

IICA
PM-A1/SC
89-10

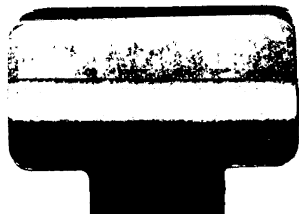
IICA



MANUAL DE DIAGNOSTICO RAPIDO
DE ENFERMEDADES VIRALES
DE LOS ANIMALES UTILIZANDO
METODOS INMUNOENZIMATICOS

PROGRAMA V: SALUD ANIMAL Y SANIDAD VEGETAL

PV
11CA
PM
A1/SC-89-10



ISSN-0534-5391



IICA
INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACION PARA LA AMERICA LATINA

IICA
BIBLIOTECA VENEZUELA

14 AGO 1999

RECIBIDO

MANUAL DE DIAGNOSTICO RAPIDO DE ENFERMEDADES VIRALES DE LOS ANIMALES UTILIZANDO METODOS INMUNOENZIMATICOS

Luis V. Meléndez, VPI
Gerhardt G. Schurig, VPI
Alejandro A. Schudel, INTA
Judy E. Devery Pocius, VPI
Linda M. Dellers, VPI

PROGRAMA V: SALUD ANIMAL Y SANIDAD VEGETAL

00000694

SERIE DE PUBLICACIONES
MISCELANEAS

ISSN-0534-5391
A1/SC-89-10

San José, Costa Rica
Julio, 1989

"Las ideas y planteamientos contenidos en los artículos firmados son propios del autor y no representan necesariamente el criterio del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura"

PREFACIO

En los últimos años las técnicas inmunoenzimáticas, mas conocidas como ELISA, (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay), han sido desarrolladas para el diagnóstico de las enfermedades, tanto en humanos como en animales y plantas. Su alta sensibilidad, especificidad, rapidez y economía las convierten en instrumentos esenciales para el diagnóstico. Normalmente son superiores a muchas técnicas serológicas convencionales y no solo son aplicables - con grandes ventajas - en el campo de la virología, pero en la microbiología en general, la toxicología y en la biotecnología moderna.

Este manual es producto de las presentaciones y prácticas desarrolladas en el Curso para Médicos Veterinarios, Laboratoristas de Servicios Gubernamentales de Países de América Latina, que se desarrolló en la Ciudad de Buenos Aires, Argentina, del 19 al 20 de Septiembre de 1985. Este curso fue organizado por la Dirección del Programa de Salud Animal, del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), con la colaboración del Centro de Investigaciones en Ciencias Veterinarias del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de la República Argentina y el Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine, Virginia Tech - VPI, Blacksburg, Virginia.

El Programa de Salud Animal del IICA se siente muy complacido de presentar esta publicación como parte de sus actividades de cooperación técnica a los servicios veterinarios de los países de América Latina y otras áreas. Asimismo, expresa su mas profundo agradecimiento a los autores de este manual que en forma totalmente desinteresada han brindado el beneficio de sus conocimientos y experiencia para lograr esta publicación, que estamos seguros será de gran utilidad para el control y la prevención de las enfermedades virales de los animales.

Héctor Campos López

INDICE

	<u>Página</u>
Introducción.....	1
Ventajas de las pruebas inmunoenzimáticas.....	2
Desventajas de las pruebas inmunoenzimáticas....	2
Método directo para determinación de antígeno...	3
Método indirecto para detección de antígeno.....	4
Determinación de anticuerpos: método indirecto..	6
Preparación de reactivos para diagnóstico de rotavirus.....	8
Protocolo de prueba directa para detectar antígeno rotavirus.....	11
Protocolo de prueba indirecta para detectar antígeno rotavirus.....	12
Protocolo de prueba indirecta para detectar anticuerpo.....	13
Protocolo de prueba indirecta para titulación de anticuerpos.....	13
Reactivos.....	15
Punto Inmune-Inmunodot.....	16
Punto Inmune-Reactivos.....	18
Método para SDS-Electroforesis en gel de polyacrilamida (SDS-PAGE).....	18
Western Blot.....	20
Instrumentos y Reactivos para SDS-PAGE and Western Blot.....	22
Producción, Mantenimiento y Preservación de anticuerpos monoclonales.....	23
Reactivos.....	29
Referencias.....	34
 Figuras:	
1. ELISA sandwich para determinación de Ag.....	5
2. Método sandwich-antiglobulina para ensayo de Ag.....	7
3. ELISA sandwich para determinación de Ac.....	9

INTRODUCCION

El diagnóstico de enfermedades virales de los animales por lo general se hace aislando el agente etiológico en cultivos celulares. Este procedimiento muchas veces tiene grandes desventajas para el diagnóstico rápido de estas enfermedades. Es conocido que toma bastante tiempo obtener cultivos puros con muchos virus, y aun cuando el clínico reciba un diagnóstico exacto, la información es tardía y no es útil como para modificar en forma efectiva los tratamientos suministrados a los animales afectados. Cultivar e identificar virus muchas veces toma más de dos a cuatro semanas. Además muchos virus son difíciles de multiplicar en los cultivos de tejidos con que se trabaja regularmente en los laboratorios. Esto es lo que se observa generalmente con agentes como los rotavirus, adenovirus, virus de Norwalk y astrovirus.

Es debido a esta situación que es necesario desarrollar métodos de diagnóstico de enfermedades virales más rápidos y sensibles.

Una forma de proveer diagnóstico rápido y exacto es poder identificar los agentes patógenos directamente en las muestras clínicas. Esto es perfectamente posible ya que la mayor parte de los agentes patógenos tienen determinantes antigénicos como proteínas y polisacáridos que pueden ser claramente diferenciados de los determinantes antigénicos de las células del huésped afectado mediante procedimientos inmuno-enzimáticos

Existe un buen número de procedimientos inmuno-enzimáticos que pueden ser utilizados en la detección de antígenos propios de agentes infecciosos. Sin embargo, a fin de que estos procedimientos tengan éxito es necesario que el sistema de inmuno-ensayo empleado sea sensible, rápido, conveniente y además suficientemente específico como para no interferir con otros materiales que pudieran estar presentes en los líquidos orgánicos del animal enfermo.

La necesidad de contar con métodos de diagnóstico rápidos y fehacientes requiere de reactivos estables y disponibles cuando fuere necesario. Los métodos inmuno-enzimáticos cuentan con estas condiciones siendo una de las pruebas más empleadas el procedimiento denominado E.L.I.S.A. (por enzyme linked immunosorbent assay = enzima ligada a un inmunoadsorbente). Las pruebas inmuno-enzimáticas utilizan inmunoglobulinas o proteínas marcadas con enzimas que mantienen su capacidad de reaccionar específicamente con antígenos.

La utilidad de la prueba inmuno-enzimática se basa en la amplificación inherente del sistema enzima y sustrato, ya que solo una molécula de fosfatasa alcalina (alkaline phosphatase), o de peroxidasa de rábano de caballo (horseradish peroxidase), enzimas empleadas en estas pruebas, pueden reaccionar con hasta 100.000 moléculas de sustrato por minuto y generar un producto visible bajo condiciones apropiadas. Este notable aumento permite medir cantidades muy pequeñas de antígeno o anticuerpos, a menudo en el rango de los picogramos, utilizando solamente una simple reacción enzima-sustrato.

Los mejores sustratos son aquellos que producen al reaccionar un color visible, fácil de medir mediante instrumentos o por visión directa.

VENTAJAS DE LAS PRUEBAS INMUNO-ENZIMATICAS

- Aumento inherente de la reacción enzima-sustrato ($\times 10^6/10$ min.).
- Estabilidad de los reactivos.
- Medición de resultados por interpretación visual o por instrumentos simples.
- Pequeños volúmenes de reactivos.
- Resultados de naturaleza cuantitativa.
- Posibilidad de ejecutar reacciones controladas.
- Bajo nivel de peligro biológico.
- Costo bajo.

Las pruebas inmuno-enzimáticas son excelentes herramientas de diagnóstico rápido pues permiten detectar virus difícilmente cultivables en cultivos celulares corrientes como los agentes etiológicos de enfermedades diarreicas y respiratorias.

Las pruebas inmuno-enzimáticas permiten también trabajar con un gran número de muestras, lo que es particularmente favorable cuando se quiere estudiar la epidemiología de las enfermedades infecciosas.

Hay muchas pruebas inmuno-enzimáticas que actualmente pueden ejecutarse en 20 minutos, lo que indudablemente tiene grandes ventajas en el tratamiento de las enfermedades infecciosas.

