

## **I.-SITUACIÓN EPIDEMIOLOGICA EN LA REGION.**

### **Prof. Angel Goyenechea Hernández**

Las infecciones respiratorias agudas (IRA) constituyen un importante problema de salud, tanto por las impresionantes cifras de morbilidad como por el elevado índice de mortalidad que provocan, sobre todo en los países en vías de desarrollo, así como por las afecciones que producen, ausentismo laboral y escolar, necesidades de atención médica, consumo de medicamentos y las afectaciones sociales en sufrimiento y vidas humanas.

En casi todos los países de la Región, incluyendo los desarrollados, la principal causa de consulta pediátrica ambulatoria son las IRA. Estudios realizados han comprobado que entre el 40 y 60 por ciento de las consultas pediátricas y entre el 20 y 40 por ciento de las hospitalizaciones se deben a IRA. Es común que los niños tengan entre 4 y 6 episodios de IRA al año, lo que implica una demanda de elevada atención médica. A su vez existen variaciones estacionales donde el mayor número de casos se dan en las épocas invernales, mientras que en las estaciones más calurosas esta proporción disminuye.

Las IRA son también la principal causa de administración de antibióticos y otros medicamentos a los niños menores de 5 años, la mayor parte de las veces innecesarias e inadecuadas ya que no contribuyen a mejorar los síntomas ni a la curación de la enfermedad. Además que tienen efectos tóxicos potenciales, y fomentan la aparición de resistencia bacteriana.

En la región, durante los últimos años se ha realizado un gran esfuerzo por cumplimentar los compromisos de la Cumbre Mundial a favor de la Infancia celebrada en 1990, lo que ha motivado que la reducción de la mortalidad por IRA tenga un impacto significativo. A pesar de estos esfuerzos, observamos en el siguiente cuadro las tasas estimadas de mortalidad por 100,000 habitantes, según causas en países seleccionados, donde las IRA están dentro de las cinco causas de mortalidad general en 16 de los 19 países seleccionados y dentro de las dos primeras causas en 18 de los 19 países entre el grupo de las enfermedades infecciosas, lo que indica que en nuestra región las IRA siguen constituyendo uno de los principales problemas de salud.

**TASA ESTIMADA DE MORTALIDAD POR 100.000 HABITANTES, SEGÚN CAUSA EN PAISES SELECCIONADOS. REGION DE LA AMERICAS, FINALES DE 1990.**

CAUSAS	ARG	BAR	BRA	CAN	CHI	COL	COR	CUB	DOR	ECU	ELS	JAM	MEX	PAN	PAR	PUR	TRT	USA	VEN
Infecciones intestinales	1.9	1.9	6.1	0.2	1.9	5.3	3.4	4.7	6.7	12.4	16.4	7.4	6.9	4.3	12.3	0.2	3.4	0.4	15.2
Enfermedades inmunoprevenibles	0.1	0.4	0.3	0.0	0.1	0.2	0.1	0.0	0.5	0.5	0.3	0.4	0.1	0.2	0.9	0.0	0.2	0.0	0.4
Septicemia	20.6	15.5	7.9	3.2	5.8	4.7	1.6	1.4	3.9	5.9	15.8	4.0	3.2	3.0	6.9	17.4	4.5	8.5	3.1
SIDA	5.4	34.3	8.8	4.5	2.5	4.1	3.6	1.0	11.3	1.2	6.5	0.0	4.3	15.2	0.7	27.3	18.8	7.8	4.2
Neoplasia de estómago	9.0	14.0	7.6	6.9	20.2	11.2	19.0	6.2	2.8	14.8	9.7	12.8	5.0	8.0	3.8	8.3	6.6	4.9	7.6
Neoplasia de colon, recto y ano	15.0	17.0	4.7	20.9	7.2	3.9	5.0	14.8	2.2	2.6	1.9	7.3	2.5	5.0	1.9	13.0	9.2	21.3	3.9
Neoplasia de tráquea bronquio y pulmón	24.1	9.9	9.4	52.3	12.7	7.3	6.3	31.5	4.4	4.3	2.8	11.3	6.6	7.1	3.5	16.2	7.5	57.7	8.6
Neoplasia de mama	14.1	17.2	5.3	17.0	6.7	3.6	4.8	9.5	2.1	2.5	1.8	7.7	3.5	4.1	2.9	9.3	10.2	16.0	4.2
Neoplasia de útero y placenta	6.8	13.0	4.4	3.6	6.6	5.6	5.5	8.5	3.6	6.8	7.9	9.3	5.4	5.6	6.1	3.5	8.6	4.1	6.7
Neoplasia de próstata	9.1	32.9	4.9	12.4	8.2	4.4	5.8	15.8	6.3	4.4	3.6	9.4	3.8	7.6	2.2	15.4	17.5	12.4	5.4
Leucemia, otras neoplasias hematopoyéticas	10.2	15.4	5.8	18.4	8.4	6.0	8.1	10.9	3.0	5.5	3.4	5.7	5.9	7.6	3.7	12.4	8.8	20.9	6.1
Diabetes Mellitus	21.0	88.4	19.6	18.8	15.6	13.7	9.3	18.9	13.3	18.4	15.8	53.8	42.9	19.3	11.0	61.8	92.3	23.8	20.3
Deficiencia nutricional	5.9	8.0	4.8	2.4	2.6	4.6	1.7	2.5	2.7	10.7	4.2	8.0	13.1	9.8	3.3	6.3	8.2	3.2	6.3
Enfermedad hipertensiva	13.1	20.7	14.4	4.7	12.1	14.7	10.4	9.9	13.7	25.4	3.0	32.5	9.8	6.7	6.0	27.0	29.9	16.2	15.5
Enfermedad isquémica del corazón	61.2	77.7	53.6	148.9	58.5	58.3	60.0	161.4	35.4	17.4	44.6	30.4	45.4	50.8	33.5	109.6	134.3	176.2	65.5
Enfermedades cerebro vasculares	68.4	130.4	59.5	53.4	50.9	36.9	29.3	72.8	28.2	26.1	22.0	86.7	26.5	48.9	45.0	46.0	88.6	60.1	35.5
<b>Infección Respiratoria Aguda</b>	<b>27.0</b>	<b>25.9</b>	<b>24.0</b>	<b>26.2</b>	<b>52.2</b>	<b>16.1</b>	<b>15.3</b>	<b>45.1</b>	<b>8.0</b>	<b>22.6</b>	<b>37.4</b>	<b>16.6</b>	<b>19.7</b>	<b>15.4</b>	<b>17.6</b>	<b>33.5</b>	<b>27.6</b>	<b>33.3</b>	<b>16.2</b>
Bronquitis enfisema y asma	4.2	7.2	6.6	6.6	6.4	4.7	6.3	7.3	3.6	7.6	7.7	7.1	8.3	5.8	3.0	12.7	10.8	9.8	4.1
Cirrosis y otras enfermedades hepáticas	8.9	11.6	11.4	7.3	24.7	4.2	10.7	9.1	12.0	12.0	10.9	3.0	25.1	6.6	3.1	21.7	6.3	9.5	7.7
Enfermedades del sistema urinario	17.2	21.3	8.6	11.8	11.8	7.2	8.5	6.0	3.9	13.6	22.9	17.5	11.6	9.5	6.2	24.9	16.3	17.2	7.3
Anomalías congénitas	9.0	4.5	6.4	3.9	8.1	6.1	11.2	5.7	3.9	4.9	6.2	1.8	10.3	13.8	5.6	5.6	6.4	4.9	9.0
Accidentes de transporte	11.8	8.7	20.4	11.2	---	19.1	16.0	---	14.4	16.1	26.1	1.1	15.4	17.8	7.3	17.4	11.5	17.2	20.1
Suicidio	6.3	5.8	4.1	12.9	---	3.3	5.4	---	1.8	4.7	9.1	0.1	3.4	4.8	2.1	8.5	14.0	11.5	4.8
Homicidio	4.5	7.1	24.2	1.6	---	64.0	5.3	---	6.5	14.0	40.2	0.2	13.5	9.4	7.0	24.0	11.2	7.2	14.5
Todas las demás	201.1	161.5	138.4	200.0	126.0	101.0	98.8	136.8	68.7	99.3	118.8	75.6	111.7	95.5	58.8	208.7	143.9	218.3	97.6

Horwitz A. Análisis de Salud Regional. Cap. I p 1 – 59. en .OPS/OMS. La Salud en las Américas. Edición de 2002. Vol.

1.Publicación Científica No. 587.Washington D.C. 20037. E.U.A.

Entre los numerosos agentes etiológicos descritos, los virus se reconocen como los agentes predominantes, señalándose que son responsable de más del 90% de las IRA de las vías respiratorias altas y de una proporción considerable aunque menor de las respiratorias bajas. Dentro de los principales virus que causan esta patología se encuentran los virus influenza A, B y C; virus sincitial respiratorio; adenovirus; rinovirus y los coronavirus. Se ha demostrado que un cuadro clínico puede ser causado por diferentes agentes. Por otra parte el mismo agente es capaz de causar una amplia gama de síndromes. Si bien se postula que en países en desarrollo la etiología bacteriana era la predominante en las IRA, en un estudio multicéntrico internacional coordinado por el Board on Sciences and Technology for International Development of the National Academy of Sciences de los Estados Unidos, se determinó, que la etiología viral está presente en mayor proporción que la bacteriana, variando los porcentajes de identificación viral según el país, encontrándose entre el 17 y 44% de las IRA en niños menores de 5 años.

#### **Referencias:**

- 1.- OPS/OMS. La Salud en las Américas. Edición de 2002. Vol. 1 y 2. Publicación Científica No. 587. Washington D.C. 20037. E.U.A.
- 2.-OPS/OMS. Investigaciones Operativas sobre el control de las infecciones respiratorias agudas (IRA) en niños en América Latina y el Caribe. Serie HLT/AIEPI – 3.E. Yehuda Benguigui, Carmen Valenzuela. Editores. Washington D.C. 20037. E.E.U.U. 1998.
- 3.- OPS/OMS. Infecciones Respiratorias en niños. Serie HCT/AIEPI – 1. Yehuda Benguigui, Francisco J. López Antañano, Joao Yunes. Editores. Washington D.C. 20037. 1999.

