

GUÍAS DE TRABAJOS PRÁCTICOS EN VIROLOGÍA

Jordá Graciela Beatriz
Silva Gustavo Alfredo
Salvatierra Karina
Medina Ivana Rocío Magalí
Hanke Silvina
Sergio Ariel Parafeniuk

Colección: Cuadernos de Cátedra



Facultad de Ciencias Exactas,
Químicas y Naturales

EDITORIAL UNIVERSITARIA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE MISIONES

Coronel José Félix Bogado 2160
Tel-Fax: 03764-428601

Correos electrónicos:
direccion@editorial.unam.edu.ar
Página WEB: www.editorial.unam.edu.ar

Colección: Cuadernos de Cátedra
Coordinación de la edición: Nélide González
Preparación para la web: Francisco A. Sánchez

Guía de trabajos prácticos en virología / Graciela Beatriz Jordá...
[et al.]. - 1a ed. - Posadas : Universidad Nacional de Misiones.
Facultad de Ciencias Exactas, Químicas y Naturales, 2019.
Libro digital, PDF - (Cuadernos de cátedra)

Archivo Digital: descarga y online
ISBN 978-950-766-154-9

1. Virología. 2. Bioquímica. 3. Análisis Bioquímico. I. Jordá, Graciela
Beatriz.
CDD 572.8

Impreso en Argentina
©Editorial Universitaria
Universidad Nacional de Misiones
Posadas, 2019

TRABAJO PRÁCTICO N°1

TEMA: Bioseguridad en el laboratorio de virología

INTRODUCCIÓN

En el laboratorio de virología se realizan procedimientos que requieren de un especial y cuidadoso manejo a fin de lograr la máxima seguridad para el personal y óptimas condiciones para los cultivos en crecimiento. Es primordial controlar elementos contaminantes en ambos sentidos, es decir, proteger al trabajador de posibles patógenos aportados por el cultivo celular y a éste de contaminaciones provenientes del operador o del medio ambiente.

NIVELES DE SEGURIDAD

Existen laboratorios de distintos niveles de seguridad según los microorganismos que se manejan, según la infraestructura y el equipamiento que se dispone.

Nivel I: Se manipulan microorganismos con pocas probabilidades de provocar enfermedades en humanos o animales. Por ejemplo, un laboratorio de enseñanzas básicas.

Nivel II: Se manipulan microorganismos que pueden causar enfermedades en humanos o animales, pero con pocas posibilidades de entrañar un riesgo grave si se dispone de las medidas adecuadas. Son laboratorios con cámaras de bioseguridad y dispositivos de protección personal. Ejemplo: laboratorios de diagnóstico, de hospitales o servicios de nivel primario de salud.

Nivel III: Se manejan agentes patógenos que provocan enfermedades graves en humanos o animales, pero comúnmente no se propagan de un individuo a otro. Son laboratorios de contención, donde se realizan diagnósticos especializados.

Nivel IV: Se trabaja con agentes patógenos que provocan enfermedades graves en humanos o animales, y se propagan fácilmente de un individuo a otro, generando un riesgo elevado para el personal del laboratorio y para la comunidad. Se trata de laboratorios de contención máxima, donde se trabaja con agentes patógenos peligrosos.

ÁREAS DE TRABAJO

El funcionamiento exitoso de un laboratorio de cultivos celulares depende de su ubicación y diseño, de su equipamiento adecuado y de la experiencia, sentido común y entrenamiento del personal.

Es importante delimitar áreas de trabajo con distinto nivel de riesgo de infección, según el material con que se trabaja, técnicas que se realizan y muestras que se procesan. Se tiene:

Áreas de bajo riesgo: donde el personal no está mayormente expuesto. Por ej. Administración, archivo, etc.

Áreas de mediano riesgo: lugares de recepción de muestras, atención de pacientes, lavado de materiales, etc.

Áreas de alto riesgo: zonas de extracción de muestras, procesamiento y control, etc.