DESVENTAJAS DE LAS PRUEBAS INMUNO-ENZIMATICAS

- Dependencia de la cinética antígeno-anticuerpo:
 - reactividad cruzada
 - sobre especificidad
 - limitaciones en la afinidad del anticuerpo
- Reactividad no específica

- Variación en la habilidad de los antígenos de adherirse a la fase sólida.
- Pérdida de la actividad del anticuerpo después del marcado con enzima.
- Variación de la reacción enzima-sustrato.
- Sensibilidad a inhibidores de la actividad enzimática.
- Presencia de actividad enzimática endógena de los antígenos a detectar.
- Limitaciones en la detección del sustrato o sus productos de degradación.

MÉTODOS PARA EJECUTAR PRUEBAS INMUNO-ENZIMÁTICAS

Método directo para determinación de antígeno (o método sandwich)

1. En este método el anticuerpo específico para el antígeno (denominado primer anticuerpo) es adsorbido a la fase sólida. Aunque se pueden emplear varios tipos de fases sólidas, una de las más usadas es la placa plástica de microtitulación con 96 pocillos, ya que permite efectuar varias reacciones de una sola vez. Existen varias fuentes comerciales para estas fases sólidas. Una bastante empleada es la llamada Immulon II (Dynatech Laboratories, Alexandria, VA, U.S.A.).

Pueden también ser usadas membranas de nitrocelulosa, bolillas o cuentas plásticas, cubiertas de anticuerpos como fase sólida en vez de placas de microtitulación.

Teóricamente, las fases sólidas más eficientes para esta prueba serían aquellas que permiten enlaces covalentes entre ella y los grupos carboxilo de las moléculas de anticuerpo. La adsorción de las proteínas al plástico ocurre en forma física por uniones no covalentes.

2. Adición de la muestra a la fase sólida cubierta con el primer anticuerpo.

En esta fase el antígeno presente en la muestra reaccionará con el primer anticuerpo que está adsorbido a la fase sólida. Todo exceso de antígeno que no reaccione específicamente con los anticuerpos será eliminado durante la fase de lavado siguiente.

3. Fase de lavado (siempre en presencia de detergentes).
4. Adición de anticuerpos específicos para el antígeno marcados (conjugados) con enzima.

En esta fase el anticuerpo marcado con la enzima se adhiere al antígeno.

5. Fase de lavado en presencia de detergentes.

Esta tiene por objeto eliminar todo el exceso de anticuerpo marcado con enzima que no reaccionó específicamente con el antígeno.

6. Adición del sustrato.

En esta fase la enzima ligada al anticuerpo reaccionará con el sustrato produciendo un resultado que puede ser medido por un cambio de color de los reactivos. La reacción debe ser detenida a un tiempo predeterminado. Esto se obtiene al agregar una gota de ácido sulfúrico a la reacción. La medición del cambio de color puede hacerse con espectrofotómetro o colorímetro especialmente diseñados para placas de microtitulación, o visualmente. El cambio de color es proporcional a la cantidad de antígeno existente en la muestra.

El método directo tiene la ventaja de ser simple, rápido y con un mínimo de reactividad inespecífica. Sin embargo, requiere de anticuerpos específicos para cada virus o antígeno investigado marcados con enzimas.

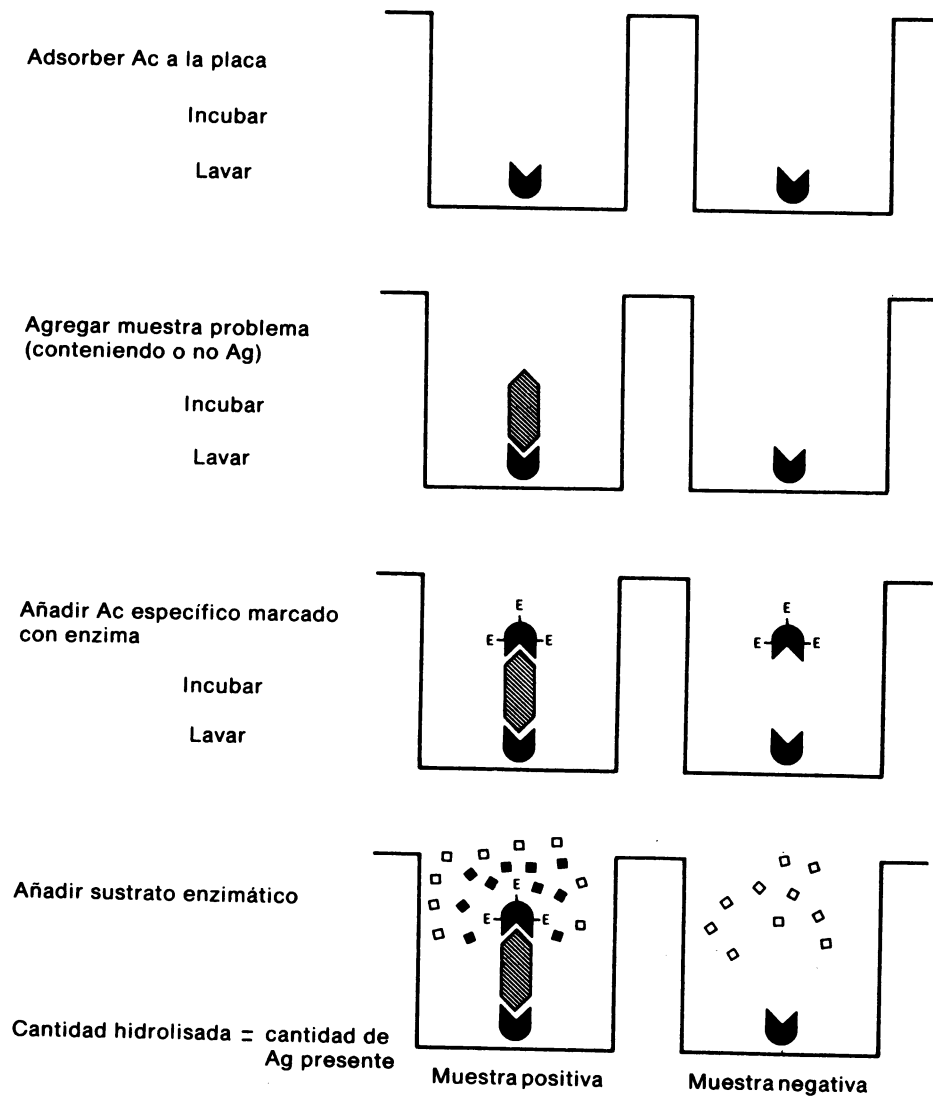
7. Fases principales (Fig. 1)

Método indirecto para detección de Antígeno (o ELISA sandwich antiglobulina).

1. Adsorción del primer anticuerpo.
2. Fase de lavado con detergentes.
3. Adición de la muestra a la fase sólida cubierta con el primer anticuerpo.
4. Fase de lavado.
5. Agregar anticuerpo específico para el antígeno sin marcar (denominado segundo anticuerpo).
6. Fase de lavado.

Tiene por objeto eliminar todo el exceso del segundo anticuerpo no combinado específicamente con el antígeno.

7. Agregar inmunoglobulina específica marcada con enzima, dirigida contra el segundo anticuerpo.



Voller et al. Bull. Wild. Hlth. Org. (1976) 53, 55-56

Fig. 1 ELISA sandwich para determinación de Ag.

8. Fase de lavado.
9. Agregar sustrato.
10. Frenar la reacción y medir el cambio de color.
11. Fases principales (Fig. 2).

En vez de una inmunoglobulina marcada puede usarse proteína A derivada de estafilococos. La proteína A marcada tiene la propiedad de ligarse o adherirse a la fracción Fc de la mayor parte de las inmunoglobulinas animales como las del hombre, ratón, cobayo y conejo, pero no con la de cabra o de oveja.

