



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

MANUAL DE DIAGNOSTICO VIROLOGICO
PARA HUMANOS Y PARA VETERINARIA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

JOSE LUIS ALVARADO NAVA

ASESORES DE TESIS:

DRA. SUSANA E. MENDOZA ELVIRA

DR. ABEL CIPRIAN CARRASCO

DR. ELISEO HERNANDEZ BAUMGARTEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
P R E S E N T E

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Manual de Diagnóstico Viroológico: Para Humanos y para Veterinaria.

que presenta el pasante: José Luis Alvarado Nava
con número de cuenta: 8055051-8 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuatitlán Izcalli, Méx. a 17 de Noviembre de 2004

PRESIDENTE	<u>MFC. Ma. Eugenia R. Posada Galarza</u>	
VOCAL	<u>Dra. Susana E. Mendoza Elvira</u>	
SECRETARIO	<u>MC. Amparo Londoño Orozco</u>	
PRIMER SUPLENTE	<u>QFB. Ladislao Palomar Morales</u>	
SEGUNDO SUPLENTE	<u>MC. Alma Nuñez del Arco</u>	

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a DIOS y a la VIRGEN DE GUADALUPE por darme fuerzas e iluminar mi camino en todo momento.

A mi Papá:

Salvador Alvarado Maldonado (Q. D. E. P)

A mi Mamá:

Teresa Nava Guerra (que Dios la conserve por mucho tiempo)

A mi Esposa, por su apoyo incondicional:

Patricia I. Ramírez Lacarieri

A mis Hijas, que siempre me apoyaron:

Xochitl A. Alvarado Ramírez

Nathaly I. Alvarado Ramírez

A mis hermanos que siempre creyeron en mi

A mis amigos y compadres que siempre me apoyaron:

I. Q. Modesto Escobedo Aguilar

Q.F.B Fidel L. Bravo Guarneros

Lic. Gustavo Galicia Garduño

A mi ahijado, que es un ángel llegado del cielo:

Victor Bogart Bravo Jalomo

A mi asesores de tesis:

Dr. Susana E. Mendoza Elvira

Dr. Abel Ciprian Carrasco

Dr. Eliseo Hernández Baumgarten

A mis sinodales:

M. en F. C. Ma. Eugenia R. Posada Galarza

M. en C. Amparo Londoño Orozco

M. en C. Alma Núñez del Arco

QFB. Ladislao Palomar Morales

A los profesores, por su apoyo incondicional:

M. V. Z. David Trujillo Cevallos

M. en C. Carolina Moreno

A todos mis profesores

Gracias

INDICE

Objetivos	iii
Introducción	iv
CAPITULO 1: GENERALIDADES	1
1.1 Historia de la virología	1
1.2 Escalas microscópicas	7
1.3 Definiciones	8
1.4 Postulados de Koch	8
CAPITULO 2: INTERACCIÓN VIRUS CELULA	9
2.1 Interacción entre los virus y las células hospedadoras	9
CAPITULO 3: NIVELES DE BIOSEGURIDAD	11
3.1 Niveles de bioseguridad para trabajo en laboratorios	11
CAPITULO 4: LAVADO Y ESTERILIZACIÓN DE MATERIAL	13
4.1. Lavado y esterilización del material para cultivo de tejidos	13
4.2. Tipos de Esterilización	14
4.3 Preparación de material	15
4.4 Código de colores en un laboratorio	16
4.5 El agua para el área de virología	16
4.6 Procedimiento estándar	18
4.7 Trabajando en flujo laminar	19
CAPITULO 5: COMPONENTES DE MEDIOS DE CULTIVO	20
5.1. Preparación de medios de cultivo y complementos	20
5.2 Preparación de soluciones	21
5.3 Pruebas de esterilidad	24
CAPITULO 6: TOMA DE MUESTRAS	25
6.1 Introducción	25
6.2 Envases e instrumental	25
6.3 Toma de muestras virales en humanos	26
6.4 Toma de muestra en general procedimientos	28
6.5 Conceptos básicos de algunos desechos	34
6.6 Rotulación de las Muestras y Datos Anamnésticos	35
6.7 Remisión de las Muestras y acondicionamiento	36
6.8 Apéndice	38
CAPITULO 7: SISTEMAS INDICADORES	39
7.1 Animales de laboratorio	39
7.2 Cultivo de Tejidos	39
7.3 Embrión de pollo	56
CAPITULO 8: TECNICAS DE DIAGNOSTICO	65
8.1 Pruebas bioquímicas y biofísicas	65
8.2 Pruebas para determinación de antígenos (Ag) y pruebas especiales	78
8.3 Serología	117
CAPITULO 9: TECNICAS UTILIZADAS EN MEDICINA VETERINARIA	147
9.1 Muestras de sangre y fluidos	147
9.2 Confiabilidad de las técnicas de laboratorio	148
9.3 Valoración de anticuerpos	150

9.4 Recolección de Muestras para animales	152
9.5 Técnica de neutralización de fluorescencia (FA) para la Detección de anticuerpos de la fiebre porcina clásica (FPC) y de la diarrea viral bovina (DVB).	156
9.6 Técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) para detectar anticuerpos de FPC y diarrea viral bovina	158
9.7 Técnica de peroxidasa marcada (PLA) para detectar anticuerpos de FPC y diarrea viral bovina	161
9.8 Técnica de neutralización de la peroxidasa (NAPC) para detectar anticuerpos contra FPC y diarrea viral bovina	164
9.9 Técnica de inhibición de la hemoaglutinación para detección de anticuerpos de encefalomiocarditis porcina (EMC)	166
9.10 Técnica de inhibición de la hemoaglutinación para Detección de anticuerpos de la encefalomiocarditis hemoaglutinante (EH)	169
9.11 Técnica de microneutralización para detección de anticuerpos de la gastroenteritis transmisible (GET)	171
9.12 Técnica de inhibición de la hemoaglutinación para detección de anticuerpos de influenza porcina	172
9.13 Técnica de inmunofluorescencia indirecta (IF) para detectar anticuerpos del síndrome de infertilidad y respiratorio suino (SIRS)	176
9.14 Técnica de inhibición de la hemoaglutinación para la detección de anticuerpos de parvovirus porcino (PVP)	178
9.15 Técnica de ELISA para detectar anticuerpos de pseudorrabia (Pr)	182
9.16 Técnica de microneutralización para detectar anticuerpos de pseudorrabia (Pr)	184
9.17 Técnica de microinmunodifusión para la detección de anticuerpos de pseudorrabia	185
9.18 Técnica de aglutinación látex para detectar anticuerpos de pseudorrabia	186
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	187
GLOSARIO	188
BIBLIOGRAFIA	190

OBJETIVOS

- Elaborar un manual de técnicas de diagnóstico virológico que sea útil para diagnosticar enfermedades virales tanto en humanos como en animales.
- Conocer las diferentes técnicas de diagnóstico que existen en la actualidad para poder detectar enfermedades de tipo viral tanto en seres humanos como en animales.
- Conocer las diferentes técnicas que existen de toma de muestra y aislamiento viral utilizadas para aislar virus que afectan a los humanos y a los animales.
- Que este manual sirva de guía en los trabajos de investigación actividades de laboratorio y tareas para estudiantes de QFB y de Medicina Veterinaria.

INTRODUCCIÓN

Características Generales:

Para la elaboración de este manual fue necesario investigar que tipo de manuales de este tipo había ya existentes y ver que tan completos estaban en cuanto a la información que le brindan al estudiante de la carrera de QFB y de Medicina Veterinaria, en base a esto, se observo que hay manuales que solo hablan de las enfermedades y técnicas de diagnóstico virológico solo en animales o solo en seres humanos, la idea de crear este manual es unir las dos areas y abarcar las técnicas de diagnóstico virológico tanto en humanos como en animales y así sirva de herramienta tanto a los estudiantes de QFB como a los estudiantes de Medicina Veterinaria.

En el capítulo 1 de este manual se incluyen los temas referentes a **Generalidades**.

En el capítulo 2 se incluyen los temas relacionados a las **Interacciones entre los virus y las células hospedadoras**

En el capítulo 3 se incluyen los temas referentes a los **Niveles de Bioseguridad de Laboratorios**

En el capítulo 4 se incluyen los temas referentes al **Lavado y Esterilización de Material**

En el capítulo 5 se incluyen los temas referentes a **Componentes de Medios de Cultivos**

En el capítulo 6 se incluyen los temas referentes a **Tomas de Muestras**

En el capítulo 7 se incluyen los temas referentes a **Sistemas Indicadores**

En el capítulo 8 se incluyen los temas referentes a **Técnicas de Diagnóstico**

En el capítulo 9 se incluyen los temas referentes a las **Técnicas Utilizadas en Medicina Veterinaria**

Este manual esta enfocado principalmente al diagnóstico de laboratorio de enfermedades virales tanto en humanos como en animales y esto incluye:

- **Aislamiento del virus:** es decir, el aislamiento de la gente causal y esto puede ser por medio de:

Inoculación del Huevo embrionario:

- a) Por inoculación de membrana corioalantoidea
- b) Por inoculación alantoidea
- c) Por inoculación del saco amniótico
- d) Por inoculación de saco vitelino

Inoculación de Animales de Laboratorio: la inoculación de embriones y de cultivo de tejidos, ha desplazado mucho a los animales de laboratorio. No obstante la inoculación intracerebral de ratones lactantes es precisa para el cultivo de algunos virus de importancia médica.

- **Pruebas serológicas:** o sea demostración de un aumento en el título de anticuerpos específicos en el curso de una enfermedad.

Las pruebas serológicas son métodos retrospectivos que emplean sueros de pacientes en estado agudo y convaleciente que contienen anticuerpos cuya naturaleza se puede determinar mediante reacciones in Vitro antígeno anticuerpo. En respuesta a la infección, varios anticuerpos, por ejemplo, los de neutralización y fijación de complemento, aparecen todos a la vez en distintas etapas de la enfermedad y con títulos variables. Deben obtenerse dos muestras, una al ingreso y otra en fecha posterior, en un intervalo de tiempo de unos días a dos semanas.

- **Examen tisular:** examen de los tejidos para ver los cambios patológicos característicos. El diagnóstico de lagunas enfermedades víricas puede hacerse basándose en los tipos de tejidos anatómicos patológicos y/o la presencia de cuerpos de inclusión, los cuales pueden encontrarse en el núcleo, en el citoplasma o en los dos sitios. Los cuerpos de inclusión son partículas víricas puras.

Capítulo 1. GENERALIDADES

1.1 Historia de la Virología

1.1.1 La cadena de inventarios y acontecimientos:

1. Los hermanos **Jansen** inventaron en 1590 el llamado microscopio compuesto. Consta de un tubo con dos lentes convexas en cada extremo y ampliaba más que las lupas, que existían desde la Edad Media, aunque daba una imagen borrosa.
2. 1660 **Robert Hooke** publica su obra micrografía, en la que hay reproducciones de sus observaciones hechas con un microscopio compuesto, del tipo inventado por los hermanos **Jansen**.
3. **Anthony Van Leeuwenhoek**, un pañero holandés sin formación científica, gran pulidor de lentes, consigue hacer del microscopio una herramienta útil. Descubre organismos, a los que llama "animáculos" o pequeños animales. Escribió más de 300 cartas a la Royal Society de Londres y recibió la visita de **Leibniz**, que también creía en la vida microscópica.
4. **Louis Pasteur** (1822-95) se ayuda del microscopio para demostrar que las infecciones son producidas por microbios. Impulsó el concepto de vacunación preventiva y estudió también los microorganismos positivos para la vida humana.
5. **Santiago Ramón y Cajal** y **Camilo Golgi** reciben el Premio Nóbel en 1906 por trabajos científicos fundamentados en observaciones microscópicas realizadas mediante el teñido de muestras.
6. **Ernst Ruska** y **Max Knoll** construyen en 1931 el primer microscopio electrónico. Funciona mediante bombardeo de electrones sobre la muestra. La imagen resultante aún es inferior a la que ofrecen los microscopios convencionales.
7. **James Hillier** consigue un microscopio electrónico que supera a los convencionales en 1937. Se pasa de 2000 aumentos a 7000. Con los años, el propio **Hillier** contribuirá a construir aparatos con una capacidad de 2 millones de aumentos. Una dimensión totalmente fuera de las posibilidades de los microscopios tradicionales.
8. 1965. Se desarrolla el microscopio electrónico de barrido.
9. 1981. **G. Binning** y **H. Rother**, desarrollan el llamado microscopio de efecto túnel. Con esta tecnología se observan los átomos individualizados por primera vez.
10. 1985. **G. Binning** y **H. Rother**, desarrollan el llamado microscopio de fuerza atómica.
11. 1998. **S. Chou** y **P. Krauss** consiguen, mediante el efecto túnel, realizar la grabación de datos de mayor densidad conocida: 65 gigabits por centímetro cuadrado.

1.1.2 Virus (Latín, veneno)

La existencia de los virus se estableció en 1892, cuando el científico ruso Dmitri I. Ivanovsky descubrió unas partículas microscópicas, conocidas más tarde como el *virus del mosaico del tabaco*. En 1898 el botánico holandés Martinus W. Beijerinck denominó *virus* a estas partículas infecciosas. Pocos años más tarde, se descubrieron virus que crecían en bacterias, a los que se denominó bacteriófago.

En 1935, el bioquímico estadounidense Wendell Meredith Stanley cristalizó *el virus del mosaico del tabaco*, demostrando que estaba *compuesto sólo del material genético llamado ácido ribonucleico (ARN) y de una envoltura proteica*. Los virus son parásitos intracelulares submicroscópicos (fig 1.1), compuestos por ARN (tabla 1.2) o por ácido desoxirribonucleico (ADN) (tabla 1.1) —nunca ambos— y una capa protectora de proteína o de proteína combinada con componentes lipídicos o glúcidos. En general, el ácido nucleico es una molécula única de hélice simple o doble; sin embargo, ciertos virus tienen el material genético segmentado en dos o más partes. La cubierta externa de proteína se llama cápside, y las subunidades que la componen, capsómeros. Se denomina nucleocápside al conjunto de todos los elementos anteriores. Algunos virus poseen una envuelta adicional que suelen adquirir cuando la nucleocápside sale de la célula huésped. La partícula viral completa se llama virión. Los virus son parásitos intracelulares obligados, es decir: sólo se replican en células con metabolismo activo, y fuera de ellas se reducen a macromoléculas inertes.

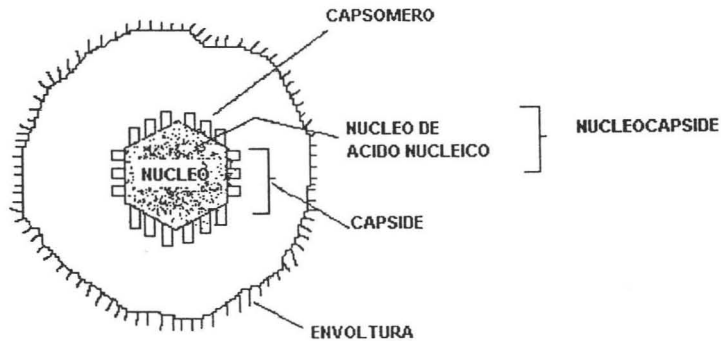


Fig 1.1 Estructura viral
 Componente de un partícula vírica completa o "virión"
 Tomado de Charles H Cunningham. Virología Practica

El tamaño y forma de los virus son muy variables (tabla 1.3). Hay dos grupos estructurales básicos:

*isométricos, con forma de varilla o alargados, y virus complejos, con cabeza y cola (como algunos bacteriófagos).

*Los virus más pequeños son icosaédricos (polígonos de 20 lados) que miden entre 18 y 20 nanómetros de ancho (1 nanómetro = 1 millonésima parte de 1 milímetro). Los de mayor tamaño son los alargados; algunos miden varios micrómetros de longitud, pero no suelen medir más de 100 nanómetros de ancho. Así, los virus más largos tienen una anchura que está por debajo de los límites de resolución del microscopio óptico, utilizado para estudiar bacterias y otros microorganismos (como algunos bacteriófagos).

Muchos virus con estructura helicoidal interna presentan envueltas externas (también llamadas envolturas o cubiertas) compuestas de lipoproteínas, glicoproteínas, o ambas. Estos virus se asemejan a esferas, aunque pueden presentar formas variadas, y su tamaño oscila entre 60 y más de 300 nanómetros de diámetro. Los virus complejos, como algunos bacteriófagos, tienen cabeza y una cola tubular que se une a la bacteria huésped. Los poxvirus tienen forma de ladrillo y una composición compleja de proteínas. Sin embargo, estos últimos tipos de virus son excepciones y la mayoría tienen una forma simple. En la tabla 1.4 podemos observar la composición química de los virus.

Tabla 1.1 Principales tipos de virus ADN.

Familia	Subfamilia	Genero	Simetría	Especie	Enfermedad	
Sin envoltura						
Monocatenario	Parvoviridae	Parvovirus	Icosaédrica	B19	Eritema infeccioso, eritroblastopenia, aplasia medular en pacientes VIH (+)	
Bicatenario	Parvoviridae	Papilomavirus	Icosaédrica	Virus del condiloma Virus verruga simple	Condiloma acuminado Verruga vulgar	
		Polyomavirus	Icosaédrica	Virus JC Virus BK	Leucoencefalopatía multifocal progresiva Cistitis hemorrágica	
	Adenoviridae	Mastadenovirus	Icosaédrica	Adenovirus 7	Infecciones respiratorias	
				Adenovirus 8	Conjuntivitis epidémicas	
				Adenovirus 40/41	Gastroenteritis	
Con envoltura						
Bicatenario	Hepadnaviridae	Hepadnavirus	Icosaédrica	Virus de hepatitis B	Hepatitis B	
	Herpesviridae		Icosaédrica			
	Alfaherpesviridae	Simplexvirus			Virus del herpes simple tipo 1 y 2	Herpes simple
		Varicellovirus			Virus varicela-zoster	Varicela, herpes-zoster, enfermedad citomegálica, roséola
	Betaherpesviridae	citomegalovirus				Enfermedad citomegálica
		Herpesvirus 6				Roséola o exantema súbito
		Herpesvirus 7				
	Gammaherpesviridae	Lymphocryptovirus			Virus de Epstein-Barr	Mononucleosis infecciosa, linfomas, carcinoma nasofaríngeo.
	Poxviridae		Compleja			
	Chordopoxviridae	Orthopoxvirus			Virus de la viruela mayor	Viruela
					Virus de la viruela menor	Alastrin
					Virus de la viruela del mono	Viruela del mono humano
					Virus de la vacuna	Vaccinia necrosum
		Parapoxvirus			Orfvirus (Orfhumano)	Orf humano
					Virus de los nódulos del ordeñador	Nódulos del ordeñador
Yatapoxvirus				Virus de la viruela de Tana	Viruela de Tana	
Molluscipoxvirus			Virus del molluscum contagiosum	Molluscum contagiosum		

* ADN bicatenario superenrollado.

** ADN bicatenario circular.

Tomado de D. Davis Bernard. Tratado de Microbiología Con Inclusión de Inmunología y Genética Molecular.

Tabla 1.2 Principales tipos de virus ARN.

Familia	Subfamilia	Genero	Simetría	Especie	Enfermedad	
S/envoltura						
Monocatenario	Picornavirus	Enterovirus	icosaédrica	Poliovirus	Poliomielitis	
				Coxsackievirus, Grupo A	Herpangina	
					Enfermedad mano, pie, boca, conjuntivitis hemorrágica (A24)	
				Coxsackievirus, Grupo B	Miopericarditis/mialgia epidérmica o enf. de Bomholm	
				Echovirus	Exantema	
				Enterovirus 68-71	Conjuntivitis hemorrágica (70)	
				Enterovirus 72	Hepatitis A	
				Rhinovirus	Resfriado común	
				Caliciviridae	Calicivirus	Gastroenteritis de Norwalk
					Herpevirus	Hepatitis E
Bicatenario	Reoviridae	Orbivirus	icosaédrica	Virus fiebre de la garrapata de Colorado / virus kemetovo		
		Rotavirus	icosaédrica		Gastroenteritis	
C/envoltura						
Monocatenario	Togaviridae	Alphavirus	icosaédrica	Arbovirus Gpo A	Encefalitis equina	
		Rubivirus	icosaédrica	Virus de la rubéola	Rubéola	
	Flavivirus	Flavivirus	icosaédrica	Arbovirus Gpo B	Dengue, Fiebre amarilla y hemorrágicas	
		hepacavirus	icosaédrica	Virus de hepatitis C	Hepatitis C	
	Orthomyxoviridae	Influenzavirus	Helicoidal	Virus de la influenza	Gripe	
	Paramyxoviridae	Paramyxovirus	Helicoidal	Virus parainfluenza	Crup, bronquitis	
			Helicoidal	Virus de Parotiditis	Parotiditis	
			Helicoidal	Virus hepatitis G	Hepatitis G	
			Helicoidal	Virus de sarampión	Sarampión	
			Helicoidal	Virus respiratorio sincitial	Crup/bronquitis/traqueobronquitis	
	Rhadoviridae	Lyssavirus	Helicoidal	Virus de la rabia	Rabia	
	Filoviridae	Filovirus	Helicoidal	Virus de Marburg y Ebola	Fiebres hemorrágicas	
	Coronaviridae	Coronavirus	Helicoidal		Resfriado común diarrea	
	Bunyaviridae	Bunyavirus	Helicoidal	Virus de encefalitis californiana, Virus bunyamwera, virus de la Crosse	Meningoencefalitis	
			Helicoidal	Virus fiebre de los valles del Rift		
			Helicoidal	Virus fiebre hemorrágica de Crimea y el Congo		
			Helicoidal	Virus Uukuniemi		
			Helicoidal	Virus Hantaan	Fiebre hemorrágica de Corea	
			Helicoidal	Virus de Ictiomeningitis linfocítica	Coriomeningitis linfocítica	
			Helicoidal	Virus fiebre lassa	Fiebre de lassa	
	Retroviridae	Grupo HTLV-BLV	icosaédrica	Virus HTLV I	Tricoleucemia	
		Lentivirus	icosaédrica	Virus inmunodeficiencia humana 1 y 2	SIDA	

ARN segmentado. Arbovirus: Virus transmitidos por artrópodos vectores.
 taxonomía según V informe del Comité de Taxonomía de Virus (1991).

Tomado de D. Davis Bernard. Tratado de Microbiología Con Inclusión de Inmunología y Genética Molecular.

Tabla 1.3 Tabla comparativa de virus que tienen RNA Y DNA

Familia	Forma	Diámetro nm	Envoltura	Simetría	No. de capsomeros (si son icosaédricos)
C / ADN					
Parvoviridae	Esférica	20	-	Icosaédrico	32
Papovaviridae	Esférica	45-55	-	Icosaédrico	72
Adenoviridae	Esférica	70-80	-	Icosaédrico	252
Herpetoviridae	Esférica	150	+	Icosaédrico	162
Poxviridae	Forma de ladrillo	150X240X300	-	-	-
ARN					
Picornaviridae	Esférica	20-30	-	Icosaédrico	? 60
Togaviridae	Esférica	40-60	+	Icosaédrico	?
Bunyaviridae	Esférica	90-100	+	Helicoidal	-
Arenaviridae	Esférica	85-120	+	? Helicoidal	-
Retroviridae	Esférica	80-120	+	Helicoidal	-
Ortoviridae	Esférica o filamentosa	100-120	+	Helicoidal	-
Paramyxoviridae	Esférica o filamentosa	80-120	+	Helicoidal	-
Rabdoviridae	Esférica	70X180	+	Helicoidal	-
Reoviridae	Esférica	50-80	-	Icosaédrico	?

Tomado de D. Davis Bernard. Tratado de Microbiología Con Inclusión de Inmunología y Genética Molecular.

Tabla 1.4 Tabla de la composición química de virus que tienen RNA Y DNA

Familia	Acido nucleico		Proteínas	Transcriptasa
	Configuración	PM (millones de Daltons)		
C / ADN				
Parvoviridae	Filamento Único	2	3	-
Papovaviridae	Doble Filamento	3-5	6	-
Adenoviridae	Doble Filamento	20-25	9	-
Herpetoviridae	Doble Filamento	100	12-24	-
Poxviridae	Doble Filamento	160	30	+
ARN				
Picornaviridae	Filamento Único	2-3	4	-
Togaviridae	Filamento Único	4	3	-
Bunyaviridae	Filamento Único	6	3	+
Arenaviridae	Filamento Único	6	?	?
Coronaviridae	Filamento Único	9	16	+
Retroviridae	Filamento Único	10-12	7-8	+
Ortoviridae	Filamento Único	5	7	+
Paramyxoviridae	Filamento Único	7	6	+
Rabdoviridae	Filamento Único	4	7	+
Reoviridae	Doble Filamento	15	7	+

- Número aproximado de los diferentes polipéptidos virus-codificados en el virión.
- PM: peso molecular.

Tomado de D. Davis Bernard. Tratado de Microbiología Con Inclusión de Inmunología y Genética Molecular.

Tabla 1.5 Diferencia entre virus y otros microorganismos

	Crecimiento en medios múltiples	División binaria	ADN y RNA	Ribosomas	Susceptibilidad a los antibióticos	Susceptibilidad al interferón
Bacterias	+	+	+	+	+	-
Micoplasmas	+	+	+	+	+	-
Hongos	+	+	+	+	+	-
Rickettsiae	-	+	+	+	+	-
Chlamydiae	-	+	+	+	+	+
Virus	-	-	-	-	-	+

Tomado de D. Davis Bernard. Tratado de Microbiología Con Inclusión de Inmunología y Genética Molecular.

Varias consecuencias prácticas importantes surgen de las diferencias entre los microorganismos y los virus (tabla 1.5); Por ejemplo, algunos virus (pero no los microorganismos) pueden hacerse latentes por la integración de su ADN (o de una copia ADN de su ARN) con el de la célula huésped, y los antibióticos que actúan contra pasos específicos en los caminos metabólicos de los microorganismos.

La virología se ha convertido en una parte integral de la biología molecular porque trata con entidades subcelulares, los virus, cuya estructura y organización consta enteramente en el dominio macromolecular. En 1957 Lwoff propuso la siguiente definición de virus: Entidades estrictamente intracelulares y potencialmente patógenas con una fase infecciosa que:

- Contienen un solo tipo de ácido nucleico.
- Se multiplican en forma de su material genético.
- Son incapaces de crecer y sufrir división binaria.
- Están desprovistas de un sistema de Lipmann (o sea, de un sistema de enzimas para la producción de energía).

Otra definición considera a los virus como "elementos de material genético que pueden determinar, en las células donde se producen, la síntesis de un aparato específico para su propia transferencia a otras células" (Luria, 1959). Esta definición insiste en la especialización de los virus de una célula huésped a otra, en vez de en su carencia de autosuficiencia metabólica.

Dos cualidades de un virus:

- La posición de un material genético propio, el cual, dentro de una célula huésped, se comporta como parte de la célula.
- La posesión de un estado infeccioso extracelular, representado por objetos especializados, los viriones, los cuales se producen en la célula bajo el control genético del virus mismo y sirven como vehículos para introducir el genoma vírico en otras células.

Los virus son obligadamente dependientes de las células huéspedes para su multiplicación.

Epidemiología.

Es una rama de la medicina que estudia los mecanismos de transmisión y factores que determinan el desarrollo, transmisión y frecuencia de una enfermedad.

Es el conjunto de conocimientos relativos a las enfermedades de las poblaciones humanas o comunidades, más que individuales. Jungthut (1935) dice. En una definición muy amplia. La epidemiología se debe entender que incluye las manifestaciones de cualquier enfermedad capaz de atacar grupos de individuos en cualquier momento. Maxcy (1956), se refiere al asunto como "al campo de la ciencia médica al que competen las relaciones de diversos factores y condiciones que determinan la determinación y frecuencia de un proceso infeccioso, una enfermedad o un estado fisiológico en una comunidad humana. De tal modo, la epidemiología

es una rama de la medicina que incorpora no solo datos en el área de las enfermedades infecciosas en grupos de poblaciones, sino también aquellos que resultan de deformaciones anatómicas, constitución genética, disfunción metabólica, destrucción, neoplasias, prácticas ocupacionales y el proceso de envejecimiento.

Cuando una enfermedad en la población se mantiene a un nivel relativamente quieto y moderado se dice que es endémica, si la prevalencia es elevada, entonces es hiperendémica; si hay un incremento marcado en la incidencia o un brote de considerable intensidad se considera que es "epidémica" y si aparece solo de manera ocasional en uno o en unos pocos individuos de la comunidad, se considera esporádica.

Algunas veces ciertas enfermedades infecciosas han sido diseminadas sobre grandes extensiones del orbe produciendo pandemias.

VIREMIA o virusemia. Presencia de un virus en la sangre.

EPIDEMIA. Enfermedad accidental transitoria generalmente infecciosa que ataca al mismo tiempo y en el mismo país o región a un gran número de personas.

Enfermedad Endémica. Enfermedad normal dentro de una población.

Enfermedad Epidémica. Enfermedad fuera de lo normal en una población.

Enfermedad Pandémica. Incremento en el número de casos de determinada enfermedad que involucra a varios países.

1.2 Escalas Microscópicas.

Que vemos a simple vista:

- De gran tamaño: kilómetros de montañas o de mar.
- De tamaño humano: una persona, un animal....
- De 1 centímetro: moscas, abejas...
- De 1 milímetro: garrapatas, pulgas y otros insectos.

Que vemos al microscopio óptico:

- Amebas y protozoos: Una décima de milímetro.
- Glóbulos rojos y otras células: Una centésima de milímetro.
- Bacterias: Milésimas de milímetro.

Que vemos con el microscopio electrónico:

- Cromosomas: décimas de micra o diezmilésimas de milímetro.
- Virus: centésimas de micra.
- Moléculas: milésimas de micra, o nanómetros.

Qué vemos con los microscopios de efecto túnel y de fuerza atómica:

- Átomos: un ángstrom, acerca hasta la distancia de 1 nanómetro (10^{-9} m). Una corriente eléctrica débil genera una diferencia de potencial de 1 voltio. Al recorrer la superficie de la muestra, la aguja reproduce la topografía atómica de la muestra.

1.3 Definiciones:

* Epidemia:

- o Ocurrencia de un número de casos de enfermedad de naturaleza semejante en una comunidad o región claramente en exceso del número habitual de casos.
- o Del griego *epidemios* sobre la gente. Es un aumento repentino de la frecuencia de una enfermedad por encima del nivel esperado.

* Pandemia:

- o Enfermedad que afecta a todo un país o que esta distribuido por todo el mundo
- o Del griego *pan*, todo. Es el aumento de la frecuencia de una enfermedad en una población muy grande de una región muy extensa (habitualmente todo el mundo).

* Epidemiología:

- o Estudio de los factores que determinan la ocurrencia de una enfermedad en la población humana.
- o Del griego *epi*, sobre, *demos*, pueblo ó población; y *logos*, estudio. Es la ciencia que evalúa la aparición, determinantes, distribución y control de la salud y la enfermedad en una población humana definida.

Virus RNA que se replican en el núcleo.

- ❖ Son ejemplos de estos los virus del género Orthomyxoviridae y el virus de la Influenza.
- ❖ Son excepciones ya que la mayoría de los virus RNA se replican en el citoplasma.

1.4 Postulados de Koch.

Para que una enfermedad sea considerada transmisible debe cumplir requisitos. Estos requisitos fueron enunciados por Robert Koch basados en sus experimentos con el Bacillus anthracis.

Postulados:

1. El microorganismo debe estar presente en todos los individuos con la misma enfermedad.
2. El microorganismo debe ser recuperado del individuo enfermo y poder ser aislado en medio de cultivo.
3. El microorganismo proveniente de este cultivo debe causar la misma enfermedad cuando se le inocula a otro huésped.
4. El individuo experimentalmente infectado debe contener el microorganismo.

La mayoría de las bacterias que causan enfermedad en el humano se ajustan a los postulados con excepciones, a saber: Mycobacterium leprae no cumple con el segundo enunciado de Koch.

Para demostrar que un microorganismo dado es la causa de una determinada enfermedad, es necesario:

- ❖ Que se encuentre en todos los casos de la enfermedad considerada y no en personas sanas y que su distribución corresponda a las lesiones características de la misma.
- ❖ Que sea aislado en cultivo puro y transportado al laboratorio sin estar en contacto con otros microorganismos.
- ❖ Que después de cultivado in Vitro durante varias generaciones, reproduzca la enfermedad en los animales respectivos o susceptibles.
- ❖ Que se aisle de nuevo a partir de los animales infectados experimentalmente.

Capítulo 2. INTERACCIÓN VIRUS-CÉLULA

2.1 Interacciones entre los Virus y las células hospedadoras.

Las interacciones entre el virus y las células dentro de las cuales éste se replica son de importancia decisiva, determinando si la infección se establece en absoluto, el tipo de infección que es establecida y el resultado final para el hospedador.

2.1.1 Factores celulares.

La presencia de receptores apropiados en la superficie de la célula determina si el virus puede ser absorbido. Una vez que esto tiene lugar y el virus entra en la célula, éste debe reproducirse para establecer la infección, que puede tomar varias formas. Esto no es posible a menos que el ambiente interior de la célula hospedadora sea conveniente durante el ciclo de reproducción inicial. Los factores involucrados no están totalmente claros, pero sabemos, por ejemplo, que la temperatura de la célula es muy importante y, claramente, sus actividades bioquímicas también deben tener una parte importante. La replicación viral no es la actividad de todos o ninguno: En un ambiente poco óptimo la replicación parcial puede tener lugar y puede resultar "incompleta", generando virus con poca ó ninguna capacidad de infectar otras células.

2.1.2 Efectos citopáticos.

Muchos virus matan las células en las que se reproducen, a veces con apariencias características, ó **efectos citopáticos (ECP)**. Estos efectos ocurren en el hospedador intacto como también en cultivos celulares y es a menudo bastante distintivo para dar una idea del virus involucrado, una propiedad útil en el laboratorio de diagnóstico. Además el tipo de ECP puede dar pistas acerca de la clase de respuesta inmune involucrada.

2.1.3 Lisis celular:

La codificación temprana de proteínas virales puede **detener la síntesis de macromoléculas**, particularmente los polipéptidos, por la célula hospedadora. Después del ciclo de replicación de algunos virus (Ej. Adenovirus) la acumulación de grandes cantidades de proteínas de la cápside puede causar inhibición general de la célula hospedadora y las actividades sintéticas virales. La muerte de la célula es seguida por la lisis y descarga de un gran número de viriones. Se puede clasificar a estos virus como "Estalladores".

2.1.4 Fusión de las células:

Ya sabemos que estos virus tienen **proteínas de fusión** específicas en la membrana del plasma de las células por medio del cual penetran a la célula, éstos causan la formación de células gigantes multinucleadas (**sincitios**) por **paramyxovirus** como por virus respiratorio sincicial, parainfluenza virus, y sarampión. **Herpes y algunos retrovirus** también dan lugar a sincitios. Virus que se comportan de ésta manera tienden a **pasar de célula a célula** en lugar de ser liberados en estallido por lisis. Éstas son las "enredaderas"

2.1.5 Cuerpos de inclusión:

Éstos son cuerpos basófilos ó eosinófilos que aparecen dentro de las células como resultado de infección con algunos virus y con ciertas bacterias (normalmente Chlamydia). Las inclusiones virales pueden ser **intracitoplásmicas, intranucleares ó ambas**.

La naturaleza de las inclusiones varía con el virus involucrado. Ellos pueden representar **agregaciones de viriones maduros** (papovavirus, reovirus) pero son más a menudo **áreas de alteración manchando al sitio de síntesis viral ó los cambios absolutamente degenerativos**.

El hallazgo de inclusiones características en células exfoliadas de secciones de tejidos coloreados por métodos convencionales era hace años muy usado en diagnóstico pero ha sido reemplazado por otros métodos más fiables.

2.1.6 Nuevos Antígenos en la superficie celular.

Otra consecuencia muy importante de muchas infecciones virales es la inducción para que aparezcan nuevos antígenos en la célula. Esto es particularmente importante en el caso de virus envueltos que brotan de la superficie de la célula por ejemplo: herpes, myxo, paramyxo, y retrovirus. Desde que son inducidos por el virus en lugar de la célula hospedadora, éstos antígenos marcan las células infectadas como "extranjeras" para que sean susceptibles a ser atacados por células T citotóxicas, un elemento importante en la respuesta inmune. Los antígenos de superficie inducidos por virus pueden hacerse visibles por inmunofluorescencia. Algunos virus inducen cambios malignos en la célula.

Capítulo 3. NIVELES DE BIOSEGURIDAD

3.1 Niveles de bioseguridad para trabajo en laboratorios.

Nivel 1.

Se trabaja con agentes sin riesgo o de riesgo bajo, que no producen enfermedades en humanos.

Características:

1. Prácticas generales de laboratorio.
2. Prácticas especiales
 - o Material contaminado en recipientes cerrados para transporte.
 - o Control de insectos y roedores.
3. No se tiene ningún equipo de contención
4. Instalaciones de laboratorio.

Nivel 2.

Laboratorios que trabajan con agentes de riesgo individual moderado y bajo, que puede transmitirse a la comunidad.

Provocan enfermedades en humanos y animales, pero existe tratamiento.

Características:

1. Prácticas generales de laboratorio.
2. Prácticas especiales.
 - a. Acceso limitado
 - b. No se permite el acceso a personas con factor de riesgo.
 - c. Avisos de precaución, mensajes de bioseguridad. Indicar el agente infeccioso.
 - d. Cambio de ropa
 - e. No se permite el acceso a animales.
 - f. Reporte de accidentes o derrames, si estos suceden.
 - g. Registro de evaluación médica, vigilancia y tratamiento.
 - h. Existencia de un manual de Bioseguridad.
3. Equipo de contención.
 - a. Gabinetes de seguridad I y II.
4. Instalaciones de laboratorio
 - b. Autoclave

Nivel 3.

Se trabaja con agentes de alto riesgo individual, pero bajo riesgo a la comunidad.

Causan enfermedades serias en humanos y animales, pero no se transmiten fácilmente de un individuo a otro. Existe tratamiento.

Características:

1. Prácticas generales de laboratorio.
2. Prácticas especiales.
 - a. Todas las actividades con material infeccioso que se trabajen en el laboratorio deben realizarse sin excepción en gabinete.
 - b. Ningún trabajo debe hacerse en recipientes abiertos sobre las mesas.
3. Equipo de contención.
4. Instalaciones de laboratorio.
 - a. El laboratorio debe de estar separado de áreas de paso no restringido del edificio.
 - b. Para el acceso a éste se tiene que contar con 2 puertas (cuarto de cambio y regaderas).
 - c. Lavabos operados con pies, codos u automáticos cerca de la puerta.
 - d. Ventanas cerradas y selladas.
 - e. Puerta de acceso con cerrado automático.
 - f. Sistema de ventilación.

Nivel 4.

Laboratorio en el que se trabaja con agentes de alto riesgo individual y comunitario, que provocan enfermedades serias en humanos y animales, se transmiten fácilmente. No existen tratamiento y prevención efectiva.

Características:

1. Prácticas generales de laboratorio.
2. Prácticas especiales.
 - a. El material biológico viable fuera de gabinete tipo III se coloca en un material irrompible sellado y es colocado en un segundo contenedor.
 - b. Se debe sacar el laboratorio en un tanque de desinfección.
 - c. Registro de entradas y salidas.
 - d. Existencia de protocolos de emergencia.
 - e. El personal debe bañarse antes de salir.
 - f. Autoclave y doble puerta.
3. Equipo de contención.
 - a. Gabinetes clase III ó I, II.
 - b. Trajes de presión positiva.
4. Instalaciones de laboratorio.
 - a. El laboratorio de máxima contención debe estar en un edificio separado (en una zona aislada).
 - b. Cuartos de cambio de ropa separados del laboratorio por un cuarto de regaderas.
 - c. Drenaje con trampas.
 - d. Sistema de ventilación individual conductos de escape.
 - e. Filtrar aire de escape.
 - f. Aire de entrada filtrado.
 - g. Regadera química.
 - h. Luz de emergencia.

Capítulo 4. LAVADO Y ESTERILIZACIÓN DE MATERIAL

4.1 “Lavado y esterilización de material para cultivo de tejidos”

Uno de los factores que contribuyen básicamente a un buen cultivo celular, es el material con el que se va a realizar el trabajo.

El lavado de material para cultivo de tejidos, es uno de los procesos a los cuales se les debe exigir el mayor esmero, ya que las superficies de cristal pueden estar limpias, tal como habitualmente se define la limpieza y ser completamente inadecuadas para los métodos de cultivo de tejido dependientes de la adhesión y crecimiento de poblaciones celulares sobre el cristal. Aún cuando las células se propagan en medios que contengan suero y otros líquidos que proporcionan un desarrollo adecuado de las células en el cristal, es a menudo difícil preparar superficies que sean favorables para la adhesión y multiplicación celular.

La gran tarea de que se adhieren las células es poder lograr confluencia en la superficie del cristal y mantenerlo vivo. De aquí el poder llevar a cabo un buen estudio, sobre los cambios que provocan algunos virus sobre las células.

Del material dependerá la buena preparación de los medios de cultivo y el cultivo mismo. Aún en la actualidad aunque la tecnología haya avanzado tanto, la limpieza y la esterilidad del material debe ser escrupulosa. No pudiendo minimizar en ningún momento la importancia de estos procesos fundamentales.

Se recomienda que el tratamiento para el material de cultivo y preparación de medios de cultivo, sea realizado por personal especializado.

4.1.1 Factores importantes:

El material contaminado por bacterias ó material en que se trabajaron virus, deben ser inactivadas mediante calor húmedo principalmente, previamente deben tratarse con hipoclorito de sodio.

Otro punto importante es la toxicidad, se sabe que algunos tipos de cristal impiden el crecimiento correcto de las células. Por lo que generalmente se usa vidriería “Pirex o Kimex, en los que se ha comprobado que no existe desprendimiento de sustancias tóxicas para las células. A menudo células que se multiplican abundantemente en ciertas áreas de la superficie del cristal mueren en áreas vecinas; a veces las áreas tóxicas no afectan a las células hasta que se adhieren y comienzan a multiplicarse. Se ha demostrado que la carga negativa total y la cantidad de sodio en el cristal son la causa de la toxicidad para las células.

En los países desarrollados se ha sustituido todo el material de vidriería por material de plástico especial para cultivos celulares, siendo para nosotros una gran desventaja el no poder rehusarlo, ya que son desechables.

El agua que se utiliza para todo el proceso, es de gran importancia. Para obtener agua destilada debe tratarse de manera especial, para que la cantidad de sales sea reducida y que tenga un alto grado de pureza se obtiene por el método de intercambio iónico. El tipo de desionizadores utilizados pueden ser: Cartridge, Borell y Millipore.

Los detergentes que se utilizan para este tratamiento reducen la tensión superficial del agua para obtener un gran poder de limpieza. Es necesario que las trazas de detergente sean removidas con facilidad del cristal, y esto se logra usando algunos detergentes neutros como el Extran.

Un punto importante es la estandarización de los métodos de limpieza del laboratorio, ya que dependerá de cada laboratorio, del material que tengan agua, personal, etc.

4.2 Tipos de Esterilización.

4.2.1 Esterilización: Es el método por el cual un objeto o sustancia queda libre de todo tipo de vida. Es importante tener conocimiento de los métodos existentes, para matar, remover o inhibir crecimiento de los microorganismos. La esterilización se usa en una gran variedad de cosas para el trabajo de cultivo celular, como son: Medios de cultivo, vidriería, filtros, suero, material de cirugía, cada uno de diferente composición química y por lo tanto requieren de diferentes procesos de esterilización. El método de esterilización por calor quizás sea el mas utilizado, y este método es aplicado por tres variantes.

1. Calor húmedo
2. Calor seco
3. Incineración.

1. Calor Húmedo.

Este método es quizá uno de los más usados. Es el más simple de los tratamientos y el aparato utilizado es la **autoclave**. Este funciona con vapor a 15 lb. de presión y una temperatura de 121° C, con un tiempo de 15-30 minutos. Deben ser consideradas las siguientes precauciones:

- a. El papel que se utiliza para tapan las bocas de los frascos u otros tipos de material o soluciones, deben de permitir circular el vapor libremente.
- b. Líquidos procesados en volúmenes pequeños requieren de tiempo y temperatura normal, pero si el volumen es muy grande, se necesitara más tiempo y más temperatura en contenedores especiales.
- c. El llenado de los frascos debe ser hasta $\frac{3}{4}$ partes de su total, un volumen mayor provocaría que se perdiera una gran parte en la esterilización.
- d. La válvula debe permitir circular un flujo fino de vapor.
- e. El tiempo y la presión deben ser constantes en la esterilización.

Por este método puede ser esterilizado, vidriería, material de cirugía, algunas soluciones sin proteínas, agua para que quede libre de pirógenos, filtros preparados, gasas, jeringas, etc.

2. Calor Seco.

El calor seco en la esterilización también es muy usado, el **horno** en donde se lleva a cabo este tipo de esterilización es un poco más difícil de que se tenga en un laboratorio pero se debe conseguir. La temperatura y el tiempo es más prolongado que en el caso anterior, ésta esterilización se lleva a cabo de 170-180° C. durante 2 horas, estas condiciones deben ser constantes durante la esterilización.

Se recomienda que durante la esterilización no se abra el horno para que se lleve a cabo óptimamente. Todo tipo de vidriería se esteriliza por este método. Generalmente se envuelven en papel aluminio para que el calor seco, penetre correctamente en todas las superficies. Se debe recordar que después de terminada la esterilización se debe dejar enfriar para guardarlo, ya que se puede dañar el material.

3. Incineración.

Incineración (calentando en una flama), se usa para bocas de frascos, tubos, para hojas de bisturí, fórceps, pinzas, tijeras, después de sumergir el material de cirugía en alcohol etílico al 70%. Debe tenerse mucho cuidado con el alcohol y la flama que ya que pueden resultar peligrosos.

4.2.2 Filtración:

Es un método por el cuál partículas de varios tipos pueden ser separadas de un medio líquido o gas. El filtro tiene poros, los cuales permiten que pase el medio y retiene (generalmente partículas).

Hay diferentes tipos de filtros diseñados para diferentes sistemas, pero esencialmente hay dos propósitos básicos de filtración: Retención y Separación.

Ocasionalmente es necesario esterilizar líquidos, los cuales no pueden sujetarse al calor, como suero, soluciones azucaradas, enzimas, etc. Existen diferentes tipos de filtro:

1. **Filtros Seitz:** Consisten de celulosa incorporados con asbestos purificados, existen de diferentes diámetros de poro.
2. **Filtros de Membrana:** Están hechos de esteres de celulosa, nylon, cloruro de polivinilo, son membranas circulares y tienen diferentes grados de porosidad y diámetro. Para volúmenes de 10 a 100 ml. se pueden usar filtros adaptados a jeringas hipodérmicas, y para más de 100 ml. se utilizan contenedores conectados a una compresora con presión positiva y filtros Millipore estériles, con campana para recibir el líquido estéril.

4.2.3 Desinfectantes

Existen muchos tipos de desinfectantes. Lo importante es elegir uno que no irrite y que no manche.












Los **yodoformos** son desinfectantes no irritantes y que no manchan, estos bajan la tensión de la solución y libera poco yodo. Esta puede ser efectiva para hongos, bacterias, esporas y algunos virus.

Desinfectantes **fenólicos**, **sales cuaternarias de amonio**, **soluciones alcohólicas** y **benzal** son importantes desinfectantes, usados para la limpieza de áreas de trabajo y aparatos.

4.3 Preparación de Material.

- Para la preparación del material se debe de tener mucho cuidado, ya que si alguna parte quedara descubierta la esterilización sería nula.
- El papel que es más utilizado para envolver es el papel aluminio de un grosor mediano.
- Se envuelve todo el material de la boca principalmente.
- Las pipetas se taponan con algodón, de manera que no queden muy apretados y se meten en cartuchos separados según de la cantidad de que sean.
- Las cajas de petri y jeringas se envuelven con papel estraza o algo parecido.

4.4 Código de colores en un laboratorio.

	AIRE COMPRIMIDO (rojo)		VAPOR (blanco)
A		VA	
	VACIO (verde)		RETORNO DE CONDENSADOS BAJA PRESION. (blanco)
V		RCBP	
	GAS (amarillo)		RETORNO DE CONDENSADOS ALTA PRESIÓN. (blanco)
G		RCAP	
	AGUA DE SERVICIO (azul)		
AS			
	AGUA FRIA (verde botella)		
AF			
	RETORNO DE AGUA FRIA (blanco)		
RAF			
	AGUA HELADA (azul marino)		
AH			
	RETORNO DE AGUA HELADA (azul fuerte)		
RAH			

4.5 El Agua para el área de Virología.

4.5.1 Torrencial:

Cuando sea posible, no verter de un contenedor estéril contenido a otro, a menos que el bote esté chorreando y sea usado solo una vez y, preferiblemente, y para vaciar todo el contenido (promedio) en una sola vez. El mayor riesgo en torrentes es la generación de un puente de líquido entre la botella de afuera o frascos que son almacenados o incubados.

4.5.2 Flujo Laminar:

La mayor ventaja de trabajar en flujo laminar es que el trabajo dentro de la campana es protegido del polvo y contaminación por un flujo constante estable de aire filtrado, Hay dos tipos principales de flujo (1) horizontal donde el flujo de aire sopla hacia el operario, paralelo a la superficie de trabajo, y no es recirculado; y (2) vertical, donde aire circula de arriba hacia la superficie de trabajo y es atraído a través de la superficie de trabajo. En muchas campanas, el 20% es abierto y hecho hacia arriba para dibujar en el aire hacia el frente de la superficie de trabajo. Esta configuración es diseñada para minimizar derrames del aire de trabajo o el gabinete. Las campanas de flujo horizontal dan el mas estable flujo de aire y la mejor protección de esterilidad hacia los cultivos y reactivos; las capuchas de flujo vertical dan mas protección hacia el operador.

Un flujo vertical de clase II bioarriesgado donde las campanas deben ser usadas si el material potencialmente peligroso (cultivos infectados viralmente de humano o primate, etc.) sirve de guía. La mejor protección de riesgos químicos y radioquímicos es dada por una campana de citotoxicidad que es especialmente diseñada para la tarea y esta tiene una trampa de filtro de carbón en el recirculador de flujo de aire o una campana con todo el chorro abierto hacia fuera del área. Si notamos patógenos humanos son manejados, una clave III con gabinete patógeno con una trampa patógena sobre el respiradero es obligatoria.

La eficiencia de campanas de flujo laminar dependen de un mínimo de presión de gota se incrementa, y el dato del flujo de aire en el gabinete desciende. Abajo 0.4 m/s (80 ft/min), la estabilidad del flujo de aire laminar se pierde, y la esterilidad puede no ser mantenida largamente. La presión de gota puede ser monitoreada con un manómetro apto para el gabinete, pero directamente medido del flujo de aire con un cronometro es preferible.

El mantenimiento de rutina checa con filtros primarios son requeridos (siempre cada tres o seis meses). Las campanas con flujo horizontal, los filtros pueden ser removidos (después de desviar la agitación) y descartar o lavar en jabón y agua, como son generalmente hechos de espuma de poliuretano. Los filtros primarios en fluido vertical y capucha bioarriesgados son alternados y pueden necesitar ser remplazados por un ingeniero. Los filtros deben ser incinerados o autoclaveados y descartados.

Cada seis meses el filtro principal de alta eficiencia de aire particulado encima de la superficie de trabajo hubiera sido monitoreado por flujo de aire y agujeros. (El último es detectable por un incremento local de aire y un incremento particular contado). El monitoreo es mejor hecho por ingenieros profesionales, con precauciones propias tomadas para hacer trabajar con biopeligrosos, los gabinetes deben ser sellados y fumigados antes que los filtros sean cambiados.

El chequeo regular del trabajo debe ser hecho debajo de la superficie de trabajo y ningún derramamiento al enjuagar arriba, la bandeja lavada y el área esterilizada con 5% de desinfectante fenólico en 70% de alcohol. Los derrames deben, por supuesto, enjuagados arriba cuando esto ocurra, pero ocasionalmente ello pasa desapercibido, así un chequeo regular es importante. Estropajos, tejidos limpios, o guantes, si gotea debajo de la superficie de trabajo durante la limpieza, puede terminar arriba sobre el filtro primario y flujo de aire restringido, así tener cuidado durante la limpieza y checar el filtro primario periódicamente.

Las campanas de flujo laminar son mejor corriendo continuamente a la izquierda, porque estos guardan el área de trabajo limpia.

No debería ocurrir ningún derrame, cualquiera sobre el filtro o debajo de la superficie de trabajo, es secado rápida y equitativamente en aire estéril reduciendo el intercambio de microorganismos a voluntad grandemente.

La luz ultravioleta es usada para esterilizar el aire y la superficie de trabajo expuesta en capuchas de flujo laminar entre usos. La efectividad de las luces es dudosa porque ellas no producen grietas, las cuales son tratadas mas efectivamente con alcohol u otros agentes esterilizantes, los cuales corren a voluntad por capilaridad. Las luces ultravioletas presentan una radiación peligros, particularmente para los ojos, y además plomo a voluntad para enloquecer de algunos panales de plásticos despejados (ejem: Perspex) después de 6 meses a 1 año si es usada en conjunción con alcohol.

Nota de seguridad: Si las luces ultravioleta son usadas, protegerse con goggles y toda la piel que pudiera ser expuesta debe ser cubierta.

4.6 Procedimiento Estándar

La esencia de las buenas técnicas de esterilidad incluye muchos de los principios de las buenas prácticas de laboratorio estándar (ver tabla 4.1). Guardando la limpieza, despeja espacio de trabajo, y tiene sobre el solo lo que requiere a tiempo. Preparar tanto como sea posible en avance, así esos cualitativos que están fuera de la incubadora por corto tiempo posible y manipulación de varios puede ser acarreada fuera rápidamente, fácilmente, cepillado. Guardar siempre en línea directa de vista, desarrollar una conciencia de contactos accidentales entre superficies estériles y no estériles. Abandonar el área limpia y ordenar cuando usted termine.

Tabla 4.1. Buenas Técnicas de Asepsia.

SUJETO	HACER	NO HACER
Campanas de flujo laminar	Limpiar con algodón antes y después de usar Guardar una mínima suma de aparatos y materiales en la campana Trabajar en línea de vista directa	Desordenar la campana de arriba Abandonar la campana en un derroche
Contaminación	Trabajar sin antibióticos Checar cultivos regularmente, por ojo y microscopio Abrir la caja plateada	Abrir frascos contaminados en cultivo de tejidos Acarrear células infectadas Abandonar contaminaciones sin reclamar disponer de ellos sin peligro
Mycoplasma	Prueba celular rutinaria	Acarrear células infectadas
Líneas celulares importadas	Obtenidos de fuente confiable Checar para mycoplasma Validada de origen Records guardados	Probar a descontaminar detalles Obtener la fuente lejana removida del original
Líneas celulares exportadas	Checar para mycoplasma Validada de origen Mandar sábana de datos Triple envoltura	
Cristalería	Guardar acciones por separado	Usado por químicos
Matraz	Ventilar poco a poco si es sujetado	Sujeto también altamente
Medio y reactivos	Fregar los botes antes de colocarlos en la campanas Abrir solo en la campanas	Repartir entre líneas celulares Repartir con otros Verter
Pipetas	Use atorador de pipetas Cambie si es contaminado Use plástico para agar	Usar la misma pipeta para diferentes líneas celulares Repartir con otras personas Sobrellenar cilindros dispuestos

Tomado de Beunard N Fields. Fundamental Virology.

5.3 Pruebas de Esterilidad.

A todas las soluciones y equipos a utilizar, se les hará prueba de esterilidad, lo mismo que a la campana. En la campana, estufa, incubadora, horno, se pone una caja de petri con agar BHI abierta durante 5 min. Se tapa y se incuba por 24 hrs. a 37° C. No debe existir ningún crecimiento.

Los medios y soluciones se ponen en caldo BHI y se incuba de la misma forma, para que pase prueba de esterilidad.

Nota: Después de terminar de esterilizar por filtro Millipore se abre para ver si no está roto o mal puesto el filtro.

Muchas soluciones necesitan ser esterilizadas por filtros Millipore ya que podrían desnaturalizarse, tal es el caso del suero, medio ricos en aminoácidos, vitaminas y proteínas.

No debe ser filtrado un material viejo o contaminado, ya que tapan rápidamente los poros del filtro, permitiendo retrasarse en el trabajo.

Estos filtros tienen la ventaja de no alterar el pH de las soluciones.

Tabla 5.1 Medios estándar para cultivos de tejido.

Componentes	DME	RPMI1640	Ham's F-12
CaCl ₂	200		33
Ca (NO ₃) ₂ . 4H ₂ O		100	
CuSO ₄ . 6H ₂ O			0.0023
Fe (NO ₃) ₃ . 9H ₂ O	0.1		
FeSO ₄			0.46
KCl	400	400	220
MgSO ₄ . 7H ₂ O	200	100	150
NaCl	6400	6000	7600
NaHCO ₃	3700	2000	1200
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	125		
Na ₂ HPO ₄		800	140
ZnSO ₄ . H ₂ O			0.86
Glucosa	4500	2000	1800
Glutacion		1	
Hipoxantina			4.1
Acido lipoico			0.21
Metil linoleato			0.088
Rojo de fenol	15	5	1.2
Putrecina			0.16
Piruvato de sodio	110		110
Timidina			0.73
L- Alanina			8.9
L- Arginina		200	
L- Arginina. HCl	84		210
L- Aspargina. H ₂ O		57	15
L- Ácido aspártico		20	13
L- Cistina	48	50	
L- Cisteina. HCl. H ₂ O			35
L- Ácido glutámico		20	15
L- Glutamina	580	300	150
Glicina	30	10	7.5
L- Histidina		15	
L- Histidina. HCl. H ₂ O	42		21
L- Hidroxiprolina		20	
L- Isoleucina	105	50	3.9
L- Leucina	105	50	13
L- Lisina . H ₂ O	150	40	37
L- Metionina	30	15	4.5
L- Fenilalanina	66	15	5.0
L- Prolina		20	35
L- Serina	42	30	11
L- Treonina	95	20	12
L- Triptofano	16	5	2.0
L- Tirosina	72	20	5.4
L-Valina	94	20	12
Biotina		0.2	0.0073
D- Pantotenato de Calcio	4	0.25	0.24
Clorhídrico	4	3	14
Ácido Fólico	4	1	1.3
i- Inositol	7	35	18
Nicotinamida	4	1	0.037
Para- aminobenzoico		1	
Piridoxal- HCl	4		
Piridoxina- HCl		1	0.062
Riboflavina	0.4	0.2	0.038
Tiamina- HCl	4	1	0.34
Vitamina B ₁₂		0.005	1.4

En mg/1000 ml
 "Kawamoto et al (1986) en "Antibodies a Laboratory Manual"
 DME= Medio Mínimo Esencial
 RPMI1640 = Medio Mínimo Esencial

5.2.6 Solución de Penicilina – Estreptomicona.

Como la penicilina y la estreptomicona se hallan incorporadas en todos los medios, se prepara una mezcla de ambas en una solución.

En 100 ml. de PBS se disuelve una megaunidad de penicilina – más 1 gr. de estreptomicona. Se distribuyen en cantidades de alícuota de 5 ml y se almacenan a -20° C.

Al agregar 1 ml. de SPE a 100 ml de medio de cultivo, resultara una concentración final de 100 unidades de penicilina y 100 μ g de estreptomicona por ml.

5.2.7 Medio mínimo basal con Sales de Hank's y Earle. (tabla 5.1)

Los medios de cultivo, serán hidratados en 950 ml. de ADE, esterilizado por filtros Millipore, se recibe en matraces de 1 litro y se distribuye en botellas de leche de 100 ml. en la campana de flujo laminar. Se guardan a 4° C., debidamente etiquetados.

5.2.8 Medio preparado para usar.

• Hank's	100 ml.
• CO_3	1.2 ml.
• Piruvato	1 ml.
• L-Glt.	1 ml.
• SPE	1 ml.
• SFB	1 ml. para desarrollo 5 ml. para mantenimiento

5.2.9 Desinfectantes:

5.2.9.1 Yodo:

I = 2 gr

Nal = 2-4 gr

E = 100 ml

E = Alcohol etileno al 95%.

Disuelva el Nal en 5 ml de H_2O dest. Adicione el I y afore con E al 95%.

5.2.9.2 Fenol:

Fenol al 5% en agua destilada.

5.2 PREPARACION DE SOLUCIONES

5.2.1 PBS: Solución Amortiguadora.

	1 Lt.
• NaCl	8 gr.
• KCl	0.2 gr.
• PO_4HNa_2	1.15 gr.
• $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$	0.2 gr.
• Rojo de Fenol 1%	0.5 ml.
• Aforar cbp.	1 Lt..

El agua utilizada debe ser desionizada y esterilizada por autoclave.

- Ajustar el pH a 7.2
- Filtrar o Autoclavear
- Guardar a 4°C.

5.2.2 Glutamina:

- Solución concentrada 100X.
- Pesar 2.92 gr del polvo y aforar a 100 ml con agua desionizada y esterilizada con autoclave.
- Esterilizar por filtro Millipore.
- Guardar en tubos de 5 x 15 ml. a -20° C.

5.2.3 Carbonatos:

- Es una solución al 3.5% de Bicarbonato de Sodio con agua de desionizada.
- Esterilizada con autoclave.
- Autoclavear o filtrar.
- Guardar a 4° C.

5.2.4 Piruvato:

- Solución 100 milimolar con ADE (agua desionizada-esterilizada).
- Filtrar por Millipore.
- Guardar en tubos de 5 – 10 ml a 4° C.

5.2.5 Tripsina-versene:

	1 Lt.
• NaCl	8 gr.
• KCl	0.4gr.
• Dextrosa	1 gr.
• NaHCO_3	0.58 gr.
• Tripsina	0.5
• Versene (EDTA)	0.2
• Rojo de Fenol al 0.5%	0.4 ml.
• ADE	1 Lt..
• Ajustar pH a 7.3 con NaHCO_3	
• Esterilizar por Filtros Millipore	
• Guardar en frascos de 100 ml a -20° C.	

Capítulo 5. COMPONENTES DE MEDIOS DE CULTIVO

5.1 Preparación de medios de cultivo y complementos.

Existe un sin número de medios apropiados para el cultivo y mantenimiento de las células y puede causar confusión a una persona nueva en las técnicas de cultivo para tejidos. Básicamente hay dos tipos y son los siguientes:

1. Soluciones Salinas Balanceadas (SSB), que son soluciones isotónicas de sales inorgánicas y de glucosa, amortiguadas con fosfatos, a las cuáles se les agrega suero sanguíneo u otros productos biológicos similares para el mantenimiento y desarrollo de las células.
2. Medios de cultivo definidos que están compuestos por aminoácidos y vitaminas en cantidades conocidas, en una solución salina balanceada donde se mantendrán las células y posiblemente se promoverá algún desarrollo sin necesidad de nuevas adiciones.

5.1.1 Suplementos Biológicos:

En las primeras técnicas se embebían los fragmentos de tejidos en medio de un coagulo de plasma. Aunque este método esta ampliamente superado, pero conserva todavía un lugar como técnica de investigación, particularmente en embriología.

5.1.2 Suero Sanguíneo:

Se han usado sueros de muchas especies, pero los más comunes son: humano, ternera, fetal de bovino o el de conejo.

1. Se recoge la sangre asépticamente y se deja coagular.
2. Se centrifuga para retirar todas las células sanguíneas.
3. Se prefiltra.
4. Se pasa por una lámpara de UV lentamente.
5. Se esteriliza por filtros Millipore estériles de 0.22 mm. de Ø
6. Se reciben en recipientes de 100 ml. y se almacenan a -20° C.

Algunos sueros son citotóxicos, por lo cual es necesario comprobar cada nuevo lote con un cultivo celular, para finalmente utilizarlo de forma general, también se debe comprobar si no tiene anticuerpos. La hemólisis mínima en el suero puede ser no perjudicial, pero en exceso de hemoglobina se precipitara y arruinara la confluencia de las células.

5.1.3 Líquidos Corporales:

Los líquidos, amniótico, ascético y pleural se han usado con éxito pero su provisión es algo errática y no tiene aceptación general.

5.1.4 Extractos de Embrión:

Se usan con frecuencia para incrementar el desarrollo celular en especial células recién aisladas. Pueden sustituir al suero en algunos casos; especialmente en los cultivos de tejidos diferenciados.

4.7 Trabajando en flujo laminar.

4.7.1 Fuera de línea.

Lavar y cepillar el área de abajo, y traer botes, pipetas, etc. Acarrear fuera los primeros procedimientos de preparación (preparación de medio y otros reactivos) seguido por cultivo de trabajo. Finalmente, obtener arriba y secar toda la superficie con 70% de alcohol

4.7.2 Purificación de agua.

Purificar el agua es requerido para cristalería ascendente, disolviendo medio en polvo, y diluyendo concentrados. El primero de estos propósitos es generalmente satisfecho por la desionización por osmosis reversa de agua, pero el segundo y el tercero requiere agua ultrapura (UPW), el cual demanda un tercer o cuarto proceso de estado. El principio importante es que cada estado sea cualitativamente diferente; la osmosis reversa puede ser seguida por filtración en carbón vegetal, desionización, y filtración por micropor (ejemplo: vía un filtro de millipore) o destilación (con un elemento de silico-enfundada) puede ser sustituido para el primer estado. La osmosis reversa es abaratada si su compensador de combustible paga la factura; si no, la destilación es mejor y mas verosímil para dar un producto estéril. Si la osmosis reversa es usada, el tipo de cartucho debe ser escogido para convertir el pH del abastecimiento de agua, como algunas membranas pueden volverse porosas en condiciones extremas de pH.

El desionizador debe tener una medida de conductibilidad monitoreando el flujo, para indicar cuando el cartucho debe ser cambiado. Otros cartuchos deben ser fechados y reemplazados de acuerdo a las instrucciones de manufactura. Un carbón orgánico total (TOC) puede ser usado para medir el monitor de coloides.

