DETECCIÓN DE ANTÍGENOS DE VIRUS DENGUE EN TEJIDOS EMBEBIDOS EN PARAFINA

El dengue es la arbovirosis más importante en términos de morbilidad y mortalidad. Cada año ocurren a causa de esta enfermedad alrededor de 20 000 muertes en las áreas subtropicales y tropicales del mundo (1).

La confirmación de una infección por virus dengue (VDEN) en los casos fatales es de gran interés. Sin embargo, en la mayoría de estos casos solo se obtiene una única muestra de suero de valor limitado para el diagnóstico virológico (2). En el caso que se logre realizar la autopsia se pueden obtener tejidos fijados en formol y embebidos en parafina (FFEP). En dichos tejidos es posible realizar la detección de antígenos de VDEN mediante inmunohistoquímica (IHQ) que es un método inmunoenzimático de detección de antígenos en tejidos (3-7). Esta técnica requiere anticuerpos conjugados con enzima peroxidasa (7) o fosfatasa alcalina (8) y para aumentar su sensibilidad se pueden utilizar los sistemas biotina/estreptavidina o biotina/avidina (3, 6, 9, 10).

Muy recientemente este método de detección de antígenos virales ha servido para estudiar la asociación de la fisiopatología de esta compleja enfermedad con el tropismo del VDEN en diferentes tejidos de fallecidos por dengue hemorrágico y de un modelo experimental murino de dengue (11).

Materiales:

- 3 frascos con xilol y 4 frascos con etanol (95%, 90%, 80%, 70%, respectivamente) frescos
- Buffer de lavado de TBST (Tris-Buffered Saline-Tween 20) de pH 7.4
- Tripsina (Difco)
- Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 30% y metanol
- Albúmina bovina sérica (ABS)
- Anticuerpo Policlonal (AcP) anti-Dengue (líquido ascítico hiperimune) (IPK)
- AcP de conejo anti-ratón conjugado con peroxidasa (DAKO)
- Polvo de 3, 3`-Diaminobenzidina, DAB (Sigma)
- 4 frascos con etanol (70%, 80%, 90%, 95%, etanol absoluto, respectivamente) para deshidratar y 3 frascos con xilol frescos

- Hematoxilina de Mayer y bálsamo de Canadá

Equipos

- Micrótomo con baño histológico a 58 °C
- Estufa a 60 °C
- Estufa a 37 °C con cámara húmeda (CH)
- Cámara fría a 4 °C
- Microscopio de luz

Tejidos controles

Los tejidos FFEP controles positivos de VDEN se obtienen de ratones lactantes como se describiera en el capítulo de aislamiento del VDEN. Brevemente, los cerebros de ratón post-inoculados son extraídos y fijados en solución de formol tamponado neutro (solución al 10% de formol al 40% en solución tampón fosfatada neutra 0.1 M) por 48 horas antes del procesamiento histológico de rutina para inclusión en parafina. Los tejidos cerebrales de ratón empleados como controles negativos son procesados de igual manera que los controles positivos con excepción de que la solución inoculada por vía intracerebral no posee VDEN.

Procedimiento de IHQ por el método indirecto de inmunoperoxidasa

1. Corte y Montaje

- Realizar cortes de los tejidos FFEP de 4 µm de grosor con micrótomo y montarlos en láminas portaobjetos tratadas con silane (3-triethoxisilylpropylamine, Sigma). Incubarlos a 37 ° C toda la noche (o al menos 12 horas) o a 60 º C por 1 hora.

Nota: Los cortes de los controles positivos y negativos de tejidos deben ser realizados simultáneamente.

2. Desparafinación y rehidratación

- Colocar los cortes histológicos en xilol durante 5 minutos. Repetir en total 3 veces por 5 minutos (3x5min).

- Colocar los cortes histológicos en soluciones de etanol seriados descendentes (etanol absoluto, y al 95%, 90%, 80%, 70% en agua destilada) durante 5 min cada uno.
- Lavado con TBST, 3x5 min.

Nota: a partir de este paso no se debe dejar secar ningún corte histológico o sus bordes para evitar coloración falsa positiva. Circular los cortes con DakoCytomaton Pen o algún producto hidrófobo.

3. Recuperación de antígenos por digestión enzimática

- Incubar los cortes histológicos cubiertos con tripsina 0.1 % con $CaCl_2$ 0.1%, pH 7.8, en agua destilada a 37^0C durante 20-30 minutos en CH.
- Lavado con TBST 2x5 min.

4. Bloqueo de la actividad de peroxidasa endógena

- Cubrir los cortes histológicos con una solución de metanol al 90%, H_2O_2 al 5% en agua destilada durante 20 minutos a TA en CH.
- Lavado con TBST 2x5 min.

Nota: el peróxido de hidrógeno es un potente oxidante, evitar su contacto con la piel.

5. Bloqueo de la unión de los anticuerpos a sitios inespecíficos

- Incubar con solución de ABS recién preparada al 5% en TBST durante 30 min. a TA en CH.

Nota: ¡**No Lavar** a continuación! Sacudir la lámina con la solución de bloqueo, secar alrededor del tejido y aplicar anticuerpo primario inmediatamente.

6. Aplicación de anticuerpo primario

- Aplicar AcP anti-Dengue diluido 1:100 en Tris/HCL 0.05 M, pH 7.4 con ABS al 1% más Tween 20 al 0.1%. Calcular el volumen final teniendo en cuenta un volumen de 50-100 µL por cada corte en dependencia de su tamaño.
- Incubar los cortes histológicos cubiertos con el anticuerpo primario en CH a 37^0C durante 30 min. ó a 21-25^0 C por dos horas ó a 4° C toda la noche.

- Lavado con TBST 3x5 min.

7. Aplicación de anticuerpo secundario (conjugado) (Figura 1)

- Aplicar AcP de conejo anti-ratón conjugado con peroxidasa diluido 1:100 o 1:200 en Tris/HCL 0.05 M, pH 7.4.
- Incubar los cortes histológicos cubiertos con el anticuerpo conjugado en CH a TA durante 1 hora.
- Lavado con TBST 3x5 min.

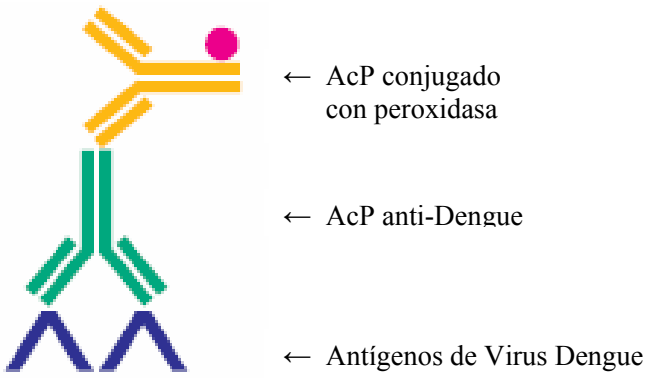


Figura 1. Inmunohistoquímica por el método indirecto de inmunoperoxidasa. El anticuerpo secundario conjugado reacciona con el anticuerpo primario unido a los antígenos del tejido (12).

8. Revelado

- Diluir la DAB como indique el fabricante. Brevemente, se disuelven 6 mg de DAB en 10 mL de Tris/HCl pH 7.4. Agitar bien para diluir (aconsejable utilizar vortex por 30 segundos), filtrar para eliminar partículas (se sugiere filtro de 0.2 µm), y luego añadir H_2O_2 al 3% en agua destilada antes de aplicar.

Nota: Controlar bajo microscopio de luz la reacción, lámina a lámina, no debe pasar de 5-10 minutos para evitar el sobre-revelado. Las muestras de pacientes deben observarse al final.

La DAB es cancerígena y su preparación debe ser con guantes y cámara de gases. Para mejores resultados debe ser utilizada la solución de DAB inmediatamente y evitar su exposición a la luz.

- Detener la reacción con agua corriente.

9. Coloración de contraste (opcional) y montaje

- Introducir y extraer inmediatamente las láminas en hematoxilina de Mayer fresca.
- Lavar en agua corriente.
- Deshidratar los cortes en etanoles seriados ascendentes (70%, 80%, 90%, 95%, etanol absoluto) por 2 min.
- Aclarar los cortes en xilol, 2 pases de 2 min.
- Montar cubreobjetos con bálsamo de Canadá.
- Observar bajo microscopio de luz (Figura 2).

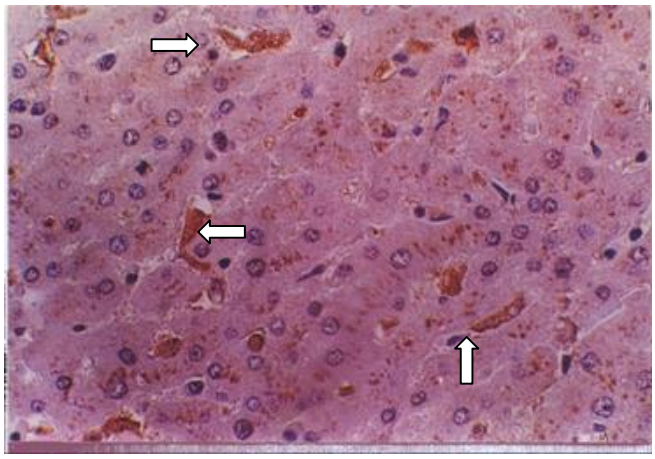


Figura 2. Se observan células de Kupffer positivas (flechas) de antígenos de virus dengue por el método de inmunohistoquímica en un corte de hígado humano.