## II.-CRITERIOS DE DEFINICION DE CASOS:

Se define como infección respiratoria aguda (IRA) toda aquella patología de presentación aguda que produce afección del tracto respiratorio tanto superior como inferior.

En los laboratorios de virología se reciben las muestras con la indicación que envía un profesional médico donde se señala el diagnóstico presuntivo del paciente. En el siguiente cuadro presentamos los síndromes clínicos con el agente etiológico viral, que en mayor o menor frecuencia lo producen.

Los virus como causa de infecciones respiratorias agudas:

Síndrome	Agente etiológico viral	
	Mas frecuente	Menos frecuente
<b>Infecciones de vías respiratorias altas (resfrío común).</b>	Rinovirus Coronavirus Adenovirus Parainfluenza 3.	Influenza A o B Parainfluenza 1 o 2 VRSH Enterovirus
<b>Faringitis</b>	Adenovirus Enterovirus	Influenza A VRSH Parainfluenza 1 y 2 Rinovirus Coronavirus
<b>Bronquiolitis</b>	VRSH Parainfluenza 3	Adenovirus Parainfluenza 1 y 2 Influenza A o B Rinovirus
<b>Neumonía</b>	VRSH Parainfluenza 3 Adenovirus Influenza A	Parainfluenza 1 y 2 Rinovirus.
<b>Crup</b>	Parainfluenza 1, 2 y 3	Influenza A VRSH Sarampión

**Fuente:Weissenbacber M, Avila M. Los virus como causa de IRA alta y baja en niños: características generales y diagnóstico. Cap 5,89-106. en OPS/OMS. Infecciones Respiratorias en niños. Serie HCT/AIEPI-1. Yehuda Benguigui, Francisco J López, Joao Yunes. Editores Washington D.C 20037. 1999**

### **III.-ALGUNAS CONSIDERACIONES DE IMPORTANCIA SOBRE SEGURIDAD BIOLÓGICA**

**Dra. Belsy Acosta Herrera**

La Organización Mundial de la Salud siempre ha reconocido que la seguridad biológica es una medida internacional de la mayor importancia. El entendimiento de la responsabilidad personal que tienen los investigadores para garantizar actividades de laboratorio seguras es una consideración de primer orden. Un ambiente seguro en el laboratorio depende fundamentalmente de individuos bien entrenados y preparados técnicamente en prácticas seguras para sí mismos, para otros colegas, la comunidad y el medio ambiente.

La clasificación de los laboratorios se realiza teniendo en cuenta los objetivos fundamentales del laboratorio, las características constructivas y el nivel de contención:

**1.-NIVEL I DE BIOSEGURIDAD (básico):** su objetivo fundamental es la enseñanza e investigación básica y es suficiente la práctica de buenas técnicas microbiológicas.

**I.2.-NIVEL II DE BIOSEGURIDAD (básico):** servicios primarios de salud e investigaciones relacionadas con el diagnóstico. Es necesario además de la práctica de buenas técnicas microbiológicas, el uso de ropa protectora, la simbolización de la seguridad biológica y el uso de gabinetes de seguridad biológica Clase II. En este nivel se trabajan el Virus Sincitial Respiratorio, los Virus Parainfluenza, Adenovirus, Virus Influenza y Rinovirus.

**I.3.-NIVEL III DE BIOSEGURIDAD (contención):** servicios de diagnóstico e investigación especiales. Además de tener en cuenta los aspectos del nivel II, son necesarios el uso de algunos medios de protección individual especiales como, flujo de aire direccional y un acceso restringido al local. En este nivel se trabaja Hantavirus y Coronavirus (agente causal del SARS).

**I.4.-NIVEL IV DE BIOSEGURIDAD (máxima contención):** unidades de patógenos muy peligrosos. Son necesarios, gabinetes de seguridad biológica Clase III, material gastable desechable, presencia de ducha, filtros de aire, etc.

Cada país (región) deberá realizar una clasificación nacional (regional) de los microorganismos por grupos de riesgo basado fundamentalmente en los siguientes factores:

Patogenicidad del microorganismo.

Modo de transmisión y rango hospedero del microorganismo, que puede estar influenciado por los niveles de inmunidad existentes en la población local, la densidad de población y el movimiento de la misma, presencia de vectores apropiados y existencia de medidas de higiene ambiental apropiadas.

Disponibilidad local de medidas preventivas efectivas que pueden incluir: profilaxis por inmunización o administración de antisueros u otras medidas sanitarias.

Disponibilidad local de tratamiento efectivo que incluye inmunización pasiva, vacunación post exposición, uso de agentes antimicrobianos, agentes antivirales o quimioterapéuticos. Debe tomarse en consideración la posibilidad de la emergencia de cepas resistentes a las drogas.

## **I.5.-LABORATORIOS BÁSICOS. NIVELES DE BIOSEGURIDAD I Y II**

Los laboratorios de diagnóstico y cuidados de la salud (instituciones de salud pública, hospitales o clínicas) deben poseer nivel de bioseguridad II o superior. Existen laboratorios en los cuales no hay un control riguroso sobre las muestras recibidas y los trabajadores de laboratorio pueden exponerse ocasionalmente y de forma no sospechada a microorganismos que pertenecen a los grupos de alto riesgo. Ante esta posibilidad existe es indispensable el desarrollo de políticas y planes de seguridad en cada país (región). Las precauciones universales deben ser adoptadas y practicadas mundialmente.

### **Aspectos importantes a tener en cuenta:**

#### **I.6CÓDIGO DE PRÁCTICAS:**

Cada laboratorio debe poseer un manual de operaciones y seguridad del laboratorio que identifique riesgos potenciales y las prácticas para prevenir o minimizar estos riesgos. Las buenas técnicas microbiológicas son esenciales para la seguridad del laboratorio. El equipamiento especializado es fundamental pero nunca reemplaza los procedimientos apropiados.

### **I.6.1.-Acceso:**

El símbolo internacional de seguridad biológica debe ser colocado en la puerta de las habitaciones donde se trabajan organismos que pertenecen a los grupos de riesgo II o superior.

Solo se debe permitir la entrada al área de trabajo del personal autorizado.

Las puertas de los laboratorios deben permanecer cerradas.

No se debe permitir la entrada de niños menores de 16 años a las áreas de trabajo.

No se debe permitir la entrada al laboratorio de animales que no están involucrados en el trabajo.

No se puede fumar, comer o beber dentro o fuera del laboratorio.

### **I.6.2.-Protección del personal:**

Los trabajadores deben permanecer dentro del laboratorio con batas o uniforme destinado al trabajo dentro del mismo.

Usar guantes para todos los procedimientos que involucren el contacto directo con muestras de sangre, material infeccioso o animales infectados. Después de terminar el trabajo los guantes deben ser desinfectados y las manos deben ser correctamente lavadas.

El personal de laboratorio debe lavarse las manos frecuentemente y antes de abandonar el área de trabajo del laboratorio.

Espejuelos de seguridad, máscaras faciales u otras medidas de protección deben ser empleadas cuando es necesario proteger los ojos y la cara del impacto de objetos o de radiaciones ultravioletas.

No debe abandonarse el área de trabajo llevando consigo ropa u otros dispositivos protectores del laboratorio hacia otra área (biblioteca, oficinas, baños).

Está prohibido guardar alimentos en cualquiera de las áreas de trabajo del laboratorio.

### **I.6.3.-Procederes:**

Nunca se debe pipetear con la boca.

Todos los procederes deben llevarse a cabo de manera que se evite o minimicen la formación de aerosoles o gotas. Si el proceder implica el riesgo de que se formen los mismos, el trabajo debe desarrollarse en un gabinete de seguridad biológica.

El uso de jeringuillas o agujas hipodérmicas debe ser limitado para inyección parenteral o extracción de fluidos de animales de laboratorio.

Cualquier accidente, derrame o exposición a material infeccioso debe ser reportado a un supervisor del laboratorio y deben ser correctamente archivados.

Los procederes de limpieza y desinfección a seguir ante cualquier derrame deben estar debidamente escritos y puestos en práctica.

### **I.7.-Laboratorio de contención: Nivel de Bioseguridad III.**

Los laboratorios de nivel III de bioseguridad son empleados para trabajar con microorganismos que pertenecen al grupo de riesgo III o para cuando se trabajan con grandes volúmenes o altas concentraciones de microorganismos del grupo de riesgo II por existir el riesgo de diseminación de aerosoles. En el nivel de seguridad III deben cumplirse todas las medidas mencionadas con anterioridad para los laboratorios básicos (Nivel I y II de seguridad biológica) además de algunas específicas. Estos laboratorios deben ser debidamente registrados por las autoridades nacionales de salud.

### **Referencias:**

1. Laboratory biosafety manual. Second Edition. (revised) World Health Organization. Geneva 2003. WHO/CDS/CSR/LYO/2003-4
2. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories (BMBL) Fourth Edition .U.S. Department of Health and Humana Centers for Disease Control and Prevention ( CDC) and National Institute Of Health . Washington 1999.



#### **IV.-PRINCIPIOS GENERALES DE LA TOMA DE MUESTRA, CONSERVACIÓN Y TRANSPORTE.**

**Dra. Clara Savón Valdés**

Para la obtención de un diagnóstico virológico acertado, es indispensable la selección adecuada de la muestra. Sin embargo de las condiciones en que se realice la colecta, manipulación y transporte de la muestra dependerá también el éxito de los resultados de laboratorio. El traslado al laboratorio debe efectuarse entre 24 a 48 horas como máximo para que la muestra sea útil para el aislamiento viral. De no poder trasladar la muestra en el tiempo establecido, la misma debe ser congelada a -70°C para la conservación de la partícula presente en la muestra, es necesario mantenerlas a pH 7 y evitar su desecación utilizando una solución denominada medio de transporte de virus (MTV)

#### **I.- MUESTRAS PARA AISLAMIENTO VIRAL**

##### **I.1.- ASPIRADOS NASOFARINGEOS (ANF).**

Esta muestra es la recomendada para la colecta en infantes, niño pequeño y adulto mayor (1) (2). Es la muestra clínica de elección para obtener los aislamientos de los virus causantes de infección respiratoria aguda (IRA), ya que puede suministrar un número apropiado de células infectadas. El aspirado puede obtenerse, utilizando un catéter acoplado a una jeringuilla de bulbo deprimido la cual se coloca en la orofaringe y luego en la fosas nasales, succionando con la jeringuilla. Para realizar esta operación el paciente debe sentarse con la cabeza inclinada hacia atrás instalándose 1.5 mL de MTV en cada fosa nasal con un gotero estéril y luego aspirando las secreciones. La aspiración de las secreciones de la orofaringe se realiza a partir de las secreciones presentes

El contenido de esta jeringuilla se vierte en un tubo plástico preferiblemente de fondo cónica y con tapa de rosca que contiene de 3-5 mL de medio de transporte virológico. Este tubo debe cerrarse herméticamente y rotularse inmediatamente, sumergirse en un baño de hielo o guardarse a una temperatura de 4°C, debiendo cumplirse las regulaciones de conservación y de traslado al laboratorio. (2).

