta heterotípica: cambio de cuatro o más veces en el título de anticuerpos a varios serotipos del dengue y otros flavivirus. Según la OMS, los títulos de anticuerpos no deben exceder de 1:1,280 en una respuesta primaria.

Infeción secundaria: cuando el individuo se pone en contacto por segunda vez con otro serotipo del dengue.

Infeción actual: cambio de cuatro o más veces en el título de anticuerpos a dos o más serotipos. Según la OMS, títulos mayores de 1:1,280).

Títulos estables: los títulos de anticuerpos de 1:20 a 1:160 a uno o más flavivirus sin un aumento de cuatro veces sugiere una infección en el pasado y no necesariamente una infección actual, por lo que deben considerarse negativos.

Casos inconclusos: cambios en el título de anticuerpos de 1:10 a 1:20 a uno o más antígenos del dengue (es aconsejable tomar una tercera muestra en la fase convalescente).

8.5 Referencias

Casoslarke, D.H.y Casals, J.1958 . Techniques for Hemagglutination and Hemagglutination-Inhibition with Arthropod-Borne Viruses. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 7:561-573.

Shope, R.F. y Sather G. E. Arboviruses. In: Diagnostic procedures for viral, rickettsial and chlamydial infections. Fifth Edition. New York: American Public Health Association, 1979.

FIJACIÓN DEL COMPLEMENTO

La técnica de Fijación del Complemento (FC), se fundamenta en la reacción antígeno-anticuerpo específicos donde además interviene un tercer elemento, el complemento, que normalmente se encuentra en el suero sanguíneo. Para que el sistema antígeno-anticuerpo-complemento se encuentre asociado, debe presentar la homología antígeno-anticuerpo correspondiente y además poseer la propiedad de fijar el complemento presente en el medio donde se encuentran las cantidades apropiadas de cada componente. Para detectar la presencia de complemento libre se emplea un sistema indicador formado por glóbulos rojos de carnero y hemolisina (anticuerpos anti-hematíes de carnero). Este sistema hemolítico fija el complemento libre y produce lisis de los eritrocitos de carnero lo que se hace visible a simple vista.

Si el antígeno y el anticuerpo no son específicos o si alguno de ellos está ausente, el complemento se encontrará libre para unirse a los eritrocitos de carnero sensibilizados dando como resultado la lisis de estos. Si no hay complemento libre, se observa la formación del botón de hematíes. Por lo tanto, una reacción de fijación del complemento positiva es aquella donde no hay hemólisis mientras que en una negativa si hay hemólisis.

Todos los reactivos utilizados (complemento, hemolisina, antígenos), deben ser titulados para determinar las condiciones óptimas de fijación y se emplean en las proporciones correspondientes. Un exceso de complemento puede dar falsos negativos; por el contrario si hay defecto puede dar falsos positivos.

Los glóbulos de carnero deben ser sensibilizados con las cantidades óptimas de hemolisina. Otros factores que pueden afectar la prueba y deben ser controlados son la concentración iónica, pH, volumen total de los reactivos, cantidad de glóbulos rojos, concentración de calcio y magnesio (sin los cuales el complemento es inactivo), temperatura y tiempo de incubación.

Para que la prueba sea válida deben incluirse los controles necesarios:

- **Control de suero:** Algunos sueros son anticomplementarios, es decir, fijan el complemento inespecíficamente. La causa puede ser por contaminación bacteriana, presencia de lípidos o de agregados de gamma globulina, almacenamiento prolongado, adición de compuestos que contengan calcio y magnesio, entre otros.
- **Control de antígeno:** Algunos antígenos son anti-complementarios, particularmente aquellos obtenidos de órganos infectados. Por lo tanto, debe utilizarse un control de antígeno normal obtenido en igual forma.
- **Control de complemento y de glóbulos rojos:** Todos los sueros deben ser inactivados ya que pueden contener complemento, lo que alteraría los resultados.

Esta técnica puede ser utilizada para detectar la presencia de anticuerpos como antígenos.

9.1 Equipo y Reactivos

Equipo

- Centrífuga
- Equipo de microtitulación
- Placas de fondo U
- Goteadores de 0.025 y 0.05 ml.
- Asas dilutoras de 0.025 ml.
- Baño de agua.

Reactivos

- Buffer de Veronal
- Solución de Alsever
- Complemento de cobayo
- Hemolisina
- Antígenos
- Líquidos ascíticos hiperinmunes (LAH)

9.2 Preparación de reactivos

9.2.1 *Buffer Veronal/ Solución de Veronal 5x⁸*

Agua hirviendo	200.00 ml.
Acido 5-5 dietilbarbitúrico	2.75 g.
5-5 dietilbarbiturato de sodio	1.87 g.
Cloruro de sodio (NaCl)	42.50 g.
Completar con agua hasta	1,000 ml

Añadir:

MgCl ₂ .6H ₂ O	0.84 g.
CaCl ₂	0.14 g.

Ajustar el pH a 7.2-7.4. Esterilizar en autoclave a 0.6 atm por 5 minutos. Conservar a 4°C.

9.2.2 *Solucion de Alsever*

Ver Complotto en la página 38.

9.2.3 *Complemento de Cobayo*

El complemento se puede obtener comercialmente liofilizado o puede ser preparado en el laboratorio siguiendo el siguiente procedimiento:

- Realizar punción cardíaca a un cobayo ligeramente anestesiado para obtener 10 ml de sangre (pueden usarse seis cobayos machos de 250-300 g).
- Obtener el suero en frío y probar la actividad del complemento.
- Distribuir en volúmenes de 1 ml y guardar a -70°C o liofilizado (no se debe añadir preservante). El proceso completo no debe durar más de ocho horas y durante el mismo el complemento debe estar en frío ya que es termolábil.

⁸Cuando se vaya a utilizar diluir 1:5 (1 veronal + 4 H₂O destilada).

9.2.4 Hemolisina (anti-glóbulos de carnero preparados en conejo)

La hemolisina usualmente se prepara inmunizando conejos con glóbulos rojos de carnero lavados. La inmunización con estromas de glóbulos rojos produce hemolisina de una mayor actividad.