Un laboratorio de cultivo celular, debe cumplir con ciertas condiciones:

a. El área de cultivo debe ser estéril, debe estar restringida al cultivo celular y en un lugar aislado del laboratorio de microbiología y del bioterio, debe ser ubicada en un lugar donde no circule gente ni haya corrientes de aire. Deben instalarse cámaras de flujo laminar o en su defecto pequeñas cabinas cerradas provistas de luz ultravioleta.

b. El lugar destinado a cultivos celulares debe estar provisto de filtros de aire, debe estar sujeto a desinfecciones periódicas y debe ser de fácil limpieza, sin molduras ni elementos que puedan acumular polvo. Los pisos deben ser lavables, vinílicos.

c. La incubación se lleva a cabo en estufas que serán ubicadas en zonas de poco tránsito y cercanas al área de cultivo propiamente dicha. Si es necesario pueden reemplazarse por un cuarto de incubación, acondicionado y controlado termostáticamente.

d. La preparación de los medios de cultivo debe realizarse en área estéril, si es posible se debe utilizar cámara de flujo laminar para la filtración y fraccionamiento de soluciones estériles.

e. El área de almacenaje debe estar situada entre la zona de preparación y zona de cultivo y ser de fácil acceso.

f. El lavado del material y su esterilización deben realizarse en la zona más alejada posible de la zona de trabajo con los cultivos.

EQUIPAMIENTO REQUERIDO PARA UN LABORATORIO DE CULTIVO CELULAR

- ◆ Cámara de flujo laminar
- ◆ Centrífugas refrigeradas (hasta 2000 rpm)
- ◆ Microscopio o lupa invertida (hasta 100x)
- ◆ Hornos y autoclaves para esterilización
- ◆ Equipos de filtración de medios de cultivo
- ◆ Tanque para nitrógeno líquido para congelar células
- ◆ Heladeras y congeladora de – 20°C
- ◆ Estufas e incubadora de CO₂
- ◆ Fuentes de agua, destilador, desionizador.
- ◆ Balanza, pHmetro, agitador magnético, pipetas automáticas.
- ◆ Material de vidrio o plástico descartable, probetas, pipetas, botellas, frascos de cultivo.
- ◆ Cámara de recuento, tubos de centrifuga, microplacas, cajas de Petri.

Cámara de flujo laminar: Según el nivel de seguridad que brinden, los equipos de flujo laminar pueden ser considerados de tipo 1, 2 ó 3.

Los equipos *tipo 1*, son básicamente campanas de extracción que llevan un caudal de aire del ambiente a la mesa de trabajo y de allí a un filtro, evitando la salida de aerosoles al medio ambiente. La desventaja es que los materiales de experimentación se exponen a los contaminantes ambientales, por lo que se usan cuando el producto no necesita aislación. Una variante de estos equipos son los de circulación de aire horizontal, donde el aire pasa primero por el filtro, después por la mesa de trabajo, protegiendo al producto y se vuelca al medioambiente, originando riesgos para el operador y el ambiente.

Los equipos **tipo 2**, aíslan al producto de los contaminantes ambientales y protegen al personal de posibles aerosoles patógenos producidos dentro de la cámara. Son los flujos laminares de circulación vertical.

Los gabinetes de seguridad **tipo 3**, son sistemas cerrados para uso con agentes de alto riesgo. Son de cierre hermético con presión negativa en su interior, y el operador sólo puede introducir sus manos a través de guantes.

Los filtros utilizados para eliminar las partículas de aire son los filtros HEPA (*high efficiency particulate air*) que retienen con un 99,97% de eficiencia, partículas de hasta 0,3 micrones. Estos filtros vienen colocados en los gabinetes y pueden colocarse en los sistemas de ventilación.

El funcionamiento de los flujos laminares debe controlarse anualmente, este procedimiento lo realizan empresas especializadas. Ante la duda del correcto funcionamiento de un equipo, puede realizarse un control sencillo repartiendo en la superficie de trabajo varias placas de Petri con agar nutritivo para bacterias, que se mantienen destapadas durante 20 minutos. Luego éstas se incuban a 37°C durante una semana. La aparición de colonias bacterianas indicaría falla en el equipo.