##### **I.2.-HISOPADOS O EXUDADO NASOFARINGEO (ENF).**

Los hisopados nasofaríngeos generalmente contienen un número de células bajo, por lo que son menos útiles que los aspirados. Para tomarlos deben utilizarse hisopos de Teflón dracón (comerciales) estériles, de esta manera el raspado de las células epiteliales de las mucosas

es de mejor calidad, obteniéndose un mayor número de células. Una vez raspadas las mucosas nasales y faríngeas, los hisopos se sumergen inmediatamente en MTV en tubos plásticos de tapa de rosca cerradas herméticamente y rotulados. Deben conservarse en un baño de hielo o deben ser refrigerados a 4° C debiendo cumplirse las regulaciones de conservación y traslado al laboratorio (1, 2)

### **I.3.-LAVADOS FARÍNGOS O GARGARISMOS.**

Esta muestra se utiliza fundamentalmente para el aislamiento del virus Influenza en pacientes adultos jóvenes (3). El paciente se enjuaga la orofaringe con una solución salina tamponada (PBS pH 7.2) con antibióticos, a las concentraciones establecidas para los medios de transporte, vertiendo el contenido en un tubo plástico con tapa de rosca utilizando un embudo hecho con papel estéril o de plástico desechable estéril. En ningún caso los guantes de técnico deben tocar la parte interior del embudo. Como precaución se debe preguntar al paciente si presenta alergia a los antibióticos que se han adicionado al medio transporte (PBS) para evitar accidentes por reacciones alérgicas. Como los antibióticos más comúnmente usados son la penicilina y estreptomycin, es recomendable la sustitución de la penicilina por sulfato de neomicina que provoca menos reacciones alérgicas que la penicilina.

Una vez recogida la muestra, el tubo debe cerrarse herméticamente, rotularse y colocarse inmediatamente en un baño de hielo o refrigerarse a 4°C, durante 24 a 48 horas hasta su traslado al laboratorio, debiendo cumplirse las regulaciones de conservación y traslado al laboratorio (1, 2)

### **I.4.-ESPUTO**

Esta muestra es recomendable en pacientes mayores de 60 años. El esputo puede obtenerse fácilmente provocando mecánicamente la tos al paciente introduciendo un hisopo estéril en la orofaringe del paciente.

Esta secreción es recogida en un frasco estéril de boca ancha que contenga 3 o 5 mL de medio de transporte de virus. Al igual que en las muestras anteriores deben cumplirse las regulaciones de conservación y traslado (3).

### **I.5.-ASPIRADO BRONQUIAL**

Esta muestra sólo puede ser colectada cuando el paciente se encuentra bajo ventilación mecánica en una sala de terapia. La aspiración se realiza con un catéter estéril. La secreción colectada se deposita en tubo de plástico de fondo cónico preferiblemente y con tapa de rosca que contiene 3mL de medio de transporte virológico con antibióticos. El tubo es cerrado herméticamente, rotulado e inmediatamente refrigerado a 4°C. La toma de esta muestra responde a una verdadera urgencia médica por lo que su traslado debe estar previsto para que arribe al laboratorio en menos de 5 horas (1,2).

### **I.6.-MUESTRA DE NECROPSIA**

La muestra de necropsia generalmente puede llegar altamente contaminada, debido a la manipulación a que se ve sometida en la morgue, por ello es importante que el laboratorio establezca los parámetros que se requieren para lograr una mayor calidad de la misma. Estas medidas consisten en que se coloquen los fragmentos de pulmón, cerebro (Síndrome de Reyé) del paciente con las lesiones macroscópicas inmediatamente en medio de transporte virológico con antibióticos, sin que medie ninguna otra manipulación Esta muestra debe refrigerarse a 4°C rápidamente y enviarse al laboratorio para ser procesada a la mayor brevedad posible Si esta norma no puede cumplirse entonces deberá congelarse – 70°C hasta su traslado al laboratorio (2).

### **I.7.-HISOPADO FARÍNGEO-CONJUNTIVAL**

Esta muestra sólo es útil para el aislamiento de adenovirus, causante de fiebre faringoconjuntival. Para ello se utilizan hisopos de Tefón estériles. Los hisopos se deben introducir en el medio de transporte (MTV) antes de proceder a raspar la conjuntiva. El hisopo que se utilice para raspar la orofaringe no necesita introducirse previamente en el MTV. Una vez realizada esta operación se introducen en el tubo de rosca con MTV se cierra herméticamente, se rotula y refrigera a 4°C hasta su traslado al laboratorio, debiendo cumplirse las regulaciones de conservación y traslado al laboratorio (1, 2). Si la muestra no va ser trasladada entre 24 a 48 horas, entonces debe congelarse a –70°C (2).

## **II.-FACTORES QUE INFLUYEN EN EL AISLAMIENTO VIRAL**

Son muchos los factores que influyen en el aislamiento viral, unos son independientes como por ejemplo la carga viral de la muestra, pero sin duda tres de ellos pueden ser controlados y son de gran relevancia: el tiempo, la temperatura y el medio de transporte.

### **II.1.-Tiempo**

Es de gran relevancia el momento en que se realiza la toma de muestra para estudios de virus respiratorios. Un factor importante a considerar es que el período de excreción viral de estos virus es breve, por lo que las muestras deben ser colectadas antes de las 48 a 72 horas del comienzo de los primeros síntomas. Una muestra colectada tardíamente puede resultar falsa negativa. Por otro lado, teniendo en cuenta que muchas de estas infecciones pueden constituir infecciones nosocomiales, la muestra del paciente hospitalizado debe ser colectada durante las primeras 24 horas del ingreso hospitalario, para que el diagnóstico sea de utilidad epidemiológica. En el caso de que se tome tardíamente, perderá esta utilidad, aunque siga conservando su valor diagnóstico clínico etiológico (1).

### **II.2.-Temperatura**

La temperatura de conservación es otro de los factores que inciden sobre la calidad de la muestra para el aislamiento viral. Si la muestra es conservada y transportada a una temperatura inadecuada es posible obtener un resultado falso negativo.

Por consiguiente toda muestra para aislamiento viral debe conservarse a 4°C si va ser trasladada al laboratorio dentro de las 24 a 48 horas posteriores a la colecta. Si no fuera así debe congelarse a - 70°C para la mejor conservación de la infectividad de las partículas presentes en la muestra

La temperatura de 0°C es crítica para muchos virus y especialmente los virus respiratorios, son capaces de perder casi la totalidad de su infectividad. Para la conservación óptima de los virus presentes en la muestra, es necesario mantenerlas a pH 7 y evitar su desecación. Para ello se utiliza una solución denominada "de transporte de virus (MTV)", en cuya composición toman parte los antibióticos con objeto de frenar la contaminación bacteriana.

### II.3.-Medios de transporte virológico (MTV)

Para el diagnóstico virológico se requieren de medios de transporte isotónicos que proporcionen un pH 7 aproximadamente para la conservación de las células infectadas y de las partículas virales presentes en la muestra clínica. Entre estos podemos citar:

Solución Salina de Hanks

Solución Salina Tamponada, PBS (sólo útil para coleccionar virus Influenza)

Medio Esencial Mínimo (MEM) (con el cual se obtienen los mejores resultados, aunque resulta caro)

Estos medios en su preparación requieren de la adición de los llamados estabilizadores, que no son más que proteínas, cuya función no es más que proteger la partícula viral presente en el material infeccioso. Se añaden al medio de transporte al 0.5 %.

Entre los estabilizadores más utilizados comúnmente están:

Suero bovino fetal

Albúmina bovina

Lactoalbúmina

La adición de antibióticos es obligatoria, por cuanto previenen la contaminación bacteriana que puede surgir durante la colecta y manipulación (1). Otro aspecto importante a considerar es el empleo de fungicidas para prevenir la contaminación por hongos, el más comúnmente usado es la anfotericina B.

Por lo general las concentraciones recomendadas de antibiótico para el medio de transporte son las siguientes: (1)

Penicilina----- 200 unidades x mL

Estreptomina ----- 200µg /mL

Anfotericina B-----5 µg / mL

Es necesario tener en consideración que el empleo de concentraciones muy superiores puede provocar un efecto tóxico en el cultivo celular inoculado, que podría llegar a ser confundido si se carece de experiencia con un falso positivo por desprendimiento de la monocapa celular.

### **III.-MUESTRAS PARA DIAGNÓSTICO RÁPIDO**

Las muestras idóneas para el diagnóstico rápido por Inmunofluorescencia (IF) o por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) son las mismas que se utilizan en el aislamiento viral, es decir secreciones respiratorias tomadas mediante aspirados, lavados, o hisopados. Pero en el caso de IF debe tenerse en cuenta que las muestras no deben ser congeladas ya que el proceso de congelación y descongelación, rompe las células haciéndolas difíciles de reconocer. La PCR no se afecta por la congelación- descongelación (2)

### **IV.-MUESTRAS PARA EL DIAGNOSTICO SEROLOGICO**

El diagnóstico serológico de los virus respiratorios generalmente tiene carácter confirmatorio aunque, cuando se hace nula la posibilidad de coleccionar muestras para la detección del virus o sus componentes es factible realizar el diagnóstico por serología.