Referencias

1. Calisher CH. Persistent emergence of dengue. Emerg Infect Dis 2005;11(5):738-9.
2. Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. Clin Microbiol Rev 1998;11(3):480-96.
3. Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. J Infect Dis 2004;189(8):1411-8.
4. Miagostovich MP, Ramos RG, Nicol AF, Nogueira RM, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, et al. Retrospective study on dengue fatal cases. Clin Neuropathol 1997;16(4):204-8.
5. Rigau-Perez JG, Laufer MK. Dengue-related deaths in Puerto Rico, 1992-1996: diagnosis and clinical alarm signals. Clin Infect Dis 2006;42(9):1241-6.
6. Hall WC, Crowell TP, Watts DM, Barros VL, Kruger H, Pinheiro F, et al. Demonstration of yellow fever and dengue antigens in formalin-fixed paraffin-embedded human liver by immunohistochemical analysis. Am J Trop Med Hyg 1991;45(4):408-17.
7. Limonta D, Capo V, Torres G, Perez AB, Guzman MG. Apoptosis in tissues from fatal dengue shock syndrome. J Clin Virol 2007;40(1):50-4.
8. Huerre MR, Lan NT, Marianneau P, Hue NB, Khun H, Hung NT, et al. Liver histopathology and biological correlates in five cases of fatal dengue fever in Vietnamese children. Virchows Arch 2001;438(2):107-15.
9. Couvelard A, Marianneau P, Bedel C, Drouet MT, Vachon F, Henin D, et al. Report of a fatal case of dengue infection with hepatitis: demonstration of dengue antigens in hepatocytes and liver apoptosis. Hum Pathol 1999;30(9):1106-10.
10. Pelegrino JL, Arteaga E, Rodriguez AJ, Gonzalez E, Frontela MD, Guzman MG. [Standardization of immunohistochemical techniques for detecting dengue virus antigens in paraffin-embedded tissues]. Rev Cubana Med Trop 1997;49(2):100-7.
11. Balsitis SJ, Coloma J, Castro G, Alava A, Flores D, McKerrow JH, et al. Tropism of dengue virus in mice and humans defined by viral nonstructural protein 3-specific immunostaining. Am J Trop Med Hyg 2009;80(3):416-24.
12. Boenisch T. Immunochemical Staining Methods. 3rd ed. California: DakoCytomation; 2001.

DETECCIÓN DE APOPTOSIS EN TEJIDOS EMBEBIDOS EN PARAFINA

La fisiopatología de la fiebre hemorrágica del dengue/síndrome de choque por dengue (FHD/SCD) es muy compleja y no está completamente dilucidada (1). Sin embargo, existen numerosos estudios que asocian esta compleja enfermedad viral con inmunoamplificación dependiente de anticuerpos heterólogos, células T de memoria de reactividad cruzada, incremento de la producción de citocinas, altas cargas virales, activación del complemento y citotoxicidad dependiente de anticuerpos. la apoptosis, una forma de muerte celular programada, se ha implicado en la patogénesis de la FHD/SCD (2, 3). Este evento celular se ha demostrado con anterioridad en diferentes líneas celulares inoculadas con virus dengue (4-6), cerebro de ratón infectado con virus dengue (7) y en hepatocitos de fallecidos por FHD/SCD (8, 9). Por otra parte, en un trabajo más reciente se demostró apoptosis de células endoteliales de vasos sanguíneos en un modelo murino de hemorragia por dengue (10). Se ha postulado que la apoptosis puede ser inducida por la replicación viral (5, 8, 9) o mecanismos inmunes (6, 11, 12).
Muy recientemente, se reportó por primera vez apoptosis por el método de TUNEL (marcaje por dUTP de extremos finales de fragmentos mediado por Transferasa deoxinucleotídica Terminal, del inglés –**T**erminal deoxynucleotydil Transferase-mediated d**U**TP **n**ick-**e**nd **l**abeling-) de células endoteliales de la microvasculatura de intestino y pulmón, células cerebrales y leucocitos sanguíneos en tejidos fijados en formalina y embebidos en parafina (FFEP) de casos fatales de FHD/SCD de una epidemia de dengue en Cuba en el año 1997 (13, 14) y en el 2001 (15).

Reactivos

- 3 soluciones de xilol y soluciones de etanol seriados frescos.
- Buffer de lavado de PBS (Phosphate-Buffered Saline) de pH 7.4 y coplin limpios.
- Proteinasa K recombinante (Roche Applied Sciences, No. Cat. 03 115 879 001)
- DNase I, grado I (Roche Applied Sciences, No. Cat. 10 104 132 001)
- Tabletas listas para su uso, NBT/BCIP (Roche Applied Sciences, No. Cat. 1 697 451)
- Hematoxilina

Equipos

Micrótomo, incubadora de 37 °C, cámara húmeda (CH), microscopios de luz y de fluorescencia

Tejidos controles de apoptosis

En cada corrida del protocolo de TUNEL se incluyen controles de tejidos FFEP desparafinados, rehidratados y digeridos con Proteinasa K siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche Applied Sciences). El control positivo de tejido incluye cortes de amígdala humana. Los controles negativos de tejidos están constituidos por tejido de amígdala u otro tejido humano correspondiente al tejido muestra.

Detección *in situ* de células apoptóticas por el método de TUNEL (*In Situ* Cell Death Detection Kit, AP, Roche Applied Sciences, No. Cat. 11 684 809 910) Es un kit para la detección y cuantificación inmunohistoquímica de la apoptosis a nivel celular, basado en la técnica del marcado de fragmentos de ADN (TUNEL)

Contenido del Kit

Vial/tapa	Etiqueta	Contenido
1/Azul	*Enzime Solution (Solución de Enzima)*	-Transferasa deoxinucleotidica Terminal de timo de ternero (EC 2.7.7.3.1), recombinante de *E. coli*, en buffer de almacenamiento -10X (5 x 50 µL)
2/Violeta	*Label Solution (Solución de Marcado)*	- Mezcla de nucleótidos en buffer de reacción -1 X (5 x 550 µL)
3/Amarillo	*Converter-AP (Convertidor-FA)*	- Anticuerpo anti-fluoresceína, fragmento de unión al anticuerpo (Fab, del inglés -fragment antibodies binding-) de carnero, conjugado con Fosfatasa Alcalina (FA) (3.5 mL)

Principio de la técnica: La incisión del ADN genómico durante la apoptosis puede producir ADN de doble cadena, fragmentos de ADN de bajo peso molecular (mono y oligo-nucleosomas) así como fragmentos de cadenas de alto peso molecular.
Estos fragmentos de ADN pueden ser identificados en una reacción enzimática a través del marcado de los extremos libres 3´-OH terminales con nucleótidos modificados.

Método

1. Marcaje de los fragmentos de ADN con una Transferasa deoxinucleotídica Terminal (TdT), la cual cataliza la polimerización de nucleótidos marcados a los extremos libres 3´-OH terminales (reacción de TUNEL)
2. Detección de los nucleótidos con fluoresceína incorporados con un fragmento de Fab de anticuerpo anti-fluoresceína de carnero, el cual esta conjugado con FA
3. Luego de la reacción del substrato, las células teñidas pueden ser analizadas con un microscopio de luz

1. Corte y Montaje

Realice cortes de los tejidos FFEP de 4 µm de grosor en micrótomo y móntelos en láminas portaobjetos tratadas con silane (3-triethoxisilylpropylamine, Sigma). Incúbelos a 37 °C overnight (al menos 12 horas) o a 60 ºC por 1 hora.
Nota: los cortes de los controles positivos y negativos de tejidos deben ser realizados simultáneamente

2. Desparafinación y rehidratación

- Colocar los cortes histológicos en xilol durante 5 minutos. Repetir 3 veces por 5 minutos (3x5min)
- Colocar los cortes histológicos en soluciones de etanol seriados descendentes (etanol absoluto, y al 95%, 90%, 80%, 70% en agua destilada) durante 5 min cada uno
- Lavado con PBS 3x5 min

Nota: a partir de este paso no se debe dejar secar ningún corte histológico o sus bordes para evitar coloración falsa positiva. Circular los cortes con DakoCytomaton Pen

3. Tratamiento de los tejidos por digestión enzimática

- Incubar las secciones de tejido por 15 minutos a 37^{0}C con la solución de trabajo de Proteinasa K recombinante [10-20 µg/mL in 10mM Tris/HCL, pH 7.4-8]
- Lavar con PBS 2x3 min

4. Procedimiento de Marcaje:

Un par de tubos (vial 1: *Solución de Enzima* y el vial 2: *Solución de Marcado*) son suficientes para colorear 10 muestras al utilizar 50 µL de la *mezcla de reacción de TUNEL* por muestra y 2 controles negativos al utilizar 50 µL de la *Solución de Marcado* por cada control.

Nota: La reacción de TUNEL debe ser preparada inmediatamente antes de su uso y no debe ser almacenada. Mantener la *mezcla de reacción de TUNEL* en hielo hasta su utilización. El control positivo se prepara antes de adicionar la *mezcla de reacción de TUNEL* a las muestras.

- Tome 100 µL de la *Solución de Marcado* (vial 2) para los dos controles negativos
- Adicionar el volumen total (50 µL) de la *Solución de Enzima* (vial 1) a los restantes 450 µL de la *Solución de Marcado* en el vial 2 para obtener 500 µL de la *mezcla de reacción de de TUNEL* (dilución 1:10)
- Mezclar bien para equilibrar los componentes

Controles:

Dos controles negativos y un control positivo deben ser incluidos en cada experimento.

Control Negativo	Incubar los tejidos desparafinados, rehidratados y digeridos en 50 µL de la *Solución de Marcado* (sin la Transferasa Terminal) en vez de la *mezcla de reacción de de TUNEL*
Control Positivo	Incubar los tejidos desparafinados, rehidratados y digeridos con DNase I, grado I [1000 U/mL en 50 mM Tris-HCL, pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$ 1mg/mL BSA] por 10 minutos a temperatura ambiente para inducir el rompimiento en fragmentos de ADN

	antes de los procedimientos de marcado.