El método indirecto tiene la ventaja de poder detectar cualquier antígeno viral con un solo anticuerpo marcado siempre que se cumplan dos condiciones:

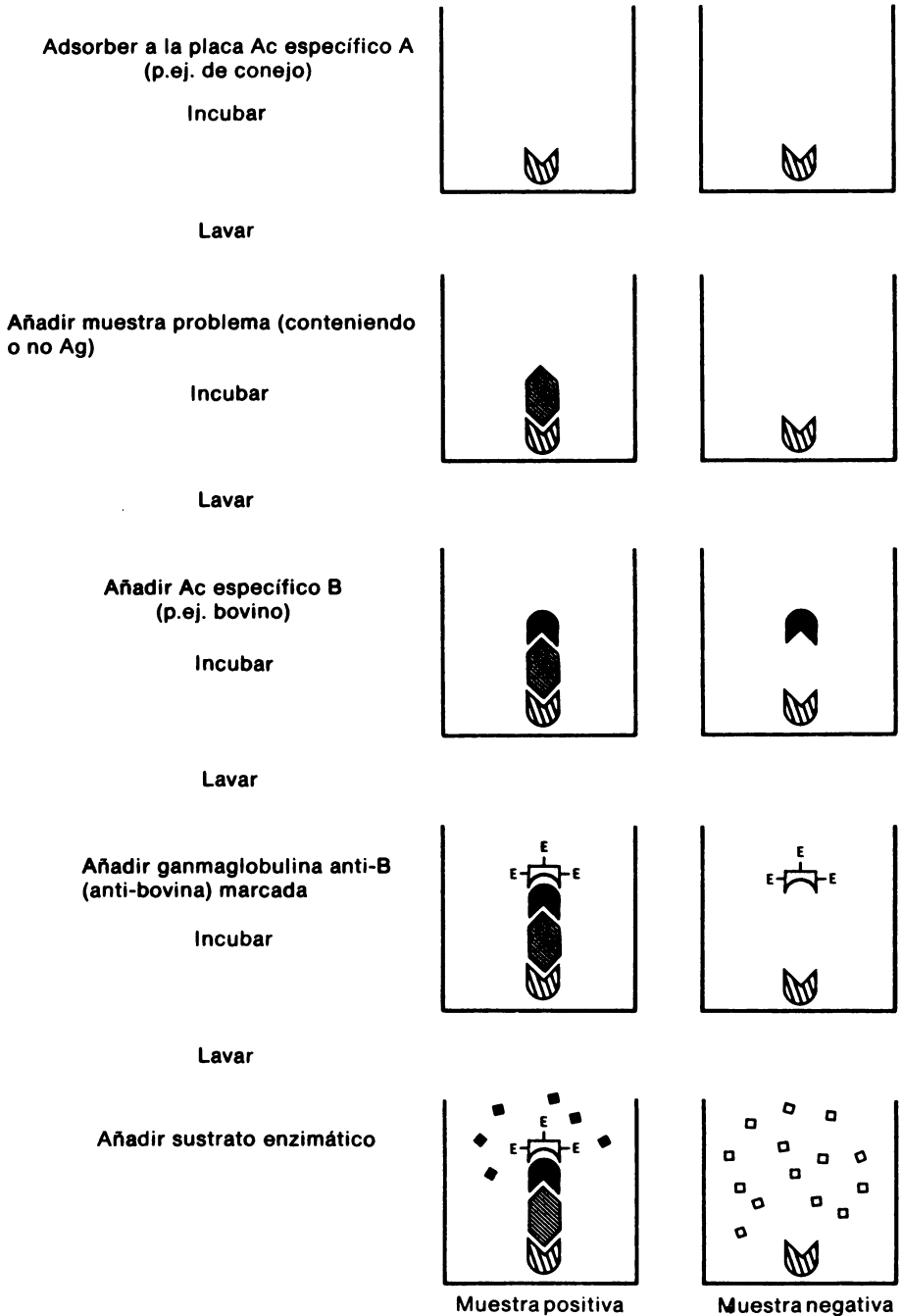
- a) Que el anticuerpo marcado no reaccione con los antígenos virales a detectar, y
- b) Que el primero y segundo anticuerpo se originen de especies diferentes.

El método indirecto a menudo es más sensible que el método directo, ya que varias moléculas de anticuerpo marcado van a ser capaces de combinarse con una molécula de anticuerpo específico para el antígeno (segundo anticuerpo). Este método sin embargo, requiere de un período de incubación adicional, y es además necesario preparar el primer y segundo anticuerpo en dos especies de animales diferentes para así prevenir la reactividad de los anticuerpos marcados con el primer anticuerpo.

Determinación de anticuerpos

Método indirecto

1. El antígeno contenido en la muestra se adhiere a la fase sólida.
2. Fase de lavado.
Tiene por objetivo eliminar todo el antígeno no adherido a la fase sólida.
3. Agregar muestra problema. Aquí el anticuerpo presente reaccionará con el antígeno adsorbido a la fase sólida. Todo exceso de anticuerpo que no reaccione específicamente con el antígeno será eliminado durante la fase de lavado.
4. Fase de lavado.



Voller et al. Bull. Wld. Hlth. Org. (1976) 53, 55-56

Fig. 2 Método sandwich-antiglobulina para ensayo de Ag.

5. Adición de inmunoglobulina antiespecie marcada con enzima.
6. Fase de lavado.
7. Adición del sustrato.
8. Frenado de la reacción y lectura.
9. Fases principales (Fig. 3).

Pureza de los reactivos

Debido a la alta sensibilidad de las pruebas inmunoenzimáticas los reactivos empleados deben ser muy específicos y puros para prevenir la aparición de respuestas no específicas y un alto nivel de reactividad basal. Los reactivos más convenientes son aquellos que se preparan con componentes virales altamente purificados. Lo mismo vale para los anticuerpos empleados. Anticuerpos de gran homogeneidad y especificidad son los anticuerpos monoclonales.

Preparación de reactivos para diagnóstico de Rotavirus

Los rotavirus son agentes virales de doble banda de ácido ribonucleico (ARN) de 65 nm de tamaño, y con la capacidad de producir gastroenteritis infecciosas en los animales y en el hombre, especialmente en los infantes.

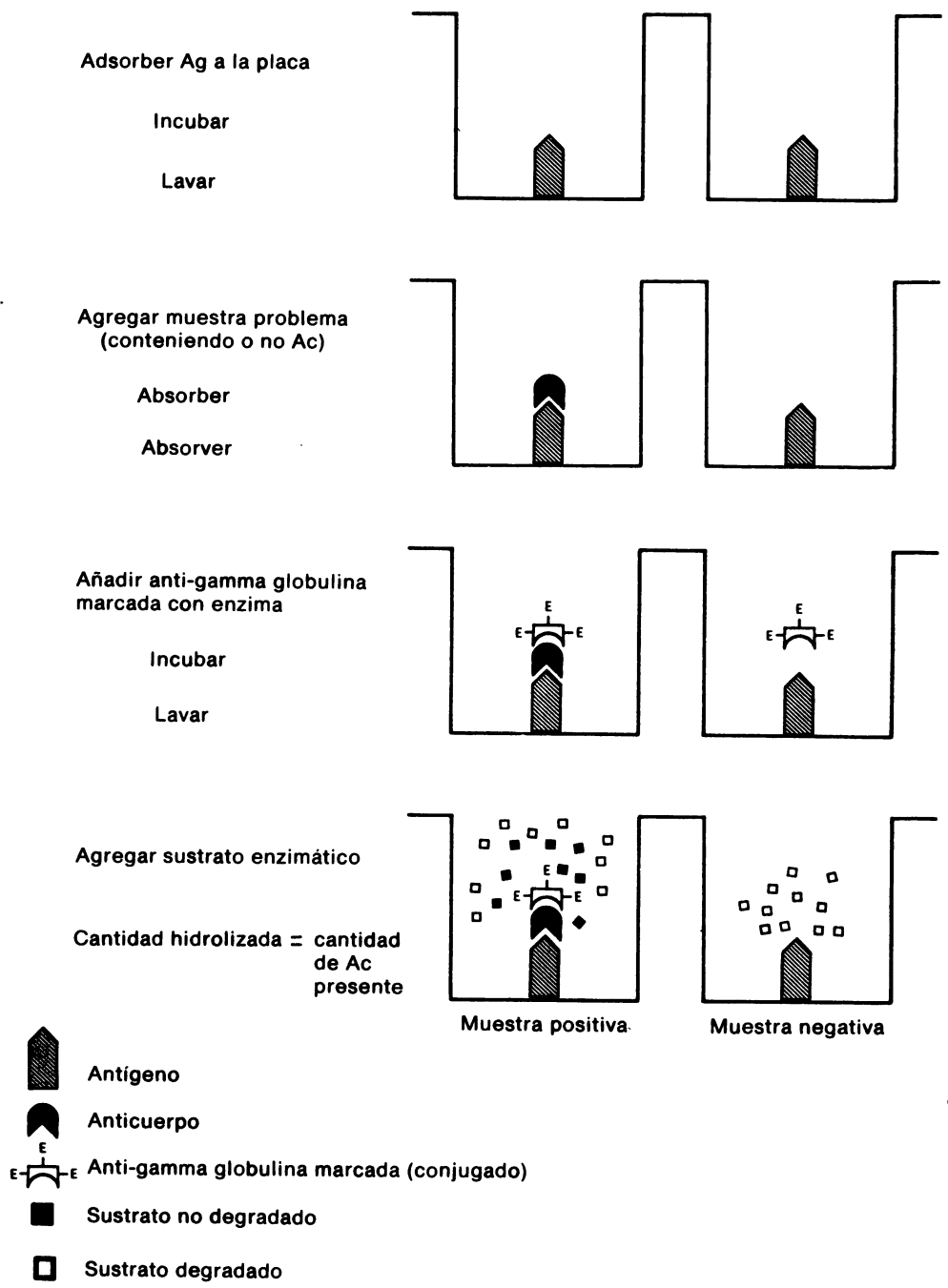
Debido a que es difícil cultivar estos virus, es necesario contar con métodos de diagnóstico que permitan detectarlos en las heces o mediante su respuesta serológica en el suero sanguíneo. Es por ello que las pruebas i-e son un método de diagnóstico útil y rápido para este propósito.