Usualmente se toman dos muestras de suero; la primera en la fase aguda de la enfermedad (1<sup>er</sup> suero) y la segunda en la fase convaleciente (2<sup>do</sup> suero). El suero en la fase aguda se extrae en los primeros 3 días del comienzo de los primeros síntomas y el de fase convaleciente entre 15 y 21 días después de haber tomado la primera muestra. La sangre colectada debe permanecer al menos una hora a temperatura ambiente, posteriormente se coloca en el refrigerador de 4 °C durante toda la noche. Al día siguiente las muestras son centrifugadas a 1000 r.p.m. por 10 minutos a 4°C. A continuación se separa el suero que se transfiere a un tubo previamente rotulado y se almacena preferiblemente a 4°C. El envío al laboratorio debe realizarse preferiblemente en congelación (4°C o - 20°C) (1).

### **DATOS PARA EL ENVIO DE MUESTRAS CLÍNICAS.**

Las muestras deben ir acompañadas de un conjunto mínimo de datos para que el laboratorio pueda tomar la decisión de cuáles son las pruebas diagnósticas más adecuadas e interpretar los resultados. Los datos más importantes son:

Nombre y Apellidos

Edad, sexo

Dirección particular

Fecha del comienzo de los primeros síntomas

Fecha de Toma de las Muestras

Tipo de Muestra (ANSF, ENF, LF, E, Necro)

Número de historia clínica, diagnóstico clínico primario, resumen de datos clínicos (los hallazgos clínicos más relevantes) y epidemiológicos del caso

Unidad de Salud de procedencia. Hospital, Provincia etc.

Nombre y datos generales del médico de atención

## **V.-TRANSPORTE Y CONSERVACIÓN DE MUESTRAS CLINICAS**

### **V.1.-REQUERIMIENTOS PARA EL TRANSPORTE DE MUESTRAS CLÍNICAS.**

Para el transporte de muestras debe usarse el sistema básico de **TRIPLE EMPAQUE**. A continuación se describe el sistema de la IATA que es el recomendado por la Organización Mundial de la Salud muy especialmente para transporte de muestras de SARS (2003) (4).

**Primer contenedor.** En el se deposita la muestra clínica. Debe ser de plástico con tapa de rosca, cierre hermético y debe envolverse en suficiente papel absorbente por si hubiera algún derrame de la muestra en cuestión.

**Contenedor secundario.** En este contenedor es donde deben colocarse las sustancias refrigerantes, hielo seco. Los datos de la muestra clínica, así como la información que describe el tipo de muestra deberá, colocarse en el exterior del mismo. El contenedor secundario debe ser de un material que permita conservar la temperatura o evite los escapes de frío.

**Contenedor Externo.** Es el encargado de proteger al segundo contenedor de daños físicos que puedan ocurrir durante el proceso de transporte. En el debe consignarse el remitente y quien lo recibe. Las etiquetas correspondientes al riesgo biológico de la muestra que esta siendo transportada deberán estar visibles.

Las regulaciones internacionales específicas para el transporte debe ser de estricto cumplimiento. Por otro lado cada país tiene regulaciones específicas para la importación de materiales biológicos.

En el momento del envío debe avisarse al laboratorio receptor (FAX teléfono E mail).del momento de la llegada del mismo, lo que asegurará que sea recogido inmediatamente a su llegada.

Teniendo en cuenta que los virus respiratorios no producen en general viremia en el transporte de sueros si bien no constituye un material infeccioso como tal, no puede ser descartado la posible contaminación con un virus como la Hepatitis B o C

**Referencias:**

- 1.-Lennette DA. General principles for laboratory diagnosis of viral rickettsial and Chlamydial infections Chapter 1. IN: Diagnostic Procedure for Viral, Rickettsial and Chlamydial Infections 7 ed Washington DC 1995. 3-25.
- 2.-C Weissenbacher M, Avila M. Los Virus como causa de IRA alta y baja en niños: Características generales y diagnóstico en: Benguigui Y Antuñano F, Schmunis G, Yunes J. Infecciones respiratorias en niños. USA OPS/OMS, 1999:87-104
- 3.-W Covalcuic KA, Webb K, Carlson C. Comparison of four clinical specimen types for detection of Influenza A and B Viruses by Optical Immunoassay (Flu OA test) and cell culture methods. J Clin Microbiol 1999, 37(12) : 3971-74.
- 4.-Reglamentación sobre mercancías peligrosas. Resolución 618 de la IATA 44 Edición. En vigor desde el 1 de Enero al 31 de Diciembre de 2003.



## **V.-CULTIVOS CELULARES Y VIRUS RESPIRATORIOS.**

**Lic Lisette Pérez Santos MsC**

### **INTRODUCCION.**

Hace más de 30 años que Enders y col. descubrieron que los Poliovirus podían replicarse en cultivo de células de origen no neuronal, estimulando así el uso de los cultivos celulares "in vitro" para la propagación de virus humanos y animales. Estos hallazgos permitieron los estudios de virus que no se propagaban en los sistemas hasta ese momento empleados como los huevos embrionados o los ratones, e igualmente hicieron posible la profundización en el conocimiento de otros muy conocidos como el virus de la Poliomiélitis. En el campo de la Virología la extensión de los sistemas de cultivos celulares ha suplantado a los sistemas hospederos animales y los huevos embrionados para el aislamiento viral, el test de Neutralización y la obtención de antígenos virales entre otros.

### **Equipos:**

Incubadora preferiblemente de CO<sub>2</sub>.

Cabina de flujo Laminar.

Microscopio invertido.

Baño Termostataado.

Cámara de 4 ° C

### **Materiales y Reactivos:**

Tubos plásticos para el cultivo de células.

Placas de 96 pocillos (fondo plano).

Medio MEM con amino ácidos no esenciales y glutamina.

Medio 199.

Medio Dulbecco's MEM.

Medio RPMI-1640.

Agua bidestilada de calidad suficiente para cultivo de células.

Solución stock de Penicilina G 100 U/mL-Sulfato de Estreptomina 100 mg/mL.

Solución de Bicarbonato de Sodio ( para cultivo celular) al 7.5%

Solución de Tripsina-EDTA: Tripsina (1:250) al 0.25% -EDTA al 0,02%.

Solución de Tripsina (Difco) (1:250) a 1,5 µg/mL.

Glutamina.

Solución stock de buffer Hepes 1 M

Albúmina bovina humana fracción V.

Suero Fetal Bovino inactivado a 56°C durante 30 min.

Frascos plásticos de 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>, 182 cm<sup>2</sup>, 225 cm<sup>2</sup>.

Pipetas de 2, 5 y 10 mL.

### **I.Células NCI-H292**

La línea NCI-H292 (ATCC CRL-1848) Fue lograda en 1980 a partir de un carcinoma mucoepidermoide de pulmón y ha sido reportada como sustituto de los cultivos primarios de riñón de mono para el aislamiento de los *Paramyxovirus* humanos (1, 2,3). Estudios más recientes demuestran que esta nueva línea también es sensible a *Adenovirus* y *Enterovirus* (4,5,9,10).

Crece en medio RPMI-1640 suplementado con 20µM de glutamina, Hepes 25 mM y 10% de suero fetal bovino (SFB). El Medio de inoculación es RPMI-1640 con 20 µM de glutamina y 1,5 µg/mL de tripsina (Difco 1:250) y antibiótico (Penicilina 100U/mL- Estreptomicina 100mg/mL, concentración final).

#### **I.1.-Preparación de las células NCI-H292**

Partir de un frasco de cultivo (25 cm<sup>3</sup> o 75 cm<sup>3</sup>) de una semana de sembrado.

Preparar el medio de crecimiento de cultivo (RPMI 1640, SBF 10% y antibiótico al 0,1%) necesario para los tubos que se van a sembrar.

Desprender las células con solución de Tripsina-EDTA (0,25% y 0,02%) y se adicionan al medio preparado a razón de 200 000 cel./mL. Recogerlas por centrifugación y adicionar al medio preparado a razón de 200 000 cél./mL

Incubar los tubos en plano inclinado a 37°C durante 48 o 72 horas. Al cabo de este tiempo debe estar cubierta la monocapa (al menos 1 cm<sup>2</sup>) y los tubos, listos para inocular.

## **II.- Células HeLa**

La línea celular continua HeLa ATCC (CCL-2), fue lograda en 1951 a partir de un carcinoma de cervix humano (6). Se ha descrito que es sensible a *Poliovirus* tipo 1 y *Adenovirus* tipo 3 (8).

Utiliza como medio de cultivo, medio mínimo esencial (Eagle MEM) con amino ácidos no esenciales y glutamina suplementado con 10% de SFB. El medio postinoculación es Eagle MEM con 2% de SFB y antibiótico 0,1% (concentración final Penicilina 100U/mL- Estreptomycinina 100mg/mL).

### **II.1.-Preparación de las células HeLa**

Partir de un frasco de cultivo (25 cm<sup>3</sup> o 75 cm<sup>3</sup>) de una semana de sembrado.

Preparar el medio de cultivo (Eagle MEM con 10% de SFB y antibiótico al 0,1%) necesario para los tubos que se van a sembrar.

Desprender las células con solución de Tripsina-EDTA (0,25% y 0,02%) Recogerlas por centrifugación.y se adicionan al medio preparado a razón de 150 000 cel./mL

Incubar los tubos en plano inclinado a 37°C durante 48 o 72 horas. Al cabo de este tiempo debe estar cubierta la monocapa (1 cm<sup>2</sup>) y los tubos listos para inocular.

En este tipo de células se recomienda trabajar la línea celular con la línea celular con monocapa semiconfluente dadas sus características de crecimiento.

## **III .- Células HEp-2**

La línea continua HEp-2 ATCC (CCL-23) se obtuvo en 1952 a partir de un carcinoma epidermoide de laringe humano (6). El medio de crecimiento de cultivo es Eagle MEM con 10% de SFB. El medio postinoculación es Eagle MEM con 2% de SFB y antibiótico 0,1% (concentración final Penicilina 100U/mL-Estreptomycinina 100mg/mL).

Esta línea se ha reportado como sensible a *Poliovirus* tipo 1, *Adenovirus* tipo 3 y el Virus de la estomatitis vesicular (cepa Indiana) (7,8).

### **III .-Preparación de la células HEp-2**

Partir de un frasco de cultivo (25 cm<sup>3</sup> o 75 cm<sup>3</sup>) de una semana de sembrado.

Preparar el medio de crecimiento para el cultivo (Eagle MEM con 10% de SFB y antibiótico al 0,1%) necesario para los tubos que se van a sembrar.

Desprender las células con solución de Tripsina-EDTA (0,25% y 0,02%), centrifugar y adicionar al medio preparado a razón de 150 000 cel./mL.