Incubador de CO₂: Todos los recipientes donde se cultivan células requieren de una atmósfera controlada con alta humedad y presión de CO₂. Esta se controla con un manómetro, mezclando aire con gas en la relación apropiada.

Estufas: Para cultivo de células se debe contar con estufas termostalizadas, con un grado de seguridad de $\pm 0,5^{\circ}\text{C}$. Las células no sobreviven a un aumento de temperatura de más de 2 o 3 grados, en pocas horas. Pueden sobrevivir algunos días a 4°C o a temperatura ambiente.

Microscopio o lupa invertida: Debe observarse las células regularmente ya que cualquier alteración se detecta primero a nivel morfológico. Se requiere un amplio espacio, que no poseen los microscopios comunes, para colocar sobre la platina el frasco de cultivo. Utilizando filtros puede mejorarse la visión de la monocapa, que se observa sin tinción.

Centrífuga: Si bien es suficiente una centrífuga de mesa de 2000 rpm, es conveniente proveerse de una centrífuga refrigerada.

Propipetas y Pipetas automáticas: Protegen tanto al operador como a los cultivos de posibles contaminaciones. Se recomiendan las que utilizan puntas o jeringas que pueden esterilizarse independientemente de la pipeta.

Congeladoras y heladeras: Pueden utilizarse las de uso doméstico, según el volumen de almacenaje. Respecto a las conservadoras de $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$, son convenientes las de tipo horizontal ya que al abrir la puerta la pérdida de frío es menor que en las de tipo vertical. Es importante que estén provistas de una alarma, que indique subas excesivas de temperatura, y de un estabilizador de voltaje.

Tanque de nitrógeno líquido: La elección del tanque depende de la capacidad requerida y de la tasa de evaporación del nitrógeno, que está condicionada por la frecuencia de acceso al tanque y la boca del mismo. Un tanque de 25 lt tiene capacidad para 250 ampollas de 1 ml. También debe contarse con un tanque de reserva de nitrógeno. Existen equipos grandes, con alarmas que indican aumento de temperatura y equipos de llenado automático (a nivel industrial).

Purificación de agua: Se requiere agua de la mejor calidad, bidestilada, desionizada u obtenida por ósmosis reversa para la preparación de los medios de cultivo, y para todas las condiciones que van a estar en contacto con las células. Para el último enjuague del material de vidrio se requiere agua de la mejor calidad. Es conveniente reciclar el agua para evitar contaminaciones con algas. Si es imprescindible almacenar agua debe hacerse por períodos cortos y en recipientes de vidrio borosilicato. Es conveniente limpiar tuberías y reservorios con hipoclorito y detergentes.

Material de vidrio plástico: los envases plásticos más utilizados son: policubetas, frascos de cultivo, placas de Petri, botellas Roller. Éstos son de poliestireno, deben ser específicamente señalados como “para cultivo celular”, ya que fueron tratados como para asegurar una mejor adhesión celular, no son tóxicos y presentan excelente calidad óptica. El uso de este material descartable es la solución más fácil, depende de la posibilidad de reciclado, de la disponibilidad de personal y del costo.

Los recipientes de vidrio adquiridos en el comercio son tóxicos para las células, por lo que requieren de un tratamiento especial con bicarbonato, lavados con detergentes adecuados y enjuagues minuciosos.

FUNCIONAMIENTO Y ADMINISTRACIÓN DEL LABORATORIO

La responsabilidad es exclusiva del director del laboratorio, aunque puede delegar la tarea en un profesional especializado e interiorizado en el tema.

Si se trata de un instituto grande, es necesario crear un comité de bioseguridad que recomiende un plan de seguridad para adoptar prácticas de seguridad en los laboratorios. La formación del comité depende de la naturaleza del instituto, de la distribución de los servicios, etc. Debe estar integrado por un representante del personal profesional, uno del personal técnico, un representante del personal administrativo, uno del personal de limpieza, un asesor médico y el inspector de bioseguridad.