La prueba inmuno-enzimática directa es más usada en el diagnóstico de gastroenteritis infecciosas agudas, mientras que la prueba indirecta lo es más en estudios epidemiológicos en gran escala de la misma enfermedad (ver ventajas y desventajas de ambos métodos en la sección correspondiente de este manual).

Fase sólida

Como decíamos anteriormente, pueden emplearse varios materiales: gel, cuentas, palitos, papel filtro, membranas de nitrocelulosa o placas plásticas de microtitulación.

Para evitar reacciones inespecíficas en los espectrofotómetros al leer las placas, se aconseja usar solamente los 60 pocillos interiores de las placas de 96 pocillos, y no agregar más de 100 ul de líquido total por pocillo, aun cuando la capacidad máxima tolerada



Voller et al. Bull. Wid. Hlth. Org. (1976) 53, 55-56

Fig. 3 ELISA indirecto para determinación de Ac.

sea de 250 ul por pocillo. Es mucho mejor hacer la adsorción (coating) de las proteínas (antígeno o anticuerpo) en varias placas a la vez. Las placas se pueden sellar con Parafilm o poner dentro bolsas plásticas y se guardan en cámaras húmedas a 4 C, sin que se note pérdida de actividad en períodos de hasta de cuatro meses.

Lavado

Todas las pruebas inmuno-enzimáticas que emplean la adsorción de proteínas a fases sólidas, requieren la eliminación de todos los reactivos que no se han adsorbido. Esta eliminación se obtiene mediante lavados que siguen al período de adsorción (incubación). La adición de detergentes no iónicos, como Tween 20 a los líquidos de lavado ayuda a cumplir este objetivo.

Es aconsejable eliminar los líquidos de lavado con aparatos de succión manuales o automáticos y no por simple inversión de las placas.

Enzimas

Las más empleadas para marcar Ig o proteína A son la peroxidasa o la fosfatasa alcalina. La peroxidasa es de bajo costo y cataliza sustratos que dan color oscuro fácil de ver. Los conjugados preparados con esta enzima son estables a 4 C, pero su acción es inhibida por bacteriostáticos como la azida sódica.

La fosfatasa alcalina, en cambio, no es sensible a los agentes bacteriostáticos y es más estable en condiciones de campo. La reacción entre esta enzima y el sustrato puede ser fácilmente detenida elevando el pH a 12. Sin embargo, la mayor desventaja de esta enzima es que es cara y difícil de obtener, ya que es extraída principalmente de intestinos de ternera.

Sustratos

Los más simples o sencillos son aquellos que al ser catalizados por la enzima dan un producto visible como resultado de la reacción. El color del producto es fácilmente visible al ojo desnudo o puede ser cuantificado en un espectrofotómetro.

Para la fosfatasa alcalina el sustrato recomendado es el fosfato de p-nitrofenilo.

Para peroxidasa los sustratos recomendados son ortofenildiamina, ácido 5-aminosalicílico, diaminobenzidina, y 4-Cloro-1-Naftol.

Reactivos

La gran sensibilidad de las pruebas inmuno-enzimáticas hace necesario contar, para realizarlas, con reactivos altamente específicos que permitan disminuir la reactividad cruzada inespecífica. Para lograr ésto es preciso preparar anticuerpos con virus o antígenos purificados. De este modo los anticuerpos reaccionarán principalmente con el antígeno viral.

Los reactivos a emplearse en las pruebas inmuno-enzimáticas deberían ser inactivados a 56 C por 30 minutos, antes de ser usados, con el fin de eliminar la interferencia producida por reacciones mediadas por el complemento.

Las actividades virales específicas se definen como la diferencia en actividad entre pocillos que contienen antígeno más el anticuerpo específico y los pocillos que contienen antígeno más suero no inmune.

Protocolo de prueba directa para detectar antígeno rotavirus o ELISA sandwich

1. Absorba en pocillos de filas alternas de las placas de microtitulación una dilución adecuada de suero de cabra antirotavirus (o de IgG antirotavirus) y una dilución de suero de cabra (o de IgG) que no contenga anticuerpos contra rotavirus.
2. Incube la placa a 4 C hasta el día siguiente. Si la placa no se va a usar al día siguiente debe cubrirse con Parafilm y guardarse a 4 C hasta ser usada.
3. Lave la placa cinco veces con salina tampón fosfato (PBS) y Tween-20 al 0.05-0.01%.
4. Agregue 50 ul de N-acetilcisteína (ajustada a pH 7) a cada uno de los pocillos. Agregue una cantidad igual (50 ul) de muestra a dos pocillos. Agregue una cantidad igual (50 ul) de muestra a dos pocillos adsorbidos (coated) con suero de cabra antirotavirus y a dos pocillos adsorbidos con suero de cabra no-inmune (normal). Incluya un control débilmente positivo y cuatro controles negativos en cada prueba.
5. Incube la placa a 37°C por dos horas, o toda la noche a 4°C.
6. Lave la(s) placa(s) cinco veces con PBS-Tween.

7. Agregue a todos los pocillos el suero antirotavirus marcado con enzima (suero de cabra o de cobayo) diluído con PBS-Tween conteniendo 2% de suero bovino fetal (PBS-Tween-FBS).
8. Incube la placa a 37 C durante 1 hora.
9. Lave la placa cinco veces con PBS-Tween.
10. Agregue el sustrato adecuado. Incube la placa a 37 C o a temperatura ambiente (T.A.) hasta que el control débilmente positivo presente un color visible equivalente a una densidad óptica (D.O.) de aproximadamente 0.1. Calcule la actividad específica sustrayendo la actividad media de la muestra en pocillos con suero negativo (control) de la actividad media de los pocillos absorbidos con el suero antirotavirus.

Una muestra se considera positiva si su actividad media es más grande que dos desviaciones standard sobre la actividad media de los controles negativos.

En otras palabras, la medición cuantitativa de la actividad específica se calcula restando la actividad encontrada en los pocillos de control de la actividad encontrada en los pocillos cubiertos con anticuerpos antivirales.

La muestra también se considera positiva si su actividad es mayor que la del control débilmente positivo. En determinaciones visuales cualitativas la muestra se considera positiva si el color en los pocillos con anticuerpos antirotavirus es más intenso que el color en los pocillos que contienen suero normal (no inmune) o suero débilmente positivo.

Protocolo de prueba indirecta para detectar antígeno rotavirus o ELISA ANTIGLOBULINA

1. Proceda como en las fases 1 a 6 de la prueba directa.
2. Agregue suero de cobayo antirotavirus no marcado con enzima, diluído en PBS-Tween-FBS.
3. Incube la placa a 37 C por 1 hora.
4. Lave la placa cinco veces con PBS-Tween.
5. Agregue a los pocillos inmunoglobulina anticobayo marcada con enzima, preparada en cabra o conejo, diluída en PBS-Tween.

6. Incube la placa a 37 C por 1 hora.
7. Lave la placa cinco veces con PBS-Tween.
8. Agregue sustrato e interprete los resultados en la forma descripta en la fase 10 del método directo.

Protocolo de prueba indirecta para detectar anticuerpo

A. Adsorción de antígeno (rotavirus) a las placas

1. Agregar 100 ul de dilución adecuada de antígeno a tampón alcalino en cada pocillo.
2. Incubar a 4 C por 18 horas.
3. Lavar cinco veces con PBS-Tween.
4. Utilizar la placa inmediatamente o guardarla a 4 C hasta su uso (no más de 5 meses).

B. Ejecución de la prueba

1. Agregar 100 ul de la respectiva dilución de suero a los pocillos previamente fijados con antígeno.
2. Tapar la placa e incubar a 37°C por 1 hora.
3. Lavar cinco veces con PBS-Tween.
4. Agregar conjugado de IgG contra la especie del suero problema, 100 ul/poc.
5. Incubar a T.A. por 1 hora.
6. Lavar cinco veces con PBS-Tween.
7. Agregar dilución de sustrato. 100ul en cada pocillo.
8. Incubar a T.A. por 8 minutos.
9. Frenar la reacción agregando 100 ul/poc. de H₂SO₄-3N.
10. Leer en espectrofotómetro automático (Multiskan-Flow Lab), a una longitud de onda adecuada o por lectura en visión directa.