Incubar los tubos en plano inclinado a 37°C durante 48 o 72 horas. Al cabo de este tiempo debe estar cubierta la monocapa (mínimo 1 cm<sup>2</sup>) y los tubos listos para inocular. En este tipo de células se recomienda utilizar la línea celular con la monocapa semiconfluyente dadas las características de crecimiento de esta línea.

#### **IV.- Células Vero**

La línea Vero fue obtenida en 1952 a partir de un riñón de un mono verde africano adulto normal (ATCC-CCL-81) (6). Está reportado que esta línea es sensible a *Poliovirus* tipo 3, *Getah*, *Ndumu*, *Pixuna*, *Ross River*, *SemLiki*, *Paramaribo*, *Kokohera*, *Herpes virus*, *Adenovirus* tipo 3 y 7 (8).

El medio de cultivo empleado es 199 con 5% de SFB y el medio de postinoculación es 199 con 2% de SBF y antibiótico 0,1% (concentración final Penicilina 100U/mL- Estreptomicina 100mg/mL).

##### **IV.1.--Preparación de células Vero**

Partir de un frasco de cultivo (25 cm<sup>3</sup> o 75 cm<sup>3</sup>) de una semana de sembrado.

Prepara el medio de cultivo (199 con 5% de SFB y antibiótico al 0,1%) necesario para los tubos que se sembraran.

Desprender las células con solución de Tripsina-EDTA (0,25% y 0,02%) y se adicionan al medio preparado a razón de 200 000 cel./mL.

Incubar los tubos en plano inclinado a 37°C durante 48 o 72 horas. Al cabo de este tiempo debe estar cubierta la monocapa (mínimo 1 cm<sup>2</sup>) y los tubos listos para inocular.

#### **V.- Células MDCK-L**

La línea MDCK-L, cepa de la línea celular MDCK se obtuvo en 1958 de un riñón de cocker spaniel adulto aparentemente normal (ATCC-CCL-34) (6). Es sensible a *Influenza virus* al virus de la estomatitis vesicular, a *Vaccinia virus*, *Coxsackie B-5*, *Reovirus* tipo 2 y 3, *Adenovirus* tipo 4 y 5.

El medio de cultivo empleado es Dulbecco's MEM suplementado con albúmina bovina humana fracción V al 0,2%, glutamina 2,5 g/L, Hepses 25 mM y SBF al 5%. El Medio de

inoculación es Dulbecco's MEM suplementado con albúmina bovina humana fracción V al 0,2%, glutamina 2,5 g/L, Hepes 25 mM, 1,5 µg/mL de tripsina (Difco 1:250) y antibiótico 0,1% (Penicilina 100U/mL-Estreptomicina 100mg/mL).

### **V.1.-Preparación de las células MDCK**

Partir de un frasco de cultivo (25 cm<sup>3</sup> o 75 cm<sup>3</sup>) de una semana de sembrado.

Preparar el medio de cultivo (Dulbecco's MEM al 5% SFB y antibiótico al 0,1%) necesario para los tubos que se van a sembrar o la placa de 96 pocillos.

Desprender las células con solución de Tripsina-EDTA (0,25% y 0,02%) y adicionar al medio preparado a razón de 250 000 cel. /mL.

Incubar los tubos en plano inclinado a 37°C durante 48 o 72 horas. La placa se incuba a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub>. Al cabo de este tiempo debe estar cubierta la monocapa y los tubos o la placa listos para inocular.

## **VI.- CMRC-5**

La línea celular MRC-5 fue obtenida de pulmón normal de un feto masculino de 14 semanas en 1966 (6). Se ha descrito que es sensible a *Poliovirus* tipo 1 y *Herpes simplex*, *Citomegalovirus*, Adenovirus y el virus de la Estomatitis vesicular.

Se emplea como medio de cultivo, medio mínimo esencial (Eagle MEM) con amino ácidos no esenciales y glutamina suplementado con 10% de SFB. El medio postinoculación es Eagle MEM con 2% de SFB y antibiótico 0,1% (Penicilina 100U/mL-Estreptomicina 100mg/mL).

### **VI .1.-Preparación de las células MRC-5**

Partir de un frasco de cultivo (25 cm<sup>3</sup> o 75 cm<sup>3</sup>) de una semana se sembrado.

Preparar el medio de cultivo (Eagle MEM con 10% de SFB y antibiótico al 0,1%) necesario para los tubos que se van a sembrar.

Desprender las células con solución de Tripsina-EDTA (0,25% y 0,02%) y adicionar al medio preparado a razón de 250 000 cel. /mL.

Incubar los tubos en plano inclinado a 37°C durante 48 o 72 horas. Al cabo de este tiempo debe estar cubierta la monocapa (1 cm<sup>2</sup>) y los tubos listos para inocular.

## Referencias:

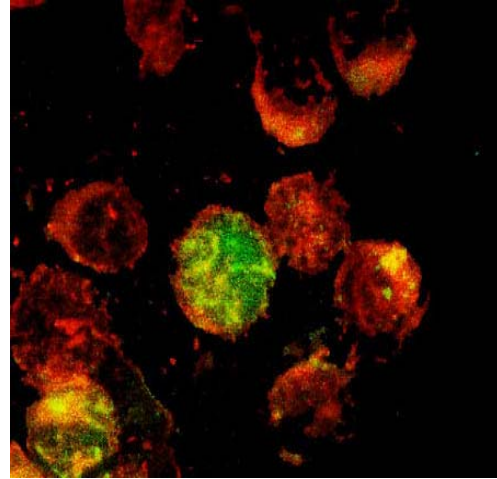
- 1.- Banks-Schlegel, SP; Gazdar AF, Harris CC. Intermediate filament and cross-linked envelope expression in human lung tumor cell line. *Cancer Res* 1985;45(6):1187-97.
- 2.- Carney ND; Gazdar AF; Bepler G; Guccion JG; Marangos PJ; Moody TW; et al. Establishment and identification of small cell lung cancer lines having classic and variant features. *Cancer Res*, 1985;45(8):2913-23.
- 3.- Castells E; George VG; Hierholzer JC. NCI-H292 as an alternative cell line for the isolation and propagation of the human paramyxoviruses. *Arch Virol* 1990;115(2):277-88.
- 4.- Kinsburg DW. Paramyxovirus and their replication. En: Fields, Knipe DM, eds. *Virology*. 2 ed. New York: Raven Press, 1990; Vol 1:945-62.
- 5.- Hierholzer JC; Castells E; Bank K; Bryan JA; Mc Ewen CT. Sensitivity of NCI-H292 human lung mucocoepermoide cell for respiratory and other human viruses. *J Clin Microbiol* 1993;31(6):1504-72.
- 6.- American Type Culture Collection. Catalogue of Cell lines and Hybridomes. Maryland, 1992:4,17, 21, 48, 98, 175.
- 7.- McIntosh K, Chanock RM. Respiratory syncytial viruses. En: Fields, Knipe DM, eds. *Virology* 2ed. New York Raven Press, 1990; Vol 1:1045-72.
- 8.- Horwitz S. Adenovirus and their replication. En: Fields, Knipe DM, eds. *Virology* 2ed. New York Raven Press, 1990; Vol 1:1723-40.
- 9.- Chanock RM; McIntosh K. Parainfluenza virus . En: Fields, Knipe DM, eds. *Virology* 2ed. New York Raven Press, 1990; Vol 1:963-87.
- 10.- Morier L, Pérez L, Cancio R, Savón C, González Z, Goyenechea A. Comparación de la línea celular NCI-H292 con otras líneas continuas para la multiplicación de virus respiratorios. *Rev Cub Med Trop* 1996; 48(3): 171-73.

## VI.-TECNICAS GENERALES DE DIAGNOSTICO

### I.- INMUNOFLUORESCENCIA

**Lic. Alexander Piñón Ramos**

La inmunofluorescencia fue introducida por primera vez a principios de los años 40 y fue utilizada en el diagnóstico virológico a mediados de los cincuenta. Se ha comprobado que la técnica de inmunofluorescencia es sensible y segura para diagnosticar virus. Puede ser directa o indirecta y emplearse para detectar antígenos víricos específicos o para demostrar anticuerpos específicos de clase



para virus conocidos,proporciona resultados pocas horas después de haber ingresado un paciente en el hospital. Por tanto, es actualmente una de las técnicas principales en uso para el diagnóstico rápido de muchas infecciones víricas en período agudo.

#### I.1.-PRINCIPIOS:

Los fluorocromos se unen químicamente a los anticuerpos con una elevada eficiencia, sin interferir en la especificidad inmunológica del anticuerpo y sin perder la intensidad de su fluorescencia. El fluorocromo utilizado es excitado por la luz de corta longitud de onda (luz ultravioleta o azul) y emite luz de onda mas larga (luz verde) Los anticuerpos una vez marcados pueden ser utilizados en muchos formatos de inmunoensayo para detectar tanto antígenos virales como anticuerpos contra estos. En años recientes, la pureza de los fluorocromos y el uso y calidad de los microscopios ópticos de fluorescencia han mejorado grandemente.

Los fluorocromos más ampliamente utilizados son el isotiocianato de fluoresceína (FITC), que emite un color verde manzana, y el isotiocianato-tetrametil-rodamina (TRITC), que emite un color rojo-naranja. Aunque ambos fluorocromos son eficientes y fluorescen intensamente, la fluoresceína tiene tres ventajas: (1) el ojo humano es más sensible a la porción verde del espectro; (2) la fluoresceína deja un fondo rojizo; y (3) el posible brillo

verde no específico puede ser bloqueado por muchos agentes como el azul de Evans y el rojo congo, que refuerzan el fondo rojo. La presencia de 25µg/mL de azul de Evans en la solución del conjugado tiñe todas las partes de la célula, y su fluorescencia roja provee de un gran contraste con el verde de la fluorescencia del FITC. El azul de Evans es carcinogénico y teratogénico, por lo que debe ser manipulado con cuidado.