El agua purificada no debe ser almacenada, pero debe ser reciclada a través de un aparato continuamente para minimizar infección con algas. Cualquier tubería o reservorio en el sistema debe ser checado regularmente (cada tres meses) para evitar el crecimiento de algas, limpiar por fuera con hipoclorito y detergente, y atentamente enjuagar en agua purificada después del uso.

El agua es muy simple, pero probablemente la mas critica, constituyente de todo medio y reactivos, prácticamente medio libre de suero. Un buen control de calidad moderado es para checar el plateado eficiente de una línea celular sensitiva a intervalos regulares.

A realizar:

1. Si el material se encuentra contaminado se inactiva por calor húmedo o por hipoclorito de sodio.
2. Se enjuagará y se pondrá en una tina con Extran al 3% y 3% de hipoclorito de sodio, toda la noche.
3. Se lavara con mucho cuidado, tratando de no rayar el cristal.
4. Se enjuaga con agua corriente varias veces (5-10 veces).
5. Se enjuaga 5 veces en 4 tinas con agua destilada.
6. Se enjuaga 5 veces en 3 tinas con agua desionizada.
7. Se deja escurrir y se mete a secar 1 hora a 80° C.
8. Se envuelve el material de vidriería con papel aluminio, en la boca de los frascos.
9. Se esteriliza en horno 2 horas a 180° C.
10. Material que no es de cristalería o que por lo tanto no resistan el calor seco, se esterilizará por autoclave a 121° C. por 15 minutos.
11. El material esterilizado se guarda en gavetas apropiadas.

Capítulo 6 TOMA DE MUESTRAS

6.1 Introducción.

El objetivo es proporcionar pautas básicas e imprescindibles para extraer, manipular y remitir muestras al laboratorio de virología tendientes a un diagnóstico exitoso.

De la representatividad de la muestra dependerá también dicho éxito.

El conocimiento de la etiopatogenia de la enfermedad y sus repercusiones orgánicas indicarán al profesional qué muestra ha de extraer y cuándo.

La mejor muestra es, siempre, aquella proveniente de un animal con los primeros síntomas o al que se mata y se le practica la necropsia, pues esto evita el problema de la contaminación post-mortem.

Para obtener la muestra adecuada en el momento oportuno es necesario conocer la fisiopatología de cada infección viral. Sin embargo existen reglas generales, por Ej.: Si la enfermedad está en la superficie se deben cultivar secreciones solamente; si la enfermedad es sistémica, se deberán cultivar múltiples sitios. De todos los pasos en el diagnóstico de virus por aislamiento, los dos más importantes son la obtención de la muestra adecuada y su correcta conservación y envío.

Debe evitarse la demora en la obtención de las muestras ya que para la mayoría de los virus existen mayores posibilidades de éxito en un aislamiento o en la detección de antígeno en etapas tempranas de la enfermedad. Existen excepciones a esta regla, por Ej., el citomegalovirus puede aislarse por largos períodos (semanas o meses) de fluidos o secreciones en infecciones congénitas y adquiridas; el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B puede detectarse en circulación durante años en los portadores crónicos.

Las muestras para diagnóstico virológico pueden obtenerse mediante hisopados (conjuntivales, genitales, rectales, de fauces o de lesiones cutáneas), de sangre (viremia), aspirados nasofaríngeos (ANF), orina (viruria), líquido cefalorraquídeo (LCR), materia fecal y órganos obtenidos por biopsias o autopsias.

Es imprescindible que junto con la muestra se envíe un breve resumen de historia clínica, la fecha de comienzo de la enfermedad actual y la fecha y hora de extracción de la muestra.

Las muestras pueden obtenerse con jeringa y aguja estériles (sangre, LCR) o con hisopos estériles de algodón (u otros materiales), los que deben colocarse en tubos con tapa hermética que contienen un medio de transporte para virus (por Ej., medio de Stuart o de Hanks con 0.2 – 1 % de albúmina bovina, antibióticos y antimicóticos). La albúmina o suero fetal bovino se añaden para preservar al virus y los antibióticos y antimicóticos para inhibir la flora que puede contaminar la muestra.

6.2 Envases e Instrumental.

6.2.1 Transporte y conservación de las muestras:

La conservación de la muestra puede lograrse de diferentes maneras, a continuación se refieren algunos métodos:

Congelación: Se emplean termos que contienen bióxido de carbono sólido (hielo seco) para el transporte y conservación de las mismas por tiempo limitado.

Además, en todos los laboratorios de virología existen gabinetes de bajas temperaturas que pueden mantener la muestra en condiciones adecuadas lo que garantiza una conservación prolongada de la misma.

Liofilización: Esta técnica de amplio uso no solo para el trabajo con virus, se basa en la congelación rápida del material bajo régimen de alto vacío, lo cual hace que se produzca además la deshidratación del mismo por sublimación del agua. En muchas ocasiones el producto a liofilizar puede ser mezclado con plasma o suero original al 10 – 20 % u otro medio protector como la leche descremada.

Los materiales liofilizados pueden conservarse en frascos sellados en refrigeración por períodos de tiempo prolongados.

Glicerol: Es un método sencillo que se emplea para preservar virus y otros microorganismos. Aunque su empleo no es tan reciente, sigue siendo un procedimiento muy útil sobre todo cuando no existen otros recursos.

El glicerol diluido al 50 % en agua o solución salina se emplea con éxito para conservar materiales fecales, secreciones y otros.

Aspirados Fluidos y Tejidos: Deben transportarse en contenedores estériles que no derramen su contenido. Su procesamiento hay que realizarlo lo antes posible (en términos de unas horas). Incluso se recomienda la inoculación en el momento de la toma.

Hisopos: Deben colocarse en un tubo conteniendo 0.5 ml. de medio de transporte que contenga antibióticos. Los hisopos secos deben descartarse. La composición del medio varía pero se recomienda la solución de Hank's. Se mantiene en recuperación.

6.2.2 Envases

Deben ser impermeables, estériles, y con buen cierre.

Esterilizados en:

- Autoclave 121° C, 20 minutos (olla a presión)
- Horno 160° C, 2 horas. 180° C, 30 minutos. En horno de cocina y con el material envuelto en papel, se considera que el vidrio se ha esterilizado cuando el papel adquiere color caramelo

6.2.3 Instrumental de Necropsia

Debe estar en perfectas condiciones, sin óxido. Los bisturís, tijeras y demás instrumental de diéresis deben tener buen filo.

6.3 Toma de muestras virales en humanos

6.3.1 Tomas de muestra en virología.

6.3.1.1 Introducción:

Los virus que infectan y causan enfermedad en el ser humano han recibido nombres y se les agrupado desde varios puntos de vista. La clasificación actual se hace con base en elementos propios del virus.

El punto de partida de cualquier trabajo lo constituye la fuente de material o muestra viral, su manipulación es un aspecto muy importante, dependiendo el éxito del trabajo futuro de la correcta recogida, conservación y manipulación de la misma.

La muestra que contiene virus debe colectarse de manera cuidadosa, en la etapa aguda de la enfermedad, observando las reglas de asepsia y evitando que diversos factores como las temperaturas y el pH puedan afectar el virus en la misma.

El material a coleccionar es muy diverso (TABLA 6.1) lo cual está determinado por el histotropismo que presenta el virus en cuestión.

Tabla 6.1.

MUESTRAS A COLECTAR PARA DIFERENTES VIRUS.

VIRUS	MUESTRA
- Poliomiéлитis	Heces fecales, médula espinal.
- Fiebre amarilla	Sangre.
- Influenza	Secreciones y lavados nasofaríngeos.
- Parotiditis	Saliva y orina.
- Rabia	Saliva, cerebro.
- Sarampión	Orina, sangre, nasofaringe.
- Viruela	Pústulas y secreciones de la piel.
- Molusco contagioso	Nódulos de la piel.
- Adenovirus	Regresiones Sist. Respiratorio, Conjuntiva, heces fecales, y orina.
- Arbovirus	Cerebro, sangre.

Aunque muchos virus producen cuadros clínicos perfectamente definidos y característicos, muchas veces los virus de familias diferentes pueden producir síndromes similares. La frecuencia con que éstos se recuperan a partir de las muestras clínicas, varía de acuerdo al cuadro clínico, el tipo de muestra y la oportunidad de su obtención.

Se debe intentar coleccionar las muestras directamente del tejido u órgano afectado (CUADRO 6.2).

- Infecciones de la piel o mucosas: es suficiente un raspado de la lesión.
- Infecciones de las vías respiratorias: es suficiente contar con exudados faríngeos.
- Infecciones sistémicas: se coleccionan muestras en los sitios de entrada o de salida del agente que se sospecha está involucrado.

Cuadro 6.2
TIPOS DE MUESTRA SEGÚN EL SÍNDROME ASOCIADO

SÍNDROME	MUESTRA ADECUADA
Coriza	Aspirado nasofaríngeo.
Faringitis	Hisopo faríngeo.
Pleurodinia	Hisopo faríngeo.
Neumonía	Aspirado nasofaríngeo y traqueal, biopsia.
Meningitis	Líquido cefalorraquídeo, heces, hisopo
Aséptica-encefalitis	Faríngeo.
Gastroenteritis	Heces.
Parotiditis	Aspirado faríngeo, orina.
Exantema vascular	Aspirado o hisopo vesicular.
Exantema maculopapular	Aspirado nasofaríngeo, heces.
Miocarditis, peritonitis	Aspirado nasofaríngeo, heces
Queratitis, conjuntivitis	Raspado conjuntival y corneal.
Aspirado nasofaríngeo.	

El éxito en el aislamiento varía de 0.1 al 90 % de acuerdo a las siguientes condiciones:

- Oportunidad de la toma de la muestra (en tiempo).
- Sitio de toma de la muestra (adecuado)
- Tiempo transcurrido hasta su llegada al laboratorio (horas).
- Condiciones de envío de la muestra (refrigeración).
- Técnicas y experiencia con que cuenta el laboratorio.

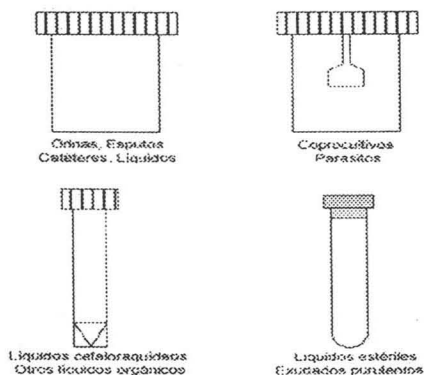
6.4 Tomas de muestras en general. Procedimientos.

A continuación se describen, en ORDEN ALFABETICO, los procedimientos adecuados de toma y envío de muestras clínicas (M) .

M1. Expectoración (Espujo).

Toma: Enjuagar la boca con agua destilada estéril o solución salina. Obtener el espujo tras una expectoración profunda, preferentemente matinal. De no producirse expectoración espontánea, puede inducirse el espujo con nebulizaciones de suero fisiológico estéril (15 ml. durante 10 minutos). En un frasco de plástico, con capacidad de 30 – 50 ml., de boca ancha y estéril, se recogen unos 5 ml. de expectoración del paciente.

Envío: Las muestras se protegen del calor excesivo con refrigerante.



M2. Exudado Cutáneo.

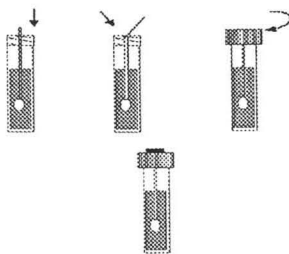
Toma: Con un hisopo de algodón se toma una porción del exudado, evitando que sea muy superficial. Inmediatamente se inocula en los medios apropiados.

Envío: Las muestras se protegen del calor excesivo con un refrigerante.

M3. Exudado Faríngeo.

Toma: Se pide al paciente que se siente y coloque su cabeza hacia atrás. Se ilumina bien la cavidad orofaríngea y con un abatelenguas se empuja la lengua hacia abajo para facilitar el acceso a la parte posterior de la faringe. Con un hisopo de algodón se hace un raspado de las áreas hiperémicas, purulentas o necróticas, así como de las membranas o manchas de Koplic, si es que las presenta.

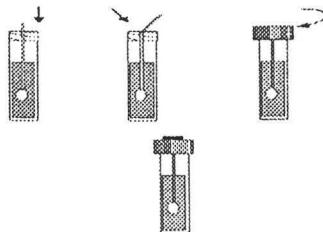
Envío: Agentes virales: El hisopo con la muestra se introduce en un tubo de tapón de rosca con 1 o 2 ml. de Solución Salina Isotónica estéril. Se rompe la varilla de madera a la altura del tapón y se tapa herméticamente.



M4. Exudado Nasofaringeo.

Toma: Se pide al paciente que se sienta y coloque su cabeza hacia atrás. Se introduce un hisopo de alginato de calcio, dacrón o nylon (nunca de algodón en caso de sospechar Bordetella) por las fosas nasales hasta la nasofaringe, sin tocar los cornetes y tratando de producir un acceso de tos. El hisopo se mantiene in situ de 10 – 15 segundos durante el acceso de tos, después de lo cual se retira rápidamente.

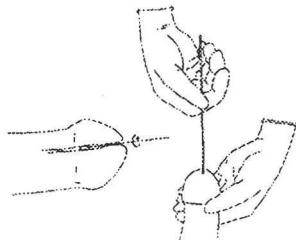
Envío: Agentes virales: El hisopo con la muestra se introduce en un tubo de tapón de rosca con 0.5 ml. de Solución salina isotónica estéril. Se rompe la varilla de madera a la altura del tapón y se tapa herméticamente.



M5. Exudado Uretral.

Toma: Se recomienda al paciente que no orine por lo menos una hora antes de tomar la muestra. Se utiliza un hisopo de alginato de calcio adecuado para tomas de muestra, el cual se introduce unos 2 a 4 cm. en la uretra y se frota las paredes haciendo girar el hisopo durante 5 a 10 segundos; con esta muestra se deben hacer de inmediato frotos en portaobjetos limpios.

Envío: El tubo y las preparaciones se envía lo antes posible de modo que no lleguen al laboratorio después de 24 horas.



M6. Exudado Vaginal y Endocervical.

Toma: Se utiliza un espejo vaginal para revisar el cérvix. Se toma la muestra con un hisopo, tomando todo el flujo que haya en las paredes de la vagina. Cuando se sospecha de infección por Clamidias, se limpia el exocervix con un hisopo de algodón para eliminar el moco y el exudado, se introduce el hisopo (de alginato de calcio o de dacrón, nunca de algodón) unos 2 a 4 cm. Dentro del canal endocervical y se rota cuidadosamente presionando contra la pared, evitando el contacto con las superficies vaginales.

Envío: Se envía lo antes posibles, para que llegue antes de 24 horas, no necesita refrigerarse.

M7. Frotis Sanguíneo:

Toma: Se limpia la yema del dedo o el lóbulo de la oreja con una torunda de algodón empapada en alcohol etílico al 70 % y se deja secar. Con una lanceta estéril se hace una punción firme y profunda y se limpia la primera gota de sangre con un algodón limpio y seco. Se comprime de nuevo la yema o el lóbulo hasta que forme una gota esférica. Se toca la parte superior de la gota con un portaobjetos muy limpio y con un extremo de otro portaobjetos, se extiende la sangre para hacer un frote. Se deja secar a temperatura ambiente.

Envío: Cada laminilla se protege individualmente, se empaqueta cuidadosamente en un recipiente y se envía lo antes posible.

M8. Gargarismo.

Toma: Se proporciona al paciente un frasco de boca ancha con tapón de rosca, estéril, con 5 ml. de solución salina y se le instruye de modo que mantenga la solución en la garganta el mayor tiempo posible mientras hace gárgaras y depositando nuevamente el líquido en el frasco.

Envío: El frasco con la muestra se envía de inmediato, protegido con un refrigerante.

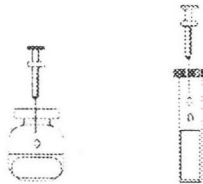
M9. Gota gruesa.

Toma: Ver las indicaciones de la M7 Frotis sanguíneo.

M10. Hemocultivo.

Toma: Se limpia el sitio de la punción con una torunda de algodón impregnada con etanol al 70 % o solución de yodo al 2 %. Si se trata de un adulto, se toman de 5 – 8 ml. de sangre total, sin anticoagulante, o de 2 a 3 ml. si se trata de un niño, siguiendo las indicaciones que se describen en el inciso M21. De inmediato la sangre se inyecta a través del tapón (previamente desinfectado con alcohol) de un frasco con medio bifásico para hemocultivo.

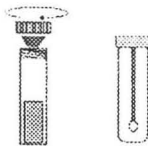
Envío: El frasco del hemocultivo se empaqueta bien en un recipiente con doble cubierta para evitar se ruptura. No hay que refrigerarlo.



M11. Hisopo Rectal.

Toma: La muestra se toma introduciendo la punta de un hisopo de algodón humedecido en solución salina o medio de transporte en el recto y haciéndolo rotar ligeramente. Estará bien tomada si observamos un ligero color café en el hisopo. Una vez tomada la muestra se introduce el hisopo hasta el fondo en un tubo con medio de transporte que debe estar bien tapado (tapón de rosca). Para estudios virales mandarlo en refrigeración, aunque no se recomienda usar hisopo para el caso de virus.

Envío: Hay que refrigerar en el caso de estudios virales.



M12. Impronta de lesiones cutáneas.

Toma: En caso de una lesión ulcerosa, se presiona un portaobjeto perfectamente bien desengrasado sobre la lesión. Si la lesión está cicatrizada con la punta de un portaobjetos se levanta la cicatriz y se toma la muestra como se indicó anteriormente. En caso de una lesión nodular, se pincha el nódulo con una lanceta y se presiona con un portaobjeto sobre la lesión hasta que salga líquido tisular el cual contendrá al parásito. Hay que evitar en lo posible el sangrado durante la toma de la muestra. Se fija con alcohol metílico absoluto.

Envío: Las laminillas se envuelven individualmente y se empaquetan se protege de la luz solar y la humedad.

M13. Lavado Faringeo.

Toma: Se pide al paciente que se siente cómodamente e inclina la cabeza hacia atrás. Se mide la distancia media entre la fosa nasal y la base del pabellón auricular, para saber la profundidad a la que se debe introducir la sonda. Se aplicará 1 ml. de solución salina o PBS e inmediatamente se introducirá la sonda, que estará conectada a través de una trampa a un tubo o recipiente estéril para la recepción del material.

Envío: La muestra se coloca en hielo hasta se procesamiento.

M14 Lavado Gástrico.

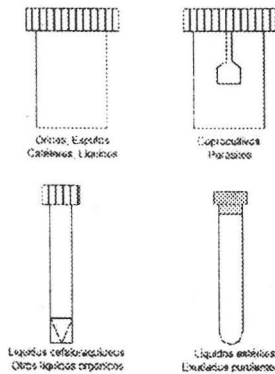
Toma: Debe ser efectuada por personal médico bien entrenado. Se introduce una sonda por vía bucal hasta el estómago en ayunas. La muestra se deposita en un frasco de boca ancha y de preferencia estéril.

Envío: El frasco se envía lo antes posible al laboratorio, donde no debe llegar después de 6 horas de tomada la muestra. Se debe acompañar de refrigerante.

M15. Líquido Cefalorraquídeo (LCR).

Toma: La obtención de la muestra es responsabilidad exclusiva del médico quien la tomará bajo rigurosas condiciones de asepsia. Se deben recuperar unos 5 ml. los cuales se conservan en tubos de vidrio estériles con tapón de rosca.

Envío: Las muestras para el estudio de virus se enviarán en hielo, si el envío se retrasa más de 24 horas, se debe conservar a -70°C .



M16. Líquido pleural.

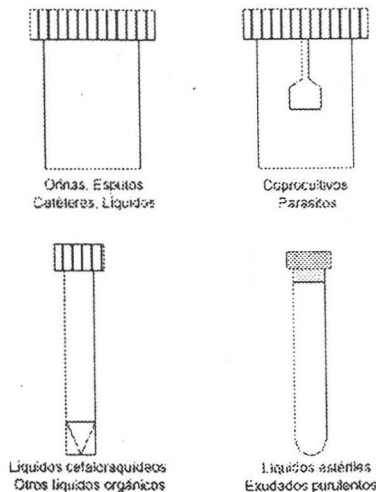
Toma: La obtención de la muestra es responsabilidad exclusiva del médico quién la tomará bajo condiciones rigurosas de asepsia. Se obtiene una muestra de aproximadamente 5 ml. en tubos de vidrio estériles con tapón de rosca.

Envío: El tubo se envía lo antes posible al laboratorio acompañado de refrigerante.

M17. Materia Fecal.

Toma: Las muestras fecales pueden ser obtenidas en recipientes limpios de boca ancha y con tapa hermética que permitan su fácil transporte, de preferencia que no sea de vidrio. Las heces obtenidas del suelo, excusado así como de pañal no son satisfactorias, debido a que pueden contaminarse con material extraño. Heces pastosas o formadas, al menos 1 o 2 gr. Para virología, añadir de 2 a 4 gr. más. Heces líquidas entre 5 y 10 ml.

Envío: Estudios virales: El tiempo de envío debe ser menor a los tres días y en condiciones de refrigeración, con la cantidad de 10 gr. Enviar sin medio de cultivo, pues este diluye las partículas virales disminuyendo la sensibilidad. Si se trata de hisopo rectal en solución salina, sueros y LCR, en envases apropiados correctamente sellados.



M18. Médula Ósea.

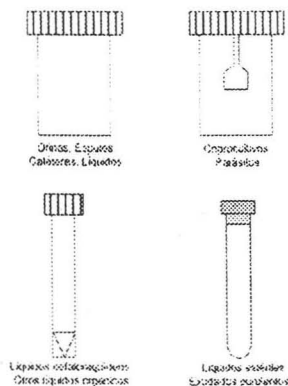
Toma: La muestra deberá ser tomada exclusivamente por el médico en condiciones rigurosas de asepsia. Se obtienen aproximadamente de 0.25 a 0.3 ml. de material con una jeringa heparinizada estéril de 1 ml. de capacidad. La jeringa se gira cuidadosamente para mezclar el material aspirado y se deposita en un tubo estéril con 0.5 ml. de solución salina fisiológica.

Envío: Si el laboratorio está cerca se manda en la misma jeringa cuidando la aguja para que no se contamine, si va a tardar las muestras se conservan en refrigeración.

M19 Orina.

Toma: Se usa un recipiente estéril, de boca ancha con tapa de rosca. Aunque el sondeo vesical es la forma ideal para evitar la contaminación, debido a la posibilidad de extender la infección en el paciente, se utiliza en casos muy excepcionales en el hospital. Por esto, la micción espontánea es la técnica más aconsejable: después de una cuidadosa limpieza de la región urogenital con agua y jabón y después con benzal al 1 %, se instruye al paciente para que deseche la primera parte de la micción y se colecta el chorro medio. Para búsqueda de virus debe ser la primera orina de la mañana y recolectar un volumen de 10 – 15 ml.

Envío: Para estudios virales: se deberá mandar con hielo y debe tardar menos de un día.



M20. Raspados de lesiones y/o costras.

Toma: Se lava bien el sitio de la lesión, primero con agua y jabón y luego con alcohol al 70 %, utilizando gasa (no debe utilizarse algodón) y se deja secar. Con bisturí estéril, se raspa el borde de la lesión y se recoge el material que se desprende. Si la epidermis está desprendida se toman porciones de ésta. Para la búsqueda morfológica del agente, las costras o escamas se colocan en una caja de petri estéril y se asegura la tapa con cinta adhesiva para que no se abra

Envío: El material sólo debe congelarse cuando la muestra es para estudios virológicos.

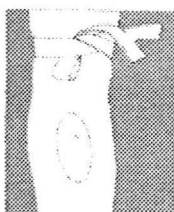
M21. Sangre total.

Toma: La toma deberá hacerse en un lugar perfectamente iluminado y con el paciente cómodamente sentado. Se localiza una vena adecuada en el brazo del paciente y se coloca el torniquete. Se desinfecta el área de punción con un algodón impregnado de alcohol al 70 %, se introduce la aguja con el bisel hacia arriba. Si la muestra necesaria es sangre total hay que utilizar el anticoagulante adecuado según el proceso que vaya a seguirse, ya que algunos anticoagulantes pueden ser inhibitorios. Si la toma de sangre es para la obtención de suero, no debe usarse ningún anticoagulante. Si la sangre no fluye espontáneamente y se está utilizando una jeringa. Se jala el émbolo y se aspira con suavidad; si se está empleando equipo al vacío se presiona el tubo de ensaye hacia arriba. Al empezar a fluir la sangre el torniquete se retira y hasta que se haya obtenido la cantidad de sangre que se requiere (generalmente 6 – 10 ml.) se retira la aguja y se coloca una torunda con alcohol sobre el sitio de punción ejerciendo presión para detener la hemorragia. Si la toma se hizo con jeringa, la sangre se vierte de la jeringa ya sin aguja sobre el tubo estéril dejándola resbalar lentamente por la pared para evitar hemólisis. El tubo se tapa cuidadosamente.

Envío: Se protege del calor excesivo con un refrigerante y de la luz solar.



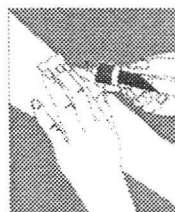
a) Prepare todo el equipo necesario.



b) Desinfecte el sitio, ligue el brazo



c) Realice la punción



d) Obtenga la sangre, retire la aguja.

M22. Suero.

Toma: Se debe seguir la misma técnica que para la obtención de sangre total (M21), pero sin anticoagulante. El coágulo formado se separa de las paredes del tubo con un aplicador de madera. Se debe esperar el tiempo necesario para que se retraiga el coágulo y el suero se separa por centrifugación a 2,500 – 3,000 rpm. El suero no debe mostrar indicios de hemólisis, ni debe estar lipémico y se debe conservar refrigerado o congelado, a menos que se de otra indicación. Actualmente existe un equipo comercial de tubos al vacío con un gel especial, con este sistema se puede separar el suero directamente en los tubos centrifugando a 3,000 rpm por 5 minutos.

El suero se conserva en los mismos tubos por varios días.

Envío: El tubo con la muestra se envía de inmediato, protegiéndolo del calor con hielo o un refrigerante.

6.5 Conceptos Básicos de algunos desechos.

6.5.1 Desechos Biológicos.

Se considera desecho cualquier material a partir del momento en que haya sido descartado. Se consideran Desechos Sólidos Hospitalarios (DSH) los generados por una Instalación de Salud. La clasificación de los DSH sugerida en el presente manual está basada en los criterios adoptados por la Organización Mundial de Salud (OMS), los cuales establecen que la sangre y los líquidos corporales de todos los pacientes deben ser considerados "potencialmente infectantes".

6.5.2 Los desechos comunes.

Son desechos comunes los generados principalmente por las actividades administrativas, auxiliares y generales, que no corresponden a ninguna de las categorías de desechos peligrosos. Son similares a los desechos de producción doméstica e implican las mismas prácticas de higiene en su manejo y transporte. Se incluyen en ésta categoría los papeles, cartones, cajas, plásticos, restos alimenticios y los materiales de limpieza de patios y jardines, entre otros.

6.5.3 Los desechos peligrosos.

Se consideran Desechos Sólidos Hospitalarios Peligrosos (DHS/P) todos los residuos producidos en instalaciones de salud que de una forma u otra pueden afectar la salud humana o animal y el medio ambiente. Los desechos peligrosos se dividen en desechos: Bioinfecciosos, Químicos, Radiactivos.

6.5.4 Los desechos bioinfecciosos.

Los desechos bioinfecciosos son generados durante las diferentes etapas de la atención de salud y representan diferentes niveles de peligro potencial, de acuerdo con su grado de exposición ante los agentes infecciosos. Se dividen en:

- Infecciosos
- Patológicos
- Punzocortantes

6.5.5 Infecciosos

Materiales provenientes de salas de aislamiento, residuos biológicos, excreciones, exudados o materiales de desechos provenientes de salas de aislamiento de pacientes con enfermedades altamente transmisibles. Se incluye a los animales aislados, así como también a cualquier tipo de material que haya estado en contacto con los pacientes de éstas salas.

Materiales biológicos: cultivos, muestras almacenadas de agentes infecciosos, medios de cultivo, placas de Petri, instrumentos utilizados para manipular, mezclar o inocular microorganismos, vacunas vencidas o inutilizadas, filtros de áreas altamente contaminadas, etc.

Sangre humana y productos derivados: Sangre de pacientes; bolsas de sangre inutilizadas con plazo de utilización vencida o serología positiva; muestras de sangre para análisis; suero; plasma y otros subproductos. También se incluyen los materiales empapados o saturados con sangre, plasma, suero y otros, aunque se hayan secado, así como los recipientes que los contienen o que se contaminaron, como bolsas plásticas, catéteres intravenosos, etc.

6.5.6 Patológicos

Residuos anatómicos, patológicos y quirúrgicos: Desechos patológicos humanos, incluyendo tejidos, órganos, partes y fluidos corporales, que se remueven con las autopsias, la cirugía u otros, incluyendo las muestras para análisis.

Residuos de animales: Cadáveres o partes de animales infectados provenientes de los laboratorios de investigación médica o veterinaria, así como sus camas de paja u otro material.

6.5.7 Punzocortantes

Elementos punzocortantes que estuvieron en contacto con fluidos corporales o agentes infecciosos, incluyendo agujas hipodérmicas, jeringas, pipetas de Pasteur, agujas, bisturís, mangueras, placas de cultivo, cristalería entera o rota, etc.. También se considera cualquier punzocortante desechado, aún cuando no haya sido usado.

6.5.8 Los desechos químicos

Son desechos generados durante las actividades auxiliares de las Instalaciones de Salud y que no han estado en contacto con fluidos corporales ni con agentes infecciosos. Constituyen un peligro para la salud por sus características propias, tales como corrosividad, reactividad, inflamabilidad, toxicidad, explosividad. También se incluyen en ésta categoría los fármacos vencidos que presentan características similares de peligrosidad:

- DESECHOS INFLAMABLES
- DESECHOS CORROSIVOS
- DESECHOS REACTIVOS
- DESECHOS TÓXICOS
- DESECHOS CITOTÓXICOS
- DESECHOS EXPLOSIVOS

6.5.9 Los desechos radiactivos

1. Cualquier tipo de residuo con características radiactivas o contaminado con radionucleidos es considerado un desecho radiactivo.
2. Son generados en laboratorios de investigación química y biológica, en laboratorios de análisis clínicos, en los servicios de radiología y de medicina nuclear.
3. Éstos desechos pueden ser sólidos o líquidos e incluyen materiales o sustancias comúnmente utilizadas en los procedimientos clínicos o de laboratorio: jeringas, frascos, orina, heces, papel absorbente, etc.

6.5.10 Los desechos especiales

Los desechos especiales son los que no están incluidos en las categorías anteriores y por alguna característica particular necesitan un manejo diferente que se debe definir para cada caso.

- ◆ Desechos de gran tamaño y/o de difícil manejo.
- ◆ Contenedores presurizados
- ◆ Desechos provenientes de la construcción de obras civiles.
- ◆ Fármacos vencidos que no clasifican como peligrosos.

6.6 Rotulación de las muestras y datos anamnésticos

Datos Anamnésticos

Deben incluirse dentro de la caja, en un sobre protegido por una bolsa de nylon. El protocolo consignará los siguientes datos:

- | | |
|---|--|
| <p>a) Generales:</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Fecha▪ Nombre del establecimiento, ubicación Geográfica.▪ Tipo de explotación▪ Cantidad de animales.▪ Distribución dentro de los potreros.▪ Superficie del establecimiento. | <p>b) Particulares o específicos:</p> <ul style="list-style-type: none">▪ Especie, raza, sexo, edad, uso.▪ Historia clínica del rodeo afectado.▪ Morbilidad, mortalidad.▪ Aparición, hallazgos clínicos y de laboratorio, tratamientos. |
|---|--|

- c) Adicionales:
 - Datos en establecimientos vecinos, reservorios. Diagnósticos presuntivos.
- d) Sobre el material:
 - Tipo, fecha de recolección, método, fecha de remisión, conservación, medios, etc.

Rótulo

El rótulo del envase que contiene la muestra debe indicar:

- ◆ Tipo de muestra
 - ◆ Fecha de toma de la muestra
 - ◆ Animal al que pertenece
1. Tubos y frascos
 - Se rotulan con tela adhesiva y/o etiquetas adhesivas.
 - Las inscripciones se efectúan con bolígrafo o a máquina.
 - No usar marcadores.
 2. Jeringas: Ídem al a)
 3. Capilares:
 - Se rotulan con tela adhesiva formando una pequeña lengüeta en la que se realiza la inscripción.
 4. Paquetes:
 - Los paquetes de papel de aluminio se atan con un piolín al que se adosa la tela adhesiva tal como si se tratara de un capilar.
 5. Rotulación de cajas:

U R G E N T E

NOMBRE COMPLETO
TELEFONO
TIPO DE MUESTRA
FECHA
ANALISIS SOLICITADO

6.7 Remision de las muestras y acondicionamiento

Refrigeradas (4°C) (cuadro 6.3)

- a) Deben llegar al laboratorio en 6 – 12 horas.
- b) Muestras para aislamiento y sangre para serología.

MATERIALES NECESARIOS:

Con "sachets" refrigerantes:

- Algodón, bolitas de telgopor
- Viruta o aserrín, cartón
- Cajas de telgopor, a adhesiva

Con 1 a 4 Kg. de hielo en bloques o cubos en bolsa plástica resistente:

- Iden punto anterior

TÉCNICA:

- ◆ Tapizar el fondo de la caja con las muestras en sus respectivas bolsas plásticas. Solución C.
- ◆ Agregar material de "collage"(viruta, telgopor, etc).
- ◆ Luego colocar otra capa de algodón
- ◆ Tapar la caja y asegurar su hermeticidad circulando la unión de tapa y caja con una tela adhesiva.

Congeladas:

- a) Muestras para aislamiento y suero para serología
- b) Con hielo seco
- c) Con nitrógeno líquido (-196° C).

TÉCNICA:

- ◆ Agregar a una caja de telgopor ¼ de su capacidad de nitrógeno líquido.
- ◆ Incluir el material en bolsas plásticas.
- ◆ No colocar recipientes de vidrio.
- ◆ Tapar la caja y asegurar sus juntas con tela adhesiva.

Cuadro 6.3 : Toma y remisión de muestras.

MOMENTO DE RECOLECCION	MUESTRAS DE ELECCIÓN	CONDICIONES DE TEMPERATURA DE ENVIO
BHV (Bovine Herpes Virus) – 1 Al iniciarse los síntomas	De tracto respiratorio superior. De tracto genital. SNC. Abortos: líquidos y órganos fetales	Refrigerados
VDB (Virus de la Diarrea Viral Bovina)	De tracto digestivo, órganos Linfáticos, en especial ganglios mesentéricos. Médula ósea, bazo, pulmón, hígado, sangre exudado nasal	Refrigerado o congelado
PI (Para influenza) – 3	De tracto respiratorio superior e inferior. Contenido nasofaríngeo	" "
AdVB (Adenovirus)	" " "	" "
F A (Fiebre aftosa)	Líquido vesicular, trozo de epitelio de boca, patas o ubre afectados. Trozo de corazón afectado. Contenido esófago – faríngeo. Sangre.	" "
VEV (Virus de la estomatitis vesicular)	" " "	" "
EVB (Epstein Barr)	Contenido esófago-faríngeo. M.F. hisopado respiratorio.	" "
CVB (Citomegalovirus)	MF	" "
Pox V (Pox virus)	Liq. Vesículas. Trozo de epitelio afectado	" "
Rabia	Asta de amon, cerebro y cerebelo	" "
PPC o FPC (fiebre porcina clásica)	Tonsila, ganglio linfático. Hepatogástrico, bazo, riñón, hígado, pulmón. Sangre entera.	" "
PPA (Peste Porcina Africana)	" " "	" "
PVP (Parvovirus Porcino)	Fetos	Congelado
PRV (Pseudo-rabia)	Encéfalo, médula, tonsila, pulmón, bazo, riñón, suero, feto entero	Refrigerado
LA (Laringotraqueitis aviaria) Al iniciarse los síntomas	Exudado traqueal	"

6.8 Apéndice

Medios de Soporte

a) Medio Vallee

Glicerina neutra	0,5 l.
Agua tridestilada	0,5 l.
PO ₄ H ₂ K	0,9 g.
PO ₄ HK ₂	1,13 g.

Ajustar a pH 7,6 con NaOH al 20%

b) Medio PBS, pH 7,4 tampón fosfato

Solución A

NaCl	8,0 g.
KCl	0,2 g.
HNa ₂ PO ₄	1,15 g.
KH ₂ PO ₄	0,2 g.
H ₂ O c.s.p	1000 ml.

Solución B

CaCl ₂	0,1 g.
H ₂ O	100,0 ml
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	0,1 g.
H ₂ O	100,0 ml.

c) OPG (Solución anticoagulante preservativa para sangre entera – Lengua Azul-)

Oxalato de potasio	5 g.
Fenol	5 g.
Glicerina	500 ml.
H ₂ O destilada	500 ml.

Capítulo 7. SISTEMAS INDICADORES

7.1 Animales de laboratorio.

7.1.1 Introducción

Los animales que podemos utilizar en el laboratorio de virología diagnóstica son:

- Ratones: de preferencia lactantes de 1 a 5 días de nacidos son los mejores y se utiliza vía intracerebral
- Ratones destetados: ya con pelo, nos sirve para el virus de la rabia y encefalitis.
- Ratas.
- Conejos.
- Cobayos.
- Gerbos(ratones canguro): para virus emergentes.
- Equinos: útiles para zoonosis.
- Monos: excelentes por su similitud genética a los humanos, son muy caros. El mono verde esta en extinción.

Muchos de estos animales ya no se usan en el laboratorio por lo caro que resulta su mantenimiento. En realidad, el uso del ratón queda limitado por ahora al aislamiento de los arbovirus, virus de la rabia y algunos virus Coxsackie del grupo A; ratones lactantes de menos de 24 horas de edad son inyectados con aproximadamente 0.02 ml. de suspensión de virus, por vía intracerebral, y con 0.03 ml. por vía intraperitoneal, y posteriormente se observa durante 14 días esperando el desarrollo de los signos patognomónicos antes de que sean sacrificados para el estudio histopatológico.

Los animales mas grandes se usan muy rara vez para el aislamiento viral de rutina, aun cuando los monos, especialmente los chimpancés, se emplean rutinariamente, hoy en día, en los laboratorios que los pueden adquirir, para el intento de aislar virus humanos que todavía no son cultivables en ningún otro huésped extrahumano, por ejemplo, el virus de la hepatitis y varios agentes responsables de infecciones lentas en el cerebro del hombre, así como para estudios experimentales de patogénesis viral e inmunidad, para probar nuevas vacunas virales producir antisuero estándar.

7.2 Cultivo de tejidos.

El cultivo de tejidos es una técnica que nos permite reproducir y mantener células animales en circunstancias artificiales, facilitándonos el estudio de los virus, la preparación de vacunas virales y la ejecución de pruebas de diagnóstico.

El cultivo de tejidos fue empleado en un principio por el año de 1913, para la propagación de virus vacunal. Enders y Cols, en 1950 descubrieron que los poliovirus, podían ser propagados en cultivos de tejidos de origen no neural. Este dio bases para los grandes avances de la Virología.

Posteriormente se hicieron innovaciones de considerable importancia para el uso extensivo de cultivos celulares de virología, como fue la inclusión de antibióticos, antimicóticos en el medio de nutrientes, conduciéndonos estos a estudios de mayor duración, sin el peligro de contaminación de los cultivos; también el uso de agentes dispersantes de las células para la propagación de las líneas celulares fue el refinamiento de las técnicas de monoestratos de cultivos celulares y la elaboración de medios de cultivo, químicamente definidos libres de sustancias inhibitorias de virus.

Característica importante de los virus es que se puedan multiplicar en células vivas, por lo tanto para su perpetuación son inducidos a invadir células y aprovechar sus mecanismos sintéticos.

PREPARACIÓN DE MONOESTRATOS CELULARES:

Las fuentes de células para la preparación de cultivos celulares son los tejidos que se tienen a partir de fetos, de animales recién nacidos y animales adultos.

Los riñones y testículos son los más frecuentemente usados, aunque en la actualidad se pueden cultivar todos los tejidos animales.

Actualmente se usan tres tipos de cultivo celular:

1 Cultivo de Monoestratos.

Se divide en dos tipos: cultivos primarios y cultivos secundarios.

• Cultivos Primarios:

Los cultivos primarios no se emplean satisfactoriamente por la no uniformidad y la naturaleza rugosa de las células, pero aún así se logra distinguir los cambios morfológicos causados por algún virus.

Todo este proceso de metabolismo de las células, que se estén multiplicando, producen acidez del medio que lo hace peligroso para las células, por lo cual las células han obtenido su desarrollo, es reemplazado por medio de mantenimiento, para disminuir el metabolismo y así en ese estado de latencia las células pueden ser mantenidas por algún tiempo.

• Cultivos Secundarios:

Para esta clase de cultivos, las células provienen de cultivos primarios, dando origen hacia monoestratos. El término de monoestrato se usa para indicar que la capa de las células que ha crecido en la superficie de la botella es del grosor de una célula. En este tipo de cultivo se prepara la dispersión del estado del cultivo primario que haya crecido en la botella. Para la dispersión celular se usa tripsina al 0.25%, las células son cosechadas por centrifugación, se lavan y se suspenden en medio de cultivo y se cuentan. Luego se redistribuyen, se incuban de igual manera que los cultivos primarios.

2. Cultivos en Suspensión:

En este tipo de cultivos las células proliferan mientras estas suspendidas en el medio de cultivo. Las células se mantienen en movimiento para impedir que sedimenten en el fondo del recipiente. Debido a que el incremento de células es de 4 a 5 veces, la suspensión de células debe contener una concentración más alta de células que la que usamos para la preparación de cultivos de monoestratos.

3. Cultivo de Órganos:

Este tipo de cultivo consiste en trozos pequeños de órganos, estos fragmentos son puestos en un soporte de acero inoxidable contenido en una caja de Petri. Se pone medio de cultivo hasta que alcance el nivel del soporte y se incuban en una estufa de CO₂ del 5 al 10%.

El crecimiento de este tejido es continuo, así que la identidad o la parcial diferenciación de las estructuras es mantenida con éxito, la proliferación excesiva de tejidos es controlada ajustando los constituyentes del medio.

7.2.1 Cultivos en coágulos

Esta es de las primeras técnicas, que se utiliza aún hoy en día; se usa especialmente para estudios citológicos como excrescencias de un pedazo de tejido y se presta para la observación continua de zonas selectivas. De todos los métodos descritos, son dos los que combinan la mayoría de las ventajas.

7.2.1.1 Cultivos en tubo de ensayo

1. Se diseca asépticamente el tejido que va a ser cultivado. Se coloca en una caja de Petri esterilizada y se separa con agujas.
2. Con una pipeta Pasteur se colocan unas cuantas gotas de plasma de pollo en el fondo del tubo de ensayo.
3. Se hace girar el tubo suavemente entre las manos para extender el plasma sobre la superficie del tercio inferior del tubo.
4. Se colocan tres o cuatro fragmentos del tejido sobre el área cubierta por el plasma, el cual comenzará a coagularse. Si se requiere un coágulo más firme, se bañan los fragmentos con extracto embrionario EE₅₀.
5. Cuando ya está coagulado, se cubren los fragmentos con el medio de cultivo para tejidos:

SSB Hank	100 ml.
Hidrolizado de lactalbúmina en solución acuosa al 10%	5 ml.
Suero sanguíneo	10 ml.
Solución de Penicilina-Estreptomicina (SPE)	1 ml.

6. Se incuban los tubos y se examinan diariamente para observar el desarrollo
 - ♦ Si ocurre metabolismo se observará una caída del pH del medio.
 - ♦ Los cultivos se pueden alimentar, cambiándoles el medio según requiera.

7.2.1.2 Cultivos en cubreobjetos

Los cultivos se pueden montar en cubreobjetos flotantes. Estos son cubreobjetos angostos que se introducen en tubos de ensayo, que pueden retirarse después de la incubación, para teñirse y montarse como preparaciones permanentes.

1. Se coloca una gota de plasma a 50% en solución salina Hank, sobre el cubreobjetos.
2. Se sumergen uno o dos fragmentos de tejido en la gota.
3. Se le agrega una gota de extracto embrionario EE₅₀ y se mezcla suave pero rápidamente.
4. Se extiende sobre una superficie de aproximadamente 2 cm², se extienden los fragmentos de tejido y se deja formar el coágulo.
5. Se pasan los cubreobjetos a un tubo de ensayo y se cubren con el medio de cultivo como para cultivos en tubo de ensayo.

7.2.2 Cultivos Monoestrato.

Si una suspensión de células tisulares, incluida en un medio estimulante de desarrollo, se deja sedimentar sobre la superficie interna de un recipiente adecuado, por ejemplo una botella médica plana, las células se aplanarán y se dividirán para formar una capa de células que cubrirá toda la superficie.

Se hace referencia a tres tipos de cultivos celulares, como sigue:

1. Cultivos de células primarias, las cuales son derivadas inmediatamente de tejidos.
2. Cepas de células diploides, las cuales son subcultivos subsiguientes de cultivos de células primarias de tejidos diploides normales.

Las cepas celulares diploides finalmente fallecerán después de 50 a 70 subcultivos a menos que ocurra una mutación que produzca células poliploides o transformadas.

3. Las líneas celulares continuas, que son derivadas de células diploides transformadas o de tejidos neoplásicos, pueden ser subcultivadas sin límite aparente.

Para producir monoestratos, las células deben obtenerse en condiciones ideales como una suspensión de células individuales procedentes de tejidos o por desintegración de un monoestrato previo para realizar el subcultivo. Se han usado diferentes enzimas para este propósito, pero con mucho la más usada es la tripsina.

Agentes dispersos celulares

Se prepara una suspensión al 2.5% de tripsina en polvo purificada (Tripsina Difco 1:250), en solución salina amortiguada con fosfatos de Dulbecco o solución "A" (STF), agitando o batiendo durante una hora a 4° C. Se clarifica y se esteriliza por filtración. Se almacena a -20° C.

Para su uso se diluye al 1:10 en solución "A" STF. Esta dilución se usa ya sea para disgregar tejidos o para romper monoestratos celulares para subcultivos.

La propiedad de las células de adherirse a superficies adecuadas está condicionada a la presencia de los iones calcio y magnesio. En los subcultivos en monoestrato se puede usar un agente quelante el cual actúa retirando los iones calcio y magnesio, con lo cual libera las células de la superficie a la cual se hallaban adheridas.

Se prepara una solución patrón a 2% de ácido etileno diaminotetraacético (EDTA o versene) en solución "A" STF, sin la presencia de iones calcio o magnesio. Se esteriliza en el autoclave durante 15 minutos a 15 lb/pul². Se diluye al 1:100 en solución "A" STF para usarse, lo cual produce una concentración final al 1:5,000.

Para obtener monoestratos reproducibles, los tubos o los frascos deberán ser sembrados con un número regulado de células cada vez. Las células se pueden contar con el hemocitómetro y usando un colorante, se pueden diferenciar las células viables de las no viables. Un hemocitómetro de líneas brillantes del tipo Neubauer mejorado es el recomendado.

Método: A 1 ml. de suspensión celular se le agregan 0.2 ml. de Azul tripán disuelto en solución salina a 0.85%, el cual teñirá a las células no viables. Se llena la cámara de recuento y se cuentan las células viables de los cuatro cuadrados primarios de las esquinas. Se calcula el promedio de cuadrado y se multiplica por 6/5 para considerar el título de dilución con el colorante. Un cuadrado primario tiene las siguientes dimensiones: 1 mm x 1mm x 0.1mm, por consiguiente el factor $10^4 = 10 \times 10 \times 100$, expresará el número de células por ml.

Por ejemplo:

Cuenta promedio en un cuadrado primario, $125 \times 6/5 = 150$
considerando la dilución por el colorante
Células/ml. = $150 \times 10^4 = 1,500,000 = 1.5 \times 10^6$

Cultivos de epitelios ciliados embrionarios humanos (Hoorn, 1966)

Requerimiento:

- Instrumentos quirúrgicos esterilizados.
- Cajas de Petri esterilizadas.

Medio de cultivo para mantenimiento:

- | | |
|---|---------|
| ➤ Medio 199 | 100 ml. |
| ➤ Solución de bicarbonato de sodio al 3.5% | 0.1 ml. |
| ➤ Solución de penicilina-estreptomina (SPE) | 1 ml. |
| ➤ Nistanina 5,000 microgramos/ml. | 1 ml. |

Método:

1. Se reseca la tráquea de fetos abortados espontánea o terapéuticamente de 12 a 26 semanas de gestación y se pasa a una caja de Petri.
2. Se reseca todo el tejido circunvecino.
3. Se abre con corte longitudinal por medio de tijeras de punta fina haciendo 3 ó 4 tiras.
4. Se cortan transversalmente pedacitos de aproximadamente 20 mm².
5. Se colocan 3 ó 4 pedacitos en áreas formadas por líneas cruzadas en una caja de Petri, con la porción ciliada hacia arriba.
6. Se agrega medio de mantenimiento hasta el nivel del epitelio.
7. Se incuba a 37° C en una cámara húmeda.

Los cilios en movimientos se pueden ver por medio de luz incidente.

7.2.3 Clonas celulares.

Cualquier población celular contendrá células de distintas características las cuales han sido derivadas del tejido inicial, ya sea por mutación o por muchos subcultivos. Para muchos propósitos esto tiene poco significado; pero para el estudio detallado y exacto de las células, obviamente es de desearse un cultivo de células idénticas. Una línea celular se puede establecer a partir de una sola célula, la cual, al ser aislada, formará una clona, semejante a una colonia bacteriana. Al cultivarse una sola célula, es más difícil obtener las condiciones óptimas que cuando se cultivan numerosas células, las cuales pueden superar o modificar condicionados (es decir medios en los cuales ya se han desarrollado células), previa filtración, o alternativamente la presencia de células con proceso metabólico, pero que no se hallen en mitosis, pueden modificar suficientemente el medio para que una sola célula se desarrolle y se divida.

Método capilar:

1. Se tripsiniza un monoestrato celular y se resuspende en medio para desarrollo condicionado.
2. La concentración celular se ajusta a aproximadamente 50 células/ml.
3. Se llenan a la mitad tubos capilares de 5 cm. de longitud con la suspensión celular y se sellan a la flama en cada extremo por medio de un micromechero Bunsen.
4. Se incuban los tubos capilares a 37° C. durante 24 horas y se examina cada uno de ellos al microscopio.
5. Los tubos que contengan una o dos células saludables son seleccionados y se esterilizan por inmersión en cloroformo.
6. Cada tubo capilar se rompe en 2 o en 3 pedazos, los cuales se colocan cada uno en un tubo de ensayo separado y se cubren con medio condicionado para desarrollo.
7. Se incuban a 37° C. y se examinan diariamente al microscopio.
8. La célula única contenida dentro del pedazo del capilar se divide y finalmente las células crecerán fuera del tubo capilar, invadiendo el tubo de ensayo, de donde pueden ser subcultivadas progresivamente en recipientes más grandes.

Método de la microgota.

1. Se tripsiniza un monoestrato celular y se resuspende con medio condicionado para desarrollo.
2. Se ajusta la concentración celular para dar aproximadamente una célula en cada dos gotas de suspensión, al examen microscópico.

3. Se vierte parafina líquida esterilizada en cajas de Petri a una profundidad de 4 mm.
4. Luego se agregan de 3 a 4 gotas de la suspensión celular a cada caja, las cuales se hundirán bajo la parafina líquida; ésta mantendrá aisladas las gotas de suspensión celular entre sí, pero permitirá el paso de gases dentro de ellas y de ellas hacia el exterior.
5. Se incuba a 37° C. durante 24 horas, se examina al microscopio cada gota anotando cuáles contienen una sola célula sana.
6. Se vuelve a incubar a 37° C., examinando diariamente hasta que se forme una clona de 30 a 40 células. El medio se puede retirar con una fina pipeta Pasteur capilar, reemplazándose con nuevo medio si es necesario.
7. Cuando la clona está suficientemente desarrollada, se puede sustituir el medio por suspensión de tripsina a 0.25% en SSB Hank durante unos pocos minutos, con lo cual se liberan las células de la superficie y pueden ser trasladadas a un pequeño tubo de ensayo que contiene medio para desarrollo. Se puede establecer una estirpe celular por cultivos sucesivos en recipientes cada vez más grandes.

Método de células alimentadoras.

1. Se expone a los rayos X una botella médica o una caja de Petri que contenga un monoestrato celular, para destruir la capacidad de las células para dividirse, permitiéndoles sin embargo metabolizar.
2. Se introducen unas cuantas microgotas de suspensión celular, preparada como se dijo para la técnica de microgota. También se deben incubar unos cuantos cultivos irradiados, sin agregarles células, para detectar las posibilidades de división de las células alimentadoras en caso de que las dosis de rayos X hayan sido demasiado bajas.
3. Se incuba a 37° C., examinando diariamente al microscopio y cambiando el medio cuando sea necesario, lo cual se indica por una caída en el pH.
4. Las clones seleccionadas se pueden retirar, colocando sobre cada una un cilindro de vidrio de 12 mm. de largo cuyo borde inferior se ha cubierto con grasa de silicón.
5. Se retira el medio contenido dentro del cilindro y se sustituye con suspensión de tripsina a 0.25% en SSB Hank.
6. Se retiran las células una vez liberadas y se pasan a un tubo de ensayo que contenga medio para desarrollo fresco, donde las células de la clona se dividirán y las células irradiadas irán falleciendo.
7. Se puede establecer una línea celular mediante subcultivos progresivos en recipientes cada vez más grandes.

7.2.4 Almacenamiento celular.

Las células pueden almacenarse durante años a bajas temperaturas y aun conservar su viabilidad. Los propósitos para el almacenaje celular son los siguientes:

1. Evitar la necesidad de subcultivos sucesivos de una estirpe celular que no esté en uso corriente.
2. Para mantener una provisión de células contra la pérdida accidental de un cultivo celular, por ejemplo, por contaminación.
3. Para disponer de células como referencia, frente a células en uso corriente que puedan cotejarse para evidenciar mutaciones, sensibilidad a los virus, etc.
4. Para mantener una confluencia de células diploides de baja viabilidad por pasos sucesivos, la cual podría proveer esta clase de células durante muchos años: en otras condiciones estas células irían falleciendo después de 50 ó 70 subcultivos.

Cuando se congelan lentamente las células animales, se forman cristales de hielo extracelularmente, deshidratando a las células hasta que son bañadas en un concentrado de sus propios solutos. Alternativamente, si

las células son congeladas rápidamente, los cristales de hielo se forman intracelularmente y rompen la pared celular.

En 1949 se encontró que la glicerina protegería a las células de los efectos de la congelación al ligar el agua impidiéndole cristalizarse, con lo que permanece todavía como solvente. Esta técnica se ha aplicado al cultivo de tejidos con éxito aceptable, pero más recientemente Lovelock y Bishop (1959), demostraron que el dimetil sulfóxido resultaba ser un agente protector más confiable. Un factor crítico en el proceso es el ritmo de enfriamiento. Se ha encontrado que un ritmo de enfriamiento de -1°C. $-2^{\circ}\text{C./minuto}$ hasta los -25°C. , seguido de un enfriamiento rápido a -70°C. o más bajo, produce la mejor supervivencia celular. Existe equipo de enfriamiento regulado; pero su alto precio lo convierte en un lujo, de no ser para los bancos celulares más grandes.

Se pueden construir en el laboratorio dispositivos con un ritmo de enfriamiento satisfactorio, por el método de prueba y error o más simplemente aun, las células se pueden cambiar por pasos de refrigeración a congelación y de allí a un congelador a -20°C. y finalmente a un congelador a -70°C. Otro método consiste en construir una caja de poliestireno de 2.22 cm. con dimensiones interiores de 10 cm. de profundidad por 28 cm^2 , con tapa del mismo material. Las células que se desean congelar son envasadas en ampollitas y se colocan dentro de la caja junto con una canastilla de alambre llena de "Cardice". Después de una hora se retiran las ampollitas y se almacenan a -70°C. o más bajo.

Otro dispositivo, consiste en un bote de aluminio que contenga alcohol, dentro del cual se colocan las células en ampollitas. El bote flota en un vaso de precipitados de polietileno que contiene glicerina a 20% en agua, dicho vaso flota a su vez en una mezcla congelante de alcohol con "Cardice". La glicerina proporciona un transporte lento de calor entre el bote de aluminio y la mezcla congelante.

Aunque las células se pueden almacenar más o menos adecuadamente durante un periodo de algunos años a -70°C. , hay indicaciones de que con el uso del nitrógeno líquido se prolongan los periodos de almacenaje al descender la temperatura hasta -195°C.

Algunos refrigeradores para nitrógeno líquido (Unión Carbide U. K. Ltd.) tienen un "congelador biológico". Este congelador es básicamente un núcleo, al cual se adhieren las ampollitas, que se insertan en un tapón al cual a su vez está colocado en el cuello del recipiente de refrigeración. El vapor que se forma sobre el nitrógeno líquido enfría a las ampollitas a un ritmo que va desde -0.5°C. a $-7^{\circ}\text{C./minuto}$, dependiendo de la posición de las ampollitas sobre dicho centro.

Método de la glicerina:

1. Se dispersan los monoestratos celulares con tripsina o con versene, se centrifuga descartando el sobrenadante y se resuspende con MME Eagle que contenga 10% de suero sanguíneo y 10% de glicerina.
2. Se cuenta y se ajusta la suspensión a 2×10^6 de células/ml.
3. Se deja en el refrigerador a 4°C durante la noche para permitir que la glicerina penetre la membrana celular.
4. Se enfría a un ritmo de -1°C. a -2°C. hasta llegar a -25°C.
5. Se coloca a -70°C. o más bajo para almacenar.
6. Para recuperar las células se deshíela rápidamente con movimientos circulares en un baño de María a 37°C.
7. Se siembra una botella médica plana de 120 ml. con 1 ml. de la suspensión celular y 9 ml. del medio para desarrollo o proporcionalmente para otros recipientes.
8. Se incuba a 37°C. durante la noche y se repone el medio con otro para desarrollo fresco.

Método de dimetil sulfóxido:

1. Se dispersan las monocapas celulares con tripsina o con versene, se centrifuga descartando el sobrenadante y se resuspenden las células con MME Eagle que contenga 10% de suero sanguíneo y 10% de dimetil sulfóxido.

2. Se cuenta y se reajusta la suspensión a 2×10^6 de células/ml.
3. Se enfría a un ritmo de -1°C . a -2°C . por minuto hasta -25°C .
4. Se coloca a -70°C . o más bajo para el almacenamiento.
5. Para recuperar las células se deshiela rápidamente con movimientos circulares en baño María a 37°C .
6. Se centrifuga descartando el sobrenadante y se resuspenden las células con 10 volúmenes de medio para desarrollo.
7. Se repite una vez más el paso 6).
8. Se siembra en una botella médica plana de 120 ml. con 10 ml. o a "prorrata" para otros recipientes.
9. Se incuba durante la noche a 37°C y se repone el medio por otro nuevo de desarrollo.

Preparaciones para cromosomas.

Algunas veces es necesario cotejar el patrón cromosómico de las células de cultivo de tejidos, para determinar el grado de mutación que pueda haber ocurrido durante un periodo de tiempo. Hay varios métodos disponibles y el de Imán (1968) se ha usado para el cultivo de tejidos con buenos resultados.

o **Reactivos:**

Colcemida. Esta es un derivado de la colquicina (N-desacetil-N-metilcolquicina), que frena la división de la metafase al inhibir la formación del huso.

Solución patrón:

Colcemida (Ciba)	100 mg.
Agua desionizada	100 ml.

Se prepara una solución de trabajo a 0.1 mg% diluyendo la solución patrón al 1:1,000 con SSB Hank.

o **Tripsina:**

Solución patrón (al 1%):

Tripsina de Difco (1:250)	1 g.
SSB de Hank	100 ml.

Solución de trabajo (0.05%):

Suspensión patrón de tripsina	1 ml.
SSB Hank	19 ml.

o **Fijador:**

Alcohol metílico	75 ml.
Ácido acético glacial	25 ml.

Se prepara fresco cada vez antes de usarse.

o **Colorantes:**

May-Grünwald, ya preparada (G. T. Gurr).
Giemsa R. 66, ya preparada (G. T. Gurr).

Método:

Deben usarse células procedentes de películas celulares jóvenes, ya que así contendrán una alta proporción de células en mitosis. Un tratamiento de choque con frío antes de aplicar la Colcemida parece aumentar la proporción de células en mitosis en cultivos de más edad.

1. Se colocan los cultivos a 4°C . durante 30 minutos.
2. Se vuelven a incubar a 37°C . durante 30 minutos.

3. Se agregan 0.2 ml. de la solución de Colcemida a 0.1 mg% a cada 5 ml. del medio.
4. Se incuban los cultivos durante 5 horas a 37° C.
5. Se retira con cuidado el medio de las capas celulares.
6. Se disgregan las películas celulares con suspensión de tripsina a 0.05% a 37° C.
7. Se centrifugan a 500 rpm. durante 10 minutos, se descarta el líquido sobrenadante.
8. Se agrandan las células resuspendiéndolas en SSB Hank diluida al 1:4 en agua desionizada.
9. Se coloca a 37° C. durante 20 minutos.
10. Se centrifuga a 500 rpm durante 10 minutos, se descarta el líquido sobrenadante.
11. Sin romper el sedimento, se fija con la mezcla alcohol metílico, ácido acético durante 30 minutos.
12. Se descarta el fijador y se resuspenden las células en nuevo fijador (0.25 ml.), aspirando y expulsando con la pipeta hasta lograr una suspensión homogénea de células.
13. Se sostienen las laminillas, que se han enfriado en agua helada, a un ángulo de 45° C. y se deja correr una gota de la suspensión celular de arriba abajo.
14. Se secan los frotis con movimientos vigorosos en el aire y finalmente a la flama.
15. Se tiñen durante 3 minutos en el colorante de May-Grünwald diluido al 2:3 en solución amortiguada fosfatada con pH de 6.8.
16. Se escurre el colorante y se substituye por el de Giemsa, diluido al 1:4 en solución amortiguada fosfatada con pH de 6.8, durante 20 minutos.
17. Se lava con agua simple y se sumerge las preparaciones en solución amortiguada fosfatada con pH de 6.8, durante 1 o 2 minutos, hasta lograr la diferenciación.
18. Se secan completamente con papel filtro o secante.
19. Se flamean ligeramente y se montan con DPX (G. T. Gurr).

7.2.5 Aplicaciones virológicas del cultivo de tejidos.

Introducción.

Se pueden mantener durante semanas monoestratos de células sin desarrollo, empleando medio esencial mínimo, por ejemplo, el medio 199 o el MME Eagle sin suero sanguíneo, permitiendo así que los virus se desarrollen en un medio ambiente relativamente estable. Un virus penetrará en una célula susceptible y se replicará, frecuentemente dañando o matando a la célula. Los efectos de los virus se pueden inhibir con antisueros específicos si el virus entra en contacto con anticuerpos homólogos, mientras sea extracelular. De esto se deduce que los virus pueden ser identificados usando antisueros conocidos, y así también se pueden detectar y cuantificar los anticuerpos usando virus conocidos. Como en todos los métodos cuantitativos, los agentes reaccionantes deben ser normalizados. El título de un antisuero está condicionado a la cantidad de antígeno (virus), y el antígeno puede inundar a un antisuero a concentración demasiado baja. El método diseñado por Kärber (1931) se usa para determinar el punto final a 50% (TCD₅₀ o sea la dilución vírica total de 50% de los virus) de una titulación sérica o viral, es decir, la dilución a la cual 50% de los cultivos inoculados resultan positivos cuando se leen los resultados.

Titulaciones de virus:

Dilución viral	Positiva	Negativa	Porcentaje de positivas
10^{-1}	6	0	100
10^{-2}	6	0	100
10^{-3}	4	2	66
10^{-4}	1	6	17
10^{-5}	0	0	0

Se aplica la fórmula de Kärber.

Logaritmo negativo de la dilución más baja.

$$-\left(\frac{\text{Suma del \% positivo}}{100} - 0.5\right) \times \text{el intervalo logarítmico} = -\left(\frac{100+100+66+17}{100} - 0.5\right) \times 1 =$$

$$-1.0 - (2.8 - 0.5) \times 1 = 1.0 - 2.3 = -3.3$$

Por consiguiente el punto final al 50% o $\text{TCD}_{50} = 10^{-3.3}$

Ejemplo de titulaciones séricas:

Diluciones séricas	Positiva	Negativa (protegida)	Porcentaje (protegido)
$1:16 = 10^{-1.2}$	0	6	100
$1:32 = 10^{-1.5}$	2	4	66
$1:64 = 10^{-1.8}$	4	2	33
$1:128 = 10^{-2.1}$	5	1	17
$1:256 = 10^{-2.4}$	6	0	0

Aplicando la fórmula de Kärber,

$$-1.2 - \left(\frac{100 + 66 + 33 + 17}{100} - 0.5\right) \times 0.3 = -1.2 - (2.16 - 0.5) \times 0.3 = -1.2 - 0.5 = -1.7$$

Por consiguiente al título del suero = $10^{-1.7} = 1/50$.

La aplicación del cultivo de tejidos a la virología depende del efecto que los virus ejercen sobre las células y los medios mediante los cuales son detectados.

7.2.6 Tipos de cultivo de tejidos.

Hay 3 métodos principales de iniciar un cultivo (tabla 7.1).

(1) **Cultivo de órganos** implica que la arquitectura característica del tejido *in vivo* es retenida, al menos en parte en el cultivo. Hacia este fin el tejido es cultivado en la interfase gas- líquido (sobre una bolsa, reja o gel), lo cual favorece la retención de una forma esférica o tridimensional.

(2) En cultivo de explante primario, un fragmento de tejido es puesto en un vidrio (plástico)- interfase –líquida, donde, siguiendo con apego, la migración es promovida en el plano de el substrato líquido.

(3) Cultivo celular implica que el tejido, o sin crecimiento del explante primario, es dispersado (mecánicamente o enzimáticamente) dentro de una suspensión de células la cual después puede ser cultivada como una monocapa adherente sobre un substrato sólido ó como una suspensión en el medio de cultivo.