- Mezclar 1 litro de sangre de carnero en 250 ml de citrato de sodio bihidratado al 3.8%, agitando continuamente.
- Filtrar la sangre a través de gasa y centrifugar a 4°C para sedimentar los glóbulos rojos. Lavar con 1-2 volúmenes de solución salina.
- Acidificar 10 l de agua destilada fría con 4 ml de ácido acético glacial y agregar lentamente el paquete de glóbulos mezclando vigorosamente durante 10 minutos.
- Dejar en reposo a 4°C durante toda la noche.
- Decantar el sobrenadante y transferir el estroma de glóbulos a seis frascos de centrífuga de 250 ml como mínimo.
- Centrifugar durante 15 minutos a 4°C y 2,000 rpm. Extraer el sobrenadante.
- Lavar el estroma cuatro o cinco veces con buffer de acetato de sodio 0.001 M, pH 5, frío y centrifugar en frío a 2,000 rpm durante 15 minutos.
- Resuspender el estroma en igual volumen de cloruro de sodio 0.15 M frío y pasarlo a ocho frascos de centrífuga.
- Centrifugar durante 20 minutos a 4,000 rpm y 0°C en una centrífuga de ángulo fijo.
- Lavar dos veces con cloruro de sodio frío.
- Resuspender en cloruro de sodio 0.15 M a un volumen aproximado de 300-400 ml.
- Transferir la solución a un erlenmeyer cerrado con tapón de algodón y agitar durante una hora a 100°C en baño de agua.
- Colocar aún caliente en un agitador y mantener la agitación hasta obtener una suspensión bien dispersa (fina y homogénea).
- Determinar la concentración de proteína (micro Kjeldahl) y hacer una suspensión de 1 mg de nitrógeno por mililitro utilizando solución salina estéril.
- Agregar mertiolato como preservante a una concentración final de 1:10,000 P/V.

El esquema de inmunización en conejo puede ser el siguiente:

Primera inmunización	0.1 ml
Cinco inmunizaciones	1 ml
Cinco inmunizaciones	2 ml

El animal se inmuniza por vía intravenosa con un total de 11 dosis que cubrirán un período de casi dos semanas, sin dejar pasar más de 2 días consecutivos.

Desangrar al cuarto o quinto día de la última inmunización⁹ y obtener el suero inactivándolo por calor a 56°C por 30 minutos. Guardar en alicuotas a -20°C.

Antígenos: Se utilizan los antígenos extraídos por el método de sacarosa-acetona y deben incluirse antígenos normales preparados en la misma forma.

Líquidos ascíticos hiperinmunes: Se obtienen mediante inoculaciones seriadas de una suspensión de virus en ratones adultos utilizando sarcoma 180.

9.3 Titulación de la hemolisina

Para titular la hemolisina se prepara una solución 1/100 en veronal (1X) y a partir de ésta se prepara una dilución 1/1,000 para hacer diluciones seriadas de 1/2,000 hasta 1/10,000¹⁰.

1/2,000 (1+1)	1 ml de hemolisina 1/1,000 + 1 ml veronal
1/3,000 (1+2)	
1/4,000 (1+3)	
1/5,000 (1+4)	
1/6,000 (1+5)	
1/7,000 (1+6)	
1/8,000 (1+7)	
1/9,000 (1+8)	
1/10,000 (1+9)	

⁹Es aconsejable obtener una pequeña muestra de sangre antes de sangrar al animal para conocer el título de hemolisina obtenido. Pueden realizarse una o dos inmunizaciones más si el título es bajo.

¹⁰De acuerdo con el volumen final pueden trabajarse la mitad de las cantidades.

La última dilución depende del título posible de la hemolisina. Si se quiere determinar con mayor exactitud el título se puede trabajar con diluciones intermedias. Por ejemplo 1:2,500).

- Tomar 0.1 ml de cada dilución de hemolisina y pasarla a otro tubo.
- Añadir 0.4 ml de veronal (1x) por cada tubo anterior, 0.1 ml de la suspensión de eritrocitos al 2% en veronal y 0.1 ml de complemento diluído 1:30 en veronal (0.5 ml de complemento + 14.5 ml de veronal).
- Agitar los tubos y ponerlos en baño de agua a 37°C por 30 minutos.
- La mayor dilución donde ocurre lisis total representa el título de la hemolisina. Por ejemplo: lisis en el tubo 8, título de hemolisina = 1:8,000

9.4 Preparación del sistema hemolítico

Después de obtener el título de hemolisina se prepara una dilución de cuatro unidades a partir de la solución original de hemolisina 1:100.

Por ejemplo: título	1:8,000	1 unidad
	1:4,000	2 unidades
	1:2,000	4 unidades

El sistema hemolítico se prepara mezclando volumen a volumen una dilución que contenga cuatro unidades de hemolisina más una suspensión de eritrocitos al 2% en buffer veronal (1x).

Por ejemplo: Si el título de la hemolisina es 1:7,000 y necesitamos preparar 50 ml de hemolisina para un volumen total del sistema hemolítico de 100 ml:

1:7,000	1 unidad
1:3,500	2 unidades
1:1,750	4 unidades

Partiendo de la dilución 1:100 de hemolisina se necesita una de hemolisina más 16.5 de veronal. Pero para el volumen necesario deben prepararse 3 ml de hemolisina 1:100 + 49.5 ml de veronal desechando lo que sobre. Para conocer el volumen total necesario debe tenerse en cuenta que una placa consume 5 ml; por tanto si fueran 10 placas se necesitan 50 ml de sistema hemolítico (25 de hemolisina más 25 de glóbulos rojos de carnero al 2%).

9.5 Titulación del complemento

A partir de una dilución de complemento 1:30 (0.5 ml de complemento más 14.5 ml de veronal) preparar las siguientes diluciones:

# Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Complemento	2.0	1.6	1.4	1.2	1.0	0.8	0.7	0.6	0.4	0.2
Veronal	1.0	1.4	1.6	1.8	2.0	2.2	2.3	2.4	2.6	2.8
Y	0.2	0.16	0.14	0.12	0.1	0.08	0.07	0.06	0.04	0.02

El título del complemento se hace en presencia de algunos sueros controles para determinar la actividad anticomplementaria de los mismos. Para esto se escogen algunos sueros de los que se van a probar.

- Pasar 0.3 ml de cada una de las diluciones anteriores de complemento a un tubo (el número de tubos depende del número de sueros controles donde se va a probar la actividad anticomplementaria).

Por ejemplo: 3 sueros controles serán 3 hileras de tubos. Los sueros se diluirán 1/8 en buffer veronal (1x). Debe incluirse también un control de veronal, por lo tanto son, 4 hileras de tubos.