Protocolo de prueba indirecta para titulación de anticuerpos

Técnica

1. Disuelva el antígeno en el tampón alcalino.

2. Agregue 50 ul de la solución de antígeno en cada pocillo de las 11 primeras filas verticales y a los 4 primeros pocillos de la fila 12 vertical de la microplaca. La fila 12 es la fila que servirá para los controles. La solución de antígeno debe ser preparada fresca.
3. Incube la placa por 2 a 18 horas a 37 C en una atmósfera húmeda para evitar la evaporación. El tiempo de incubación se puede variar dependiendo de las características del antígeno. También pueden congelarse a -70°C las placas incubadas con antígeno.
4. Lave las placas una a dos veces con PBS-Tween.
5. Agregue 50 ul de solución bloqueadora a todos los pocillos. Incube por 1/2 hora a 1 hora a 37 C en atmósfera húmeda. Este paso tiene como objetivo saturar con proteínas aquellos puntos de la fase sólida que no se combinaron con antígeno. Esto evitará más adelante la adsorción no-específica de anticuerpos.
6. Lave cinco veces con PBS-Tween.
7. Agregue 50 ul de PBS-Tween a todos los pocillos de la placa.
8. Agregue 50 ul de la muestra al primer pocillo de la fila vertical. (Se pueden titular 11 muestras por placa: una fila para cada muestra). La fila 12 es la fila control.
 - Haga diluciones dobles en todas las columnas excepto en la columna 12. Elimine 50 ul del último pocillo de las 11 columnas.
10. Incube por 30 minutos a 37 C en atmósfera húmeda.
11. Lave cinco veces con PBS-Tween.
12. Agregue 50 ul de la dilución standard de anti-anticuerpos marcados con enzima a todos los pocillos de las 11 primeras filas. La dilución de estos anticuerpos debe hacerse en PBS-Tween que contiene 1% de albúmina de suero bovino (BSA). Agregue 50 ul de los anticuerpos marcados a los siguientes pocillos de la fila 12:
 - los tres primeros pocillos (A, B y C)
 - al quinto, sexto y séptimo pocillo (E, F y G).
13. Incube en atmósfera húmeda durante 30 minutos a 37 C.

14. Lave cinco veces con PBS-Tween.
15. Agregue 50 ul de sustrato a todos los pocillos de la placa.
16. Incube por 30 minutos a 37 C en atmósfera húmeda.
17. Agregue 10 ul de 8M H₂SO₄ con el objetivo de parar la reacción.
18. Mida las reacciones.

Una reacción se puede considerar positiva si revela un color más intenso que el revelado por el control negativo (pocillo A, 12ava. columna).

19. **Controles** (columna 12)

Por lo general, exceptuando el pocillo B (control positivo), todos los pocillos de la columna 12 deberían revelar un color de menor intensidad que el color revelado en el pocillo A. Es posible, aunque no común, que una muestra contenga enzimas que reaccionen con el sustrato. El control adecuado para esta posibilidad no se ha incluido en este protocolo. Si se sospecha este problema, el suero debe ser reaccionado con el antígeno (pasos 1-10) luego, no agregar el anti-anticuerpo marcado (paso 11). Proceda con pasos 12 a 17. La reacción debe ser negativa.

Reactivos

1. **Tampón alcalino** (para disolver el antígeno)

Carbonato de Sodio	Na ₂ CO ₃	1.59 g
Bicarbonato de Sodio	NaHCO ₃	2.93 g
Agua Destilada		1 litro

Ajuste el pH a 9.6

2. **PBS-Tween**

Cloruro de Sodio	NaCl	8 g
Fosfato de Potasio	KH ₂ PO ₄	0.2 g
Fosfato de Sodio	Na ₂ HPO ₄	0.9 g
Cloruro de Potasio	KCl	0.2 g

Agregue 1 litro de agua destilada y ajuste el pH a 7.4 con NaOH-1N. Agregue 0.5 ml de Tween - 40 (polioxiethyleno sorbitan monopalmitato) o Tween - 80 (polioxiethyleno sorbitan monooleato).

3. Solución bloqueadora

PBS - Tween	100 ml
Albúmina de suero bovino (BSA)	2 g

4. Sustrato

O-fenilendiamina	10 mg
Metanol absoluto	1 ml

Mezcle bien y luego agregue esta mezcla a:

Agua Destilada	100 ml
Peróxido de hidrógeno (3%) H ₂ O ₂	100 ul

Punto Inmune - Immunodot

El método es demostrado utilizando un aparato de microfiltración adquirido de Bio-Rad Laboratories. Aparatos de otras compañías deberían dar resultados similares.

Técnica

1. Arme el aparato de microfiltración siguiendo las instrucciones del fabricante (Bio-Dot microfiltration apparatus, Bio-Rad Laboratories). Los siguientes puntos son de especial importancia:
 - a. Siempre utilice guantes al manipular las membranas de nitrocelulosa (MC).
 - b) Remoje las MC con salina tamponada con Tris (TBS).
 - c) Apriete los tornillos del aparato antes y después del uso de la bomba de vacío.
2. Prenda la bomba de vacío y lave los pocillos una vez con TBS.
3. Desconecte la bomba de vacío antes de agregar el antígeno(s) a los pocillos. Adicione el antígeno(s) a los pocillos. La cantidad de antígeno a agregar depende del tipo de antígeno y su habilidad de combinarse con la MC. Esta cantidad se tiene que establecer para cada antígeno. La adición de una cantidad excesiva de antígeno a un pocillo puede resultar en la obstrucción de la MC.
4. Permita que el antígeno penetre la MC durante un período de incubación (30-60 minutos) del aparato a temperatura ambiente.

5. Prenda la bomba de vacío por 1 minuto. De esta manera va a pasar aire a través de los pocillos y la MC se va a secar. Desconecte la bomba de vacío.
6. Adicione el "tampón bloqueador". Los componentes del tampón van a saturar con proteínas los puntos de la MC que no se combinaron con el antígeno. Esto previene la adsorción no-específica de inmunoglobulinas a la MC durante los próximos pasos.
7. Incube el aparato a temperatura ambiente por 30-60 minutos.

Repita paso #5 sin desconectar la bomba de vacío.
8. Lave todos los pocillos una vez con TBS con Tween 20 (TBS-Tween). Desconecte la bomba de vacío.
9. Adicione las muestras de suero que se van a titular. Las muestras de suero deben ser diluídas en el tampón bloqueador. Incube el aparato a temperatura ambiente.
10. Repita paso #5 sin desconectar la bomba de vacío.
11. Lave los pocillos cinco veces con TBS-Tween. Desconecte la bomba de vacío.
12. Adicione una cantidad standard de anticuerpos secundarios conjugados con enzima, diluídos en el tampón bloqueador. Recomendamos la peroxidasa de rábano de caballo como la enzima predilecta. Incube el aparato a temperatura ambiente.
13. Repita paso #5 sin desconectar la bomba de vacío.
14. Repita paso #11.
15. Remueva la MC del aparato utilizando guantes.
16. Ponga la MC en contacto con el sustrato. Observe la reacción manteniendo la MC en constante movimiento dentro de la solución de sustrato.
17. Remueva la MC del sustrato y lave con agua destilada. Anote sus resultados porque la reacción observada tiende a desaparecer con el tiempo.

Punto Inmune - Reactivos

Todos los reactivos se puede obtener de Sigma Chemicals, St. Louis, MO, U.S.A.

1. **TBS:** Salina tamponado con Tris.

20 mM Tris (hydroxymethyl) amino metano..2.42 g
 500 mM NaCl.....9.22 g
 Agua destilada..... 1 litro
 Ajuste el pH a 7.5 con HCl.

2. **TBS-Tween:**

0.3 ml Polioxyetileno sorbitan monolaurato
 (Tween 20)
 99.7 ml TBS

3. **Tampón bloqueador**

2 g albúmina de bovino (BSA)
 100 ml TBS

(en algunas ocasiones se puede utilizar TBS-Tween en vez del TBS).