Procedimiento:

1. Lavar con PBS 2x3
2. Seque el área alrededor de la muestra
3. Adicione 50 µL de la *mezcla de reacción de TUNEL* sobre la muestra.
4. Nota: Para el control negativo adicione 50 µL de la *Solución de Marcado* a cada uno
5. Incube por 60 min a 37^{0}C en CH
6. Lavar con PBS 3x3
7. Las muestras pueden ser analizadas con una gota de PBS bajo un microscopio de fluorescencia en este paso. Utilice una onda de excitación en el rango de 450-500 nm y una de detección en el rango de 515-565 nm (verde)

Revelado y Análisis:

Procedimiento:

1. Seque el área alrededor de la muestra
2. Adicione 50 µL del *Convertidor-FA* (vial 3) sobre la muestra
3. Incubar la lamina en CH por 30 min a 37^{0}C
4. Lavar con PBS 3x3
5. Adicionar 50-100 µL de *Solución de Substrato* (1 tb NBT/BCIP en 10 mL de agua bidestilada) justo antes de usar
6. Incubar la lamina por 10 minutos a temperatura ambiente
7. Lavar con PBS 3x3
8. Montar la muestra bajo un cubreobjeto de cristal (con PBS/glicerol) y analizarla bajo el microscopio de luz. Alternativa: las muestras pueden ser contrastadas con Hematoxilina antes del análisis con microscopio de luz.

Nota: Una vez abierto el vial 3 de solución de *Convertidor-FA* debe ser almacenado de 2-8^{0}C (estabilidad máxima de 6 meses) ¡No congelar!

Referencias

1. Halstead SB. Dengue. Lancet 2007;370(9599):1644-52.
2. Courageot MP, Catteau A, Despres P. Mechanisms of dengue virus-induced cell death. Adv Virus Res 2003;60:157-86.
3. Myint KS, Endy TP, Mongkolsirichaikul D, Manomuth C, Kalayanarooj S, Vaughn DW, et al. Cellular immune activation in children with acute dengue virus infections is modulated by apoptosis. J Infect Dis 2006;194(5):600-7.
4. Su HL, Lin YL, Yu HP, Tsao CH, Chen LK, Liu YT, et al. The effect of human bcl-2 and bcl-X genes on dengue virus-induced apoptosis in cultured cells. Virology 2001;282(1):141-53.
5. Avirutnan P, Malasit P, Seliger B, Bhakdi S, Husmann M. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. J Immunol 1998;161(11):6338-46.
6. Matsuda T, Almasan A, Tomita M, Tamaki K, Saito M, Tadano M, et al. Dengue virus-induced apoptosis in hepatic cells is partly mediated by Apo2 ligand/tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand. J Gen Virol 2005;86(Pt 4):1055-65.
7. Despres P, Frenkiel MP, Ceccaldi PE, Duarte Dos Santos C, Deubel V. Apoptosis in the mouse central nervous system in response to infection with mouse-neurovirulent dengue viruses. J Virol 1998;72(1):823-9.
8. Huerre MR, Lan NT, Marianneau P, Hue NB, Khun H, Hung NT, et al. Liver histopathology and biological correlates in five cases of fatal dengue fever in Vietnamese children. Virchows Arch 2001;438(2):107-15.
9. Couvelard A, Marianneau P, Bedel C, Drouet MT, Vachon F, Henin D, et al. Report of a fatal case of dengue infection with hepatitis: demonstration of dengue antigens in hepatocytes and liver apoptosis. Hum Pathol 1999;30(9):1106-10.
10. Yen YT, Chen HC, Lin YD, Shieh CC, Wu-Hsieh BA. Enhancement by tumor necrosis factor alpha of dengue virus-induced endothelial cell production of reactive nitrogen and oxygen species is key to hemorrhage development. J Virol 2008;82(24):12312-24.
11. Cardier JE, Marino E, Romano E, Taylor P, Liprandi F, Bosch N, et al. Proinflammatory factors present in sera from patients with acute dengue infection induce activation and apoptosis of human microvascular endothelial cells: possible role of TNF-alpha in endothelial cell damage in dengue. Cytokine 2005;30(6):359-65.
12. Lin CF, Lei HY, Shiau AL, Liu CC, Liu HS, Yeh TM, et al. Antibodies from dengue patient sera cross-react with endothelial cells and induce damage. J Med Virol 2003;69(1):82-90.
13. Limonta D, Capo V, Torres G, Perez AB, Guzman MG. Apoptosis in tissues from fatal dengue shock syndrome. J Clin Virol 2007;40(1):50-4.
14. Limonta D, Torres G, Capo V, Guzman MG. Apoptosis, vascular leakage and increased risk of severe dengue in a type 2 diabetes mellitus patient. Diab Vasc Dis Res 2008;5(3):213-4.
15. Limonta D, Gonzalez D, Capo V, Torres G, Perez AB, Rosario D, et al. Fatal severe dengue and cell death in sickle cell disease during the 2001-2002 Havana dengue epidemic. Int J Infect Dis 2009;13(2):e77-8.

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

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

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

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

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

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

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

I.1. <u>De cepas multiplicadas en cultivo celular o en cerebro de ratón lactante</u>

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

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

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

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

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

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

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

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

I.3 <u>De muestras de tejidos en bloques de parafina</u>

Desparafinación:

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

Extracción del ARN viral (Método del guanidinium isotiocianato):

- Resuspender el pellet en 300µL de tampón de lisis (100mM Tris-ClH pH 8.5, 0.5M EDTA, 10% SDS, 25mg\ml de Proteinasa K y 20u Rnasin) e incubar por 1h a 56^{0}C en baño de agua.
- Añadir 300 µL de fenol-cloroformo en incubar por 10 min a TA utilizando plataforma o balancín. Centrifugar por 5 min a 7000 rpm. Extraer la fase acuosa (superior) y pasarla a un tubo eppendorf nuevo. Repetir la extracción una vez más.
- Añadir 300 µL de cloroformo y realizar un proceso similar al anterior. Repetir por segunda vez la extracción con cloroformo.
- Precipitar el ARN con 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío y acetato de sodio (1\10) durante 18h a -70^{0}C.
- Centrifugar por 15 min. a 4^{0}C y 12000 rpm, lavar con 1 mL de etanol al 70%, centrifugar en iguales condiciones y dejar secar el pellet en flujo laminar durante 30 min.
- Resuspender el pellet añadiendo 10µL de agua DEPC y mantener en hielo hasta la síntesis del cADN o a menos 70 ^{o}C por más tiempo.

I.4. <u>De Sangre total seca en papel de filtro</u>

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

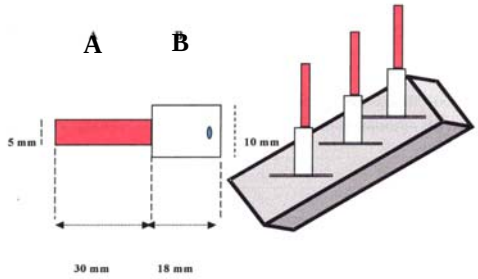


Figura 1. Papel de filtro empleado en el estudio. Izquierda A) Región donde se impregna la sangre infectada. Derecha) Posición de los papeles para el secado de la sangre impregnada.

- Elusión y extracción del ARN viral.
  - ✓ Cortar el área "A" del papel de filtro en 12-15 segmentos pequeños y transferirlos a un tubo eppendorf de 1.5 mL.
  - ✓ Añadir 400 µL de agua libre ARNasas.
  - ✓ Colocar los tubos a 37^{0}C durante 30 min.
  - ✓ Dar un golpe de centrífuga para precipitar los papeles.
  - ✓ Posteriormente transferir la mezcla de sangre y agua a un tubo eppendorf limpio (con pipeta).
  - ✓ 200 µL de la mezcla del paso anterior se utilizan para continuar el protocolo como se describe en el siguiente acápite (II) para la extracción del ARN viral empleando Trizol.

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

- En un tubo eppendorf de 1.5 mL con 200 µL de sobrenadante de cultivo celular infectado, homogenizado de tejido cerebral o suero, se añade 1 mL de Trizol.

- Agitar manualmente, incubar 10 min. a TA.

- Adicionar 200 µL de cloroformo, agitar manualmente 15 seg., incubar 15 min a TA.

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

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

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

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

Componentes del Kit:

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

Preparación de los reactivos del Kit:

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

Procedimiento:

1. En un tubo de micro –centrifuga de 1.5 mL, adicionar:
   140 µL de muestra + 560 µL de buffer AVL/RNA carrier, mezclar con vortex e incubar 10 min. a TA, Ctg breve a TA.

2. Adicionar 560 µL etanol (96-100%), mesclar por vortex breve. Ctg breve a TA
3. A un QIAamp columna incertada en un tubo de colección de 2 mL, aplicar 630 µL de la solución que se obtiene en el paso 3. Cerrar la tapa, Ctg 8000 rpm, 1 min
4. Colocar la columna en otro tubo de colección nuevo y descartar el anterior. Cuando se trabajan varias extracciones es prudente cerrar cada columna, según se trabajen para evitar contaminaciones cruzadas.
5. Adicionar a la columna 500µL del buffer AW1, Ctg a 8000 rpm, 1 min.
6. Repetir el paso 7
7. Adicionar 500 µL del buffer AW2, Ctg a 13 000 rpm, 3 min.
8. Descartar el tubo de colección con el filtrado. Colocar la columna en un tubo de micro-centrifuga 1.5 mL. Adicionar 60 µL del buffer AVE. Cerrar la tapa de la columna. Incubar a TA 1 min, Ctg. 8000 rpm, 1 min.
9. Recuperar el RNA eluido en el tubo de 1.5 mL, guardar a - 70 ^{o}C, o emplear directamente para la amplificación mediante RT-PCR.

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

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

- Tampón 10x [50 mM KCl, 10mM Tris (pH 8.5), 1.5 mM $MgCl_2$, 0.01% gelatina]
- 200µM de cada uno de los 4 deoxinucleotidos trifosfatos (ATP, CTP, GTP y TTP)
- 100 mM ditiotreitol (DTT)
- 50 pmoles de cada uno de los cebadores D1 y D2 (cebadores universales). Ver Tabla 1.
- 10 U de AMV-RT (Promega)
- 2.5 U de Taq DNA polimerasa (Promega)
- Agua DEPC (hasta completar 90 µl)
- Se adiciona a cada tubo con la mezcla anterior 10 µL del ARN.