- Agregar 1 ml de cada suero control a cada hilera de tubos.
- Poner en baño de agua a 37°C por una hora.
- Agregar a cada tubo 0.2 ml del sistema hemolítico (previamente debe haberse calentado a 37°C).
- Dejar a 37°C por 30 minutos.
- Observar hasta donde ocurrió lisis en las cuatro hileras de tubos

hilera # 1: lisis tubo 9
 # 2: lisis tubo 8
 # 3: lisis tubo 9
 # 4: lisis tubo 6

En este caso se toma como media el tubo ocho para preparar la dilución de trabajo del complemento utilizando la siguiente fórmula:

$$X = 0.1 (30)/Y (2)$$

donde: 2 y 0.1 son constantes
 y = valor correspondiente de complemento de acuerdo con la tabla anterior (se obtiene de acuerdo al tubo escogido, el de mayor lisis)
 30 representa la dilución original de complemento utilizada

Ejemplo: Si se toma el tubo 8, Y será, de acuerdo con la tabla, 0.06 por lo que:

$$X = 0.1 (30)/0.06 (2) = 25$$

$$X = 25$$

Por lo tanto, deberá usarse en la prueba una dilución de complemento de 1:25 (1 ml de complemento puro¹¹ + 24 ml de veronal).

9.6 Fijación del complemento

- Diluir la solución de veronal 1:5 en agua destilada.
- Recolectar la sangre de carnero en Alsever y lavar tres veces en solución salina (la sangre que no se use debe mantenerse en Alsever estéril).
- Preparar una suspensión de eritrocitos al 2% en veronal.
- Titular la hemolisina y preparar el sistema hemolítico.
- Preparar una dilución 1:8 en veronal de cada uno de los sueros que se van a probar e inactivar a 56°C por 30 minutos (si son sueros humanos) o a 60°C por 20 minutos (si son sueros de animales). Para cada suero se prepara la dilución 0.1 ml de suero más 0.7 ml de veronal. En el caso de los sueros que se utilicen como controles en el título del complemento puede prepararse mayor cantidad (0.3 + 2.1).
- Titular el complemento.
- Preparar las placas con los sueros:

¹¹El volumen total de complemento a preparar dependerá del número de placas a usar.

- Agregar 50 μ l de las diluciones de suero en el primer pozuelo y agregar en el resto de los pozuelos 25 μ l de veronal. Diluir cada suero desde 1:8 (dilución original hasta 1:1024, deben incluirse en la prueba LAH positivos y negativos como controles a iguales diluciones que los sueros problema).
- Agregar en cada pozuelo 25 μ l de complemento (diluido de acuerdo con el título previo). Agregar a cada pozuelo 25 μ l de antígeno (la dilución del antígeno puede ser de 1:8 o 1:16 de acuerdo con el título hemaglutinante del mismo y se diluye en veronal).

Títulos del antígeno: \geq 1:128 diluir 1:16

< 1:128 diluir 1:8

En caso de duda es recomendable trabajar cada suero a tres diluciones de antígeno (1:8, 1:16, 1:32). Si se quiere establecer una comparación entre antisueros y antígenos de diferentes virus debe realizarse una titulación cruzada simultánea.

9.6.1 Controles

Además de las placas de los sueros, se preparan los controles del complemento:

- Cuatro pozuelos por cada suero y por antígeno que se use.
- Agregar 25 μ l de suero o antígeno en cada uno de los cuatro pozuelos.
- Añadir 25 μ l de veronal y 25 μ l de complemento de cuatro diluciones correspondientes a 2, 1, 0.5 y 0.25 U. Estos controles se realizan para comprobar que no hay anticomplementariedad.

Debe observarse lisis en los primeros dos pozuelos, lisis parcial en el tercero y no lisis en el cuarto. Si no ocurre lisis es que hay anticomplementariedad.

Las diluciones del complemento se preparan de la siguiente forma:

2 U (es la que se utiliza en la prueba)

1 U (1 ml de la de 2U + 1 ml veronal)

0.5 U (1 ml de la de 1U + 1 ml veronal)

0.25U (1 ml de la de 0.5U + 1 ml veronal)

Cada una de las diluciones de complemento corresponde a un pozuelo diferente, por lo tanto:

2U 1U 0.5U 0.25U (25 μ l de complemento cada uno)
+ 25 μ l de suero 1/8 ó 25 μ l de antígeno (dilución trabajo)
+ 25 μ l de veronal (1x)

También debe realizarse un control de veronal solo (se sustituye el suero o el antígeno por veronal poniendo 50 μ l de éste más 25 μ l complemento).

- Colocar las placas a 4°C por toda la noche (18 horas).
- Pasar las placas a 37°C por 30 minutos, así como el sistema hemolítico.
- Agregar 50 μ l del sistema hemolítico en cada pozuelo y agitar.
- Colocar las placas a 37°C por 15 minutos y agitar. Dejar otros 15 minutos. Poner en frío durante 10-15 minutos (para mejorar la sedimentación de los glóbulos).

9.6.2 Lectura

Se considera positivo cuando se produce un botón de glóbulos de tamaño mayor o igual a la mitad del botón control (que puede prepararse agregando en cualquier pozuelo vacío tres gotas de 25 μ l de veronal y una gota de 50 μ l de sistema hemolítico).

9.6.3 Interpretación de los resultados

Para el diagnóstico se utilizan sueros pareados, ya que los monosueros tienen poco valor.

Negativo

Sin títulos detectables de anticuerpos.

Positivo

- **Primario:** aumento de cuatro veces o más en el título de anticuerpos a un serotipo. Títulos fijos de anticuerpos de 1:64 se considera que pueden deberse a infección reciente.

- *Secundario*: aumento de cuatro veces o más en el título de anticuerpos a dos o más serotipos o títulos mayores de 1:128 a un serotipo (con o sin seroconversión).
- *Estables*: de 1:8 ó 1:32 sin seroconversión (esto sugiere una infección en el pasado).
- *Inconcluso*: títulos de anticuerpos de 1:8 a uno o más serotipos de dengue.

Es importante recordar que los anticuerpos IH aparecen más temprano que los FC. En los casos secundarios ambas respuestas ocurren muy rápido, usualmente en la primera semana de la enfermedad, declinando después del primer mes. La respuesta de anticuerpos es muy parecida para los cuatro serotipos.

9.7 Referencias

Casals, J. *Methods in Virology*, vol III, 1967.

Kabatand Mayer's. *Experimental Immunochemistry*. 2nd. ed., 1967.

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

INMUNOFLUORESCENCIA

La inmunofluorescencia (IF) o técnica de anticuerpos fluorescentes se basa en la unión inmunológica de un anticuerpo marcado con un fluorocromo a su antígeno homólogo.