Como procedimiento general se toman las muestras o las suspensiones de cultivos celulares, se lavan mediante resuspensión en PBS y centrifugación. Las células resultantes se depositan y se dejan secar sobre un portaobjetos. En este procedimiento, la fijación celular es importante. Mediante la misma se impide la difusión de proteínas celulares y víricas, quedando intacta la morfología de las células y la distribución de antígenos víricos. La fijación también hace permeables las membranas de las células a los reactivos. La fijación en acetona durante 5-10 minutos a -20°C es el procedimiento sistemático que se sigue en las investigaciones víricas, pues da una fijación satisfactoria y no destruye la reactividad inmunológica de la mayoría de los antígenos. Después de la fijación, los anticuerpos específicos aplicados a las células se difunden a través de la membrana celular y se combinan con antígenos víricos en el interior de las células. El anticuerpo específico estará marcado con un fluorocromo si la técnica a emplear es la IF directa. Si el anticuerpo específico para el virus no estuviera conjugado con FITC, se usa la IF indirecta en que se aplica un segundo anticuerpo frente a las globulinas de la especie del primer anticuerpo conjugado con FITC, en los dos casos la fluorescencia se localiza en los antígenos víricos dentro de las células infectadas o en sus membranas y resalta las modalidades del ciclo de replicación de los diferentes virus. En los dos casos, la fluorescencia se localiza en los antígenos víricos dentro de las células infectadas o en sus membranas y resalta las modalidades características del ciclo de replicación de los virus. La distribución esperada de antígenos víricos dentro de la célula infectada, el color preciso de la fluorescencia y el tipo de célula en que apareció la fluorescencia contribuyen a la mayor especificidad del ensayo.

## **I.2.-MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA:**

Muchos de los modernos microscopios de fluorescencia tienen luz incidente (epiluminación). La luz, de longitudes de onda seleccionadas para producir excitación, se refleja por medio de un espejo de interferencia dirigiéndose a través del objetivo hasta la



muestra desde arriba. La luz emitida desde el fluorocromo pasa por atrás a través del objetivo y el espejo dicróico hasta el ocular.

En un microscopio de luz ordinaria, la estructura celular o del tejido es visible a causa de la absorción y la difracción de la luz incidente. El microscopio de fluorescencia funciona con un principio diferente. Si las sustancias fluorescentes están presentes, ellas se convierten en fuente de luz independiente, por irradiación con luz ultravioleta, violeta azul o luz verde excitada.

Uno de los dos tipos de sistemas de iluminación son utilizados para todos los microscopios de fluorescencia. La primera generación de microscopios de fluorescencia utilizaron la luz transmitida. En estos microscopios, la luz pasa a través de un filtro excitante y es reflejada por un espejo a través de un condensador de campo oscuro y llega hasta la muestra atravesándola. La fluorescencia emitida por la muestra pasa por el objetivo y el filtro barrera a través de los oculares hasta el observador. La mayor desventaja de estos microscopios es que requieren de altas fuentes de energía luminosa.

Virtualmente, todos los microscopios de fluorescencia modernos en los laboratorios de virología, usan sistemas de iluminación incidentes o sistemas de epi-iluminación, y están equipados con filtros de interferencia. En este tipo de microscopio, la fuente de luz está localizada en la parte superior de la muestra. La luz excitada pasa a través del filtro de excitación a un espejo dicróico, desviando el rayo de luz (a la longitud de onda seleccionada) bajando continuamente hasta el objetivo y llegando hasta la superficie de arriba de la muestra. La luz fluorescente emitida por la muestra es guiada a través del objetivo, el espejo dicróico, y el filtro barrera a través de los oculares del observador.

Las ventajas de la epi-iluminación son: (1) no es necesario un condensador externo; (2) el objetivo actúa como un condensador, centrando y enfocando la luz y (3) con solo la capa de la superficie de arriba de la muestra, se obtiene un buen brillo y una mejor imagen con elevado contraste.

Además, muchos microscopios combinan la fluorescencia con la luz ordinaria o con el sistema de contraste de fase. Esta última combinación es la más utilizada en el estudio de las células vivas.

Las fuentes de luz de suficiente intensidad de excitación son esenciales en la microscopía de fluorescencia. Las tres fuentes de luz más comúnmente utilizadas para la epi-

iluminación son: las lámparas de mercurio (50 o 100watt), lámparas de halógeno cuarzo (12volt, 100watt), y las lámparas de alta presión de xenón (12volt, 75-100watt) que tienen un espectro muy cercano a la luz del día o natural. La luz UV es requerida para la excitación del fluorocromo. Sin embargo, el pico de absorción del FITC es a 445nm, con emisión a 525nm. Con filtros de interferencia, más del 80% de la luz transmitida es entre los 400-500nm, en el espectro visible, y no en el rango ultravioleta.

### **Ventajas técnicas**

1. Permite detectar antígenos víricos mientras están en la célula; por tanto, se necesitan relativamente pocas células.
2. Tras la fijación, las muestras son estables y pueden enviarse al laboratorio sin grandes limitaciones de tiempo.

### **Desventajas técnicas**

1. Son indispensables los antisueros altamente específicos y buenos conjugados, que no siempre son asequibles.
2. Se necesita un microscopio de fluorescencia, que es costoso.
3. Es necesario tener gran experiencia.
4. Algunas muestras dan altos grados de reacciones no específicas por la presencia de mucosidad o por contaminaciones.

### **Equipos**

Vórtex

Centrífuga (que alcance las 3000rpm, no tiene que ser refrigerada)

Microscopio de fluorescencia

Secador

### **Materiales y Reactivos:**

Láminas porta objetos para fluorescencia

Viales de 1mL

Puntas de micropipetas que permitan tomar las cantidades especificadas en el protocolo

Micropipetas de 5-20 y de 50-100 $\mu$ L.

Vasos o frascos Coplin.

PBS 1x

Acetona pura

Anticuerpos monoclonales necesarios (casa comercial Chemicon):

- Adenovirus: MAB8052
- Influenza A, antígeno H1: MAB8252
- Influenza A, antígeno H3: MAB8254
- InfluenzaB: MAB8671
- Parainfluenza 1: MAB834-1
- Parainfluenza 2: MAB844-1
- Parainfluenza 3: MAB855-1

Virus Sincitial Respiratorio, fusión 1b, 92-11c: MAB8581

### **I.3- INMUNOFLUORESCENCIA DIRECTA:**

Es adecuada para

- a) la detección de un antígeno siempre que se cuenta con un suero hiperinmune específico de elevada potencia para conjugarse.
- b) para demostrar los sitios de formación o la presencia de anticuerpos cuando se cuenta con un antígeno marcado.

#### **I.3.1.-PROCEDIMIENTO:**

1. Homogeneizar la muestra agitándola en vórtex.
2. Repartirla en viales estériles y correctamente rotulados (tomar un vial para realizar la prueba y el resto conservarlos a -70°C).
3. Centrifugar a 3000 r.p.m. durante 10 minutos.
4. Eliminar el sobrenadante con pipeta Pasteur de 1mL (cuidar que no se elimine el sedimento).
5. Añadir 1mL de PBS y resuspender suavemente el sedimento.
6. Repetir los pasos 4 y 5 por dos veces más, cuidando siempre de en el último lavado dejar al menos 10µL de PBS para resuspender.
7. Añadir en cada pocillo de la lámina porta objetos (limpia y previamente rotulada) una gota de la muestra (aproximadamente 20µL) y observar al microscopio la presencia de células.

8. Secar (incubando a 37°C durante 1 hora o mejor a temperatura ambiente por mas tiempo).
9. Fijar la muestra embebiendo la lámina en el frasco Coplin con acetona preenfriada durante 10 minutos.
10. Secar (después de este paso, si no se va a continuar la técnica, las láminas deben ser conservadas a 4°C si la tinción se hará en dos días, si demora más, deben ser guardadas a -20°C en un porta laminas).
11. Añadir 20µL del anticuerpo específico conjugado con fluoresceína a la dilución de trabajo correspondiente.
12. Incubar durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda.
13. Eliminar el conjugado lavando ligeramente con PBS por tres veces (inclinando la lámina y dejar correr suavemente sobre la misma 1mL de PBS).
14. Realizar un lavado en agitación lento (introduciendo la lámina en un frasco Coplin con PBS durante 10 minutos).
15. Secar la lámina como en el paso 8.
16. Añadir una gota del glicerol al 90% al centro y bordes de la lámina, y colocar un cubreobjetos.
17. Examinar la muestra en un microscopio de fluorescencia.

#### **I.4.-INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA:**

También es utilizada para la detección de antígeno, usando de suero hiperinmune no conjugado, demostrándose los sitios de reacción por medio de un segundo suero marcado para inmunoglobulina del primer suero. Es más sensible que la inmunofluorescencia directa en la detección de antígenos.

##### **I.4.1.-PROCEDIMIENTO**

1. Homogenizar la muestra agitándola en vórtex.
2. Repartirla en viales estériles y correctamente rotulados (tomar un vial para realizar la prueba y el resto conservarlos a -70°C).
3. Centrifugar a 3000 r.p.m. durante 10 minutos.
4. Eliminar el sobrenadante con pipeta Pasteur de 1mL (cuidar que no se elimine el sedimento).

5. Añadir 1mL de PBS y resuspender suavemente el sedimento.
6. Repetir los pasos 4 al 5 por dos veces más, cuidando siempre de no eliminar el sedimento y dejando en el último lavado dejar al menos 10 $\mu$ L de PBS para resuspender.
7. Añadir en cada pocillo de la lámina (limpia y previamente rotulada) una gota de la muestra (20 $\mu$ L aproximadamente) y observar al microscopio la presencia de células.
8. Secar (incubando a 37°C durante 1 hora o mejor temperatura ambiente mas tiempo).
9. Fijar la muestra embebiendo la lámina en un frasco Coplin con acetona previamente durante 10 minutos.
10. Secar (después de este paso, si no se va a continuar la técnica, las láminas deben ser conservadas a 4°C si la tinción se hará en dos días, si demora más, deben ser guardadas a -20°C en un porta láminas).
11. Añadir 20 $\mu$ L del anticuerpo monoclonal en cada depresión circular conteniendo muestra.
12. Incubar durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda.
13. Lavar rápido con PBS por tres veces (inclinare la lámina y dejar correr suavemente sobre la misma 1mL de PBS).
14. Realizar un lavado lento (introducir la lámina en un frasco con PBS durante 10 minutos).
15. Secar la lámina como en el paso 8.
16. Añadir 20 $\mu$ L del anticuerpo anti especie conjugado con fluoresceína en cada pocillo conteniendo muestra.
17. Repetir pasos del 12 al 15.
1. Añadir una gota del glicerol al 90% al centro y bordes de la lámina, y colocar un cubreobjetos.
18. Examinar la muestra en un microscopio de fluorescencia.