Porque de la retención de la interacción de células fundada en el tejido del cual el cultivo fue derivado, cultivos de órganos cuidados para retener la diferenciación apropiada de ese tejido. Ellas no crecen rápidamente (la proliferación celular es limitada hacia la periferia de el explante y es restringida principalmente para tejidos embrionarios) y por lo tanto no puede ser propagado; cada experimento requiere explantaciones frescas; lo cual implica mayor dificultad y poca reproducibilidad de la muestra que es lograda con cultivo celular. La cuantificación es sin embargo, mas difícil y la cantidad de material que puede ser cultivada es limitada por las dimensiones del explante (1mm^2) y la dificultad requerida para la disección y colocación del cultivo. Sin embargo los cultivos de órganos retienen interacciones histológicas específicas sin las cuales puede ser dificultoso para reproducir las características del tejido.

Los cultivos celulares pueden ser derivados de explantes primarios o células dispersadas en suspensión. Porque la proliferación celular es frecuentemente fundada en tales cultivos, la propagación de las líneas celulares se vuelven factibles. Una monocapa o suspensión celular con una significativa fracción de crecimiento, puede ser dispersado por tratamiento enzimático o dilución simple y replantado o subcultivado, dentro de los frascos nuevos. Esto constituye un pase, y las hijas del cultivo así formadas son el comienzo de una línea celular.

La formación de una línea celular de un cultivo primario implica:

(1) Un incremento en el número total de células terminando varias generaciones.

(2) La ultima predominancia de células o linajes celulares con la capacidad para alto crecimiento, resultando en,

(3) un grado de uniformidad en la población celular. La línea puede ser caracterizada, y las características a voluntad aplicadas para la mayoría de estos lapsos de vida finitos. La derivación de continuos (o “establecidos” como ellos fueron conocidos) las líneas celulares generalmente implican un cambio fenotípico, o transformación.

Cuando las células son seleccionadas de un cultivo, por clonación o por algún otro método, la sublínea es conocida como una tendencia celular. Una caracterización detallada es después implicada. Las líneas celulares o tendencias celulares pueden ser propagadas como una monocapa adherente o en suspensión. El cultivo de monocapas significa que, dan la oportunidad, las células voluntariamente propagadas de este modo.

Anclaje dependiente medios apagados hacia (y generalmente, algún grado de extensión hacia) el substrato es un prerrequisito para la proliferación celular. Cultivos de monocapa es el modo de cultivo común para la mayoría de células normales, con la excepción de células hematopoyéticas. Cultivos en suspensión son derivados de células que pueden sobrevivir y ploriferarse sin ataduras (anclaje-independiente); esta habilidad es restringida para células hematopoyéticas, transformación de líneas celulares, y células procedentes de tumores malignos. Puede ser mostrado, sin embargo, que una pequeña proporción de células que son capaces de ploriferación en suspensión, existen en muchos tejidos normales. La identidad de esos vestigios sucios de células, pero una relación hacia el tallo celular o precursor celular in vivo que de llenado de células diferenciadas, como, normalmente, la mayoría de células diferenciadas no se divide.

Tabla 7.1 Propiedades de diferentes tipos de cultivo

CATEGORIA	CULTIVO DE ORGANOS	EXPLANTE	CULTIVO CELULAR
Fuente	Órganos embrionarios, fragmentados de tejido adulto	Fragmentos de tejido	Tejido disgregado, cultivo primario, línea celular propagada.
Dificultad	Alto	Moderado	Bajo
Caracterización	Fácil, histología	Citología y marcadores	Bioquímico, molecular, inmunológico y ensayos citológicos
Histología	Informativo	Difícil	No aplicable
Diferenciación Bioquímica	Posible	Heterogéneo	Perdido, pero debe ser reinducido
Propagación	No posible	Posible	Procedimiento
Replicación de muestra, reproducibilidad, homogeneidad	Alto intermuestreo, variación	Alto intermuestreo, variación	Bajo nivel de variación
Cuantificación	Dificultad	Dificultad	Fácil; muchas técnicas disponibles

Tomado de Wiley Liss a Wiley John. Culture of animal Cells a Manual of Basic Technique

7.2.7 Cultivo primario de embrión de pollo (fibroblastos).

Material:

- Embriones de pollo, vivos, observados en el ovoscopio.
- Embudos con gasa estéril.
- Pinzas estériles
- Tijeras rectas y curvas estériles
- Cajas de Petri.
- Cámara de Newbawer
- Tubos de centrifuga estériles
- Vaso de precipitados para desechos.

Soluciones:

- Suero Fetal Bovino
- Medio de crecimiento
- Medio de mantenimiento
- Azul de Tripán al 0.1%
- Alcohol al 70%
- Lugol

Técnica:

1. Se eligen huevos embrionados de 9 a 11 días de edad.
2. Se observan al ovoscopio la viabilidad de los embriones.
3. Trabajando en condiciones estériles, se procede a limpiar los huevos por inmersión en etanol al 70%.
4. Se limpia con gasa estéril y se le pone un poco de lugol, en la parte donde se encuentra la cámara de aire.
5. Se hace un pequeño orificio con cuidado con la punta de la tijera y se corta toda la parte de arriba de la cámara de aire.
6. Se saca el embrión con pinzas estériles y se pone en una caja de Petri estéril, se lava dos veces con PBS.

7. Se cortan, ojos, pico, alas, patas y vísceras, lo demás del cuerpo se lava dos veces con PBS.
8. Se corta en pequeños pedacitos y se pasa por una jeringa estéril a un matraz de tripsinización, con 10 veces el volumen de tripsina al 0.25% del volumen tisular, precalentada a 37° C.
9. Se pone en un agitador magnético durante 5 min.
10. Se pasa por un embudo con gasa estéril, y lo que queda en la parte de arriba, se vuelve a poner en el matraz con el mismo volumen de tripsina y se pone en el agitador magnético durante 20-30 min.
11. Se pasa por un embudo con gasa y se colecta, el líquido en tubos estériles de centrífuga, con 10 ml. de medio al 10% de suero ó se deja sedimentar y se decanta el sol.
12. Se centrifuga durante 15 min. a 1000 r.p.m.
13. Desechar el sobrenadante y se suspende el sedimento celular en medio limpio.
14. Realizar el conteo en la cámara de Newbawer:

Se diluye 0.5 ml. de suspensión + 0.1 ml. de colorante.

total de células = # de células contadas X 2400 x ml. de susp.

ó

De los 4 cuadros primarios de las esquinas, se calcula el promedio y se multiplica por 6/5, considerar el título de dilución con el colorante. Un cuadro tiene las siguientes dimensiones 1 mm. x .1 mm. por consiguiente el valor del factor de dilución es 10^4 y nos dará el # total de células por ml.

15. Se pone en cada botella una concentración de aproximadamente 2×10^6 , utilizando 15 ml. por cada botella de medio de cultivo. Figura No.
16. Se tapan herméticamente y se incuban a 37° C hasta confluencia en la botella de leche, se cambiará el medio a las 24 hrs.
17. Se podrá realizar pase, ó se podrá infectar.

7.2.8 Cultivo primario de riñón de cerdo (células epiteliales).

Materiales:

- Botellas de leche
- Embudos estériles
- Pinzas estériles
- Tijeras estériles
- Cajas de Petri estériles
- Pipetas estériles
- Cámara de newbawer
- Tubos de centrífuga estériles
- Vaso de precipitados para desechos

Soluciones:

- Medio de crecimiento y mantenimiento
- Suero Fetal Bovino
- L-Glutamina
- Antibióticos
- Azul de Tripán al 0.1%
- Alcohol al 70%

Técnica:

1. Se eligen de fetos de cerdos de 3 meses de edad, riñones, transportados bajo condiciones asépticas y sumergidos en medio de crecimiento, en baño de hielo.
2. Llegando al laboratorio se desecha el medio en que se transportaron los riñones y se lavan 2 veces con PBS+antibióticos.
3. Se elimina la pelvis renal y la membrana (cápsula) que la cubre, así como las ramificaciones de tejido membranoso, haciéndolo con mucho cuidado.
4. Se corta en pedacitos muy finos con un bisturí o tijeras pasando la pulpa a una caja de Petri estéril y se lavan los fragmentos dos veces con PBS.
5. Los fragmentos se pasan a un tripsinizador con tripsina-versene al 0.25%, colocándose en un agitador magnético durante 30 a 45 min. a temperatura ambiente.
6. Se pasa por una gasa estéril y se recibe en tubos de centrifuga con medio preparado, se centrifuga a 1000 r.p.m. por 10 min. si los fragmentos no están totalmente tripsinizados, se procede a repetir la tripsinización.
7. Se elimina el sobrenadante y se resuspenden las células, si se desea se pueden lavar dos veces con PBS.
8. Se cuenta las células de igual forma que el anterior tratamiento.
9. Poner una concentración de 2×10^6 células por ml.
10. Cerrar herméticamente cada botella de leche ya preparada con 15 ml. de medio de crecimiento y las células.
11. Roturarlas correctamente.
12. Después de 24 hrs. de cambia de medio de crecimiento y a la confluencia de las células en las botellas se cambia a medio de mantenimiento.

7.2.9 Cultivo de riñón de aves.

Material:

- El mismo

Soluciones:

- Iguales

Técnica:

1. De un ave adulta, anestesiada con éter o cloroformo, limpiada de todo el cuerpo con desinfectantes.
2. Se abre de la parte ventral hacia el abdomen.
3. Se obtienen los riñones
4. Se lleva la tripsinización de la misma forma anterior
5. Se pone la misma concentración de células por ml. en medio de crecimiento.
6. Se repite los pasos 10-12.

7.2.10 CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES

Materiales:

- Botellas de leche
- Tubos de centrifuga estériles
- Pipetas estériles
- Perillas

Soluciones: Medio de crecimiento y medio de mantenimiento, Tripsina-Versene

Técnica:

1. Se descongela una línea celular (ver la técnica de descongelación).
2. Se pone en medio de crecimiento.
3. A las 24 hrs. se le cambia el medio de crecimiento.
4. La confluencia se presenta aproximadamente a los 3 días.
5. Se realizará un pase, se desecha el medio que tiene y se lava dos veces con tripsina-versana, luego se desechan y se le agrega 5 ml. de este misma tripsina-versene y se incuba a 37° C. por 5 min. Después se le da unos pequeños golpes, se toman las células con pipeta estéril, se dejan caer tres veces en la misma botella.
6. Se pasan a tubos de centrifuga estériles y se centrifuga 10 min. a 1000 r.p.m.
7. Se desecha el sobrenadante y se resuspenden las células en medio preparado.
8. Se reparte en botellas de leche una concentración aproximada de 2×10^6 células por ml. con 15 ml. de medio de crecimiento.
9. Se incuban a 37° C., hasta que se observe un cultivo confluyente.

7.2.11 Infección de monoestratos celulares.

Estudios hechos en el campo de la Virología han demostrado que ciertas líneas o sistemas celulares son susceptibles con mayor o menor grado a ciertos agentes virales y en ocasiones son totalmente resistentes o no se puede detectar la presencia de esas partículas en una forma determinante. Se han preparado con diferentes temperaturas y los resultados obtenidos nos indican que hay diversidad en la capacidad de infección, determinados por varios factores.

Por otra parte la detección de la presencia de los virus en cultivos celulares pueden manifestarse de diferentes formas y en ocasiones es casi imposible determinarla. Dentro de las técnicas más usualmente usadas para la detección de los virus en cultivos celulares, tenemos: La observación directa del efecto citopático que producen ciertos virus; La inmunofluorescencia que nos permite conocer la presencia del virus en una forma definida y específica; La hemoadsorción que en algunas ocasiones sirve para indicar la presencia de virus en cultivos celulares; La observación directa de las partículas víricas en el microscopio electrónico, nos indica la presencia del virus y por último la inhibición metabólica de células que producen ciertos virus, también nos indica la presencia de alguno de ellos.

Algunos virus producirán alteraciones microscópicas visibles en las células huéspedes. Los virus de la poliomielitis determinan que las células se redondeen, se encojan y se vuelvan picnóticas. Los adenovirus producen efectos de "Encaje Viejo" con aglomerados de células unidas por hilos citoplasmáticos. Los virus de la Parotiditis epidémica provocan la unión de células en un sincitio multinuclear. Los herpesvirus hinchan a las células en fos sobre la capa celular.

Técnica:

1. A los cultivos celulares confluyente, se les inocula 1 ml. de virus y se incuban durante 1 hr. a 37° C.
2. Poner el medio de mantenimiento y cerradas se incubarán a 37° C. durante 7 días, revisándolos diariamente, comparando cada botella con una botella de cultivo celular sin virus (control).
3. Terminado el período de los 7 días, se inactivarán por calor húmedo y se lavarán las botellas.

7.2.12 Prueba en placas.

Un método preciso para detectar la infectividad de los virus en cultivos celulares es la prueba de placa = Unidades formadoras de placas. Esta técnica fue adaptada por primera vez por Dulbecco y desde entonces ha sido ampliamente modificada y ampliada por algunos virologos.

Las partículas víricas que infectan y se multiplican en las células se encuentran localizadas en concentraciones que dan origen a las placas. Estas son áreas circunscritas de degeneración celular, estando todo el sistema en un estado semisólido (gel), lo cuál inmoviliza las células pero permite que el virus se disemine de la célula infectada originalmente a las células vecinas.

Una característica de las células vivas es que se tiñen con colorantes vitales como el rojo neutro. En este caso las placas son concentraciones de virus donde las células están muertas y que no se tiñen al contacto del colorante vital, por lo cuál por comparación de color, las placas pueden verse cuando se aplica una luz de contraste, eliminando turbulencias. Esencialmente una placa es formada a partir de una partícula viral. Uno de los principales usos de esta prueba es la cuantificación de la infectividad viral, así como la capacidad de neutralización de sueros. También líneas puras de virus pueden ser purificadas con este proceso por medio de la subpases de la progenie de virus a partir de una sola placa.

Cuando una cepa celular infectada se cubre con medio de cultivo para mantenimiento, los virus son liberados por las células infectadas y se diseminan a través del medio líquido para infectar otras células. Sin embargo si el medio se solidifica con agar, no puede ocurrir la diseminación de los virus y la extensión de la infección se limita a aquellas células que se hallan inmediatamente adyacentes a las células infectadas al principio.

Se obtiene con facilidad una atmósfera que contenga CO_2 , en una estufa que vaya conectada a un tanque de CO_2 , purgando dos veces la cámara, después de poner las cajas de incubación. Aproximadamente pasa un 5% de CO_2 .

Hay dos métodos por medio de los cuáles se pueden obtener UFP.

1. El método original de Dulbecco (1952), que consiste en cubrir a la célula infectada con medio de cultivo que contenga gelosa, la ventaja de está técnica consiste en cubrir a la célula infectada con medio de cultivo que contenga gelosa, la desventaja de esta técnica consiste en la necesidad de cultivar las células en un monoestrato confluyente.
2. Cooper diseño un método mediante el cuál una suspensión de células infectadas se mezcla con gelosa y se vacía con una cepa sobre una película basal de gelosa. La técnica de Cooper, aunque permite la disponibilidad inmediata de una técnica de placas, requiere más celulosas inicialmente, ya que no ocurrirán más divisiones celulares una vez que las células se mantengan en un medio de gelosa.

Material:

- Botellas de leche
- Tubos de centrifuga estériles
- Tubos de ensaye estériles
- Cajas de Petri Falcón
- Pipetas
- Vaso de precipitados.

Soluciones:

- PBS a pH = 7.2
- Tripsina Versene
- MEM con sales de EARLE
- Suero fetal bovino
- L-Glutamina
- Pen-Strep
- Piruvato: Sol. Amortiguadora de fosfatos-formol al 10%
- Solución de Giemsa al 20%

Técnica:

1. Botellas confluentes con cultivo celular de PK-15, se lleva a cabo la metodología para hacer pase de las células con tripsina-versene.
2. En cajas de Petri Falcón se pone aproximadamente 2×10^4 por ml., cada caja lleva 2.5 ml. de Medio de crecimiento con la concentración adecuada.
3. Las cajas se incubarán a 37°C . por 48 hrs. en atmósfera de CO_2 (31.5 grs. de CO_2), hasta confluencia.
4. En zonas de esterilidad se hacen las diluciones en tubos de ensaye con 0.9 ml. de PBS y dlocándose 0.1 ml. de virus pasando 0.1 ml. en cada tubo, hasta 10^8 , homogenizándolas bien.
5. De estas preparaciones se tomará 0.1 ml. y se pondrá en las cajas (1 caja por dilución).
6. Se incubara una hora a 37°C . en atmósfera de CO_2 .
7. se prepara MEM con sales de EARLE 2 X adicionándole agarosa al 1.5% en una proporción de 50% cada uno.
8. Se elimina el líquido de infección y se le agrega al medio 2.5 ml. de MEM 2X, agarosa por placa.
9. Se incubará durante 5 días y se le agregará 2 ml. de PBS formol a la capa de agar formada, incubándose durante 1 hr. a 4°C .
10. Después de 1 hr. se sacan y se elimina el contenido y se lavarán al agua corriente, hasta que se deseche todo el agar de la caja Falcón.
11. Se sacarán a temperatura ambiente.
12. Se teñirán con el colorante de Giemsa durante 1 hrs.
13. Se lava con agua corriente, hasta que el agua salga clara.
14. Se secarán a temperatura ambiente.
15. Se medirán cada placa y se contara el # total de placas para realizar Unidades Formadoras de Placas.

7.2.13 Congelación de células para cultivos celulares.

A.-

1. Desprender las células del vidrio con T-V como si fuera a realizar un pase.
2. Agregar una pequeña cantidad de medio y centrifugar las células a 6000-8000 r.p.m. durante 5 min.
3. Hacer una suspensión de células (aproximadamente 1 cc de paquetes de células en 10 ml. de medio) en el medio usual de iniciación con 20% de suero y 10% de Glicerina (esterilizada por autoclave).
4. Con una jeringa estéril de 10 ml., poner 1 ml. de la suspensión de células en cada una de las ampolletas especiales para congelar.
5. Sellar las ampolletas con un soplete de propano.
6. Poner las ampolletas en el congelador, previamente enfriadas, 1 hr. a 4°C ., 24 hrs. en refrigerador -70°C . y después pasarlas a nitrógeno líquido, hasta 1 año, pueden durar.
7. Cuando las células están listas, pueden ser conservadas por este método.

7.2.14 Descongelación de células para cultivos celulares.

1. Sacar las ampolletas congeladas del tanque de nitrógeno líquido e inmediatamente descongelarlas en baño maría a 37°C . agitándolas.
2. Esterilizar la parte externa de la ampolleta sumergiéndola en una solución de ETOH al 70%.
3. Remover la suspensión de células con una jeringa.
4. Romper la ampolleta, utilizando gasas impregnadas de ETOH.
5. Poner las células ya descongeladas con una jeringa de una botella de Blake con medio de crecimiento.
6. Cambiar el medio de cultivo a las 5-8 hrs.
7. Incubarlas en la estufa a 37°C .

Con las células de una botella de Roux, se pueden hacer 3 ampollitas y estas nos van a dar 3 botellas de Blake ó de Roux.

Técnica usada en el Instituto de Virología de la Universidad de Cornell.

B.-

1. Colectar las células por tripsinización.
2. Centrifugar 1000 r.p.m. x 10 min.
3. Preparar 1:20 de la suspensión del paquete en medio de crecimiento en glicerina estéril en una razón de 0.5:8.5:1. La concentración final de las células es de 5%.
4. Distribuir 1 ml. con una jeringa en los viales para congelación y ponerlo en una caja.
5. Almacenará en el refrigerador a 4° C. por 2 hrs.
6. Transferirá la caja a -20° C. por 2 hrs.
7. Pasarla al REVCO a -70° C. toda la noche.
8. Finalmente ponerlas en el tanque de nitrógeno líquido (-196° C.), mantener siempre el nivel del N.

C.- Método de la Glicerina

1. Se dispersan los monoestratos celulares con tripsina-versene, se centrifuga descartando el sobrenadante.
2. Se resuspende con medio de crecimiento (10% de suero sanguíneo y 10% de glicerina).
3. Se cuentan y se ajustan las células a 2×10^6 cel/ml.
4. Se pone en el refrigerador a 4° C. durante la noche, para permitir que la glicerina penetre en la membrana celular.
5. Se enfría a un ritmo de -1° C. a -2° C. hasta llegar a -25° C.
6. Se coloca a -70° C. ó -196° C.
7. Para recuperar las células se descongela rápidamente con movimientos circulares en baño maría a 37° C.
8. Se pone en una botella Roux, la cantidad del vial más medio de crecimiento.
9. Se incuba a 37° C., hasta confluencia.

D.- Método del Dimetil Sulfóxido.

1. Se dispersan las células con tripsina-versene y se centrifugan.
2. Las células se resuspenden en medio de crecimiento (10% de suero sanguíneo y 10% de Dimetil Sulfóxido).
3. Ajustar la suspensión a 2×10^6 cel/ml.

Se llevan a cabo los pasos 4 a 9 del tratamiento anterior.

7.3 Embrión de pollo.

□ Extractos de embrión

Se usan con frecuencia para incrementar el desarrollo celular, en especial de las células recién aisladas. Pueden sustituir al suero en algunos casos, especialmente en el cultivo de tejidos diferenciados. El embrión se prepara normalmente como extracto a 50% (EE₅₀) en solución balanceada. Se pueden usar embriones de muchas especies, pero el material más simple es el huevo fértil de gallina incubado durante 12 días.

□ Método

1. Se examinan los huevos a trasluz para determinar su viabilidad y se marca el espacio de aire.
2. Se limpian las cáscaras de los huevos con alcohol a 70° C.
3. Se rompe y se retira la cáscara sobre el espacio de aire.
4. Se retira la membrana y la corioalantoides.
5. Se pinza suavemente el embrión por el cuello y se extrae.
6. Se enjuaga el embrión en solución salina balanceada para remover sangre y yema.
7. Se pasa el cilindro de una jeringa de 10 ml., se adapta el émbolo y se comprime el embrión, recogiénzose en un frasco universal.
8. Se le agrega a la pulpa un volumen igual de solución salina balanceada y se deja reposar durante 30 minutos a la temperatura del cuarto.
9. Se centrifuga durante 15 minutos a 3,000 rpm.
10. Se retira el líquido sobrenadante y se almacena a menos 20° C.
11. Se siembra una muestra para comprobar esterilidad.

7.3.1 Inoculación de embriones de pollo. (fig. 7.1)

Rous y Murphy en 1911, utilizaron embriones de pollo para la propagación del virus del Sarcoma. Para 1931 este estudio se expandía más y permitía estudiar virus como el de la Enfermedad de Newcastle y el de la bronquitis infecciosa, pudiéndose replicar en embrión de pollo. Pero no llegaron a obtener resultados satisfactorios; hasta que Burnet y Cols. (1940-1942), demostraron que los Mixovirus, Herpesvirus y Arbovirus, crecían en embriones de pollo y pudieron ser aislados. Los criterios para la infección difieren dependiendo del virus que se trate y edad del embrión. Algunos virus producen cambios patológicos tales como hemorragias, petequias en la membrana, muerte del embrión, etc. Sin embargo otros virus no producen efectos tan notables y sin ninguna patología observable. La infección y el crecimiento de tales virus como el de Influenza y el de Paperas no producen signos notorios, pero pueden ser detectados por otras propiedades como es la hemoaglutinación.

Hasta entonces de los avances de los cultivos celulares, el embrión de pollo era uno de los medios más comunes para la propagación, titulación, modificación y producción de virus en la elaboración de vacunas, presentando ciertas ventajas y desventajas.

Ventajas:

1. Los huevos embrionarios se pueden adquirir con facilidad.
2. Son baratos.
3. Son de fácil manejo.

Desventajas:

1. Alto nivel de proteína (Inhibe el crecimiento del virus).
2. Posibilidad de contaminantes virales y bacterianos. Para evitarlo se requiere trabajar con embriones libres de enfermedades cuyo costo es mayor y difícil de conseguirlos.

Algunos de los factores que influyen sobre el crecimiento del virus en embrión de pollo son:

1. Edad del embrión.
2. Vía de inoculación
3. Dilución y volumen del inóculo.
4. Temperatura de incubación.
5. Tiempo de incubación tras la inoculación.

6. Estado fisiológico y nutrición de las aves, especialmente por lo que respecta a deficiencias vitamínicas y empleo de inhibidores o activadores enzimáticos.

Observaciones: Para el aprendizaje de la técnica de inoculación en huevo fértil por diferentes vías, es recomendable la utilización de colorantes.

Es indispensable que se llegue al dominio de las técnicas de inoculación en el embrión de pollo, por la selectividad que presentan algunos virus y de lo cuál se elige la vía de inoculación, y por lo consiguiente la edad del embrión para llegar a buenos resultados. La sustitución arbitraria de la vía de inoculación o de la edad del embrión, puede conducir al fracaso nuestro experimento. Ya que generalmente la cosecha de los materiales infectados del huevo embrionario tiene como propósito recuperar a altas concentraciones de los virus inoculados. Además es muy importante la revisión del cual se va a cosechar ya que la mayor producción de virus se obtiene de embriones moribundos y no de los embriones muertos. Algunos virus requieren de períodos de observación cortos, cada 8 a 10 hrs. mientras que para otros es suficiente una observación cada 24 hrs. Los embriones moribundos, los cuáles presentan movimientos lentos se pueden guardar en el refrigerador hasta el momento de la cosecha general.

Respiración del Embrión. Los primeros 18 días de incubación son designados como período Prenatal, durante este período el intercambio de CO_2 y O_2 se lleva a cabo a través de la membrana corioalantoidea.

Por el día 19 el embrión formado comienza a picar el saco de aire y su respiración consiste en una difusión y convección del aire de la cámara hacia los pulmones a este período se le conoce como Período Paranatal, del 19 al 21 día.

El período Posnatal, comienza después que el pollito pica el cascarón, en ese momento se pone en contacto con el aire atmosférico y comienza su respiración pulmonar.

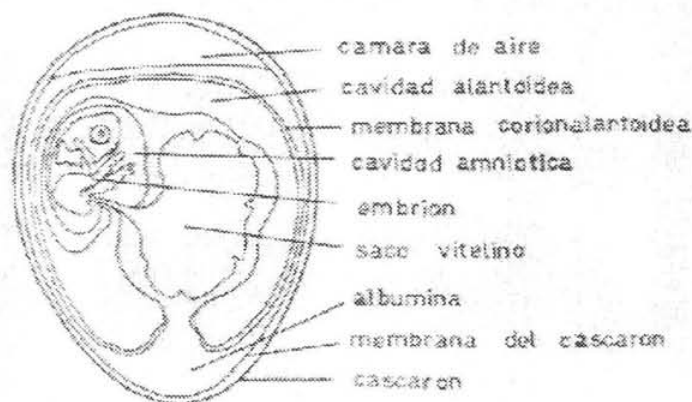


Fig. 7.1 Partes de un embrión de pollo

Tomado de Manual de prácticas de virología UNAM

Objetivos:

- El alumno conocerá las técnicas comúnmente utilizadas para inocular huevos fértiles de gallina.
- Adiestrar al alumno en el manejo de las técnicas para la cosecha de membranas y líquidos extraembrionarios, con el fin de recuperar, identificar y titular al virus inoculados.

7.3.2 Vías de inoculación.

7.3.2.1 Cavity Alantoidea: (Fig. 7.2)

Material:

- Jeringa de insulina
- Aguja calibre 27 de 1 pulg. de largo.
- Hisopos
- Vela
- Perforador
- Lápiz
- Tintura de Yodo
- Ovoscopio
- Embriones de 9 a 12 días.

Técnica:

1. Seleccionar los embriones por transluminación, utilizando el ovoscopio, delimitar la cámara de aire, localizar al embrión y marcar el sitio de inoculación con una X, sobre la cámara de aire, cerca de la base y opuesto al embrión.
2. Desinfectar con lugol y perforar en el sitio de inoculación (perforador).
3. Introducir la aguja hipodérmica en el huevo, aproximadamente media pulgada, como marca la figura.
4. Depositar el inoculo (de 0.1 ml. a 0.2 ml. a aproximadamente).
5. Retirar la aguja, sellar con parafina y volver a desinfectar.
6. Incubar a 37° C. durante 18, 24, 48 hrs. hasta muerte del embrión.
7. Observar y revisar durante 5 días a los embriones inoculados.

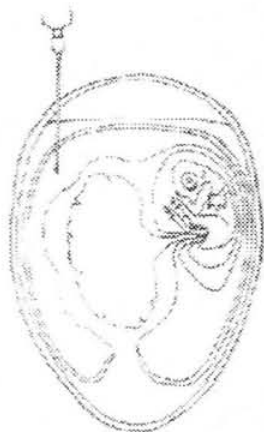


Fig. 7.2 Inoculación por cavidad alantoidea

Tomado de Manual de prácticas de virología UNAM

7.3.2.2 Cavidad Amniótica. (Fig. 7.3)

Material:

- Agujas de 26 a 28 de calibre y 1 pulg.
- $\frac{3}{4}$ de largo (aprox. 4.5 cm.)
- Y lo demás de lo utilizado en la anterior vía de inoculación.
- Embriones de 7 a 12 días.

Técnica:

1. Seleccionar los embriones por transluminación, utilizando el ovoscopio, marcar la cámara de aire, localizar el embrión y marcar el punto de inoculación en el centro de la cámara de aire.
2. Desinfectar el sitio de inoculación y perforar.
3. Introducir la aguja hacia la sombra que da el embrión. Poner el inóculo en la cavidad de 0.1 ml. a 0.2 ml. toda esta manipulación debe hacerse observando el embrión en el ovoscopio.
4. Retirar la aguja y sellar con la vela.
5. Seguir los pasos 6, 7, 8 de la otra vía de inoculación.
6. Observar la figura.

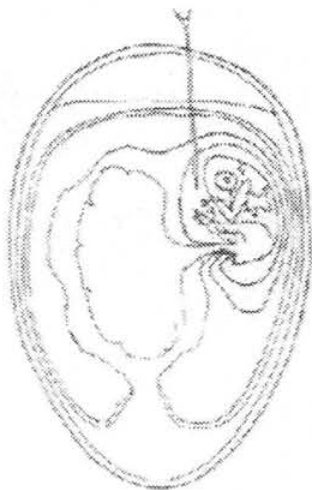


Fig. 7.3 cavidad amniótica

Tomado de Manual de prácticas de virología UNAM

7.3.2.3 Membrana Corioalantoidea. (Fig. 7.4)

Material:

- Embriones de pollo de 10 a 11 días.
- Agujas de calibre 27 a 1/2 pulg.
- Agujas de calibre 26
- Bulbo.

Técnica:

1. Seleccionar a los embriones de la misma manera y marcar la cámara de aire sobre la MCA, evitar no tocar algún vaso sanguíneo.
2. Desinfectar el lugar de inoculación, sitio contrario al embrión y la parte recta hacia arriba de la cámara de aire.
3. Succionar con un bulbo a través de la perforación hecha en la cámara de aire y observar en el ovoscopio la formación de una cámara de aire artificial, mantener el huevo en posición horizontal con el punto de inoculación hacia arriba.
4. Introducir ligeramente la aguja con el bisel hacia abajo y depositar el inóculo en la MCA de 0.1 ml. a 0.2 ml., balancear suavemente el huevo para distribuir el inóculo.
5. Sellar primero el sitio de inoculación y después la perforación sobre la cámara de aire.
6. Incubar en posición horizontal con el punto de inoculación hacia arriba.
7. Incubar a 37° C.

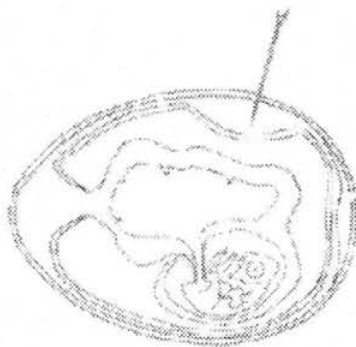


Fig. 7.4 Membrana Corioalantoidea

Tomado de Manual de prácticas de virología UNAM

7.3.2.4 Saco Vitelino

Material:

- Embriones de 5 a 6 días.
- Aguja calibre 22 de 11/2 pulg. de largo
- Resto de la primera parte.

Técnica:

1. Seleccionar a los embriones de la misma forma, marcar la cámara de aire y el punto de inoculación en el centro de esta.
2. Desinfectar el punto de inoculación y perforar la cáscara.
3. Insertar la aguja perpendicularmente e inocular de 0.5 a 1 ml.
4. Retirar la aguja y sellar.
5. Incubar a 37° C.

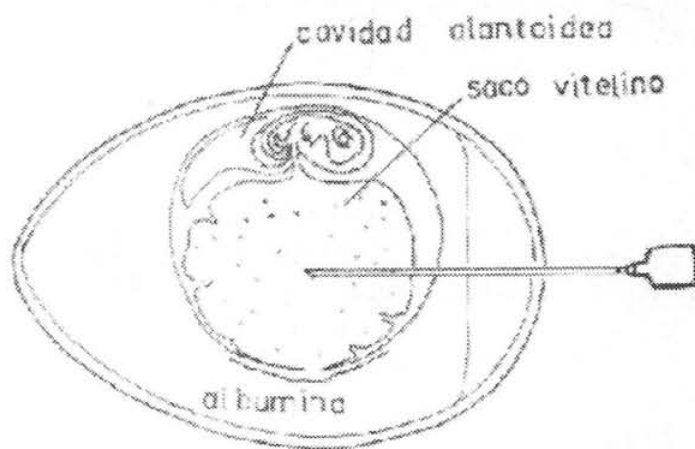


Fig. 7.5 Saco Vitelino

Tomado de Manual de prácticas de virología UNAM

7.3.3 Cosecha de membrana de líquidos extraembrionarios.

7.3.3.1 Líquido Alantoideo.

Material:

- Tijeras
- Pipetas
- Desinfectante
- Charola
- Tubos de centrifuga
- Baño de hielo
- Huevo fértil inoculados.
- Pinzas
- Hisopos
- Agujas calibre 22, 26 de 1 pulg. de largo.
- Matraces
- Recipientes para desechos.

Técnica:

1. Seleccionar al ovoscopio los embriones vivos, delimitar la cámara de aire; enfriarlos a 4° C. durante 2 a 4 hrs. ó durante ½ hr. a -70° C.
2. Colocar el huevo en la charola en posición vertical con el extremo romo hacia arriba, desinfectar la cáscara que cubra la cama de aire.
3. Quitar el casquete que cubre la cámara de aire y la membrana de la cáscara y membrana corioalantoidea, que forman la base de la misma.
4. Aspirar el líquido alantoideo con una pipeta o con una jeringa con aguja calibrada 18 y con ayuda del abatelenguas.
5. Mezclar los líquidos cosechados y centrifugar durante 10 min. a 1500 rpm, guardar el sobrenadante en volumen de 0.5 ml. a -70° C. hasta su utilización.

7.3.3.2 Líquido Amniótico.

Material:

- El mismo que el anterior.

Técnica:

1. Llevar a cabo los pasos 1, 2, 3 anteriores.
2. Levantar el saco amniótico con las pinzas y aspirar el líquido con la aguja calibre 26.
3. Guardar el líquido cosechado a -70° C. hasta su utilización.

NOTA: El embrión de pato se usa igual que el de pollo, para alimento viral, ya que algunos virus tienen la afinidad por estas células, también se llegan a usar huevos de codorniz en algunos casos.

Reportar:

1. Indicar los errores cometidos y dificultades que haya encontrado durante el aprendizaje de esta técnica.
2. Porque es importante determinar la edad del embrión de acuerdo a la inoculación con diferentes virus.
3. Porque algunos virus (lengua azul) se reproducen mejor en embrión de pollo que en cultivos celulares.
4. Mencionar el uso de embrión de pato en virología.
5. Lesiones que causan determinados virus (Diagnóstico).
6. Que virus pueden crecer, titularse y cosecharse en embrión de pollo.
7. Que lesiones teóricas tendría que obtener en su virus dado y cuáles obtuvo, discútalos.
8. Llenar tablas de resultados:

Vía de inoculación virus 1°. 2°. 3°. 4°. 5°. Lesiones y C.

- Discuta sus resultados.

Vías de inoculación de virus

VIRUS	VÍA DE INOCULACIÓN	ANIMAL
Poxvirus	Subcutánea	Ratón
Reovirus	Parenteral	Ratón
HSV-1	Oftálmica	Ratón
HSV-1	Oftálmica	Conejos
HSV		
HSV-2	Vaginal	Cerdos de Guinea
Virus de la Gripe	Se instala en el hocico	Neumonía en ratón
Virus de la Gripe	Intracerebral	Toxicidad en ratón

Tomado de Manual de prácticas de virología UNAM

Capítulo 8. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO

8.1 Pruebas bioquímicas y biofísicas.

8.1.1 Formación de placas.

Técnica de placas.

Cuando una capa celular infectada se cubre con medio de cultivo para mantenimiento, los virus son liberados por las células infectadas y se diseminan al través del medio líquido para infectar otras células. Sin embargo, si el medio se solidifica con agar, no puede ocurrir la diseminación de los virus y la extensión de la infección se limita a aquellas células que se hallan inmediatamente adyacentes a las células infectadas al principio. Empleando colorantes adecuados, las áreas de células muertas aparecen como agujeros o placas en la capa celular y se pueden contar para calcular el número de unidades formadoras de placas (UFP) contenidas en la suspensión viral (Fig. 8.1).

Si se usa un recipiente cerrado (por ejemplo, una botella médica plana), se puede emplear medio de cultivo de formulación normal; pero si se usan recipientes abiertos (por ejemplo, cajas de Petri), se requiere un método de regulación del pH.



Fig. 8.1. Placas

Si se cambia el amortiguador en un sistema dependiente del bióxido de carbono por otro amortiguador orgánico, como el tris (hidroximetil) aminometano, las técnicas de placa se pueden hacer en una atmósfera de aire.

Se disuelve 2.42 g de tris (hidroximetil) aminometano con 100 ml. de solución salina balanceada Hank (SSB). A esta solución se le agregan 76.8 ml. de solución de ácido clorhídrico 0.5 M y se ajusta el volumen a 400 ml. con SSB Hank. La dilución final resulta de 0.05 molar del amortiguador de tris (hidroximetil) aminometano con pH de 7.6.

Desafortunadamente algunas células de mamíferos no prosperan bien en el medio amortiguado con tris (hidroximetil) aminometano (THAM) y requieren un amortiguador de bicarbonato de sodio/CO₂, con la consecuente complicación de la atmósfera de CO₂ si se emplean recipientes abiertos.

Se obtiene con facilidad una atmósfera que contenga CO₂, pasando por el recipiente una mezcla de CO₂ a 5% en aire de un cilindro a presión, regulando la velocidad de flujo con un flujómetro o con un manómetro. Por otra parte el CO₂ puede generarse dentro de una incubadora sellada usando el amortiguador de Pardee (Bellet, 1960).

Se diluye dietanolamina industrial a 60% con agua desionizada y desclorizada y, en caso necesario, con carbón activado.

Para prevenir la autooxidación, se le agregan 3 ml. de solución acuosa a 3% de tiourea a 400 ml. de la dilución de dietanolamina a 60%. La mezcla se coloca en una botella herméticamente cerrada mezclada con 200 ml. de solución de ácido clorhídrico 6 N y 120 g de bicarbonato de potasio y se agita hasta que se aclare a 37°C. Se almacena en la incubadora a 37°C. Cien ml. en un vaso de precipitados son suficientes para producir una atmósfera al 5% en un recipiente cerrado de 10 lt. Al variar la cantidad de ácido, se pueden obtener concentraciones variables de CO₂.

Hay dos métodos por medio de los cuales se pueden obtener placas. El método original de Dulbecco (1952) que consiste en cubrir a la célula infectada con medio de cultivo que contenga gelosa. La desventaja de esta técnica consiste en la necesidad de cultivar las células en un monoestrato confluyente. Cooper diseñó un método mediante el cual una suspensión de células infectadas se mezcla con gelosa y se vacía como una capa sobre una película basal de gelosa. La técnica de Cooper, aunque permite la disponibilidad inmediata de una técnica de placa, requiere más células inicialmente, ya que no ocurrirán más divisiones celulares una vez que las células se mantengan en un medio de gelosa.

La gelosa que se use para sobreponer a la capa basal debe ser pura y libre de agentes citotóxicos. Hay disponibles gelosas de alta calidad (agar Difco Noble y agar Difco Ion); pero resulta más barato usar Difco Bacto que haya sido lavado cinco veces con agua desionizada, tres veces en acetona y dejado secar a 37° C. La gelosa se prepara a una dilución de 1.6% en agua desionizada y se esteriliza en el autoclave a 10 lb/pulg² de presión durante 20 minutos.

Medio con agar:

- Medio esencial mínimo de Eagle a concentración 10X 10 ml.
- Agua desionizada 40 ml.
- Suero sanguíneo 2 ml.
- Solución de penicilina-estreptomicina en solución salina isotónica 1 ml.

Agregando ya sea de:

- 3 ml. de solución de bicarbonato de sodio/CO₂ a 4.4%. para incubación, en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire o recipientes de cultivo sellados, o
- 1 ml. de una solución de bicarbonato de sodio/CO₂ a 4.4% y 4 ml. de solución amortiguadora 0.05 M de Tris (hidróximetil) aminometano. para incubación en una atmósfera de aire.

Se coloca el medio de doble fuerza en baño María a 44° C agregado de un volumen igual de agar a 1.6%, fundido. Se mezclan bien antes de usarse.

> **Titulación de virus (Dulbecco, 1952)**

1. Se desarrollan células de un monoestrato confluyente.
2. Se desecha el medio y se lavan las células dos veces con STF "A".
3. Se escurre bien cada monoestrato celular.
4. Se diluye la suspensión de virus en décuplos progresivos (logarítmicos) y se agregan 0.2 ml. a cada monoestrato celular.
5. Se deja que se adsorban los virus durante 45 minutos a la temperatura del cuarto, mecido los cultivos cada 10 minutos. para asegurar una distribución pareja del inóculo.
6. Se cubre con gelosa hasta una profundidad de 4 mm., usando una pipeta de 10 ml. con punta de grueso calibre.
7. Se deja asentar y solidificar la cubierta con la gelosa y se pasa a la incubadora.

➤ **Titulación de virus (Cooper, 1955)**

1. Se vierte una capa basal de medio de cultivo, usando 7 ml. para cada caja de Petri de 10 cm.
2. Se deja solidificar.
3. Se distribuyen suspensiones celulares que contengan 10 células en volúmenes de 0.9 ml. en tubos de ensayo de 7.5 x 1.27 cm.
4. Se diluyen las suspensiones de virus progresivamente por décuplos (logarítmicos) con STF "A" (Dulbecco) y se agrega 0.1 ml. de cada dilución a cada uno de tres tubos con suspensión celular.
5. Se agrega 1 ml. del medio con gelosa a un tubo que contenga células/virus, se mezcla y se vierte inmediatamente sobre la capa del medio basal. Se repite la misma operación vaciando cada tubo por separado ya que la mezcla está muy cerca del punto de solidificación del agar.
6. Se deja solidificar y se coloca en la incubadora.

Después de la incubación se tiñen las células viables, quedando las placas de células muertas como áreas claras. Tradicionalmente se usa el rojo neutro; pero más recientemente se han empleado las sales de tetrazolio (Cooper, 1959). Ambas son agregadas después de la incubación, usando suficiente cantidad para inundar la superficie del agar.

Colorante rojo neutro:

- Yoduro de rojo neutro, vital 0.01 g.
- Cloruro de sodio 0.85 g.
- Agua desionizada 100 ml.

Colorante de tetrazolio:

Cloruro de 2-(p-yodofenil)-3-(p-nitrofenil)-5-feniltetrazolio a 0.15 g% en solución salina isotónica con NaCl a 0.85%.

La concentración viral en una suspensión se puede calcular fácilmente contando las placas y ajustando las diluciones. Por ejemplo, si un inóculo de 0.1 ml. con dilución viral de 10^{-4} produce 50 placas, entonces la concentración de la suspensión original = $50 \times 10 \times 10^4 = 5 \times 10^6$ unidades formadoras de placas (UFP) por ml.

➤ **Identificación de virus.**

Las técnicas de placas normalmente no se emplean para identificar a los virus, sin embargo se pueden usar modificando una de las técnicas para anticuerpos que se describen después.

➤ **Detección de anticuerpos**

Los métodos que incorporan el antisuero en agar son costosos e innecesarios. Hay dos métodos disponibles que requieren una cantidad mínima de antisuero.

- **Método 1.** Reducción de placa. El virus a prueba y el antisuero se hacen reaccionar juntos y las mezclas luego son probadas para buscar virus residuales, como en el siguiente ejemplo:
 1. A 0.2 ml. de una suspensión del virus a prueba que contenga 2×10^3 UFP, se le agregan 0.2 ml. de suero sanguíneo desconocido diluido al 1:10. Se dejan reaccionar a la temperatura del cuarto (o en refrigeración a 4°C si se trata de los virus termolábiles), durante 20 minutos.
 2. Se agregan 0.2 ml. de la mezcla virus / suero a cada uno de tres monoestratos celulares lavados y escurridos en una caja de Petri de 10 cm. y se deja que se adsorban durante 45 minutos a la temperatura del cuarto, meciendo las cajas cada 10 minutos, para asegurar una distribución homogénea.
 3. Se cubren con gelosa hasta una profundidad de 4 mm., se deja solidificar y se colocan en la incubadora

También se preparan en paralelo grupos testigos de virus y diluyente. Después de teñir, los monoestratos inoculados con la mezcla de virus más anticuerpos homólogos mostrarán una reducción en el número de placas, comparadas con los monoestratos inoculados con las mezclas de virus/diluyente.

- **Método 2.** Inhibición de placas. Los monoestratos celulares son inoculados con una suspensión de virus a una concentración tal que las placas que se forman resultan confluentes, es decir, todas las células serán destruidas y después de un periodo de adsorción cubiertas con medio de gelosa. Se cargan por capilaridad con antisuero algunas cuentas pequeñas huecas de aislamiento (cuentas de aislamiento de espinazo de pescado, N° 2: Taylor Tunnicliffe & Co., 125 High Holbom, London W. C. I.) y se colocan sobre la superficie del medio con agar. Durante la incubación se difundirán los anticuerpos a través del agar, protegiendo a las células en la vecindad de las cuentas de la extensión de la infección.
1. A monoestratos celulares lavados y escurridos en cajas de Petri de 10 cm. se les agrega 0.1 ml. de suspensión de virus a prueba de contengan 10^4 UFP/ml. Se dejan adsorber durante 30 minutos a la temperatura del cuarto y luego se cubren con medio con agar a una profundidad de 4 mm.
 2. Sobre la superficie del medio con gelosa se colocan cuentas de espinazo de pescado, que contengan suero sanguíneo desconocido y antisuero testigo normalizado.
 3. Se colocan las cajas en la estufa de temperatura constante a 37° C. y después de teñirlas se examinan para detectar la inhibición de las placas alrededor de las cuentas.
- **Titulación de los anticuerpos.**

Los anticuerpos pueden ser titulados por el método de inhibición de placas. El área de inhibición de torno a la cuenta que contenga el antisuero es proporcional a la concentración de anticuerpo (Fig. 7). El título de anticuerpos de un suero desconocido se puede calcular comparando las zonas que produce con las de un antisuero normalizado, cuyo título de anticuerpo ya ha sido determinado por otro método.

8.1.2 Ciclo Replicativo.

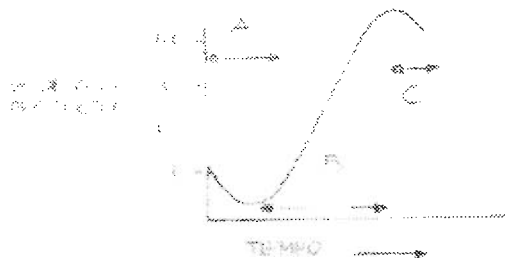
Ciclo de replicación.

GENERALIDADES:

HOSPEDERO: Rangos
Susceptibilidad

VIRUS: Habilidad de síntesis de Proteínas:

CARACTERÍSTICAS: Aseguran la replicación
Empacar el genoma
Alterar estructura o función



A FASE DE ECLIPSE
B FASE DE LIBERACIÓN Y MADURACION
C DISMINUCIÓN VIRAL

INICIACIÓN DE LA INFECCIÓN:

1. Ataque, Antireceptor – Receptor.
2. Penetración: Proceso dependiente de energía; traslocación, endocitosis o fusión.
3. Descubierta: Eventos después de la penetración, expresión de las funciones virales.

ESTRATEGIAS DE MULTIPLICACIÓN:

- 0 Los virus DNA utilizan transcriptasas celulares para la síntesis de RNA.
- 0 Producir mRNA para cada gen o formar una poliproteína.
- 0 Ventaja competitiva o inhibición de la síntesis o transducción de los mRNA celulares.

ESTRUCTURA Y ORGANIZACIÓN DE GENOMA VIRAL:

- 0 Genes virales DNA o RNA de un o dos cadenas.

FUNDAMENTO:

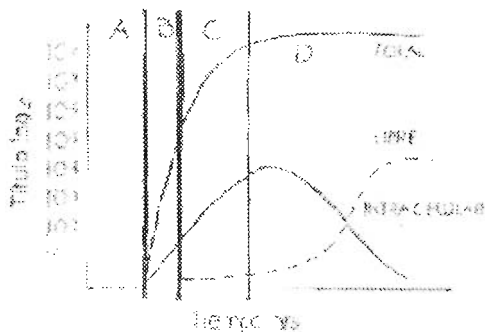
Una suspensión de virus es adicionado a un cultivo celular y el tiempo permite la absorción del virus a la célula, las células son lavadas con amortiguador para remover el virus no absorbido, el medio de nutrientes es adicionado con amortiguador y los cultivos son incubados. En intervalos es analizado el fluido sobrenadante para la presencia de los virus liberados y las células todas para determinar la presencia de virus intracelular.

Material:

- Suspensión de virus
- Cultivo celular
- Tubos de centrifuga
- Tubos prueba
- Congelador
- PBS estéril
- Medio de Hanks de mantenimiento
- Pipetas 1 y 10 ml.
- Baño de agua 37° C.

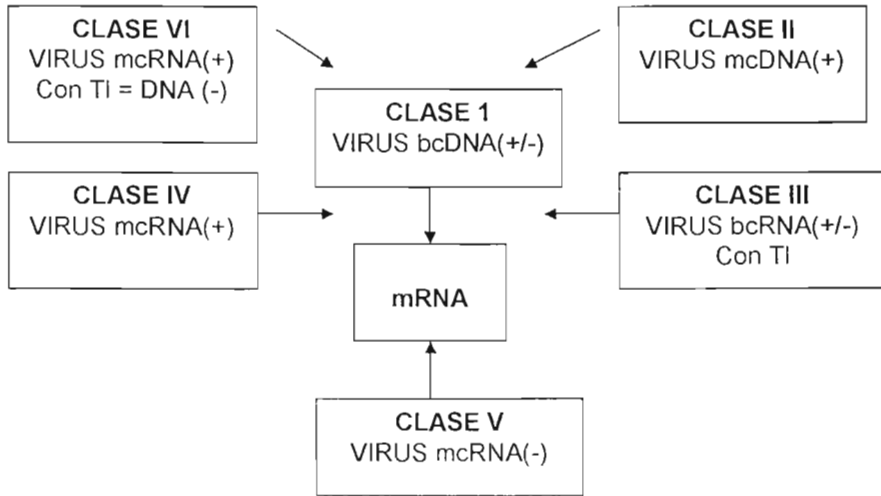
Método:

1. Agrupar 13 líneas de cultivo de tejidos en tubos, de 5 cada una.
2. Preparar una solución de virus con medio de Hanks de 100 TCID₅₀ e inocular cada tubo con 0.1 ml., Incubar a 37°C.
3. Cada hora por cinco horas recolectar el fluido de 5 tubos, centrifugar, etiquetar y congelar a -70° C.
4. Lavar la célula de los tubos 5 veces con PBS, desechar el liquido, agregar 1 ml. del medio de Hank y colocar a -70° C.
5. Al final de las cinco horas se tendrán 8 líneas, desechar los fluidos, lavar con PBS, agregar 1 ml. de medio de mantenimiento a todos los tubos y reincubar los cultivos.
6. A los 40 tubos se les realiza el procedimiento de 3 y 4 en intervalos de 8, 12, 24, 36, 48, 72, 96 y 120 horas.
7. Congelar y descongelar los tubos por 3 veces.
8. Preparar diluciones de todas las muestras y titular.
9. Dibujar u diagrama del ciclo de crecimiento indicando los periodos indicando el total de virus, intracelular y extracelular.



A eclipse
B latente
C maduración
D liberación

EXPRESIÓN Y REPLICACIÓN DE GENOMAS:



ENSAMBLE MADURACIÓN Y LIBERACIÓN:

1. Virus no envueltos. Ensamblar y adquirir infectividad dentro de la célula. Desintegración de la célula en la salida.
2. Virus envueltos. Ensamble y maduración por la expulsión desde la superficie celular.

Herpesvirus: Envoltura y maduración al interior de la membrana nuclear. Citolítico

8.1.3 Determinación de tamaño.

Se han desarrollado varios métodos para ayudar a la determinación del tamaño viral. Los métodos directos de medida involucran el uso de un microscopio electrónico con el que el tamaño así como la forma pueden determinarse. Las técnicas con el microscopio electrónico no involucran el uso de materiales especializados y equipo normalmente disponible en el laboratorio promedio. Estos métodos no se discutirán aquí.

Es una práctica común para medir el tamaño viral indirectamente por medio de técnicas que usan filtros de membranas no tratadas. Las suspensiones del virus son clarificadas primero pasándolos a través de filtros de 200 y 300 milimicras. Los filtrados clarificados, pasan a través de membranas de porosidad más pequeñas, para la determinación del tamaño. Los virus pueden ser adsorbidos a estas membranas, incluso aquellos cuya porosidad es dos o tres veces mayor que el diámetro del virus que está bajo estudio.

Desarrollando un procedimiento por medio del cual la suspensión de virus es pasada a través de membranas cuya porosidad es dos veces el diámetro del virus. Los filtrados contienen del 50 al 100% de los virus presentes inicialmente. son usadas para virus viscosos para que pasen a través de las membranas de porosidad más pequeña. Las membranas son pretratadas con proteína (10% de suero de ternera) que se adsorbe a las membranas y evita adsorción del virus. Pueden tratarse virus que son resistentes a los detergentes con lauril sulfato de sodio y pueden filtrarse a través de las membranas no tratadas. Virus detergente-sensibles, lipofílicos pueden ser diluidos en agua destilada para reducir la concentración de sal (debajo de 0.002 M) y la tensión superficial y luego filtrados a través de membranas no tratadas.

Mientras clasifica según el tamaño exclusivamente, no es adecuado para la clasificación viral, es un parámetro interesante por encima del estudio de los virus. Puede considerarse que el tamaño real de los virus

es aproximadamente uno y medio veces más pequeño que el filtro más pequeño por medio del cual pudo pasar. La estimación de tamaño por filtración toma como una primera presunción que las dimensiones del virus son uniformes, por ejemplo: esférico.

Donde esto es verdad, la única limitación de un virus que atraviesa los poros de un filtro (aparte de la adsorción) sería su tamaño. Cuando un virus no es esférico, como el virus de la varicela, muchos no pueden atravesar el filtro porque su forma ocluye las aperturas del filtro. La pérdida numerosa de virus en esta prueba podría interpretarse como una indicación de que los virus a filtrarse son de un tamaño que requeriría un filtro de porosidad más grande. Las determinaciones de tamaño por filtración pueden ser interpretadas con cuidado hasta que la configuración del virus involucrado es determinada. La disponibilidad de un microscopio electrónico puede facilitar ambos estudios, la configuración y la determinación del tamaño y puede usarse junto con, o como un alternante a, la filtración estudiada.

1. Materiales:

- Suspensión del virus.
- Cultivos de tejido inoculado.
- Medio de Hanks', estéril.
- PBS, 10X, estéril.
- Agua destilada, estéril.
- Lauril sulfato de sodio al 10%, estéril.
- Suero fetal de ternera, estéril.
- Filtros de membrana de 450, 300, 200, 100 y 50 milimicras, 25mm. de diámetro, estéril.
- Almohadilla clarificante, similar al millipore AP 25.
- TRIS buffer.
- Filtros adaptadores, estériles.
- Jeringas, estériles.
- Tubos de prueba, estériles.
- Pipetas de 1.0, 5.0 y 10 ml., estéril.
- Tubo de prueba rack.

Método:

a. Preparación de proteína de la cubierta

Prepare 100 ml. de suero de ternera al 10% en agua destilada. Para esterilizar el suero, fíltrelo a través de una almohadilla clarificante millipore 25 psi. Entonces pase el suero, fíltrelo a través de membranas de 300, 200, 100 y 50 milimicras, en serie, contener en un adaptador de la jeringa. Agregue PBS 10X al filtrado final en tal volumen que restaure la isotonicidad.

b. Pretratamiento de filtros.

Filtros de membrana tratados con 5 ml. de suero de ternera preparado anteriormente pasándolo a través de membranas de 25 mm. cuya porosidad es dos veces la esperada para el virus a ser probado.

c. Filtración de virus, membranas tratadas.

- (1) Rápidamente deshiele la suspensión del virus. Centrifugue a los 205 rpm. por 10 min. Para quitar ruinas de la célula. Quite una muestra para ser titulada como un control del no filtrado. Tratar otras muestras como se indica abajo.
- (2) Prepare un poseedor de filtros que contenga una serie de membranas tratadas (por ejemplo, 200, 100 y 50 milimicras) y lo ata a una jeringa.
- (3) Filtrar 5 ml. de suspensión del virus clarificado a través de la serie de membranas a 1 psi y colecciona el filtrado en un tubo de prueba estéril.
- (4) Titular cada filtrado y prueba de no filtrado de virus en un sistema indicador apropiado y determinar el título.
- (5) Nota: Si prefiere, el virus puede filtrarse a través de membranas separadas de porosidad decreciente. Quite una muestra de cada filtrado subsiguiente para titular el virus.

d. Filtración de virus, membranas no tratadas.

- (1) Pasar una muestra de 5 ml. de virus no diluido a través de una jeringa que posea un filtro con membrana no tratada en serie. Ensaye el filtrado en un sistema indicador apropiado.
- (2) Diluya otra muestra de un ciento de virus en agua destilada y filtre 5 ml. A través de otra serie de membranas no tratadas. Ensaye el filtrado.
- (3) Diluya otra muestra de virus (nueve partes) con una parte de un 10% de solución de lauril sulfato de sodio. Filtrese 5 ml. de esta suspensión a través de una serie de membranas no tratadas. Ensaye el filtrado.

Determinación de tamaño.

Si no ha habido ninguna adsorción de virus a las membranas del filtro, no debe haber, o sólo mínima, disminuya el título del filtrado (comparado con el control) después pase a través de una cierta porosidad de membrana y complete la desaparición del virus después de pasar a través de la siguiente membrana más pequeña. Por ejemplo, el título del control es de 10-6.5. El título de la suspensión del virus de prueba es de 10-6.25 después de pasar a través de un filtro de 100 milimicras y ningún virus es detectado después del paso de la suspensión a través del filtro de 50 milimicras. Puede asumirse, por consiguiente que el virus es por lo menos de 100 mmmc., y probablemente en alguna parte entre 50 y 100 mmmc. de tamaño.

Si el título del virus control es de 10-6.5 y el título de la suspensión del virus de prueba es de 10-6.25 después de pasar a través de una membrana de 200 mmmc., 10-3.5 después de pasar a través de una membrana de 100 mmmc., y ningún virus puede descubrirse después del paso a través de una membrana de 50 mmmc., por ejemplo, existen dos posibilidades. Que alguna adsorción todavía esté ocurriendo o que la forma del virus no es esférica. La adsorción debe ser dirigida fuera desde pequeño, si cualquiera, ocurrió con la membrana de 200 mmmc. (la adsorción debe aplicar a todas las membranas). Más probablemente es que el virus está realmente en alguna parte entre 50 y 100 mmmc. de tamaño y no es esférico desde que puede atravesar la membrana de 200 mmmc., sin la pérdida del título pero empieza a dejar caer grandemente, pero no completamente, en el paso a través del filtro de 100 mmmc. de porosidad.

8.1.4 Efecto del calor.

Como una ayuda para la clasificación viral es importante saber que efectos tiene el calor sobre las partículas de los virus con las que se trabajan.

En algunas ocasiones es necesario destruir la actividad viral (por autoclave) y en otras preservar la actividad viral.

La mayor parte de los virus son totalmente estables a la temperatura del lugar cuando se suspenden en un medio complejo o tejido.

Las diferentes medidas de temperatura elevada son de 50°-60° C. donde la desnaturalización de la proteína es elevada.

La prueba estándar usa una T cte. de 56° C. para la medida de la inactivación terminal la temperatura de los virus se mantuvo constante. En intervalos las muestras fueron retiradas y ensayadas en un sistema indicador.

Materiales:

- Suspensión de virus
- Inoculación de cultivo de tejidos u otro sistema indicador
- Tubos prueba de 12 x 72 mm. estériles
- Pipetas estériles de 1 y 10 ml.
- Gradilla para tubos prueba
- Cultivo de tejido de carnero
- Baño maría 56° C.

Método:

- a) Colocar una suspensión sin diluir del virus en un pequeño tubo prueba estéril. Colocarlo en un baño de agua a 56° C en un nivel de agua de la suspensión en el tubo.
- b) En intervalos de ½, 1, 2, 4, 6 y 8 hrs. (u otros tiempos como decida) tomar una muestra y preparar una serie de diluciones en medio de Hank.
- c) Tratar como es usual para un cultivo celular u otro sistema hospedero. Comparar con un **virus control** sin calor titulándolo simultáneamente. La pérdida más grande que 1 log₁₀ en títulos en 1 hora es considerado por ser indicativo de la labilidad al calor.
- d) La recolección y el cambio de pase del cultivo del virus tratado con calor, en una prueba la cual determina la labilidad del Ag CPE, no necesariamente determina la viabilidad de los restos del genoma viral. Los Ag virales son separados de la partícula infectiva y a menos que se realice un repaso del material tratado se sabe si el CPE fue lábil o no. Por ejemplo si el material tratado con calor no causó en un tiempo CPE, el virus sin tratar produce CPE, un recolectado y repaso de los cultivos en los cuales el material tratado fue inoculado es entonces necesario.

Si se tiene que CPE reaparece en el primero, segundo y tercer paso serial, uno puede postular que original y únicamente el Ag CPE fue destruido pero no la infección. Cuando el virus es recuperado y repasado, la replicación del virus está infectada y produce todos los Ags que requiera.

8.1.5 Sensibilidad a solventes lipídicos.

I.- **Fundamento:** Los viriones con lípidos en su envoltura.

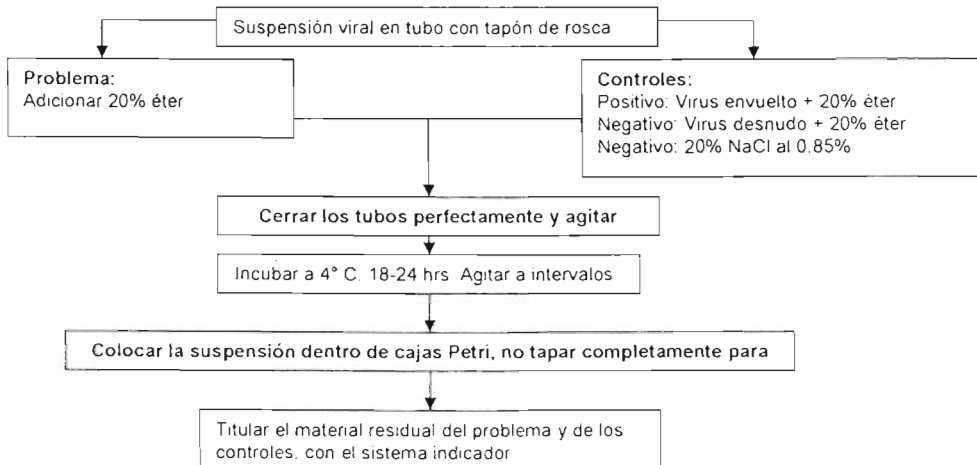
Se inactivan rápidamente con detergentes sintéticos y con disolventes orgánicos como: éter, cloroformo y formol. Destruyen en virión y liberan la cápside y ácido nucleico en diversos estados de agregación.

II.- **Metodología:**

Materiales y reactivos.

- Suspensión viral.
- Cultivos de tejidos sin inocular u otro sistema indicador
- Tubos de ensaye con tapón de rosca y de 12 x 72 mm. estériles
- Pipetas graduadas estériles de 1 y 10 ml.
- Cajas Petri estériles
- Éter etílico, grado anestesia.

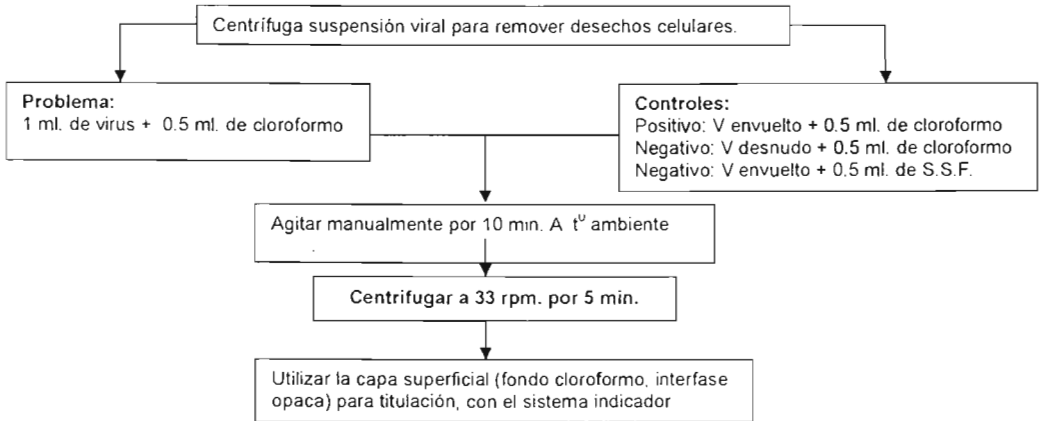
Procedimiento-Sensibilidad al Éter.