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

En 1941, Coons y colaboradores, introdujeron la técnica de IF, empleando isocianato de fluoresceína para el marcaje de antígenos y anticuerpos. Posteriormente, Riggs y colaboradores modificaron las técnicas de conjugación reemplazando el isocianato por el isotiocianato, este último más estable, más fácil de conjugar y de obtener comercialmente.

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

10.1 Principio de la técnica

Las moléculas protéicas de los anticuerpos se unen al marcador fluorescente (fluorocromo) por medio de enlaces químicos firmes que esencialmente no alteran la actividad inmunológica de estos anticuerpos, manteniendo íntegramente su capacidad de unirse a los antígenos homólogos.

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

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

La extensa variedad de estructuras y propiedades físicoquímicas de los antígenos implica que los requerimientos para el marcaje del antígeno con el fluorocromo variarán para cada caso en específico, de ahí que se haya generalizado el marcaje de los anticuerpos (todos los anticuerpos son proteínas). Es por ello que la IF se conoce también con el nombre de técnica de anticuerpos fluorescentes.

Dependiendo de los objetivos trazados se pueden emplear distintas variantes de tinción en la inmunofluorescencia:

10.1.1 Método Directo

El material se tiñe directamente con el correspondiente anticuerpo marcado,



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

10.1.2 Método Indirecto

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



Este método, en comparación con el directo, presenta tres ventajas fundamentales:

- Es más sensible
- Sirve para detectar Ag como Ac
- Se puede trabajar una amplia variedad de Ag-Ac siempre que se utilicen sueros de la misma especie

10.2 Microscopio para fluorescencia

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

Se ha comprobado en la práctica que el sistema de excitación ultravioleta es el más conveniente ya que en gran medida su empleo elimina la posibilidad de confundir la fluorescencia específica con la autofluorescencia propia de las células y tejidos. Es por ello que en general se emplea como fuente de luz una lámpara de mercurio acompañada de un sistema de filtros de absorción de calor, de excitación, filtros de "barrera" y otros. Los filtros aseguran

una mayor nitidez en la observación de las muestras ya que seleccionan las longitudes de onda mas apropiadas para la excitación, eliminando aquellas que resulten perjudiciales para el observador.

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

10.3 Preparación del sustrato antigénico

10.3.1 *Ratón*

- Si se parte de un ratón agonizante hay que extraerle el cerebro y colocarlo sobre un papel de filtro.
- Con la punta de un bisturí tomar pequeñas porciones de cerebro y hacer frotis sobre portaobjetos, cuidando que queden bien extendido para poder lograr una monocapa de células.
- Esperar que los frotis sequen completamente a temperatura ambiente.
- Una vez secos los frotis, colocar las láminas en un vaso koplín y añadir acetona a 4°C hasta cubrirlos. Mantener en acetona por 15 minutos.
- Eliminar la acetona y conservar las láminas en los mismos vasos en congelación (-20°C o -70°C). Mientras menor sea la temperatura se conservan por más tiempo las muestras. Si se mantienen a -20°C, no deben almacenarse por más de 1.5 meses.

10.3.2 *Células*

Para utilizar células como sustrato antigénico para la IF, éstas deben ser inoculadas como está establecido para cada línea celular, teniendo en cuenta sus requerimientos individuales. En el caso del virus del dengue las células deben ser fijadas a partir del tercer día y no antes.

- Para fijar se elimina el sobrenadante del cultivo y las células se desprenden con un policia de goma.
- Las células ya desprendidas (si fue un frasco de 25 ml), se resuspenden en 3 ml de PBS pH 7.2-7.4 y se trasladan a un tubo de centrifuga.

- Se centrifugan a 100 rpm durante cinco minutos a temperatura ambiente.
- Se elimina el sobrenadante y se resuspende el precipitado en 3 ml de PBS. De esta forma se lavan las células tres veces.
- Después de la última centrifugación se elimina el sobrenadante y se resuspenden las células en una cantidad tal de PBS que la concentración final sea de 10 cels/ml. Para un frasco de 25 ml son necesarios de 1-3 ml de PBS dependiendo del tipo de células y de la concentración de la monocapa celular.
- La suspensión celular se gotea sobre el portaobjetos, colocando en cada uno de ellos las muestras que sean necesarias. Por lo general se colocan ocho (cuatro a cada lado).
- Dejar secando a temperatura ambiente. No deben utilizarse secadores eléctricos porque provocan aerosoles de las células infectadas.
- Una vez secas las muestras, los portaobjetos se colocan en un vaso koplín y se añade acetona a 4°C durante 15 minutos.
- Se elimina la acetona y en los mismos vasos koplín se guardan las láminas en congelación hasta su uso.

10.4 Procedimiento para la inmunofluorescencia indirecta

- Sobre la muestra se añade el antisuero específico en dilución apropiada y en cantidad suficiente para cubrirla por completo. El antisuero específico puede ser líquido ascítico hiperinmune de referencia, sueros hiperinmunes, sueros de pacientes, anticuerpos monoclonales y otros, dependiendo del objetivo de la prueba. Las láminas se mantienen a 37°C durante 30 minutos en cámara húmeda.
- Se escurre cada lámina y se colocan en los vasos koplín. Se añade PBS que se elimina al instante. Se agrega nuevamente PBS y se vuelve a agitar suavemente 15 segundos, se elimina el PBS y de esta misma forma se realiza otro lavado (tres en total).
- Se extraen las láminas de los vasos koplín y se secan cuidadosamente por la cara posterior de donde están las muestras y sobre ellas se añade el conjugado ya preparado a la dilución de trabajo (para el conjugado anti-ratón "SEVAC" la dilución es de 1:5-1:20 en PBS).
- Las muestras se mantienen en contacto con el conjugado durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda.

- El conjugado se escurre de las láminas y se añade sobre las muestras una solución de azul de Evans diluído 1:20,000. Así se mantienen sólo un instante, se escurren y se colocan nuevamente en los vasos de koplín donde se realizan los tres lavados de la forma como se describió anteriormente.
- Después de lavadas las láminas se secan por detrás y encima de las muestras se añade una pequeña cantidad de glicerina bufferada (9 volúmenes de glicerina + 1 volumen de PBS). Sobre la glicerina se coloca cuidadosamente el cubreobjeto con un ángulo de 45 grados con respecto a la superficie, de forma tal que no forme burbujas que dificultan grandemente la observación microscópica.
- Se observan las láminas bajo un microscopio para fluorescencia y se valoran las muestras positivas y negativas teniendo en cuenta lo observado en los controles.