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

30 min - 42º C (transcripción reversa)

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

5 min - 72 ºC (extensión final)

Segunda amplificación o nPCR

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

30 seg. - 94 ºC, 1 min. - 55 ºC2 min. - 72 ºC

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

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

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

Análisis directo de los productos del PCR por Electroforesis

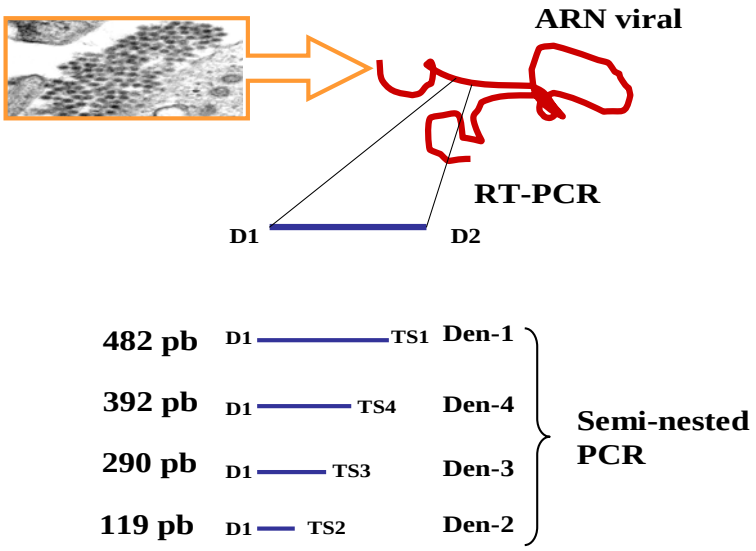
Preparar un gel de agarosa al 2 % en tampón TBE 1X (0,4M de Tris, 0,5 M de ácido bórico y 0,01 M de ácido etilendiamín tetracético), teñido con bromuro de etidio (0.5µg/mL). A 10µL del producto amplificado se le adiciona 2 µL de tampón de corrida (Tampón Loading 6X, Promega) se someten a electroforesis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

Interpretación de los resultados:

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

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

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



Referencias

1. D. Rosario, M. Alvarez, J. Díaz, R. Contreras, R. Rodríguez, M.G. Guzmán. Rapid detection and typing of Dengue viruses from clinical samples using Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction. Revista de la Organización Panamericana de la Salud 1998; 3:1-5.
2. D. Rosario, M Alvarez, S Vázquez, N Amin, R Rodríguez K Valdés MG Guzmán. Application of Molecular Methods to the Diagnosis and Characterization of Dengue Outbreak in Cuba. Biotecnología Aplicada 2001; 18:203-206.
3. D. Rosario. Diagnóstico molecular de las infecciones por Arbovirus. Libro: Genetic Diagnosis in Medicine, Primera edición, 1998.
4. Prado I, Rosario D, Bernardo L, Alvarez M, Rodriguez R, Vazquez S, Guzman MG. PCR detection of dengue virus using dried whole blood spotted on filter paper. J Virol Methods. 2005 Apr; 125(1):75-81.

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

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

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

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

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

La RT y la PCR se realizan en un mismo tubo de reacción. Se adicionan 10 µL de ARN viral extraído a 90 µL de una mezcla que contiene: 50mM de KCL, 10mM de Tris pH 8.5, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,01% de gelatina (componentes del tampón de reacción), 200 µM de cada deoxinucleótido trifosfato (dNTP), 5mM de ditiotreitol, 50 pMoles de cada uno de los cebador Flavi 1+ y Flavi 1- (ver Tabla 2), 5 U de RT-AMV (Promega) y 2,5 U de Taq DNA polimerasa (Promega).

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

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

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

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

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

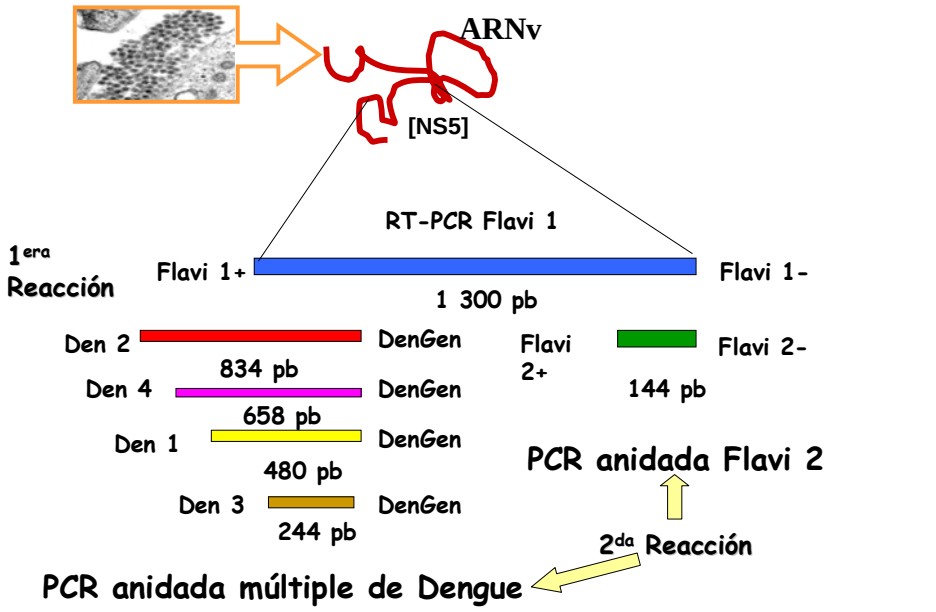
Es posible incorporar en esta reacción además los cebadores Flavi 2+ y Falvi 2-, con similar concentración.

Análisis directo de los productos del PCR por Electroforesis:

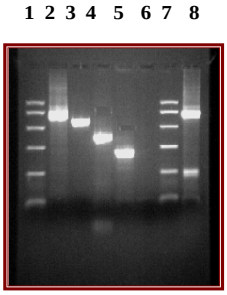
Se sigue el protocolo propuesto para el análisis de la PCR propuesta por Lanciotti y col. 1992.

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

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



Un ejemplo de los resultados se puede observar en la siguiente foto:



1 y 7. Marcador de peso molecular PCR Marker
2. Den-2
3. Den-4
4. Den-1
5. Den-3
6. Control negativo
8. Den-2 frente a la mezcla de los cebadores para la detección de flavivirus y tipificación de los virus del dengue (múltiple de dengue)

Referencias

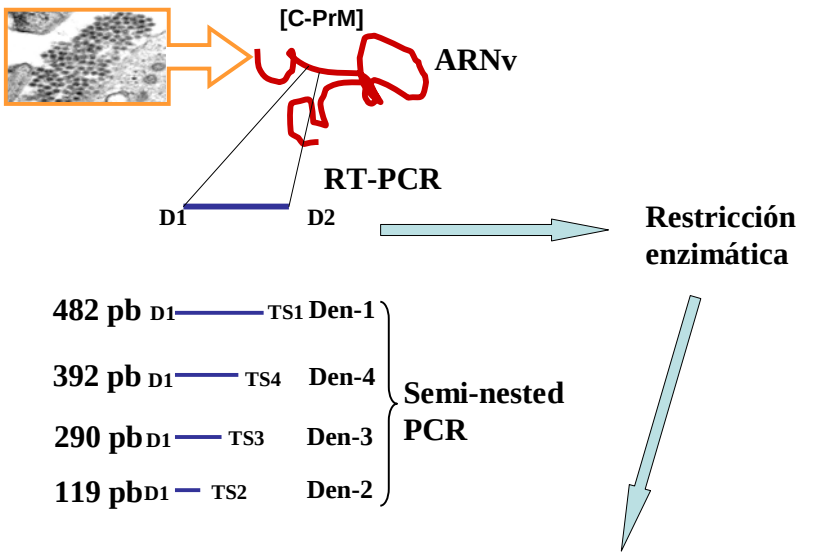
1. Generic detection of flaviviruses using degenerated primers and internal control and specific identification by jeans of sequencing. Sánchez-Seco MP, Rosario D, Valdes K, Guzmán MG, Tenorio A. J Virol. Method 2005, 126(1-2):101-109.

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

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

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

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



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

1. Rotular 5 tubos eppendorf de 0.5 mL (1 con el nombre de cada enzima empleada y 1 tubo control, al que no se le añade ninguna de las enzimas. Adicionar secuencialmente:
2. 8 µL del producto amplificado del RT/PCR
3. 1 µL del tampón de la enzima de restricción correspondiente
4. 1 µL de la enzima de restricción según el rotulo (HaeIII, AluI, RsaI, HinfI) o 1 µL de agua (Control).
5. Incubar a 37 º C, 1 hora
6. 2 µL de tampón de aplicación para electroforesis
7. Preparar un gel de agarosa al 4 % con TBE 1X con 1 µg/mL de bromuro de etidio (igual procedimiento al descrito en **IV.1**.)
8. Aplicar todo el volumen de la reacción con cada enzima, en un orden fijo en el gel
9. Visualización de las bandas a través de luz UV (Fig.4).

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

Referencias

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

DETECCIÓN DE LA CARGA DE VIRUS DENGUE MEDIANTE REVERSO TRASCRIPCIÓN- REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (RT/PCR-TR Ó CV).