Procedimiento-Sensibilidad al Cloroformo

Materiales y reactivos:

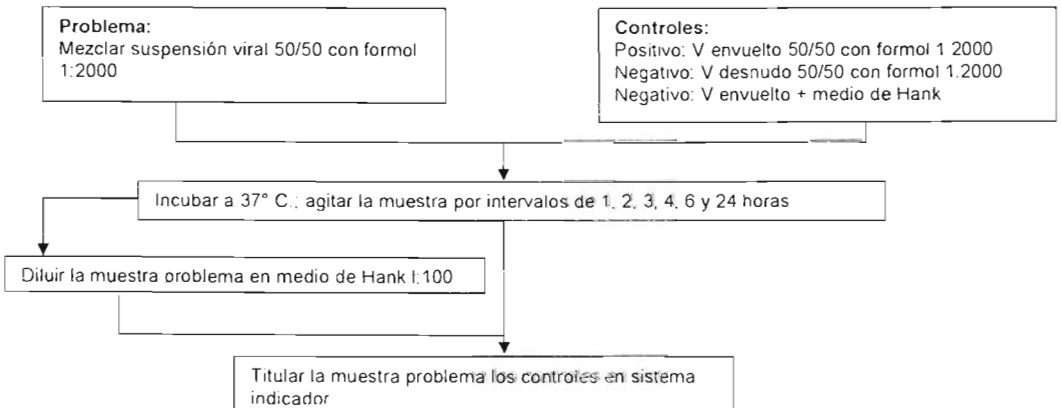
- Suspensión viral
- Cultivos de tejido sin inocular u otro sistema indicador
- Tubos de ensaye de 12 x 72 mm. estériles
- Pipetas graduadas estériles de 1 y 10 ml.
- Tubos de centrifuga estériles
- Cloroformo grado reactivo.



Procedimiento-Sensibilidad al formol.

Materiales y reactivos:

- Suspensión viral.
- Cultivos de tejido sin inocular u otro sistema indicador.
- Medio de Hank estéril.
- Formol comercial (37% dil. 1:2000).
- Baño de agua.
- Tubos de ensaye de 12 x 72 mm. Estériles.
- Pipetas graduadas de 1 y 10 ml.



III.- **Interpretación:** Si el título del problema excede el control por 1 log 10, es considerado susceptible al solvente lipídico.

IV.- **Ejemplo:** mixovirus, arbovirus, herpesvirus, coronavirus.

V.- **Tipo de diagnóstico:**

- ⊖ Es útil como etapa inicial en fraccionamiento químico de algunos virus.
- ⊖ Diferenciación de virus envueltos.

8.1.6 Sensibilidad a pH.

En general, los virus prefieren un ambiente isotónico con pH fisiológico, pero sus límites de tolerancia son bastante amplios. De hecho la infectividad de ciertos virus puede realmente ser protegida contra la inactivación del calor suspendiéndolos en soluciones molares de sales comunes como Mg^{2+} , pero para otros virus la situación es inversa. La razón de las diferencias entre los virus a este respecto es desconocida; interesan principalmente a los que trabajan en laboratorios de investigación y a los que preparan vacunas.

La sensibilidad viral hacia el pH ácido puede ser testificada de acuerdo con Ketter.

1.- Materiales.

- Suspensión de virus.
- Células de tejido celular desinfectadas u otro sistema indicador.
- Medio de Hanks, estéril
- HCl, 0.1N.
- Tubos de prueba, 12 x 72 mm., estériles.
- Pipetas, 1 y 10 ml., estéril.
- Tubo de prueba rack.
- Cultivo de tejido rack.

2.- Método.

- a) Adicione HCl diluido al medio de Hanks', removiendo y tomando pruebas con un pH metro hasta alcanzar un pH de 3.0. No regresar los fluidos probados al bote del medio estéril.
- b) Diluir la muestra del virus a 10^{-1} en un medio de pH = 3.0. diluir otra muestra de virus en el medio de Hanks' como un control. Incubar ambos a temperatura ambiente uno por $\frac{1}{2}$ hora y el otro por 1 hora.
- c) Preparar una serie de diluciones de cada uno en el medio de Hanks' y títule en el sistema indicador apropiado. Una reducción del título de 1 log 10 o más después de 30 minutos es interpretado como lábil. Retención del título lleno, o pérdida de menos de 1 log de 10 de actividad, es considerado como indicativo de estabilidad.

8.1.7 Determinación de ácido nucleico.

8.1.7.1 Determinación de ácidos nucleicos por Feulgen.

Este método ha sido empleado en la determinación de la clasificación primaria de un virus, si este es de ARN o ADN. Los virus de ADN se replican en el núcleo, donde ocasiona un incremento en la intensidad de los agregados teñidos de rosa a rojo-púrpura. Esto es absolutamente esencial que la prueba enzimática enlistada bajo control sea realizada al mismo tiempo. Adicionalmente, cultivos de células no infectadas y cultivos infectados con virus de ARN y ADN no provocarán la respuesta descrita anteriormente y las células permanecerán de color azul. Algunos virus, entonces, pueden ser sospechosos de ARN con lo que no pueden realizar pruebas adicionales como Naranja de Acridina, la cual, confirmará esta prueba así como también identificará virus de ARN.

Controles:

- ❖ Control (+), cultivos de células infectadas con virus ADN.
- ❖ Control (-), cultivos de células no infectadas y cultivos infectados con virus de ARN.

Metodología:

El fluido de Carnoy es recomendado para la fijación celular antes del uso del reactivo de Feulgen.

- ↻ Lavar las células infectadas en PBS (3 veces).
- ↻ Fijar las células en solución de Carnoy por 20 minutos.
- ↻ Transferir en etanol al 95% por 2 minutos.
- ↻ Transferir en etanol al 70% por 2 minutos.
- ↻ Lavar en agua por 2 minutos.
- ↻ Transferir en HCl (1N) y dejar 2 minutos.
- ↻ Transferir en HCl (1N) precalentado a 60° C. y conservarlo de 10-20 minutos.
- ↻ Transferir en HCl (1N) por 2 minutos a temperatura ambiente.
- ↻ Lavar rápidamente en H₂O.
- ↻ Reaccionar con el reactivo de Schiff por 30 minutos.
- ↻ Lavar con agua de 5-15 minutos, eliminando el exceso de reactivo.
- ↻ Contrastar con verde claro (0.5%), y lavar con agua.
- ↻ Rápidamente deshidratar en etanol al 70%, 2 minutos.
- ↻ Rápidamente deshidratar en etanol al 95% (2 veces).
- ↻ Rápidamente deshidratar en etanol al 100% (2 veces). Transferir a xileno.
- ↻ Examinar al microscopio.

8.1.7.2 Naranja de Acridina.

Este método es utilizado para la identificación del tipo de ácido nucleico de un virus en cultivos celulares. Esto es posible hacerlo debido a que el DNA o RNA pueden ser marcados con cationes aromáticos como el ión etidio, proflavin o el naranja de acridina presentando la siguiente fluorescencia.

DNA	cadena doble Cadena sencilla	amarillo-verde roja
RNA	cadena doble Cadena sencilla	amarillo-verde roja

Técnica:

- ↻ Lavar los cultivos infectados con PBS.
- ↻ Fijar las células infectadas en Carnoy's (cloroformo, alcohol absoluto y ácido glacial en proporciones 3, 6, 1 respectivamente).
- ↻ Hacer inmersiones sucesivas en etanol al 95, 75, 50 y 25%
- ↻ Poner en solución amortiguadora de 5-10 min.
- ↻ Colocar en naranja de acridina en buffer al 0.01%
- ↻ Colocar en solución amortiguadora de 2- 3 min.
- ↻ Montar.
- ↻ Examinar en microscopio de fluorescencia.
- ↻ Se deben procesar simultáneamente cultivos celulares problema y control.
 - Cultivos celulares no infectados.
 - Cultivos celulares con virus DNA conocido.
 - Cultivos celulares con virus RNA conocido.

8.1.8 Actinomicina D.

Historia. El primer agente antibiótico cristalino aislado de un caldo de cultivo de especies de *Streptomyces parvullus*, fue la actinomicina A (Waksman y Woodruff, 1940). La actinomicina D, se obtuvo posteriormente (Waksman Conference on Actinomycins, 1974). La actinomicina tiene efectos benéficos en el tratamiento de numerosos tumores, especialmente ciertas neoplasias de la infancia y coriocarcinoma.

- Polipéptido que liga con ADN. Conjunto de varios antibióticos de estructura similar de Actinomicinas A, B, C, D descubierto en 1953 por alemanes, (C-D) se usa en la Terapéutica por ser menos Tóxicas y más activas. Inhibe crecimiento de Virus ARN: Poliovirus, Mengovirus, Reovirus.

Uso: Enfermedades infecciosas (linfosarcomas, Mielomas)

Acción Citostática (Detención de Tumores).

Materiales:

- Suspensión de Virus.
- Cultivo de tejido.
- Medio de Mantenimiento Hank's.
- Actinomicina D
- Pipetas 1.0 – 10 ml.
- Tubos de Prueba 12 x 72 mm.

Métodos:

- Determinación preliminar de Actinomicina D.
- Preparar diluciones de Actinomicina D en medio de Hank's de 1.0, 0.01, 0.005 y 0.001 µg/ml.
- Determinar concentración a las células.

Test:

- ⇨ Preparar Actinomicina D contenida en medio de Hank's a concentración deseada del antibiótico.
- ⇨ Agregar 1.0 ml. de Actinomicina D a 64 tubos, Incubar a 37° C/24 hrs.
- ⇨ Inocular la mitad de los cultivos (32 tubos) con diluciones de serie décuplas de virus. (0.1 ml. x tubo) 4 tubos por dilución.
- ⇨ Incubar a 37° C/48 hrs. y observar el crecimiento de Virus.
- ⇨ Grabar en CPE*.

Medio Hank's.

Solución A:		Solución B:		Solución C:	
NaCl	160 g.	CaCl ₂	2.8 g.	KH ₂ PO ₄	1.2 g.
KCl	8 g.	H ₂ O destilada	800 ml.	Na ₂ HPO ₄	1.2 g.
MgSO ₄	4 g.			Dextrosa	20.0 g.
H ₂ O destilada	800 ml.			Rojo de Fenol	0.4 g.
				Soluble en Agua	
				Agua destilada	1000 ml.

Disolver los ingredientes en 1 litro de agua, meter en autoclave las 3 soluciones a 10 lb. por 10 min. Vaciar la soluciones en tubos estériles guardar en refrigeración.

8.1.9 ANALOGOS DE BASE

Fundamento:

Un análogo de base es una sustancia que es suficientemente similar en estructura a un residuo de purina o pirimidina normal para ser incorporado a una cadena de DNA en lugar de la base a la que se parece.

Los análogos más citados son el 5- bromuracil (BU) y el 2- aminopurina (AP). El primero es un análogo de la timina, mientras el último es un análogo de la adenina. Cuando son incorporados al DNA, cada uno de estos análogos hace par como las bases a las que reemplazan. Pueden también tomar formas tautoméricas que

resultan en la misma alteración de las propiedades de los enlaces de hidrógeno. Esto causa un daño al DNA mediante errores en la formación de pares de bases mediante el tautomerismo.

Efecto del 5bromo-2deoxiuridina (BUDR) en virus:

A) Reactivos:

- Virus A DNA.
- Virus B RNA.
- Cultivo de células Hep-2.
- Medio de mantenimiento.
- Medio de mantenimiento + BURD 100mcg/ml.

Metodología:

- ▶ Prepare 10 diluciones de los virus A y B (1:10 hasta 1:10⁸) en 2 ml. de medio de mantenimiento.
 - ⇨ Agregue a los cultivos celulares de Hep-2 0.9 ml. de medio.
 - ⇨ Inocule 3 cultivos con 0.1ml. de c/dil. de virus.
- ▶ Prepare 10 diluciones de los virus A y B (1:10 hasta 1:10⁸) en 2 ml. de medio de mantenimiento + BURD.
 - ⇨ Agregue a los cultivos celulares de Hep-2 0.9 ml. de medio + BURD
 - ⇨ Inocule 3 cultivos con 0.1 ml. de c/dil. de virus.
- ▶ Incluya 3 cultivos celulares con medio de mantenimiento y otros 3 con medio de mantenimiento + BURD como controles celulares, sin virus.
- ▶ Marque los cultivos y póngalos en posición inclinada a 34° C. Examine los cultivos diariamente usando embriones de pollo.
- ▶ El tipo de ácido nucleico puede ser determinado por varios métodos. La replicación de los virus DNA es inhibida por BURD, mientras que la replicación de virus RNA no es afectada. El BURD es convertido en monofosfato por la timina quinasa.

Este monofosfato es convertido en di y trifosfato los cuales sirven como precursores del DNA y son incorporados en lugar de la timidina. Esto lleva a la inhibición de la replicación de virus DNA, mientras que los virus RNA pueden seguir su replicación.

Ejemplo:

Poliovirus podrá continuar su ciclo normalmente; mientras que Herpesvirus si es afectado, y su replicación será inhibida.

8.2 Pruebas para determinación de Antígenos (Ag) y pruebas especiales.

8.2.1 Hemoaglutinación / Desenmascaramiento por Fluorocarbono.

Las preparaciones de los cultivos celulares pueden variar a la actividad de hemoaglutinación, y se ha encontrado que ciertos inhibidores pueden estar presentes en fluidos como el suero que enmascaran la reacción de HA. Estos inhibidores pueden ser de naturaleza compleja pero como muchas veces es conocida, existen muchos métodos por los cuales estas pueden ser removidas del material que contendrá a los virus entre los cuales están: Tratamiento con calor, Acetona, Éter, Tripsina, Caolín, Centrifugación a alta velocidad y Fluorocarbono.

Ejemplos:

Influenza: Glucoproteínas e Inhibidores Termolábiles

New castle: Muco proteínas

Materiales:

- Cultivos infectados 24 hrs.
- Genesolv-D (trifluorotricloroetano, CC12F-CC1F2)
- Homogenizador Servall, frío y estéril
- PBS estéril
- Células rojas de la sangre, tipo apropiado
- Pipetas de 1.0 ml. y 10.0 ml. estériles
- Tubos de la prueba 12 x 72 mm. Estériles
- Tubos para centrifuga estériles
- Mechero Bunsen

Método:

A) Tratamiento con Fluorocarbono.

- Veinticuatro horas post inoculación del virus, enfriar y deshelar los cultivos tres veces. Cosechar los fluidos.
- Al liquido cosechado, agregar un volumen igual de Genesolv- D, homogenizar a 44,000 RPM por tres minutos, en frío. Centrifugue a 205 g por 10 min.
- Quitar el liquido sobrenadante a un tubo de prueba estéril.
- Etiquete con los volúmenes, tratamiento y datos.

B) Test.

- Prepare diluciones en serie del liquido sobrenadante dobles en PBS. Agregue 0.4 ml. de cada dilución por triplicado en tubos de la prueba estériles pequeños.
- Lavar apropiadamente tres veces con PBS estéril los glóbulos rojos. Haga una suspensión al 1% en PBS y agregue 0.1 ml. a cada tubo de la prueba.
- Agite todos los tubos. Ponga un juego a 4° C., un juego a la temperatura del cuarto. un juego a 37° C. por una hora o hasta que todas las células rojas reaccionen.
- Leer la hemoaglutinación.

Ventajas:

- Cabe decir que los inhibidores son mas frecuentemente encontrados en preparaciones derivadas de tejido de animales que en aquellos provenientes de cultivos celulares.
- Nos permite no dar un falso negativo para la presencia de hemaglutininas.
- Este método nos permite realizar una correcta titulación en la hemoaglutinación.

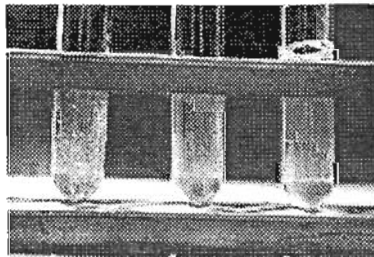


Imagen de una aglutinación en tubo

ESTA TESIS NO DEBE
QUITARSE DE LA BIBLIOTECA

Tomado de: www.sanidadanimal.info/inmuno/quinto1

En la primera línea se observa el suero control positivo y en la segunda el negativo. Los sueros problema por duplicado han sido colocados en el resto de la placa, se observan positivos (azul) y negativos (sin color).

Hemaglutinación

El fenómeno, fue descrito primero en 1941 por Hirst, analizó cuidadosamente si se mezclaban glóbulos rojos con líquido alantoideo de huevos infectados con virus de la gripe las células se aglutinaban, encontró que la reacción no era dependiente de la temperatura y requería electrolitos en el medio. La reacción se podría bloquear con anticuerpos contra el virus y su velocidad dependía de la concentración vírica. La proteína HA del virus de la influenza. Se une a las partículas virales a las células susceptibles y es el antígeno principal contra el cual se dirige los anticuerpos neutralizantes (protectores).

La HA hemaglutinina la proteína de la superficie del virión, es una glicoproteína que se presenta en forma de muchas espinas cortas que se proyectan de la envoltura viral. El virus se unirá a cualquier eritrocito, de la especie que sea, siempre que lleve los receptores celulares complementarios que son glicoproteínas de una clase diferente. La hemaglutinación para los virus de la influenza y los paramixovirus, pero no para otros, se complica por el hecho de que el virus también lleva una enzima neuraminidasa, que destruye los receptores glicoproteicos de la superficie del eritrocito y permite al virus liberarse nuevamente.

La secuencia primaria de la HA contiene 566 aminoácidos, se corta en dos subunidades, la HA1 y la HA2, que permanecen firmemente unidas por un puente disulfuro, la lisis que separa a la HA1 y HA2 es mediada por proteasas celulares y es necesaria para que la partícula del virus sea infecciosa. La antigenicidad de la HA funciona al final de la replicación viral. Es una enzima sialidasa que retira el ácido siálico de los gluconjugados. Facilita la liberación de la partícula viral de la superficie de las células infectadas durante el proceso de gemación y la ayuda a evitar la autoagregación de los viriones, retiran los residuos de ácido siálico de las glicoproteínas virales.

Hemaglutinación:

VIRUS	GLÓBULOS ROJOS	RESULTADO
Mixovirus	De pollo, de cobaya, humano Se necesitan iones monovalente, la reacción tiene lugar a 4° C., elusión espontánea a 37° C.	Positiva
Virus pustulosos	Se emplea normalmente pollo adulto, temperatura óptima de 37° C. no hay elusión.	Positiva
Sarampión	Preferiblemente células de mono, óptimo a 37° C., no hay elusión.	Positiva
Arbovirus	Preferentemente células de pollo joven o de ganso, ligeramente sensible al pH (Se requiere 6.0 a 7.0) Inhibida por lípidos normales en suero.	Positiva
Polioma	Células de Cobayo	
Enterovirus	Células humanas del grupo O, El virión Tiene capacidad hemaglutinante, No todos los enterovirus pueden hemaglutinar La reacción ocurre en frío y la disociación espontánea a 37° C.	Negativa

Hemaglutinación:

La primera observación fue cuando se mezclaron glóbulos rojos con líquido alantoideo de huevos infectados con virus de la gripe, las células se aglutinaban y sedimentaban rápidamente, Hirst analizó cuidadosamente y encontró que la reacción de aglutinación no era dependiente de la temperatura y requería electrolitos en el medio. La reacción podía bloquear con anticuerpos contra el virus y la velocidad dependía de la concentración vírica. Concluyó que una capa de complejos célula-virus era la responsable de la reacción de aglutinación. La HA hemaglutinina la proteína de la superficie del virión, es una glicoproteína que se presenta en forma de muchas espinas cortas que se proyectan de la envoltura viral. El virus se unirá a cualquier eritrocito, de la especie que sea, siempre que lleve los receptores celulares complementarios que son glicoproteínas de una clase diferente. La hemaglutinación para los virus de la influenza y los paramixovirus, pero no para otros, se complica por el hecho de que el virus también lleva una enzima neuraminidasa, que destruye los receptores glicoproteicos de la superficie del eritrocito y permite al virus liberarse nuevamente.

Material:

- Suspensión de virus.
- Glóbulos rojos citratados.
- BBS, 0.01 M, pH 7.2.
- Tubos de centrifuga.
- Tubos de 12 x 72mm.
- Pipetas de 1.0 y 10.0 ml. estériles.
- Centrifuga.
- Agua a 37° C.
- Gradilla.

Método:

- Separación de las células de plasma citratado.
- Preparar suspensión al 0.5% de glóbulos rojos en PBS.
- Preparar serie de doble dilución (1:10 a 1:640) de virus en PBS (suspensión).
- Añadir 0.4 ml. de gr. al 0.5% al tubo homogenizar e incubar a 37° C.

1.2.1.1 Inhibición de la Hemoaglutinación.

FUNDAMENTO: Los ácidos nucleicos de muchos virus codifican proteínas de superficie que aglutinan eritrocitos de varias especies, esta prueba se basa en la inhibición de la hemoaglutinación viral por un anticuerpo específico el fenómeno de hemoaglutinación no es evidente y se visualiza la sedimentación de los glóbulos rojos formando el característico botón rojo; se usa para detectar indirectamente la presencia de virus hemoaglutinante como ortomixovirus, paramixovirus, y los arbovirus-toga virus (incluyendo la rubéola), flavivirus y bunyavirus; por que el virus es una proteína extraña por lo cual se producen anticuerpos contra el antígeno.

La reacción de las hemoaglutininas virales con los eritrocitos da como resultado un retículo de células aglutinadas que sedimentan en forma irregular en un tubo o cubeta de micro titulación, las células no aglutinadas sedimentan en forma de botón compacto.

Esta técnica es altamente sensible y específica, debido a que únicamente mide aquellos anticuerpos dirigidos contra la hemoaglutinina viral; la rapidez, sensibilidad específica y costo mínimo de la técnica hace que sea empleada en muchos laboratorios para la caracterización de los virus y/o anticuerpos.

MATERIAL:

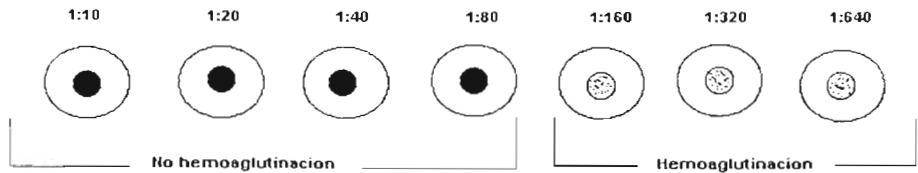
- Suspensión del virus.
- Antisuero específico.
- Eritrocitos de la especie adecuada (pollo, ganso, cobayo o humanos grupo o tripsinizados) extraídos en solución de Alsever o citratados.
- PBS estéril.
- Tubos de centrifugar estériles.
- Tubos de prueba 12 x 72 mm. estériles
- Pipetas de 1 y 10 ml. estériles
- Centrifuga.
- Baño Maria a 37° C.

METODO:

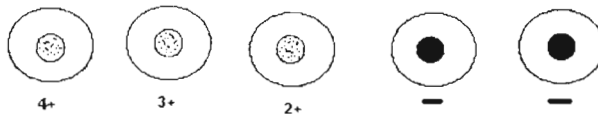
- ⇨ Hacer diluciones dobles seriales del antisuero en PBS comenzando con una dilución 1:10. Distribuir la dilución del suero en 0.2 ml. en pequeños tubos.
- ⇨ Titular el antígeno como en la prueba de HA. Determinar la dilución que contenga 4 unidades HA por 0.2 ml.

Por ejemplo:

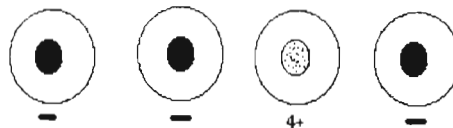
- ❖ Si el título de HA del virus es 1:80 representa 1 unidad HA, de esta manera, una dilución 1:10 puede contener 8 unidades HA en 0.4 ml. o 4 unidades HA en 0.2 ml.
- ❖ Añadir 4 unidades de antígenos en 0.2 ml. en cada tubo con antisuero.
- ⇨ Incluir los siguientes controles:
 - (1). suero solo dilución 1:10, 0.4 ml.
 - (2). antígeno solo 4 unidades, 0.4 ml.
 - (3). suero positivo conocido 1:10, 0.4 ml.
 - (4). suero negativo conocido 1:10, 0.4 ml.
- ⇨ Incubar de 30 a 60 min.
- ⇨ Añadir 0.4 ml. de eritrocitos al 5% a todos los tubos. Añadir. Colocar todos los tubos a una temperatura apropiada también los controles tienen que asentarse completamente.
- ⇨ Leer el título, la dilución mas alta de la hemoaglutinación inhibido por el virus y es expresado como la reciproca de la dilución del suero



- ⇨ Leer la titulación reversa como sigue:



- ⇨ Leer los controles.



Tomado de Practical Virology, Metselaar, D and Simpson, D.I.H. Ed. Medical Publications Oxford

- (1) suero solo debe ser negativo.
- (2) antígeno solo debe ser negativo.
- (3) suero positivo conocido debe ser positivo
- (4) suero positivo conocido debe ser negativo.

INTERPRETACIÓN:

Se tomara como punto final de la actividad del suero, la máxima dilución en que el fenómeno de hemoaglutinación ha sido inhibido, el resultado final se expresa en unidades inhibitoras de la hemoaglutinación (UIHA), la reciproca de la dilución del punto final de la actividad del suero, multiplicada por las unidades hemoaglutinantes del suero por unidad del volumen.

La presencia de reacciones IHA de diluciones inferiores a 1/10 (40 u 80 UIHA) son consideradas negativas, de 1/10 a 1/40 (80 a 320 UIHA) indican exposición previa del virus, valores superiores a 1/180 (mayor de 640 UIHA) representa a la infección reciente.

8.2.2 Hemoadsorción.

Técnicas de hemoadsorción.

Parece ser que algunos virus hacen que las superficies celulares del huésped, sean capaces de adsorber a los eritrocitos de algunas especies. Los virus de esta categoría no son liberados por la ruptura de la célula, sino que se escapan durante un periodo de días. En realidad, los eritrocitos son adsorbidos por los virus de la superficie celular. El fenómeno de la hemoadsorción pueden ocurrir con o sin la presencia del efecto citopático.

❖ Detección de virus (por ejemplo, los mixovirus).

1. Después de un periodo de incubación adecuado (de 5 a 10 días se retira el medio de cultivo de los tubos).
2. A cada tubo se le agregan 0.5 ml. de una suspensión a 0.5% de eritrocitos humanos del grupo IV-0, en solución salina isotónica de NaCl y se ponen en el refrigerador a 4° C. durante 30 minutos.
3. Se examinan al microscopio hasta que los cultivos positivos de desarrollo de los virus muestren a los eritrocitos adsorbidos por el monoestrato celular.

❖ Identificación de virus.

Como en todos los sistemas de identificación, se usan antisueros de referencia normalizados, para inhibir el efecto viral. Sin embargo muchos sueros sanguíneos contienen inhibidores no específicos de la hemoadsorción y éstos deben eliminarse antes de usarlos.

1. A una parte de suero se agregan cuatro partes de enzima destructora de receptor (EDR) (Burroughs Wellcome Co., Euston Road, London N. W. 1.), que es una enzima que se halla presente en los filtrados de cultivos de *V. Cholerae*.
2. Se incuba a 37° C. durante la noche y se inactiva a 56° C., en baño María, durante 30 minutos, con lo cual se destruyen también cualesquiera inhibidores termolábiles.
3. Como es imposible determinar la cantidad de virus presentes en la prueba, los sueros sanguíneos se usan a una dilución de 1.5 hecha con el EDR.
4. Se deben inocular suficientes tubos con cultivos celulares con el virus hemoadsorbente desconocido y se incuban durante 5 o 7 días.
5. Se retira un tubo y se examina para comprobar hemoadsorción.
6. Si resulta positivo, se desecha el medio de cultivo de los tubos restantes y se substituye con 0.5 ml. de antisuero tratado con EDR, empleando un tubo por suero.
7. Se incuba a la temperatura del cuarto durante una hora.
8. Se descarta el antisuero y se agregan 0.5 ml. de una suspensión de hematies humanos de grupo IV-0 a 0.5% en solución salina isotónica.
9. Se incuba en el refrigerador a 4° C. durante 30 minutos y luego se examina cada tubo al microscopio para comprobar la hemoadsorción. El tubo que contenga anticuerpos homólogos frente al virus bajo prueba no mostrará hemoadsorción.

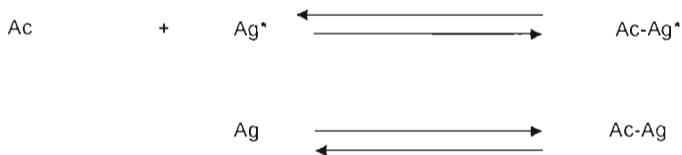
❖ Detección y titulación de anticuerpos.

Ya que la prueba se lleva al cabo sobre virus cultivados en desarrollo, es imposible calcular, con exactitud la titulación viral. Las titulaciones de anticuerpos mediante los métodos de inhibición de la hemoadsorción no son de uso general, pero las pruebas de neutralización realizadas como con los métodos para comprobar los efectos citopáticos, pueden hacerse usando la hemoadsorción para detectar los puntos finales.

8.2.3 Radioinmunoensayo (RIA).

Consiste en la inhibición competitiva de la unión de un antígeno radiactivo (trazador) a su anticuerpo específico, con el antígeno no marcado.

Evaluación de la unión de una sustancia radiomarcada con un anticuerpo o proteína receptora:



El proceso obedece a la ley de acción de masas. Cuando mayor sea la cantidad de Ag no marcado presente, menor será la cantidad de trazador que se une al Ac.

Se puede determinar las concentraciones del antígeno y muestras complejas de fluidos biológicos con suficiente sensibilidad y especificidad.

Requisitos:

- El trazador sea altamente radiactivo.
- El anticuerpo sea altamente específico en baja concentración.
- Isótopos radiactivos:
 - El radioisótopo es un átomo inestable que va desintegrándose y emite partículas subatómicas y/o energía en forma de radiación que puede ser medida con aparatos apropiados.
 - Los isótopos más comúnmente empleados son:
 - ^{131}I Vida media de 8 días.
 - ^{125}I Vida media de 60 días.
 - ^{125}I Aumenta el tiempo de conservación de las preparaciones radioyodadas
- La energía emitida está constituida por radiaciones gamma.
- Para producir el radical activo:
 - Electrólisis por corriente continua.
 - Cloramina T.
 - Lactoperoxidasa.
 - Lactoperoxidasa-glucoxidasa.

Para la realización de un RIA se efectúan dos ensayos fundamentales:

1. Ensayo de titulación: Ajuste de la concentración de los Ac específicos.
2. Ensayo de desplazamiento: Consiste en la elaboración de una curva patrón empleando una dilución fija del antisuero (título) frente a una serie de concentraciones conocidas del Ag.

Luego del procedimiento de la información es posible calcular la concentración de muestras desconocidas mediante la interpolación de las respuestas dentro de los mismos rangos.

Dos variantes:

- **Análisis competitivo**

Sigue las leyes de acción de masas, que especifica las relaciones entre las sustancias problema y la proteína de unión, el anticuerpo o el receptor.

- **Análisis no competitivo:**

Conocido como inmunoradiométrico (IRMA) o tipo sándwich, que a diferencia del análisis competitivo, que se tituló para alcanzar una respuesta con el uso mínimo de Ac, en este se emplea un exceso de Ac.

En este método se emplea una técnica de separación en fase sólida de anticuerpo libre para discriminar entre este y el anticuerpo unido a su ligando.

Otra característica de este análisis es el empleo de dos anticuerpos dirigidos hacia sitios

Con los datos obtenidos puede graficarse el antígeno marcado combinado contra el antígeno no marcado que se adiciona.

La curva regresiva es lineal lo que permite hacer la cuantificación por interpolación de los resultados obtenidos.

Se aplica en:

- *Hormonas:* insulina, aldosterona, FSH humana, progesterona, testosterona, tiroxina, vasopresina.
- *Proteínas:* alfa-fetoproteína, Ag carcinoembrionario, IgE, Ag de superficie de virus de hepatitis B.
- Ácidos nucleicos ADN
- Vitamina B12.
- Medicamentos: Digoxina, LSD, barbituratos.
- Enzimas: Pepsina y tripsina.

8.2.4 Sondas / Hibridación.

Híbrido. Se denomina con este término al producto resultante de dos progenitores distintos, fue propuesto por Gregor Johann Mendel en 1865.

Hibridación DNA-RNA. Se fundamenta básicamente por la complementariedad de los pares de bases de fragmentos específicos en la cadena de DNA para la formación de una cadena nueva con RNA o DNA complementario.

Ejemplo: Hibridación DNA-RNA.

En esta técnica el DNA es desnaturalizado por calentamiento lo cual hace que se separen las dos cadenas de la hélice doble. Cuando la solución se enfría una parte de las cadenas de DNA se unirán y se enrollarán; esto es, las cadenas complementarias se "encuentran" unas a otras y reconstituyen hélices dobles. Cuando se añade RNA a la solución de DNA desnaturalizado y la solución se deja enfriar lentamente, parte del RNA formará hélices dobles con el DNA, si estos fragmentos de RNA son complementarios a unas partes del DNA.

La existencia de complementariedad muy extendida entre DNA y RNA es una indicación convincente de que el DNA actúa como un molde sobre el cual se hace un RNA complementario.

La hibridación del DNA-RNA se empleó para mostrar que la infección por fagos da lugar a la producción de mRNA específico de fago útil para la proliferación del mismo.

Interpretación:

Para la interpretación de dicha técnica es necesario la utilización de varias técnicas como: Sondas radioactivas, electroforesis, transferencia de Western, Inmunofluorescencia entre las más comunes.

Sondas.

Generalmente las sondas son ácidos nucleicos marcados radiactivamente cuya complementariedad localiza con precisión una secuencia determinada de DNA.

Por lo tanto si deseamos localizar el gen de la β -globina, deberemos usar mRNA de la β -globina marcado radiactivamente o cDNA marcado radiactivamente se formarán híbridos RNA-DNA o DNA-DNA entre el gen específico y la sonda. La auto radiografía localizará entonces la sonda radioactiva.

8.2.5 Reacción en cadena de polimerasa.

Durante la Reacción en Cadena de la Polimerasa se permite replicar entre cientos de miles y millones de veces, en el transcurrir de pocas horas e in Vitro, pequeñas cantidades de ADN. La reacción imita un fenómeno de replicación del ADN que ocurre en forma natural en la célula. La reacción "in Vitro" necesita la presencia de una cadena de ADN "diana" donde esta incluido el fragmento que se puede amplificar, un par de cebadores (cadenas simples de ADN, entre 15-30 nucleótidos) que limitan la talla del segmento que se va amplificar, nucleótidos que son precursores de las nuevas cadenas de ADN (adenina, timina, guanina y citosina) y la enzima polimerasa, taq polimerasa, la cual usando como inicio los cebadores va a formar las cadenas nuevas.

Metodología:

La PCR es un proceso que consta de tres pasos que forman un ciclo, el que se repite un número determinado de veces.

- * Un ciclo de PCR consiste de los siguientes pasos:
 1. Desnaturalización.
 2. Unión (alineación)
 3. Extensión.
- * Este proceso se lleva a cabo en un termociclador, un instrumento que automáticamente controla y alterna las temperaturas durante períodos programados de tiempo para el número apropiado de ciclos (usualmente 30-40 ciclos).

Paso 1: Desnaturalización por calor.

En la desnaturalización por calor el ADN se calienta hasta una temperatura de 92° a 96° C. separando la doble hebra de DNA en dos hebras sencillas rompiendo los enlaces de hidrógeno que unen a las bases, mientras que los enlaces entre la desoxirribosa y los grupos fosfato permanecen intactos.

Paso 2: Alineación – Unión del Partido al Objetivo.

En el segundo paso, la temperatura se reduce usualmente entre 40° C. y 65° C., para permitir el "apareamiento" de cada una de las cadenas cortas de nucleótidos (oligonucleótidos) con cada una de las hebras separadas del ADN molde. Se trata de segmentos de ADN de cadena simple, sintetizados en el laboratorio y diseñados de manera tal que permiten definir los límites del tramo de ADN que se desea replicar. Obviamente, para que se pueda producir el apareamiento, cada uno de estos oligonucleótidos, a los que se denomina "iniciadores" o *primers*, debe ser complementario del tramo al que tienen que unirse en las cadenas separadas del ADN molde.

Paso 3: Extensión.

Una vez que los cebadores se unieron a sus secuencias complementarias, se eleva la temperatura a 72° C. y la enzima Taq DNA polimerasa se usa para replicar las hebras de DNA. La Taq polimerasa comienza el proceso de extensión en dirección 5' a 3' agregando los nucleótidos correspondientes, obteniéndose la hebra complementaria de DNA. Para ello, la ADN polimerasa usa desoxidionucleósidos trifosfato (dNTPs) agregados a la mezcla de reacción. La temperatura a la que se realiza el tercer paso está condicionada por aquella a la cuál "trabaja" la enzima ADN polimerasa. Al cabo del primer ciclo de tres reacciones (desnaturalización, apareamiento, extensión) el tramo de ADN elegido se ha duplicado y el doble de su cantidad original se encuentra disponible para ser nuevamente replicado en un segundo ciclo. El resultado de la aplicación de numerosos ciclos "en cadena" da lugar a la amplificación geométrica del segmento de ADN delimitado por los cebadores o *primers*.

Diferentes tipos de PCR:

* PCR/Tag

Para replicar el ADN, la técnica PCR hizo uso, en un principio, de la ADN polimerasa de la bacteria *Escherichia Coli*. Pero esta enzima resulta desactivada debido a la alta temperatura requerida para desnaturalizarla doble cadena del ADN, por lo cual debía agregarse enzima fresca al comenzar el tercer paso de cada ciclo. Este inconveniente fue solucionado de manera ingeniosa cuando se la reemplazó por su equivalente de la bacteria "termófila" *Thermus aquaticus*. En efecto, la ADN polimerasa de este microorganismo, denominada Taq polimerasa, actúa eficientemente entre los 75° C. y los 80° C. y resiste más de dos horas a 93° C. De esta manera es posible mezclar todos los componentes de la PCR al comenzar el primer ciclo y la reacción en cadena puede llevarse a cabo mediante equipos automatizados que realizarán los ciclos térmicos programados.

* PCR a partir de RNA.

El genoma de muchos virus de importancia clínica está compuesto de RNA en lugar de DNA, los más sobresalientes son el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), el Virus de la Hepatitis C (HCV) y la familia de Enterovirus (EV):

* Transcripción Reversa-PCR (RT-PCR).

Dado que el RNA usualmente es de una sola hebra y es sensible al calor, es necesario hacer una transcripción reversa (RT) antes de iniciar la amplificación por PCR. La transcripción reversa genera una copia de la hebra de RNA, pero esta copia es DNA complementario (cDNA) el cual es estable al calor y puede resistir la metodología PCR.

Los pasos de la RT-PCR son:

1. Transcripción reversa: Unión del partidor a la secuencia de RNA objetivo.
2. Transcripción reversa: La polimerasa *rTth* cataliza la extensión del partidor mediante la incorporación de nucleótidos complementarios.
3. Fin de transcripción reversa, se obtiene la hebra del cDNA complementario al RNA.
4. PCR.

El análisis de las muestras.

El hecho de que las moléculas de ADN obtenidas al finalizar la reacción en cadena correspondan efectivamente al fragmento de interés queda asegurado por la intervención de los *primers* que definen los extremos "derecho" e "izquierdo" de este fragmento. Así, una vez que la reacción a finalizado, el tamaño del fragmento multiplicado puede determinarse sometiendo los productos de la reacción a una electroforesis en gel de agarosa o poliacrilamida. Por otra parte, la identidad del producto puede ser confirmada mediante hibridación (unión complementaria) con una sonda marcada radiactivamente, cuya secuencia de base esté contenida en el fragmento de interés. La localización de las sondas radiactivas se logra, en ambos casos, mediante autorradiografías.

Una estrategia distinta para confirmar la identidad del fragmento replicado consiste en realizar dos reacciones de PCR consecutivas. Al finalizar la primera, una alícuota de la misma es sometida nuevamente al proceso de multiplicación tras haber colocado dos *primers* internos. Mediante el empleo de esta metodología, conocida como *nested* PCR (PCR anidada), la filiación de los fragmentos obtenidos queda confirmada por el hecho de que poseen tamaños previsibles.

Para diseñar los *primers* que hacen posible replicar un fragmento de ADN mediante la técnica PCR es necesario conocer, en la mayoría de los casos, la secuencia de bases total o parcial de dicho fragmento.

La técnica PCR puede ser utilizada, en algunos casos, para clonar genes cuya secuencia de bases es desconocida. Cabe preguntarse como se diseñan, en este caso, los *primers* necesarios para realizar la amplificación. La respuesta a esta pregunta la da el conocimiento del código genético. Si se determina

experimentalmente la secuencia de aminoácidos que constituyen un segmento de la proteína cuyo gen se quiere clonar, se puede deducir cuáles son las secuencias teóricas de todos los posibles ARN mensajeros que codifican para ese segmento. Con esta información se fabrican los dos *primers*, cada uno de los cuales es, en realidad, una mezcla de todos los oligonucleótidos posibles que el código genético permite deducir para codificar el segmento de proteína elegido. Dicho de otro modo: varias secuencias de nucleótidos pueden dar lugar a un mismo aminoácido. La reacción de PCR se realiza con estas dos mezclas de "*primers degenerados*". En cada mezcla, sólo uno de los oligonucleótidos será totalmente complementario del fragmento de ADN a amplificar y funcionará realmente como primer. Una vez amplificado el fragmento, se estudia la secuencia y se comprueba su correspondencia con la de la proteína previamente caracterizada.

Aplicaciones en el diagnóstico. La PCR ha permitido el desarrollo de nuevas estrategias de diagnóstico en numerosos campos de la medicina. Por ejemplo, existen métodos de detección por PCR de agentes infecciosos como los virus de la hepatitis B y C, del papiloma humano, de Epstein Barr y citomegálico. En relación con el SIDA es posible detectar regiones del genoma del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) amplificadas por PCR a partir de sangre extraída de pacientes seropositivos. Esta técnica puede ayudar a resolver resultados inciertos provenientes de las pruebas habituales y ha sido aplicada en el diagnóstico de la infección en recién nacidos de madres seropositivas. En tales casos, el uso de la técnica PCR evita el problema que se plantea por el hecho de que la presencia de anticuerpos recibidos de la madre impide saber, hasta que éstos desaparecen aproximadamente un año después del nacimiento, si el propio organismo del niño ha generado anticuerpos porque se encuentra infectado. Pueden detectarse también otros microorganismos patógenos como las clamidias, la bacteria *Escherichia coli* enterotoxigénica, el vibrión del cólera y los tripanosomas.

La técnica PCR ha facilitado enormemente el diagnóstico de enfermedades hereditarias como hemoglobinopatías (talasemias y anemia falciforme), la fenilcetonuria, las hemofilias A y B, la deficiencia de alfa 1 antitripsina, la distrofia muscular y la fibrosis quística. Esta última es la más común de las enfermedades autosómicas recesivas severas que afectan a la población blanca.

Problemas de la técnica PCR: Uno de los problemas más evidentes que presenta esta técnica, sobre todo cuando se le utiliza como herramienta de diagnóstico, es la posible generación de resultados falsamente positivos. Podría llegar a indicar, por ejemplo, la presencia de secuencias virales en personas no infectadas. Esto es consecuencia de la extrema sensibilidad del método. Los falsos positivos pueden generarse por contaminación de una muestra a partir de una única molécula de ADN proveniente de otra muestra. Esta molécula será amplificada en la PCR y aparecerá como una banda en el caso de electroforesis en gel o como una respuesta positiva en una hibridación con una sonda radiactiva. La causa más frecuente de falsos positivos es el "arrastré" de secuencias de ADN amplificadas en reacciones previas. Tales secuencias pueden estar presentes en los equipos de laboratorio y en los reactivos, pudiendo espaciarse por medio de aerosoles. Frente a esto, los expertos recomiendan la realización de controles negativos múltiples (reacciones de amplificación con todos los reactivos, excepto el ADN molde), además del uso de técnicas de esterilidad y de micropipetas que eviten la generación de aerosoles como precaución para prevenir la contaminación de las muestras.

Contaminación entre muestras:

- * Utilizar material de un solo uso
- * Utilizar pipetas de desplazamientos positivo ó puntas con filtro.
 - Abrir los tubos uno a uno -
- * Contaminación por ambiente.
- * No trabajar con plásmidos recombinantes.
- * Contaminación por producto amplificado.
 - Separar FÍSICAMENTE las zonas de "pre" y "post" PCR
 - Utilizar material de laboratorio diferente en ambas zonas.
 - Utilizar métodos de descontaminación.
 - Luz UV
 - HCl
 - Enzimas: Uracil-N-Glycosylase (UNG).
- * Utilizar reactivos prePCR ya preparados, analizados y conservados en alícuotas.

Principios de la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

La técnica de PCR fue reportada por primera vez en 1985; de esa fecha hasta ahora esta metodología ha experimentado numerosas modificaciones, siendo la más importante de ellas la ocurrida en 1986 donde se introdujo por primera vez el uso de una polimerasa termoestable, la Taq polimerasa, lo cual implicó un cambio radical en la técnica y su definitiva aceptación por la comunidad científica internacional.

Durante la Reacción en Cadena de la Polimerasa "se multiplica" un fragmento de ácido nucleico hasta 10^9 veces, la reacción imita un fenómeno de replicación del ADN que ocurre en forma natural en la célula. La reacción "in Vitro" necesita la presencia de una cadena de ADN "diana" donde está incluido el fragmento que se puede amplificar, un par de cebadores (cadenas simples de ADN, entre 15-30 nucleótidos) que limitan la talla del segmento que se va a amplificar, nucleótidos que son precursores de las nuevas cadenas de ADN (adenina, timina, guanina y citosina) y la enzima polimerasa, taq polimerasa, la cual usando como inicio los cebadores va a formar las cadenas nuevas.

La reacción tiene lugar en tres fases. Durante la primera o desnaturalización el fragmento original de ADN se calienta hasta una temperatura de 92° a 96° C.; esto provoca la separación de las dos cadenas. En la segunda fase, llamada hibridación, la temperatura de la mezcla se rebaja hasta $40-60^{\circ}$ C. para que los cebadores se enlacen con el ADN escindido. En la tercera fase de extensión o polimerización, la temperatura de la mezcla se eleva hasta 72° C. para la extensión, una enzima la Taq DNA polimerasa la cual es termoestable y es la que en buena cuenta ha permitido la optimización del proceso PCR en una forma relativamente sencilla, copie rápidamente la molécula de ADN.

Estas tres fases constituyen un ciclo completo de PCR, que se realiza en menos de dos o tres minutos. Teóricamente, el ciclo de PCR se puede repetir sin límite, pero la polimerasa, los nucleótidos y los cebadores suelen renovarse al cabo de unos 30 ciclos. Estos 30 ciclos, que duran menos de tres horas, bastan para producir mil millones de copias de ADN.

Esta característica identifica a la PCR como una herramienta poderosa y valiosa en todos los campos de la Biomedicina.

En el terreno del diagnóstico de las enfermedades infecciosas, la PCR detecta directamente en diferentes tipos de muestras, patógenos tradicionalmente difíciles de cultivar tales como, Clamidia, Legionella y Micoplasma y/o aquellos que requieren de largos periodos para su desarrollo in Vitro y/o que se encuentra en muy baja concentración en los líquidos biológicos y son difíciles de aislar, como es el caso del *Mycobacterium tuberculosis*, enfermedad en la que muchas veces el tratamiento empírico tiene que iniciarse antes del diagnóstico definitivo, apoyándose únicamente en el cuadro clínico. Mediante el uso de la PCR se puede identificar en una pequeña muestra biológica al *Mycobacterium tuberculosis*, en tan sólo 4 horas, en lugar de las 6 semanas que toman las técnicas del cultivo convencionales con una alta sensibilidad y especificidad.

En virología, esta tecnología nos permite identificar al agente infeccioso independientemente de su respuesta serológica, una gran ventaja en el diagnóstico de algunas enfermedades virales en los cuales los anticuerpos aparecen luego de un largo periodo de la infección y a veces en forma impredecible o en aquellos numerosos casos donde se quiere precisar si la presencia de anticuerpos es señal de infección antigua o activa como puede ser el caso del hallazgo de anticuerpos a Hepatitis C y la necesidad de precisar si el virus está presente o no. También es de gran aplicación en el diagnóstico de enfermedad viral neonatal donde el diagnóstico serológico de la infección es generalmente enmascarado por la presencia de anticuerpos maternos circulantes por ejemplo el VIH. En la actualidad ya se dispone de sistemas de identificación de *Chlamydia trachomatis*, Dengue y sus serotipos, *Helicobacter pylori*, HIV, Hepatitis C, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae*, Pápiloma virus y sus diferentes tipos, *Mycoplasma pneumoniae*, *Ureaplasma urealyticum*, Herpes simple, Citomegalovirus, *Treponema pallidum*, etc. Además la técnica ofrece una alternativa novedosa para investigar la evolución y diversificación de los microorganismos en una forma rápida y sencilla, las investigaciones en esta área básica han tenido implicaciones muy importantes desde el punto de vista epidemiológico y ha implicado el desarrollo de una nueva ciencia conocida como Epidemiología Molecular. En el megaproyecto internacional "Genoma Humano" la PCR y las microtécnicas de secuenciación han permitido un avance mucho más rápido que lo previsto.

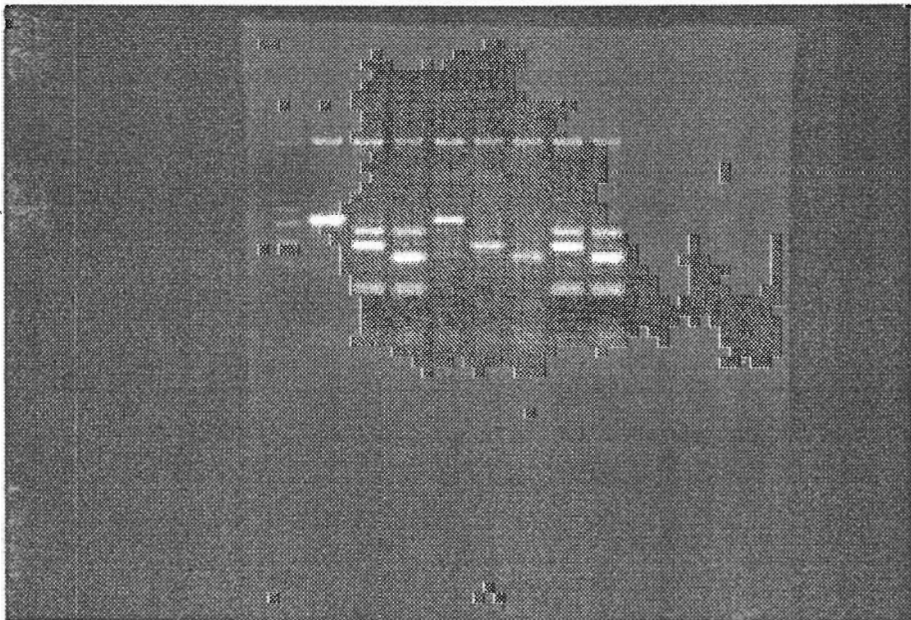
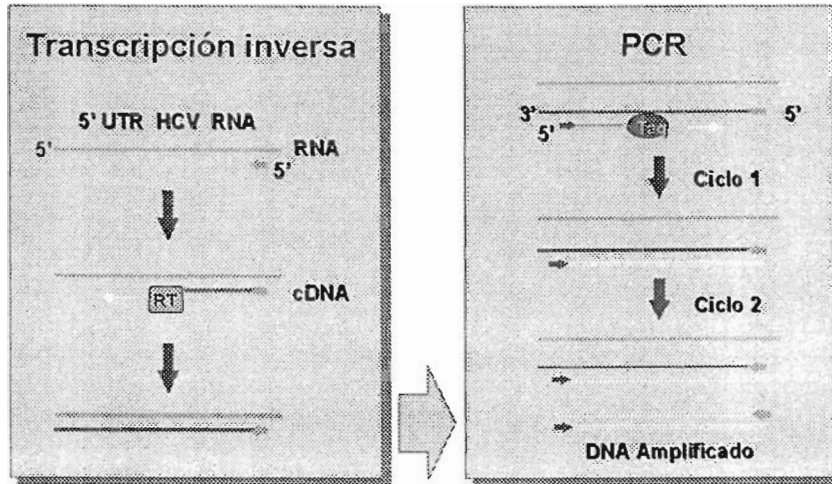
También se ha introducido el uso de PCR para el estudio del complejo mayor de histocompatibilidad que son los antígenos HLA, especialmente, los de la región HLA-D conocidos en la actualidad como moléculas HLA de clase II. Con ello, se puede realizar pruebas de paternidad y la identificación de tejidos. En criminalística esta técnica ha revolucionado la

Técnicas moleculares en el diagnóstico de las ETS

PCR: *Reacción en Cadena de la Polimerasa*

Variantes:

- è *RT-PCR*
- è *Nested PCR*
- è *Semi Nested PCR*



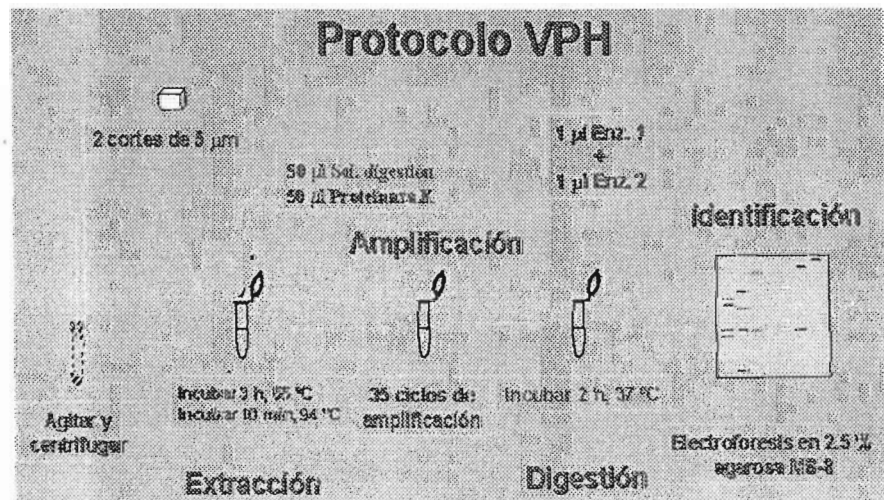
Detección de productos en gel de Agarosa y coloración BET

Equipamiento Laboratorio PCR

<p>Área pre PCR, área de extracción de ácidos nucleicos-</p> <ul style="list-style-type: none"> -Pipetas automáticas -Microcentrífuga -Bloque térmico -Vortex -Hielo 	<p>Área post PCR, amplificación y fotodocumentación</p> <ul style="list-style-type: none"> -Termociclador -Pipetas automáticas -Horno de hibridación -Equipo de electroforesis en agarosa/acrilamida/secuencia -Sistema fotodocumentación con software
<p>Materiales desechables:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Puntas de pipeta con filtro -Tubos eppendorf -Guantes 	<p>Materiales desechables:</p> <ul style="list-style-type: none"> -Puntas de pipeta con filtro -Tubos eppendorf -Guantes

¡Cuidado con la contaminación!

<p>Contaminación entre muestras Utilizar material de un solo uso Utilizar pipetas de desplazamiento positivo ó puntas con filtro Abrir los tubos uno a uno</p>	<p>Contaminación por producto amplificado para FÍSICAMENTE las zonas de "pre" y "post" PCR Utilizar material de laboratorio diferente en ambas zonas. Utilizar métodos de descontaminación</p> <ul style="list-style-type: none"> -Luz UV -HCl -Enzimas: Uracil-N-Glycosylase (UNG) <p>Utilizar reactivos prePCR ya preparados, analizados y reservados en alícuotas.</p>
<p>Contaminación por ambiente No trabajar con plásmidos recombinantes</p>	



Detección / Identificación VPH

Amplificación de una región común a todos los VPH

-Región L1 open reading frame (Manos et al. 1990)

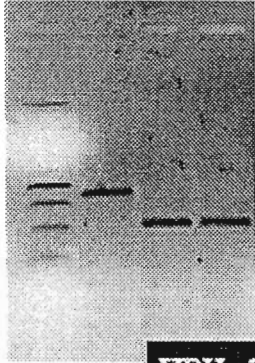
Tipado por digestión con enzimas de restricción

-Búsqueda de enzimas que permitan identificar el mayor número de tipos (software)

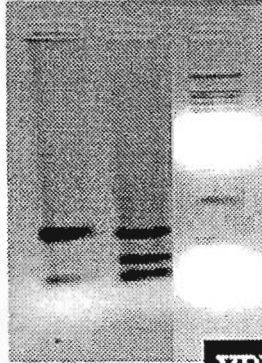
Interpretación del patrón de bandas por electroforesis (digitalización + software)

-Cada tipo de virus ha de presentar un patrón de restricción distinto y característico.

Tipificación de VPH mediante enzimas de restricción

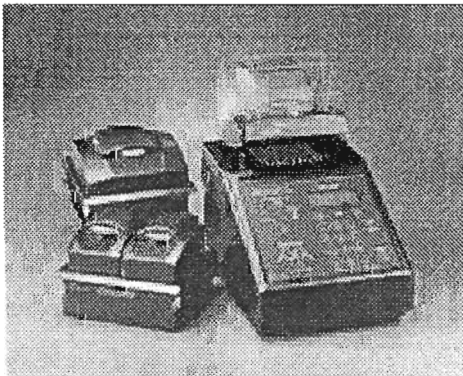


VPH 16



VPH 18

Termociclador de efecto Peltier con bloque intercambiable (tubos y microplacas de 96 pozos)



8.2.6 Reacción en cadena de polimerasa (PCR) De tiempo real (PCR / RT / PCR TAQMAN)

PCR

La PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) es una técnica que nos permite copiar secuencias específicas de DNA de forma tal que, en cada ciclo del proceso se duplica el número de moléculas.

Metodología:

Esta se lleva a cabo en tres pasos:

1. Desnaturalización. Es el inicio de cada ciclo, para que la DNA polimerasa funcione, se necesita que ambas cadenas de DNA molde se separen. Esto se consigue al exponer la doble cadena de DNA a temperatura de 92 a 98° C.
2. Alineamiento. Este se lleva a cabo a una temperatura de entre 42 a 60° C. y consiste en la unión de un pequeño fragmento de DNA a la cadena molde y sirva como sitio iniciador o anclaje para la DNA polimerasa. El tamaño del fragmento (iniciador) generalmente es de 18 a 22 bases.
3. Extensión. Esta se da a una temperatura de 70 a 74° C. La DNA polimerasa agrega al iniciador las bases correspondientes a la cadena complementaria.

Posteriormente los productos de PCR se deberán analizar en geles de acrilamida o agarosa.

Reactivos:

- Cadena molde de DNA.
- Oligonucleótidos iniciadores.
- DNA polimerasa taq.
- Mezcla de desoxinucleótidos.
- Solución amortiguadora tris pH 7.1-7.2.
- Agua bidestilada.
- Aceite mineral.

PCR a partir de RNA (RT-PCR).

Algunos m.o. y retrovirus contienen la enzima llamada transcriptasa reversa que puede hacer copias de DNA a partir de RNA. Esta enzima es aislada y clonada, y su actividad puede ser explotada para hacer DNA complementario a partir de RNA in Vitro.

Para que la transcriptasa reversa construya una cadena de DNA complementario a partir de RNA, se requiere de un sitio de iniciación. Existen tres tipos de iniciadores que pueden utilizarse para hibridar el RNA: hexámeros (random primers), oligo-dT e iniciadores específicos. Los hexámeros son los menos específicos y consisten de una mezcla de hexanucleótidos con secuencias al azar, por lo que se obtienen transcripciones inespecíficas a partir de todo el RNA. El oligo-dT es un oligonucleótido compuesto de varias timinas (12-18) que se unen específicamente a la cola de poliadeninas que caracterizan al RNA mensajero. Los iniciadores específicos los diseña el investigador y permite la síntesis de DNA complementario exclusivamente del mensajero que contiene la secuencia que se pretende amplificar. La utilidad de la RT-PCR es determinar con precisión la expresión de genes de diversos tejidos y a partir de ahí clonarlos secuenciarlos o utilizarlos como sonda para un análisis Norteen blot.

Ejemplo: Enfermedades hereditarias, en infecciones amplificación del material génico bacteriano o viral, en neoplasias malignas, amplificación de oncogenes y otras proteínas asociadas al cáncer.

PCR-TAQMAN

- * Es un sistema de alta cuantificación de secuencias de ácidos nucleicos, combinando ciclos térmicos, con una detección fluorescentes de los productos de la PCR.
- * La detección cuantitativa de secuencias de ácidos nucleicos específicos es posible usando el ensayo de nucleasa fluorogénica 5'.
- * Si al blanco de interés esta presente, a la prueba se le añade especificidad marcando los sitios de los primers de adelante y atrás, el resultado es un incremento en la intensidad de la fluorescencia.
- * Este proceso ocurre en varios ciclos de PCR y no interfiere con la acumulación del producto del PCR.
- * La fluorescencia es inducida por la luz de un láser, la fluorescencia emitida es captada por fibras dirigidas a un espectrógrafo con una cámara de carga-acoplada (CCD).

8.2.7 Quimioluminiscencia.

Emisión de radiación desde una especie excitada electrónica o vibracionalmente y que no está en equilibrio térmico con su entorno debido a una reacción química, característico de un producto de oxidación.

Los compuestos quimioluminiscentes son llamados quimioluminóforos: luminol, isoluminol, éster de acridina.

Método:

- Inmuno ensayo de quimioluminiscencia CIA o LIA
- Técnica de luminiscencia del antígeno en fase sólida (SPALT)

Fundamento: Fijación del quimioluminóforo a un Ag o Ac.

Técnica:

1. El antígeno es inmovilizado en una fase sólida (poliestireno).
2. El anticuerpo es marcado con un quimioluminóforo.
3. Formación del complejo inmune.
4. Reacción de oxidación por un agente oxidante y un catalizador.

Usos:

- ↪ Determinar la viabilidad de las células. Medición directa del ATP.

CITOMEGALOVIRUS

MUESTRA	IgG Suero.
CONDICIONES	Muestra sin lipemia.
ESTABILIDAD	Refrigerada de 2 a 8° C. una semana o congelada por dos meses.
PROCESO	Diario.
INFORME	En 24 horas.

HERPES I-II

MUESTRA	IgG Suero.
CONDICIONES	Muestra no lipémica, no hemolizada.
ESTABILIDAD	Refrigerada de 2 a 8°C. por una semana, congelada a -20° C. por una semana.
PROCESO	Diario..
INFORME	En 24 horas

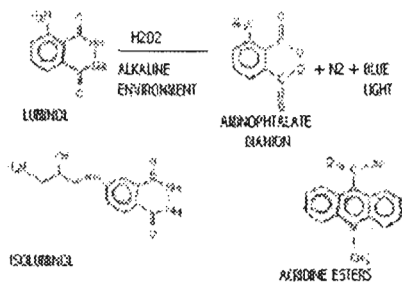
RUBÉOLA, ANTICUERPOS

MUESTRA	IgG Suero.
CONDICIONES	No hay.
ESTABILIDAD	Refrigerada de 2 a 8° C. por una semana, congelada a -20° C. 2 meses.
PROCESO	Diario.
INFORME	En 24 horas.
V. REFERENCIA	Negativo Menor de 10.

RUBÉOLA, ANTICUERPOS

MUESTRA	IgM Suero.
CONDICIONES	No hay.
ESTABILIDAD	Refrigerada de 2 a 8° C por una semana, congelada a 20° C. 2 meses.
PROCESO	Diario.
INFORME	En 24 horas.

REACCION DE QUIMIOLUMINISCENCIA



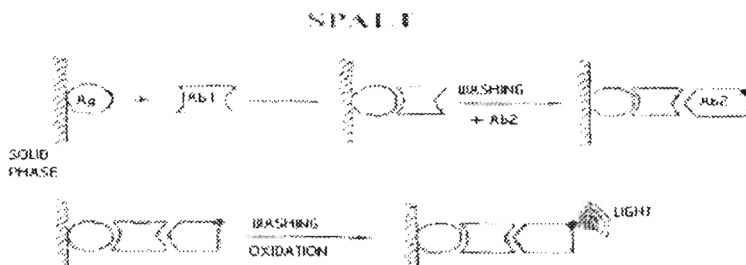
Tomado de: Miroslav F. Handbook of Inmunochimistry
Chapma & Hall. Checoslovakio. 1993.

8.2.7.1 SPALT

La quimioluminiscencia se basa en un espectro de emisión de una especie excitada que se ha formado en el curso de una reacción química; el resultado de este espectro es característico de un producto de oxidación.

Cuando la quimioluminiscencia ocurre en organismos vivos es llamado bioluminiscencia; este es un fenómeno que usualmente es catalizado por la enzima luciferasa dependiendo de un sustrato específico llamado luciferina. El compuesto que tiene la capacidad de ser quimioluminiscente es conocido como quimioluminóforo (estos son el luminol, isoluminol, ester de acridina).

Los métodos utilizados en la quimioluminiscencia son inmuno ensayos, como inmuno ensayo quimioluminiscencia (CIA o LIA), en los inmuno ensayos se pueden fijar un quimioluminóforo a un antígeno o anticuerpo. Cuando un anticuerpo es marcado con un quimioluminóforo, el antígeno es inmovilizado en una fase sólida (polioestireno), después de que se forme el complejo inmune ya formado, la luminiscencia es generada por un agente oxidante y un catalizador. Este método es llamado la Técnica de luminiscencia del antígeno en fase sólida (SPALT). El método de bioluminiscencia puede ser usada para medir directamente al ATP para determinar la viabilidad de las células. Cuando la célula es metabólicamente activa está genera ATP, mientras que esta muerta al ATP es degradado rápidamente.



Tomado de: Miroslav F. Handbook of Inmunochimistry
Chapma & Hall. Checoslovakio. 1993.