10.4.1 *Preparación de conjugado para inmunofluorescencia indirecta*

Entre las técnicas de diagnóstico rápido utilizadas en virología se encuentra la Inmunofluorescencia, que se ha convertido en un método importante para la detección de antígenos y anticuerpos.

El conjugado, elemento importante en esta técnica se caracteriza por presentar una unión estable entre moléculas de anticuerpos presentes en un suero inmune y moléculas de una sustancia fluorescente sin perder estos anticuerpos la capacidad de fijarse a su antígeno. El aspecto más importante del proceso de conjugación es obtener gamma globulinas libres de otras proteínas séricas y conjugarlas a un número óptimo de moléculas del reactivo fluorescente.

El isotiocianato de fluoresceína (FITC) y la rodamina son los fluorocromos más utilizados en el proceso de conjugación por ofrecer mayor estabilidad y mejores resultados.

10.4.2 *Obtención de inmunoglobulinas anti-ratón*

Precipitación con sulfato de amonio

Materiales

- Solución saturada de sulfato de amonio pH 7.
- Solución salina al 0.85%: 8.5 g de cloruro de sodio en un litro de agua destilada.

Método

- Agregar 20 ml de suero de ratón a 20 ml de solución salina al 0.85 %.
- Mantener en agitación y añadir lentamente 40 ml de la solución saturada de sulfato de amonio. Continuar agitando durante 45 minutos.
- Centrifugar a 5,000 rpm por 30 minutos. Eliminar el sobrenadante.
- Resuspender el precipitado en 20 ml de solución salina y mientras se agita nuevamente agregar lentamente 20 ml de sulfato de amonio. Repetir el paso anterior.
- Resuspender el precipitado en 20 ml de solución salina y dializar contra grandes volúmenes de solución salina, para eliminar el sulfato de amonio (tres veces con dos litros de solución salina a 4°C).
- Determinar la concentración de inmunoglobulinas.

Concentración de inmunoglobulinas

Se determina mediante la lectura de la densidad óptica a 280 y 260 nm usando la siguiente fórmula:

$$F = 2.303/0.28 \times \% \text{ de proteínas}/100$$

Algunos valores de F y R (280/260)

R 280/260 ^a	% Ácidos nucleicos	F ^b
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	3.50	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

^a Relación densidad óptica 280/260

^b $F \times 1/d \times D/280 = \text{mg proteínas}$

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:

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

Donde: d: ancho de la cubeta en cm

Esquema de inmunización

Se realizan inoculaciones seriadas por vía subcutánea en carnero adulto joven para la obtención de suero anti-ratón según el siguiente esquema:

- Día 1: Primera dosis 2.5 mg de la suspensión de Igs en 0.5 ml de solución salina con 0.5 ml de adyuvante de Freud completo.
- Día 7: Segunda dosis igual que la primera con adyuvante incompleto.
- Día 15: Tercera dosis 5 mg de la suspensión de Igs en 0.5ml de solución salina con 0.5 ml de adyuvante incompleto.
- Día 30: Igual que la tercera dosis.
- Día 37: Extraer una pequeña muestra de sangre y probar el suero por inmunodifusión radial (IDR).

Titulación de las inmunoglobulinas por inmunodifusión radial

Materiales

- Buffer Veronal pH 8.2:

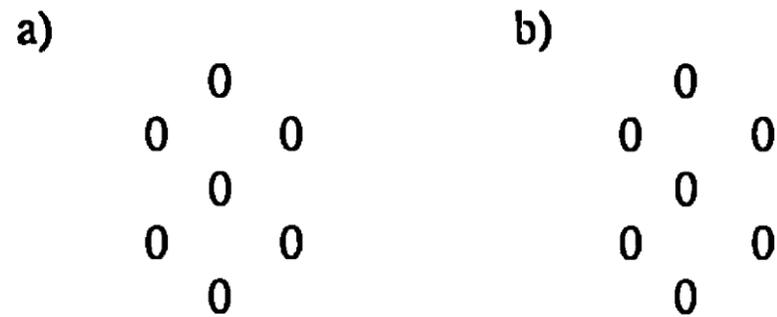
Barbital sódico	7.2 g
Acido clorhídrico 1N	9.9 ml
Agua destilada hasta un volumen de	450.0 ml

- Agarosa al 1%: 50 mg de agarosa en 5ml de buffer veronal.
- Solución salina: 0.85g de NaCl en 100ml de agua destilada.

Método

- Agregar 50 mg de agarosa a 5 ml de buffer veronal. Colocar la mezcla al calor hasta que se disuelva la agarosa.
- Agregar la agarosa ya disuelta a una lámina de cristal de 8 X 3 cm, colocada sobre un nivel.

- Esperar a que el gel se endurezca. Perforar la capa de gel formando pozos de 2 mm de diámetro aproximadamente y distribuidos según la siguiente figura:



- En el pozo central colocar la dilución de Igs de ratón a una concentración de 1 mg/ml para (a) y 2mg/ml en (b). En los pozos restantes colocar diluciones del suero de carnero anti-ratón desde 1/2 hasta 1/64 preparadas en solución salina.
- Colocar la lámina en cámara húmeda a temperatura ambiente hasta el siguiente día.
- Para realizar la conjugación, se recomiendan títulos iguales o mayores de 1/16 para una concentración de 1 mg/ml de Igs de ratón.

Precipitación de Igs anti-ratón

- La precipitación se realiza de igual forma que para las Igs de ratón hasta el paso 6, después se procede a realizar una diálisis con PBS pH 9.5 a 4°C.
- Determinar la concentración de Igs y ajustar para una concentración de 20 mg/ml con PBS pH 9.5.

10.5 Conjugación con FITC

10.5.1 Materiales

- PBS pH 9.5:

Fosfato dibásico de sodio anhidro (Na ₂ HPO ₄)	14.3 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5.89 g
Agua destilada	1 L

- PBS pH 7.4:

NaCl	8 g
2 Fosfato monobásico de potasio (KH ₂ PO ₄)	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.2 g

Cloruro de potasio (KCl)	0.2 g
Agua destilada	1 L

- FITC
- Sephadex G-50

10.5.2 Método

- Pesar FITC para una concentración de 10 mg de FITC por 1 g de proteínas.
- Disolver el FITC en un pequeño volumen de PBS pH 9.5.
- Agregar la solución de FITC a la solución de Igs anti-ratón poco a poco y agitando, manteniendo la mezcla a temperatura ambiente.
- Detener la agitación y dejar la mezcla de Igs + FITC durante una hora a temperatura ambiente.
- Para separar el FITC libre del conjugado se dializa la mezcla contra PBS pH 7.4 durante toda la noche a 4°C o se pasa por una columna de Sephadex G-50. Si se dializa, debe probarse el conjugado por IFI utilizando varias diluciones. Agregar albúmina bovina para una concentración del 0.02% y guardar en alícuotas a -20 °C.