4. Membrana de nitrocelulosa (MC). Se obtiene de Bio Rad Laboratories, Richmond, CA, USA.

5. **Sustrato.**

o-fenilendiamina 10 mg
 metanol absoluto 1 mg

Mezcle bien y agregue la mezcla a:

Agua destilada 100 ml
 Peróxido de hidrógeno H₂O₂ (3%) 100 ml

Método para SDS - electroforesis en gel de polyacrilamida (SDS-PAGE)

Esta técnica se puede utilizar para:

- I. La determinación del peso molecular de proteínas.
 - II. La detección de antígenos a través de reacciones inmuno-enzimáticas (Western blot).
- I. **Electroforesis de proteínas en geles de polyacrilamida utilizando SDS**

- A. **Técnica**

1. Las placas de vidrio deben estar totalmente limpias, libres de aceites u otras sustancias.

2. Separar las dos placas con separadores de Teflón de 1.5 mm de grosor.
3. Asegure los espaciadores y las placas de vidrio firmemente con pinzas formando un "sandwich".
4. Selle el fondo del sandwich. (En esta demostración se utilizará una membrana de goma).
5. Mezcle la acrilamida, bis-acrilamida y el tampón en un frasco y proceda a remover el aire atrapado en la mezcla conectando el frasco a una bomba de vacío. Deben usarse guantes ya que la acrilamida no polimerizada es una neurotoxina.
6. Agregue SDS, TEMED y persulfato de amonio a la mezcla (asegúrese que el persulfato de amonio haya sido preparado recientemente).
7. Proceda inmediatamente a llenar aproximadamente $3/4$ del sandwich (12 cm) con esta mezcla.
8. Agregue agua destilada para cubrir la mezcla de acrilamida y sellarla del aire ambiental. Incube 30 a 60 minutos. Esto permite la polymerización de la acrilamida y la formación del "gel separador" de proteínas.
9. Remueva la capa de agua destilada de la polyacrilamida.
10. Adicione la mezcla necesaria para formar el gel "concentrador". Esta mezcla utiliza un porcentaje bajo de acrilamida-bisacrilamida (ver fórmula). Para su preparación proceda como en los pasos 5 y 6.
11. Agregue la mezcla al sandwich cubriendo el gel de polyacrilamida formado anteriormente.
12. Proceda a insertar la "peineta" (aparato formador de pocillos) en el sandwich y cubra los puntos de la mezcla del gel concentrador que están en contacto con el aire con agua destilada. Incube durante 30-60 minutos.
13. Remueva la peineta una vez que la acrilamida se haya polimerizado. Enjuague los pocillos con tampón utilizando una pipeta.

14. Disuelva la muestra en el tampón #1. Proceda a aplicar la muestra. Se puede aplicar un volumen máximo de 200 μ l (con 100-200 mg de proteína) en cada pocillo.
15. Aplique tampón #2 sobre las muestras depositadas en los pocillos.
16. Inserte el sandwich con las muestras en el estanque inferior del aparato de electroforesis. El estanque inferior está conectado al ánodo y debe contener el tampón #2.
17. Inserte el estanque superior en el aparato de electroforesis.
18. Llene el estanque superior con el tampón # 2 hasta cubrir el electrodo (cátodo).
19. Conecte el aparato de electroforesis a la fuente de poder.

20 mAmp/gel para la primera hora
30 mAmp/gel para la segunda hora
30 mAmp/gel a partir de la tercera hora
20. Desconecte la corriente eléctrica cuando el azul de bromofenol (la tintura en el tampón #1) se aproxime a la parte inferior del gel. Saque el gel del sandwich y corte el gel concentrador del gel separador. Incube el gel separador en una fuente con azul de Coomassie (tinción para proteínas) por 1-18 horas a temperatura ambiente.
21. Decolore el gel con solución decolorante.

II. Western Blot

A. Técnica

1. Siga los procedimientos descritos anteriormente (SDS-PAGE) incluyendo paso #19. Después de la electroforesis corte el gel concentrador y corte la parte del gel separador que contiene la línea de migración del azul de bromofenol.
2. Deposite el gel separador en el tampón de transferencia por una hora.
3. Humedezca la membrana de nitrocelulosa en el tampón de transferencia (utilice guantes).

4. Llene el estanque del aparato de transferencia con tampón de transferencia enfriado a 0-4°C.
5. Arme el dispositivo de transferencia en el siguiente orden:
 - a. placa poroso de fibra
 - b. papel filtro
 - c. gel separador
 - d. membrana de nitrocelulosa; elimine todas las burbujas de aire atrapadas entre el gel y la membrana.
 - e. papel filtro
 - f. placa porosa de fibra

Importante: Todos los componentes deben ser mojados en el tampón de transferencia antes de armar el dispositivo.

6. Inserte el dispositivo en el estanque de manera que la membrana de nitrocelulosa quede entre el gel y el ánodo.
7. Conecte la fuente de poder por 2 a 3 horas entre 90 a 95 volts.
8. Desconecte la corriente eléctrica, remueva la membrana de nitrocelulosa (use guantes).
9. Con un lápiz marque en la membrana la posición aproximada de los pocillos utilizando la peineta como referencia.
10. Corte la membrana en tiras basándose en la posición de los pocillos.
11. Agregue las tiras a bolsas de polietileno.
12. Agregue el tampón bloqueador; selle las bolsas con calor.
13. Agite las bolsas por 1 hora.
14. Abra las bolsas, agregue el primer anticuerpo diluido en tampón bloqueador, selle las bolsas y agite por 1/2 a 1 hora.
15. Remueva las tiras y lávelas bien en varios volúmenes de TBS-Tween.
16. Introduzca las tiras en bolsas, agregue el anticuerpo marcado diluido en tampón bloqueador, selle la bolsa y agite por 1 hora.

17. Remueva las tiras y repita el paso #15.
18. Prepare el sustrato; agregue las tiras al sustrato y agite hasta que se observe el desarrollo de las reacciones.
19. Lave las tiras en agua destilada y séquelas con papel de filtro.

B. Instrumentos y Reactivos para SDS-PAGE and Western Blot

Las técnicas se demostraron utilizando equipo de LKB y Bio-Rad. Instrumentos fabricados por otras compañías deberían dar resultados similares. La mayoría de los reactivos fueron adquiridos en Sigma Chemical, St. Louis, MO, U.S.A.

1. TBS

20 mM Tris (hidroximetil) amino metano
500 mM NaCl
Ajuste pH a 7.5 con HCl

2. Tampón bloqueador:

2 g albúmina bovina (BSA)
100 ml TBS

3. TBS-Tween:

0.3 ml Polioxietileno sorbitan Monolaurato
(Tween 20)
99.7 ml TBS

4. Tampón # 1:

25 mM Tris, pH 6.8 (ajuste con HCl)
1% sulfato dodecílico de sodio (SDS; Bio-Rad
Laboratories)
0.05% azul de bromofenol
50% glicerol

5. Tampón #2:

25 mM Tris
192 mM Glicina
0.1% SDS
El pH va a ser aproximadamente 8.3 (no ajuste
el pH).

6. Tampón de transferencia (para Western Blot)

25 mM Tris
192 mM Glicina
20% metanol
No ajuste el pH.

7. Geles

7.1 Gel separador (15% acrilamida)

14.7% acrilamida
 0.3% bis-acrilamida
 0.1% SDS
 0.781 M Tris, pH 8.8
 0.065% persulfato de amonio preparado recientemente
 0.065% N,N,N',N'-tetrametiletilediamina (TEMED; Eastman Kodak Company)

7.2 Gel concentrador (5.9% acrilamida)

5.7% acrilamida
 0.2% bis-acrilamida
 0.1% SDS
 0.143 M Tris pH 6.8
 0.0573% persulfato de amonio
 0.1145% TEMED

8. Tinción para geles:

0.3% Azul R de Coomassie
 10% Acido acético
 45% Etanol
 45% Agua

9. Solución para decolorar:

10% Acido acético
 25% Etanol
 65% Agua

10. Enzima = peroxidasa

11. Sustrato

a. 4-chloro-1-naphtol: 3 mg por ml de metanol
 b. 0.018% H₂O₂ en TBS
 Mezcle 1 parte de (a) con 5 partes de (b).

Producción, mantenimiento y preservación de anticuerpos monoclonales

I. Producción de anticuerpos monoclonales

El método demostrado utiliza células tumorales que provienen de ratones BALB/c llamadas SP2/0. Por lo tanto, si se desea cultivar los hibridomas en la cavidad peritoneal de ratones se deben usar células provenientes de ratones BALB:c para la fusión con las células SP2/0.

A. Inmunización

Inyecte el ratón o ratones con antígenos. Inyecte el antígeno ip (con o sin adyuvante). Repita la inyección 2 ó 3 veces cada 14 a 21 días. Inyecte el antígeno por última vez sin adyuvante 4 días antes de la fusión.