Quimioluminiscencia:

- Ocurre cuando una molécula emite un fotón como resultado de una reacción química, en la cual cada uno de sus intermediarios o productos finales se dejan en un estado de excitación electrónica.
- La mayoría de las reacciones quimioluminiscentes producen fotones en el rango comprendido entre 400 nm. (violeta) – 750 nm. (rojo)

Estas reacciones son poco comunes, ya que la mayoría liberan energía en forma de calor y como se requiere de una gran cantidad de energía para producir un fotón (aproximadamente 200 kJ), la mayoría de las reacciones quimioluminiscentes son de tipo oxidativo, de esta manera estas reacciones involucran oxígeno, peróxidos y otros oxidantes.

Los compuestos quimioluminiscentes mas conocidos son la lofina, el luminol y la lucigenina.

LUMINOL:

- El ejemplo más conocido en reacciones directas es la oxidación del luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona) en medio alcalino, para producir el ión 3-aminofalato excitado. Pueden utilizarse varios oxidantes, tales como el permanganato, hipoclorito o yodo, aunque el más usado es el peróxido de hidrógeno. La reacción es catalizada por iones metálicos (Fe(II), Cu(II), Co(II), entre otros), ferricianuro o algunos metalocomplejos (hemina, hemoglobina y peroxidasa).

LUCIGENINA:

- La lucigenina (nitro de 10,10' -dimetil-9,9' -biacridinio) es uno de los compuestos quimioluminiscentes más eficientes, que emite una intensa luz verde cuando se oxida en medio básico [5]. Otros derivados del acridinio producen emisión quimioluminiscente al ser oxidados por peróxido de hidrógeno en disolución acuosa.

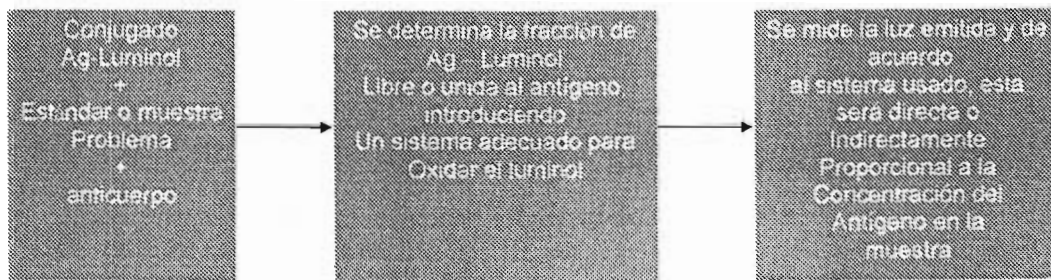
LOFINA:

- La lofina (2,4,5-trifenilimidazol) es el precursor quimioluminiscente más representativo de estos compuestos. Cuando la lofina es oxidada, en medio básico, por peróxido-hipoclorito o peróxido hexacianoferrato (III) y O₂ a hidroperóxido, a partir del cual se forman diariloilanimidinas en estado excitado a través de una estructura de dioxetano, que es la responsable de la emisión de la luz.

El desarrollado sistemas automatizados para el uso de inmunoensayos por quimioluminiscencia) desplaza a aquellas metodologías como el Radioinmunoanálisis (RIA), Inmunoradiometría (IRMA) y otras, haciendo hincapié que cada vez son más sencillas las determinaciones inmunológicas con esta tecnología de vanguardia. Ya que este sistema posee una gran especificidad y sensibilidad, se puede determinar una reacción antígeno-anticuerpo aunque su concentración sea del orden de los picogramos y con un mínimo de desnaturalización.

La variedad de pruebas que conforman esta metodología permite realizar diferentes determinaciones de casi todas las áreas del Laboratorio Clínico tales como: Endocrinología, Inmunología, Virología, Epidemiología, Hematología, Bioquímica Clínica, etc.

- Estos marcadores permiten monitorear las reacciones antígeno-anticuerpo en sistemas de ensayo inmunológico
- El luminol y sus derivados son relativamente fáciles de acoplar a proteínas y haptenos, uniéndolos covalentemente a la función amino del luminol (o sus derivados) el antígeno o a la proteína de interés a través del grupo alquil, y al producto de la unión se le denomina conjugado. Con esto determinar la concentración del antígeno por la quimioluminiscencia producida por la fracción libre o unida al anticuerpo marcado.



APLICACIONES : En las pruebas diagnósticas utilizadas como escrutinio para la infección por el virus de la hepatitis C en el Banco de sangre son la detección cualitativa de anticuerpos frente al virus por quimioluminiscencia (prueba 1) y la PCR-VHC (prueba 2).

El instrumento cuenta con las siguientes pruebas divididas en perfiles:

Perfil Tiroideo	Perfil Fertilidad	Perfil de Anemias	Marcadores Tumorales	Perfil Drogas Terapéuticas	Pruebas Especiales	Perfil Cardíaco
T4	LH	Vitamina	PSA	Digoxina	IgE	CK-MB
T3	FSH	B12	AFP	Teofilina	Cortisol	Mioglobina
T-uptake	HCG total	Folatos	CEA	Fenitoina	CK-MB	Troponina
TSH	Prolactina	Feritina	BR (CA 15-3)	Fenobarbital		
FT4	Estradiol		OV (125)	Vancomicina		
FT3	Progesterona		GI (19-9)	Gentamicina		

8.2.8 Microscopía Electrónica.

Microscopio Electrónico

La longitud de onda de los rayos de electrones es de 0.005-0.0003 nm., muy corta comparada con la de la luz visible (426-750 nm.; violeta-rojo). Es posible con el microscopio electrónico resolver objetos separados por una distancia de 0,003 µm. comparado con los 0,25 µm. de uno óptico. Los aumentos pueden llegar a ser un millón de veces.

El fundamento del microscopio electrónico consiste en calentar un filamento de Tungsteno con alto voltaje, este se ioniza, este haz de e⁻ es más rectilíneo e incide sobre la muestra. Se obtiene una imagen plana dada por e⁻ primarios.

A causa de la naturaleza de este instrumento sólo pueden examinarse objetos muy delgados; incluso una sola bacteria es demasiado gruesa para ser observada directamente. Por lo que, para preparar muestras para el microscopio electrónico se necesitan técnicas especiales de cortes ultrafinos. Para seccionar las células primero deben ser fijadas y deshidratadas (etanol o acetona). Después de la deshidratación, la muestra se incluye en una resina y es aquí donde se realizan cortes finos con un ultramicrotomo, por lo general equipado con una cuchilla de diamante. Una sola célula bacteriana puede cortarse en cinco o seis secciones muy finas. Si sólo tiene que observarse el contorno de un organismo, no son necesarias secciones finas por lo que se deshidratan al punto crítico incluyendo alcohol en los espacios moleculares que deja el agua y después con CO₂. Posteriormente la muestra se pasa en un convertor iónico y se recubren de una capa fina de un metal pesado (oro). El rayo de electrones es dirigido sobre la preparación y los electrones dispersados por el metal pesado activan una pantalla de observación produciendo una imagen. A la primera técnica se la denomina Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) y a la segunda Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

Tiene utilidad para identificación de partículas en su contorno, grosor y densidad. Composición química de muestras específicas e incluso observar las reacciones químicas en celdas especiales para su simulación.

Cuantitativamente por medio de las técnicas de recuento proporcional en donde se mezcla una suspensión viral con una cantidad medida de partículas de látex, la cantidad de viriones se calcula a partir de la relación entre el número de esferas de látex y el número de viriones; y por centrifugación en donde una suspensión viral se rocía sobre una membrana de la rejilla de observación que esta colocada en una capa sólida de agar, el liquido eluyente pasa rápidamente al agar y se queda en la membrana una distribución de partículas.

Microscopio Electrónico (Fig. 8.3)

1930-1931 Rusha y Knoll desarrollan el primer M.E. (virus del mosaico del tabaco).
Utilizan rayos de electrones en lugar de la luz, lo que les permite tener un poder de resolución muy elevado.

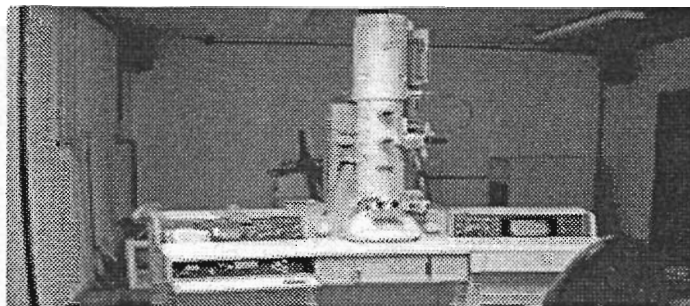


Fig 8.3
tomado de : www10.uniovi.es/SCTs/servicios/cristo/microscopia/servicioCC9equipamiento.html

- La longitud de onda de los rayos de electrones es de 0,005 - 0,0003 nm., muy corta comparada con la de la luz visible (426 - 750 nm.; violeta - rojo).
- Es posible con el microscopio electrónico resolver objetos separados por una distancia de 0,003 $\mu\text{m.}$, comparado con los 0,25 $\mu\text{m.}$ de uno óptico.
- La resolución aumenta en un factor de 10^3 .

Aplicaciones:

- Estudio ultraestructural de células y tejidos normales y patológicos.
- Morfología y ultraestructura de microorganismos.
- Localización y diagnóstico de virus.
- Caracterización inmunocitoquímica e histoquímica de distintos tipos celulares.
- Estudios de Parasitología y enfermedades parasitarias.
- Ayuda en diagnóstico peñicial.
- Estudio ultraestructural de suspensiones celulares y orgánulos aislados.

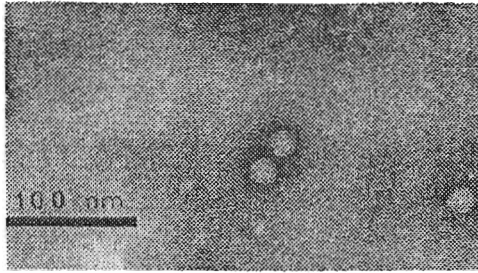
Microscopio Electrónico de Transmisión:

Permiten la observación de muestras teñidas con sustancias que son resistentes al paso de electrones y cortadas dando lugar a láminas finas, denominadas cortes finos.

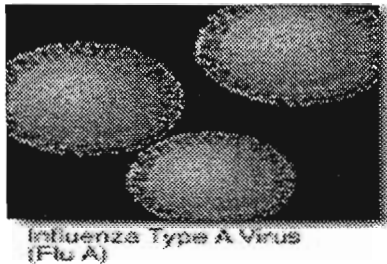
Los electrones no son visibles directamente por lo que éstos se envían a una pantalla que emite fluorescencia más o menos intensa según el número de electrones que inciden en ella.

Las estructuras celulares que se tiñan más intensamente impedirán el paso de electrones y por lo tanto no permitirán la emisión de fluorescencia, por lo que estas estructuras aparecerán oscuras en un fondo más brillante.

Se consiguen entre 10.000 y 100.000 aumentos.



Tomado de : www10.uniovi.es/SCTs/servicios/cristo/microscopia/servicioCC9equipamiento.html



Tomado de : www10.uniovi.es/SCTs/servicios/cristo/microscopia/servicioCC9equipamiento.html

➤ Proceso de Fijación

- Fijación en glutaraldehído 3% en buffer de fosfato, 2h/hielo, lavado en fosfato.
- Post-fijación en tetróxido de osmio 1% en buffer de fosfatos, 2h/hielo, lavado en fosfato.
- **Deshidratación en EtOH 30-50-70-80-90-95-100% en agua, y luego en 100% óxido de propileno.**
- Inclusión: incubación en una mezcla de Epon:óxido de propileno, seguido por incubación en Epon.
- Polimerización del Epon con la muestra, en moldes (60° C/dos días).
- Sacar cortes finos con el microtomo (70 - 100 nm. de grosor), transferir los cortes a rejillas de cobre.
- **Tinción con acetato de uranilo (30 min.) y citrato de plomo (15 min.). Para aumentar el contraste.**

Microscopio Electrónico de Barrido

1. Permiten la observación de células enteras, sin necesidad de cortes finos, de modo que aparecen los relieves originales y las superficies externas.
2. Alcanzan entre 1.000 y 10.000 aumentos.
3. Si sólo tiene que observarse el contorno de un organismo, no son necesarias secciones finas por lo que se montan células enteras que se recubren de una capa fina de un metal pesado (oro).

El rayo de electrones es dirigido sobre la preparación y los electrones dispersados por el metal pesado activan una pantalla de observación produciendo una imagen.

8.2.9 Electroforesis

La electroforesis es un método poderoso para separar las proteínas y otras macromoléculas, tales como el DNA y RNA. La velocidad de migración de una proteína (o de cualquier otra molécula) en un campo eléctrico depende de la fuerza del campo (E) de la carga neta de la proteína (z) y el coeficiente de fricción (f).

La fuerza eléctrica Ez que conduce la molécula cargada hacia el electrodo con signo opuesto sufre la resistencia $f v$, debida a la fricción viscosa entre la molécula que se desplaza y el medio de desplazamiento. El coeficiente de fricción f depende tanto de la masa y de la forma de la molécula que emigra como de la viscosidad (η) del medio.

Se conoce como electroforesis al movimiento de partículas cargadas bajo la influencia de un campo eléctrico.

Tiselius fue el primero que utilizó este método en 1937 para separar los componentes del suero.

Las proteínas presentan una carga eléctrica neta se encuentra en un medio que tenga un pH diferente al de su punto isoeléctrico y por eso tienen la propiedad de desplazarse cuando se someten a un campo eléctrico. La velocidad de migración es proporcional a la relación entre las cargas de la proteína y su masa. Cuanto mayor carga por unidad de masa más rápida será la migración. Empleando geles de sílice o de acetato de celulosa y aplicando las proteínas en una zona estrecha en torno a los electrodos se pueden determinar diferencias de carga neta (carga total / masa) entre proteínas. Este método se denomina electroforesis zonal. La matriz de poliacrilamida no es un buen soporte para este método pues la migración de las proteínas en su seno no sólo es proporcional a la carga neta sino también al tamaño y forma de la proteína.

La velocidad de migración de una sustancia en un campo eléctrico depende de varios factores tales como carga y tamaño de partícula, pH, fuerza iónica, viscosidad del medio, etc.

Fundamento:

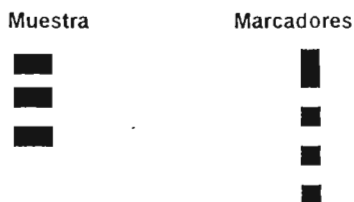
Las moléculas con una carga eléctrica neta se desplaza en un campo eléctrico, además de que las proteínas presentan una carga eléctrica neta se encuentran en un medio que tenga un pH diferente al de su punto isoeléctrico y por eso tienen la propiedad de desplazarse cuando se someten a un campo eléctrico. utilizando un soporte de gel de poliacrilamida (de tamaño de poro ajustable), en donde las partículas se separan en base a su tamaño donde los más pequeños migran más rápido que los grandes. La velocidad de migración es proporcional a la relación entre las cargas de la proteína y su masa, cuanto mayor carga por unidad de masa más rápida será la migración. La velocidad de migración de una sustancia depende de factores como carga, tamaño de partícula, pH, fuerza iónica viscosidad del medio.

Metodología:

La mezcla de proteínas se disuelve primero en un medio con dodesilsulfato de sodio (SDS), un detergente aniónico capaz de romper casi todas las Interacciones no covalentes en las proteínas nativas. También se añade mercaptoetanol o ditioneitol para reducir los puentes disulfuro. Los aniones de SDS se unen a la cadena principal a razón de un SDS por cada dos aminoácidos, lo que da el complejo SDS-proteína desnaturalizada una carga negativa aproximadamente proporcional a la masa de la proteína. Al ser la carga negativa, adquirida por fijación de SDS, muy superior a la carga propia de la proteína nativa, esta carga se considera despreciable.

Los complejos SDS-proteína se someten a electroforesis sobre gel de poliacrilamida, que normalmente se utiliza como un bloque delgado dispuesto verticalmente. La dirección de la electroforesis es vertical descendente.

Por último las proteínas pueden visualizarse sobre el gel tiñéndolas con plata o con un colorante tal como el azul de Coomassie, que revela una serie de bandas.



Las separaciones electroforéticas se realizan casi siempre sobre geles (o sobre soportes sólidos como el papel), en vez de disoluciones libres, por dos razones principales:

1. Los geles suprimen las corrientes de convección producidas por pequeños gradientes de temperatura, lo cual es un requerimiento para una separación más efectiva.
2. Los geles sirven de tamices moleculares que potencian la separación. Las moléculas más pequeñas que los poros de gel se desplazan fácilmente a través de él, mientras que las moléculas mucho mayores que los poros del gel permanecen casi inmóviles.
3. Los geles son químicamente inertes y se forman con facilidad mediante polimerización de la acrilamida.
4. Escogiendo distintas concentraciones de acrilamida y metilendisacrilamida (un reactivo que establece enlaces cruzados) y variando los tiempos de polimerización se pueden producir tamaños de poro controlados.

Reactivos utilizados para el gel de poliacrilamida.

Es un método analítico de alto poder resolutivo que combina la migración en un campo eléctrico y tamizado molecular a través de un gel de corrida.

Una ventaja importante de los geles de poliacrilamida es que son químicamente transparentes y estables en un amplio rango de pHs, temperatura y fuerza iónica.

Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización de la acrilamida.

- (PAS) Persulfato de sodio: iniciador
- TEMED; N, N, N', N' - Tetrametil etilendiamina: Cataliza la formación de los radicales libres a partir del persulfato.
- Dodesil Sulfato de Sodio (SDS): (Detergente iónico) Somete a las proteínas a migración asegurando la completa desnaturalización (perdida de la estructura tridimensional).
- Tris 6.8 - 8.8: Permite a las moléculas desolozarse a través del gel concentrándose en una zona estrecha en el límite correspondiente al gel de corrida.

La electroforesis en geles de acrilamida se puede realizar empleando sistemas de uno o más tampones, en este caso se habla de sistemas tampón continuos o discontinuos. En los sistemas discontinuos el primer tampón asegura la migración de todas las proteínas en el frente de migración, provocándose la acumulación de todas las que se han cargado en el pocillo. La separación realmente comienza a partir del momento en el que el frente de migración alcanza a frontera del segundo tampón.

El oxígeno inhibe la polimerización.

Colorantes: La tinción de Coomassie permite detectar hasta 0.2 a 0.6 microgramos de proteínas y es cuantitativa (lineal) hasta 15 a 20 mcg. Se emplea habitualmente en soluciones de metanol-acético y se destiñe por difusión en soluciones de isopropanol-acético. Para la tinción de geles 2D se recomienda eliminar los anfólitos mediante inclusión de tricloroacético (TCA) en el colorante y la destinción en ácido acético.

La receta para teñir con Coomassie es:

- ⇒ Solución de Azul de Coomassie: 0.2 g de azul de Coomassie en 90 ml. de metanol: agua 1:1 y 10 ml. de ácido acético glacial.
- ⇒ Tinción: sumergir el gel en 5 vol. de colorante al menos 1 hora con agitación suave (el máximo se consigue en 3 horas).
- ⇒ Destinción: Habitualmente mediante cambios repetidos de 10% acético en 20% metanol: agua. Se puede conseguir muy rápidamente mediante electroforesis.

Otras técnicas de electroforesis:

- Electroforesis de Rocket
- Inmunolectroforesis
- Contrainmunolectroforesis
- Electroforesis SDS-PAGE
- Electroforesis bidimensional

Metodología para preparar gel concentrador y gel separador:

Por ejemplo el gel de separación se preparará al 12%. Preparar una solución con los siguientes reactivos y sus cantidades asignadas.

(Gel de Separación)		Gel Concentrador al 8%	
• Monómeros	5.45 ml.	• Monómeros	1.09 ml.
• H ₂ O	4.74 ml.	• H ₂ O	1.89 ml.
• Tris 8.8	3.45 ml.	• Tris	0.95 ml.
• SDS	0.27 ml.	• SDS	0.08 ml.
• PSA	0.08 ml.	• PSA	0.035 ml.
• TEMED	0.09 ml.	• TEMED	0.01 ml.

8.2.10 Gradientes de purificación.

Objetivo: Revelar la presencia de materiales que están ausentes en preparaciones análogas de tejidos no infectados; probar que estos materiales son infecciosos; separarlos de las demás sustancias y obtener una imagen química y física de ellos tan completa como se pueda.

Fundamento: Este método se fundamenta en la centrifugación de partículas en una columna líquida cuya densidad se distribuye en un gradiente continuo. Las partículas se agrupan en zonas cuya densidad corresponde a la suya.

La centrifugación diferencial es útil para muchos de los virus cuyos viriones difieren en tamaño de componentes celulares estables:

- * **Centrifugar en gradientes de sacarosa:** hace posible la separación fina de partículas de propiedades de sedimentación ligeramente diferentes.
- * **Centrifugar en gradientes de Cesio:** Separa las partículas de acuerdo con su densidad de flotación.

8.2.10.1 Gradientes de sacarosa (Brakke 1960)

Si trata de una sedimentación zonal, sirve especialmente para el estudio de velocidades de sedimentación y para separar varios materiales según su tamaño y forma.

La preparación a analizar se deposita en el extremo superior de una columna líquida; en la cual se ha establecido previamente un gradiente de las propiedades deseadas depositando disoluciones apropiadas de sacarosa. Después de la centrifugación las zonas se pueden separar por recolección ordenada de fracciones, normalmente a través de un orificio practicando perforando el fondo del tubo donde se ha centrifugado.

8.2.10.2 Gradientes de cloruro de cesio (Meselson 1957)

Es una centrifugación en gradientes isopícnico, las partículas se suspenden en una disolución concentrada de una sal de alta densidad como el cloruro de Cesio. Después de una centrifugación prolongada, la disolución forma un gradiente de densidad estable debido a un equilibrio entre la sedimentación de solutos densos y difusión desde las regiones más concentradas a las más diluidas. Las partículas se agrupan en el nivel donde la densidad del medio es igual a la suya, llegando a formar una banda.

Técnica:

- * Preparar 20 ml. de CeCl_2 1.7 g por 5 ml. en solución tampón fosfatada .05 M a un pH 7.4
- * Poner 5 ml. de CeCl_2 en los tubos de centrifuga, agregar 0.5 ml. del virus previamente clarificado, mezclar y determinar la densidad de la mezcla.
- * Ultracentrifugar los tubos durante 24-48 horas a 40,000 r.p.m (fuerza centrífuga media 130.576 veces la gravedad).
- * Retirar los tubos teniendo cuidado de no agitar. Perforar el fondo del tubo con una aguja hipodérmica o alambre frío.
- * Recoger las fracciones consistentes en 10 gotas del tubo y depositarlos en tubos separados.
- * Se puede utilizar una micropipeta de peso conocido, se toma una parte de cada tubo y se determina la densidad.
- * Preparar una dilución 1/5 del resto de la fracción y determinar el título HA del virus.

8.2.10.3 Densidad Boyante

Algunos cuerpos flotan en el agua y otros no. Sin embargo, los que no flotan parecen pesar menos dentro del agua. Esto se debe a que, como descubrió Arquímedes, todo cuerpo dentro de un fluido siente una fuerza vertical y hacia arriba llamada empuje o **fuerza boyante**. Este empuje es producido por el fluido, y actúa sobre cualquier cuerpo que se encuentre dentro de él, parcial o totalmente.

El que un cuerpo flote o no, depende de la relación entre las dos fuerzas verticales que sobre él actúan, que son su peso y el empuje que le ejerce el fluido hacia arriba. Si el empuje es mayor que el peso, el cuerpo flota, pero si el empuje es menor que el peso, el cuerpo se hunde, pero parece pesar menos por efecto del empuje. También puede darse el caso de que el peso y el empuje sean iguales. En este caso el cuerpo se quedará sin ascender ni descender dentro del fluido.

Densidad Boyante, es la densidad de líquido, donde adquiere un equilibrio indiferente cuando se somete a un gradiente de densidad con CIC's.

La "DENSIDAD VOLÁTIL". Es la densidad en la cual las macromoléculas se agrupan en un gradiente isopícnico. Además de ser relativo al volumen específico parcial de la macromolécula, el valor es afectado por factores como la hibridación de la macromolécula, el efecto del gradiente del material sobre la hidratación y la unión de ese material a la macromolécula. Los virus con capa de lípidos tienen una baja densidad comparados con los que no la tienen. La densidad del ADN es dependiente del contenido de G+C de acuerdo a la fórmula:

$$p = 0.0988(G+C) + 1.6541$$

en donde p es la densidad en g/cc

G+C es la fracción de nucleótidos guanina y citosina.

Las densidades típicas de las bandas de virus, bacterias proteínas y ácidos nucleicos son:

	CsCl	Cs ₂ SO ₄
Proteína	1.28	1.24
Virus (5%RNA)	1.32	1.27
Virus (20% RNA)	1.35	-
Virus (40% RNA)	1.36	1.30
DNA (50%G+C)	1.70	1.42
RNA	1.90	1.63

Las densidades de algunas agrupaciones de virus (p.e. virus de enfermedades de pies y boca) pueden ser mayores que lo esperado debido a la porosidad de la partícula.

8.2.11 Bacteriófagos

Fundamento:

La especificidad de un bacteriófago hacia su célula huésped (bacteria) depende de sus receptores para así formar placas.

Titulación de un bacteriófago:

- De una suspensión de bacteriófagos se realizan diluciones dobles (10, 10, 10, 10).
- Colocar cuatro tubos en Baño maría a 46° C/- 1 añadiendo 0.1 ml. de la suspensión del bacteriófago.
- A continuación se vierten a cada tubo 0.2 ml. del cultivo de 18 hrs. de la cepa indicadora y 3 ml. de agar blando. (agar nutritivo con 0.4% de agar).
- El contenido de cada tubo se mezcla por rotación y se vierte sobre la superficie de cajas de Petri que contienen agar.
- Hacia las 6 hrs. de inoculación se distinguen las placas producidas por el fago.

Interpretación: Formación de placas, Tipo de diagnóstico:

Aunque son agentes terapéuticos, sirven en la medicina como herramientas para el diagnóstico para la identificación de bacterias patógenas.

8.2.12 Titulación Viral:

- ❖ HEMAGLUTINACION
- ❖ DOSIS LETAL 50 EN CULTIVO CELULAR
- ❖ TITULACION LOGARITMICA
- ❖ TITULACIÓN DE VIRUS.

La titulación de un virus es una determinación cuantitativa de la actividad viral, es decir, la cantidad más pequeña de suspensión viral que puede producir una enfermedad, lesión o algún efecto reconocible en el huésped. La unidad más pequeña de virus que produce esta reacción se denomina "unidad infecciosa" y el título se expresa como el número de unidades infecciosas por unidad de volumen.

Primero se deben preparar una serie de diluciones del virus. La dilución quizá sea de factores de 10, 5 ó 2; entre más pequeño sea el factor más preciso es el título.

Sin embargo el costo, disponibilidad, entre otros de su sistema indicador dictará normalmente la dilución a ser usada. Los errores se cometen comúnmente en la preparación de este serie de diluciones, por lo que se debería considerar esto primero:

1. Preparación de la dilución. (Ver apéndice A)
2. Preparación de diluciones seriales.

A. Materiales.

- Medio de Hank, estéril, precalentado.
- Suspensión viral.
- Tubos de ensaye pequeños, 12 x 72, estériles.
- Pipetas, 1.0 y 10.0 ml, estériles.
- Gradilla.
- Mechero de bunsen.

B. Método.

- ↪ Colocar una fila de 10 tubos de prueba pequeños, estériles en la gradilla, añadir el medio de Hank a cada tubo con técnicas de esterilización.
- ↪ La cantidad usada va a depender de cuanto necesite; por ejemplo, si usted quiere añadir 0.1 ml. de cada dilución a cada uno de los 3 tubos de cultivo de tejido o huevos o animales, necesitará un total de 0.3 ml. más lo suficiente para hacer la siguiente dilución. Si usted quiere 0.2 ml. de cada dilución para cada uno de 5 cultivo de tejido o huevos, usted necesitará 1.0 ml. más lo suficiente para hacer la próxima dilución, etc.

En virología normalmente se empiezan las diluciones al 1:10 y se sigue con múltiplos de 10:1:10...1:100... etc. Sin embargo para la primera dilución se puede usar.

- ✓ 0.1 ml. virus + 0.9 ml. diluyente = 1:10
- ✓ 0.4 ml. virus + 3.6 ml. diluyente = 1:10
- ✓ 0.1 ml. virus + 9.0 ml. diluyente = 1:10

Vamos a usar el primero a manera de ejemplo, así que añadimos 0.9 ml de medio de Hank a cada tubo.

1. Con una pipeta nueva de 1.0 ml., añadimos 0.1 ml. de suspensión viral al tubo No. 1.

No se debe insertar la pipeta dentro del tubo o líquido ya que la parte externa de la pipeta tendrá una gran cantidad de virus en ella. Simplemente la parte superior del tubo con la pipeta y dejar que la suspensión corra entro del tubo rápidamente. Dejar la pipeta dentro de la jarra de pipeta.

2. Con una pipeta de 10 ml. nueva, mezclar el contenido del primer tubo.

La técnica para una mezcla propicia es importante y da la impresión de tocar un trombón. Con la práctica se puede desarrollar esta técnica a un grado de fineza.

- a) Sostenga el tubo de prueba en la mano izquierda y la pipeta en derecha.
- b) Ponga el dedo pequeño en el algodón con la mano derecha. Caliente a boquilla del tubo.
- c) Ponga la pipeta en el líquido tan lejos como sea posible sin desplazar el líquido del tubo y simultáneamente, lentamente ponga el tubo en su posición original.
- d) Expuse de regreso el contenido de la pipeta dentro del tubo mientras, simultáneamente, lentamente ponga el tubo en su posición original.
- e) Levante el tubo a su posición original y simultáneamente deje líquido dentro de la pipeta otra vez.
- f) En estas maniobras la pipeta no debe dejar el interior del tubo. La distancia actual a la que esta separando el tubo es mínima. La idea es agitarlo pero sin sacudir.
- g) Repetir esto de 9 a10 veces.

3. Remover 0.1 ml. de dilución 10-1, calentar la punta del tubo y reemplazar la pipeta, colocándolo en un lugar para esterilizar, colocar una nueva pipeta con la cual se le agrega 0.1 ml. dentro del tubo #2 sin tocar el interior del tubo o el líquido, desechar esta pipeta.
4. Con una pipeta nueva, mezcle el contenido del tubo #2 como se indica el paso #3 continúe de esta forma hasta que se haya removido y desechado 0.1 ml. del tubo #10.

Notara que una nueva pipeta es usada después de cada transferencia. En todas las titulaciones una pipeta diferente debe ser usada para cada dilución, por que una pipeta contendrá miles de millones de partículas virales (o bacterias o lo que sea) en su superficie exterior que no pueden ser transferidas.

Si no se cambian las pipetas se transportan está partículas, y como resultado tendrá una larga dilución errónea. Esta es probablemente la precaución #1 que casi nadie cumple, y este error es normalmente refendo con el término alemán PIPETENFEHLER.

Titulaciones:

A. Materiales

- Suspensión viral
- Cultivos de tejidos sin inocular en tubos, botellas o platos.
- Huevos de embriones, o animales apropiados.
- Medio de Hank u otro diluyente estéril.
- Gradilla y placa con posos.
- Pipetas de 1.0 y 10.0 ml. estériles.
- Tubos de ensaye de 12 X 72 ml. con tapones de algodón estériles.
- Jeringas y agujas de tamaño apropiado.
- Alcohol 70% o tintura de yodo.

B. Métodos

Animales

- a) Prepare la dilución de virus como se describe anteriormente
- b) Esterilizar he inocular el animal de prueba, como se describe en la sección B el # por dilución dependerá del costo Etc. No olvidar tener un animal de control inoculado con el mismo volumen del medio de Hank u otro diluyente además de controles no inoculados.
- c) Ponerlos en jaulas apropiadas o unidades aisladas. Observar diariamente.

Cultivo de tejido

- a) Colocar una gradilla con 10 tubos de ensaye pequeños y estériles añadir 0.9 ml. (u otra cantidad según se requiera) del medio de Hank a cada tubo.
- b) Preparar una lamina de posos con 10 filas con cultivos de tejido, tres posos por fila, y poner 6 posos de control al final (o use el mismo # de botellas o platos de tejido apropiado).
- c) Rápidamente descongelar el virus de ejemplo, añadir 0.1 ml. (o la cantidad deseada) al primer tubo de dilución. Desechar la pipeta. Recongelar el virus del ejemplo.
- d) Mezclar el contenido del tubo #1 y remover 0.4 ml. añadir .01 ml. de la dilución del virus de 10-1 a cada uno de los posos cultivados de la fila 1 agregar 0.1 ml. dentro del tubo de dilución #2 y desechar la pipeta.
- e) Mezclar el contenido del tubo #2, sacar 0.4 ml. añadir .01 ml. de esta dilución (10-2) a cada poso de la fila #2 y agregar los últimos 0.1ml. en el tubo de dilución #3. Desechar la pipeta.
- f) Repetir el procedimiento hasta que se hayan inoculado todos los posos hasta la fila 10. etiquetando e incubarlos a 37° C.

Nota: Se van a ahorrar un buen # de pipetas siguiendo esta técnica ya que no se tiene que utilizar una pipeta para cada poso.

Embriones de pollo:

- 1) Prepara la dilución de virus como se describe anteriormente.
- 2) Esterilizar he inyectar la cantidad apropiada de dilución viral dentro del huevo. Usar una jeringa separada para cada dilución; empezando con la más concentrada y seguir con la más diluida. Se recomienda usar una jeringa esterilizada por cada huevo.
- 3) Incubar los huevos a 37° C.

Respuestas:

- ⇨ Animales: Observar los animales diariamente, las respuestas dependerán del virus utilizado, Coagulación, parálisis, inflamación de los ojos etc. Checar tanto los inoculados como los de control para síntomas similares.
- ⇨ Células cultivadas: Compara los posos inoculados con los no inoculados. Fijarse en cambios en los inoculados que no se presenten en los de control por ejemplo redondeo de células adelgazamiento lisis etc.
- ⇨ Embriones de pollo: Poner contra la luz los huevos cada día registrar cada muerte y remover estos huevos de la recolección. Si el embrión no ha muerto, pero presenta anomalías de cualquier tipo (parálisis, malformaciones), recolecte los embriones en el tiempo apropiado y registre las anomalías o cambios detectados en cada embrión. Comparar con los embriones de control recolectados durante el mismo tiempo.

Registrando respuestas

- ❖ El "record" de cada cambio o muerte es equivalente sin importar que se haya utilizado tubos, platos, embriones, etc.
- ❖ Registrar cada tubo, botella, embrión o animal en cada dilución así como cada control, registra cada uno como 0, +-, 1+, 2+, 3+, 4+ por ejemplo.

Calculo de titulación viral

Introducción:

La titulación es normalmente expresada como el recíproco de la dilución mas alta del virus el cual causa una reacción especifica en 50% del material inoculado con, o expuesto a, la dilución de material infeccioso. Donde células cultivadas son usadas como el sistema indicador, las titulaciones son expresadas como el 50% de dosis infecciosa de tejido cultivado (TCID50). Donde se usan animales o embriones para experimentos con la muerte como criterio, la dosis letal al 50% de los inoculados y se expresa como LD50. Es obvio que cierto vocabulario abreviado es de uso común y debería ser entendido.

El método de Reed y Muench es ampliamente utilizado para calcular el punto de actividad viral (título). El mérito de este sistema es que acumulando muertes y sobrevivientes, reactores y no reactores sobre el rango entero de dilución todos los inoculados y los titulados son usados en el cálculo en lugar de solo aquellos en las diluciones cercanas al punto final.

Este es un método relativamente fácil de aprender y tiene la ventaja de que funciona una vez que se ha dominado no durara el deseará aprender otros métodos de titulación como Karver o Seligman y Mickey. Cualquier método que utilice el porcentaje de error permanecerá constante mientras se use el mismo método consistentemente. Siempre deberá comparar una titulación con una titulación de un control preparado bajo las mismas condiciones. Recuerde el punto final detecta solamente viñones capaces de iniciar una infección y una titulación se refiere a la concentración de estas unidades infecciosas.

Método:

Registrar las respuestas en el sistema indicador, sobre un periodo de tiempo que es aplicable tanto a los virus bajo estudio como el huésped indicador, esto se ve en varios días se observación hasta varias semanas hasta que los efectos ase noten:

Ejemplo se va a inocular 5 ratones con X ml. de virus T por dilución.
 Período de observación 5 días (los datos se deberán observar como sigue)

Días de observación

Dilución	1	2	3	4	5
10-5	00000	00000	00000	00000	00000
10-4	00000	00000	00000	00000	00000
10-3	00000	00000	11000	33300	XXXX00
10-2	00000	11000	33210	XXXX3X	XXXXXX
10-1	00000	11110	33330	XXXXXX	XXXXXX
Control	00000	00000	00000	00000	00000

Legendas los # indican el grado de parálisis.

X es = a muerte.
 0 = a sin efectos.

Se debe tomar el rango donde afecto a todos los animales este va a ser 100% donde afecto a menos es el % de muertes en el total de animales ejemplo 10-3 es del 60% como se menciona el punto final del virus es indicado por la dilución máxima que afecta al 50% o más de los inoculados.

Determinar el 50% del punto final como sigue:

Disolución de virus midiendo un rango del 100% a 0% de afectados.

	10-2	10-3	10-4
% de infectados (muertes) x dilución	5/5	3/5	0/5
# de afectados (muertes)	5	3	0
# de supervivientes (no afectados)	0	2	5
Acumulado de ratones afectados (total, empezando del nivel + diluido y acumulando hacia el nivel + Concentrado)	8 = 5 + afectados	3	= 3 + 0
Acumulado de ratones no afectados (total, empezando del nivel + concentrado y acumulando hacia el nivel + diluido)	0 + 2 =	2	+ 5 = 7
Expresar el rango de mortalidad (# de afectados/total)	8/8	3/5	0/7
Expresar la mortalidad en %	100	60	0

Fórmula:

$\frac{\% \text{ de mortalidad más cercano sobre } 50\% - 50\%}{\% \text{ de mortalidad más cercano sobre } 50\% - \% \text{ de mortalidad más cercano debajo del } 50\%}$ = distancia proporcionada

$$\frac{60\% - 50\%}{60\% - 0\%} = 0.2$$

log de la dilución en cuyo % fue más próximo sobre 50% es = -3.0

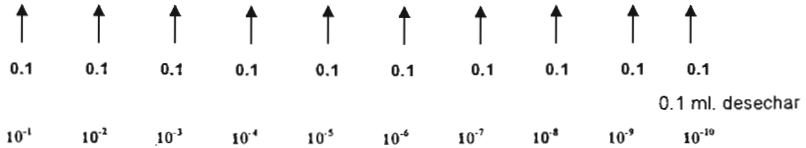
Entonces se multiplica la distancia proporcionada (0.2) por el log de la dilución factor 10 (= -1.0) para obtener el valor real de la distancia proporcionada, esta multiplicación da como resultado = -0.2 entonces se suma -3.0 + 0.2 = -3.2

Se puede expresar esta titulación como
 I.D.₅₀/ 0.1 ml es $10^{-3.2}$ o 1.58 (antilog de 0.2) x 10^3

Terminología	definición.
Sistema indicador	El animal, célula, cultivo u otro sujeto usado para medir o indicar la actividad del virus.
I.U.	Unidad infecciosa, la cantidad más pequeña de V, que produce una reacción reconocible en el sistema indicador.
I.	Infeccioso usado donde la medida de respuesta a la exposición viral es una reacción específica o preseleccionada, ejemplo: signos respiratorios, reacciones de la piel.
D.	Dosis: Debe ser dado como un volumen usado así como la dilución usada en la preparación ejemplo :0.2ml. a 1:100 (10^{-2})
Título	Expresado como el recíproco de la dilución del virus el cual afecta al menos al 50% pero no más del sistema indicador expuesto a esta dilución.

Ejemplos	Interpretación
TCID 50 es $10^{-6.7} / 0.1 \text{ ml}$.	Indica que la suspensión viral diluida a $10^{-6.7}$ e inoculada en unidades de .01 ml es la dilución máxima que afecta al 50% del tejido cultivado en el sistema usado.
LD 50 es $10^{-3} / 0.2 \text{ ml}$.	Indica que la suspensión viral diluida a 10^{-3} y administrada en unidades 0.2 ml es la dilución máxima que infecta al 50% de los sujetos expuestos.
Titulación viral.	El punto final de la actividad viral se encuentra en el dilución de $10^{-7.0}$ esta dilución entonces es considerada de tener 1 unidad infecciosa.

Tirar las pipetas usadas.



Cálculos

Fórmula:

$$\frac{\% \text{ de mortalidad más cercano sobre } 50\% - 50\%}{\% \text{ de mortalidad más cercano sobre } 50\% - \% \text{ de mortalidad más cercano debajo del } 50\%} = \text{distancia proporcionada}$$

$$\frac{60\% - 50\%}{60\% - 0\%} = 0.2$$

log de la dilución en cuyo % fue más próximo sobre 50% es = -3.0

Entonces se multiplica la distancia proporcionada (0.2) por el log de la dilución factor 10 (= -1.0) para obtener el valor real de la distancia proporcionada, esta multiplicación da como resultado = -0.2 entonces se suma -3.0 + 0.2 = -3.2

Se puede expresar esta titulación como:

$$I.D._{50} / 0.1 \text{ ml. es } 10^{-3.2} \text{ o } 1.58 (\text{antilog de } 0.2) \times 10^3$$

8.2.13 Inmunotransferencia

8.2.13.1 Southern Blot

Denominada así en honor a su creador Edwin Southern, que tiene como finalidad caracterizar la identidad de genes específicos la cual consiste en absorber el ADN por capilaridad o electrotransferencia en una membrana de nitrocelulosa o nylon.

Es también utilizada para:

- La identificación de fragmentos de ADN que contienen un gen determinado de entre una mezcla de muchos fragmentos, para detectar reorganizaciones y duplicaciones en genes asociados en enfermedades genéticas humanas y cánceres, la cartografía de sitios de restricción en un gen o cerca de él.
- La información que proporciona este método es muy fácil y específica, porque define el tamaño y el número de fragmentos homólogos a la sonda utilizada.

METODOLOGÍA.

- ❖ En la transferencia Southern el ADN se desnatura dentro del gel en fragmentos de cadena sencilla, y estos se transfieren a un filtro de nitrocelulosa o un derivado de nylon, que une al ADN.
- ❖ La transferencia se hace colocando el gel con el ADN desnaturado sobre una gruesa esponja, esta esponja parcialmente sumergida en un recipiente con solución amortiguadora.
- ❖ Se pone una membrana encima del gel, y se cubre con papel absorbente. La acción capilar arrastra el amortiguador a través de la esponja transfiriendo el patrón de fragmentos de ADN desde el gel hasta el filtro.

- ❖ Después de la transferencia, el ADN de cadena sencilla se fija a la membrana calentado a 80° C. o exponiéndola a la luz ultravioleta para que se hagan uniones entre los fragmentos y la membrana.
- ❖ Los fragmentos del filtro se hibridan con una sonda marcada radiativamente, solo formaran híbridos los fragmentos de ADN de cadena sencilla presentes en la membrana que sean complementarios a la secuencia nucleotídica de la sonda.
- ❖ Se lava el filtro y se cubre con un trozo de película de rayos x, al exponer la película sobre el filtro y revelarla se obtienen las señales de los fragmentos de secuencias homólogas a la sonda.

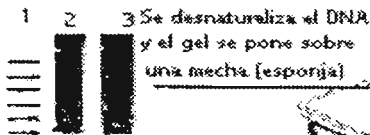
TRANSFERENCIA DE SOUTHERN

Diagrama de flujo

1. Las muestras de DNA se cortan con enzimas de restricción y se cargan en un gel de agarosa para electroforesis

caril 1: marcadores de tamaño
 caril 2: DNA cortado con la enzima de restricción A
 caril 3: DNA cortado con la enzima de restricción B

Electroforesis en gel



2. El DNA se separa por electroforesis, se visualiza por tinción e iluminación con luz ultravioleta y se fotografía



3. El filtro que une DNA, el papel secante y el peso se ponen sobre el gel. El tampón sube por capilaridad transfiriendo los fragmentos de DNA al filtro.



4. Se pone el filtro y la solución que contiene la sonda, marcada en un abolsa que luego se sella por calor

Se cubre el filtro con una película de rayos x



Se lava el filtro para eliminar el exceso de sonda, se autorradiografía de la película seca, y se le aplica la película de autorradiografía rayos x



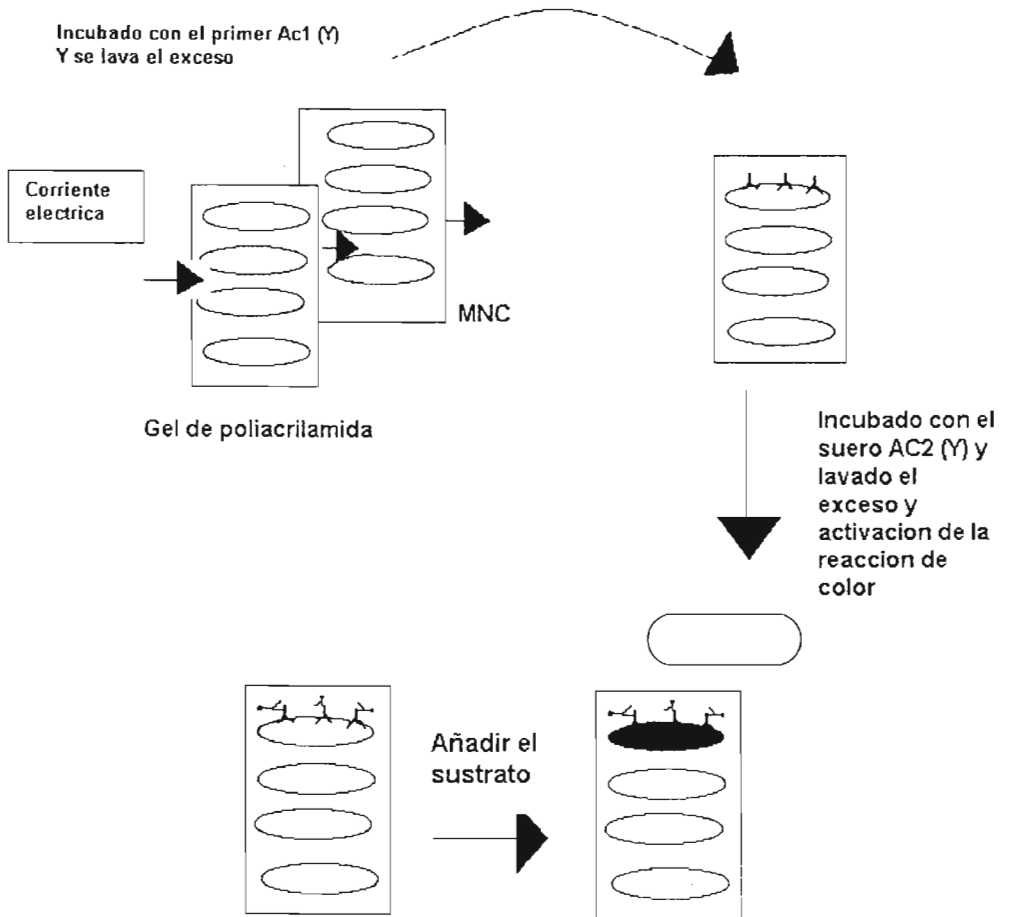
8.2.13.2 WESTERN BLOTTING

Se le conoce así a la transferencia de proteínas de un gel a una membrana de nitrocelulosa.

Se utiliza frecuentemente para la identificación de antígenos proteicos, dentro de una mezcla, que son reconocidos por los anticuerpos presentes en el suero de individuos afectados por padecimientos infecciosos.

APLICACIÓN:

Su aplicación en clínica es como prueba confirmativa en el diagnóstico de VIH.



Tomada de: Ricardo A. Margni; Inmunología e Inmunoquímica. Edit. Médica Panamericana. 4 Ed. pp. 656 y 657
Abbas Abul K. Inmunología celular y molecular Edit. Interamericana. 2da ed. pp. 67 y 68.

REACTIVOS:

- Medio de transferencia.
- Solución de TBS.
- Solución TBS – GC. TBS, 2% de glicina y 3% de leche.
- Solución TBS – TGC. 0.05 de Tween.
- Conjugado enzimático: suero antigammaglobulina, conjugado con peroxidasa.
- Sustrato para la reacción ELISA: 4-cloro naftol, peróxido y TBS.
- Muestras: Sueros inmunes contra las proteínas en estudio, lisados de virus, bacteria, parásitos.

METODOLOGÍA:

1. Treinta minutos antes de terminado el SDS-PAGE, se pone la (MNC), en medio de transferencia.
2. Retirar el gel del equipo en el que se ha desarrollado el y colocarlo sobre los papeles de filtro. Colocar los papeles de filtro y el gel sobre el "scotch-brite", con el gel hacia arriba.
3. Mojar la superficie con medio de transferencia y colocar sobre éste la (MNC).
4. Colocar 2-3 papeles de filtro, mojados en medio de transferencia, sobre la (MNC).
5. Ubicar por encima de ellos la otra "scotch-brite", con una esquina cortada para saber que éste es el lado donde se encuentra a (MNC).
6. Colocar las placas soportes de acrílico perforado a ambos lados de las "scotch-brite" e introducir el conjunto dentro de la cuba (anódica).
7. Transferir una hora a 14 V con voltaje constante o durante la noche a 4° C. dependiendo del experimento.
8. Visualizar las proteínas transferidas tiñendo 5 minutos con solución de Ponceau, negro amido. Desteñir ligeramente (2-3 min.) e indicar los marcadores de PM.
9. Separar la tira de los marcadores de PM.
10. Cortar tiras de aprox. 0.5 cm. de ancho suficientes para probar las muestras problema y los controles.
11. Los grupos reactivos libres de nitrato de celulosa se bloquean con solución de TBS-GC durante 1 hora.
12. Lavar con solución TBS-GC durante 5 minutos.
13. Diluir en TBS-TBC el suero que contiene los anticuerpos específicos contra las proteínas. (incubar).
14. Terminada la incubación, eliminar la solución de anticuerpo y lavar 4 veces, durante 15 minutos cada vez, con TBS-TGC.
15. Incubar con la dilución conveniente del conjugado antigammaglobulina-peroxidasa.
16. Lavar 3 veces con TBS para eliminar el Tween 20.
17. Añadir la solución de sustrato para la reacción de ELISA.

Se le conoce así a la técnica de transferencia de proteína de un gel a una membrana de nitrocelulosa. Las proteínas son separadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida en presencia de SDA. Bajo estas condiciones las proteínas son cargadas negativamente y por lo tanto son separadas acorde a su tamaño. Estas proteínas ya transferidas a la membrana de nitrocelulosa se hacen reaccionar con anticuerpos contra proteínas.

La posición de los anticuerpos enlazados a las proteínas es visualizada colorimétricamente o por el uso de moléculas radioactivas que se enlazan a los anticuerpos.

Esta prueba se usa como prueba confirmativa en diagnóstico de VIH y parvovirus.

Materiales:

- Amortiguador de transferencia
- TBS (amortiguador tris salino).
- TBS + Tween 20, 0.1%
- Sol. Bloqueadora (Albúmina Tween 20).
- Anticuerpo no marcado primario.
- Anticuerpo específico marcado con enzimas.
- Negro amido.
- Alcohol
- Membrana de nitrocelulosa.
- Papel filtro grueso
- Bandeja de plástico
- Micropipetas.
- Sistema de electroforesis
- Aparatos de transferencia (Tanque, Esponjas, etc.).

Metodología:

- El primer paso es la electroforesis en gel de poliacrilamida con la muestra del virus concentrada y desnaturalizada con SDS Mercaptoetanol y 100° C. En el mismo gel se corren marcadores de peso molecular para la identificación de las bandas.
- Una vez terminada la electroforesis se utiliza un cassette de electrotransferencia y se colocan los materiales en el orden siguiente.
 - Fibra húmeda (con amortiguador de transferencia).
 - Papel filtro humedecido.
 - Gel de electroforesis.
 - Papel de nitrocelulosa.
 - Papel filtro humedecido y fibra húmeda.

Todo se coloca como un emparedado y se sumerge en un tanque con tampón de tris glicina, pH 8 en presencia de metanol. Si se aplica corriente eléctrica se recomienda 200 mA por 2 hrs.

- Al terminar la transferencia se cortan tiras del papel de nitro celulosa.
- Para el revelado se bloquean los sitios de la membrana que puedan ligar proteínas no específicas, esto se hace incubando la membrana en un tampón que contenga albúmina y Tween 20.
- Después del bloque se sumerge la membrana en el suero que contiene los anticuerpos antiviral y se incuba de 1-2 hrs.
- Se añade el anticuerpo específico marcado con yodo radioactivo específico para el antígeno de interés.
- Se lava y se expone la membrana marcada a una película de rayos X.

8.2.14 Apoptosis

La apoptosis es un proceso de muerte celular programada que tiene lugar durante el desarrollo normal y durante el remodelado tisular en organismos multicelulares. Las alteraciones en el programa normal de apoptosis puede tener como resultado una gran variedad de condiciones patológicas. A nivel celular, la apoptosis ha sido caracterizada por una serie de cambios morfológicos que incluyen zeiosis (vesículas membranales), condensación de la cromatina, fragmentación del DNA y destrucción celular. Desarrollos científicos mas recientes, han permitido identificar sellas en apoptosis antes de que los cambios morfológicos sean aparentes.

La exposición de residuos de fosfatidil serina, que normalmente solo se encuentran en el lado citosólico de la membrana celular, la interrupción del potencial transmembranal de las mitocondrias ocurre en la mayoría de las células que están entrando en apoptosis antes de que los cambios morfológicos empiecen a ser detectables. La anexina V marcada con isotiocianato de fluoresceína se adhiere preferentemente a la fosfatidil serina recientemente expuesta en las células en inicio de apoptosis y el doble marcado con yoduro de popidio, permite diferenciar células necróticas de apoptosis. La Rhodamina 1,2,3 ha sido ampliamente usada para la evaluación del potencial transmembranal de las mitocondrias. Los cambios en la función mitocondrias que conducen a la activación de la cascada de las caspazas, sirve como uno de los indicadores tempranos de apoptosis en una gran variedad de células.

Duffy J.Y., Miller C. M. Rutschilling G.L., Rider G.M., Clegg M. S. A decrease in Intracellular Zinc level precedes the detection of early indicators of apoptosis in HL-60 cells. Apoptosis 2001; 6: 161-172.

La infección con Alphavirus en células de vertebrados generalmente causa la muerte celular por apoptosis, con la notable excepción de las neuronas, en las cuales establece una infección persistente. Las células BHK, N 18 de neuroblastoma murino y las células AT-3 de adenocarcinoma prostático de la rata se han visto con cambios característicos de apoptosis como consecuencia de una infección con virus como consecuencia de una infección con virus Sindbis, que incluyen zeiosis, condensación nuclear y fragmentación del DNA en fragmentos de tamaño nucleosoma. Las neuronas son células de diferenciación terminal que no expresan MHC clase I y que por lo tanto no son blanco para las células T citotóxicas.

El virus de la rabia es un virus envuelto, con forma de bala de la familia Rhabdoviridae, género Lissavirus y que consiste de una nucleocapside helicoidal de RNA, proteína N y proteína L principalmente. En la envoltura formada de fosfolípidos de la célula huésped contiene la glicoproteína G en forma de homotrímeros y la proteína M. La mayoría de las cepas del virus de rabia son altamente neurotrópicas, aun cuando pueden contener diferentes biotipos en un solo aislamiento, como se evidencia por la multiplicación extraneural de algunos virus de campo y su adaptabilidad a cultivos celulares. La cepa CVS (Challenge Virus Standard) o virus estándar de confrontación tiene un tropismo celular muy restringido y se multiplica casi exclusivamente en neuronas. Dado que las cepas que se mantienen en el laboratorio por inoculación intracerebral en ratones reducen su periodo de incubación hasta fijarlo en 10 días, se les llama cepas fijas. El virus CVS es una cepa fija, que ha sido usada ampliamente para estudios del virus rábico, y también para el estudio de la apoptosis en neuronas del sistema nervioso central.

Por otra parte existe un número importante de virus inmunosupresores en pollos, dentro de los cuales los más importantes son el de la infección de la bolsa de Fabricio y el de la anemia infecciosa aviaría, esto sin olvidar los virus inmunosupresores y oncogénicos como el de la enfermedad de Marek y los de la leucosis aviaría. Muchos de estos virus se transmiten por medio del huevo y cuando además se encuentran con micotoxinas en el alimento, la combinación de los factores sobre el sistema inmune puede dar como resultado una muy pobre ganancia de peso y conversión alimenticia.¹²

8.2.15 Resonancia magnética nuclear

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) estudia el comportamiento de los núcleos atómicos con spin diferente de cero bajo la influencia de un campo magnético externo. Cada núcleo se ve afectado por dicho campo, así como por los campos creados en su entorno por los núcleos cercanos y por la distribución electrónica. Estas interacciones nucleares van a depender de la orientación relativa de las moléculas. En los espectros registrados en disolución, las interacciones se promedian debido al rápido movimiento de las moléculas, dando lugar a señales estrechas. En estado sólido, donde la movilidad está muy restringida, se obtienen señales anchas, resultado de la suma de señales de todas las posibles orientaciones. Estos espectros, sin embargo, contienen información única acerca de la estructura y la dinámica de los materiales estudiados.

Las interacciones responsables del ensanchamiento de las señales son la anisotropía del desplazamiento químico, los acoplamientos dipolares (homo y heteronucleares) y el acoplamiento cuadrupolar. Se han desarrollado técnicas que permitan obtener espectros de alta resolución conservando en lo posible información que aportan estas interacciones: giro con ángulo mágico (MAS, Magic Angle Spinning), polarización cruzada (CP, Cross Polarization) o secuencias multipulso específicas para sólidos (CRAMPS, Combined Rotation and Multiple Pulse Spectroscopy)

El desarrollo de los métodos indicados anteriormente ha permitido el uso de RMN en estado sólido para el estudio estructural de sustancias poco solubles, como polímeros, vidrios, cerámica, resinas, etc., siendo una alternativa muy interesante para materiales de baja cristalinidad que no pueden ser estudiados por técnicas de difracción. También permite el estudio de factores dinámicos difícilmente observables por otras vías. Existe, así mismo, gran número de estudios realizados sobre materiales biológicos: virus, moléculas fibrilares (seda, colágeno, celulosa), proteínas, carbohidratos o compuestos con fines farmacéuticos (estudios de polimorfos).

Espectrómetro Bruker AV 400 WB:

- Sonda multinuclear (^{15}N - ^{31}P) CPMAS de triple canal (BL4 XY/1 H) para rotores de 4 mm., con giro hasta 15 KHz.
- Sonda multinuclear CPMAS de doble canal (BL 2.5 ^{17}O - ^{31}P / ^{19}F - ^1H) para rotores de 2.5 mm., con giro hasta 35 KHz.
- Accesorios de temperatura variable.

Tipos de estudios realizables

Realización de espectros CPMAS mono y bidimensionales (INADEQUATE, post C7) de núcleos con spin = 1/2.

Para otro tipo de núcleo o ensayo ponerse en contacto con el laboratorio.

Condiciones generales y específicas de las muestras

- Las muestras deben enviarse debidamente identificadas con una referencia.
- Preferentemente, el sólido debe ser reducido a un polvo homogéneo.
- La cantidad de muestra necesaria para el análisis varía en función de la sonda que se use:
 - o Para la sonda de 4mm se precisan en torno a **50 mg.** de producto (es necesario rellenar **un volumen de aprox. 40 μl .**
 - o Con la sonda de 2.5 mm. cuyo rotor tiene un volumen en torno a **10 μl .**, entre **10 y 20 mg.** de producto puede ser suficiente.

MEDIANTE RESONANCIA MAGNETICA

Unas micropartículas ayudan a “ver” los virus

Científicos estadounidenses han desarrollado un nuevo método para detectar microorganismos por escáner. Este es el procedimiento mejor y más rápido conocido hasta ahora y consiste en inyectar nanopartículas en la sangre. De momento, ya ha permitido detectar el virus del herpes y ha sido probado en seres humanos.

Estas nanopartículas son piezas del tamaño de una millonésima parte de milímetro con forma, en este caso, de muelles. Estas han sido recubiertas de unos anticuerpos (pegados con una especie de azúcar) que actúan contra un virus concreto. De esta manera microorganismos y nanopartículas se unirán a este formando grupos que pueden ser vistos fácilmente a través de una resonancia magnética.

Entre las importantísimas aplicaciones de esta técnica están la detección y localización de virus como el del SIDA, que se suele encontrar en los nódulos linfáticos, lo que ayudaría a los médicos a mejorar los tratamientos. También se podrá utilizar en la terapia génica para comprobar que el virus está transportando el ADN al lugar deseado.

Hasta el momento, los científicos del Centro para la Investigación Molecular mediante Técnicas de Imagen de la Escuela Médica de Harvard, sólo han podido detectar microorganismos en fluidos corporales pero confían en que en un periodo de tan solo dos años también pueden detectar los virus en los órganos del paciente.

Antes los microorganismos sólo podían ser detectados de manera indirecta capturando y amplificando el ADN viral mediante la técnica de la PCR, lo que tarda unas dos horas. “Es incómoda, lleva tiempo, da tanto falsos positivos como negativos y sólo detecta fragmentos del virus”, ha explicado Manuel Pérez, cabeza del equipo que ha desarrollado la nueva técnica.

Los resultados obtenidos en este estudio, publicado en el “Journal of the American Chemical Society”, muestran que la actual técnica necesita la mitad de tiempo para ofrecer unos resultados mucho más precisos.

8.2.16 Cromatografía líquida de alto desempeño (HPLC)

En la actualidad HPLC ha llegado a ser una de las Técnicas del Laboratorio Moderno más importante como herramienta analítica para separar y detectar compuestos químicos y biológicos. Esta técnica utiliza la cromatografía en fase reversa (RPC) la cual permite separar moléculas en base a su polaridad. El principio de la cromatografía en fase reversa es semejante al de la cromatografía en capa fina. Sin embargo, aquí la fase estacionaria es de partículas de sílica químicamente modificadas con hidrocarburos saturados, insaturados o aromáticos de diferentes tipos empacados en columnas metálicas. Esto convierte a la fase estacionaria en una matriz apolar. Por lo tanto, para este tipo de cromatografías se emplean mezclas de solventes polares, tales como agua, acetonitrilo, acetato de etilo, acetona y alcoholes alifáticos.

En virtud de lo anterior, este tipo de cromatografía ha sido también llamada como cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC). En general, este último término se ha empleado para referirse a las aplicaciones en las que se emplean sustituyentes y matrices compatibles con fluidos biológicos. Por tanto, el término HIC es común cuando se habla de purificación de proteínas y carbohidratos, en tanto que RPC es más empleado para referirse a la separación de moléculas en sistemas que son inadecuados para la separación de macromoléculas biológicas.

Debido a diversas limitaciones prácticas de la cromatografía de capa fina en fase reversa, entre las que destaca el costo de usar placas no reutilizables de una matriz difícil de sintetizar, la cromatografía en fase reversa ha sido adaptada para el uso de columnas. La versatilidad y eficiencia de este tipo de cromatografía se ha visto incrementada con el uso de sistemas de alto desempeño (HPLC, de inglés "High Performance Liquid Chromatography") que utilizan alta presión para mejorar la resolución y reducir los tiempos de separación.

Los sistemas de alto desempeño pueden también emplearse en otros tipos de cromatografías, de manera que para referirse a la cromatografía en fase reversa en sistemas de alto desempeño se emplea la abreviatura HPLC-RPC.

En la separación de aminoácidos y péptidos mediante fase reversa la resina más comúnmente empleada posee una cadena lineal de 18 carbonos y se denomina como C₁₈.



Dado que la resolución de los aminoácidos mediante fase reversa RPC requiere de sistemas de HPLC, es frecuente referirse al sistema como C₁₈-HPLC.

Cromatografía líquida de alta resolución en columnas de **fase reversa**. Este método consiste en aplicar los aminoácidos disueltos en una fase acuosa acidificada a una columna de sílice unida a una cadena hidrofóbica. Los aminoácidos, según su polaridad se van a unir a la columna y entonces el eluyente se mezcla gradualmente con cantidades cada vez mayores de un solvente menos polar que el agua. Los aminoácidos van siendo lavados de la columna conforme la polaridad del solvente baja lo suficiente.

Los aminoácidos pueden identificarse mediante su reacción con ninhidrina, mediante su absorbancia UV o mediante fluorescencia (si están marcados con un grupo fluorescente), ya sea en la placa de sílice, o conforme eluyen de la columna.

8.3 Serología

8.3.1 Inmunoperoxidasa (IP)

INTRODUCCIÓN: Dentro del grupo de las pruebas inmunocitoquímicas e inmunohistológicas se encuentran las pruebas de inmunofluorescencia e inmunoperoxidasa. Estas han demostrado ser tan sensibles y específicas como las serológicas pero con la ventaja de disminuir el error de un falso positivo causado por el cruce de antígenos.

FUNDAMENTO:

Se basa en la identificación de un antígeno determinado por medio de un anticuerpo específico, al igual que otras pruebas de tipo inmunológico, pero con las características de que los antígenos forman parte o pueden ser observados en la estructura de la que inicialmente proviene, esto es cortes de tejidos u otro preparado como extendido o improntas celulares.

Todo esto permite estudiar las características morfológicas, la localización de compuestos histicos y celulares en procesos de condiciones normales o patológicas, o identificar otro tipo de compuestos y partículas tales como virus, bacterias, anticuerpos, etc., en dichas estructuras.

Dicho material además, sirve de soporte para las posteriores reacciones que tienen como fin visualizar la presencia de determinado elemento con sustancias coloridas o la formación de ellas.