10.6 Preparación de la columna con Sephadex G-50

- Agregar 8g de Sephadex G-50 a un volumen de 200ml de PBS pH 7.4.
- Calentar la mezcla de buffer Sephadex en un baño de agua hirviendo por una hora agitando suavemente en diferentes intervalos o dejar a 20°C por tres horas.
- Dejar enfriar el gel a temperatura ambiente.
- Eliminar el sobrenadante y agregar PBS de nuevo.
- Dejar sedimentar el sephadex, eliminar el sobrenadante y ajustar el volumen necesario (200ml) con PBS.
- Colocar una columna de 16 mm x 40 cm y agregar sephadex a través del tubo evitando formar burbujas.
- Agregar la cantidad necesaria para que se cubra toda la columna y se mantenga a una altura constante.

- Agregar PBS a la parte superior de la columna y cerrar el sistema ajustando el goteo (20 gotas por minuto).
- Cuando el sistema de la columna se haya estabilizado agregar la solución globulina-FITC suavemente, casi haciendo contacto con la superficie del sephadex.
- Esperar que se incorpore a la columna toda la mezcla e ir agregando PBS para evitar que se seque.
- Conectar de nuevo el sistema de goteo.
- Cuando comiencen a salir las primeras porciones coloreadas recolectar volúmenes de 1 ml.
- Leer las densidades ópticas de cada fracción en un espectrofotómetro a 280 y 495 nm.
- Unir las fracciones donde coincidan los valores máximos para ambas densidades ópticas. Una relación $495/280 = 1$ indica una buena conjugación.
- Concentrar con polietilenglicol y centrifugar a 10,000 rpm por 30 minutos a 4°C.
- Probar por IFI a diferentes diluciones.
- Añadir albúmina bovina para una concentración de 0.02%. Guardar en alícuotas y conservar a -20°C.

10.7 Referencias

Lyerla, Craig H. and Francis T. Forrester. Immunofluorescence Methods in Virology, 1979.

ENSAYOS INMUNOENZIMÁTICOS

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 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, que están formados por una enzima ligada a un antígeno o anticuerpo determinado.

Existe una gran variedad de enzimas que por ser estables, altamente reactivas y puras han sido utilizadas como marcadores. Entre ellas 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 la enzima y el anticuerpo o antígeno mantengan al máximo su actividad, así como lograr un óptimo acoplamiento de ambos componentes. Entre los métodos de conjugación más utilizados se encuentran el del glutaraldehído de dos pasos y el del peryodato, siendo este último el que brinda mejores resultados cuando se trabaja con peroxidasa.

11.1 Preparación de conjugado anti-dengue-peroxidasa

11.1.1 *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 filtrarse antes de usarla.
- Solución salina al 0.85% : 8.5 g en un litro de agua destilada.

Método

- Agregar 2 ml de suero humano conteniendo anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación con títulos de 1/1,280 o más contra los cuatro serotipos del virus dengue a 2 ml de solución salina al 0.85%.
- Mantener la mezcla en agitación y agregar lentamente 4 ml de la solución saturada de sulfato de amonio, continuar la agitación durante 45 minutos.

- Centrifugar la mezcla a 5,000 rpm durante 30 minutos a 4°C. Eliminar el sobrenadante.
- Resuspender el precipitado en 2 ml de solución salina. Agregar lentamente mientras se agita 2 ml de sulfato de amonio, manteniéndolo la agitación por unos minutos. Centrifugar nuevamente.
- Repetir el paso anterior.
- Resuspender con 2 ml de solución salina y dializar con grandes volúmenes de esta misma solución (tres veces con dos litros de solución salina) a 4°C.
- Determinar la concentración de inmunoglobulinas mediante la lectura de la densidad óptica a 280 y 260 nm (ver cuadro en preparación de conjugado para IF en la página 65).

11.1.2 *Conjugación por el método del peryodato de sodio*

Materiales

- Buffer Acetato de sodio 1 mM, pH 4.4.
 - Solución A: acetato de sodio anhidro 8.24 g en un litro de agua destilada
 - Solución B: ácido acético 6 ml en un litro de agua destilada.

Añadir una parte de la solución A en dos partes de la solución B.
- Diluir en 1:100 con agua destilada para obtener una solución 1 mM. Asegurarse que tenga un pH de 4.4.
- Buffer de bicarbonato de sodio 0.2 M pH 9.5.
 - Solución C: carbonato de sodio anhidro 0.2 M 21.2g/L de agua destilada.
 - Solución D: bicarbonato de sodio 0.2 M 16.802g/L de agua destilada.

Añadir solución C a la solución D hasta obtener un pH de 9.5.
- Buffer carbonato/bicarbonato 0.01M pH 9.5.
 - carbonato de sodio anhidro 1.59 g
 - bicarbonato de sodio 2.93 g

Disolver en un litro de agua destilada y ajustar el pH si es necesario. Diluir 1:5 para obtener una solución a 0.01 M.

- Buffer borato 0.1 M pH 7.4.
 - ácido bórico 24.732 g en cuatro litros de agua destilada.
 - borax 19.07 g en 500 ml de agua destilada.

Añadir aproximadamente 115 ml de borax a cuatro litros de ácido bórico, ajustar el pH a 7.4.

- Peryodato de sodio.
- Borohidruro de sodio.

Método

- Disolver 8 mg de peroxidasa de rábano picante (tipo VI) sigma en 1 ml de agua destilada.
- Preparar solución fresca de peryodato de sodio 0.01 M (21 mg/ml) en agua destilada. Añadir suavemente mientras agita 0.2 ml de esta solución a la de peroxidasa. Mantener en agitación durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- Dializar la mezcla toda la noche contra un exceso de buffer de acetato de sodio 1 mM pH 4.4 a 4°C.
- Añadir 20 μ l de buffer de bicarbonato de sodio 0.2M pH 9.5 a la peroxidasa. Agregar 1 ml de 10mg/ml de inmunoglobulinas previamente dializadas la noche anterior contra buffer carbonato/bicarbonato 0.01 M pH 9.5. Agitar la mezcla suavemente a temperatura ambiente por dos horas.
- Agregar 0.1 ml de borohidruro de sodio (4mg/ml) recién preparada a la mezcla. Mantener la agitación por dos horas a 4°C.
- Dializar la mezcla contra buffer de borato pH 7.4 toda la noche a 4°C.¹²
- Agregar fracción V de albúmina bovina para una concentración final del 1% y glicerol a igual volumen del conjugado.