1. Extracción del ARN viral mediante el QIAamp Viral RNA Mini Kit.: Se realiza siguiendo el protocolo propuesto por el fabrican. (Ver acápite A-III)

2. Transcripción reversa.

El ADN copia (ADNc) es obtenido a partir de 8 µL de ARN extraído, que se adicionan a una mezcla de reacción que contiene: 200ng de cebador al azar (en inglés, *random hexamers*) (Roche), dNTP 10mM (Qiagene) y agua libre de nucleasas (Sigma), para un volumen final de 13µl. Esta mezcla es llevada al termociclador (Mastercycler, Eppendorf), dónde se sometie a 65 ^{0}C por 5 min. Seguidamente se colocan los viales en hielo por un minuto y a esta mezcla se le añade una segunda que contiene: 4 µL del tampón 5x, DTT 5mM, 16U RNAsa Inhibitor, 40U Superscript III-RT (Invitrogene) y agua libre de nucleasas, cantidad suficiente para 20µl de reacción. La transcripción reversa se llevó a cabo en el mismo termociclador con el siguiente programa: durante 5 min a 25^{0} C, seguido de 1h a 50^{0} C y por último 70^{0} C por 15 min. El ADNc obtenido puede ser guardado a 4^{0} C hasta su utilización, por corto tiempo (no más de una semana) o utilizarlo directamente en el próximo paso.

3. Ensayo TaqMan.

Para la realización del ensayo TaqMan se emplean las sondas y los cebadores específicos para cada serotipo, propuestos por Laue y col. en 1999, que amplifican parte de la región del genoma viral que codifica para la proteína no estructural NS5, con modificaciones realizadas en la unidad en la Universidad de Oxford del Hospital Ho Chi Minh de Vietnam (Simmons C, datos no publicados) y empleando las concentraciones propuestas por esta institución.

Para la realización de esta técnica se siguieron los siguientes pasos:

1. Se añaden 5 µL del ADNc a cada capilar de cristal (Roche) que contiene: 4 µl de la mezcla de reacción (Taq FastStart DNA polimerasa, tampón de

reacción, MgCL2 y mezcla de dNTP, con dUTP en lugar de dTTP, contenido en el estuche comercial *LightCycler TaqMan Master PCR*, Roche), los cebadores específicos según el serotipo a una concentración final de 0,75µM, la sonda TaqMan según el serotipo a una concentración final de 0,25 µM para los virus DEN-1, DEN-2 y DEN-4 y 0,3 µM para el virus DEN-3 **(Tablas 1 y 2)** y agua libre de nucleasas, cantidad suficiente para un volumen final de 20 µl. Estos capilares se colocan en una gradilla con soportes para capilares, previamente refrigerada.

2. Los capilares en su soporte se someten a una centrifugación durante 1 min a 1300 rpm.

3. Posteriormente, cada capilar conteniendo la mezcla de reacción se coloca en el carrusel del equipo LightCycler 1.5 (Roche) y se inicia el programa siguiente: 95^{0}C por 14 min, 45 ciclos (95^{0}C, 15 seg; 60^{0}C, 1 min; 72^{0}C, 1 seg) y 5 min a 72^{0}C.

Tabla 1. Cebadores empleados para el ensayo TaqMan, secuencia de bases y talla del producto amplificado.

	CEBADOR POSITIVO	CEBADOR NEGATIVO	TALLA (pb)
DEN-1	5´ATCCATGCCCACCAYCAATG 3´	5´CAGGGATCCACACCAYTGATC 3´	162
DEN-2	5´ACAAGTCGAACAACCTGGTCCAT 3´	5´GCCGCACCATTGGTCTTCTC 3´	177
DEN-3	5´TTTCTGCTCCCACCACTTTCAT 3´	5´TGGCGTTGGATGCYAGTCT 3´	229
DEN-4	5´GYGTGGTGAAGCCYCTRGAT 3´	5´AGTGARCGGCCATCCTTCAT 3´	186

Tabla 2. Sondas utilizadas para el ensayo TaqMan y secuencia de bases de las mismas.

SEROTIPO	SONDAS
DEN-1	5´FAM-TCAGTGTGGAATAGGGTTTGGATAGAGGAA- 3´TAMRA
DEN-2	5´FAM-GTTTTGTCTTCCATCCA-3´BHQ-1
DEN-3	5´FAM-AAGAAAGTTGGTAGTTCCCTGCAGACCCCA-3´TAMRA
DEN-4	5´FAM –ACTTCCCTCCTCTTYTTGAACGACATGGGA-3´TAMRA

4. Cálculos

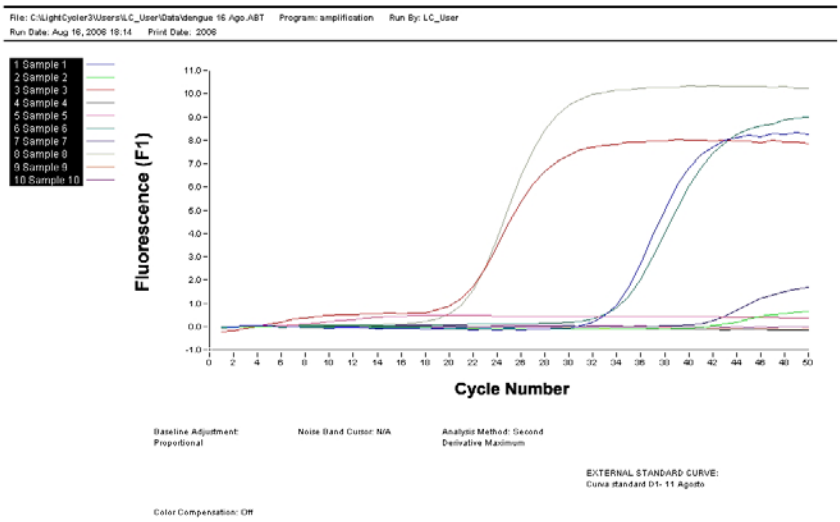
Por las características de este tipo de ensayo, mientras transcurre el ciclado se puede observar en pantalla las muestras que comienzan a mostrar un resultado positivo de acuerdo a la lectura de fluorescencia que va haciendo el equipo de cada muestra debidamente individualizada.

Análisis de los resultados: para el análisis del resultado por TaqMan se utiliza el programa 3.5.3 (modo aritmético del método SDMM) del LightCycler 1.5.

Criterio de positividad y de negatividad: se considera positiva toda muestra de suero o de sobrenadante de cultivo celular infectado, cuya señal de fluorescencia es detectada por el LightCycler y como negativa aquella que no detecta señal.

Cuantificación de amplicones en muestras clínicas: para la cuantificación del ADNc amplificado en cada muestra de suero, se importa la curva estándar correspondiente según el serotipo.

Al concluir el programa de corrida se puede cuantificar la carga viral presente en la muestra importando una curva estándar previamente realizada y guardada en el programa o empleando los valores de la curva que ha corrido en el mismo ensayo con las muestras clínicas. Los resultados de carga viral se cuantifican en UFP/mL, como se establecieron durante la estandarización de la técnica, acorde a las unidades que tienen cada punto de la curva. Otros parámetros del programa pueden ser chequeados para conocer que los resultados son válidos.

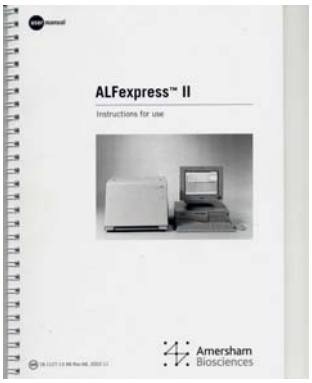


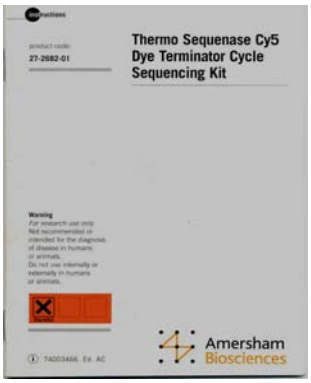
Referencias

1. Laue T, Emmerich P, Schmitz H. Detection of dengue virus RNA in patients after primary or secondary dengue infection by using the TaqMan automated amplification system. J Clin Microbiol. 1999 Aug; 37(8):2543-7.

SECUENCIACIÓN NUCLEOTÍDICA DIRECTA DEL PRODUCTO DE PCR

Se emplea el equipo de secuenciación automática: **ALFexpress ™ II (Amersham Biosciences)** y un estuche comercial para las reacciones de secuencia **(Termo Sequenase Cy5 Dye Terminador Cycle Sequencing Kit).**





El equipo ALFexpress II DNA Analyser, está diseñado para la detección automática de moléculas de ADN separadas por electroforesis y se basa en el método de secuenciación tradicional de Sanger, con la diferencia que se utilizan dideoxinucleotidos maracados fluorescentemente en lugar de los marcados con isótopos radioactivos. El Sistema ALFexpress II DNA Analyser consiste en un sistema de electroforesis, una computadora externa con un software disponible para el control de la corrida electroforética, almacenamiento y análisis de los datos. Durante la electroforesis, los fragmentos marcados son excitados al pasar por un rayo láser que se encuentra dirigido hacia el gel, perpendicularmente a la dirección de las bandas de migración. La luz emitida por los fragmentos es detectada por fotodetectores que están ubicados detrás del gel, uno en cada carril. El equipo cuenta con 40 carriles con sus correspondiente fotodetectores, lo que equivale a 10 muestras por corrida, ya que se requieren reacciones independientes con cada uno de los dideoxinucleotido (ACGT) por estar marcados con el mismo flourógeno (Cy5). Las señales colectadas por los fotodetector son enviadas a la comoputadora donde son procesadas para dar como resultado final un cromatograma en tiempo real. Se utilizan 4 colores diferentes para representar cada una de las bases.

Preparación de las reacciones de secuencia:

1. Para las reacciones de secuencia se prepararan las siguientes mezclas de deoxinucleotidos (dNTP: dATP, dCTP, dGTP y dTTP) y dideoxinucleotidos (ddNTP) marcados con Cy5 en cuatro tubos de reacción correspondientes a cada ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP y ddTTP).