### **I.5.-LECTURA E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:**

Ante la presencia de 5 o más células fluorescentes se informa el caso como positivo. En ausencia de células fluorescente (coloración roja) o por debajo de 5 células se informa el caso como negativo.

#### **Referencias:**

1. Edwin H, David A, Evelyne T. 1995. Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial, and Chlamydial infections. 7a edition. American Public Health Association.

## **II.-DETECCIÓN SIMULTÁNEA DE LOS VIRUS: INFLUENZA A, B y C, VIRUS RESPIRATORIO SINCICIAL A y B y ADENOVIRUS EN MUESTRAS CLÍNICAS POR ENSAYO DE MULTIPLEX RT-PCR-ANIDADA.**

**Dra. Clara Savón Valdés**

Los estudios clínicos epidemiológicos de los virus respiratorios están basados en el aislamiento y la serología. Como ya ha sido planteado en acápites anteriores es difícil recuperar algunos virus respiratorios en muestras clínicas por malas prácticas en el transporte o conservación de las mismas o debido a que muchas de ellas presentan una carga viral baja, por ejemplo en el hisopado nasofaríngeo de un niño menor de un año sólo se encuentran como promedio  $2 \times 10^4$  ufp de VRSB por mL (1).

Por otro lado la presentación clínica de las infecciones por distintos virus respiratorios, pueden tener características muy similares, es por ello que el desarrollo de ensayos virológicos que permiten la rápida identificación, del agente etiológico son de gran interés para la toma de medidas terapéuticas.

Actualmente las técnicas de nested RT-PCR y PCR de tipo múltiplex son de gran utilidad. Entre sus principales ventajas, está la posibilidad de realizar un diagnóstico preciso aún en una muestra clínica no útil para el aislamiento viral, o bien la de incluir iniciadores capaces de detectar más de un virus en una sola reacción con buenos resultados (2).

La múltiplex RT-PCR anidada desarrollada por Coira y cols. en el 2003, es capaz de detectar y tipificar a la vez, diferentes virus respiratorios. Los iniciadores o cebadores fueron diseñados en regiones altamente conservadas de la nucleoproteína (NP) de los Influenzavirus, la proteína de fusión (F) del Virus Respiratorio Sincicial Humano (VRSB) y el hexón de los Adenovirus de los tipo 1-47. Los productos de amplificación de la PCR son específicos de cada uno de ellos y se pueden diferenciar por electroforesis en gel de agarosa al 3%, por ejemplo pueden observarse fragmentos de 661 pb para el VRSB tipo B, 363 pb para el VRSB tipo A, 301pb para el Influenza tipo A, 226 pb para el Influenza tipo B, 168pb para los adenovirus y 111pb para el virus de la Influenza C.

Este ensayo en su diseño incluye en el tampón de extracción un control interno de amplificación que permite excluir la presencia de falsos negativos en las muestras debidos a la presencia de inhibidores en la muestra o fallas en el proceso de extracción de ARN viral.

La sensibilidad del ensayo es elevada siendo posible obtener niveles de detección entre 0.1-0.01 TCID<sub>50</sub> para el virus de la influenza A y B, entre 1-10 moléculas de producto clonado amplificado para el influenza C. Para el VRSB A y B los niveles de detección son de 1-10 moléculas del producto amplificado y clonado y 1 molécula para el Adenovirus, fue el nivel de detección que se obtuvo para este último.

Su especificidad es muy alta no existiendo reacciones cruzadas con otros virus respiratorios, como Rinovirus o Parainfluenza tipo 1, 2, 3, 4 a y 4b (3).

#### **Equipos :**

- Gabinete de seguridad Clase II
- Centrifuga de viales refrigerada
- Vortex
- Congelador de  $-70^{\circ}\text{C}$
- Refrigerador o Cámara de  $4^{\circ}\text{C}$
- Termociclador
- Cámara de electroforesis submarina con fuente
- Transiluminador y cámara fotográfica

#### **Materiales y Reactivos:**

Viales eppendorf de 2mL

Viales de PCR de 0.5mL

Micropipetas de 10,100,200,1000  $\mu\text{l}$

Puntas de PCR con filtro para micropipetas

Pipetas Pasteur

Guantes desechables

Tubos de 5mL plástico

Tubos universales de 50 mL

Batas

Glicógeno

Sarkosyl



Tiocianato de Guanidinio  
Citrato de Sodio  
Etanol 100 % ( PA)  
Isopropanol (PA)  
Agarosa L M  
Kit RT –Access ( Promega n cat:1250)  
Amplitaq Pol ( Perkin Elmer )  
dNTPs  
MgCL2  
Agua libre de ARNsa  
Marcador de peso Molecular XIII (Roche)  
Azul de Bromofenol

## **II.1.-EXTRACCIÓN DE ACIDOS NUCLEICOS VIRALES DE MUESTRAS CLÍNICAS RESPIRATORIAS.**

### **PROCEDIMIENTO:**

Se describe la extracción de acuerdo con el protocolo propuesto por Casas y cols. 1995 (4).

1. Dispensar en un vial eppendorf 200µL de la muestras clínicas y se adicionan 600µL de Buffer lisis ( ver preparación). Incubar 15 minutos a temperatura ambiente.
2. Añadir 600µL de Isopropanol preenfriado a  $-20^{\circ}\text{C}$ ; agitar en Vortex y centrifugar a 13000 r.p.m. durante 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .
3. Eliminar el sobrenadante con pipeta pasteur desechable.
4. Añadir 1mL de etanol al 70% preenfriado preparado en el momento o alicuotado. Agitar ligeramente para limpiar el sedimento.
5. Centrifugar a 13000 r.p.m. durante 10-20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .
6. Eliminar el sobrenadante con una pipeta pasteur desechable sin dejar resto de alcohol . Secar perfectamente.
7. Resuspender en 15µL de H<sub>2</sub>O libre de ARNsa.

<b>REACTIVOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ACIDOS NUCLEICOS</b>			
<b>BUFFER LISIS CON CONTROL INTERNO</b>			
<b>Reactivos</b>	<b>Solución de Partida</b>	<b>Preparación</b>	<b>Concentración final de buffer</b>
Tiocianato de Guanidinio	5M	5.91 gr+ 5.5mL H <sub>2</sub> O para 10mL	4M
Citrato de Na	1M	14.71 gr hasta 50mL con H <sub>2</sub> O ajustar pH=7 con Ac. Acético glacial	25mM
DTT	1M	1.54 gr +10mL de H <sub>2</sub> O	1mM
Sarkosyl	3%	3 gr + 100mL de H <sub>2</sub> O	0.5%
Glicógeno	20 mg/mL	concentración comercial	0.1mg/mL
Control Interno	2x10 <sup>8</sup> cop/μL	Hacer diluciones seriadas a 1/100 hasta 2x10 <sup>6</sup>	2x10 <sup>3</sup> cop/μL

<b>Otros Reactivos Necesarios</b>		
Isopropanol	puro	Alicuotas de 5mL a -20 <sup>0</sup> C
Etanol al 70%	70mL + 30mL de H <sub>2</sub> O	Alicuotas de 20 mL a -20 <sup>0</sup> C
	350 mL+150 mL de H <sub>2</sub> O	
Agua libre de ARNsa	puro	aliquotas en eppendorf 1.5mL

## **II.2.-PRIMERA REACCION DE AMPLIFICACIÓN: RT/PCR**

### **PROCEDIMIENTO:**

Para la primera reacción de amplificación se utiliza el Kit de RT-PCR Access System (Promega n Cat a1250). Este Kit compatibiliza la Transcripción Inversa y la amplificación del c ADN degenerado.

1. Preparar la mezcla de reacción de acuerdo con lo que se muestra en el esquema 1. El volumen final de la reacción es de 50 μL /tubo (45μL de mezcla + 5μL de extracto de ARN). Las características de la mezclas son las siguientes:

2.-Mezcla previa de iniciadores o cebadores de sentido (+) y sentido negativo (-). Esto se prepara de manera que la concentración final de los iniciadores sea de 20 pmol/50µl de los reactivos. Los iniciadores se muestran en el esquema 3.

3.-La concentración óptima del  $S_0_4Mg_2$  es de 2mM y 300mM para los dNTPs de cada uno de ellos .

4.-Añadir 5µl del extracto de ARN, y dar un golpe de centrifuga a los tubos para que se mezcle el ARN con la mezcla de reacción. Llevar los tubos al termociclador.

**Nota:** Pueden prepararse lotes de 50 o 100 tubos de mezcla de reacción manteniéndolos congelados a  $-70^{\circ}C$  hasta su uso.

## Esquema 1

### Protocolo de la RT/PCR Múltiplex

#### Mezcla de Reacción

Kit –RT Access	1 Tubo	10 Tubos			
H2O	23.36. µL	183.86µL			
Buffer AMVRT/TFL (5X)	10 µL	100 µL	RT	48 <sup>0</sup> C	45min
DNTPs( promega 10mM)	1.5 µL	15 µL		94 <sup>0</sup> C	2min
SO4Mg2(25mM)	4 µL	40 µL	PCR x 45 ciclos	94 <sup>0</sup> C	30seg
M1 (+)	2.14µL	21.14µL		50 <sup>0</sup> C	2min
M1(-)	2µL	20µL		68 <sup>0</sup> C	1min
AMVRtasa 5u/µL	1µL	10 µL	Elongación Final	72 <sup>0</sup> C	10min
TFLpolymerasa 5u/µL	1µL	10 µL		4 <sup>0</sup> C	
Cantidad total de Mezcla	40µL	400µL			

### II.3.-SEGUNDA REACCION DE AMPLIFICACIÓN/PCR.

#### PROCEDIMIENTO:

Para la segunda reacción de amplificación los tubos deben prepararse de acuerdo al protocolo que se muestra en el esquema 2.

El volumen de la reacción es de 50µL /tubo (48µL de la mezcla de reacción y 2µL de ADN amplificado en la reacción de RT-PCR). Esta mezcla de reacción se prepara en el laboratorio partiendo de un Buffer 5X, que se describe en la Tabla 1.