¹²Para separar el conjugado del no conjugado pasar la mezcla por una columna de Sephadex G-200 equilibrada con buffer de borato. Determinar los valores de densidad óptica de cada fracción a 280 y 403nm, recolectando aquellas donde coincidan los valores máximos para ambas longitudes de onda.

- 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.
- Reenvasar en alícuotas y almacenar a -20°C.

11.2 ELISA de Captura de IgM

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 quinto día del establecimiento de la enfermedad.

El inmunoensayo enzimático sobre fase sólida (ELISA) ha sido utilizado como método para el diagnóstico serológico en un gran número de enfermedades virales. Uno de los métodos aplicados es el de captura de IgM utilizado para demostrar infecciones actuales o recientes. Para ello se emplea Inmunoglobulinas humanas anti-IgM fijadas a una 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 y encontró buena sensibilidad y una especificidad muy semejante a la de esta última técnica. Además, es un método rápido para determinar infecciones de dengue en casos hospitalizados de áreas endémicas. Es muy útil en la vigilancia de áreas no endémicas, ya que con seguridad cualquier caso positivo indica infección reciente. Por otra parte, es importante señalar que para el diagnóstico solamente se requiere de una muestra.

11.2.1 *Materiales*

Reactivos

- 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 un litro.

- Buffer carbonato/bicarbonato pH 9.6:

Na ₂ CO ₃	1.59 g
NaHCO ₃	2.39 g

Completar con agua destilada hasta un litro.

- Inmunoglobulinas anti-IgM humana purificada por cromatografía de afinidad.
- Albúmina bovina sérica fracción V
- Antígeno de complejo dengue obtenido por el método de sacarosa-acetona (ver técnica IH en la página 33).
- Suero humano normal (SHN) extraído con acetona: Colocar 10 ml de suero o plasma en un beaker de 2,000 ml. Agregar 500 ml de acetona y mantener en agitación durante 15 minutos. Colocar el beacker formando un ángulo de 45° para facilitar la sedimentación de las proteínas y dejar en esa posición toda la noche a temperatura ambiente.
- Al siguiente día decantar el sobrenadante y repetir los mismos pasos anteriores. Dejar secar el sedimento colocando el recipiente a 37°C toda la noche y rehidratar las proteínas con 20 ml de PBS, manteniendo la mezcla en agitación por dos horas. Clarificar finamente por centrifugación a 5,000 rpm por 30 minutos y guardar en alícuotas a 20°C hasta su uso.
- Conjugado anti-dengue peroxidasa (ver método de conjugación en la página 72).
- Buffer fosfato-citrato pH 5 (ver ELISA de Inhibición en la página 79).
- OPD (ver página 79).
- Peróxido de hidrógeno o urea peróxido (ver página 79).
- Sustrato (ver página 79).

11.2.2 Método

- A una placa de polivinilo agregar por pozo 100 μ l de Igs anti-IgM humana a una concentración de 5 μ g/ml en buffer de recubrimiento (*coating*); este valor se determina probando el sistema con varias concentraciones de Igs, generalmente entre 0.1 y 10 μ g/ml. Obteniéndose la concentración de saturación que se identifica al no presentarse incremento del valor de DO a partir de esa dilución. La placa se mantiene a 4°C toda la noche.
- Lavar cinco veces con PBS.
- Añadir por pozo, 150 μ l de ASB al 4% en buffer de recubrimiento por 30 minutos a 37°C. Se requiere un total de 15 ml por placa.
- Lavar cinco veces con PBS.
- Agregar en los pozos respectivos 50 μ l de los sueros a probar diluidos 1/20 en PBS-ABS al 0.5%. Se deben incluir sueros positivos y negativos diluidos también a 1/20 como controles.
- Lavar cinco veces con PBS.
- Añadir por pozos 50 μ l del antígeno preparado para 16 UH (esto se calcula en función del título hemaglutinante y se necesitan 5 ml por placa). Este antígeno se prepara en PBS-SNH al 20%.
- Colocar la placa a 4°C toda la noche.
- Lavar cinco veces con PBS.
- Agregar por pozos 50 μ l de conjugado anti-dengue peroxidasa diluido en PBS-SNH al 20% e incubar por una hora a 37°C. La dilución del conjugado (1/1,500) se calculó realizando varias diluciones y tomando aquella que establecía una diferencia de cinco veces o más entre el control positivo y el negativo.
- Lavar siete veces con PBS.
- Agregar 100 μ l por pozo de sustrato. Mantener la reacción durante 30 minutos y detener con 100 μ l de ácido sulfúrico al 12.5% por pozo.
- Leer la placa en un lector de ELISA a 492 nm.

11.2.3 *Cálculo*

Determinar la media geométrica de las DO de los controles negativos y multiplicar por dos. 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 el positivo con el negativo con un valor mayor o igual a cinco.

11.3 Sistema Ultra-Micro-ELISA para la detección de anticuerpos IgM anti-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 ultra-micro-ELISA (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 fija a los anticuerpos de recubrimiento. A continuación, previo lavado que elimina los componentes no fijados, se añade el antígeno específico de dengue (los cuatro serotipos); seguido nuevamente de incubación y lavado. Posteriormente se añade un anticuerpo monoclonal de ratón contra virus del dengue conjugado con fosfatasa alcalina. En caso de reacción positiva este anticuerpo marcado se une al complejo formado previamente sobre la fase sólida. Un nuevo lavado de la placa elimina el exceso de conjugado. Al añadir un sustrato fluorogénico, este se hidroliza y la fluorescencia que emite permite detectar la presencia de anticuerpos IgM específicos contra el virus del dengue.

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

- Lector SUMA 121, 221 ó 321
- Paquete de programas UMELISA-DENGUE
- Multipipeta ERIZO 101 ó 201
- Juego de accesorios de laboratorio SUMA

La técnica detallada aparece en el prospecto del paquete comercial UMELISA-DENGUE para la detección de anticuerpos IgM al virus del dengue.