	Mezcla A	Mezcla C	Mezcla G	Mezcla T
1.1 mM dNTP	4 µL	4 µL	4 µL	4 µL
Cy5 ddNTP	2 µL	2 µL	2 µL	2 µL
Agua desionizada	16 µL	16 µL	16 µL	16 µL
Volumen total	22 µL	22 µL	22 µL	22 µL

2. Se prepara además la mezcla de reactivos siguiente:

ADN	3 µL (1-20 µL)
Primer (4 pmoles)	1µL
Buffer de reacción	3.5 µL
ADN polimerasa Thermo Sequenase I 10 U/µL	1 µL
Agua destilada	17.5 µL (completar hasta 27 µL dependiendo de la cantidad de ADN añadido)
Volumen total	27 µL

3. A cada uno de los tubos de reacción que contiene los ddNTP marcados se adicionan 6 µL de la mezcla de reactivos que contiene el producto amplificado que se desea secuenciar (ADN). La mezcla final se coloca en un termociclador y la reacción de secuencia se lleva a cabo siguiendo 30 ciclos del siguiente programa: 95°C (30s), 55°C (30 s) y 72°C (80 s)

4. Posteriormente se procede a la purificación de los productos de secuencia mediante el método de precipitación con etanol, para lo cual se adicionan 2 µL de acetato de amonio 7.5 M, 2 µL de solución de Glycogen y 30 µL de etanol 100%.La mezcla se mantiene toda la noche a -20 °C.
5. Después de una centrifugación a 13 000 rpm se eliminan los sobrenadantes y se lavan los precipitados con 200 µL de etanol frío al 70 %. Nuevamente se centrifugan durante 5 minutos, se elimina el etanol y se mantiene el tubo abierto por unos minutos para obtener un precipitado seco, el cual se resuspende en 6 µL de formamida al 99.5 %.
6. Previo a la corrida electroforética las muestras resuspendidas en formamida se desnaturalizan 72 °C por 2.5 min y se colocan en hielo hasta su aplicación en el gel.

Corrida Electroforética

1. La corrida electroforética se lleva a cabo en geles ReproGel Long Read o High Resolution, Amersham Biosciences en dependencia del tamaño de los fragmentos a secuenciar. Los mismos se preparan mezclando as soluciones **A y B**.

A: acrilamida/bisacrilamida

B: TBE 1X (Tris 0.1 M, Ácido Bórico 83 mM y EDTA 1 mM), agente desnaturalizante e iniciador de la polimerización.

2. La polimerización se logra con luz UV utilizando el equipo ReproSet, Amersham Biosciences.
3. Una vez que el casete que contiene el gel queda acoplado al secuenciador, se añade el buffer de corrida (TBE 0.5X) y se aplican las muestras correspondientes. Las condiciones de corrida dependen del tipo de gel empleado:

ReproGel Long Read	**ReproGel High Resolution**
Voltaje: 1500 V	Voltaje: 1500 V
Corriente: 60 mA	Corriente: 60 mA
Potencia: 25 W	Potencia: 30 W
Temperatura: 55ºC	Temperatura: 55ºC
Tiempo de corrida:750 min	Tiempo de corrida:450 min

Toda la corrida electroforética es controlada a través de una computadora utilizando el Programa ALFwin Instrument Control 2.00. Al finalizar la corrida, los cromatogramas de cada una de las secuencias obtenidas quedan debidamente almacenados.

La edición de las secuencias, así como el ensamblaje para la obtención de las secuencias consenso se realizó mediante el programa ALFwin. Sequence Analyser 2.11.

Referencias

1. ALFexpress II Instruction for use. User Manual, Amersham Biosciences.
2. Thermo Sequenase Cy5 Dye Terminator Cycle Sequencing Kit. Intructions. Amersham Biosciences.

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

La tecnología de expresión diferencial de mRNA es una poderosa herramienta para la identificación y la clonación de genes diferencialmente expresados. Este método comprende: la transcripción inversa de mRNA con cebadores de oligo-dT que se incorporan a la cola de poli(A), la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) en la presencia de un segundo cebador corto cuya secuencia es arbitraria y la corrida electroforética, en un gel de secuenciación de DNA, de las subpoblaciones de cDNA amplificadas.

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

Materiales:

- tampón de transcripción inversa 5X
- transcriptasa inversa MMLV (100 u/µl)
- dNTP (250 µM)
- H-T_{11}G (2 µM)
- H-T_{11}A (2 µM)
- H-T_{11}C (2 µM)
- tampón de RCP 10X
- dNTP (25 µM)
- H-AP1 (2 µM)
- H-AP2 (2 µM)
- H-AP3 (2 µM)
- H-AP4 (2 µM)
- H-AP5 (2 µM)
- H-AP6 (2 µM)
- H-AP7 (2 µM)
- H-AP8 (2 µM)
- control de RNA (1 µg/µL)
- glucógeno (10 mg/mL)

- H_2O destilada (H_2Od)
- colorante de corrida
- Taq DNA polimerasa (5 u/µL) o AmpliTaq DNA polimerasa (5 u/µL)
- α-[^{33}P]dATP (2 000 Ci/mmol) o α -[^{35}P]dATP (1 000 Ci/mmol)
- El sistema RNAimage fue optimizado usando Taq DNA polimerasa de Qiagen o Perkin Elmer y α-[^{33}P] dATP de New England Nuclear. DNA polimerasas termoestables producidas por otras casas comerciales pueden no ser compatibles con el sistema RNAimage.
- MessageCleanKit de la Corporación GenHunter. El RNA total debe ser purificado de contaminantes de DNA cromosomal con este sistema, antes de su uso en differential display.

Métodos:

Transcripción inversa del mRNA

1. Descongelar los siguientes componentes y poner en hielo:

Para un volumen final de 20 µL	µL
H_2Od	9.4
Tampón de transcripción inversa 5X	4.0
dNTP (250 µM)	1.6
RNA total (libre de DNA)	2.0 (0.1 µg/µL, diluido en el momento de ser usado)
H-T_{11}M* (2 µM)	2.0
Total	19.0

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

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

condensación. Poner los tubos en hielo para la RCP o guardar a –20º C para su uso posterior.

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

El control de RNA (libre de DNA) es el RNA total aislado de fibroblastos transformados de embrión de rata y está previsto que sirva como un control de la amplificación de mRNA dependiente de la transcripción inversa y con cualquiera de las combinaciones de cebadores. El control de RNA debe ser diluido justo antes de su uso, por adición de 9 µl de H_2Od o agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC.)

PCR

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

20 µL de volumen final para cada combinación de pares de cebadores	µL
H_2Od	10.0
Tampón de RCP 10X	2.0
dNTP (25 µM)	1.6
cebador H-AP (2 µM)	2.0
H-T_{11}M (2 µM)	2.0
Mezcla de transcripción inversa del paso 1 (debe contener el mismo H-T_{11}M usado para la PCR)	2.0
α-[^{33}P]dATP (2 000 Ci/mmol)	0.2
Taq DNA polimerasa (Qiagen)	0.2
Total	20.0

Nota: Se puede usar 1 µl de α-[^{35}P] dATP (1 000 Ci/mmol) en lugar de α-[^{33}P] dATP (2 000 Ci/mmol). Ajustar el volumen total con H_2Od.

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

Electroforesis en gel desnaturalizante de poliacrilamida a 6 %.

1. Preparar un gel desnaturalizante de poliacrilamida a 6 % en tampón TBE. Dejar polimerizar por al menos 2 horas antes de su uso. Poner a correr el gel durante 30 minutos. Es crucial que la urea en los pozos sea completamente lavada justo antes de correr sus muestras. Para una mejor resolución, lavar cada cuatro a seis pozos durante la adición de las muestras, mientras se trata de no afectar las muestras que ya han sido adicionadas.
2. Mezclar 3.5 µl de cada muestra con 2 µl de colorante de corrida e incubar a 80º C por 2 minutos inmediatamente antes e adicionarlas a un gel de secuenciación de DNA al 6 %.
3. Poner a correr durante 3.5 horas a 60 watts (el voltaje no debe exceder de 1700) hasta que el colorante de xileno (de menor movilidad en el gel) alcance el borde inferior del gel. Apagar la fuente de energía y secar el gel sobre un papel 3M. Cubrir el gel con una envoltura plástica y secarlo al vacío en un secador de geles a 80º C por 1 hora. (Debido a que el DNA es sensible a ácidos, no fijar el gel con metanol/ ácido acético debido a que esto puede conducir a problemas en la reamplificación.)

Reamplificación de las sondas de cDNA

1. Orientar el autorradiograma y el gel seco con tinta radioactiva o con un corte en un extremo antes de exponerlos a la película de rayos-X.

2. Después de revelar la película (el tiempo de exposición puede variar desde toda la noche hasta 72 horas), orientar el autorradiograma con el gel. Marcar las bandas de interés por perforación a través de la película con una aguja en los cuatro extremos de cada banda de interés. (Manipular el gel seco con guantes y guardarlo entre dos hojas de papel limpio.) Extraer las bandas marcadas con un bisturí limpio.

3. Poner los fragmentos de gel en tubos y añadir tampón de RCP 2X.

4. Hervir los tubos con la tapa bien cerrada (con parafilm) durante 15 minutos.

5. Centrifugar durante 2 minutos para recoger la condensación y precipitar los desechos de gel.

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

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

8. Disolver el precipitado en 10 µL de H_20d y usar 4µL para la reamplificación. Guardar el resto a –20º C.

9. La reamplificación debe ser realizada con el mismo juego de cebadores y en las mismas condiciones de la RCP, excepto que las concentraciones de dNTP deben ser de 20 µM (usar la mezcla de dNTP de 250 µM) en lugar de 2 a 4 µM y que no

se añaden isótopos. Se recomienda que el volumen de la reacción de reamplificación sea de 40µL.