El inspector de seguridad tiene la responsabilidad de formar al personal, observar su estado inmune, investigar accidentes, controlar la descontaminación del material usado y su eliminación, controlar la desinfección de equipos a reparar, antes de que sean sacados del laboratorio. Es función del inspector reconsiderar periódicamente las medidas adoptadas para preservar la seguridad en el laboratorio.

Debe existir en el laboratorio un libro foliado donde se registren accidentes, infracciones del personal, profilaxis y medidas de seguridad tomadas en cada situación.

SEGURIDAD EN EL LABORATORIO

Desde los comienzos de los cultivos de tejidos, se desarrollaron técnicas para protegerlos de la contaminación externa. Los flujos laminares y las mejores técnicas de pipeteo brindaron mayor seguridad a los productos de los cultivos y también a las personas que trabajan con ellos.

Si bien en el campo de los cultivos celulares hay pocas denuncias de infecciones en el trabajador, no debe minimizarse el riesgo potencial. Líneas celulares continuas pueden ser portadoras de virus latentes a los que el ser humano puede ser susceptible. Así, ha habido personas infectadas con virus herpes simiano, al manipular cultivos de ese origen. Si se

trabaja con líneas transformadas, éstas pueden producir virus potencialmente oncogénicos o, se ha descrito para las células Hela, ser ellas mismas causantes de tumores.

Actualmente las normas de seguridad están pensadas para proteger tanto al operador como a los cultivos y debemos tener claro que el principal problema a que nos enfrentamos pasa por nuestra negligencia o la de los demás.

En general, se infectan con mayor frecuencia los más jóvenes e inexpertos, los aerosoles infecciosos son la principal causa de infecciones accidentales en el laboratorio. Los accidentes están asociados a los cultivos celulares, más que al manipuleo con animales.

Otras causas de infección son: inoculación accidental con agujas, accidentes al centrifugar, aspiración por boca a través de la pipeta.

Todo personal debe ser entrenado en la práctica de reglas de seguridad y procedimientos específicos para reducir o eliminar en lo posible, los riesgos biológicos.

MANUAL DE BIOSEGURIDAD

En todo laboratorio debe existir un manual de bioseguridad con normas básicas que facilitarán un correcto manejo de los fluidos biológicos, permitirá una adecuada manipulación de los medios de cultivo, reactivos y elementos de trabajo, lo que favorece una buena calidad de los procedimientos.

Es un manual enfocado hacia la práctica, que pretende crear conciencia y promover la formación del personal en seguridad y bioseguridad. Es un elemento prioritario en todo laboratorio, ya que promueve la realización inocua de técnicas que pueden generar cierto riesgo de contaminación.

Ningún elemento protector (guantes, mascarilla, cámara de bioseguridad), garantiza por sí solo, la inocuidad de los procedimientos ni protege de las exposiciones en el laboratorio.

El manual debe reunir los principios de bioseguridad adaptados por la OMS, que tienen aplicación en el laboratorio de virología. También debe contener un protocolo a

seguir para el manejo de los equipos utilizados en el laboratorio y durante cada uno de los procedimientos más frecuentemente realizados en él.

SEGURIDAD DEL PERSONAL DEL LABORATORIO

Todos los procedimientos técnicos en los cuales se realice manipulación de fluidos biológicos, de cualquier tejido, célula, o cultivo celular humano, deberán ser realizados bajo condiciones de bioseguridad adecuadas.

Al personal que ingrese al laboratorio se le deben practicar exámenes médicos y de laboratorio: Examen médico general pre-ocupacional, examen oftalmológico, odontológico y de otorrino, clasificación sanguínea, VDRL y citoquímico de orina.

Además, deberán tener certificado de vacunación para Tétanos, difteria, fiebre amarilla y esquema completo contra la hepatitis B.

Todo el personal del laboratorio poseerá la información necesaria para prevenir y manejar adecuadamente las exposiciones en el laboratorio.

Toda persona que trabaja en un laboratorio de cultivos celulares debe tener en cuenta una serie de normas elementales con respecto a:

1. **Ropas protectoras:** Se debe usar guardapolvo y en áreas restringidas otras ropas protectoras como batas que sólo se usan en esa área.