Las mezclas de los iniciadores sentido positivo (+) y sentido negativo (-) se preparan previamente y deben quedar a una concentración de 20pmol /50µL de cada uno de ellos en la mezcla de reacción

Las concentraciones de los dNTPs será 200µM.

El Mg se le adiciona al Buffer con una concentración final 2mM

**Tabla 1**

BUFFER 5X para la PCR Anidada				
Reactivos	Lote	uso	2mL	20mL
Tris-HCl pH8.5	1M	300mM	600µL	6mL
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1M	75mM	150µL	1.5mL
MgCl <sub>2</sub>	25mM	10mM	800µL	8mL
H <sub>2</sub> O			450µL	4.5mL

## Esquema 2

### Protocolo de la PCR Anidada

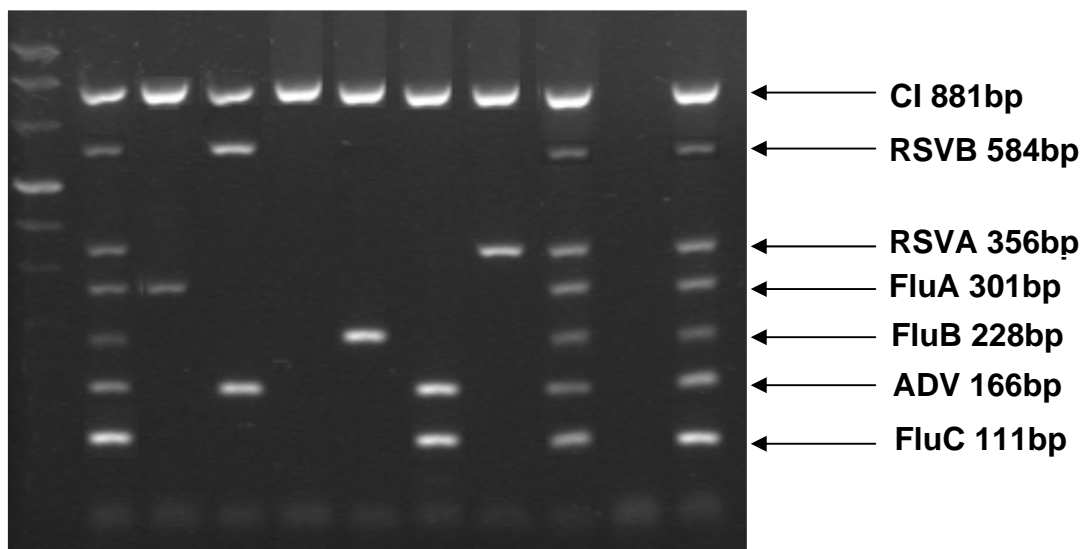
#### Mezcla de Reacción

	1 Tubo	10 Tubos			
H <sub>2</sub> O	31.68µL	316.8µL			
5XB (pre y alicoutado)	10µL	100µL		95 <sup>0</sup> C	4min
dNTPs(Pharmacia-100mM)	0.4µL	40µL	PCR x35 ciclos	94 <sup>0</sup> C	30seg
M 2 (+)	2.95µL	29.5µL		55 <sup>0</sup> C	1min
M 2(-)	2.47µL	24.7µL		72 <sup>0</sup> C	30seg
Taq pol ( Perkin Elmer)	0.5µL	2.5µL	Elongación Final	72 <sup>0</sup> C	10min
Cantidad Total de Mezcla	48µL	480µL		4 <sup>0</sup> C	forever

#### **II.4.-VALORACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE AMPLIFICACIÓN:**

Los Productos se revelarán por electroforesis en un gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidium (solución de bromuro de etidium 0.1 mg/mL , en 100mL de TBE). Las bandas correspondientes a los diferentes virus serán visualizadas en un transiluminador de luz UV. En la figura 1 se pueden observar fragmentos de 661 pb para el VRSH tipo B, 363 pb para el VRSH tipo A, 301pb para el Influenza tipo A, 226 pb para la influenza tipo B, 168pb para los adenovirus y 111pb el virus de la Influenza C.

#### **MULTIPLEX PCR PARA VIRUS RESPIRATORIOS**



#### **II .5.-PRECAUCIONES PARA EVITAR CONTAMINACIONES:**

Debido a la alta sensibilidad de la PCR anidada deben tomarse precauciones para excluir la posibilidad de contaminación de los tubos de reacción con productos previamente amplificados o ARN o ADN procedente de otras muestras y controles. La preparación de alicuotas de las muestras respiratorias, la preparación de los reactivos el procesamiento de las muestras y la PCR anidada deben ser realizadas en cabinas situadas en laboratorios separados , todo ello alejado de la Zona donde se analizan los productos amplificados. Cada cabina debe estar equipada con un juego independiente de reactivos , micropipetas , tubos de reacción esterilizados y puntas de pipetas con filtro.

## II .6.-PREPARACIÓN DEL CONTROL INTERNO DE LA MULTIPLEX RT-PCR DE VIRUS RESPIRATORIOS CLONADOS EN E. COLI.

Plásmidos clonados en E. coli

pGemT A	Influenza A
pGemT B	Influenza B
pGemT C	Influenza C
pGemT RSA	VRSA
pGem T RSB	VRSB
pGemT CI	Control Interno

guardados a  $-70^{\circ}\text{C}$  con 50% de glicerol

### Cultivo bacteriano

Se utilizan 10 mL medio de LB en universales. se inoculan con asa en mechero y se dejan en agitación a  $37^{\circ}\text{C}$  durante toda la noche.

### Extracción de los Plásmidos de las bacterias

Para ello se utilizan columnas Wizard de Promega y se siguen las orientaciones del fabricante.

### Linearización del Plásmido

	Vol 50 $\mu\text{L}$	Vol 100 $\mu\text{L}$	Vol 200 $\mu\text{L}$
ADN purificado cerrado	20 $\mu\text{L}$	40 $\mu\text{L}$	80 $\mu\text{L}$
buffer H 10X	5 $\mu\text{L}$	10 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$
Sal I	1 $\mu\text{L}$	2 $\mu\text{L}$	4 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O bidestilada	24 $\mu\text{L}$	48 $\mu\text{L}$	96 $\mu\text{L}$

Incubar a  $37^{\circ}\text{C}$  en baño de agua o en el termociclador durante 2.5 horas

Incubar a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 5min.

## II.7.-OLIGONUCLEOTIDOS UTILIZADOS: ESQUEMA 3

<b>Oligonucleótidos RT/PCR de sentido directo (M1+) o inverso (M1-)</b>		
M1 +	NPAC11+	<b>GAACTCRTCCYWWATSWCAAWGRRGAAAT</b>
M1 +	NPB1+	<b>ACAGAGATAAAGAAGAGCGTCTACAA</b>
	RSFAB41+	<b>ATGGAGYTG CYRATCCWCARRRCAARTGCAAT</b>
	RTS	<b>GCTTGGGCGTGTCTCAAATCT</b>
	ADV1F+	<b>CAACACCTAYGASTACATGAA</b>
M1 -	NPABC22-	<b>ATKGCWCYRAYAMWCTYARRTCTTCAWAKGC</b>
	RSFAB51-	<b>AGGTGTWGTTACACCTGCATTRACACTRAATTC</b>
	RTA-	<b>GTCGCCACGGTTGATGAGAGCT</b>
	ADV1R-	<b>KATGGGGTARAGCATGTT</b>

<b>Oligonucleótidos de la PCR Anidada</b>		
	NPAB3 +	<b>GATCAAGTGAKMGRRAGYMGRAAYCCAGG</b>
M2 +	NPC3+	<b>AAATTGGAATTTGTTCCTTTCAAGGGACA</b>
	RSFA8+	<b>TTATACTCAACAATRCCAAAAAWACC</b>
	RSFB112+	<b>ATCTTCCTAACTCTTGCTRRTTAATGCATTG</b>
	NS	<b>GGGGTGTATGAGCCATATTCAACGG</b>
	ADV2F+	<b>CCCITYAACCACCACCG</b>
M2 -	NPAC4 -	<b>TCTTCAWATGCARSWSMAWKG CATGCCATC</b>
	NPB4 -	<b>CTTAATATGGAAACAGGTGTTGCCATATT</b>
	RSFA10 -	<b>AAATCCCTGGTAATCTCTAGTAGTCTGT</b>
	RSFB133B -	<b>GATGCGACAGCTCTGTTGATTTACTATG</b>
	NA	<b>AGCCGCCGTCCCGTCAAGTCAG</b>
	ADV2R -	<b>ACATCCTTBCKGAAGTTCCA</b>

## II .8.-SOLUCIONES :

### Tampón de electroforesis. TBE 5X pH 8.0

TRIS	54g
ACIDO BORICO	27.5g
EDTA	20mL *
H2O C.S.P.	1000 mL

\*20mL de EDTA 0.5M

Nota :para preparar TBE 1X tomar 200 mL de TBE 5X y completar con 800 mL de agua.

### Tampón muestra 6X

EDTA	500mM
Glicerol	10%
Azul de Bromofenol	0.01%

### Gel de Agarosa al 3%

Agarosa	3gr
TBE IX	100 mL
Bromuro de Etidium*	0.1µg/mL

### Referencias:

- 1.-Smith Mc, CreutzC, Huang YT. Detection of Respiratory Syncytial Virus in nasopharyngeal secretions by Shell vial assay. J Clin Microbiol.1991;21:29-30.
- 2.-Weige J A, Puppe W, Grondhal B, Schmidt H. Epidemiological investigation of nine respiratory pathogens in hospitalized children in Germany Using Multiplex reverse Transcriptase Polymerase Chain reaction. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000;19:336-343.
- 3.-Coira MT, Pérez-Breña P, Garcia ML , Casas I. Simultaneous detection of Influenza A, B, And C viruses Respiratory Syncytial Virus and Adenovirus in clinical samples by Multiplex Reverse Transcription Nested - PCR Assay. J Virol Methods 2003;69:132-144.
- 4.- Casas.I,Powell L, Klapper Pe, Cleator GM New methods for the extraction of viral ARN and ADN from cerebrospinal fluid for use in polymerase chain reaction .J Virol Methods 1995,53:25-36.
- 5.-Maniatis T, Sambrook J, Fritsch E.F. Molecular Cloning . Laboratory Part III Second ed 1989.