Reactivos	µl
H_2Od	20.4
tampón de la Taq DNA polimerasa 2X	4.0
dNTP (250 µM)	3.2
cebador H-AP (2 µM)	4.0
H-T_{11}M (2 µM)	4.0
molde de cDNA del paso 8	4.0
Taq DNA polimerasa (Qiagen)	0.4
Total	40.0

Se corren treinta microlitros de las muestras de RCP en un gel de agarosa a 1.5 % y se tiñen con bromuro de etidio. Si usted falla en reamplificar la sonda de cDNA en una primera ronda de RCP, puede usar 4 µl de una dilución 1:100 de la muestra de la primera ronda de RCP como molde para otra amplificación de 40 ciclos. Aproximadamente 90 % de las sondas debe ser visible en geles de agarosa después de la primera ronda de RCP. Guardar el resto de las muestras de RCP a –20º C para clonación.

10. Verificar que la talla de los productos de RCP reamplificados se corresponden con sus tallas en el gel de secuenciación del DNA. Extraer la sonda de cDNA reamplificada del gel de agarosa mediante un sistema QIAEX de Qiagen.
11. Analizar la identidad de la sonda por hibridación Northern antes de la clonación o de forma más eficiente por hibridación inversa Northern después que la sonda ha sido clonada (PCR-TRAP Cloning System and ReversePrime cDNA labeling kit de la Corporación GenHunter.) El segundo de estos métodos permite la verificación simultánea de múltiples sondas.
12. Clonar la sonda de cDNA usando PCR-TRAP Cloning System de la Corporación GenHunter.

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

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

Referencias

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

ENSAYO DE LINFOPROLIFERACIÓN A PARTIR DE CÉLULAS HUMANAS DE SANGRE PERIFÉRICA

Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica.

1. Punción de la vena cubital con extracción de sangre en condiciones asépticas. Descargar jeringuilla en tubo de 50ml con Heparina (12-15 UI/mL de sangre). Mezclar por inversión del tubo.
2. Diluir la sangre heparinizada 1/2 en PBS, solución salina 0.9% o solución de Hank modificada (sin Calcio ni Magnesio).
3. Montar sangre diluída sobre Medio de separación de CMP Ficoll-Hypaque (Sigma) (densidad =1.077g/ml) a temperatura ambiente.
4. Centrifugar a 800g(2500rpm) durante 30 minutos a 22-25 ^{o}C .
5. Extraer con pipeta Pasteur el anillo de células mononucleares periféricas (CMP) y dispensarlo en tubos 12-15 mL fondo redondo (o cónico). Completar el tubo con solución de Hank modificada a 4°C.
6. Centrifugar a 400g (1800 rpm) 10 minutos a 4^{0}C.
7. Decantar sobrenadante, resuspender el pellet celular gentilmente y completar el tubo con solución de Hank modificada.Repetir dos lavados en iguales condiciones.
8. Resuspender el pellet en 2ml de RPMI-1640 suplementado (STF 10%, Glutamina 100mM, Peni-estrepto 100UI-100ug/mL).
9. Conteo de células en cámara de Neubauer con colorante Turk violeta. Medir viabilidad con Tripán azul. Se preparan diluciones 1/20 de las células con el colorante. Contar 4 cuadrantes externos de la cámara, luego aplicar la fórmula:

$$\text{Cel/ml de medio} = \frac{\text{\# Cel. Contadas x Dilución en colorante. } 10^4}{\text{\# Cuadrantes contados}}$$

Ensayo de linfoproliferación:

1. Ajuste de células a la concentración de 1×10^6/ml en medio RPMI-1640 suplementado.
2. Dispensar 100uL de células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos, fondo en U(Costar/Falcon).
3. Añadir antígenos (virus dengue purificado a partir de cerebro de ratón lactante) o mitógenos como PHA o medio en control de síntesis espontánea por triplicados, a concentraciones deseadas, en un volumen de 100 uL/pozo.
4. Incubar placas a 37^0 C, atmósfera húmeda, 5% de CO_2 durante 6 días para antígenos y 3 días para mitógenos.
5. Dar pulso con timidina tritiada 6 horas antes de completar el tiempo de incubación a 1uCi/pozo.
6. Tras completar el tiempo de incubación congelar la placa a -70 ^{0}C hasta el momento de su cosecha.
7. Cosechar las células con Cosechador automático (Cell harvester, Skatron) sobre papel de fibra de vidrio (Skatron).
8. Poner a secar el papel a temperatura ambiente durante toda la noche, a 37^0C durante 3 horas o a 60^0C durante durante 30 minutos.
9. Dispensar los discos en papel de fibra de vidrio en viales de centelleo.
10. Añadir Coctel líquido de centelleo (Scitran) 1mL en viales pequeños o 5ml en viales grandes.
11. Contar en contador de centelleo líquido (LKB) a 1 min/vial.

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

Referencias

1. Bojum A. (1968) Isolation of leucocytes from human blood. Further observations. Methylcellulose dextran and Ficoll as erythrocyteaggregating agents. Scand J. Clin Lab. Invest 21 supplement 97, 31-50.

ENSAYO DE LINFOPROLIFERACIÓN A PARTIR DE ESPLENOCITOS DE RATÓN

Aislamiento de esplenocitos

1. Extracción de los bazos en condiciones asépticas (incisión lateral izquierda y disección del órgano).
2. Obtención de los esplenocitos por perfusión o macerado de los bazos con solución de Hank modificada a 4°C.
3. Completar a 15 ml con solución de Hank modificada a 4°C.
4. Centrifugar a 400g (1800 rpm) 10 minutos a 4°C.
5. Decantar sobrenadante, resuspender el pellet celular gentilmente.
6. Lisis de eritrocitos por choque osmótico con tampón de hemólisis (NH_4Cl 0.15M, Tris 9.9mM pH 7.2) a 4°C por 10 minutos.
7. Lavar por centrifugación a 400g (1800 rpm) 10 minutos a 4°C. con solución de Hank modificada.Repetir dos lavados en iguales condiciones.
8. Resuspender el pellet en 2ml de RPMI-1640 suplementado (STF 10%, Glutamina 100mM, Peni-estrepto 100UI-100ug/ml).
9. Conteo de células en cámara de Neubauer con colorante Turk violeta. Medir viabilidad con Tripán azul. Se preparan diluciones 1/20 de las células con el colorante. Contar 4 cuadrantes externos de la cámara, luego aplicar la fórmula:

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

10. Ajuste de células a la concentración de $2x10^6$/ml en medio RPMI-1640 suplementado.
11. Dispensar 100ul de células por pozo en placas de cultivo de 96 pozos, fondo en U (Costar/Falcon).
12. Añadir antígenos o mitógenos (o medio en control de síntesis espontánea) por triplicados, a concentraciones deseadas, en un volumen de 100 ul/pozo.
13. Incubar placas a 37° C, atmósfera húmeda, 5% de CO_2 durante 4 días para antígenos y 3 días para mitógenos.
14. Pulso con 1uCi/pozo de timidina tritiada (Amershan) por 18 horas.

15. Añadir Timidina tritiada a la concentración de 1μCi/pozo.
16. Incubar 6 horas.
17. Congelar a -70^{0}C.
18. Descongelación.
19. Cosecha.
20. Conteo de cpm.

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

Referencias

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

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

1. Preparación de gelatina al 3% en agua. Seguidamente esterilizar y disolver por autoclave.
2. Colocar sobre los frascos 10 mL e incubarlos toda la noche a 50 ^{0}C.
3. Aislar las CMSP según el método de Boyum et al., 1968.
4. Colectar el anillo así como el plasma.
5. Añadir 15 mL de plasma.
6. Incubar 1hora a 37^{0}C.
7. Absorber el plasma y lavar dos veces con RPMI sin suplementar (10mL /frasco).Observar la limpieza al Microscopio.
8. Colocar las CMSP en RPMI al 10 % STF
9. Incubar de 60-90 minutos, 37^{0}C, 5%CO_2.
10. Extraer células que no se pegaron: Lavar con RPMI 2 veces y chequear al microscopio.
11. Añadir sln salina fría (20 mL).
12. Incubar 5 minutos.
13. Desprender y centrifugar 7 minutos 4^{0}C a 1500 rpm.
14. Resuspender en RPMI al 2% de STF, si el objetivo siguiente es infectarlas (la infección se realiza empleando la técnica de Shell vial descrita previamente).
15. Ajustar a 5x 10^8 células.

Referencias

1. Boyum et al. Isolation of leucocytes from human blood. Isolation of mononuclear cell by one centrifugation and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. SCAND.J Lab. Invest **1968**; 21 (97): 77-89.

DETECCIÓN DE CITOQUINAS INTRACELULARES Y MARCADORES CELULARES DE SUPERFICIE POR CITOMETRÍA DE FLUJO EN CULTIVOS DE CÉLULAS MONONUCLEARES MURINAS ESTIMULADAS CON ANTÍGENOS/MITÓGENOS.

1. **Bloqueo de Receptores FC para disminuir marcaje fluorescente no-específica**.
   - Se emplea un Ac anti receptor FC γ II/III, 1ug/10^6 en 100 ul de tampón de marcaje (PBS-Dulbecco, STF 1% inactivado, Azida Sódica 1%, pH 7.4-7.6) filtrado; (TM)
   - Incubar 30 minutos 4 ^{0}C.
2. **Marcaje de Antígenos de Superficie**.
   - Depositar 10^6 células en 100 uL de Tm en tubos precubiertos con ACM específico conjugado a fluorocromos (0,5 ug)
   - Incubar 30 minutos a 4 ^{0}C.
   - Lavar 2 veces con TM 1 mL/tubo 250 x g, 10 minutos.
   - Desagregar con vortex.
3. **Fijado y Permeabilización de las células.**
   - Resuspender las células en 200 ul de solución de fijado y permeabilización.
   - Incubar 20 minutos a 4 ^{0}C.
   - Lavar en las mismas condiciones que en el paso 2.
4. **Marcaje de citoquinas intracelulares**.
   - Depositar 10^6 células en 100 uL de Tm en tubos pretratados con AcM específico conjugado a fluorocromos (5 ug)
   - Incubar 30 minutos 4 ^{0}C
   - Lavar en las mismas condiciones que en el paso 2.
5. **Análisis Citométrico.**
   - Control de marcaje para citoquinas intracelulares: Después de paso 3.