11.4 ELISA de inhibición

Las técnicas serológicas constituyen un auxiliar imprescindible en 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, en años recientes se han introducido técnicas de mayor sensibilidad y facilidad de ejecución, que han ido ganando terreno en el campo del diagnóstico virológico, sobre todo por la rapidez de los resultados. Entre ellas se encuentran los inmunoensayos enzimáticos y de estos el Inmunoensayo enzimático sobre fase sólida (ELISA) que ha alcanzado una gran utilización en el diagnóstico de otros virus como hepatitis, rubéola, encefalitis B japonesa, citomegalovirus y otros.

11.4.1 Materiales

■ Inmunoglobulinas humanas anti-dengue:

Pool de suero humano conteniendo anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación con título mayor o igual a 1/1,280 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:

Suspensión al 20% de cerebro de ratones lactantes infectados con el virus del dengue 2 en buffer Tris 0.02 M pH 8.6 y centrifugado a 6,000 rpm por 30 minutos a 4°C.

■ Buffer de recubrimiento (*coating*) 0.05 M pH 9.5

-	Carbonato de sodio (Na ₂ CO ₃) anhidro	1.59 g
-	Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃)	2.93 g

Disolver en un litro de agua destilada. Ajustar el pH si es necesario. Duración máxima de 15 días. Mantener a 4°C.

■ PBS-Tween (PBS-T) pH 7.4

-	Cloruro de sodio (NaCl)	8 g
-	Cloruro de potasio (KCl)	0.2 g
-	Fosfato monobásico de potasio (KH ₂ PO ₄)	0.2 g
-	Fosfato dibásico de sodio anhidro (Na ₂ HPO ₄)	1.2 g

Disolver en un litro de agua destilada y agregar 0.5 ml de Tween-20. Mantener a temperatura ambiente.

■ Fosfato-citrato 0.05M pH 5

- Acido cítrico 5.1 g
- Fosfato dibásico de sodio anhidro 7.47 g

Disolver en un litro de agua destilada . Ajustar el pH a 5. Mantener a temperatura ambiente.

■ Ortofenilendiamina (OPD)

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

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

1 gramo de ABS en 100ml en buffer de recubrimiento. Prepara al momento de ser usado.

■ Sustrato

- Buffer fosfato-citrato 25 ml
- OPD 10 mg
- H₂O₂ 10 μl

Proteger de la luz.

11.4.2 Método

- Absorber en placa de poliestireno (M29 AR Cooke Microtiter, Dynatech) Igs humanas anti-dengue en buffer carbonato/bicarbonato pH 9.5 a una concentración de 1 μg/ml (100 μl por pozo). Dejar las placas en cámara húmeda o tapadas 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 150 μl en cada pozo de la solución de ABS al 1%. Incubar a 37°C por una hora. Volumen total de 15 ml por placa.
- Lavar las placas tres veces con PBS-T.
- Agregar 100 μl de la dilución de trabajo de la suspensión del antígeno en cada pozo (diluído en PBS-T dependiendo del título obtenido).

- Incubar la placa por una hora a 37°C.¹³
- Lavar tres veces con PBS-T.
- Agregar 100 µl por pozo de los sueros diluidos 1/20 en PBS-T, al igual que los sueros controles (positivo y negativo). Agregar PBS-T a tres pozos a igual volumen que los sueros. Incubar a 37°C por una hora.
- Lavar tres veces con PBS-T.
- Añadir 100 µl por pozo del conjugado anti-dengue-peroxidasa diluido 1/1500 en PBS-T con 10% de suero de ternera. Dejar incubando por una hora a 37°C.
- Lavar tres veces con PBS-T.
- Añadir 100 µl de sustrato por pozo. El sustrato debe ser preparado unos minutos antes de su utilización. Esperar 30 minutos de reacción.
- Detener la reacción agregando 100 µl de ácido sulfúrico al 12.5% en cada pozo.
- Determinar los valores de densidad óptica a 492 nm en un lector Micro-ELISA.
- Calcular los porcentajes de inhibición para cada muestra según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de Inhibición de ELISA} = 1 - \text{DO de la muestra} / \text{DO del PBS-T} \times 100$$

11.4.3 Resultados

Criterio de positividad de anticuerpos: aquellos sueros que presenten un porcentaje de inhibición mayor o igual al 50% en relación con el control de PBS-T.

Criterio de positividad en pares de sueros: se considera seroconversión en aquellos cuyo primer suero sea negativo y el segundo positivo; cuando se presente positividad en ambos sueros y haya evidencia de aumento de anticuerpos, expresado por un incremento del 10% o más de inhibición

¹³El título del antígeno se determina realizando varias diluciones de éste y utilizando como control negativo cerebro normal de ratón a las mismas diluciones del antígeno. Se prepara la curva de dosis-respuesta determinando la dilución de antígeno cuya densidad óptica sea cercana a 1.0 y que este valor, al relacionarlo con el del control negativo, sea de 5 a 10 veces mayor. Por ejemplo, si en la dilución de 1/40 se lee 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.

del segundo suero con respecto al primero y en aquellos que presenten valores de fijos del porcentaje de inhibición pero con porcentajes elevados de 85% o más.¹⁴

11.5 Referencias

Wilson et al, 1978. Immunofluorescence and related techniques. Ed. Knapp Wet, Elsevier Holland:215.

Voller,A. et al, 1976. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. Bull WHO,53:55-65.

Gubler. D.J. et al. Use of IgM Capture ELISA for Surveillance for Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever.

Kuno, G. et al, 1985. Antigen Capture ELISA for the identification of dengue viruses. J. of Virol. Meth.12, 93-103.

Voller,A. et al, 1976. Microplate enzyme immunoassays for the immunodiagnosis of virus infections. In N. R. Rose and H. Friedman (ed). Manual of Clinical Immunology. Am Soc Microbiol. Washington, DC.

Voller,A. et al, 1979. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). A guide with abstracts of microplate applications.

Voller,A. et al, 1980. The enzyme linked immunoasorbent assay (ELISA). A review of recent developments with abstracts of microplate applications. Vol 2.

Vázquez, S. y Fernández, R., 1989. Utilización de un método de Inhibición de Elisa en el diagnóstico serológico del Dengue. Reporte preliminar. Rev. Cub. Med. Trop. 41 (1).

Fernández, R. y Vázquez, S., 1990. Serological diagnosis of Dengue by an Elisa Inhibition Method (EIM). Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 85 (3).

¹⁴Estos casos deben ser titulados para confirmar positividad, expresando un incremento de cuatro veces o más en el título de anticuerpos del segundo suero con respecto al primero.