Las pruebas de inmunoperoxidasa utilizan como marcador a la enzima peroxidasa (extraída del rábano picante y de donde toma el nombre de prueba). El uso de enzimas como la peroxidasa, han ampliado la variedad de tinciones debido a que se pueden ocupar varios sistemas sustrato cromógeno según las necesidades de cada caso. En general los sistemas más utilizados son aquellos que como producto final forman un precipitado insoluble, en solventes orgánicos, sobre el sitio donde se encuentra la peroxidasa permitiendo contrateñir y fijar con resina las preparaciones. Entre estos sistemas se encuentra el de H_2O_2 – diaminobencidina (donde la enzima reduce al peróxido de hidrógeno y posteriormente se oxida a diaminobencidina) cuyo producto final es un precipitado de color café-marrón.

Los pasos por los que la peroxidasa queda unida con el antígeno depende de la modalidad de la prueba cuyas principales variantes son:

- ☞ Prueba directa
- ☞ Prueba indirecta
- ☞ Sistema peroxidasa-antiperoxidasa o complejo avidina-biotina

Entre las variantes, la amplificación de la coloración es su característica principal de diferenciación. En todos los casos se tiene la alternativa de poder conservar las preparaciones mediante su fijación en resinas o su contrateñición sin afectar sus características iniciales y sobre todo el que puedan ser observadas con microscopio óptico.

8.3.2 Inmunoperoxidasa indirecta (IPI)

El fundamento de la prueba de IPI se basa en tres reacciones principales que tiene como base un corte histológico o impronta donde se encuentra el antígeno a ser estudiado:

1. La identificación de un antígeno con un anticuerpo primario homólogo y específico al antígeno y que posterior a una incubación adecuada.
2. Se aplica e incuba con un anticuerpo secundario conjugado a la enzima y
3. La aplicación e incubación con la solución sustrato-cromógeno más adecuada a los propósitos finales. Todo esto sin olvidar los pertinentes lavados entre cada paso para eliminar cualquier sobrenadante de compuesto que pudiera interferir en la tinción.
4. Finalmente la lectura de las laminillas se observan con un microscopio óptico y pueden hacerse de ellas un tinción permanente.

8.3.3 Inhibición de la hemaglutinación.

Los ácidos nucleicos de muchos virus codifican proteínas de superficie que aglutinan eritrocitos de varias especies. El fenómeno se emplea con mucha frecuencia para el diagnóstico de las infecciones producidas por ortomixovirus, paramixovirus y los arbovirus-togavirus (incluido de la rubéola), flavivirus y buyanvirus. La presencia del virus en cultivos celulares infectados pueden detectarse por hemoaglutinación; la identidad del

virus o de los anticuerpos presentes en el suero de pacientes puede determinarse por la inhibición específica de la hemoaglutinación.

FUNDAMENTO:

La prueba de inhibición de la hemoaglutinación se basa en la inhibición de la hemaglutina viral por anticuerpos específicos.

MATERIAL Y REACTIVOS:

- * Eritrocitos de especie adecuada (pollo, gansos, cobayo o humanos grupo O tripsinizados) extraídos en solución Alsever o heparina.
- * Diluyente de pH adecuado.
- * Soluciones para eliminar las Hemaglutinas no específicas del suero.
- * Medio de cultivo infectado o antígeno estándar para serología.

PROCEDIMIENTO:

- 1) Determinar del Título hemaglutinante.

Una suspensión diluida de eritrocitos se incuba a 4° C. o a temperatura ambiente con diluciones seriadas del antígeno hasta que los eritrocitos de los tubos sin virus sedimenten en forma de botón compacto (1 a 4 hrs.). La mayor dilución que produce hamaglutinación parcial o completa representa 1 unidad hemaglutinante.

- 2) Tratamiento del suero.

Para la mayoría de los virus es necesario eliminar los inhibidores inespecíficos presentes en el suero. Esta eliminación puede efectuarse por medios físicos, como el caolín; por medio de enzimas, como la neuroaminidasa o la enzima de estructura de los receptores EDR del *Vibrio cholerae*, o por una combinación de estos métodos. La elección varía de acuerdo con el virus en estudio.

- 3) Prueba de inhibición.

Se mezcla una dilución de antígeno que contenga 4 UHA con los glóbulos rojos adecuados y diluciones seriadas al medio del suero tratado.

Interpretación:

El punto final es la última cubeta en la que se observa aglutinación parcial o completa de los eritrocitos. Una película de bordes dentados o un botón irregular indican aglutinación. La observación del movimiento del sedimento de eritrocitos cuando se inclina la placa ayuda a aclarar el punto final.

Controles:

Suero positivo conocido, Suero negativo conocido, Suero y células si antígeno (para detectar aglutinación inespecífica).

Titulación de la actividad hemaglutinante del antígeno (para asegurarse que se utilizan 4 UHA).

Fundamento:

Los ácidos nucleicos de muchos virus codifican proteínas de superficie que aglutinan eritrocitos de varias especies, esta prueba se basa en la inhibición de la hemoaglutinación viral por un anticuerpo específico el fenómeno de hemoaglutinación no es evidente y se visualiza la sedimentación de los glóbulos rojos formando el fenómeno de hemoaglutinación no es evidente y se visualiza la sedimentación de los glóbulos rojos formando el característico botón rojo; se usa para detectar indirectamente la presencia de virus hemoaglutinante como ortomixovirus, paramixovirus, y los arbovirus-toga virus (incluyendo la rubéola), flavivirus y bunyavirus; porque el virus es una proteína extraña por lo cual se producen anticuerpos contra el antígeno.

La reacción de las hemoaglutininas virales con los eritrocitos da como resultado un retículo de células aglutinadas que sedimentan en forma irregular en un tubo o cubeta de micro titulación, las células no aglutinadas sedimentan en forma de botón compacto.

Esta técnica es altamente sensible y específica, debido a que únicamente mide aquellos anticuerpos dirigidos contra la hemoaglutinina viral; la rapidez, sensibilidad especificidad y costo mínimo de la técnica hace que sea empleada en muchos laboratorios para la caracterización de los virus y/o anticuerpos.

MATERIAL:

- Suspensión del virus.
- Antisuero específico.
- Eritrocitos de la especie adecuada (pollo, ganso, cobayo o humanos grupo O típsinizados) extraídos en solución de Alsever o citratados.
- PBS estéril.
- Tubos de centrifugar estériles.
- Tubos de prueba 12 x 72 mm. estériles.
- Pipetas de 1 y 10 ml. estériles.
- Centrifuga
- Baño María a 37° C.

METODO:

- Hacer diluciones dobles seriales del antisuero en PBS comenzando con una dilución 1:10. Distribuir la dilución del suero en 0.2 ml. en pequeños tubos.
- Titular el antígeno como en la prueba de HA. Determinar la dilución que contenga 4 unidades HA por 0.2 ml.

Por ejemplo:

1. Si el título de HA del virus es 1:80 representa 1 unidad HA. de esta manera, una dilución 1:10 puede contener 8 unidades HA en 0.4 ml. o 4 unidades HA en 0.2 ml.
2. Añadir 4 unidades de antígenos en 0.2 ml. en cada tubo con antisuero.
 - a) Incluir los siguientes controles:
 - i. Suero solo dilución 1:10, 0.4 ml.
 - ii. Antígeno solo 4 unidades, 0.4 ml.
 - iii. Suero positivo conocido 1:10, 0.4 ml.
 - iv. Suero negativo conocido 1:10, 0.4 ml.
 - b) Incubar de 30 a 60 min.
 - c) Añadir 0.4 ml. de eritrocitos al 5% a todos los tubos. Agitar. Colocar todos los tubos a una temperatura apropiada también los controles tienen que asentarse completamente.
 - d) Leer el título, la dilución más alta de la hemoaglutinación inhibido pro el virus y es expresado como la reciproca de la dilución del suero.
 - e) Leer la titulación reversa como sigue:
 - f) Leer los controles.
 - i. Suero solo debe ser negativo.
 - ii. Antígeno solo debe ser negativo.
 - iii. Suero positivo conocido debe ser positivo.
 - iv. Suero negativo conocido debe ser negativo.

Interpretación:

Se tomara como punto final de la actividad del suero. la máxima dilución en el que el fenómeno de hemoaglutinación ha sido inhibido, el resultado final se expresa en unidades inhibitoras de la hemoaglutinación (UIHA), la reciproca de la dilución del punto final de la actividad del suero, multiplicada por las unidades hemoaglutinantes del virus utilizado nos dará el número de dosis inhibitora hemoaglutinantes del suero por unidad del volumen.

La presencia de reacciones IHA de diluciones inferiores a 1/10 (40 u 80 UIHA) son consideradas negativas, de 1/10 a 1/40 (80 a 320 UIHA) indican exposición previa del virus, valores superiores a 1/180 (mayor de 640 UIHA) representa una respuesta a la infección reciente.

8.3.4 Inmunodifusión (ID) (fig. 8.7)

Principio

Las reacciones de precipitación en medios semisólidos, llamadas "inmunodifusión en gel" permiten identificar individualmente cada constituyente de una mezcla de Ag y Ac mediante difusión o electroforesis, evitando la mezcla mediante un agente coloidal como el agar, agarosa, gelatina y poliacrilamida. Así como su cuantificación por comparación con sistema conocidos.

En un ensayo de inmunodifusión, Ag y Ac se difunden lateralmente unos hacia otros, sus frentes se entremezclan y forman una cinta de precipitado en el gel.

Inmunodifusión radial simple

Se lleva a cabo en una capa de agar sobre un portaobjetos que contiene antisuero uniformemente repartido.

METODOLOGÍA:

- Preparar agarosa al 1% y añadir el antisuero, mezclar.
- Colocar 4 ml. sobre un portaobjetos y dejar gelificar.
- Hacer 5 perforaciones de 3 mm. en el agar y removerlo.
- Llenar los posos con la soluciones de Ag en diferentes concentraciones (c/u por duplicado).
- Incubar las placas en cámara húmeda de 24-48 horas.
- Medir el diámetro de los halos de precipitación.
- Hacer una gráfica: diámetro (mm.) vs. concentración (mg/ml).

INTERPRETACIÓN:

- ▶ La difusión del Ag da lugar a la formación de un anillo de precipitación, cuyo diámetro es proporcional a la concentración inicial del Ag.
- ▶ Dado que el Ag esta en solución y el antisuero distribuido en el agar, la localización de la línea esta dada por los siguientes factores:
 - ⇨ [] del Ag
 - ⇨ Coeficiente de difusión del Ag
 - ⇨ [] de Ac
 - ⇨ Tiempo
 - ⇨ T°
 - ⇨ [] del agar

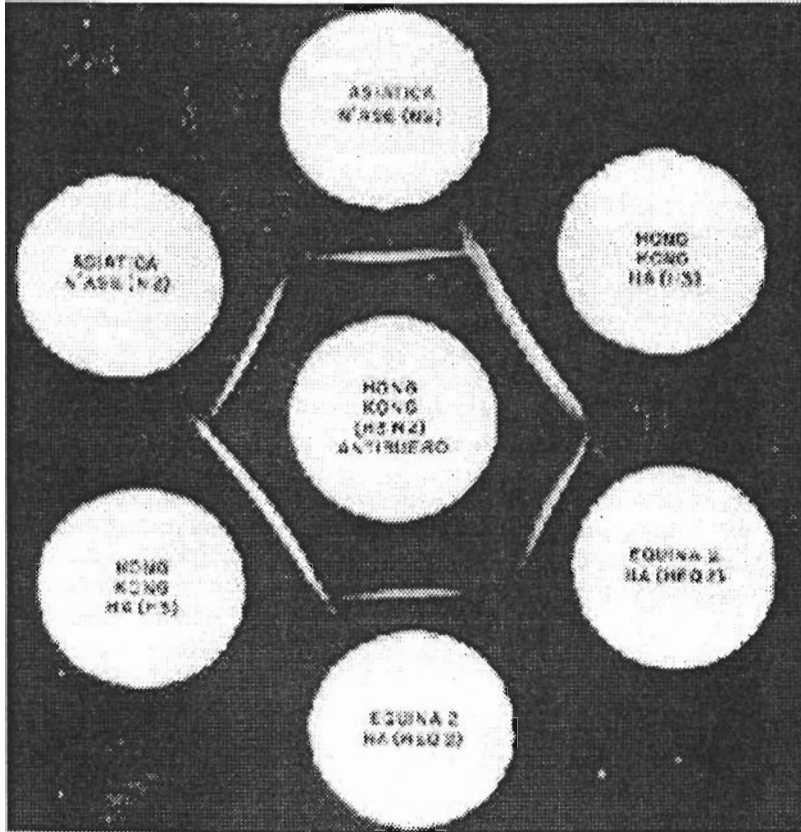


Fig. 8.7 Prueba de inmunodifusión. El ejemplo ilustra su uso para analizar la relación entre los antígenos de envoltura del virus de la influenza A.

Tomada de: Fenner White Virología Médica 2da Ed. La Prensa Médica Mexicana S.A.

8.3.5 Precipitación

La facilidad de combinación del antígeno con el anticuerpo depende de varios factores, como son el pH, fuerza iónica, temperatura, tiempo, concentración crítica micelar y, sobre todo, las concentraciones relativas de antígeno y anticuerpo.

La precipitación del complejo se manifiesta por dos fenómenos principales:

- Reducción de cargas de superficie a nivel de los sitios activos del antígeno y anticuerpo.
- Reducción en la capacidad de las moléculas de agua presentes en ambas moléculas, lo cual reduce su solubilidad hasta precipitarlos.

Los complejos antígeno-anticuerpo insolubles forman una red tridimensional que puede observarse y los reactantes han de estar en proporciones adecuadas, ya que el exceso de cualquiera de ellas produce un grado de solubilización del agregado molecular.

Las reacción de precipitación puede ser cualitativa o cuantitativa y efectuarse en medios sólidos o líquidos.

Pruebas en medio líquido

Principio.

La precipitación se presenta cuando antígenos solubles y polivalentes se combinan con su anticuerpo específico (antisuero homólogo) y da lugar a complejos insolubles que pueden ser visibles y cuantificables a cabo de unos cuantos minutos.

Prueba clásica del tubo

METODOLOGÍA:

1. Mezclar concentraciones decrecientes de Ag en solución fisiológica, con cantidades constantes de antisuero.
2. Incubar 4° C por 3 o mas días
3. Medir el precipitado resultante.

Prueba del anillo

METODOLOGIA:

1. Añadir el antisuero.
2. Colocar 50 µl. de solución transparente de antigeno, sin mezclar, hasta que se forme una capa de mismo volumen de antisuero mas denso y transparente.
3. A los pocos minutos observar el disco precipitado en la interfase de ambas soluciones.

En forma semicuantitativa se estima la cantidad de precipitado formado, expresándolo en milímetros lineales. Cuantitativamente el precipitado se puede analizar mediante la determinación del nitrógeno proteico en el mismo.

Si los resultados se grafican, a pequeñas concentraciones de Ag no se observa el precipitado, pero conforme aumenta la concentración de AG se comienza a formar el precipitado que va aumentando gradualmente hasta llegar al máximo, después del cual comienza a desaparecer aun cuando la concentración de Ag sigue aumentando.

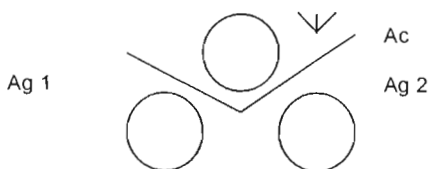
Al analizar el contenido del sobrenadante después de centrifugar y eliminar el precipitado, es posible evidenciar la presencia de Ac libre en la región ascendente de la curva (zona de exceso de Ac) o de Ag libre en la región descendente de la curva (zona de exceso de Ag). En la región central de la curva, donde esta el máximo de precipitación no hay ni Ac ni Ag libre y se denomina zona de equivalencia.

Condiciones para pruebas en medio líquido

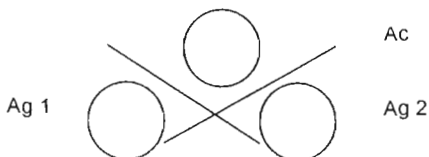
- ✓ El grueso de precipitado es Ac.
- ✓ La concentración de antisuero debe ser mayor a la del Ag
- ✓ Las soluciones de antisuero y Ag deben ser transparentes.
- ✓ pH y concentración salina deben ser fisiológicas.
- ✓ Intensificadores (dextrano o polietilenglicol) para aumentar la sensibilidad.

Patrones de precipitación con el método de difusión doble en agar.

Identidad



No identidad



Identidad parcial



8.3.6 Fijación de complemento

8.3.6.1 Introducción

Cuatro enfermedades vesiculares no pueden diferenciarse clínicamente: fiebre aftosa (FA), estomatitis vesicular (FV), enfermedad vesicular (EVC) y exantema vesicular (EVC), por lo que es necesaria la confirmación de laboratorio.

Las pruebas más empleadas son Fijación del Complemento (FC') y Seroneutralización (SN). La identificación del virus requiere alrededor de 3 horas por FC' y 2-4 días por SN. Por medio de la FC' se lleva a cabo la detección del antígeno (virus) en el material remitido.

Se trata de una prueba físico-química, en la que se emplea una batería de sueros hiperinmunes de cobayo, perfectamente estandarizados, que permite tipificar y subtipificar los agentes causantes de las enfermedades vesiculares.

Esta prueba se realiza en dos etapas: en la primera se enfrenta el material sospechoso, adecuadamente procesado, con las diluciones de trabajo de los sueros hiperinmunes específicos y el complemento (C') previamente titulado. Luego de la incubación, se añade el sistema hemolítico, que nos permite visualizar si se produjo la reacción antígeno anticuerpo-complemento.

En los ensayos de FC' es esencial emplear una cantidad limitada y perfectamente regulada de C'. La dosis de C' se especifica en términos de unidades de actividad hemolítica. Universalmente se adoptó la normalización del C' en términos de "unidad hemolítica 50%" (UHC₅₀). Cuando los sueros o los antígenos inactivan el complemento por sí solos, se dice que son anticomplementarios (la actividad pro-complementaria, no es usual en materiales infecciosos).

8.3.6.2 Preparación y estandarización de reactivos

Sistema hemolítico

Glóbulos rojos de carnero

El ovino se sangra por la vena yugular, usando trocar de 2 a 3 mm. de diámetro o una aguja del número 16. La sangre de ovino es extraída asépticamente; se recoge en un volumen igual de solución de Alsever (ver Apéndice) modificada y se conserva la mezcla entre 2° y 5° C.

Preparación del suero hemolítico o hemosilina en conejos

- a) Se sangran varios carneros y se hacen una mezcla (300 ml. de sangre).
- b) Se mezcla con agua destilada (30 ml.) en un frasco con boca ancha. Se agita bien.
- c) Se centrifuga a 10.000 rpm. durante 10-15 minutos. Decantar el sobrenadante cuidando de no arrastrar el estroma.
- d) Se continua lavando con agua destilada hasta que el sobrenadante se aclara.
- e) Se resuspende en solución salina fisiológica sin antibiótico, pH 7,6-7,8. Se lleva a un volumen igual a la mitad del volumen inicial de sangre (en este ejemplo 150 ml.).
- f) Se sigue el siguiente esquema de inmunización por vía intramuscular.

1° - 2,5 ml.	Tres días entre
2° - 3,0 ml.	cada inoculación
3° - 3,5 ml.	y se sangra tres
4° - 4,0 ml.	días después
5° - 5,0 ml.	
- g) Se recoge la sangre en placas de Petri grandes. Se deja 1 hora a 37° C. Se mantiene el coágulo y se mantiene toda la noche a 4° C.
- h) El suero obtenido se centrifuga 10 minutos a 500 g aproximadamente. Se inactiva 30 minutos a 56° C.
- i) Se fracciona y congela a -20° C.
- j) Se titula una de las alícuotas.

Titulación del suero hemolítico

(figura 8.8)

- a) Diluir la hemosilina a 1/100 (19,8 de Buffer Barbitol (BB) + 2,0 ml. hemosilina).
- b) Diluir la hemosilina a 1/1000 (18,0 ml. de BB x 2,0 ml. hemosilina 1/100).
- c) Preparar una suspensión patronizada de GR al 2% y medir en el espectrofotómetro (0,4 ml. de GR + 1,6 ml. de agua destilada).
- d) El esquema de diluciones es el presentado en la (figura 2).
- e) Incubar 30 minutos, en baño María a 37° C.
- f) Preparar tantas titulaciones de complemento como diluciones de hemosilina se usaron para preparar los sistemas.
- g) Obtener el título del complemento para cada sistema empleado y hacer el gráfico en papel milimetrado. Colocar en la ordenada los títulos del complemento y en abscisa las diluciones del suero hemolítico.
- h) El título del suero hemolítico (1UH 50%) estará dado por la recíproca de la mayor dilución del suero que produce 50% de hemólisis con la menor cantidad de C' (inclinación de la "meseta" o "plateau"). Por lo tanto, 1UH 50% es la menor cantidad de suero hemolítico, a partir de la cual se obtiene una hemólisis constante aumentando la concentración del mismo.

Preparación del sistema hemolítico

- a) Se filtra la sangre de ovino (colectada en Alsever) por algodón para eliminar coágulos.
- b) Se hace un primer lavado con solución salina fisiológica y dos con BB. Se centrifuga a 2000 rpm. durante 50 minutos.
- c) Un último lavado con BB se centrifuga 10 minutos a 2000 rpm.
- d) Con los GR lavados se hace una suspensión al 2%.
- e) Se coloca 1,6 ml. de agua destilada más 0,4 ml. de la suspensión de GR. Se ajusta el espectrofotómetro con agua destilada. Se emplea una longitud de onda de 542 nm. La densidad óptica (DO) debe estar entre 0,68 – 0,70. La DO de la suspensión de GR puede ajustarse añadiendo o quitando BB. La formula empleada es la siguiente:

$$\text{Volumen final} = \frac{\text{Volumen inicial de GR} \times \text{DO leído}}{\text{DO deseado}}$$

- f) Después de verificarse la DO se agrega la hemolisina (previamente diluida adecuadamente) y se dobla el volumen de BB para lograr una concentración del 1%.
- g) Se sensibiliza el sistema incubándolo 30 minutos a 37° C en Baño Maria (BM)

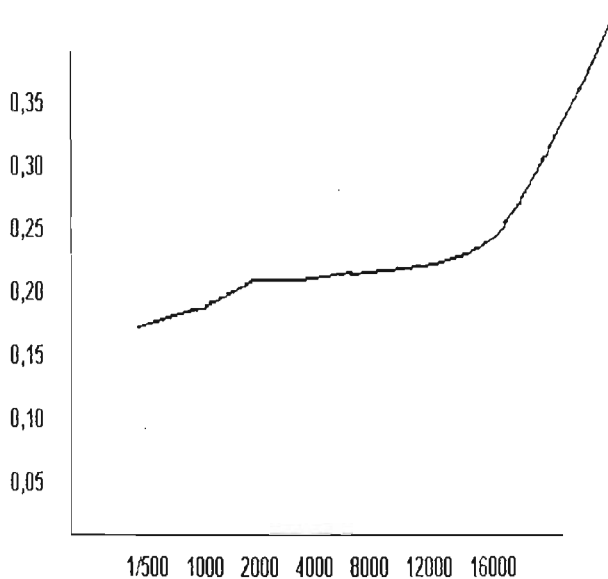


Fig. 8.8 Titulación de hemolisina (método clásico)
Tomado de : Manual de Técnicas de Diagnóstico Virológico

FIGURA 8.9

Dilución Suero hemolítico	1/500	1/1000	1/2000	1/4000	1/8000	1/12000	1/16000
Hemosilina	1,0	5,0	2,5	1,25	0,625	0,42	0,312
BB	4,0	0,0	2,5	3,75	4,375	4,58	4,688
GR 2%	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Volumen final	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0	10,0

FIGURA 8.10

C'	C'	C'	C'	C'	C'	C'	C'	C' 1/10	C' 1/10	C' 1/10
1/100	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100	1/100			
Tubo	1	2	3	4	5	6	7	testigo	testigo	Blanco
BB	1,10	1,05	1,00	0,95	0,90	0,85	0,80	0,90	0,90	1,2
C'	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,30	0,30	-
SH	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80

Obtención del complemento

El complemento es una mezcla de suero de cobayos sanos de mas de 500 g de peso. Los cobayos, dejados en ayuno durante la noche, se sangran cortando la vena yugular; se usa hielo seco como anestésico. La sangre se recoge en placas de Petri. Se deja 30 minutos a 37° C. en estufa. Se corta el coágulo, se deja 2 horas a 4° C., se pasa a tubos de centrífuga mantenidos en baño de hielo y se centrifuga 20 minutos a 500 g a 4° C. Se decanta el suero. Se envasa inmediatamente, sin diluir (3 ml. por envase) y se conserva a -70° C. o con solución de Richardson. El sobrante de C' usado en cada titulación debe desecharse. Las diluciones que se usaran en la prueba de FC se preparan en el momento con buffer frío y se conservan en hielo mientras se efectúa la prueba. Se debe evitar la agitación excesiva o el "pipeteo" violento, pues son causa de inactivación del C'.

Titulación del complemento.

La C'H50 se define como la cantidad de C' necesaria para lisar el 50% de los eritrocitos sensibilizados.

- a) El C' a titular se diluye 1/10 con BB (colocar todos los reactivos que intervengan en la reacción en bandejas con agua y hielo.
- b) Colocar en una gradilla 2 hileras con 8 tubos de hemólisis cada una
- c) se cargan los tubos de acuerdo al esquema de la (figura 3).
- d) Incubar a 37° C., 30 minutos en Baño María .
- e) Centrifugar a 1800 rpm., durante 10 minutos.
- f) Leer en el espectrofotómetro con filtro de 540 nm.
- g) Graficar en papel logarítmico y determinar el 1UC' H50.
- h) En base a los resultados obtenidos diluir el C' de manera de emplear en la prueba 4 C'H₅₀. El C' diluido 1/10 debe mantenerse a 4° C. y desecharse al finalizar la prueba.

Cobayización del virus y obtención del suero hiperinmune.

- Se parte de una cepa patrón de virus aftoso bovino (origen cultivo celular o aislamiento).
- Se diluye 1/10 y se inocula 0,2 ml. por vía intradérmica en las almohadillas de las patas traseras de cobayos de 500 g. de peso. Controlar cada 24 hr. por desarrollo de lesiones.
- Se recoge el material en el momento en que se observan lesiones podales, controlando a las 24-48-72 hrs. y se realizan pasajes hasta que ocurra la generalización (pasaje del virus de las patas a las manos). Se dice entonces que la cepa está cobayizada, y ese material se guarda en un cepario como virus cobayizado.
- Con este material se inoculan 250 cobayos. A las 24 hrs. de inoculado se recoge el material (500 patitas). Este material servirá para inmunizar posteriormente a los cobayos.
- Una vez curadas las manos y patas en aproximadamente 30 días PI, los cobayos se inmunizan con la suspensión de virus en saponina.

Preparación de la suspensión viral de descarga.

- Saponina Baker o similar 2,5% en B. Borato
- Epitelio plantar 1/30 en B. Borato

La suspensión viral obtenida en el punto 2.3.1, se centrifuga a 4000 rpm. durante 30 minutos, al sobrenadante se agrega la solución de saponina al 2,5%, pH 7,8 en centrifugación final de saponina del 0,25%. Fraccionándose en frascos de ampolla y conservándolos a -20° C.

Inmunización de los cobayos.

- a) Inocular por vía SC en el lado derecho 0,5 ml. del material preparado en el punto 2.3.2.
- b) Dos días mas tarde inocular igual en el lado izquierdo 0,5 ml. del inoculo de material
- c) Dos días mas tarde inocular en la región dorsal 0,5 ml. de material preparado en punto 3.2.2
- d) Dos días mas tarde inocular en la región plantar 0,5 ml. de material preparado en punto 3.2.2.
- e) A los 4 días de la ultima inmunización se sangran los cobayos en blanco y se recoge la sangre en placas de Petri (día 40 PI)
- f) Se inactiva al suero 30 minutos a 56° C. y se guarda a -20° C. fraccionando. Para titular el suero hiperinmune de cobayo se emplea un virus de cepario tipificado y subtipificado, almacenado a -70° C.
- g) Se hacen diluciones del suero hiperinmune de 1/10 a 1/2560 (dil. Aritméticas)
- h) Se diluye el virus desde 1/2 a 1/64 .
- i) Se realiza la titulación en tubos de hemólisis en bloque de acuerdo al diseño de "Titulación de virus".
- j) El título esta dado por la máxima dilución de suero hiperinmune con al que se obtiene el máximo título antígeno. La dilución de uso se determina dividiendo este valor entre 3, para cubrir diferencias de antígeno.

8.3.6.3 Desarrollo de la prueba

Tipificación de materiales infecciosos

Son normalmente epitelios obtenidos de lesiones linguales, bucales o pódales o bien ratones lactantes inoculados con el virus problema. Se sigue el mismo procedimiento para todos estos materiales.

Procesamiento del antígeno.

Es el mismo procedimiento para ratones lactantes, epitelio lingual bovino, epitelio plantar de cobayo, etc.

- En caso de ratones lactantes se quita la cabeza, vísceras (menos corazón) y la parte exterior de las extremidades.
- Lo que queda (aproximadamente 1 g) se troza y macera agregando 3 gotas de clorofomo por ratón.
- Se tritura en un mortero hasta obtener una papilla blancuzca.
- Se agregan 4 ml. de BB por ratón
- Se inactiva el macerado a 56° C. por 30 minutos en BM y se centrifuga a 3000 rpm. durante 30 minutos.
- Se pipetea cuidadosamente el sobrenadante y se tipifica enfrentándolo a sueros hiperinmunes de cobayo (previamente titulados y diluidos) tipo O, A y C, etc., de acuerdo al siguiente esquema:

	"O"	"A"	"C"
Tubo	1	2	3
Suero	0,4	0,4	0,4
Ag	0,4	0,4	0,4
C'	0,4	0,4	0,4

	suero	AG	C'	SH
Tubo	0,4	0,4	0,8	1,2
Suero	0,4	-	-	-
AG	-	0,4	-	-
C'	0,4	0,4	0,4	-

- Se incuba 30 minutos a 37° C. en BM
- Se agrega 0,8 ml. de SH a todos los tubos
- Se incuba a 37° C., 30 minutos, agitando la gradilla a los 15 minutos.
- Se centrifuga a 500 g durante 10 minutos.
- Se determina el tipo de virus por observación directa y en caso de dudas se lee en el espectrofotómetro.

Para la tipificación en microplaca se utilizan los mismos reactivos que para la tipificación en tubos, la diferencia reside en que cada 0,4 ml. es reemplazado por una gota de 0,025 añadida con micropipeta.

Se realizan los mismos controles que para la tipificación de tubos.

Titulación de un antígeno producido en células BHK-21.

- Se diluye al AG a titular de puro a 1/64
- Se hace la prueba siguiendo el esquema:

Dilución del antígeno	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
AG	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
Suero						
Homologo	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
C'	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4

- Se incuba 90 minutos en Baño María a 37° C.
- Se agrega 0,8 ml. de SH a todos los tubos.

- e) Se incuba 30 minutos a Baño María a 37° C.
- f) Se centrifuga los tubos a 500 g 10 minutos.
- g) Se determina el porcentaje de hemólisis en cada tubo.
- h) Se determina el título por interpolación del 50% de hemólisis.

Controles

	Ag Con C'	Ag Sin C'	Suero	SH	C'
BB	0,4	0,8	0,4	1,2	0,9
Suero	-	-	0,4	-	-
Ag	0,4	0,4	-	-	-
C'	0,4	-	0,4	-	0,4

Subtipificación

- a) Se parte de un virus previamente tipificado, por ejemplo, tipo "A"
- b) Se realizan diluciones del mismo, de puro a 1/64.
- c) Se enfrenta cada dilución a los diferentes sueros hiperinmunes de cobayo: A₂₄(8345), A₁₀, A₁₉, A₂₄ Cruzeiro, etc.
- d) Se carga la prueba siguiendo el mismo esquema que se utiliza para la titulación de un antígeno, repitiéndolo tantas veces como sueros se emplean para subtipificar. Los controles son similares a los de una titulación de antígeno.
- e) Se incuba 90 minutos a 37° C a BM
- f) Se agrega el sistema hemolítico.
- g) Se incuba 30 minutos a 37° C en BM
- h) Se centrifuga y se lee en el espectrofotómetro.
- i) Se determina el título del Ag enfrentando a los diferentes sueros y el subtipo del virus estará dado por el suero frente al cual el título es mayor.

8.3.7 Elusión de sangre en discos

En ocasiones se requiere recortar muestras de suero en condiciones de campo, tubos, jeringas pueden ser inconvenientes de andar cargando. Karstad et al desarrollaron una técnica por lo cual las muestras son absorbidas en discos de papel filtro. Esto requiere un mínimo espacio de equipo, es ligero y fácil de trabajar.

Material:

- ❖ Discos de prueba No. 740-E con antibiótico marca Sceicher and Schell.
- ❖ Medio de Hanks o PBS estéril.
- ❖ Tubos estériles 12 x 72 cm.
- ❖ Pipetas 1 y 10 ml. Estériles.
- ❖ Gradilla.
- ❖ Envolturas pequeñas de celofán.

Método:

1. Sujete un disco con una pinza y lentamente ponga la sangre hasta que el disco se sature. Ponga el disco en la envoltura de celofán. Use una sola envoltura para todos los discos de una sola muestra márkuelos.

2. Estos pueden ser almacenados a temperatura ambiente hasta que se haga la prueba.

- Poner el disco en el fondo de un tubo adiciona 1.96 ml. de diluyente que es medio de Hanks o PBS.
- Coloque una pipeta de 1 ml. encima del disco para mantenerlo sumergido.
- Cierre el tubo con el algodón estéril.
- Mantenga el disco sumergido en el diluyente a temperatura ambiente por aproximadamente 16 horas.
- El eluato se considera una dilución aproximadamente de 1:10 (Se estima que el disco absorbe 0.4 ml. de sangre).
- Pasadas las 16 horas renueva con pinzas estériles el disco.
- Use el eluato como si fuera una muestra de suero 1:10 (Haga la prueba de actividad de anticuerpos vía de α o β).

8.3.8 Esquema de la intersección del suero

Fundamento.

- Esta prueba es inútil cuando se tiene un amplio numero de muestras a analizar. Por ejemplo, en estudios de tipo epidemiológico.
- La prueba se basa en la capacidad que tiene un suero (antisuero) de neutralizar a una determinada dosis infectiva de un virus sospechoso
- Si el suero problema a ensayar (probar) existen Ac's específicos contra uno o varios determinantes antígenos del virus sospechoso los cuales fueron inducidos por un previo contacto del hospedero con el virus, entonces este suero tendrá la capacidad de neutralizar una dosis infectiva del virus.
- Por lo tanto la prueba se basa en la propiedad que tiene un Ac de reconocer a su Ag específico (reacción Ag – Ac).

Material

- Antisuero (suero a ensayar).
- 10 o 100 TCID₅₀ del virus.
- solución de PBS estéril.
- Pipetas estériles de 1 y 10 ml.
- Tubos estériles (12x72 mm).
- Tubos de cultivo de tejido (3 por cada pozo con suero).
- Baño de agua a 56° C.

Metodología

- Calentar los antisueros a 56° C. por 30 minutos.
- Distribuir los antisueros según un esquema de intersección

Por ejemplo:

Pozo	No.1	No.2	No.3	No.4
No. 5	S-1	S-2	S-3	S-4
No.6	S-5	S-6	S-7	S-8
No.7	S-9	S-10	S-11	S-12
No.8	S-13	S-14	S-15	S-16

- Adicionar PBS a cada pozo para obtener una dilución final de cada suero de 1:20

➤ El pozo 1 contiene

0.1 ml. de suero S-1
0.1 ml. de suero S-2
0.1 ml. de suero S-3
0.1 ml. de suero S-4
total 0.4 ml.

adicionar 19.6 ml. de PBS.

- Por la tanto: el suero S-1 esta diluido 1:20, El suero S-2 esta diluido 1:20. etc. Adicionar volúmenes iguales de suero inmune (antisuero) de un pozo, con 10 o 100 TDIC50 de virus en tubos pequeños e incubar a una temperatura apropiada para el virus por 1 hora.

TDIC50 = Dosis infectiva media de cultivo de tejido (DICT50/ml.)
Cantidad de inoculo capaz de matar al 50% de los cultivos

Para calcular TDIC50 se puede utilizar el ECP:

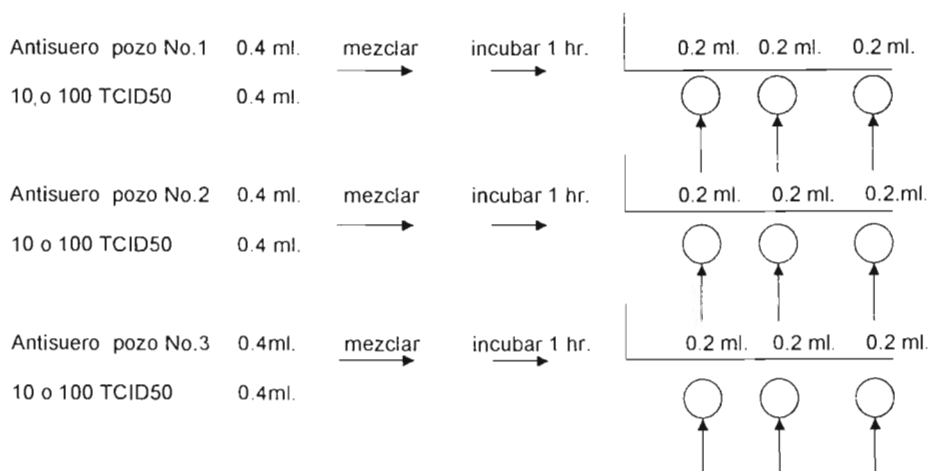
- ⇨ Adicionar 0.2 ml. de muestra de cada pozo con suero junto con el virus a un cultivo de tejido.
- ⇨ Determinar en cual, si en alguno de estos tubos el suero neutralizo al virus.

8.3.8.1 Interpretación

Si alguno de los sueros sometidos a esta prueba tuvo la capacidad de neutralizar a 10 o 100 TDIC50 de virus, entonces se observa que en 2 de los cultivos celulares (los cuales corresponden a 2 de los tubos que a su vez corresponden a un pozo diferente) no existe algún indicador de muerte o de daño a los cultivos celulares. Entonces deberá revisarse cual es el suero que ambos tubos o pozos tienen en común y aquel que se encuentre en ambos es el que neutralizo a 10 o 100 TDIC50 del virus sospechoso.

Ejemplo:

- ⇨ Si la neutralización de un virus X es notada en los tubos que contienen los pozos No.2 y No.6
- ⇨ El único antisuero común a los pozos No.2 y No.6 es el suero S-6
- ⇨ Por lo tanto, el suero S-6 a una dilución del 1:20 neutralizo a 10 o 100 TDIC50 del virus X.



- Es deseable hacer mas pruebas de neutralización con este suero.

8.3.9 Inmunofluorescencia directa e indirecta (IFD / IFI)

FUNDAMENTO:

Es una reacción inmunológica del tipo unión Ag-Ac que es puesta en evidencia por la emisión de fluorescencia si se utilizan en ella radicales orgánicos, con propiedades fluorescentes y se hace uso de microscopio para visualizarla.

Dicha fluorescencia consiste en la propiedad de dichas sustancias, denominadas fluorocromos, de emitir luz de mayor longitud de onda de la que reciben mientras dura la excitación con la luz incidente.

IFD. Se aplica a una solución de Ac específicos marcados con el fluorocromo sobre la preparación que posee el Ag. Así se forma un complejo Ag-Ac marcado que observado en el microscopio de fluorescencia se observa fluorescente.

IFI. Se trata de la preparación que contiene el Ag con el Ac no marcado y este complejo se visualiza aplicándole gama-globulina marcada con el fluorocromo. Esta técnica se utiliza para identificar y localizar Ag's y para detectar y titular Ac's de una misma especie animal.

METODOLOGÍA:

Fluorocromos como rodamina (rojo), fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína (FITC) color verde y el isotiocianato de tetrametil rodamina que emite un color rojo.

Los pasos de la IF son preparación de antisuero inmunitario o Ac's purificados, conjugación con tinción fluorescente y finalmente el procedimiento de tinción. Para la IF se obtiene un antisuero para el Ag que desea detectar en especies heterólogas. Los AcM puros de pueden utilizar. Los antisueros deben contener doble difusión o inmunoelectroforesis.

Los Ac's no deseados, presentes en conjugados en reactivos o reactivos de antiglobulina para la prueba, por lo general se pueden eliminar con inmunoabsorbentes insolubles o evitar totalmente mediante el uso de AcM.

Después de obtener un suero de suficiente potencia y de la especificidad apropiada, se puede preparar la fracción gama-globulina por precipitación con sulfato de amonio o por cromatografía de intercambio iónico con DEAE-celulosa.

Es necesario purificar parcialmente la gama-globulina sérica, esto incrementa la eficacia de la tinción y evita el teñimiento no específico, indeseable por proteínas séricas conjugadas con fluorocromo que no sean Ac y que se pueden adherir a los componentes tisulares.

La conjugación de la gama-globulina depende en gran parte, del colorante particular por combinar con la molécula de Ac. La fluorescencia en forma de FITC o rodamina, lo mismo que el isotiocianato de tetrametil rodamina, se pone a reaccionar directo con la gama-globulina en solución alcalina durante toda la noche a 4° C. o se dializa contra gamma-globulina.

Entonces se elimina la tinción que no reaccionó del conjugado de proteína y fluorocromo. con filtrado en gel o en diálisis exhaustiva.

CONTROLES:

- ❖ Método directo: (fig. 8.11)
 - Control negativo: Células sin Ag + suero marcado
 - Control positivo: Células con Ag de control + suero marcado.

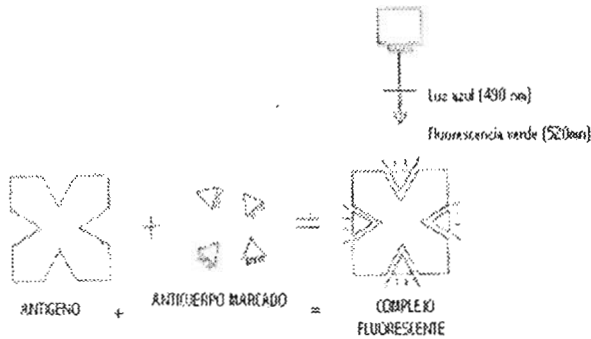


Fig. 8.11 Método directo

Tomado de : Manual de Técnicas de Diagnóstico Viroológico

❖ Método indirecto: (fig. 8.12)

- Control positivo: Células sin Ag + suero (+) + suero marcado
Células con Ag control + suero (+) + suero marcado.
- Control negativo: Células sin Ag + suero (-) + suero marcado.
Células con Ag control + suero (-) + suero marcado.

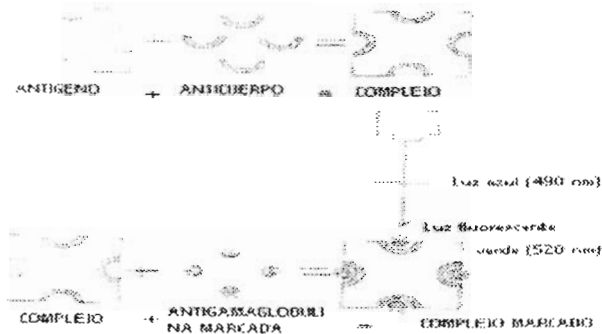


fig. 8.12 Método indirecto

Tomado de : Manual de Técnicas de Diagnóstico Viroológico

INTERPRETACIÓN:

Se observan en primer lugar los controles positivos y negativos; en el control negativo no debe observarse fluorescencia, puede observarse una coloración verdosa o tinción de fondo que será mayor o menor dependiendo de la calidad de los sueros marcados. En el control positivo se observarán células o grupos de células fluorescentes y también células negativas (no fluorescentes).

Se considera positivo todo material en el que se visualicen células o grupos de células fluorescentes.

Practica de Inmunofluorescencia

Procedimiento:

1. Pequeños fragmentos de tejido nervioso infectado son colocados en abatelenguas de madera.
2. Con un portaobjetos limpio se presiona sobre el abatelenguas y se hacen dos impresiones.
3. El exceso de tejido es removido por presión sobre papel filtro.
4. Las laminillas son marcadas e identificadas
5. Se fijan las impresiones durante 10 minutos en acetona fría
6. Se circundan las impresiones con un lápiz graso.
7. Una de las impresiones se colorea con una mezcla de conjugado CVS y la otra con una mezcla de conjugado SCN(cerebro normal)
8. Se incuban en posición horizontal en una cámara húmeda a 37° C., durante 30 minutos.
9. Se lavan las laminillas con PBS con ligera agitación durante 5 minutos.
10. Se enjuagan con agua bidestilada durante 1 minuto.
11. Se secan las laminillas en un secador eléctrico.
12. Se cubren con el elvanol y un cubreobjetos.
13. Se observan al microscopio.
 - a) Cuando es negativo no se ve fluorescencia en ninguno de los dos lados
 - b) cuando es positivo, la impronta teñida con conjugado y CVS no debe haber fluorescencia y en la teñida con cerebro normal y conjugado debe haber fluorescencia.
 - c) Cuando hay fluorescencia de los dos lados es fluorescencia inespecífica o sea que hay reacción cruzada con otros virus.

CUADRO DE RESULTADOS

	CONJUGADO	CVS	CONJUGADO	SCN
TEJIDO NORMAL				
TEJIDO SOSPECHOSO				
TEJIDO INFECTADO				

8.3.10 SN/Seroprotección

8.3.10.1 Seroneutralización:

La neutralización viral se define como la pérdida de la capacidad infectante del virus, por la reacción del mismo con un anticuerpo específico. Los anticuerpos son parte de la respuesta del hospedador cuando reaccionan frente a la infección viral, en forma natural o inducida artificialmente. La seroneutralización es la técnica más sensible y específica para la caracterización viral por métodos serológicos. El procedimiento básico consiste en mezclar diluciones apropiadas de suero y virus, incubadas en ciertas condiciones e introducirla mezcla en un sistema susceptible, donde el virus no neutralizado pueda producir un efecto reconocible como muerte, lesiones específicas, hemoaglutininas, efecto citopático, etc. Detectándose entonces, infectividad residual. Estos sistemas susceptibles pueden ser animales de experimentación sensibles (ratón, rata, cobayo, hamsters), huevos embrionados y cultivos celulares (de línea o primarios). El tiempo y temperatura de incubación, pH, presencia o no de complemento, etc. Son factores que intervienen en la neutralización. Si por ejemplo, la muestra suero inmune-virus se incuba por corto tiempo y a baja temperatura, se puede recuperar virus infeccioso diluyendo la preparación, mientras que, si se deja más tiempo o se aumenta la temperatura, el proceso es irreversible.

La seroneutralización se puede utilizar para:

- a) Identificación de aislamientos utilizando sueros específicos de referencia.
- b) Diagnóstico de infección viral demostrando aumentos de títulos del anticuerpos específicos en el curso de una enfermedad.
- c) Determinar niveles de protección a nivel poblacional ya que, en general, los Ac's neutralizantes persisten durante tiempos más prolongados.

Para la implementación de la prueba de seroneutralización se emplean dos métodos principales:

1. Suero variable- virus fijo:
Una cantidad mediada de virus, se mezcla con diluciones variables de un suero problema y se inocula en un sistema huésped susceptible. La más alta dilución que protege la infección se denomina **título seroneutralizante**.
2. Suero constante-virus variable:
Diferentes concentraciones de virus se enfrentan a una concentración sérica uniforme. Los resultados se expresan como: índice seroneutralizante (IN) y representan la diferencia entre título del virus en presencia de suero control negativo y el título del virus en presencia del suero problema.

En ambos métodos debe definirse el punto final de infectividad, que consiste en la más alta dilución de suero o virus que protege o infecta una unidad de sistema susceptible.

MÉTODO:

- 1) Suero variable-virus fijo (para BHV-1)
 - a) Las microplacas con el cultivo celular se enjuagan dos veces por Medio de Lavado, dejando en cada pocillo algunas gotas del mismo, que se descartan en el momento de inoculación.
 - b) El virus conocido se diluye en MEM-G o BME con 3% de suero normal bovino a fin de obtener 0.001, DICT50/ml. (100 dosis infecciosas en la mezcla suero-virus a inocular; 0.1 ml.)
 - c) El suero se diluye en el mismo medio, en diluciones dobles a partir de 1/2 hasta la dilución final elegida (considerar que el factor de dilución será el doble al agregar igual volumen de la dilución viral). Se mezclan iguales volúmenes de cada dilución varal (por ejemplo, 0.3 ml. dilución sérica y 0.3 ml. dilución del virus).
 - d) Los controles positivos y negativos se preparan de la misma manera, se incluye un control de la dilución viral (0.3 ml. de la dilución varal más 0.3 ml. de medio con suero).
 - e) Se agita suavemente y se lleva a 37° C. durante 60 min. La reacción se detiene a 4° C. durante 30 min.
 - f) Se destapa con cuidado el medio lavado de la microplaca, se seca con papel adsorbente y se inoculan 4 pocillos por cada dilución suero-virus con un inóculo de 0.1 ml. El control de dilución viral se titula a fin de determinar la exacta concentración varal: Tres tubos con 1.8 ml. de medio con suero, colocando en el primero 0.2 ml. de la dilución del virus utilizada (dilución 11/10), se mezcla, se traspasan 0.2 ml. al siguiente (dilución 1/100) y finalmente 0.2 ml. al tercero (dilución 1/1000).
 - g) En cada microplaca que se utiliza se deben dejar pocillos de control celular que solo se completan con medio.
- 2) Suero constante-virus variable (para BHV-1).
 - a) Las microplacas se preparan como el método anterior.
 - b) El o los sueros o problemas inactivados se diluyen 1/5 con medio con suero.
 - c) Se preparan diluciones logarítmicas de virus 0.2, 0.02, 0.002, 0.0002, etc.
 - d) Se incluyen controles de suero positivo y negativo.
 - e) Se mezclan iguales volúmenes de dilución del suero y de dilución varal (por ejemplo, 0.3 ml y 0.3 ml.). El control de cada dilución varal se prepara con 0.3 ml. de cada una de ellas con 0.3 ml.
 - f) Se mezcla y se incuba como en el caso anterior.
 - g) Se inocula 0.1 ml. de cada mezcla, dejando pocillos de control celular.

INTERPRETACIÓN:

La incubación se realiza a 37° C. durante 72 hr, al cabo de la cuales se conservan al microscopio la presencia de efecto citopático en los pocillos. Se controlan los sueros positivos y negativos, los pocillos de control de dilución varal. Una vez checados los controles, se procede a la lectura de los pocillos con y sin efecto citopático correspondientes a cada dilución. Para cada método se aplican el cálculo Reed y Muench.

8.3.10.2 SEROPROTECCIÓN

La seroprotección es una técnica utilizada principalmente en el estudio e identificación de virus, así como en la comparación de sueros y vacunas comerciales. Una prueba de protección comprende primeramente la inmunización activa o pasiva de un animal, seguida de la inoculación de virus virulento. De esta manera, se pueden evaluar sueros de acuerdo a la presencia o no de Ac's específicos frente a un virus determinado y también puede compararse la potencia de distintas vacunas para producir Ac's protectores.

MÉTODO: (para evaluar sueros frente a virus aftoso)

> Sueros

Se inactivan a 56° C. durante 30 min. y se conservan a - 20° C. hasta el momento de su uso. Se utilizan ratones lactantes blancos suizos, divididos en 19 grupos de 6 (19 cajas). A 5 de ellos se le inocula el suero problema por vía subcutánea en dosis de 0.1 ml. por ratón. Se procede igual con el suero positivo y negativo conocidos.

> Virus

Idealmente cepas de bajos pasajes conservadas a - 70° C. o menos, en forma de suspensiones mono-valentes fraccionadas. Con medio diluyente se diluye el virus con un factor de 10, para obtener concentraciones decrecientes. Al mismo tiempo, se titula el virus inoculando en ratones que no recibieron suero, con las diluciones que contienen 0.0001, 0.001, 0.01 y 0.1 DL50 RL/ml. (4 cajas con 6 ratones cada una).

INTERPRETACIÓN:

La prueba se prolonga durante 10 días, en cada uno de los cuales se realizan las lecturas para cada dilución viral:

- a) Animales vivos sanos.
- b) Animales vivos sintomáticos.
- c) Animales muertos recogidos.
- d) Animales muertos comidos

Primeramente se realiza el calculo de la DL50 en los ratones con y sin suero, según el método de Reed y Muench o de Spearman-Karber, a partir de la lectura del décimo día.

El índice de seroprotección (ISP) de un suero es la diferencia entre el log de la DL50 obtenido en el grupo de ratones lactantes sin suero (T) y el log de la DL50 del grupo de ratones lactantes con dicho suero (S), es decir: (21)

$$ISP = \log DL50_{RLT} - DL50_{RLS \text{ normal}}$$

8.3.11 Hemólisis radial simple (SRH)

Es un buen método para medir el estado inmunitario de la población. Esta estandarizado por Russell desde 1978. Se utiliza hematíes frescos de cordero que, tras sensibilizarlos con el antígeno E1, se mezclan a 43° C con complemento de cobaya y con agarosa al 0,8%, vertiéndose en placas de Petri, que pueden ser conservadas a 4° C. En estas placas se realizan, con un sacabocados, pocillos de 3 mm. Los sueros des-complementados se colocan en los pocillos y se dejan toda la noche a 4° C. en cámara húmeda; posteriormente, se incuban las placas 2 horas a 37° C. y se lee el halo de hemólisis producido. Se consideran indicativos de inmunidad diámetros de halo mayores de 5 mm. Si la hemólisis producida es incompleta, se coloca en el

pocillo complemento de cobaya se reincuba. La precocidad de esta prueba es algo menor que la de la IH, pues detecta anticuerpos tras la fase de exantemática, por lo que no se suele emplear para el diagnóstico.

Obtención y manejo de la muestra:

Es necesario obtener en forma estéril dos muestrás de suero de cada paciente, una aguda en la primera semana de evolución de la enfermedad, y otra en el período convaleciente dos a tres semanas después de la primera.

Los sueros deben ser procesados en forma estéril y mantenidos congelados hasta el análisis simultáneo de ambas muestras. La no manutención de normas de esterilidad puede derivar en la contaminación bacteriana de los sueros que en muchos casos puede entregar resultados erróneos.

Existen diferentes métodos de medición de anticuerpos:

- Aquellos que miden la capacidad del anticuerpo de bloquear alguna función específica viral. Como ejemplo se cuentan: Inhibición de la hemoaglutinación (Influenza, Parainfluenza, Adenovirus); neutralización (Adenovirus); inhibición de la neuraminidasa (influenza).
- Los que miden la capacidad del complejo antígeno-anticuerpo de afectar una función no relacionada con el virus. Ejemplo: fijación del complemento (Adenovirus, V.R.S.); hemólisis simple radial (Influenza).
- Otros que miden directamente la interacción antígeno-anticuerpo. Ejemplo: inmunofluorescencia (V.R.S., Adenovirus); radioinmunoensayo.

En los virus respiratorios las técnicas más usadas son la fijación de complemento y la inhibición de la hemoaglutinación, ya que se cuenta con reactivos comerciales de buena calidad y de relativo bajo costo.

En las actualidad las técnicas de IF y ELISA se están utilizando cada vez más, aunque su costo es mucho mas alto que las anteriores y la IF tiene el inconveniente de no ser práctica para el manejo de gran número de sueros.

El diagnóstico Serológico es especialmente útil en estudios de tipo epidemiológico pero debe considerarse que en numerosas ocasiones, en los lactantes menores con IgG materna, las infecciones especialmente a V.R.S. pueden no inducir una respuesta detectable de anticuerpos, fenómeno que también suele observarse en los adenovirus. Además pueden producirse reacciones cruzadas entre virus relacionados antigénicamente. Para influencias de diferentes serotipos, especialmente en las reinfecciones, lo que hace difícil la interpretación de resultados. Sin embargo, permite procesar un gran número de muestras transformándola en una herramienta muy útil especialmente en el estudio de brotes epidémicos. La respuesta serológica a la reinfección respiratoria generalmente es bastante consistente y rápida, y permite un diagnóstico en casos en que la breve eliminación de virus, y en baja cantidad, no permite ser detectado por otros métodos.

La detección de IgM específica, tan útil en una sola muestra de suero en Rubéola por ejemplo, no es válida en las infecciones respiratorias donde en numerosas ocasiones la IgM reaparece en reinfecciones o reactivaciones haciendo muy difícil la interpretación de resultados positivos. Por ello debe siempre usarse las dos muestras de suero: agudo y convaleciente. También se ha tratado de utilizar la formación de anticuerpos en las secreciones respiratorias, fundamentalmente IgA, y aunque su formación ha sido totalmente comprobada, no ha podido ser utilizada con fines diagnósticos de rutina debido a su difícil estandarización.

FUNDAMENTO:

La hemólisis radial simple se basa en la lisis de los eritrocitos suspendidos en agar y en presencia del complemento. Los eritrocitos son sensibilizados con el correspondiente antígeno. Si el suero problema lleva anticuerpos contra este antígeno se produce la lisis en presencia de complemento. Si el suero problema no lleva anticuerpos no se produce la lisis.

USOS:

Esta prueba se utiliza como método de escrutinio para detectar anticuerpos contra cualquier virus hemaglutinante al ser una técnica rápida y al alcance de cualquier laboratorio. De esta forma se utiliza en campañas de vacunación por ser una prueba mucho más barata y realizable que la inhibición de la hemoaglutinación la cual requiere del uso de suspensiones de virus.

Ejemplo: Hemólisis radial simple en rubéola.

En el laboratorio se utilizan los siguientes sueros:

1. Embarazada de 2 meses.
2. Adolescente de 15 años.
3. Embarazada de 3 meses.
4. Mujer de 25 años.
5. Mujer de 33 años.
6. (+) Suero control positivo.
7. (-) Suero control negativo.

TÉCNICA:

- Poner 1 ml. de suspensión de eritrocitos de oveja al 5% en 2 tubos estériles
- Marcar cada uno como "Test" (T) y otro como "Control" ©
- Añadir 0.5 ml. de hamglutinina de rubéola purificada (Título 1:128) únicamente a los eritrocitos del tubo "Test".
- Mezclar suavemente y dejar 5' a temperatura ambiente.
- Añadir a ambos un tampón para fijación de complemento (conteniendo fenobarbital, Mg²⁺ y Ca²⁺).
- Centrifugar a 2000 rpm. de 3'-5'.
- Decantar cuidadosamente el sobrenadante. Los eritrocitos del tubo "Test" están ahora sensibilizados al antígeno de la rubéola.

En ambos tubos:

- a) Resuspender cada uno de los sedimentos de eritrocitos en 0.5 ml. de la solución tampón.
- b) Añadir 0.5 ml. de complemento de cobayo, mezclar y calentar en baño de agua a 43 °C. durante unos segundos.
- c) Añadir 5 ml. de agar al 1% en solución tampón (calentado a 43° C.) mezclar inmediatamente y poner en una placa de petri-estéril, cubrir la placa.
- d) Dejar que el agar de las placas solidifique y marcar ambas placas como "Test" (T) y "Control" ©.
- e) Realizar 7 pocillos en cada una de las placas.
- f) Marcar los pocillos como 1,2,3,4,5,+y-.
- g) Poner 30 µl. del correspondiente suero en cada uno de los pocillos.

Poner las placas a incubar a 37° C. toda la noche.

RESULTADOS:

Después de la incubación a 37° C. toda la noche las placas presentan los siguientes resultados:

PLACA T	PLACA C
1. halo 2 cm	1. no halo
2. halo 0.5 cm	2. halo 0.5 cm
3. no halo	3. no halo
4. halo 1.5 cm	4. no halo
5. no halo	5. no halo
+) halo 1.2 cm	+) no halo
-) no halo	-) no halo

Una zona de lisis de eritrocitos alrededor del pocillo mayor en la placa "T" que en la placa "C" indica la presencia de anticuerpos frente a la rubéola en ese suero.

- Concentración de Ac's frente a rubéola >5 unidades/ml. (con suero+ control).
- Presencia de Ac's frente a rubéola " pero a baja concentración (<5 unidades/ml.).
- No detectados Ac's frente a rubéola.

Una zona de lisis de eritrocitos al alrededor de pocillo mayor en la placa "T" que en la placa "C" indica la presencia de anticuerpos frente a la rubéola en ese suero.

Observación	Resultado
Zona de lisis en la placa "T" mayor la del suero positivo control.	Concentración de Ac's frente a rubéola >5 unidades/ml. (con suero positivo control).
Zona de lisis en la placa "T" menor que la del suero (+) control pero mayor que en la placa control.	Presencia de Ac's frente a rubéola pero a baja concentración (<5 unidades/ml).
Zona de lisis en la placa "T" ausente o igual a menor que la zona en la placa control.	No detectados Ac's frente a rubéola .

8.3.12 ELISA

En el idioma inglés se denomina *enzyme-linked immunosorbent assay* y mundialmente se conoce como ELISA (Debido a que es versátil, sensible y fácil de manejar, este método se adapta para la identificación de un número casa vez mayor de moléculas de interés biológico, sobre todo para el diagnóstico clínico. En lo fundamental, consiste en pegar el Ag o el Ac, según sea el objeto de la búsqueda, a una fase sólida, como perlas, discos, tubos, microplacas de polivinil o poliestreno. La reacción continua su desarrollo al agregar los reactantes, que se adhieren a la fase sólida, y el material sobrante se elimina por simples lavados entre cada paso. Para revelar la reacción se emplean conjugados de anticuerpos marcados con enzimas que, al reaccionar con el sustrato adecuado, dan una reacción coloreada fácil de medir en un espectrofotómetro o a simple vista.

La cantidad de color presente en un determinado tiempo es directamente proporcional a la concentración del Ac o Ag presente en la muestra. (fig 8.12)

FIG 8.12: TÉCNICA DE ELISA

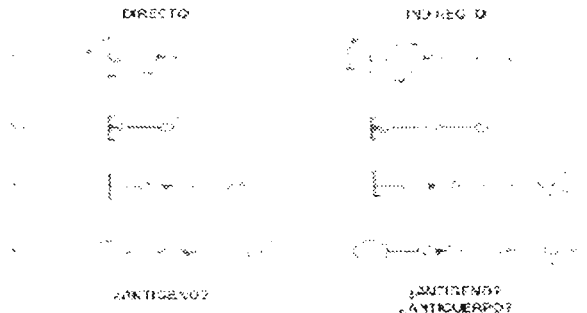


Hay variantes en el método de ELISA para subsanar las dificultades o características del material a determinar. El método indirecto es el de mayor difusión y se aplica para la determinación de I Ac, por lo cual se utiliza sobre todo para el diagnóstico clínico. Consiste en pegar al Ag en la fase sólida, lavar para eliminar el excedente, agregar de inmediato el suero problema e incubar el tiempo necesario para que se efectúe la reacción. De nuevo se lava para eliminar el material que no reaccionó; se agrega antigamma marcada con la enzima (este Ac debe ser de la misma especie animal del Ac a determinar), se vuelve a incubar y al final se agrega el sustrato correspondiente para que desarrolle el color, en el caso de una prueba positiva.

Cuando lo que se desea investigar es un antígeno, la técnica que se aplica es la de doble anticuerpo o de emparedado. Aquí el Ac se pega a la fase sólida y se aplica la solución que contiene el Ag a determinar; el paso siguiente es adicionar de nuevo el anticuerpo que sirvió de anclaje a un segundo anticuerpo, marcado con una enzima, y por último, el sustrato. (1)

FIG 8.13 Técnicas directas e indirectas de inmunodiagnóstico que permiten detectar antígenos o anticuerpos respectivamente. Las indirectas usan un anticuerpo (especie) conjugado con un marcador. Se implementan en sistemas de: 1) células 2) Placa inerte de "fase sólida" 3) Placa en sistemas de "captura" 4) Esfera inerte o biológica, con captura

INMUNODIAGNOSTICO



Técnica de Elisa

- Agregar 200 µl. de cada suero diluido a una celda de antígeno positivo y 200 µl. a una celda de antígeno negativo. Actuar rápidamente para reducir al máximo la diferencia en tiempo entre la primera y la última celda.
- Incubar a 37 ° C. por una hora.
- Descartar el inóculo.
- Agregar la solución buffer pH 7.0 a cada celda.
- Descartar rápidamente el buffer.
- Lavar nuevamente cada celda tres veces por 5 minutos cada vez con buffer pH 7.0.
- Secar la placa sobre grasa.
- Agregar 200 µl. de proteína A peroxidasa por celdas.
- Descartar rápidamente.
- Lavar nuevamente con buffer pH 7.0 cada celda, tres veces, por 5 minutos cada vez.
- Secar la bandeja sobre grasa.
- Añadir 200 µl.
- Incubar en cámara húmeda protegido de la luz, durante 15 minutos.
- Agregar 50 µl. de H₂SO₄ 2M a cada celda (detiene la reacción).

LECTURA:

Se hace en lector Elisa a 492 nm. (D.O.). Utilizar como blanco la fila de una bandeja que corresponda al antígeno negativo y a la cual se le adiciono buffer pH 7.0 en lugar de suero.

El suero positivo de referencia debe tener una lectura igual o dos veces mayor, a la del suero control negativo.

Para considerar un suero problema positivo debe tener una lectura igual o mayor a la del suero control positivo de referencia

8.3.13 Aglutinación en partículas de látex.

Cuando la acción del Ac esta dirigida a Ag's que está en a superficie o forman parte de la membrana de un microorganismo o de una célula, el Ac produce su agregación, dando lugar al fenómeno visible llamado aglutinación. Por otra parte, las células recubiertas con partículas de virus pueden ser aglutinadas por anticuerpos contra estos virus. Igualmente pueden emplearse para detectar virus que estén en las células infectadas, ya que los anticuerpos contra estos virus producirán la aglutinación de las células.

Los anticuerpos aglutinantes actúan en solución, dependiendo de la estructura molecular del anticuerpo (IgG o IgM) y, por tanto de su valencia, de densidad antigénica en la superficie de las células y del propio medio (fuerza iónica).