- Depositar 10^6 células en 50 uL de Tm en tubos pretratados con ACM específico NO conjugado a fluorocromos (5 ug), del mismo clon del conjugado.
- Añadir el AcM específico conjugado a fluorocromos (5 ug) en 50 uL.
- Incubar 30 minutos 4 ^{0}C.
- Lavar en idénticas condiciones que en el paso 2.

Referencias

1. Haynes J. L. (1988) Principles of flow cytometry. Cytometry supplement 3: 7-17.
2. Prussin C. (1992) Cytokine flow cytometry: Understanding Cytokine Biology at the single cell level. Journal of Clinical Immunology vol 17 No 3.

ENSAYO DE INMUNOAMPLIFICACIÓN

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

Materiales:

- Células K_{562}.
- Virus: dengue 2 (D2) previamente titulado
- Anticuerpos: sueros humanos con anticuerpos neutralizantes contra el virus dengue 1 (D1), sueros hiperinmunes o líquidos ascíticos hiperinmunes producidos contra D1 en animales de laboratorio.

Preparación de las células K_{562}.

Las células K_{562} se desprenden por agitación vigorosa, de la superficie de frascos de cultivos celulares de 150 cm^2 y se centrifugan. Estas células se resuspenden en medio de mantenimiento RPMI con 2 % de suero de ternera fetal y 2 mM de glutamina, para obtener una suspensión celular con una concentración de $2x10^5$ células/mL.

Preparación de las mezclas de reacción

1. Se hacen diluciones seriadas de los sueros, en medio RPMI, desde 1/10 hasta 1/3906250, y se ponen 50 µl de cada dilución de sueros en placas de 96 pozos. A una fila de esta placa se añaden 50 µL de idénticas diluciones de un suero que contenga anticuerpos inmunoamplificadores (control positivo de suero) y a otra fila se añaden 50 µL de RPMI (control de virus).
2. Se diluye el virus D2 de manera tal que al ser añadido a las células K_{562} quede en una multiplicidad de 0.0006. Se adicionan 50 µL de esta dilución de virus a cada uno de los pozos que contienen diluciones de sueros o medio RPMI.
3. Se incuban las mezclas de virus-suero y las de virus-RPMI, durante 1 hora, a 37º C.
4. Se añaden 100 µL de células K_{562} y se incuban las mezclas de reacción durante 48 horas, a 37º C y 5 % de CO_2. Pasado este tiempo se congela la placa a –70º C.

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

Cada mezcla virus-suero o virus-RPMI debe ser titulada, sin diluir y por duplicado, en células BHK21 (para el método de titulación ver p. 33.)

Se considera que se ha producido ADA si:

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

x_1 – número de placas del virus con suero

x_0 – número de placas del control de virus

PROCEDIMIENTO PARA ELISPOT DE INF GAMMA

1. Recubrir la placa con el anticuerpo primario (Ac anti IFN gamma): concentración de trabajo 3ug/ml de PBS para una placa (100 ul/pozo 10ml PBS + 30 ug de Ac anti IFN gamma).
2. Aislamiento de PBMC según el protocolo habitual.
3. Lavar tres veces con 200 ul /pozo de PBS estéril o RPMI.
4. Bloquear la placa con 200 ul de PBS / BSA: 5g de BSA fracción V en 500 ml de PBS y filtrar por 0.2um o RPMI 10% FCS + 1% P/S de 1 a 4 horas a TA.
5. Ajustar las PBMC a $3x10^6$ (300 000/pozo) o 5x 10^6 (500 000/pozo).
6. Añadir los antigenos que se usaran para estimulación: Péptidos (diluir los péptidos a una concentración de 20 ug/ml en RPMI (5 mg/ml stock: 0.4 ul/100 ul).
7. Eliminar el bloqueo aspirando el contenido de los pozos.
8. Lavar 3 veces con 200ul de PBS, (puede no lavarse).
9. Dispensar las células 100 ul y los antígenos 100ul para un total de 200 ul / pozo.
10. Cultivo: 24h, 48h o toda la noche.
11. Lavar 3 veces 200 ul PBS y 3 veces con 200 ul PBS Tween 20al 0.05 % o 6 veces con PBS Tween al 0.05%.
12. Incubar 10 min con PBST 20 0.05%. Eliminar bien el detergente con cuidado de no tocar el fondo del pozo.
13. Preparar el segundo anticuerpo a 2mg/ml en PBS Tween- BSA.
14. Incubar over night a 4 grados
15. Lavar 4 veces con PBS Tween 105 ul /pozo.
16. Preparar estreptavidina 1/2000: 5ul para 10 ml.
17. Incubar 2 horas a TA.
18. Lavar 3 veces con PBS T y 3 con PBS.

19. Sustrato aminoetil carbazol: 12 ml de buffer +0.4 ml de AEC+ 12 ul de H_2O_2.
20. Añadir 200 ul por pozo y dejar de 1 a 5 min.
21. Interrumpir la reacción lavando con abundante agua de la pila.
22. Dejar las placas secar toda la noche y contar manchas usando un microscopio de disección.

Referencias

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

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

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

DETERMINACIÓN DEL POLIMORFISMO DE LOS GENES DE CITOQUINAS

Extracción de ADN

El ADN genómico se extrae del plasma utilizando un Kit de Extracción de ADN (QIAmp DNA mini Kit and QIAmp DNA Blood mini kit, Qiagen, 2003) y se almacena a -20 ^{0} C para posterior análisis de genes. Brevemente se mezcla 200 ul de sangre venosa periférica con 20 ul de proteinaza K, se mezcla vigorosamente y se añaden 200 ul del buffer AL. Se mezcla vigorosamente y se incuba a 56 ^{o} C al menos 10 minutos. Tras un golpe de centrifuga se añade 200 ul de etanol absoluto, se mezcla, y tras otro golpe de centrifuga se añade sobre la columna que contiene una membrana de alta avidez por el DNA. Se decanta el contenido y se pone sobre un vial limpio. Se lava la columna con 500 de buffer AW1, y 500 ul de AW2, con centrifugacion intermedia de 1 minuto a 8000 RPM y una final de 5 minutos 13000 RPM. Tras centrifugar 2 minutos a 13000 para secar la columna esta se pone sobre un vial limpio y se procede a la elución del ADN añadiendo 20 ul de agua destilada en el centro de la membrana, incubando 10 minutos a TA y centrifugando 10 minutos a 13000.

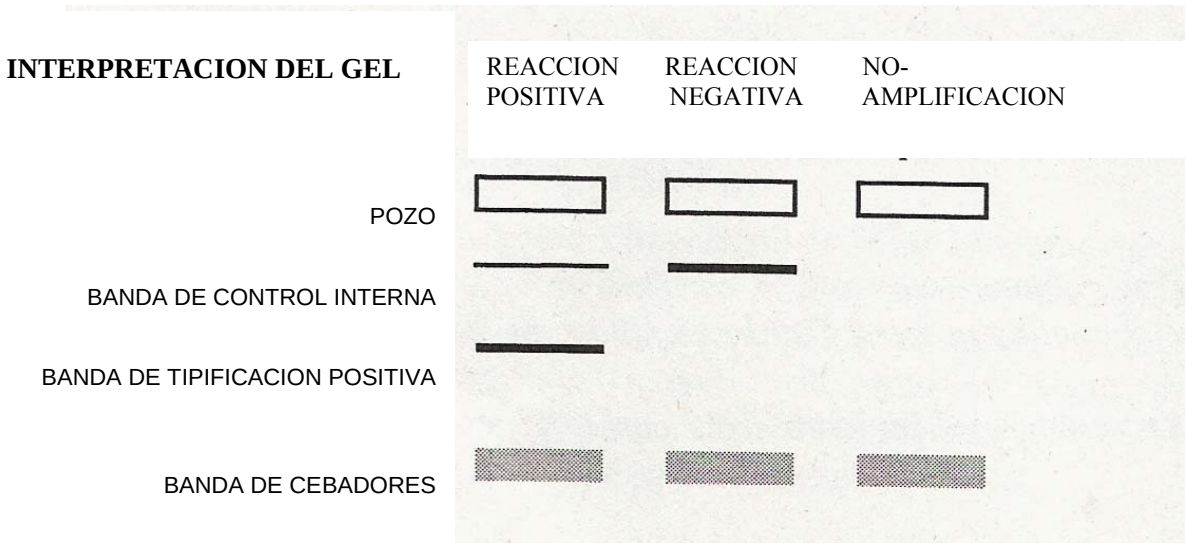
PCR para tipicación de genes polimórficos

El ADN se tipifica por PCR para identificar los alelos polimórficos de los genes de citoquinas IL-10, TGF β1, IFN γ , TNF-α e IL-6 (One Lambda Inc Kit, Cytokine Genotyping Tray) de acuerdo a las instrucciones del productor. Brevemente, se prepara la mezcla de 7 ul de D-Mix, 2 ul de cebadores de la citoquina correspondiente, y 0,05 de Taq polimerasa. Se adiciona 1 ul de ADN más 9 ul de la mezcla. Se lleva al termociclador por 1 hora 20 minutos con el programa correspondiente.

Electroforesis

Se prepara un gel de agarosa al 2% (50ml de buffer TAE y 1g de agarosa).
Se aplican 10µl del producto de PCR en los pozos del gel y se dejan correr 15 min a 140V en buffer TAE según el Cytokine Genotyping Tray, One Lambda Inc Kit empleado en el genotipaje.

La banda de control interna y la banda ancha de cebador no incorporado se emplean como marcadores de talla. Cualquier banda entre las dos marcadores deben ser considerados como bandas de tipo positivo (Figura 1).



Referencias

1. Mattar R, de Souza E, Daher S. Preterm delivery and cytokine gene polymorphisms. J Reprod Med 2006;51(4):317-20.