Si la práctica requiere uso de guantes, manoplas o botas descartables, luego del trabajo deben colocarse en recipientes para ser luego autoclavados.

Si es necesario, proteger los ojos del operador con antiparras o máscaras. No se recomienda el uso de lentes de contacto en el laboratorio.

Realizar el lavado del guardapolvo preferentemente en el lugar de trabajo y si no es posible, trasladarlo en bolsas de plástico, y antes del lavado sumergirlos en hipoclorito de sodio al 1% durante toda la noche.

2. **Higiene personal:** Está prohibido en áreas de trabajo del laboratorio, comer, beber, fumar, mascar chicles, aplicarse cosméticos, llevar lápices, lapiceras o dedos a la boca.

No debe tocarse la cara, ojos, boca, nariz, etc. Usar el cabello recogido.

Lavarse las manos frecuentemente, antes, durante y después del trabajo, al salir del laboratorio, sigue siendo la medida preventiva más importante.

3. Otras:

- ♦ No permitir el ingreso de personas no autorizadas al laboratorio, especialmente niños.
- ♦ No tocar pestillos y superficies con los guantes, no llevar los guardapolvos fuera del área de cultivo.
- ♦ Tener desinfectantes accesibles en cada área del laboratorio. Desinfectar mesadas y flujos laminares antes y después de trabajar.
- ♦ No descartar virus, células o sus productos directamente en el sistema de drenaje.
- ♦ Todo derrame de material patógeno debe ser limpiado con desinfectantes y referido al supervisor.

LIMPIEZA EN EL LABORATORIO

Todo material no descartable utilizado en el laboratorio deberá ser desinfectado y luego autoclavado antes de ser lavado.

Los tubos destinados a reacciones químicas y los tubos conteniendo coágulos de sangre u otros líquidos biológicos deben colocarse en distintos recipientes, que contengan una solución de hipoclorito de sodio al 2% (tiempo mínimo de contacto 2 hs, se recomienda dejarlo toda la noche).

Las pipetas de vidrio, pipetas Pasteur y sus tetinas de goma, y las puntas de pipetas automáticas, se colocan en recipientes con solución de hipoclorito de sodio al 2% (tiempo mínimo de contacto 2 hs), donde quedarán totalmente sumergidas.

También es importante la descontaminación de gradillas y soportes, en general con soluciones de hipoclorito de sodio en diferentes concentraciones.

MATERIAL DE VIDRIO:

Las células pueden cultivarse en diferentes materiales: celofán, vidrio, poliestireno y otros plásticos. La elección del recipiente está condicionada por el costo, conveniencia,

confianza en el fabricante, métodos de cultivos utilizados, experiencia del usuario y tipos de células que van a ser cultivadas.

Los recipientes de poliestireno son ampliamente utilizados, aunque a veces, por defectos de fabricación, las células no se adhieren a la superficie del plástico. Los vidrios varían en su composición y a veces tienen sustancias tóxicas para las células, como plomo y arsénico. No son satisfactorios para los cultivos celulares los vidrios sódicos, se prefiere usar vidrios borosilicatados.

En el lavado de la vidriería utilizada en cultivos celulares, el agua es un factor muy importante. Pueden formarse precipitados con las impurezas del agua y dado que los componentes del agua varían de un lugar a otro, los procedimientos pueden ser satisfactorios en una localidad y no en otra.

Todo material de vidrio debe ponerse en agua inmediatamente después de su uso para evitar que se sequen las sustancias proteínicas y facilitar la limpieza. Luego se somete al tipo de limpieza elegido, que puede ser:

- ♦ Con detergente, es lo más usado, no necesita hervido, pero es difícil eliminarlo por lo que es imprescindible un prolongado enjuague. En Argentina ha dado buen resultado el empleo de *Detergex* (Laboratorio Rivero y Cía., Bs.As.)

- ♦ Con álcalis, los más comunes son los jabones blandos, carbonato de sodio, trifosfato de sodio y metasilicato de sodio.