La aglutinación se lleva a cabo en solución menor o igual 0.15 M de NaCl. La fuerza iónica es importante puesto que un pH alto llevan generalmente a la superficie a una carga negativa, que debe ser neutralizada por iones de carga opuesta antes de que las células puedan entrar en contacto para que los anticuerpos formen puentes específicos entre ellas. De ahí que, aunque la superficie de las partículas posean anticuerpos, es posible que la aglutinación no se produzca en caso de que la concentración salina sea excesivamente baja (por ejemplo, mayor 10⁻³ M de NaCl).

Cuando una mezcla de partículas fácilmente distinguible entre sí, como son los eritrocitos nucleados de la aves y los hamaties anucleados de los mamíferos, se añade a una mezcla de sus anticuerpos respectivos, cada cúmulo que se forma consta de células de uno o de otro tipo. El gran parecido existente entre las reacciones de aglutinación y las de precipitación se pone de manifiesto a través de las reacciones cuantitativas de aglutina-

ción. Por las que se determina la cantidad de anticuerpo adsorbido por un tipo determinado de antígeno particulado.

La reacción de aglutinación se usa ampliamente como método semicuantitativo. Un determinado volumen de una suspensión celular se añade a una serie de tubos, cada uno de ellos con volumen fijo de antisuero o antígeno a una dilución diferente, generalmente doble progresiva. La reacción se acelera mediante agitación y calentamiento a 37° C, y entonces se detecta la aglutinación mediante observación directa, una vez que las células han sedimentado o tras haber procedido a un ligero centrifugado. El título relativo de un antisuero se expresa como recíproco de la dilución más alta que produce aglutinación.

El título estudiado por medio de la aglutinación no es muy preciso (+/- 10%), pero resulta muy fácil de obtener y proporciona indicaciones válidas sobre la concentración relativa. De aquí que la titulación por medio de la aglutinación tenga un enorme valor práctico cuando se siguen los cambios de título de Ac con relación con el tiempo durante una infección vírica, por ejemplo.

Sería de esperar, por analogía con las reacciones de precipitación, que la aglutinación disminuyera progresivamente con la dilución de un antisuero. Sin embargo, ciertos sueros dan tan solo lugar a reacciones de Aglutinación si han sido diluidos cientos o miles de veces. Si por el contrario se encuentran en forma concentrada o tan sólo ligeramente diluida, no reaccionan con el Ag. Esta última región del título recibe el nombre de prozona y es análoga a la zona de exceso de Ag.

Las reacciones de aglutinación utilizan como componentes lo siguiente: las partículas más ampliamente utilizadas son los glóbulos rojos (hemaglutinación) o un polímero sintético como el piliestreno (látex). La adhesión depende generalmente de la adsorción por enlaces no covalentes.

8.3.14 Inmunomicroscopia electrónica (IEM)

El trabajo pionero en este campo fue hecho por Singer y Schick Sternberger, (1976), El método Singer y Schick involucra el acoplamiento de ferritina (una proteína electrodensa aislada de bazo de caballo, que contiene hierro) a un Ac específico.

Una dificultad con esta técnica es que el complejo ferritina-Ac, raramente puede ser inducido para penetrar en el interior de la célula debido a su gran tamaño. Por esa razón, la reacción ha sido principalmente utilizada en reacciones de superficie de la célula.

Otro procedimiento involucra el ligar a una enzima con el anticuerpo. Esta técnica fue propuesta independientemente por Nakane y Pierce (1966) y Avrameas y Uriel (1966).

Después de que el Ac acoplado a la enzima reacciona con el Ag en el tejido, con una técnica electrocitocquímica estándar se puede realizar la localización de la enzima.

La penetración del complejo Ac-enzima hacia el interior de la célula es un poco mejor que con la ferritina debido a su menor tamaño.

Fundamento

La reacción Ag-Ac es un reacción altamente específica, un Ac particular reacciona con uno y solo un Ag en particular.

La inmunomicroscopia electrónica (IEM), permite la visualización de inmunoagregados específicos, que se detectan más fácilmente que los virones monodispersos, este procedimiento aumenta la sensibilidad del microscopio electrónico aproximadamente 1000 veces.

Reactivos:

❖ Inmunoreactivos:

- Anticuerpos
- Antígeno

❖ Marcadores:

1. Inmunoenzimas

- La peroxidasa de rábano es la enzima más ampliamente utilizada, pero también son utilizadas, la fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina, glucosa oxidasa.

2. Radiomarcadores

- Se utilizan Ac's monoclonales marcados internamente con Tritium.

3. Complejos metal-metaloproteínas y polisacáridos

- Ferritina: involucra el acoplamiento de ferritina (una proteína electrodensa aislada de bazo de caballo, que contiene hierro) a un Ac específico, tiene un P.M. de 750 Kd.

- Metal-dextran (Imposil®) y hierro-partículas de mananas: Se conjuga con la Ig's y la forma de aguja que tiene ha sido usada para distinguirla de la ferritina en inmunocitoquímica de doble marcación en secciones congeladas ultradelgada.

4. Oro coloidal

- Es la partícula más comúnmente utilizada como marcador en inmunomicroscopia.
- Es una partícula electrodensa, no citotóxica y es estable en solución.

5. Marcadores adicionales:

- | | |
|------------|--------------------------|
| ➤ Uranil | ➤ Polietileneimina |
| ➤ Hierro | ➤ Poliestireno |
| ➤ Mercurio | ➤ Microesferas de sílica |

Procedimiento

- ▶ A nivel de microscopia electrónica el Ac se marca con una sustancia electrodensa el cual causa que el sitio de la reacción Ag-Ac pueda ser visible en el microscopio electrónico.
- ▶ El complejo del anticuerpo-sustancia electrodensa se aplica entonces a tejidos ya fijados y permite que reaccione con cualquier antígeno específico que pueda estar presente en el tejido.
- ▶ El tejido se lava para quitar anticuerpo que no reacciono y entonces se observa con un microscopio electrónico.

Ejemplos:

La IEM fue el primer método utilizado con éxito para visualizar el virus de la hepatitis A.

8.3.15 Anticuerpos Monoclonales

Los AMA fueron producidos por vez primera por Kohler y Milstein en 1975, que obtuvieron el Premio Nobel de Medicina en 1984 por tal descubrimiento. Los mencionados autores consiguieron unir dos células y obtener un híbrido (**Hibridoma**) que presentaba características funcionales de ambas poblaciones celulares. Así, fusionaron un **linfocito B** de bazo de un ratón inmunizado con eritrocitos de oveja que producía anticuerpos contra un epítipo del eritrocito, con **células de mieloma** de un ratón que vivía de forma indefinida "in Vitro". Obtuvieron un **híbrido** que era capaz de segregar inmunoglobulinas frente al **epítipo** del eritrocito de oveja de forma permanente, ya que el hibridoma también había adquirido la capacidad de secreción de inmunoglobulinas del **mieloma** y su capacidad para vivir "in Vitro". Es decir, consiguieron producir anticuerpos "in Vitro" frente a un solo determinante de una compleja estructura antigénica.

Etapas de producción de hibridomas:

1. Obtención de antígeno
2. Inmunización
3. Fusión
4. Restricción del crecimiento a los híbridos formados
5. Selección de los hibridomas positivos
6. Clonaje y estabilización
7. Caracterización

PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES.

Los Anticuerpos monoclonales son Ac uniformes y homogéneos elaborados por un solo clon de células plasmáticas, lo que les confiere especificidad para un mismo determinante antigénico, con la ventaja de poderlos producir en grandes cantidades.

Los anticuerpos monoclonales son producidos por la fusión de células productoras de Ac (Linfocito B) y células tumorales (mieloma) en un medio de cultivo. La célula resultante se llama hibridoma.

En 1975, Kohler y Milstein describieron por primera vez un método para producir AcM, trabajo por el cual recibieron el Premio Nobel.

Para hacer Ac monoclonales, necesitamos:

- > Anticuerpos con una sola especificidad.
- > Todos deben ser producidos por un solo clon de células plasmáticas.
- > Que puedan crecer indefinidamente.

Metodología:

1. Inocular a un animal de laboratorio (ratón) el Antígeno de interés.
2. Extraer las células de bazo (Linfocitos B productores de Ac) del animal inoculado.
3. Tener en un medio de cultivo las células de mieloma HGPRT. (*).
4. Cultivar ambas células (fusión) en un medio HAT. (**).
5. Realizar pruebas al sobrenadante del cultivo para detectar la producción de los Ac deseados.
6. Elegir solo una célula del hibridoma en el cual se haya encontrado una producción positiva del Ac deseado, y subcultivada en otro medio.
7. Realizar nuevamente pruebas al sobrenadante para confirmar la presencia de los Ac de interés. Cada Subcultivo positivo, que ha sido iniciado de una sola célula, representa un clon y sus anticuerpos son monoclonales. Es decir, cada cultivo secreta un tipo de Ac dirigido contra un solo determinante antigénico (antígeno preseleccionado).
8. Proliferación de AcM, ya sea "in Vitro" (cultivo) o "in Vivo" (ratones).

(*) Las células de mieloma deben haber perdido su habilidad para sintetizar Hipoxantina-guanina-fosforibosiltransferasa (HGPRT). Esta enzima permite a las células sintetizar las purinas usando una fuente extracelular de Hipoxantina como un precursor. Normalmente, la ausencia de HGPRT no ocasiona problemas a las células porque las células cuentan con una vía alterna para poder sintetizar purinas. Sin embargo, cuando las células son expuestas a aminopterina (un análogo del ác. Fólico) son incapaces de usar dicha vía alterna y dependen totalmente de la HGPRT para sobrevivir.

(**) Medio HAT: Contiene Hipoxantina, Aminopterina y Timidina.

- a) Las células de mieloma que no se fusionaron a las células B, no pueden crecer por falta de HGPRT.
- b) Las células B de bazo que no se fusionaron, no pueden crecer indefinidamente debido a su limitación biológica.

- c) Las células del hibridoma (producido por fusiones exitosas) pueden crecer indefinidamente gracias a que la célula de bazo proporciona la HGPRT necesaria y a que el mieloma es inmortal.

Desventajas:

- Los AcM son producidos en ratones y el sistema inmune humano los ve como agentes extraños y montan una Respuesta Inmune produciendo HAMA (Anticuerpos Humanos Anti. Ratón).
- Por lo anterior, son eliminados rápidamente del organismo, además de formar complejos inmunes que causan daño a los riñones.

Para resolver este problema, se han hecho anticuerpos quiméricos (la parte de unión del Ac "región hipervariable" de ratón que se une al Ag se fusiona con la parte efectora "región constante" de un Ac humano por ingeniería genética. Además, aunque todavía se encuentran en fase experimental, se han hecho ratones transgénicos en los cuales se inserta un gen para la elaboración de Ac humanos; o con sus propios genes para hacer Ac "knocked out".

El resultado es:

- Un ratón inmunizado con el Ag deseado.
- Ac producidos por humanos y no por ratones contra el Ag deseado.
- Poder fabricar todos los AcM humanos.

Ventajas:

- Derivan de un clon aislado y comprenden un reactivo bien definido.
- Su producción permite obtener cantidades ilimitadas del mismo reactivo con carácter homogéneo.
- Pueden prepararse con antígenos no purificados.
- La afinidad y especificidad se hallan definidas.

Usos:

- Tipificación de variantes genéticas de virus, proteínas y enzimas.
- Reactivos inmunoabsorbentes para el aislamiento específico de antígenos, como los receptores de estrógenos y progesterona.
- Identificación y aislamiento de receptores celulares.
- Identificación y productos genéticos proteicos en los experimentos de recombinación del DNA.
- Identificación de determinantes antigénicos aislados de una amplia variedad de proteínas, ác. Nucléicos y polisacáridos.

Capítulo 9. TÉCNICAS UTILIZADAS EN MEDICINA VETERINARIA

9.1 MUESTRAS DE SANGRE Y FLUIDOS

En el diagnóstico serológico de las infecciones virales, la validez de las pruebas y su interpretación se basa en los principios cardinales de la colección (toma), preparación, preservación y manejo de las muestras de sangre. La colección oportuna, en forma estéril, volumen adecuado, acompañada de una documentación detallada e inteligible, sometidas a refrigeración y conservación apropiada a un rápido envío, son promisorios de un exitoso trabajo de laboratorio.

El momento de toma de una muestra de sangre en la fase aguda de la enfermedad debe hacerse tan pronto como se sospecha que es de origen viral. La cantidad sugerida de sangre completa esta entre 15 y 20 ml.

En el laboratorio la sangre se debe mantener a 28° C por 30 minutos, período necesario para que se forme el coágulo. Luego se refrigera el espécimen a 4° C. para acelerar su retracción; seguidamente y para máxima obtención de suero se debe centrifugar a 1.500 rpm. por 10 minutos. Utilizando una pipeta (Pasteur) con una aspiradora de caucho en el extremo, se retira cuidadosamente el suero y se transfiere a un recipiente (vial) estéril, preferiblemente con tapa de rosca que permita un sistema hermético. El suero así preparado no necesariamente debe conservarse congelado (el congelamiento y descongelamiento repetido, puede ser deletereo para los anticuerpos). Sin embargo, si la prueba no se realiza el mismo día y se sospecha contaminación del suero, este debe congelarse.

Debido a que la mayoría de los médicos veterinarios, no tiene tiempo o facilidades para separar el suero del coagulo, puede enviarse al laboratorio la muestra de sangre "completa", procedimiento que minimiza la posibilidad de contaminación. En este caso no debe congelarse, ya que este proceso produce hemólisis total. Usualmente en muestras completas enviadas, la retracción del coágulo ya ha ocurrido cuando llega al laboratorio y el suero puede así ser removido rápidamente. Puede ahorrarse algún tiempo, cuando para tomar las muestras se utilizan tubos que se ajusten a soportes estándares de centrifuga; de otra forma el suero debe ser retirado en forma aséptica, colocada en otro tubo y centrifugado para depositar así los elementos celulares presentes.

Evitar la contaminación bacterial es un problema aun cuando en el laboratorio ofrezca tubos virales estériles. Esta contaminación ocasiona degradación proteínica y es tóxica para el sistema indicador de la prueba. La acción enzimática puede también destruir los anticuerpos. Los sueros contaminados, pueden ser filtrados a través de filtros Seitz o Millipore.

El uso de anticoagulantes y preservativos tornan el suero anticomplementario, es preferible manejar el suero asépticamente, además cuando se utiliza para pruebas de neutralización, el preservativo puede tener efecto deletereo sobre el virus o ser tóxico sobre las células o ambos.

Además de la contaminación se debe evitar la hemólisis, los sueros hemolizados por agitación fuerte de la sangre, empleo de tubos y jeringas húmedas, etc., no son apropiados para la detección de anticuerpos.

El costo de cada muestra es alto y con frecuencia se pierde el esfuerzo simplemente por derrame del suero durante el transporte. Los tubos con tapón de caucho deben ser asegurados con cinta adhesiva. La conservación y envío se va a demorar unos días, es preferible congelar las muestras.

Los resultados de una sola muestra de sangre se utilizan principalmente en el análisis epidemiológico de poblaciones. Su interpretación como diagnóstico individual es de poco valor. Para que tengan validez se deben tomar al mismo animal dos muestras de sangre así: la primera durante el momento febril o cuando se detectan los signos y la segunda muestra, dos semanas mas tarde, esperando observar un aumento en el título de

anticuerpos, situación que significa multiplicación viral y estímulo del sistema inmune, conduciendo todo a un diagnóstico real.

9.1.1 Fluidos y fetos

Para la determinación de Ig en el feto. Este debe tener 70 días de gestación o más (longitud mayor de 17 cm.) Se toma suero fetal, fluido torácico, pericárdico o fluido de la cavidad cerebral. El fluido de la cavidad abdominal no es aconsejable por que puede estar contaminado con el producto del estómago.

Si se intenta conocer la actividad viral, en un feto medida por el desarrollo de anticuerpos específicos, es necesario recordar que, normalmente no hay transmisión de anticuerpos maternos a través de la placenta de la cerda.

Existen dos causas posibles que explican la presencia de inmunoglobulinas en la circulación sanguínea fetal. Si existe daño en la placenta, entonces la Ig materna junto con otras proteínas séricas pueden alcanzar el feto; en otros casos, el sistema inmune fetal puede ser estimulado por un antígeno introducido durante la preñez. Se sabe que el feto se hace inmunocompetente alrededor de los 55 días de gestación, así los anticuerpos pueden ser detectados en la sangre fetal circulante alrededor de los 70 días.

9.1.2 Interpretación

Una muestra de suero positiva a un agente viral nos está indicando que existió algún contacto previo con ese agente, pero no si aún está infectado, si es portador crónico, o si se ha eliminado el agente o si esos anticuerpos fueron el resultado de una vacunación anterior.

Los resultados negativos de pruebas serológicas pueden indicar que los animales no han estado en contacto con el antígeno. Sin embargo, se debe reconocer que existen circunstancias especiales que también producen resultados negativos, ej. falta de especificidad de la técnica empleada en el laboratorio, animal inmunotolerante, virus mal inmunógeno, reacción cruzada; además la infección puede estimular alta respuesta celular, pero baja producción de anticuerpos circulantes.

En la mayoría de los casos una muestra serológica positiva indica la presencia de una enfermedad; cuando ella es común o endémica en la piara, una prueba negativa identifica animales a riesgo.

La detección de IgM y/o IgG en fluidos de fetos anormales, puede indicar una infección en útero y ser utilizadas para detectar la acción de agentes específicos.

El éxito de los trabajos realizados en el laboratorio de virología depende de la calidad de la muestra enviada y de la experiencia del personal encargado de su realización.

9.2 Confiabilidad de las técnicas de laboratorio

En general se considera que las pruebas serológicas pueden ser aplicadas en dos situaciones diferentes: en el caso de un animal individual, como herramienta para confirmar el diagnóstico, y en el caso de una población, para estimar la prevalencia de una enfermedad dada.

Las razones de su aplicabilidad son la facilidad de su colección, rapidez en su ejecución y resultados altamente específicos. Cuando se trata de certificar la ausencia de enfermedades infecciosas en piaras las pruebas serológicas ofrecen el único sistema práctico.

En cualquier procedimiento analítico los resultados de una prueba se hallan alrededor de su valor verdadero. El grado de variación aceptable depende de la prueba y está influenciado por la complejidad del método, la necesidad de controlar factores como tiempo, temperatura, pH y la habilidad del personal del laboratorio para controlar esos factores cuando se trabaja con intensidad.

Medidas de valoración:

- ▶ Sensibilidad: habilidad de la prueba para detectar todos los animales infectados:

$$\frac{\text{Animales infectados positivos a la prueba}}{\text{Animales infectados sangrados}} \times 100$$

- ▶ Especificidad: habilidad de excluir todos los animales que no estén infectados:

$$\frac{\text{Animales no infectados negativos a la prueba}}{\text{Animales no infectados sangrados}} \times 100$$

Existe la inquietud de que si un animal se ha recuperado de una infección y ha eliminado el agente infeccioso, pero aún tiene anticuerpos contra el agente se pueda clasificar dentro del grupo de los infectados o no infectados.

Otro problema para la definición de estos parámetros son la dificultad de identificar una suficiente población de animales inequívocamente infectados, igualmente difícil encontrar una población conocida libre de infección. Además es complejo diferenciar un grupo de animales no infectados de otro expuesto a antígenos de reacción cruzada. Raramente se encuentran disponibles cifras exactas para determinar la sensibilidad y especificidad de una prueba. Cada prueba requiere una concentración mínima de anticuerpos detectables. Al aumentar la sensibilidad de pruebas serológicas a través de modificaciones de la técnica se corre el riesgo de disminuir la especificidad.

Lo ideal es que una prueba diagnóstica tenga alta sensibilidad y que al mismo tiempo posea alto grado de especificidad. Sin embargo puede decirse que no existe una enfermedad para la que se disponga de una prueba serológica con un 100% de sensibilidad y de especificidad.

Cuando se examinan casos individuales, es importante que la prueba empleada sea sensible; lo que se desea es detectar a todo animal enfermo. Por otra parte, un "falso positivo" generalmente no causa problema grave, ya que el Médico Veterinario no basa su diagnóstico en un solo procedimiento y por lo tanto es posible demostrar por otros medios que el resultado de la prueba fue falso.

En el caso de estudios de población la situación no es la misma, porque el interés se centra en estimar una prevalencia y no en tomar acción a nivel individual. Los resultados falsos en este caso no tienen ninguna consecuencia directa desfavorable para los integrantes de la población; en cambio pueden tener influencia marcada en la sobre o subestimación del valor de la prevalencia..

Cuando inicialmente se estudia una gran parte de la población para detectar una enfermedad (en los estudios de sondeo) la interpretación de la prueba se dirige hacia una mayor sensibilidad en detrimento de la especificidad. Esto se debe a que las pruebas iniciales no se enfocan a lograr diagnósticos definitivos sino que su objetivo es más bien detectar todos los casos posibles. Por lo tanto una alta proporción de falsos positivos (resultantes de una mayor sensibilidad) no es tan crítico como una alta proporción de falsos negativos (resultantes de una mayor especificidad).

Si el propósito del estudio es estimar una prevalencia, la selección del método diagnóstico a usarse no debe basarse solamente sobre consideraciones de sensibilidad y especificidad, sino también en su facilidad y costo. Pruebas que no son altamente sensibles o específicas pueden igualmente brindar resultados útiles. Muchas veces es aconsejable utilizar una prueba sencilla y de bajo costo, siempre que ésta tenga un nivel aceptable de sensibilidad y especificidad, sin importar que existan otras pruebas precisas pero sustancialmente más complejas y costosas. Estas consideraciones no son válidas en el caso de análisis individuales, donde se debe preferir el método de mayor sensibilidad y especificidad.

En las últimas etapas de una campaña de erradicación es conveniente contar con pruebas serológicas de buena sensibilidad y especificidad, si la campaña depende exclusivamente de la prueba serológica. En la práctica se hace mayor énfasis en otras medidas de control, como el aislamiento de las granjas infectadas, repetición frecuente de las pruebas en aquellas granjas que se sabe están infectadas, empleo de procedimientos de vigilancia sobre granjas acreditadas, mantenimiento de áreas libres de la enfermedad a través del control del movimiento de animal.

9.3 Valoración de anticuerpos

9.3.1 Títulos.

Se considera como tal, la concentración de anticuerpos y corresponden a la dilución más alta del suero que da una reacción al aplicar una técnica. Así, si la dilución más alta que reacciona es 1 en 64, el título será 1:64. Por otro lado puede darse el valor recíproco, lo que indica que el suero no diluido contiene 64 veces los anticuerpos necesarios para la reacción.

9.3.2 Transformación logarítmica de los títulos.

Normalmente, un suero se diluye siguiendo una serie geométrica, es decir con una relación constante (usualmente 2) entre las diluciones sucesivas lo que indica que los títulos se deben valorar en una escala logarítmica. Ya que la distribución de frecuencias de los títulos suele ser log o normal, deben utilizarse métodos estadísticos que suponen normalidad. En una escala logarítmica, si la serie de dilución geométrica presenta el mismo intervalo, por ejemplo diluciones 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, etc., corresponden a una transformación logarítmica en base dos siendo 1, 2, 3, 4, etc., los respectivos logaritmos en base dos de los inversos de las diluciones, pudiendo codificar como el valor de éstos logaritmos en base dos.

TITULOS DE ANTICUERPOS EXPRESADOS COMO LA INVERSA DE LA DILUCIÓN (X) Y COMO TITULOS CODIFICADOS.

Inversa de la dilución	Título codificado $\log_2 x$
1 (suero diluido)	0
2	1
4	2
6	3
16	4
32	5
64	6

Cuando se intenta suprimir alguna reacción no específica presente en las concentraciones elevadas del suero, se pueden iniciar las diluciones según \log_{10} y continuar con diluciones \log_2 , del siguiente modo 1:10, 1:20, 1:40, etc.

Títulos medios:

- ▶ La media aritmética se calcula sumando los títulos codificados y dividiendo por el número de ellos. Por ejemplo, si tenemos cinco títulos 1:2, 1:4, 1:2, 1:8, y 1:4 los títulos codificados serán 1, 2, 1, 3 y 2 respectivamente. Por lo tanto, la media aritmética es:

$$(1+2+1+3+2) / 5 = 1.8$$

- ▶ El promedio geométrico (PG), es el antilogaritmo en base 2 de la media codificada. Puede calcularse a partir de logaritmos en base 2 o con mayor frecuencia, utilizando logaritmos en base 10. Por ejemplo si la media aritmética de varios títulos codificados es:

$$4.7, \text{ el } \log_2 \text{ PG} = 4.7$$

por tanto $PG = 2^{4.7} = 26$. Aplicando Log_{10} :

$$\begin{aligned}\text{Log}_{10}PG &= 4.7 \times \text{Log}_{10}2 \\ &= 4.7 \times 0.301 \\ &= 1.415\end{aligned}$$

$$\text{Antilog } 1.415 = 26$$

Por lo tanto, el PG es 26

Si se comienza con una dilución log_{10} y posteriormente se realizan diluciones log_2 , antes de hallar los logaritmos en base 2 se dividen entre 10 los valores obtenidos. Por ejemplo, las diluciones 1:10, 1:20, 1:40, 1:80, serían codificadas como 0, 1, 2, 3, (la codificación de la dilución 1:10 es 0 porque equivale al suero no diluido) con lo que se obtiene una media de 1.5:

$$\text{Entonces } PG / 10 = 2^{1.5}$$

$$\text{Log}_{10}(PG / 10) = 1.5 \times 0.31 = 0.45$$

$$\begin{aligned}PG / 10 &= \text{Antilog } 0.45 \\ &= 2.8\end{aligned}$$

Por lo tanto el PG = 28

El logaritmo de cero no puede expresarse porque es "menos infinito". Por lo tanto, cuando se calcula la media de los títulos codificados deben excluirse los animales seronegativos, ya que la inversa de sus títulos es cero y no pueden codificarse; el título medio solamente puede calcularse con animales seropositivos.

Ensayo Cuantitativo.

Un ensayo de este tipo mide una respuesta de tipo "todo o nada", por ejemplo aglutinación o no aglutinación, infectado o no infectado. Dos sistemas que se emplean con frecuencia son:

1. Ensayo de dilución seriada simple.
2. Ensayo de dilución seriada múltiple.

En el primer caso cada dilución se valora una sola vez, por ejemplo, en una prueba de inhibición de la hemoaglutinación, la dilución más alta que inhibe la aglutinación de los eritrocitos es el título de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación. Es una forma de valoración relativamente débil. Si el título es 1:32 quiere decir que 1:31 no produciría el efecto. Sin embargo, como 1:16 es la dilución inferior realizada más próxima, el verdadero título podría estar entre 1:17 y 1:32. Por ello, este tipo de titulación, en la que se comprueban solamente intervalos de dilución, divide realmente las diluciones en bloques. Esta división en bloques es más evidente cuando los títulos se expresan como inferiores a, o, superiores a, por lo tanto los datos son esencialmente ordinales.

En un ensayo de dilución seriada múltiple cada dilución se valora varias veces (usualmente cinco). Se trata de conseguir una valoración fuerte. El punto límite es aquella dilución de una sustancia a la cual un determinado número de miembros del grupo de prueba presenta un efecto definido, tal como muerte o enfermedad. El punto límite más utilizado y de mayor valor estadístico es el 50%.

Así, en farmacología, la toxicidad de un medicamento puede expresarse como dosis letal₅₀ (DL₅₀): La cantidad de medicamento que produce la muerte del 50% de los animales de la prueba expresada con relación al número LD50 que contenga.

Las titulaciones de punto límite cincuenta por ciento (50%) también se utilizan para valorar las concentraciones de anticuerpos, en cuyo caso los títulos se expresan en relación a la dilución de suero que previene un efecto en el 50% de los miembros de un grupo de prueba, producido por el agente infeccioso responsable de la inducción de los anticuerpos que se pretenden valorar. Por ejemplo, la dilución de un suero que impide la infección del 50% en los cultivos celulares por parte de una concentración estándar de virus puede considerarse: una dosis efectiva 50 (DE₅₀). Existen diversos métodos para calcular los puntos límites 50%, entre ellos están los de Reed-Muench y los de Spearman-Kärber .

9.4 Recolección de muestras para animales.

9.4.1 Frotis

MATERIALES NECESARIOS:

- Dos portaobjetos, uno de ellos con dos de sus vértices truncados
- Acetonas
- Palillos
- Hilo de algodón

TÉCNICA:

- Colocar una gota de material sobre el extremo del portaobjetos de bordes enteros, apoyarlo sobre otro portaobjetos y, en ángulo de 45° deslizarlo hacia atrás.
- Secar al aire. Fijar en acetona 10 minutos. Secar.
- Para almacenarlos, colocarlos de a pares con las caras impresas enfrentadas, separados por dos palillos atados con un hilo de algodón.
- Congelar a temperatura inferior a -20°C.

Improntas

MATERIALES NECESARIOS:

- Hoja de afeitar o bisturí bien afilado.
- Un portaobjetos
- Acetona
- Palillos
- Hilo de algodón

TÉCNICA:

- Cortar un trozo de órgano en forma de cubo de aristas bien netas.
- Apoyar una de las caras sobre un portaobjetos presionando suavemente.
- Fijarlo en acetona 10 minutos. Secar.
- Para almacenarlo, colocarlo de igual forma que los frotis.
- Congelar a temperatura inferior a -20° C

9.4.2 Trozos de Órganos y Tejidos

MATERIALES NECESARIOS:

- ▶ Envases plásticos o bolsas de polietileno y papel de aluminio o frascos de vidrio.
- ▶ Se envían aproximadamente 50 o 100 gramos de envases plásticos herméticamente envueltos o en bolsas de polietileno cubiertas con papel de aluminio o en frascos de vidrio con tapa a rosca.

9.4.3 Muestras para el Aislamiento de virus

Hisopados: oculares, nasales, vaginales; **material de:** esófago, faringe, intestino; **líquidos:** cefalorraquídeo, de vesículas, orina, materia fecal; **material obtenido en la necropsia:** trozos de órganos, huesos y tejidos, exudados, raspados; **lavajes:** uterinos y prepucial, sangre.

Momentos de la recolección: (Ver cuadros 1 y 2).

9.4.3.1 Hisopados

MATERIALES NECESARIOS:

- Alambre o madera de 5 mm. de diámetro y 20 cm. de longitud.
- Algodón, gasa
- Tubo de ensayo
- Papel
- Hilo de algodón

CONSTRUCCIÓN DEL HISOPO:

- Enroscar la gasa alrededor del alambre en un trayecto de 10 cm. Puede colocarse un algodón dentro.
- Se incluye en un tubo de ensayo tapado con un capuchón de papel atado con un hilo.
- Se esteriliza en el mismo.

TÉCNICA:

- Frotar el hisopo hasta su impregnación en la superficie a muestrear. Luego se agita o diluye el material en el tubo con medio de Hank's, tampón fosfato o solución fisiológica.
- Se descarta el hisopo debido a la toxicidad de las sustancias que lo integran.

9.4.3.2 Raspado Faríngeo

MATERIAL NECESARIO: Copa Probarg estéril.

TÉCNICA:

- Mantener a los animales en ayuno total durante 12 horas.
- Una hora antes de tomar la muestra, dar agua.
- Tomar la muestra por la mañana.
- Con la copa obtener una muestra de raspado faríngeo y de la porción anterior del esófago.
- Para ello, introducir la copa haciendo poca presión; el animal la deglute.
- Deslizar la copa a la altura de los órganos mencionados tres o cuatro veces.
- Obligar al animal a mantener la boca abierta mientras se extrae la copa, cuidando de no derramar su contenido.
- Si ocurre regurgitación, dar nuevamente agua para estimular la deglución antes de intentar una nueva toma.

9.4.3.3 Contenido Intestinal

En el animal vivo

MATERIALES NECESARIOS:

- Bolsa de polietileno, papel de aluminio.

TÉCNICA:

- Colocar la mano dentro de la bolsa y así, dentro del recto del animal en forma de cuña, abriéndola luego para tomar una porción de contenido intestinal.
- Retirarla cerrada, invertir la bolsa, que de esta forma contendrá la muestra

En el animal muerto

MATERIALES NECESARIOS:

- Piolín o hilo.
- Frasco □ estéril con tapa hermética

TÉCNICA:

- Ligar el intestino en dos sectores separados por una distancia de 10 cm. Cortar por fuera de las ligaduras.
- Colocar en un frasco.

9.4.3.4 Líquido Cefalorraquídeo

MATERIALES NECESARIOS:

- Jeringa, aguja 6x20 ó T. Flower (punta roma)
- Tapa protectora de la aguja (estériles).

TÉCNICA:

- Desinfección y tricotomía de la piel adyacente a la articulación atlantooccipital.
- Introducir la aguja extrayendo líquido de la cisterna magna (ángulo de 45°).
- Enviar en jeringa tapada o el líquido en tubo estéril.

9.4.3.5 Líquido de Vesículas

MATERIALES NECESARIOS:

- Tubos capilares, sebo
- Jeringa, aguja y tapa o tubo de ensayo con tapa de caucho.

TÉCNICA:

- Clavar el tubo capilar en la vesícula, aspirar el líquido y tapar el tubo con cera o sebo
- Extraer con la jeringa, enviar la jeringa tapada o volcar su contenido en un tubo de ensayo y enviar éste.

Observación:

- Trozos de epitelio de vesículas deben enviarse con medio de soporte de Valle (Ver Apéndice)

9.4.3.6 Orina en animal vivo

MATERIALES NECESARIOS:

- Sonda plástica 5 mm. de diámetro (macho).
- Sonda rígida o sonda plástica flexible 1 cm. de diámetro (hembra).
- Frasco con tapa estériles.

TÉCNICA:

- Introducir la sonda por el orificio uretral con cuidado, especialmente en machos, hasta que se produzca eliminación de orina por apertura de esfínteres.

9.4.3.7 Orina en animal muerto

MATERIALES NECESARIOS:

- Jeringa y aguja estéril con tapa.

TÉCNICA:

- Extracción clavando la aguja en el cuerpo de la vejiga.
- Se envía la jeringa tapada o en tubo.

9.4.3.8 Lavaje prepucial

MATERIALES NECESARIOS:

- Sonda para prematuros.
- Recipiente estéril con tapa.
- Medio Earle o Hank's con antibiótico.

TÉCNICA:

- Introducir por medio de la sonda y aplicando la mano en el orificio prepucial para cerrarlo, 250 cc. de medio de cultivo en la cavidad prepucial.
- Masajear de craneal a caudal.
- Extraer el líquido por sifonaje dejándolo en el recipiente que contenía el medio y cerrando éste con tapa hermética.

9.4.3.9 Lavaje uterino

MATERIALES NECESARIOS: Ídem anterior.

TÉCNICA:

- Introducir la sonda por el orificio uterino externo.
- A través de ella colocar 500 cc. de medio en la cavidad uterina.
- Extraer por sifonaje y colocar en frasco con tapa.

9.4.3.10 Sangre

MATERIALES NECESARIOS:

- Jeringa bien seca, aguja
- Tubo de ensayo
- Heparina (10 UI/ml. de sangre) u otro anticoagulante.
- El anticoagulante puede colocarse en la jeringa.

TÉCNICA:

- Extraer lentamente 15-20 ml. de sangre en una jeringa con anticoagulante.
- Agitar suavemente por inversión y enviar la jeringa tapada o volcar suavemente el tubo.

9.4.3.11 Muestras para Técnicas de detección de Anticuerpos

Son necesarias dos muestras del mismo animal, una extraída al comienzo de la sintomatología y otra luego de dos a tres semanas, cuidando de individualizar los animales muestreados. Deben muestrearse más de cinco animales en diferentes estadios de la enfermedad.

a) Sangre

MATERIALES NECESARIOS:

- Jeringa, aguja
- Tubo de ensayo con tapón.

TÉCNICA:

- Extracción de la forma corriente, vertiendo en tubo **sin anticoagulante**. Tapar el tubo.
- Dejar en reposo y que no sufra agitación.
- Nunca congelar la sangre entera.

b) Suero

Se indica cuando la muestra debe viajar varios Km. de distancia hasta su destino.

MATERIALES NECESARIOS:

- Tubo de ensayo
- Tapón de goma
- Alambre de cobre espiralado.

TÉCNICA:

- Colocar el tubo que contiene la sangre en un ambiente con una temperatura de 22-23° C. durante dos horas hasta que la sangre coagule y luego a 4° C. hasta que el coágulo se retraiga. Separar el suero vertiéndolo en otro tubo.
- Colocar la sangre en un tubo que se tapa con un tapón de caucho adicionado con un alambre de cobre espiralado. Se procede de la misma manera que en el punto anterior y cuando se opera la retracción del coágulo se retira el tapón con el alambre que arrastra consigo el coágulo.
- Clarificar a 1000 rpm. durante 20 minutos.
- Congelar inmediatamente a -20° C. hasta su posterior utilización.
- Las muestras de suero deben estar libres de hemólisis, bacterias y hongos.

9.5 Técnica de neutralización de fluorescencia (FA) para la detección de anticuerpos de la fiebre porcina clásica (FPC) y de la diarrea viral bovina (DVB).

9.5.1 Materiales

- Virus de FPC y DVB
- Suero positivo
- Suero negativo
- Conjugado específico
- Medio MEM
- Tubos Leighton
- Tubos de serología

9.5.2 Procedimiento

Propagación del virus.

A. Fiebre Porcina Clásica:

- Utilizar células PK15 (en frascos de 150 ml.) con 48 horas de incubación; cuando la monocapa tenga un 90% de confluencia, se elimina el medio de crecimiento.
- Cubrir la capa de células con 10 ml. de la cepa A del virus del FPC con título no menor de 10^5 unidades formadoras de placa (UFP) por ml.
- Incubar las botellas a 37° C. por una (1) hora sobre un agitador orbital.
- Agregar a cada botella 50 ml. de medio MEM que contenga 10% de suero fetal bovino (SFB).
- Incubar a 37° C. por 48 horas.
- Congelar a -70° C. y descongelar.
- Centrifugar a 1.500 g. por minuto.
- Recoger el sobrenadante.
- Envasar en viales y usar como Stock del virus.

B. Diarrea viral bovina:

- El stock del virus de DVB se prepara de manera similar, utilizando una cepa de NDAL adaptada a células PK15.
- Los frascos de 150 ml. sembrados con células PK15 se inoculan con 10 ml. de una dilución de virus que tenga un título mínimo de 10^3 UFP por 0.1 ml.

TITULACIÓN DEL VIRUS

A. FPC:

- ▶ El stock del virus del FPC se titula para determinar la dilución óptima que se usará en la prueba.
- ▶ Preparar una serie de diluciones (e. i 1:500, 1:1000, 1: 2000, 1:2500) del virus stock.
- ▶ Mezclar cada dilución con una cantidad igual de suero negativo conocido de CP, diluido 1:8, hasta alcanzar una dilución final de 1:16.
- ▶ Inocular 0.2 ml. de cultivo en tubos Leighton con células PK 15 ó 0.1 ml. por cámara en caso de portaobjetos (la monocapa deberá tener de 75 a 90% de cubrimiento).
- ▶ Incubar a 37° C. de 18 a 24 horas.
- ▶ Retirar y lavar la laminilla con PBS 0.01 M, pH 7.2, (salina buferada fosfatada).
- ▶ Fijar en acetona (analítica) por 10 minutos.
- ▶ Cubrir la laminilla con conjugado anti CP por 30 minutos a 37° C.
- ▶ Lavar con PBS durante 10 minutos.
- ▶ Enjuagar con agua destilada.
- ▶ Dejar secar.

- ▶ Montar sobre portaobjetos y observar. La dilución de virus que produce aproximadamente 10 PFU por campo, utilizando un aumento 130 X, se selecciona como la dosis (concentración) de virus para la prueba.
- ▶ Para evaluar la dilución de virus seleccionada, se usa un suero conocido, positivo para CP que tenga un título de neutralización de 1: 16. Los hallazgos de la prueba FAN debe ser o tener < 1 PFU por campo observado y > 1 PFU por campo para la dilución de 1:16 y 1: 64 respectivamente. Si estas condiciones se cumplen, la dilución de virus seleccionada se considera satisfactoria para ser usada en la prueba.

B. Diarrea Viral Bovina : El stock del virus BVD se titula de manera similar utilizando una dilución del stock del virus inicial de 1: 50, 1:100, 1: 150, 200 y 250 con los reactivos apropiados para BVD.

NEUTRALIZACIÓN DE FLUORESCENCIA

A. FPC

Prueba cualitativa (screening): Los sueros problema se prueban en dilución 1:16.

- ▶ Agregar 0.2 ml. de cada suero a 1.4 ml. de Medio MEM Eagle, contenido 7.5 grms/ml. de sulfato de gentamicina y 3 g/ml. de anfotericina B. Esta proporción de suero y diluyente corresponden a una dilución de suero de 1:8.
- ▶ Adicionar 1.6 ml. de "virus prueba" de CP dilución final 1:16.
- ▶ Incubar la mezcla virus- suero a 37° C. por 60 minutos.
- ▶ Inocular en portaobjetos con cámaras o en tubos Leighton que contengan células PK15 (0.1 ml. por cámara o 0.02 ml. por tubo).
- ▶ Incubar a 37° C. por 24 horas.
- ▶ Fijar en acetona
- ▶ Colorear un conjugado ¹

PRUEBA FAN CUANTITATIVA / DIFERENCIAL

- ▶ Hacer diluciones de suero en base 4, de 1: 16 hasta 1: 1024 así :

Tubo No.1	1.4 ml.
Tubo No 2	1.5 ml.
Tubo No.3	1.5 ml.
Tubo No.4	1.5 ml.
- ▶ Al tubo No 1 agregar, 0.2 ml. del suero problema: dilución 1:8.
- ▶ Tomar 0.6 ml. de la mezcla anterior y trasladar 0.5 ml. al tubo No. 2, el restante 0.1 ml. se descarta; el resultado es una disolución en base 4 y una dilución 1:32 en el tubo No 2.
- ▶ Del tubo No 2, tomar 0.5 ml. y pasarlo al tubo No 3.
- ▶ Esta mecánica se repite para las siguientes diluciones; del ultimo tubo, remover y descartar 0.5 ml. para obtener diluciones 1:8, 1:32, 1:128, 1:512.
- ▶ Agregar volúmenes iguales de "virus prueba" a cada una de las diluciones: dilución final del suero 1:16, 1:64, 1: 256, 1:1024. (i. e. 1.0 ml. de virus de prueba al tubo 1 y 1.5 ml. de virus prueba a los tubos de 2 al 4)
- ▶ Incubar la mezcla virus-suero a 37° C. por 60 minutos.
- ▶ Inocular 0.2 de inóculo en tubos Leighton con PK-15, de 24 horas.
- ▶ Incubar a 37° C. por 24 horas.
- ▶ Fijar las láminas en acetona.
- ▶ Colorear con conjugado ¹.

¹ Ver Técnica de Neutralización de Fluorescencia para Fiebre Porcina Clásica

9.5.3 Controles

Negativo: Suero conocido negativo diluido 1:16 (final); inocular dos tubos o portaobjetos con cámaras, según el método descrito anteriormente.

Positivo: Un suero conocido positivo a CP en diluciones 1:16 y 1:64 (para el procedimiento cuantitativo/diferencial se agrega un suero positivo a BVD con título 1:16).

9.5.4 Interpretación:

Control Negativo: revisar 20 campos microscópicos para inmunofluorescencia.

- ▶ Registrar el total PFU.
- ▶ Determinar el promedio por campo, dividiendo el número de PFU, por el número de campos observados.
- ▶ El promedio se usa para calcular el 90% de reducción de placa para la prueba.
- ▶ La reducción del 90% representa el nivel (umbral) para considerar un suero positivo. Por ejemplo, si se cuentan 200 placas PFU en campos observados para el control negativo, el resultado sería 10 PFU/campo. Dando 1PFU/campo como nivel positivo (utilizando el 90% como criterio de reducción), cualquier dilución de suero que tenga un promedio menor de 1PFU/ campo, será registrado como negativo para esa dilución. La dilución 1: 16 del suero conocido como positivo debe producir menos de una placa por campo y la dilución 1:64 debe producir más de una PFU por campo.

Una desviación ± 0.2 PFU a partir del óptimo nivel positivo del 1PFU por campo, debido al cambio de la susceptibilidad celular u otro parámetro de la prueba, indica la necesidad de su reevaluación.

B. Diarrea Viral Bovina:

El procedimiento de coloración inmunofluorescentes FAN para DVB, es el mismo que se describió anteriormente, excepto que el conjugado que se emplea para el procedimiento cuantitativo es DVB.

Diarrea Viral Bovina: La interpretación y los controles son los mismos para la prueba FAN y DVB.

9.5.5 Reactivos y soluciones

* Salina Bufferada Fosfatada (PBS) 0.01M, pH 7.2

- NaCl 8.5 gr.
- Na_2HPO_4 1.14 gr.
- NaH_2PO_4 0.254 gr.
- Agua Destilada 1000 ml.
- Ajustar el pH a 7.2

9.6 Técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) para detectar anticuerpos de FPC y diarrea viral bovina.

9.6.1 Materiales

- Virus de FPC y DVB
- Tubos Leighton
- Conjugado Específico
- Suero Positivo
- Acetona
- Azul de Evans

9.6.2 Procedimiento

- ▶ Retirar los portaobjetos infectados del congelador Revco -70° C. y déjelos secar. Este procedimiento puede acelerarse por medio de :
 - Refijar por 10 min. En acetona fría ó
 - Ventilar con aire caliente con un secador de cabello
- ▶ Identificar los portaobjetos (usar lápiz) en el extremo escarchado pues la tinta puede correrse y las etiquetas se manchan.
- ▶ Agregar una gota de suero positivo a cada impresión de antígeno.
- ▶ Incubar en cámara húmeda por 30 minutos a 37° C.
- ▶ Sumergir el portaobjetos en un vaso con PBS para lavar la mayor parte de la gota (el empleo de un agitador magnético acelera el proceso de lavado).
- ▶ Recordar que el conjugado **debe corresponder** a la especie de anticuerpo usado. Ej.: con suero humano úsese IgG de cabra **anti-humano**, con fluido ascítico de ratón úsese IgG de conejo **anti-ratón** (no importa el animal huésped de donde se obtuvo el antígeno).
- ▶ Lavar con PBS.
- ▶ Sin dejar secar el portaobjetos, agregar glicerina amortiguada y colocar la laminilla.
- ▶ Observar al microscopio de fluorescencia.
- ▶ Los portaobjetos pueden almacenarse a 4° C., y leerse después.
- ▶ El azul de Evans (contrateñido) reduce el fondo verde no específico, pero también reduce el brillo de la fluorescencia específica si está demasiado concentrado. Las células negativas de fondo se verán de color rojo.

9.6.3 Preparación de portaobjetos con antígeno.

- ▶ Inocular botellas de 25 cm² ó 75 cm² con monocapa de cultivo celular apropiado para el virus a emplear.
- ▶ En general emplear una dilución de 10^{-1} ó 10^{-2} es preferible que usar la cosecha original concentrada.
- ▶ Retirar el medio de cultivo por decantación.
- ▶ Diluir el virus (de cosecha original) en diluyente MEM Eagle,
 - Inocular las botellas con los siguientes volúmenes:

0.2 ml.	25 cm ²
0.5 ml.	75 cm ²
- ▶ Incubar 30 minutos a 37° C.
- ▶ Agregar medio de mantenimiento (normalmente con 2% de suero bovino fetal) apropiado para la monocapa celular.
- ▶ Revisar los frascos diariamente para observar efecto citopatológico (CPE).
- ▶ Cosechar el virus cuando los CPE sean focales todavía (1-1 ó 1+).

Si los CPE están muy avanzados, los portaobjetos preparados tendrán exceso de células fluorescentes y serán de baja calidad (demasiado desecho).

- ▶ Decantar el medio de cultivo.
- ▶ Enjuagar la monocapa 1-2 veces con PBS pH 7.2 ó 7.4.
- ▶ Agregar tripsina-versene a los frascos.
- ▶ Dejar reposar 1-2 minutos y decantar.
- ▶ Agregar tripsina-versene fresca.
- ▶ Incubar el frasco a 37° C. hasta que la monocapa empiece a desprenderse normalmente.

Agregar:

- 1) PBS solamente ó
- 2) Solución salina isotónica conteniendo 5% de suero bovino fetal.
 - ▶ Pipetear vigorosamente para separar las porciones de monocapa.
 - ▶ Agregar un volumen menor y poner una gota en un portaobjetos y, con microscopio, evaluar la densidad de la suspensión. Si hay demasiadas células, diluir un poco más.
 - ▶ Transferir la suspensión a un envase limpio. Si está preparando más de 100 portaobjetos, se recomienda el uso de un agitador magnético para dispersar las células.
 - ▶ Agregar una gota a cada círculo en un portaobjetos previamente numerado, 12 gotas por cada portaobjetos
 - ▶ Secar en una cabina con el ventilador (aproximadamente una hora).
 - ▶ Cuando estén completamente secos los portaobjetos, fijar en acetona fría (4° C.) por 10-15 minutos en refrigerador.
 - ▶ Almacenar los portaobjetos a -70° C.
 - ▶ Colorear con conjugado (ver técnica de neutralización de fluorescencia para Fiebre Porcina Clásica)

Lectura:

FA positivo = verde brillante

FA negativo = rojo (si se usa contrateñido).

- ▶ Lo ideal es que el portaobjetos con antígeno contenga menos del 50% de células infectadas por campo óptico, visto con el objetivo 25X. Las células no infectadas, no tendrán fluorescencia color verde, se utilizan como fondo normal.

9.6.4 Reactivos y soluciones.

* Salina Buferada Fosfatada (PBS) 10X

- | | |
|--|----------|
| ▪ Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O | 6.65 g. |
| ▪ Na ₂ HPO ₄ | 35.0 g. |
| ▪ NaCl | 225.0 g. |
| ▪ Agua destilada csp | 3 litros |
- Ajustar pH a 7.2 – 7.5
Diluir 1:10 para su uso.

* Tripsina - Versene

- | | |
|------------------------------------|----------|
| ▪ NaCl | 8.0 gm. |
| ▪ KH ₂ PO ₄ | 0.2 gm. |
| ▪ KCl | 0.2 gm. |
| ▪ Na ₂ HPO ₄ | 1.15 gm. |
| ▪ Tripsina (1:250) | 0.5 gm. |
| ▪ Versene | 0.2 gm. |
| ▪ Agua destilada csp | 1000 ml. |
- Esterilizar por filtración
Distribuir en alícuotas
Almacenar a -20° C.

* Azul de Evans

- | | |
|------------------|---------|
| ▪ Azul de Evans | 1 gr. |
| ▪ Agua destilada | 400 ml. |

No es necesario filtrar. La solución de reserva puede almacenarse indefinidamente a temperatura ambiente. Diluya 1:10 para obtener una dilución final 1:4000.

Los sueros o fluidos ascíticos no necesitan ser inactivados mediante calor antes de usarse.

Conjugados FITC: Se consiguen conjugados preparados comercialmente para la mayoría de las especies. Es necesario una titulación para decidir la dilución final a usar en cada prueba.

9.7 Técnica de peroxidasa marcada (PLA) para detectar anticuerpos de FPC y diarrea viral bovina.

9.7.1 Materiales

- Virus de FPC y de DVB.
- Bandejas de Fondo Plano, TC 96.
- Tubos serología.
- Pipetas Eppendorff de 25 y 50 μ l.
- Pipetas Goteadoras de 50 y 25 μ l.
- Suero Positivo.
- Suero Negativo.
- Cultivos Celulares.
- Medio MEM.
- Peroxidasa Conjugada Antiespecie.
- Sustrato.

9.7.2 Procedimiento

TITULACIÓN DE VIRUS:

- ▶ Tomar la bandeja en posición vertical.
- ▶ Colocar 50 microlitros de medio en todos los orificios de la bandeja.
- ▶ Sembrar células de la línea PK15 (40.000 por 50 microlitros) suspendidas en medio MEM F15 adicionado de tricine, antibióticos y bicarbonato, en todas las celdas.
- ▶ Cubrir las bandejas con las tapas respectivas.
- ▶ Incubar durante 24 horas a 37° C. con CO₂.
- ▶ Lavar las celdas con PBS estéril por dos veces consecutivas con 100 μ l. cada vez.
- ▶ Secar con gasa.
- ▶ Hacer diluciones del virus en base 10 de 10⁻¹ a 10⁻⁸ con medio MEM en tubos de serología
- ▶ Agregar 50 μ l. de la dilución respectiva de virus a la hilera correspondiente, comenzando por la última dilución (para emplear la misma pipeta).
- ▶ Incubar durante 1 hora a 37° C. con CO₂
- ▶ Adicionar 50 microlitros de medio MEM a todos las celdas
- ▶ Incubar durante 24 horas a 37 °C. con CO₂.
- ▶ Descartar sobre el medio de cultivo de la bandeja
- ▶ Lavar brevemente cada celda con 100 μ l. de PBS (preparado especialmente para esta técnica), por dos consecutivas.
- ▶ Secar sobre gasa
- ▶ Añadir 100 μ l. de buffer de fijación a cada celda
- ▶ Mantener a temperatura de laboratorio durante 15 minutos
- ▶ Desechar el buffer de fijación
- ▶ Secar la bandeja a 37° C. durante 30 minutos o a temperatura de laboratorio durante mayor o a 80° C. en vacío durante una hora.
- ▶ Adicionar a cada celda 50 μ l. de suero positivo correspondiente, diluido en buffer de unión
- ▶ Incubar a temperatura de laboratorio durante una hora.
- ▶ Desechar el suero de la bandeja invirtiéndola sobre gasa estéril.
- ▶ Lavar cada celda tres veces por minuto cada vez con 100 μ l. de buffer lavado.
- ▶ Eliminar el buffer sobre gasa y secar los bordes de la bandeja.
- ▶ Colocar en cada celda 50 μ l. de peroxidasa conjugada, diluida en buffer de unión.
- ▶ Incubar durante 30 minutos a temperatura de laboratorio.
- ▶ Desechar sobre gasa.
- ▶ Lavar cada celda con 100 μ l. de buffer de lavado, por 3 veces, durante un minuto cada vez.
- ▶ Eliminar sobre gasa.
- ▶ Adicionar a cada celda 50 μ l. de solución de sustrato.
- ▶ Incubar de 5 a 15 minutos (hasta que aparezca la coloración) a temperatura de laboratorio.
- ▶ Lavar con 100 microlitros buffer de lavado, por dos veces consecutivas.

LECTURA:

Las células infectadas presentan citoplasma color café ó rojizo.

9.7.3 Detección de anticuerpos

- ▶ Tomar la bandeja en posición horizontal.
- ▶ Colocar 50 µl. del medio MEM a todas las celdas de la bandeja.
- ▶ Adicionar células PK15 (40.000 en 50 µl.) a todas las celdas de la bandeja.
- ▶ Incubar durante 24 horas a 37° C., con CO₂.
- ▶ Eliminar el medio.
- ▶ Lavar con 100 µl. de PBS estéril por dos veces consecutivas.
- ▶ Secar con gasa.
- ▶ Infeccionar las bandejas con 50 µl del virus respectivo (100DL₅₀ cc), conservando celdas sin infectar que posteriormente servirán como control de los sueros problema y de las células.
- ▶ Se emplearán cinco celdas por suero, tres para la prueba propiamente dicha y dos como control del suero respectivo.
- ▶ Incubar durante una hora a 37° C. con CO₂.
- ▶ Añadir 50 µl del medio MEM.
- ▶ Incubar durante 24 horas a 37° C. con CO₂.
- ▶ Eliminar el medio de cultivo.
- ▶ Lavar brevemente cada celda con 100 µl de PBS, por dos veces consecutivas.
- ▶ Adicionar a cada celda 100 microlitros de buffer de fijación.
- ▶ Mantener a temperatura de laboratorio durante 15 minutos.
- ▶ Descartar sobre gasa.
- ▶ Secar la bandeja a 37° C., durante 30 minutos
- ▶ Agregar 50 µl. de cada suero problema en dilución 1:10 empleando 3 celdas infectadas.
- ▶ A las dos celdas sin infectar, se les colocarán 50 µl. del suero diluido 1:10 correspondiente (se toma como control de suero respectivo, no llevan virus)
- ▶ Incubar a temperatura de laboratorio durante una hora.
- ▶ Eliminar sobre gasa.
- ▶ Lavar cada celda tres veces por minuto cada vez con 100 µl. de buffer de lavado.
- ▶ Eliminar sobre gasa.
- ▶ Agregar a cada celda 50 µl. de peroxidasa conjugada diluida en buffer de unión.
- ▶ Incubar durante 30 minutos a temperatura de laboratorio.
- ▶ Descartar sobre gasa.
- ▶ Lavar cada celda con 100 µl. de buffer de lavado por tres veces durante un minuto cada vez.
- ▶ Descartar sobre gasa.
- ▶ Adicionar a cada celda 50 µl. de solución de sustrato.
- ▶ Incubar de 5 a 15 minutos a temperatura de laboratorio.
- ▶ Lavar con 100 µl. de buffer de lavado por dos veces consecutivas.
- ▶ Leer.

CONTROLES:

Suero problema: Se ejecutan todos los pasos anteriores descritos para detectar anticuerpos, excepto que en lugar de antígeno se colocan 50 µl. de medio MEM.

Antígeno: Se ejecutan todos los pasos anteriormente descritos excepto que en lugar de suero se coloca 50 µl. de buffer de unión.

CONTROLES:

Células: Se ejecutan todos los pasos anteriores excepto que en lugar de antígeno se colocan 50 µl. de medio MEM y en lugar de suero se colocan 50 µl. de buffer de unión.

Suero Positivo y Negativo: Corresponden a un suero inmune contra el virus en cuestión y a un suero libre de anticuerpos se ejecutan los mismos pasos descritos para los sueros problema.

Dosis Infectantes de Virus: Es necesario realizar simultáneamente con la prueba, una titulación del virus empleando diluciones seriada en base 10, con el fin de determinar si realmente se emplearon las 100 DL₅₀CC. Se usa para este fin suero inmune contra el virus en cuestión de dilución óptima.

LECTURA:

Las células infectadas presentan citoplasma color café o rojizo. Las células de los controles de suero y células, deben ser incoloras.

9.7.4 Reactivos y soluciones.

❶ Salina Bufferada Fosfatada (PBS) 0.01 M, pH 7.6

- Na₂HPO₄ 2.0 gr.
- NaH₂PO₄ 0.18 gr.
- NaCl 8.5 gr.
- Agua desionizada, bidestilada 1 L.
- Ajustar el pH a 7.6

❷ Buffer de unión PBS

- NaCl 29.5 gr.
- Tween 20 100 µl.
- PBS 1 L.

❸ Buffer acetato 0.05 M, pH 5.0

SOLUCIÓN A

- Ácido acético 1.156 ml.
- Agua desionizada bidestilada 200 ml.

SOLUCIÓN DE TRABAJO

- Solución A 148 ml.
- Solución B 352 ml.
- Ajustar el pH a 5.0

❹ Buffer de fijación

- Albúmina bovina 0.2 gr.
- PBS 1 L.
- Solución de trabajo
- Acetona 4 ml.
- Buffer de fijación 7 ml.
- Prepare inmediatamente antes de su suero.

❺ Buffer de lavado

- Tween 20 500 µl.
- PBS 1 L.

SOLUCIÓN B

- Acetato de sodio 6.8 gr.
- Agua desionizada bidestilada 500 ml.

❻ Sustrato 1

SOLUCIÓN A

- 3 amino etilcarbazole (AEC) 2.5 mg.
- N,N Dimetil formamide 0.5 ml.
- Prepare esta solución inmediatamente antes de su uso.

PELIGRO: Emplear guantes y tapabocas, evitar el contacto con la piel, los vapores son tóxicos.

SOLUCIÓN B

- Peroxido de hidrógeno al 30 % 100 µl.
- Buffer acetato 900 µl.

SOLUCIÓN C

- Solución de peroxido de hidrógeno al 3% 40 µl
- Buffer acetato agite suavemente 10 µl
- Solución A (adicione lentamente) 500 µl
- presenta color ámbar

❶ SUSTRATO 2

- Buffer trís 0.1 M 15 ml.
- H₂O₂ 30% 12 µl.
- 3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride 10 mg. (1 tableta)

prepárese en la oscuridad, inmediatamente antes de su uso.

NOTAS: Los detritos celulares pueden producir coloración inespecífica al atrapar el colorante; una prueba ideal tiene el 100% de células infectadas y los controles negativos libres de coloración.

EL tiempo de incubación puede ser aumentado o reducido empleando mas lavados durante mas tiempo. Use peróxido de hidrógeno fresco (conservarlo en el refrigerador) y agua de optima calidad. Y por último máxima calidad del antisuero es importante.

Los mejores trabajos se realizan sobre células infectadas de 24 horas. Después de 48 horas de infección la intensidad de la coloración decrece rápidamente. Siempre pruebe un control negativo para asegurar que no hay coloración inespecífica. Si un control de suero presenta coloración inespecífica, repita la prueba con varias diluciones adicionales (1:8, 1:16).

A menudo se emplea virus citopático diluido para que alrededor del 50% de las células estén infectadas después de 24 horas.

9.8 Técnica de neutralización de la peroxidasa (NAPL) para detectar anticuerpos contra FPC y diarrea viral bovina

9.8.1 Materiales

- Bandejas de Fondo Plano TC 96.
- Tubos Serología.
- Suero Positivo.
- Suero Negativo.
- Pipetas Eppendorff de 25 a 50 µl.
- Cultivos Celulares.
- Medio MEM.
- Peroxidasa Conjugada.
- Sustrato.

9.8.2 Procedimiento

TITULACIÓN DEL VIRUS

- Tomar la bandeja en posición vertical
- Colocar 50 microlitros de medio de crecimiento a todas las celdas de la bandeja.
- Hacer diluciones seriadas en base 10 del virus, empleando volúmenes de 1.8 y 0.2 ml. de virus.
- Agregar 50 microlitros comenzando por la ultima dilución para emplear la misma pipeta
- Incubar a 37° C. durante una hora en CO₂
- Agregar 50 microlitros de suspensión de células PK15 (2 X 106 ml.) a cada celda.
- Incubar a 37° C. durante cuatro días en CO₂.

MICROSERONEUTRALIZACION.

- Tomar la bandeja en posición horizontal
- Inactivar los sueros a 56° C. durante 30 minutos
- Añadir a todas las celdas 40 µl. de medio de crecimiento
- Agregar 10 µl. del suero respectivo a cinco celdas. Se destinaran tres celdas para la prueba propiamente dichas y dos como controles del suero respectivo.
- Agitar suavemente la bandeja.
- Agregar 50 µl. de dilución de virus que contenga 100 DI 50 CC.
- Mezclar suavemente.
- Incubar a 37° C. durante una hora en CO₂.
- Preparar la suspensión de células con el recuento requerido.
- Agregar 50 µl. de células a cada celda en una concentración de 200.000 células por ml.
- Incubar a 37° C. durante cuatro días en CO₂.

CONTROLES:

- Suero problema: Se ejecutan todos los pasos anteriores descritos para detectar anticuerpos, excepto que en lugar de antígeno se colocan 50 µl. de medio MEM.
- Antígeno: Se ejecutan todos los pasos anteriormente descritos excepto que en lugar de suero, se colocan 50 µl. de medio MEM.
- Células: Se ejecutan todos los pasos anteriores excepto que en lugar antígeno y de suero se colocan 100 µl. de medio MEM.
- Suero Positivo y Negativo: Corresponden a un suero inmune conocido contra el virus y a un virus a un suero libre de anticuerpos. Se procesan en la misma forma que los sueros controles.
- Dosis Infectantes de Virus: Es necesario realizar simultáneamente con la prueba, una titulación del virus empleando diluciones seriadas en base 10, con el fin de determinar si realmente se emplearon 100 DL 50 CC.

9.8.3 Técnica de Peroxidasa

- Desechar el medio de crecimiento.
- Lavar con cloruro de sodio 0.15 M.
- Secar las bandejas sobre gasa.
- Fijar las células durante una hora en horno de 70 a 80° C.
- Adicionar a cada celda 50 µl. de suero hiperinmune diluido en cloruro de sodio 0.5 M que contenga Tween al 1% y Azida sódica al 0.1%.
- Incubar a 37° C. durante 15 minutos.
- Lavar cinco veces con cloruro de sodio 0.15 M que contengan Tween 80 al 1%, pH 7.6.
- Incubar a 37° C durante 10 minutos.
- Lavar cinco veces con cloruro de sodio 0.15 M que contenga Tween 80 al 1% , pH 7.6.
- Secar las bandejas sobre gasas.
- Agregar 50 ml. de sustrato a cada celda.
- Dejar colorear de 15 a 30 minutos a temperatura de laboratorio.
- Lavar dos veces con Cloruro de Sodio 0.15 M que contenga Tween 80 al 1% , pH 7.6.
- Leer visualmente o al microscopio invertido.

LECTURA:

El citoplasma de las células infectadas es parcial o completamente coloreado de color café rojizo. Las células de los controles de suero y de células deben aparecer incoloras.

INTERPRETACIÓN:

El título del suero se expresa como el recíproco de la dilución mas alta que previene la infección del 50% de las replicas de células.

El punto final del suero y el título del virus son calculados por el método de Reed y Muench.

9.8.4 Reactivos y Soluciones

① Cloruro de Sodio 0.15 M

- NaCl 4.383 gr.
- Agua destilada 500 ml.
- Ajustar el pH a 7.6 con Tris 1

② Cloruro de Sodio 0.15 M , Tween 80

- NaCl 17.532 gr.
- Tween 80 20 ml.
- Agua destilada 2000 ml.
- Ajustar el pH a 7.6. con Tris 1 M

④ Cloruro de sodio 0.5 M, Tween 80

- NaCl 8.766 gr.
 - Tween 80 3 ml.
 - Agua destilada 300 ml.
- Ajustar el pH a 7.6 con Tris 1 M.

④ Cloruro de sodio 0.5 M, Tween 80, Azida Sódica

- NaCl 8.766 gr.
 - Tween 80 3 ml.
 - Azida Sódica 0.3 gr.
 - Agua destilada 300 ml.
- Ajustar el pH a 7.6 con Tris 1 M.

④ Sustrato

- Buffer Tris 0.1 M 15 ml.
- Agua oxigenada 30% 12 ml.
- Diaminobenzidina 1 pastilla.
- Dejar incubar de 10 a 15 minutos a temperatura de laboratorio.