Fusión

1. Sacrifique el ratón utilizando una cámara de CO₂.
2. Extraiga el bazo en forma aséptica y deposítelo en una placa de Petri con 5 ml de medio de cultivo RPMI 1640 sin suero.
3. Separe los linfocitos del bazo utilizando pinzas o agujas de inyección (18 ga).
4. Transfiera la suspensión de linfocitos de la placa de Petri a tubos de centrífuga.
5. Lave los linfocitos 3 veces en RPMI-1640 sin suero (aprox. 380-400 g, 10 minutos).
6. Suspnda los linfocitos en 1 a 3 ml de RPMI-1640 sin suero y estime el número de células muertas utilizando azul tripán (ver fórmula). El 85% de las células deberán ser viables.
7. Prepare una suspensión de células SP2/0. Lave (400 g; 10 minutos) una a dos veces en RPMI-1640 sin suero; suspnda las células en 1 a 3 ml de RPMI 1640 sin suero y estime la viabilidad (debería ser sobre 90%).
8. Combine las células SP2/0 y los linfocitos en la proporción de 5 (linfocitos): 1 (SP2/0). Centrifugue la mezcla de células a 400 g por 15 minutos. La cantidad óptima total de células en la mezcla es 3×10^8 .
9. Elimine el sobrenadante agite el tubo cuidadosamente para soltar el pellet y ponga el tubo con el pellet de células en un baño maría a 37 C.
10. Adicione 1 ml de PEG (40-50%) precalentado a 37 C con una pipeta Pasteur en forma lenta agitando cuidadosamente en forma constante. La adición de este volumen de PEG debe tomar 1 minuto. Importante: evite succionar células con la pipeta durante este procedimiento.
11. Agregue 1 ml de RPMI-1640 sin suero durante 1 minuto en forma uniforme. Agite continuamente.

12. Repita paso #11.
13. Agregue 7 ml de RPMI-1640 precalentado a 37 C sin suero, durante 2-3 minutos. Agite continuamente.
14. Centrifugue a 350 g por 10 minutos.
15. Remueva el sobrenadante.
16. Agregue 10 ml de RPMI-1640 con 10% de suero de caballo. Las células se pueden suspender agitando el tubo y utilizando una pipeta Pasteur para revolver sin succionar. Este procedimiento es más fácil si se agregan los 10 ml de medio de cultivo en fracciones de 2 ml.
17. Estime el número de células y ajuste el volumen para obtener 10^7 células/ml.
18. Distribuya las células en microplacas de cultivo (96 pocillos); aproximadamente 0.1 ml por pocillo o 10^6 células/pocillo. Este número se obtiene aproximadamente si se adicionan 2 gotas procedentes de una pipeta Pasteur por pocillo. A algunos pocillos se deben agregar (a) células SP2/0 (para asegurarse más adelante que el medio de cultivo HAT no permite la sobrevivencia de estas células; (b) Hibridomas obtenidos en una fusión anterior (para asegurarse que los medios de cultivo a utilizar permiten la proliferación de hibridomas).
19. Incube las células por una hora (5% CO₂; 37 C).
20. Observe los pocillos al microscopio. La viabilidad debería aproximarse al 100%. Incube nuevamente por aproximadamente 12-18 horas. Observe las células nuevamente. Las células SP2/0 pueden haber empezado a proliferar. La viabilidad debería sobrepasar el 90%.
21. Adicione dos gotas (pipeta Pasteur) de medio cultivo HAT 24 horas después de la fusión. Si la viabilidad no es sobre 90% se deberá esperar otras 10-24 horas antes de adicionar el HAT. En general, con buena viabilidad el siguiente protocolo da buenos resultados:

<u>Día</u>	<u>Operación</u>
0	Fusión
1	Agregue 2 gotas HAT
2	Extraer la mitad del medio de cultivo agregue 2 gotas de HAT

<u>Día</u>	<u>Operación</u>
3	Repita paso 2
4	Repita paso 2
7 & 10	Repita paso 2
14 & 17	Repita el procedimiento pero reemplace el HAT por HT

Pueden introducirse cambios a este protocolo de acuerdo a las observaciones diarias de los pocillos.

*El medio de cultivo se extrae con extremo cuidado para evitar remover células.

Por lo general, durante los días 7 a 14 deberían observarse las primeras colonias de hibridomas. El sobrenadante (teóricamente) contiene los anticuerpos secretados por los hibridomas; puede ser analizado para detectar anticuerpos entre los días 9 a 14. A veces, dependiendo de cuan eficiente fue la fusión, este proceso puede demorarse entre 21 a 28 días.

C. Detección de Anticuerpos

1. Una vez que se haya determinado que el crecimiento de uno o varios hibridomas en un pocillo es adecuado, tome 100 ul de sobrenadante y analícelo con una técnica adecuada para determinar la presencia de anticuerpos específicos. Debe contarse con la capacidad de analizar cientos de sobrenadantes durante un corto plazo (6 horas). Recomendamos que el procedimiento a usar sea sensible para detectar cantidades pequeñas de anticuerpos. Nosotros hemos utilizado los siguientes sistemas con buenos resultados:

- a. ELISA en microplacas.
- b. Immunodot.
- c. Anticuerpos fluorescentes.

2. Una vez identificada una reacción positiva en el sobrenadante de un pocillo proceda al clonado.

D. Clonado

1. Remueva las células del pocillo positivo y transfíralas a un pocillo más grande (2 ml; placa con 24 pocillos). Agregue 1 ml de RPMI-1640 con suero. Remueva la mitad del medio de cultivo cada 2 o 3 días y agregue un volumen similar de medio fresco.

2. Cuando las células hayan proliferado y alcanzado un número adecuado dentro del pozo se procede al clonado. Observe los siguientes puntos importantes:
 - a. El día antes del clonado prepare cultivos de bazo procedente de ratones normales en placas de 96 pocillos. Siga los pasos B.1-5 pero suspenda las células en RPMI-1640 con 10% suero. Ajuste el número de células a 5×10^6 cél/ml y agregue 0.1 ml a cada pocillo de la placa de 96 pocillos. Incube hasta el día del clonado. Estos cultivos se utilizan como "feeder layers". Los "feeder layers" se pueden sustituir por CR-EGGS (Collaborative Research - Endothelial Cell Growth Supplement; Collaborative Research Inc., Lexington, M.A., U.S.A.) que parece ser un producto más efectivo que los "feeder layers" pero de costo más elevado.
 - b. Nunca proceda al clonado de todas las células del pocillo seleccionado. Mantenga un tercio de las células del pocillo como reserva en caso que falle el procedimiento.
3. Diluya los hibridomas del pocillo de la siguiente manera:
 - a. 10 células/ml (1 célula/0.1 ml/pocillo)
 - b. 5 células/ml (0.5 célula/0.1 ml/pocillo)
 - c. 1 célula/ml (0.1 célula/0.1 ml/pocillo)

Aplique 0.1 ml de la dilución (a) a cada uno de los primeros 24 pocillos de la microplaca con feeder layers; 0.1 ml de la dilución (b) a los próximos 36 pocillos y 0.1 ml de la dilución (c) a los pocillos restantes.

Cambie la mitad del medio de cultivo (RPMI-1640 + 10% suero) cada 2-3 días por medio fresco. Las colonias deberán visualizarse a los 7 días y el sobrenadante deberá contener suficientes anticuerpos para análisis a los 10-14 días.

4. Analice la presencia de anticuerpos y seleccione los pocillos positivos.
5. Para asegurarse que el clonado ha sido real (células que provienen de una sola híbrida) se recomienda un nuevo clonado del pocillo positivo. En general, la selección de pocillos positivos obtenidos de la dilución (c) (ver paso 3.c.) aumenta la probabilidad de que se esté trabajando con una colonia derivada de una sola célula.

6. El pocillo positivo se transfiere a pocillos más grandes y finalmente a frascos de cultivo (ver paso D.1). Evite diluir los hibridomas demasiado al hacer las transferencias.
7. A medida que las células proliferan se va colectando el sobrenadante que contiene los anticuerpos monoclonales.
8. Las células de hibridomas se pueden inyectar en la cavidad peritoneal de ratones BALB/c para obtener títulos altos de anticuerpos monoclonales. Inyecte 3×10^6 a 6×10^6 células híbridas por ratón, suspendidas en RPMI-1640 sin suero. El líquido ascítico con anticuerpos se puede obtener entre 7 a 10 días después de la inoculación.

E. Preservación

Los hibridomas (clonados o no-clonados) y las células SP2/0 se pueden preservar en nitrógeno líquido. Este proceso es extremadamente útil ya que no es recomendable mantener los hibridomas en cultivo por tiempos demasiados largos.

1. Utilice hibridomas cultivados en frascos. Se necesitan 10 ml de cultivo denso con una viabilidad cercana al 100%. Centrifugue las células (360-400 g) por 10 minutos.
2. Suspenda el pellet en 1 ml de RPMI-1640 con 10% suero.
3. Prepare 1 ml de suero con 10% de DMSO.
4. Agregue el suero con el DMSO en forma muy lenta en un baño de hielo agitando continuamente.
5. Transfiera las células suspendidas en el medio de cultivo con el DMSO a dos tubos plásticos especiales con una pipeta. Selle los tubitos. Es importante que esto se haga sobre hielo y que el pipeteo sea muy suave para evitar la destrucción de las células. Jamás mantenga las células por más de 5 minutos bajo estas condiciones; proceda con el paso #6 lo antes posible.
6. Mantenga los tubitos en vapores de nitrógeno líquido por 16-24 horas. Sumerja las células en el nitrógeno líquido.