- ♦ Con ácidos oxidantes, ácido sulfúrico caliente, ácido crómico, ácido nítrico, mezcla sulfocrómica, con la desventaja de ser peligrosos y que requieren un enjuague muy cuidadoso.

- ♦ Máquina lavadora automática, es útil cuando se tiene grandes cantidades de material y no se requiere cepillado a mano.

El enjuague es de importancia fundamental. Primero se lava tres veces con agua de canilla, llenando y vaciando completamente los frascos, botellas, etc., luego tres enjuagues similares con agua destilada y otros tres con agua bidestilada.

PROCEDIMIENTO PARA MATERIAL ESPECIAL

Tapones y conexiones de goma que están en contacto con las células pueden contener impurezas que pueden ser tóxicas para los cultivos. Se recomienda hervirlos en una solución al 5% de bicarbonato de sodio, luego enjuagar cuidadosamente con agua. Se recomienda el uso de tapones de silicona, para evitar problemas de toxicidad y pueden esterilizarse por calor seco. Tienen la desventaja de ser muy caros.

Descontaminación de autoanalizadores, debe realizarse diariamente. Es importante seguir las indicaciones del fabricante y usar el desinfectante adecuado.

Limpieza de refrigeradores y freezers, deben descongelarse periódicamente para ser limpiados y desinfectados, ya que durante el congelamiento pueden romperse tubos o ampollas. Todo el material debe estar perfectamente rotulado para evitar inconvenientes.

Limpieza del laboratorio, debe realizarse cuando finaliza la labor diaria, o a la mañana siguiente. El personal encargado de esta tarea debe estar bien instruido por el jefe del laboratorio.

La descontaminación de pisos, mesadas, paredes alrededor de las mesadas, debe realizarse con un desinfectante adecuado como hipoclorito de sodio al 2%. La descontaminación de equipos se debe realizar con soluciones no corrosivas como glutaraldehído al 2%.

Eliminación de desechos, debe separarse:

- ♦ El material contaminado para eliminación, se coloca en recipientes impermeables para ser esterilizados, y en algunos casos se llevan cerrados directamente al incinerador.
- ♦ Objetos cortantes y aguzados, se colocan en recipientes de paredes rígidas, se tapan y van a bolsas para ser autoclavado, y se eliminan con la basura.

MEDIDAS EN CASO DE ACCIDENTES

A pesar de las precauciones y la organización en un laboratorio, pueden ocurrir situaciones que expongan al personal al contagio de diversos agentes patógenos. En todos los casos, producido el incidente, debe mantenerse la calma y resolver la situación lo más adecuadamente posible y sin pérdida de tiempo. Se recomienda:

- ♦ Suspender la tarea que se estaba realizando
- ♦ Avisar al responsable del laboratorio, quien decide los pasos a seguir
- ♦ Determinar con qué material se produjo el accidente, evaluar el riesgo potencial e iniciar si es necesario y posible un plan de inmunización pasiva-activa
 - ♦ Si ocurrieron cortes, raspaduras o pinchazos, lavar inmediatamente la herida con agua y jabón.
 - ♦ Ante salpicaduras en los ojos, enjuagar inmediata y repetidamente con agua o solución fisiológica.
 - ♦ Si ocurrió aspiración por boca, enjuagar repetidamente con agua.
 - ♦ Manchas de sangre u otros materiales en la ropa, frotar con hipoclorito de sodio concentrado y luego con agua.

PROFILAXIS

♦ **Inmunización pasiva:** En casos de accidentes o sea post exposición, si el personal no está inmunizado previamente son indicados sueros inmunes (gammaglobulinas) o hiperinmunes dentro de las 48 hs para lograr mayor efectividad. Deben darse 2 dosis con 30 días de diferencia y recordar que confieren inmunidad temporaria.

♦ **Inmunización pasiva – activa:** Es la conducta de elección para aquellos individuos que ante una situación de riesgo, no se cuenta con tiempo suficiente para efectuar solamente inmunización activa. Se administra en forma simultánea pero en distintos lugares (ambos deltoides) una gammaglobulina hiperinmune y la vacuna correspondiente.