9.8.5 Preparación de suero hiperinmune FPC

- Inocular 15 ml. de vacuna de Fiebre Porcina Clásica vía subcutánea a cerdos adultos sanos que no hayan tenido exposición previa al agente.
- Reinocular al animal 21 días mas tarde con 2.0 ml. de cepa virulenta de Fiebre Porcina Clásica, vía intramuscular.
- Hiperinmunizar 60 días después con sangre desfibrinada que contenga virus así: 5 ml. por libra de peso vivo, vía intravenosa.
- La sangre infectada, usualmente se obtiene de cerdos donantes enfermos cinco a siete días después de ser infectados con una cepa virulenta del cólera. La punción intravenosa puede hacerse con presión positiva con una bomba de vacío. Cerdos grandes (mas de 300 libras) son preferidos por producir grandes volúmenes de sangre y porque las venas de la oreja pueden ser cogidas mas fácilmente. Usar un corral apropiado para ajustar el animal.
- Sangrar al animal 14 días luego de la hiperinmunización.
- Separar estérilmente el suero y congelar.

9.9 Técnica de inhibición de la hemoaglutinación para detección de anticuerpos de encefalomiocarditis porcina (EMC)

9.9.1 Materiales.

- Virus de EMC.
- Sueros Positivos.
- Sueros Negativos.
- Baños María.
- Pipetas Eppendorf de 25, 50 µl.
- Glóbulos rojos de cobayo.
- Microdiluidores de 25 y 50 µl.
- Bandejas plásticas de fondo en U, de 96 celdas.

9.9.2 Procedimiento.

TITULACIÓN INICIAL DEL ANTÍGENO (HA):

- Tomar la bandeja en posición horizontal.
- Colocar 50 µl. de buffer borato cloruro de potasio en 3 hileras de una bandeja de microtécnica.
- Adicionar 50 µl. de antígeno a la primera celda de cada hilera.
- Hacer diluciones seriadas del antígeno microdiluidores de 50 µl. comenzando por la primera celda de cada hilera.
- Añadir 50 µl. de glóbulos rojos de cobayo al 0.6% a cada uno de las celdas de las tres hileras.
- Incubar a temperatura de laboratorio durante hora y media aproximadamente.

LECTURA :

La máxima dilución de antígeno que presente homoglutinación se considera como una unidad homoglutinante. En la prueba se emplean de 8 a 16 unidades.

CONTROL DE GLÓBULOS ROJOS:

- En tres celdas de la bandeja colocar 50 µl. de buffer KCl borato.
- Adicionar a cada celda 50 µl. de glóbulos rojos de cobayo al 0.6%
- Mantener a temperatura de laboratorio durante hora y media aproximadamente

LECTURA:

Debe haber formación clara de botón.

❶ Tratamiento del suero con Kaolín:

- Inactivar el suero a 56° C. por 30 minutos.
- Medir 100 µl. de suero inactivado en un tubo pequeño.
- Adicionar 300 µl. de Kaolín lavado con ácido al 25%.
- Mantener a temperatura de laboratorio por 20 minutos, agitando una o dos veces.
- Centrifugar a 200 rpm. por 20 minutos. (este proceso remueve en el suero los inhibidores no específicos de hemoaglutinación)
- Transferir el sobrenadante a un tubo de serología limpio.
- Adicionar 25 µl. de glóbulos rojos lavados de cobayo.
- Mezclar suavemente (permitir la absorción de aglutininas naturales) temperatura de laboratorio durante una hora a toda noche a 4° C.
- Centrifugar a 2000 rpm durante 10 minutos.
- Transferir el sobrenadante a un tubo de serología limpio (el sobrenadante corresponde a la dilución 1:4 del suero original).

❷ Técnica de inhibición de la hemoaglutinación (IH)

- Tomar la bandeja en posición vertical.
- Colocar 25 µl. de buffer KCl borato, en todas las celdas de una bandeja de microtécnica.
- Adicionar 25 µl. del suero tratado a la primera y última celda de una hilera.
- Hacer diluciones seriadas empleando microdiluidores de 25 µl. comenzando por la última celda. No tocar la última celda.
- Agregar a todas las celdas 5 µl. de la dilución de antígeno que corresponde a las ocho unidades.
- Mantener las bandejas a temperatura de laboratorio durante una hora o toda la noche a 4° C.
- Incubar durante una hora a temperatura de laboratorio.

❸ Control del suero:

- Colocar 25 µl. de buffer KCl borato en una celda.
- Agregar 25 µl. de suero tratado.
- Adicionar 25 µl. de buffer KCl borato (reemplaza el antígeno).
- Incubar una hora a temperatura de laboratorio.
- Adicionar 50 microlitos de glóbulos rojos de cobayo al 0.6%.
- Incubar durante una hora a temperatura de laboratorio.

❶ Titulación final de antígeno:

- Medir 50 µl. de buffer KCl borato en 3 hileras de una bandeja de microtécnica.
- Adicionar a la primera celda de cada hilera 50 µl. de la dilución de antígeno que corresponde a ocho unidades hemoaglutinantes.
- Hacer diluciones seriadas empleando microdiluidores de 50 µl.
- Incubar durante una hora a temperatura de laboratorio.
- Adicionar 50 µl. de glóbulos rojos de cobayo al 0.6% a todas las celdas.
- Incubar durante una hora a temperatura de laboratorio.

LECTURA:

1. *Titulación de antígeno:* Debe haber hemoaglutinación hasta la dilución que corresponde a las 8 unidades hemoaglutinantes
2. *Título del suero:* El punto final inhibidor de la hemoaglutinación del suero es tomado como la próxima dilución que muestre formación de botón.
El control de suero debe presentar formación de botón.

9.9.3 Reactivos y Soluciones.

❶ Buffer KCl borato (0.05 M H_3BO_3 en 0.12 M KCl, pH 8.0)

- H_3BO_3 3.915 gr.
- KCl 8.9 gr.
- Agua destilada estéril 1 litro
- Ajustar el pH 8.0 con NaOH 0.1 N

❷ Borato Salina pH 9

❸ Solución A:

- NaCl 87.68 gr.
- Agua destilada estéril 1 litro

❹ Solución B:

- H_3BO_3 30.9 gm.
- Agua destilada estéril 1 litro

❺ Solución de Trabajo

- Solución A 80 ml.
- Solución B 100 ml.
- Agua destilada 1 litro
- Ajustar el pH a 9.0 con NaOH, 0.1 N.

❻ Kaolín

- Kaolín lavado en ácido 25 gr.
- Borato salina 100 ml.
- Ajustar el pH a 9.0

❼ Alsever

- Dextrosa 20.5 gm.
- Citrato de sodio 8.0 gm.
- Ácido cítrico 0.55 gm.
- NaCl 4.2 gm.
- Agua destilada 1000 ml.

Esterilizar en autoclave 10 libras por 10 minutos.

➤ Preparación de los glóbulos rojos de cobayo:

- Lavar los glóbulos rojos tres veces, empleando buffer borato cloruro de potasio, pH 8, como diluyente.
- Centrifugar a 1500 rpm. durante 10 minutos cada vez.
- Conservar a 4° C.
- Diluir al 0.6% para emplearlos en la prueba.

9.10 Técnica de inhibición de la hemoaglutinación para detección de anticuerpos de la encefalomielitís hemoaglutinante (EH)

9.10.1 Materiales.

- Virus de la EH.
- Suero Positivo.
- Suero Negativo.
- Células: Cultivo primario de riñón porcino.
- Medio de cultivo: MEM F15.
- Tubos de Serología.
- Baño de María.
- Bandejas Plásticas de 96 celdas con fondo en U.
- Pipetas Eppendorf de 25 a 100 μ l.
- Microdiluidores de 25 a 50 μ l.
- Eritrocitos de pollo.

9.10.2 Procedimiento.

PREPARACIÓN DEL ANTÍGENO:

- Descartar el medio de crecimiento.
- Lavar las células tres veces con medio MEM F15 eliminando el fluido después de cada lavado.
- Pretratar las células con líquido alantoideo (embriones de diez días de edad) al 5% en MEM F15.
- Inocular cada botella con 5 mil de una dilución 1:10 de stock de virus de EH..
- Incubar las botellas a 37° C. por tres días.
- Examinar el cultivo para detectar actividad hemoaglutinante.
- Congelar las botellas a -70° C., cuando el título sea mayor de 1:80.
- Si no hay actividad hemoaglutinante después de cinco a seis días los contenidos de las botellas, deberán ser congelados a -70° C.
- Centrifugar y sembrar cultivos primarios de riñón porcino.
- Incubar a 37° C. por 3 días y congelar.
- Descongelar a temperatura de laboratorio
- Mezclar los fluidos y centrifugar a 2500 rpm. por 15 minutos.
- Envasar alícuotas de la suspensión de virus en frascos estériles. Usualmente 0.6 ml. es suficiente para usos rutinarios.

TITULACIÓN INICIAL VIRUS:

- Tomar las bandejas en posición horizontal.
- Hacer diluciones de 1:2 a 1:4096.
- Colocar 50 μ l. de salina buffer fosfato, en tres hileras de la bandeja.
- Adicionar 50 μ l. de virus a la primera celda de cada hilera.
- Con microdiluidores de 50 μ l. hacer diluciones seriadas a lo largo de las 3 hileras.
- Agregar 50 μ l. de glóbulos rojos de pollo al 0.5% a cada celda.
- Agitar suavemente la bandeja.
- Incubar a temperatura de laboratorio durante 30 minutos.

LECTURA:

La mas alta dilución de virus que presente completa hemoaglutinación indica el punto final de la prueba. Esta representa el numero de unidades hemoaglutinantes por 50 μ l.: por ejemplo, si el punto final fue 1:256, hay 256 UHA en 50 μ l. Para calcular la dilución necesaria para obtener 4 unidades HA, divide el punto final de hemoaglutinación por 4. Ej. 256/4 igual 64, entonces la dilución 1:64 de stock de virus da una concentración de 4 unidades por 50 μ l.. entonces 1:64/2 igual 1:32, lo que representa la dilución final de 4 unidades por 25 μ l. por

inóculo. En la práctica se puede determinar la dilución de virus usar en la prueba dividiendo el título hemoaglutinante por 8.

TRATAMIENTO DE LOS SUEROS:

- Medir 100 µl. en tubos de serología y agregar 900 µl. de PBS.
- Inactivar a 56° C. por 30 minutos.
- Agregar 100 µl. de glóbulos rojos lavados y centrifugados de pollo adulto.
- Agitar suavemente.
- Incubar a temperatura de laboratorio por 30 minutos con agitación ocasional.
- Centrifugar a 1500 rpm. por 10 minutos a 4° C.
- Pasar los sobrenadantes a tubos limpios.
- Conservar a 4° C. , si la prueba se hace el mismo día, ó a -20° C. si no se realiza inmediatamente.

9.10.3 Técnica de inhibición de la hemoaglutinación

- Tomar la bandeja en posición vertical.
- Colocar 25 µl. de PBS 0.01 M pH 7.2 en todas las celdas de una bandeja.
- Agregar 25 µl. del suero respectivo a la primera celda correspondiente a cada hilera.
- Hacer diluciones seriadas (con microdiluidores de 25 microlitros) de 1:10 a 1: 640.
- Adicionar 25 µl. de virus que contenga de cuatro a ocho unidades a cada celda, exceptuando los controles de suero respectivos.
- Agregar 25 µl. de PBS al control de cada suero.
- Agitar suavemente.
- Incubar a temperatura de laboratorio durante 1 hora.
- Adicionar 50 µl. de glóbulos rojos de pollo al 0.05% a cada celda.
- Agitar suavemente.
- Incubar a temperatura de laboratorio durante 30 minutos.

CONTROLES : (ver técnica de inhibición de la Hemoaglutinación para EMC)

- Suero positivo y negativo: Estos controles conocidos son tratados y probados empleando las mismas diluciones de los sueros problema.
- Titulación final del virus: El virus es titulado para verificar que se emplearon de 4 a 8 unidades hemoaglutinantes en la prueba.
- Diluyente: Es empleado para determinar su efecto sobre el sistema indicador (glóbulos rojos).
- Suero: Se emplea en cada una de las muestras para detectar propiedades aglutinantes no específicas.
- Interpretación: Un aumento de ocho diluciones en el título de anticuerpos entre la fase aguda y la fase convaleciente de la muestra indica infección reciente.

9.10.4 Reactivos y Soluciones

PREPARACIÓN DE ERITROCITOS DE POLLO:

- Lavar glóbulos rojos de pollo 3 veces con salina buferada fosfatada (PBS) 0.01 M, pH 7.2.
- Centrifugar los glóbulos rojos a 1500 rpm. por 10 minutos por tres veces.
- Conservar a 5° C.

En la prueba los glóbulos rojos se utilizan al 0.5% en PB.

Salina Buferada Fosfatada (PBS) 0.01M

- | | |
|------------------------------------|-----------|
| ▪ NaCl | 8.5 gr. |
| ▪ Na ₂ HPO ₄ | 1.14 gr. |
| ▪ NaH ₂ PO ₄ | 0.254 gr. |
| ▪ Agua destilada | 1000 ml. |
| ▪ Ajustar el pH a 7.2. | |

9.11 Técnica de microneutralización para detección de anticuerpos de la gastroenteritis transmisible (GET)

9.11.1 Materiales.

- | | |
|---|--|
| ▪ Células: línea testículo (ST): | ▪ Baño María |
| ▪ Medio cultivo: Medio MEM F15, tricine antibióticos. | ▪ Bandejas plásticas para cultivo celular de fondo plano de 96 |
| ▪ Micostatín, suero fetal bovino | ▪ Celdas |
| ▪ Virus: GET | ▪ Cubiertas adhesivas |
| ▪ Suero positivo | ▪ Pipetas de 50 y 25 µl. |
| ▪ Suero negativo | ▪ Formol, cristal violeta. |
| ▪ Tubos serología | |

9.11.2 Procedimiento

TITULACIÓN DE VIRUS:

- Con la bandeja de posición vertical, colocar en cada celda 50 µl. de medio adicionado de tricine y bicarbonato
- Hacer diluciones seriadas en base 10, (medir 1.8 ml. de medio en ocho tubos; adicionar 0.2 ml. de la suspensión de virus al primer tubo, pasar 0.2 ml. al siguiente tubo y así sucesivamente; cambiando de pipeta cada vez).
- Pasar 50 µl. de cada dilución a la hilera correspondiente de l bandeja (se puede comenzar por la última dilución para emplear la misma pipeta).
- Dejar las cuatro ultimas hileras como control de células.
- Adicionar 50 µl. de medio a cada una de las hileras.
- Incubar a 37° C. por una hora.
- Agregar 50 µl. de la suspensión de células ST a cada celda (40.000 células).
- Sellar la placa.
- Incubar a 37° C. por 72 horas.
- Leer al microscopio.
- Colorear durante 50 minutos con cristal violeta al 1% en formol al 10%.
- Lavar con agua corriente.
- Leer.

MICROSERONEUTRALIZACION:

- Inactivar los sueros a 56° C. por 30 minutos
- Colocar la bandeja en posición vertical, agregar 25 µl. de medio MEM a 8 celdas (cinco celdas son para la prueba propiamente dicha y tres para control de suero).
- Agregar 25 µl. de suero a todos los celdas
- Añadir 50 µl. de dilución de virus que contenga 100 DI50 a las cinco primeras celdas

- Agregar 50 µl. de medio sin suero a las tres celdas restantes
- Incubar la mezcla a 37° C., durante una hora.
- Durante esta hora, desprender las células con la mezcla tripsina-verseno.
- Hacer recuento de células
- Agregar 50 µl. de la suspensión de células (40.000 por 50 microlitros) en medio de cultivo, a todas las celdas.
- Cubrir con cinta adhesiva
- Incubar a 37° C. por 72 horas
- Colorear durante 50 minutos con cristal violeta al 1% en formol al 10%
- Lavar con agua suficiente.

CONTROLES DE LA PRUEBA:

Con el fin de determinar si realmente se emplearon 100 DI₅₀ cc, es necesario realizar simultáneamente con cada microneutralización una titulación de virus. Se procede en la misma forma descrita para la titulación de virus, empleando diluciones seriadas en base 10.

- Suero Problema: Se ejecutan todos los pasos anteriormente descritos para detectar anticuerpos, excepto que en lugar de antígeno se colocan 50 µl. de Medio Mínimo Esencial (MEM.)
- Células: se ejecutan todos los pasos anteriores excepto que en lugar de antígeno y de suero se colocan 100 µl. de Medio Mínimo Esencial (MEM)
- Suero Positivo y Negativo: Corresponde a un suero inmune conocido contra el virus y un suero libre de anticuerpos. Se procesan en la misma forma que los sueros controles.

LECTURA:

- Suero Positivo: neutralizan la acción del virus, por consiguiente no hay efecto sicopático, al igual que el suero positivo de referencia.
- Suero Negativo: No neutralizan la acción del virus, hay efecto citopático.
- Control toxicidad sueros; Por lo menos dos de las tres celdas no deben presentar efecto citopático.
- Control dosis virus: El título del virus debe corresponder a 100 DT₅₀ CC.
- Control células: no debe haber efecto citopático.

9.12 Técnica de inhibición de la hemoaglutinación para detección de anticuerpos de influenza.

9.12.1 Materiales:

- | | |
|--|------------------------------------|
| ▪ Virus de influenza. | ▪ Microdiluidores de 25 y 50 µl. |
| ▪ Suero positivo de referencia. | ▪ Jeringa y agujas #25, 5/8" |
| ▪ Suero negativo. | ▪ Estufa de 37° C. |
| ▪ Huevos embrionados de 10 días. | ▪ Pipetas Eppendorf de 25 y 50 µl. |
| ▪ Ovoscopio. | ▪ Pinzas y tijeras. |
| ▪ Bandejas de fondo de U, de 96 celdas | ▪ Glóbulos rojos de pollo. |
| ▪ Medio de cultivo MEM. | |

9.12.2 Procedimiento:

PREPARACIÓN DEL ANTÍGENO:

- Fijar la posición del embrión dentro del huevo.
- Demarcar la cámara de aire.
- Marcar un punto cercano al embrión.

- Desinfectar con alcohol.
- Abrir un orificio con un perforador (punzón) en el punto escogido, y otro sobre la cámara de aire.
- Inocular 0.1 ml. de virus diluido 1:10, con una jeringa y aguja de 25 5/8 de pulgada.
- Sellar el huevo con cinta o liquido pegante.
- Repetir el procedimiento anterior con el resto de huevo, dejando tres como control.
- Incubar a 37° C. en cámara húmeda.
- Revisar los embriones a las 24 horas post-inoculación.
- Descartar los muertos.
- A los 3 días post-inoculación colocar los embriones a 4° C. durante cuatro horas o de un día para otro a 4° C.
- Cortar el saco de aire y remover las membranas (con tijeras estériles).
- Coleccionar el liquido alantoideo.
- Centrifugar a 3.000 rpm. a 4° C. durante 10 minutos.
- Fraccionar en alícuotas.
- Conservar a -70° C.

TITULACIÓN DE ANTIGENO:

- Tomar la bandeja en posición horizontal
- Colocar 50 µl. de PBS en cada celda de la bandeja
- Adicionar 50 µl. de stock de virus a la primera celda de cada hilera.
- Hacer diluciones seriadas empleando microdiluidores de 50 µl.
- Adicionar 50 µl. de glóbulos rojos de pollo al 0.5% a todas las celdas
- Agitar suavemente la bandeja
- Incubar durante 30 minutos a temperatura de laboratorio.

NOTA: La elusión ocurre después de 30 minutos

LECTURA:

❶ Tratamiento de los sueros con PBS.

- Medir 100 µl. de suero en tubos de serología.
- Adicionar 800 µl. de PBS
- Inactivar los sueros diluidos a 56° C. por 30 minutos
- Adicionar 200 µl. de glóbulos rojos lavados y diluidos al 50%
- Agitar suavemente
- Incubar durante 30 minutos a temperatura de laboratorio
- Centrifugar a 1.500 rpm. durante 10 minutos a 4° C.
- Pasar el sobrenadante a tubos estériles
- Mantener a 4° C. si la prueba se realiza el mismo día o en caso contrario colocar a -20° C.

❷ Técnica de inhibición de la hemoaglutinación:

- Tomar la bandeja en posición vertical.
- Colocar 25 µl. de PBS, pH 7.2, en todas las celdas de la bandeja menos a la primera celda de cada hilera.
- Agregar 50 µl. de suero tratado respectivo a la primera celda de cada hilera y 25 µl. a la última celda. (corresponde al control 1:20 del suero correspondiente).

- Emplear microdiluidores de 25 µl., hacer diluciones separadas de la primera a la penúltima celda (1:10 a 1:640).
- Adicionar 25 µl. de virus diluido conteniendo de cuatro a ocho unidades HA a toda la bandeja. Excepcionando el control de los sueros (ultima celda de cada hilera).
- Adicionar 25 µl. de PBS al control de cada suero.
- Agitar nuevamente.
- Incubar a temperatura de laboratorio durante una hora.
- Adicionar 50 µl. de glóbulos rojos al 0.5% a toda la bandeja.
- Agitar nuevamente.
- Incubar a temperatura de laboratorio durante 30 minutos.

LECTURA:

La máxima dilución de suero que presenta HI, corresponde al título del suero.

TITULACIÓN FINAL DE ANTÍGENO:

- Colocar 50 µl. de PBS a 3 hileras de una bandeja
- Adicionar 50 µl. de dilución de virus que contenga de cuatro a ocho unidades HA, a la primera celda de cada hilera.
- Hacer diluciones seriadas empleando microdiluidores de 50 µl.
- Incubar una hora a temperatura laboratorio.
- Adicionar 50 µl. de glóbulos rojos al 0.5% a todas las celdas.
- Agitar suavemente.
- Incubar a temperatura de laboratorio durante 30 minutos.

CONTROLES DE LA PRUEBA:

- Suero positivo específico.
- Suero negativo.
- Titulación final del antígeno.
- Controles de cada suero incluyendo los sueros positivo y negativo conocidos.
- Control de glóbulos rojos.

9.12.3 Interpretación:

Un aumento de ocho diluciones un título HI entre las muestras tomadas en periodo agudo y convaleciente, es evidencia significativa de una infección reciente. Para confirmar que títulos bajos de anticuerpos son específicos, se recomienda tratar al suero sospechoso con una enzima destructora de receptores (RDE) y reabsorberlos nuevamente con glóbulos rojos; también se pueden tratar con tripsina, peryodato y glicerol.

Enzima Destructor de Receptores (RDE)

Los inhibidores no específicos de virus pueden ser destruidos por RDE.

TITULACIÓN DEL RDE:

- Preparar diluciones seriadas en base dos de RDE usando como diluyente solución salina boratada de calcio
- Agregar a cada dilución igual cantidad de glóbulos rojos de pollo, lavados y diluidos al 1%
- Incubar a 37° C. durante 30 minutos
- Adicionar a cada tubo 10 unidades de HA de virus
- Agitar los tubos
- Incubar a 37° C. durante 30 minutos
- Leer.

LECTURA:

- El punto final es la dilución mas alta de RDE que presenta hemoaglutinación parcial. El reciproco del punto final de la dilución es el numero de unidades de RDE contenidos en la muestra sin diluir.

➤ Tratamiento del suero con RDE

- Colocar un volumen de suero
- Adicionar volúmenes iguales de RDE (256 unidades)
- Incubar la mezcla a 37°C durante 15 horas
- Inactivar la mezcla a 56°C durante 30 minutos
- Adicionar 50 μ l de glóbulos rojos al 0.5 %
- Incubar a temperatura de laboratorio por 30 minutos

➤ Tratamiento de los sueros con tripsina, Peryodato y Glicerol

- Medir 50 μ l. de suero en tubos de serología.
- Agregar 25 μ l. de solución de tripsina y agitar.
- Calentar la mezcla a 56° C. por minutos.
- Dejar enfriar a temperatura de laboratorio.
- Agregar 150 μ l. de solución acuosa de Peryodato de Potasio 0.01 M y agitar.
- Mantener la temperatura de laboratorio durante 15 minutos.
- Agregar 150 μ l. de solución de Glicerol (el suero queda diluido 1:7.5).
- Agregar 125 μ l. de solución salina (dilución final de suero 1:10).
- Adicionar 50 μ l. de Glóbulos rojos al 50% y agitar suavemente.
- Mantener a 4° C. durante una hora.
- Centrifugar a 1800 rpm. durante 10 minutos.
- Pasar los sobrenadantes a tubos limpios.
- Mantener a 4° C. si la prueba se realiza el mismo día, o en caso contrario congelar a -20° C.

9.12.4 Reactivos y Soluciones.

❶ Salina Buferada Fosfatada (PBS), 0.1M, pH 8.2

- NaCl 8.5 gr.
- NaH₂PO₄ 1.1 gr.
- Na₂HPO₄ 5.95 gr.
- Agua destilada 1000 ml.
- Ajustar el pH a 8.2 con NaOH

❷ Peryodato de Potasio, 0.01M

- KIO₄ 1.15 gr.
- Agua Destilada 500 ml.

❸ Tripsina Difco 1:250 (8 mgr/ml)

- Tripsina 2.4 gr.
- PBS 0.1M, pH 8.2 300 ml.

Preparar esta mezcla inmediatamente antes de su uso.

❹ Solución Salina 0.15M

- NaCl 8.76 gr.
- Agua destilada 100 ml.

❺ Glicerol al 1%

- Glicerol 5 ml.
- Solución Salina 0.15M 500 ml.

❻ Salina Buferada Fosfatada (PBS) 0.01M, pH 7.2

- NaCl 8.5 gr.
- Na₂HPO₄ 1.14 gr.
- Na₂HPO₄ 0.254 gr.
- Agua destilada 1000 ml.
- Ajustar el pH a 7.2

❼ Etilendiaminotetraacetico

- Ácido Disodico (EDTA) 10 gr.
- Aguadestilada 100 ml.
- Emplear 3 gotas para 4.5 ml. de sangre

REPARACIÓN DE LOS GLÓBULOS ROJOS DE POLLO:

- Lavar los glóbulos rojos tres veces empleando PBS 0.01M (pH 7.2) como diluyente.
- Centrifugar a 1.500 rpm. durante 10 minutos cada vez.
- Conservar a 4° C.
- Diluir al 0.5% en PBS, para usarlos en la prueba.

9.13 Técnica de Inmunofluorescencia indirecta (IF) para detectar anticuerpos del síndrome de infertilidad y respiratorio suino (SIRS)

El virus del síndrome de infertilidad y respiratorio de cerdos (SIRS) se ha reconocido recientemente en los Estados Unidos como un patógeno importante debido a que causa fallos reproductivos severos en cerdas y alta mortalidad en lechones por problemas respiratorios. Un síndrome similar se ha reportado en Europa, y el agente causal es conocido como virus Lelystad.

9.13.1 Materiales

- Suero positivo de referencia.
- Suero negativo.
- Medio RPMI.
- Pipetas Eppendorf.
- Etanol.
- Anti IgG porcina conjugada con isotiocianato de fluoresceína.
- Células: Macrófagos alveolares porcinos.
- Virus: SIRS.
- Bandejas de fondo plano de 96 celdas.
- Bandejas de fondo de U de 96 celdas.

9.13.2 Procedimiento sobre laminas portaobjeto

- Diluir el suero problema 1:20 con PBS, pH 7.2
- Colocar sobre la lamina infectada 30 μ l. de suero diluido 1:4.
- Incubar 30 minutos a 37° C. en cámara húmeda.
- Lavar durante 5 minutos con PBS pH 7.2
- Secar las laminas
- Adicionar 30 μ l. de antigama porcina conjugada (solución de trabajo 1:100).
- Incubar 30 minutos a 37° C. en cámara humedad.
- Lavar durante 5 minutos en PBS, pH 8.5 (sin secar continuar con el siguiente paso).
- Colorear durante un minuto con azul de Evans.
- Lavar en agua destilada.
- Secar, montar la laminilla.
- Observar al microscopio de fluorescencia.

9.13.3 Procedimiento sobre cultivos celulares

- Hacer suspensión de células SAM a una concentración de 2×10^6 en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 0.15% de bicarbonato de sodio y antibióticos.
- Colocar las células en las celdas de un bandeja de fondo plano.
- Incubar por tres o cinco horas a 37° C. con CO₂.
- Descartar el medio sobre gasa.
- Agregar 200 μ l. de medio que contenga una cantidad optima de dilución del virus (excepto en las hileras uno y siete, que servirán como controles no infectados).
- Incubar las bandejas a 37° C. de 40 a 60 horas con CO₂.
- Decantar el medio cuando comience el efecto sicopático
- Agregar 200 ml. d + Etanol frío a cada celda.
- Las bandejas pueden conservarse a -20° C. hasta su uso.

CONTROL:

Una bandeja de cada grupo se prueba para IFI con seis sueros de referencia positivos y seis negativos. Solo pueden ser usados aquellos grupos que produzcan el mismo resultado o una diferencia no mayor de dos diluciones en base dos, en dos de 12 sueros.

PRUEBA DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES INDIRECTA (IFI):

- Decantar el etanol.
- Secar las bandejas a temperatura de laboratorio de 10 a 20 minutos.
- Lavar con salina buferada fosfatada, pH 7.2, 300 μ l. por celda.
- Diluir el suero problema en base cuatro (de 1:4 a 1:1024) en una bandeja de 96 celdas con fondo en U.
- Transferir 200 μ l. de cada dilución a la bandeja que tiene las células infectadas.
- En las celdas control colocar dilución 1:4 de cada suero.
- Incubar la bandeja por 45 minutos a 37° C.
- Lavar cuatro veces con 300 μ l. de PBS por celda.
- Conservar el PBS por uno a dos minutos y luego descartar.
- Incubar a 37° C. por 45 minutos con 50 μ l. de una solución óptima (1:200, 1:400 en PBS), de conjugado anti IgG porcina producido en conejo.
- Lavar con PBS como en el paso anterior.
- Examinar al microscopio de fluorescencia usando objetivo 5x.



Técnica de inmunofluorescencia indirecta. Células MS infectadas con el virus de la Peste porcina africana. Se puede observar como los anticuerpos se han unido a las células infectadas, destacándose en el citoplasma unas zonas con una intensidad mayor, que corresponden a zonas de mayor replicación viral, y por tanto mayor fijación de anticuerpos.

Tomada de : www.sanidadanimal.info/inmuno/quinto1

LECTURA:

- Título IFI, corresponde a la más alta dilución de suero que presente fluorescencia citoplasmática específica.
- Suero negativo de referencia: Título IFI menor de 1:4.
- Suero positivo de referencia: título 1:64.

Reactivos y Soluciones

- ① Solución Buferada Fosfatada (PBS) 0.01M, pH 7.2
 - NaCl 8.5 gr.
 - Na_2HPO_4 1.14 gr.
 - NaH_2PO_4 0.254 gr.
 - Agua destilada 1000 ml.
 - Ajustar el pH a 7.2

9.14 Técnica de inhibición de la hemoaglutinación para la detección de anticuerpos de parvovirus porcino (PVP).

9.14.1 Materiales.

- Virus de PVP.
- Suero Positivo de referencia.
- Suero negativo.
- Bandejas plásticas de fondo en U, de 96 celdas.
- Microdiluidores de 25 y 50 μ l.
- Baño María.
- Pipetas Eppendorf de 10, 25, 50, 100, μ l.
- Glóbulos rojos de cobayo

PREPARACIÓN DEL ANTIGENO

- Inocular células PK15 de \pm 5 horas de crecimiento.
- Incubar a 37° C. por 96 horas.
- Congelar y descongelar dos veces a -70° C.
- Centrifugar a 4.000 rpm. por 20 minutos
- Fraccionar en alícuotas de 0.5 ml.
- Conservar a -70° C.

PREPARACIÓN DEL SUERO POSITIVO:

- Inocular 2 ml. de dilución de virus (10^4), a un cerdo de dos meses de edad, libre de anticuerpos, vía intramuscular.
- Repetir por 4 veces este proceso con una semana de diferentes.
- Sangrar.

Suero negativo: obtenido de cerdos libres de PVP

9.14.2 Procedimiento

Tratamiento de los sueros con Kaolín

- Inactivar los sueros a 56° C. por 30 minutos.
- En cada tubo colocar 62.5 μ l. de los sueros problema y de los controles.
- Adicionar 250 μ l. de Kaolín al 25 % en solución Veronal (dilución 1:5).
- Agitar.
- Mantener a 4° C. durante 40 minutos con agitación cada cinco minutos.
- Centrifugar a 2.000 rpm. durante 10 minutos.
- Trasvasar los sobrenadantes a nuevos tubos.
- Añadir 150 μ l. de glóbulos rojos de cobayo al 1 % en solución salina (dilución final del suero 1:10).
- Agitar.
- Dejar en adsorción de 14 a 18 horas a 4° C.
- Centrifugar 10 minutos a 2000 rpm.
- Trasvasar los sobrenadantes a tubos limpios.
- Conservar a 4° C. En caso de no realizar la prueba el mismo día se pueden mantener a -20° C.

TRATAMIENTO DE LOS SUEROS CON ACETONA:

- Inactivar los sueros a 56° C. por 30 minutos.
- Medir 50 µl. de suero inactivado.
- Adicionar 450 µl. de cloruro de sodio 1.5 M.
- Agregar 6.0 ml. de acetona fría. (12 veces el volumen de suero diluido) en baño de hielo.
- Mantener durante 5 minutos con agitación intermitente.
- Centrifugar a 2000 rpm. a 4° C. por 10 minutos.
- Botar los sobrenadantes.
- Añadir nuevamente 6.0 ml. de acetona fría en baño de hielo.
- Agitar vigorosamente.
- Conservar durante 20 minutos agitando cada cinco minutos.
- Botar el sobrenadante.
- Colocar los tubos en vacío para secar los sedimentos a temperatura del laboratorio, durante una hora.
- Resuspender el sedimento en 450 µl. de solución salina boratada pH 9.0.
- Mantener a temperatura de laboratorio durante dos horas con agitación ocasional o de un día para otro, en el refrigerador a 4° C.
- Agregar un volumen igual de glóbulos rojos de cobayo al 1% en solución salina fosfatada en Dulbecco.
- Conservar durante 20 minutos en baño de hielo con agitación ocasional.
- Centrifugar durante 10 minutos a 2000 rpm. a 4° C.
- Transvasar los sobrenadantes a tubos limpios; corresponden a la dilución 1: 10 de suero.
- Mantener a 4° C o a -20° C., si la prueba no se realiza el mismo día.

TITULACIÓN DEL ANTÍGENO:

- Colocar 50 µl. de solución salina fosfatada de Dulbecco en tres hileras de celdas (bandeja en posición horizontal).
- Adicionar 50 µl. de antígeno a la primera celda de cada una de las hileras.
- Con un microdiluidor de 50 µl. hacer diluciones.
- Añadir 50 µl. de glóbulos rojos de cobayo al 0.5 % en solución salina fosfatada de Dulbecco.
- Agitar.
- Incubar a temperatura de laboratorio durante dos horas o a 4° C. de un día para otro.
- Determinar la máxima dilución de virus que produce HA, esta corresponde a una unidad HA.
- Emplear en la prueba de 4 a 8 unidades HA.

TÉCNICA DE INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN (HI)

- Colocar 50 µl. de solución salina fosfatada de Dulbecco, en las celdas de la columna 1 de A a H y 25 µl en las demás celdas (coger la bandeja en posición horizontal).
- Adicionar 10 µl. de suero tratado respectivo a la primera celda de la columna 1 de A a H (cabén ocho sueros por bandeja). Dilución inicial de suero 1:100.
- Hacer diluciones seriadas (hasta la celda 11) con microdiluidor de 25 µl. El suero queda diluido de 1:100 a 1:6400.

CONTROLES.

Sueros: Pasar a cada celda de la columna 12 y de A a H 25 μ l. de la columna 1 (esta celda corresponde al control del suero en dilución 1:200).

- Preparar dilución del antígeno que contenga 4 a 8 unidades HA.
- Adicionar 25 μ l. de antígeno a todas las celdas de la bandeja exceptuando el control de los sueros y la primera fila.
- Agregar 25 μ l. de solución salina fosfatada de Dulbecco a las celdas correspondientes a los controles de suero.
- Agitar.
- Dejar la prueba de incubación una hora a temperatura de laboratorio.
- Añadir 50 μ l. de glóbulos rojos al 0.5% a todas las celdas incluyendo los controles de suero. (No se incluyen las celdas de la columna 1, sirve solo para hacer diluciones de los sueros).
- Agitar.
- Incubar a 4° C. de un día para otro o a temperatura de laboratorio por dos horas.
- Leer.

TITULACIÓN FINAL DEL ANTÍGENO (CONTROL UNIDADES HA):

- A tres hileras de celdas agregar 50 μ l. de solución salina fosfatada de Dulbecco.
- Colocar 50 μ l. de antígeno que contenga 4 unidades HA en la primera celda de cada una de las tres hileras.
- Con microdiluidor de 50 μ l., hacer diluciones seriadas.
- Dejar en incubación una hora a temperatura de laboratorio.
- Agregar 50 μ l. de glóbulos rojos al 0.5%.
- Agitar.
- Incubar a 4° C de un día para otro o a temperatura de laboratorio por dos horas.

Control glóbulos rojos: Colocar 50 μ l. de solución fosfatada de Dulbecco en tres celdas de una bandeja.

- Agregar 50 μ l. de glóbulos rojos al 0.5 %.
- Agitar.
- Incubar a 4° C. de un día para otro o a temperatura de laboratorio por dos horas.

LECTURA:

- Titulación final de antígeno: El título del antígeno debe ser tal, que corresponda de 4 a 8 unidades HA.
- Sueros positivos: El título esta dado por la más alta dilución donde se observe inhibición de la hemoaglutinación, al igual que los sueros positivos de referencia (formación de botón).
- Suero negativo: No debe haber formación de botón al igual que el suero control negativo.
- Controles de suero: debe haber formación de botón.
- Control de glóbulos rojos: Debe haber formación de botón.

NOTA: Cuando se desea hacer la lectura a las 24 horas es necesario trabajar con solución salina al 0.9 %, pH 7.3 como diluyente. debido a que la de Dulbecco produce hemólisis de los glóbulos rojos en menor tiempo.

9.14.3 Reactivos y Soluciones.

❶ Glóbulos rojos:

- Tomar partes iguales de glóbulos rojos de cobayo y solución de Alsever.
- Centrifugar a 1.800 rpm. por cinco minutos.
- Descartar el sobrenadante.
- Agregar 6 ml. de solución salina fosfatada, pH 7.3.
- Centrifugar a 1.800 rpm. por cinco minutos.
- Descartar el sobrenadante.
- Repetir el proceso de lavado dos veces más.
- Después de la última centrifugación descartar el sobrenadante.
- Conservar a 4° C. máximo por 72 horas.

❷ Alsever:

- Dextrosa 20.5 grms.
- Citrato de sodio 8.0 grms.
- Ácido cítrico 0.55 grms.
- NaCl 4.20 grms.
- Agua destilada csp 1000 ml.
- Autoclave 10 minutos a 10 lb.

❸ Solución salina boratada de Cloruro de sodio 1.5 M.

- NaCl 87.675 grm.
- Agua destilada 1000 ml.

❹ Ácido bórico 0.5 M.

- H_3BO_3 30.92 grm.
- Agua destilada 1000 ml.

❺ Solución de Trabajo

- NaCl 1.5 M 80 ml.
- Ácido Bórico 0.5 M 100 ml.
- Agua destilada 820 ml.
- Ajustar el pH a 9.0 con NaOH 1 N

❻ Tratamiento de Kaolín con ácido (sustancias ácido solubles)

- Colocar en digestión 1 gr. de Kaolín.
- Agregar 20 ml. de ácido hidroclicórico durante 15 minutos.
- Filtrar.
- Someter 10 ml. de filtrado a la evaporación hasta que se seque.
- Inflamarlo, dejando máximo 10 grm. de residuo (2%).

❼ Solución veronal

- Veronal 2.875 grm.
- Veronal sódico 1.875 grm.
- $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.840 grm.
- $CaCl_2 \cdot 12 H_2O$ 0.185 grm.
- NaCl 42.5 grm.
- Agua destilada csp 1000 ml.
- Ajustar el pH 7.4
- Autoclave 10 minutos a 10 libras

❽ Solución Salina Fosfatada completa de Dulbecco (PBS)

- NaCl 8.0 grm.
- KCl 0.2 grm.
- Na_2HPO_4 1.15 grm.
- $KH_2 PO_4$ 0.2 grm.
- Agua destilada 1000 ml.

❾ Solución B

- $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1 grm.
- Agua destilada 100 ml.

❿ Solución C

- $MgCl \cdot 6H_2O$ 0.1 grm.
- Agua destilada 100 ml.

Ⓤ Solución de Trabajo:

- Solución A 800 ml.
- Solución B 100 ml.
- Solución C 100 ml.
- Ajustar el pH a 7.3.
- Esterilizar por autoclave a 10 libras por 15 minutos.

9.15 Técnica de ELISA para detectar anticuerpos de pseudorrabia (Pr)

9.15.1 Materiales Kit ELIFFA AUJESZKY contiene:

- Bandejas plásticas de fondo plano de 96 celdas
- Orto fenilén diamina (OPD) sustrato
- Antígeno positivo (Células PK15 infectadas)
- Antígeno negativo (Células PK15 no infectadas)
- Suero positivo
- Suero negativo
- Proteína A peroxidasa
- Tubos serología
- Baño María
- Pipetas Eppendorf
- Ácido sulfúrico 2 M
- Lector ELISA

9.15.2 Procedimiento

INFECCIÓN DE BANDEJAS

- Reconstituir cada antígeno (positivo y negativo) en 1 ml. de agua destilada.
- Agregar 100 ml. de buffer pH 9.6 a cada uno.
- Añadir 200 µl. de antígeno Aujeszky en las líneas pares.
- Colocar 200 µl. de antígeno negativo en las líneas impares.
- Cubrir las bandejas.
- Incubar de 14 a 18 horas a 4° C.
- Descartar los antígenos.
- Lavar 3 veces por 5 minutos cada bandeja con buffer pH 7.0.
- Secar la bandeja sobre gasa.
- Conservar las bandejas sensibilizadas entre -20° C. y -30° C. hasta su uso.

9.15.3 Diluciones de suero

SUEROS CONTROLES:

- Resuspender tanto el suero negativo como el positivo de referencia en 1 ml. de agua destilada estéril.
- Inactivar a 56° C. por 30 minutos.
- Agregar 20 µl. de suero problema a 600 µl. de diluyente pH 7.0, repetir el mismo procedimiento con los sueros controles.

9.15.4 Técnica de Elisa

- Agregar 200 µl. de cada suero diluido a una celda de antígeno positivo y 200 µl. a una celda de antígeno negativo. Actuar rápidamente para reducir al máximo la diferencia en tiempo entre la primera y la última celda.
- Incubar a 37° C. por una hora.
- Descartar el inóculo.
- Agregar la solución buffer pH 7.0 a cada celda.
- Descartar rápidamente el buffer.
- Lavar nuevamente cada celda tres veces por 5 minutos cada vez con buffer pH 7.0.
- Secar la placa sobre gasa.
- Agregar 200 µl. de proteína A peroxidasa por celdas.
- Descartar rápidamente.
- Lavar nuevamente con buffer pH 7.0 cada celda, tres veces, por 5 minutos cada vez.
- Secar la bandeja sobre gasa.
- Añadir 200 µl.
- Incubar en cámara húmeda protegido de la luz, durante 15 minutos.
- Agregar 50 µl. de H₂SO₄ 2 M a cada celda (detiene la reacción).



Fases de la técnica Elisa Sándwich. (1) Un anticuerpo monoclonal o policlonal anti antígeno suele estar ya unido a la placa. (2) se incuba con la muestra problema. (3) se añade el conjugado. (4) por último el sustrato. Todos los pasos van precedidos de incubaciones y lavados.

Tomada de : www.sanidadanimal.info/inmuno/quinto1.

LECTURA:

- Se hace en lector Elisa a 492 nm (D.O.). Utilizar como blanco la fila de una bandeja que corresponda al antígeno negativo y a la cual se le adiciono buffer pH 7.0 en lugar de suero.
- El suero positivo de referencia debe tener una lectura igual o dos veces mayor, a la del suero control negativo.
- Para considerar un suero problema positivo debe tener una lectura igual o mayor a la del suero control positivo de referencia.

9.15.5 Reactivos y soluciones

◆ Buffer Carbonato

- Na_2CO_3 1.59 gr.
- NaHCO_3 2.93 gr.
- Agua destilada 1000 ml.
- Ajustar el pH a 9.6 con NaOH 5 M
- Conservar a 4° C.

◆ Buffer Salina pH 7.0

- NaCl 8.5 gr.
- NaH_2PO_4 0.22 gr.
- Na_2HPO_4 1.19 gr.
- Tween 20 0.50 ml.
- Agua destilada 1000 ml.
- Ajustar el pH a 7.0

◆ Buffer pH 5.0

- Ácido cítrico 10.51 gr.
- Agua destilada 1000 ml.
- Ajustar el pH a 5.0 con solución de fosfato.
- Conservar a 4° C.

◆ Proteína A peroxidasa

- Disolver el liofilizado en 1 ml. de H_2O destilada estéril
- Completar a 20 ml. con buffer pH 7.0

◆ Sustrato

- OPD 1 pastilla
- Buffer citrato pH 5.0 50 ml

La solución debe ser incolora y se prepara inmediatamente antes de su uso.

9.16 Técnica de microneutralización para detectar anticuerpos de pseudorrabia (Pr)

9.16.1 Materiales

- Células línea PK15
- Medio MEM F15, tricine, antibióticos, micostatin, suero fetal bovino.
- Virus de Pseudorrabia y suero de referencia.
- Tubos de serología
- Bandejas plásticas para cultivo de células, de fondo plano, de 96 celdas.
- Cubiertas selladoras.
- Pipetas Eppendorf de 50 µl. y 25 µl.
- Formol.
- Cristal violeta.

9.16.2 Procedimiento.

TITULACIÓN DEL VIRUS:

- Colocar en cada celda 50 µl. de medio adicionado de tricine y bicarbonato en bandejas en posición vertical.
- Hacer diluciones seriadas en base 10, de 1 a 8 (medir 1.8 ml. de medio en cada tubo, adicionar 0.2 ml. de la suspensión del virus al primer tubo, pasar 0.2 ml. siguiente tubo, mezclar y pasar 0.2 ml. al tercero, mezclar y así sucesivamente, cambiando de pipeta cada vez).
- Agregar 50 µl. de cada dilución a la hilera correspondiente de la bandeja.
- Dejar las cuatro ultimas hileras como control de células. Adicionar 50 µl. de medio a cada una de ellas.
- Incubar a 37° C. durante una hora.
- Adicionar 50 µl. de células PK15 a cada celda (40.000 células).
- Sellar la bandeja.
- Incubar a 37° C. por 72 horas.
- Observar al microscopio.
- Colorear durante 50 minutos con cristal violeta al 1% en formol al 10%.
- Lavar con agua corriente.

MICROSERONEUTRALIZACIÓN:

- Inactivar los sueros a 56° C. por 30 minutos.
- Colocar 25 µl. de medio MEM a 8 celdas (5 celdas para la prueba propiamente dicha y tres para control de suero), bandeja en posición vertical.
- Agregar 25 µl. de suero a todas las ocho celdas.
- Adicionar 50 µl. de la dilución de virus que contenga 100 DL₅₀ a las primeras cinco celdas.
- Agregar 50 µl. del medio sin suero a las tres celdas restantes.
- Incubar la mezcla a 37° C. durante una hora.
- Desprender las células con la mezcla tripsina verseno (durante la incubación).
- Hacer recuento de células.
- Agregar a todas las celdas 50 µl. de la suspensión de células (40.000 por 50 µl.).
- Cubrir con cinta adhesiva.
- Incubar a 37° C. por 72 horas.
- Colorear durante 50 minutos con cristal violeta al 1% en formol al 10%.
- Lavar con suficiente agua.

CONTROLES DE LA PRUEBA:

- ◆ Titulación virus (control dosis)
- ◆ Control de suero positivo.
- ◆ Control de suero negativo.
- ◆ Control células.

LECTURA:

- Suero positivo (con anticuerpos): Neutraliza la acción del virus, por consiguiente no hay efecto citopático, al igual que el suero positivo de referencia.
- Suero negativo (sin anticuerpos): No neutralizan la acción del virus, hay efecto citopático.
- Control toxicidad suero: Por lo menos dos de las tres celdas no deben presentar efecto citopático.
- Control dosis virus: El título del virus debe corresponder a 100 DL₅₀ CC.
- Control células: No debe haber efecto citopático.

9.17 Técnica de microinmunodifusión para la detección de anticuerpos de pseudorrabia

9.17.1 Materiales

- Virus de Pseudorrabia.
- Agar.
- Sueros de Referencia.
- Molde de Cobre de siete celdas.
- Cajas de Petri.
- Bomba de Vacío.

9.17.2 Procedimiento

- Retirar la preparación de agar que se ha mantenido a 4° C.
- Licuar en baño María hirviendo.
- Enfriar alrededor de 60° C.
- Agregar solución stock de ácida sódica.
- Colocar 2.25 ml. sobre cada portaobjeto.
- Conservar los portaobjetos a temperatura de laboratorio, de dos a cuatro horas antes de usarse, manteniéndolos dentro de una caja de Petri.
- Después de solidificado el agar, perforarlo en sitios diferentes con un molde de siete celdas.
- Retirar los tacos de agar de las celdas con una pipeta Pasteur o con una cánula de 14 pulgadas, conectada a una bomba de vacío.
- Cada celda deberá llenarse con los sueros problema hasta el borde del agar pero sin sobrepasarlo (24 µl. por celda).
- Los sueros se colocan entres celdas externas, conservando vacía una intermedia.
- Colocar un suero positivo de referencia en las celdas vacías.
- Agregar el antígeno de pseudorrabia a la celda central de cada molde.
- Conservar los portaobjetos en la caja de Petri a temperatura de laboratorio (20 a 26° C) durante una noche, en cámara húmeda.

LECTURA:

- Veinticuatro horas más tarde, observar con la ayuda de campo oscuro y con lente de aumento, hacer la lectura.

Reactivos y Soluciones

- | | | | |
|---|----------|----------------------------------|---------|
| ◆ Gel de Agar Buffer Tris pH 7.2 (0.05 M) | | ◆ Solución stock de azida sódica | |
| ▪ Trisma HCl | 7.02 gr. | ▪ Azida sódica | 2.5 gr. |
| ▪ Trisma base | 0.67 gr | ▪ Buffer Tris, pH 7.2 | 100 ml. |
| ▪ Agua destilada | 1000 ml. | ◆ Solución de trabajo 0.025% | |
| ▪ Agarosa | 6.9 gr. | ▪ Solución stock | 1 ml. |
| ▪ Autoclave a 10 libras por 7 minutos | | ▪ Agar diluido | 100 ml. |
| ▪ Conserve a 4° C. | | | |

Envasarlo en cantidades apropiadas para una prueba.

NOTA: Cada molde o plantilla consiste en siete celdas de 4 mm., separadas entre si por 2.5 mm. Una celda central y seis celdas a igual distancia.

9.18 Técnica de aglutinación látex para detectar anticuerpos de Pseudorrabia

Esta prueba se puede realizar empleando suero no diluido, decantado.

9.18.1 Materiales

KIT LÁTEX AUJESZKY CONTIENE:

Suspensión de látex sensibilizada con glicoproteína purificada de la cubierta del virus de pseudorrabia. Suero negativo de cerdo con título neutralizante menor de 2.0 log₁₀. Suero positivo de cerdo hiperinmunizados, que presenten clara aglutinación.

9.18.2 Procedimiento

- Colocar una gota de suero control positivo y negativo en las celdas correspondientes.
- Colocar 30 µl. de suero problema en las celdas correspondiente.
- Agregar una gota de antígeno de Pseudorrabia a todas las celdas.
- Mezclar cada celda con un agitador plástico.
- Agitar suavemente la placa.
- Leer el control positivo dentro de los cuatro a seis minutos siguientes.
- Leer los sueros problema.

NOTA: La aglutinación que se observa después del periodo de tiempo indicado, no debe ser reportada. Esta prueba no debe ser realizada con muestra recolectada sobre papel de filtro:

La prueba es sensible, de fácil realización económica y de lectura rápida. Si se puede usar a nivel campo. No debe ser empleada para diagnóstico diferencial, detecta anticuerpos totales, no diferencia animales infectados de vacunados.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

Durante las primeras décadas del siglo XX el diagnóstico virológico presentaba un atraso de casi 30 años en relación al diagnóstico bacteriológico, no es hasta los años cincuentas que empieza a despegar el diagnóstico virológico, permitiendo con esto tener grandes avances en la detección de enfermedades virales.

Este manual no pretende sustituir a la información ya existente. La información que se consultó y revisó para este manual a permitido tener información actualizada, completa y sobre todo de una forma integral: diagnóstico del antígeno, diagnóstico para los anticuerpos (serología), pruebas especiales (Microscopia Electrónica, PCR, Quimioluminiscencia entre otras).

Por lo tanto este manual de diagnóstico virológico será una herramienta de trabajo muy útil para estudiantes de la carrera de QFB y Medicina Veterinaria, así como el personal que elabora en el área de laboratorio clínico integral.

Los objetivos de éste proyecto se cumplieron en un cien por ciento.

GLOSARIO

Absorción: Proceso por el cual una sustancia es tomada por otra, química o físicamente, como cuando una esponja toma un líquido o una sustancia se disuelve en otra.

Adyuvante: Sustancia extraña a un organismo introducida conjuntamente con un antígeno para aumentar su inmunogenicidad. Estas incluyen bacterias muertas o productos bacteriales (endotoxinas) o emulsiones (adyuvante de Freud, aluminio).

Adsorción: Adhesión de las moléculas de un gas, líquido o una sustancia disuelta a una superficie por atracción química o eléctrica. Típicamente con carbón granulado activado para remover elementos orgánicos disueltos.

Alcalinidad: Concentración de carbonatos, bicarbonatos, hidróxidos y ocasionalmente boratos, silicatos y fosfatos en agua, expresado en partes por millón de carbonato de calcio.

Anticuerpo: Sustancia (generalmente globulina Gamma), sintetizada por un animal por efecto de su exposición a un antígeno o a un hapteno combinado con un vehículo y que puede reaccionar de manera específica con él.

Antígeno: Molécula que puede reaccionar de manera específica con los anticuerpos y que en condiciones apropiadas, desencadenada en el animal la síntesis de anticuerpos específicos.

Atenuación: Disminución o debilitamiento de la virulencia (de un microorganismo), que se logra por selección de mutantes naturales o en forma experimental.

Cultivo primario de células: Cultivo que se inicia con células, tejidos, y órganos que proceden directamente de un ser vivo.

Desmineralización: Se refiere al retiro de minerales y sales minerales utilizando un recobrador de iones. Algunas veces se entiende como desionización.

Dilución: Disminución de la concentración de una solución por medio de solventes.

Dilución (Factor de): La relación de solvente a soluto, por volumen.

Destilación: Proceso de separación de las impurezas del agua por calentamiento hasta que cambie a vapor y luego por enfriamiento y condensación pasa a estado líquido.

Dosis infectante (DI₅₀, TCID₅₀): Concentración de virus necesaria para producir una infección reconocible en el 50% de los animales ó en células cultivadas empleadas como indicador.

Esterilización: Destrucción o remoción de todo organismo vivo.

Efecto citopático: Alteraciones morfológicas de las células huésped; generalmente determinan la muerte celular.

Gel : Masa continua formada por coagulación de coloides.

Globulina Gamma: Fracción del suero (en base a movilidad electroforética) formada por diversas clases y subclases de moléculas de inmunoglobulina y de otras globulinas que no desempeñan función de anticuerpos.

Globulina: Cualquier proteína del suero diferente de la albúmina en soluble a altas concentraciones de sal.

Hemoadsorción: Fijación de glóbulos rojos sobre la superficie de la célula huésped.

Hemoaglutinación: Agregación de glóbulos rojos.

Hemoaglutinina (viral): Proteína (distintas de los anticuerpos), situada sobre la superficie externa de ciertos virus, capaz de reaccionar con uno o varios determinantes de la superficie de los glóbulos rojos, causando agregación de ellos (hemoaglutinación).

Inmunidad: Condición por la cual un organismo es capaz de sobrevivir a la acción de agentes infecciosos o a sus efectos lesivos y vencerlos.

Activa = Es la inmunidad que se adquiere a consecuencia del contacto natural con un agente infeccioso, o la que se debe a vacunación.

Pasiva = Inmunidad adquirida de la madre a través del calostro o por la inyección de anticuerpos formados en otro organismo.

Inmunógeno: Antígeno (molécula) que desencadena la producción de respuesta inmune.

Inmunodifusión: Reacción serológica que se presenta en o sobre un medio de fluidez restringida y en el cual los reactivos se mezclan solamente por difusión.

Inmunoglobulina: Las diversas clases de moléculas de gammaglobulina que tiene actividades de anticuerpo.

Línea celular: Cultivo de células capaz de mantenerse mediante resiembras in Vitro por tiempo indefinido.

Microlitro: Millonésima parte de un litro, μl . Ej. 0.8 ml. igual a 800 μl .

Peso molecular: Peso de una molécula, calculado por la suma de pesos atómicos de sus átomos constituyentes. Es el peso de un elemento en relación a otro tomado con estándar, usualmente oxígeno (16) o carbono (12).

pH: Logaritmo del recíproco de la concentración del ión hidrógeno, una solución con un pH inferior a 7.0 es ácida ; si es mayor es alcalina.

Respuesta inmune secundaria: Respuesta que ocurre luego de una segunda y subsecuentes exposiciones a un antígeno (memoria inmunológica).

Sóluto: Sustancia que se disuelve formando iones en solución.

Solución: Líquido que contiene soluto disuelto.

Solvente: Líquido capaz de disolver un soluto.

Suero: Porción líquida de la sangre, que se obtiene después de quitar el coágulo de fibrina y las células circulantes.

De fase aguda = suero que se obtiene en las primeras etapas de la enfermedad.

De convalecencia = suero que se recoge durante la etapa de recuperación de una enfermedad.

Tolerancia: Fallo del sistema inmune de responder a un antígeno como resultado del contacto previo con el mismo antígeno, aunque sea capaz de responder a otros (infección neonatal).

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

LIBROS

- Abbas. Inmunología Básica Ed. Panamericana.
- Ackenmann Hans, Laurent. Berthraume. 1992 USA. Virus life in Diagrams.
- Alcama, Edward. Fundamentals of Microbiology, sexta Ed. Jones and Bortlett Publishers, Estados Unidos 2001.
- Audesirk, Teresa y Auesirk Gerald. Biología tomo 1. cuarta Ed. Pearson Educación 1996. pp. 268-270.
- Beunard N. Fields. Fundamental Virology. Segunda. Raven Dress. New York. 1990.
- Can Alan J. 2000 Oxford University Press inc. DNA Virus Replication, Frontiers in Molecular Biology.
- Capuccino G. James, Sherman Natale. 1999 Fifth edition The Benjamin Cummings Publishing Company Inc. Microbiology a Laboratory Manual.
- Carrasco, Luis. CRC press 2000 USA. Mechanisms of viral toxicity in animal cells.
- Coll Morales, Julio. Técnicas de Diagnóstico en Virología. Ediciones Díaz de Santos. España 1993.
- Collier, Leslie and Oxford John. Human Virology The London Hospital Medical Collage Oxford University Press
- Cullen Bryan R. 1993 Oxford University press. Human Retroviruses
- Cunningham Charles H, Virología Práctica, sexta Ed. Edit. Acnibia España
- Curtis, Helena y Sue, Barnes. N. Biología Edit. Medica Panamericana sexta Ed. 2001 Barcelona España
- David D. Bernard, Dulbecco Renato. M. D. et al Tratado de Microbiología. Cuarta Ed. Masson S.A Barcelona 1996.
- David Lane. Antibodies a Laboratory Manual. Ed. Harlow Cold Spring Harbor Laboratory 1988.
- Diane S. Leland. Clinical Virology. Saunders de 1996.
- Edward K. Martinez. "Basic Virology". J. Blackwell science. INC USA 1999
- F. A. Murphy, C. M. Fauquet, D. H. L Bishop S. A Ghabrial. Virus Taxonomy "Classification and nomenclature of Viruses". Springer- Verlag wien New York 1983.
- Fenner, White. 2da edición. La prensa médica mexicana S.A. Virología Médica
- Franki RIB, Fauquet C.M., D. L. Knudson, Brown F. Archives of virology 1991 Austria suppl 2. Classification and Nomenclature of Viruses Fifths report of the international committee on taxonomy of viruses.
- Guidici, Fettner Ann. The science of viruses. Quilli New York 1990.

- Haukenes G. Haaheim L.R., Pattison J. R. A Practical Guide to clinical virology. John Wiley de 1989
Harper David, Kinchington R. Paul. Second edition 1994. Molecular Virology
- Henry, Bernard John. Diagnóstico y Tratamiento Clínico por el Laboratorio. novena Ed. Ediciones Científicas y Técnicas S.A México 1997.
- Hull R. Brown. F Payne. C. Directory and dictionary of Animal, Bacterial and Plant Viruses. MACMILLAN Reference Books Great Britain. 1989.
- James L, Benninton M. d. Diccionario Enciclopédico de Laboratorio Clínico. Ed. Médica Panamericana. Impreso en Buenos Aires, La Argentina
- Jawete, Melnick y Adelberg. 2002. Microbiología médica.
- Jones, Emma, Morris Anna. Célula y Genética. segunda Ed Madrid España 1999.
- Junqueira, L.C. Carneiro José. "Histología Básica. quinta Ed. Masson Barcelona 2002.
- Kart, Maramorosch. Comparative Virology. Academic Press. New York 1971.
- Koneman, Elmer W. Diagnóstico Microbiológico. Edit. Panamericana. España 1997.
- Lodish, Harvey Arnold, Matsudarrá, Paul. Biología Celular y Molecular. Cuarta Ed. Edit Panamericana 2003 p.p. 326-333.
- Lonbergholm, Karl. Philipson Lennart. 1994. Monographs in virology vol 9. Early interaction between animal Virus and cell.
- Luber, Stryer. Bioquímica. Cuarta Ed. tomo. Ed. Reverte S.A.
- Luria, S. E, Darnell Jr. E. James, Baltimore David, Campbell Allan. 1978. 3 ed, USA. General Virology.
- M. J. Walker y B, gingal. E. Biología Molecular y Biotecnología segunda ed, Ed Acriba Zaragoza España 1997 p.p. 53-64
- Mahy J and Barry R. 1973. vol 1, England . Negative Strand Viruses
- Manual de técnica de Diagnóstico Viroológico
- Manual de Virologia Medica. UNAM
- Maramorosh, Frederick; Karl a Murphy Aarón J. Shatking. 1999. Vol 53 ed. Academic. Advances in vires research
- Margni A. Ricardo. Inmunología e Inmunoquímica Fundamentos. Cuarta Ed. 1990.
- Merchant, Ival Arthur. 1970. Vol 3 ed. Acribia. Bacteriología y virologia veterinarias
- Michael H. Roos, Lynn J. Romell, "Histología y Atlas a color" tercera Ed. Ed Médica Panamericana. Bogotá 1997.
- Miroslac F. Handbook of Inmunochemistry Chapma y may. Checoslovaquio. 1993.
- Murria R. Patrick, Baron Jo Ellen, Pfaller Michael A. 1999 Washington D.C
Manual of Clinical Virology
- Murrilla Antonio .Manual de Inmunología. Ed Diana. Méx. D.F . 1986

- Newmut M. V. and Steven Ac. 1987. Vol 3 sciences publishers B. V. Animal Viruses Structure, Perspective in medical virology.
- Palmer L. Erskine, Lane Martin Mary. 1988 USA. Electron Microscopy in viral diagnosis.
- Paymont Pierre y Trudel Michel. Methods and Techniques in Virology. Ed Marcel Dekker, Estados Unidos, 1993. pag 37
- Pérez Arellano José Luis. Guía de Autoformación en Enfermedades Infecciosas. Panamericana. España, Barcelona 1966
- Prescott, Lansing, et. Al. Microbiología. Mc Graw Hill Interamericana. USA 1999
- Ravozzo Grace C. A manual of Basic Virological Techniques. Ed Prentice Hall Series USA, 1973 pag. 144-146
- Richard J. Henry. M. D. Química Clínica Tomo I segunda ed. Ed Jims. Barcelona (España 1986)
- Rose. Noel R. Laboratorio en Inmunología Clínica segunda ed. D Panamericana 1984 Buenos Aires pag 35-55
- Roitt Ivan, Inmunología Fundamental novena ed Panamericana Argentina 1998
- Smith, Kennet, Manley. 1968. La Biología de los virus
- Stainer Y. Roger, Ingraham L. John, Whelis L. Mark, Painter R. 1996. Vol 2 ed. Reverte España. Microbiología
- Stephenson R. John and Warnes Alan. 1998 New Jersey. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988
- Specter Steven, Ph. D, Lance Gerald. 1986 USA. Clinical Virology Manual
- Schwarz, Gunter. Imported Virus Infections. Ed. Springer Medicine. 1996. Austria
- Tissen Peter. 1990. Vol 1. Handbook of Porvoviruses
- Tortora Berdell Gerard, Case L. Christine. 1998. Vol 6. Microbiology and Introduction
- Torres R. Lucía Myriam. Bact. Ms Guillermo González G. MVZ. Vd. Enfermedades Virales Porcinas Manual de Técnicas Serológicas. Santa fe de Bogota, Agosto de 1993.
- Voet Donald and Judith. Biochemistry. Segunda ed. Ed. John Willey and Sons, Inc USA 1995.
- Waterson A. P. 1962 Zaragoza España. Introducción a la virología animal.
- William S K Conceptos de Genética. Prentice may quinta ed. Madrid España. 1999. pp 471-475.
- Wiley, Liss. and Wiley John. Culture of animal Cells a Manual of Basic Technique.
- Wilner I. 1964 USA. Classification of the major groups of human and other animal viruses.
- Wolfgang K, Willet P. Hilda, Bernard D. Microbiología.