D. Recuperación de hibridomas del nitrógeno líquido

1. Remueva 1 a 3 tubitos del nitrógeno líquido.
2. Inmediatamente sumerja 2/3 del tubito en agua a 37°C agitando continuamente hasta descongelar el contenido. Este procedimiento no debería tomar más de 2 a 3 minutos.
3. Lave el tubito con etanol (70-95%) y séquelo con papel secante esterilizado.
4. Deposite el contenido del tubito en un tubo estéril. No utilice pipetas.
5. Agregue 5 ml de RPMI-1640 con 10% suero, gota por gota bajo agitación continua. Agregue otros 5 ml en forma algo más rápida, los pasos 4 y 5 deben completarse en menos de 10 minutos. Una vez agregados los 10 ml de medio de cultivo en paso #5 se puede dejar los tubos a temperatura ambiente por 30-40 minutos.
6. Centrifugue (350 g x 10 minutos) y suspenda el pellet en 1 ml de RPMI-1640 con 10% suero. Las células deben suspenderse por agitación. No use pipetas.
7. Vierta la suspensión de células dentro de un pocillo con capacidad para 2 ml (placas de cultivo con 24 pocillos). No use pipetas.
8. Reemplace la mitad del medio de cultivo a las 4 horas y a las 24 horas. Las células se pueden pipetear a las 24 horas.

Nota: Se recomienda el uso de "feeder layers" (o medio de cultivo con CR-EGGS) en los pocillos si la vitalidad de las células es baja.

Reactivos

1. Medio de cultivo RPMI-1640 sin suero

- a. 1 x RPMI-1640 (con bicarbonato de sodio)...100 ml
- b. 1 M Hepes (N2 hydroxyethyl piperazine
-N'ethanesulfonic acid)
disuelva 23.83 g en 100 ml agua destilada*. 1 ml
- c. Penicilina - Estreptomina (25.000
unidades - 5.000 meq)..... 1 ml
- d. 200 mM L-glutamina..... 1 ml
- e. 100 x MEM aminoácidos no esenciales..... 1 ml
- f. Piruvato de Sodio
Disuelva 0.5 g en 50 ml de agua destilada* 0.5 ml

*Esterilice por filtración.

2. Medio de cultivo RPMI-1640 con suero

- a. RPMI-1640 sin suero..... 90 ml
- b. Suero equino inactivado con calor
(56 C por 30 minutos)..... 10 ml

3. Tinción vital

- a. RPMI-1640 sin suero..... 0.85ml
- b. Azul de Trypan (solución al 0.4% en
suero fisiológico)..... 0.1 ml
- c. Suspensión de células..... 0.05ml

4. Solución de polyetileno glycolado (PEG) 50%

Proteja el frasco del PEG de la humedad. Prepare la solución el día de la fusión. Disuelva 2 gr PEG a 50-56 C. Manténgalo a 37 C para que no se solidifique. Agregue 2 ml de RPMI-1640 sin suero y mantenga la mezcla a 37 C. Esterilice por filtración.

5. Preparación de medio de cultivo HT y HAT**Medio de cultivo HT****a. 100 x HT**

- Disuelva 68,4 mg hipoxantina en 50 ml de agua destilada a 70-80 C. Agregue 19.4 mg timidina y agite hasta disolver.

b. 50 x HT

- Mezcle 25 ml 100 x HT con 25 ml de agua destilada. Esterilice con filtro (0.22 um filtro). Divida la solución en porciones de 2 ml y congele a -20 C.

c. HT que debe usarse en los cultivos

- Mezcle 2 ml de 50 x HT con 100 ml de RPMI-1640 con 10% de suero.

HAT (50x)**a. Solución de aminopterina**

- Disuelva 1.1 mg de aminopterina en 2.5 ml de agua destilada. Si no se disuelve agregue varias gotas de IN NaOH. Luego agregue agua destilada hasta obtener un volumen final de 6.25 ml.

- b. Mezcle: 25 ml de 100 x HT con 2.5 ml de solución de aminopterina y 22.5 ml de agua destilada.

Esterilice con filtro (0.22 μ m), divida en porciones de 2 ml y congele las porciones a -20 C.

- c. HAT que debe usarse en los cultivos:

- Mezcle 2 ml de 50 x HAT con 100 ml de RPMI-1640 con 10% de suero equino.

Productores de equipos y reactivos (*)

Bio-Rad Laboratories
P.O. Box 708
220 Maple Avenue
Rockville Center, NY 11571
U.S.A.

Inmunodot. (from Bio Rad)

Bio Dot Apparatus
Catalog #170-6550

SDS-PAGE electrophoresis

Protein II Vertical Electrophoresis System

Catalog #165-1801
Combs and Spacers:
Catalog #165-1802

Fuentes de Poder

Bio Rad Model 3000/300
120 V 60 Hz - Catalog #165-0550
220 V 50 Hz - Catalog #165-0551

Western Blot

Transbolt Electrophoretic Transfer Cell
Catalog #170-3910

Fuente de Poder

Bio Rad Model 250/2.5 220V 50 Hz
Catalog #165-4754

Lavador de Microplacas

Microwash II
Skatron Inc.
P.O. Box 530
Sterling, VA 22170-0530
U.S.A.

Visor para Lectura de Microplacas

Titertek Multiskan MC (Multichromatic) 110 V/60 Hz
Catalog #78-530-00

Distribuidor de Antígeno

Titertek Autodrop 110 V/60 Hz
Catalog #78-511-00

Flow Laboratories, Inc.
7655 Old Springhouse Road
McLean, VA 22102
U.S.A.

Ready-to-Use enzyme immunoassay (ELISA) kits

1. Pitman-Moore, Inc.
International Division
P.O. Box 344
Washington Crossing, NJ 08560

2. Med-Tech
P.O. Box 338
Elwood, KS 66024

N del E.- Como se señala en la página 22 los equipos y reactivos que se mencionan en esta publicación son los que fueron utilizados en las demostraciones del curso en Buenos Aires, Argentina. La mención de firmas comerciales o del nombre comercial de estos productos no implica que el IICA los apruebe o recomiende con preferencia a otros similares.

Referencias

1. Enzyme Immunoassays for the Diagnosis of Viral Infections. R.H. Yoken, F. Lesiter, L. Whitcomb, D. Davis and M.J. Smears. Annal. N.Y. Ac. Sciences, V., 1983, 381-390.
2. Ultrasensitive Enzyme Immunoassay. E. Ishikawa and K. Kato Scand. J. Immunol. V. 8, Suppl. 7, 43-55, 1978.
3. Coupling of Enzymes to Antibodies and Antigens. S. Avrameas T. Ternynck and J.L. Guesdon. Acand. J. Immunol. V. 8, Suppl. 7, 7-23, 1978.
4. Preparation of Enzyme-labelled Staphylococcal Protein A and its use for the Detection of Antibodies. E. Engvall, Scand. J. Immunol. V. 8, Suppl. 7, 25-31, 1978.
5. Enzyme Immunoassay for the Detection of Rotavirus Antigen and Antibody. R.H. Yoken, P.J. Stopa and C.C. Harris in Manual of Clinical Immunology, 2nd Ed., 1980 by N.R. Rose and H. Friedman. Am. Soc. Microbiology, Washington, D.C.
6. Adaptación del Enzimo Inmuno Ensayo (ELISA) a la Detección de Anticuerpos Anti-Adeno 127 en Aves. J.R. Mesanza, J.M. Sánchez-Vizcaino and J. Barrera. An Inst. Nac. Inv. Agr. Serie Ganadera. No. 17, 111-121, 1982.
7. Peroxidase Labelled antibody, a New Method of Conjugation P.K. Nakane, A. Kawoi. J. Histochem. Cytochem. 22: 1081-1084, 1974.

FECHA DE DEVOLUCION

IICA
PM-A16SC-89-10

Autor

Manual de diagnóstico rápido
Título de enfermedades virales de
los animales utilizando métodos..

Fecha
Devolución

Nombre del solicitante

INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACION PARA LA AGRICULTURA

Apdo. 55-2200 Coronado, Costa Rica - Tel.: 29-02-22 - Cable: IICASANJOSE - Telex: 2144IICA,
Correo Electrónico EIES: 1332 IICA SC, FACSIMIL (506)294741 IICA COSTA RICA