BIBLIOGRAFÍA

Manual de Bioseguridad en el Laboratorio. Organización Mundial de la Salud. 3ra Edición. Ginebra. 2005.

Microbiología Clínica. Guillermo Prats. Editorial Médica Panamericana. 2005.

TRABAJO PRÁCTICO N° 2

TEMA: Toma de muestra - recolección y transporte – conservación – procesamiento

INTRODUCCIÓN

1. Obtención de muestras para estudio virológico

La elección de las muestras para la investigación virológica depende de la naturaleza, de los síntomas del paciente y del conocimiento de la patogénesis del agente viral sospechado.

Como regla general, cuando una enfermedad genera lesiones sobre mucosas o epitelios, se toma material de dichas lesiones por medio de hisopos. Si la enfermedad se localiza sobre el tracto respiratorio se recomienda secreciones respiratorias o aspirados nasofaríngeos. Por último, si la enfermedad es generalizada como, por ejemplo, un síndrome febril prolongado o una enfermedad de origen congénito es recomendable tomar muestras de múltiples sitios.

El siguiente cuadro es una guía de muestras clínicas para el diagnóstico virológico rápido.

MANIFESTACIÓN CLÍNICA	AGENTE MÁS COMÚN	MUESTRA
Infección del SNC	Enterovirus HSV Parotiditis	LCR, MF, HF. Biop. de cerebro, suero, LCR. HF, LCR, orina, suero.
Infección del tracto respiratorio	Influenza ADV Parainfluenza RSV Sarampión CMV	ANF , hisopado nasal, LBA. ANF , hisopado nasal. ANF , hisopado nasal. ANF , hisopado nasal. ANF , suero. LBA , suero, sangre heparinizada.

*Cátedra de Virología
Carrera de Bioquímica*

<p>Enfermedades exantemáticas y vesiculares</p> <ul style="list-style-type: none"> - Vesiculares - Exantemáticas 	<p>HSV VZV</p> <p>HSV VZV Sarampión Rubeola Enterovirus Parvovirus HSV-6 EBV ADV</p>	<p>HV HV</p> <p>HV, suero. HV, suero. Suero, ANF. Suero Hisopado de lesión, MF, HF. Suero Suero Suero ANF, Suero.</p>
<p>Infecciones oculares</p>	<p>HSV ADV Enterovirus VZV</p>	<p>Hisopado ocular, suero. Hisopado ocular, suero. Hisopado ocular. Hisopado ocular, suero.</p>
<p>Infecciones gastrointestinales</p>	<p>Rotavirus ADV 40-41 Hepatitis A, B, C, D, E</p>	<p>MF MF Suero</p>
<p>Infecciones cardíacas</p>	<p>Enterovirus (Coxsackie B1-6) CMV</p> <p>Influenza</p>	<p>MF, Líquido pericárdico, suero.</p> <p>Sangre heparinizada, Líquido pericárdico, suero. ANF, suero.</p>
<p>Infecciones congénitas</p>	<p>CMV</p> <p>HSV Rubeola Parvovirus</p>	<p>Sangre heparinizada, orina, suero. HV, suero. Suero Suero</p>
<p>Síndrome mononucleósico / Síndrome febril prolongado</p>	<p>CMV</p> <p>EBV</p>	<p>Suero, sangre heparinizada, orina. Suero</p>

En negrita se resaltan las muestras aptas para el estudio virológico

MF: materia fecal

HF: hisopado faríngeo

ANF: aspirado nasofaríngeo

LBA: lavado broncoalveolar

HV: Hisopado vesicular

2. Recolección y transporte

Para la mayoría de los virus, las muestras deben obtenerse dentro de la primera semana de iniciado el cuadro clínico, período en el cual se tienen las mayores posibilidades de detección o recuperación.

En condiciones ambientales adversas, los virus pierden en mayor o menor grado su infectividad. Por ello, es necesario que las muestras sean recolectadas bajo condiciones que permitan retener su contenido viral. Por tal fin, se usan medios de transporte diseñados para mantener la viabilidad viral. Dichos medios son soluciones salinas isotónicas suplementadas con proteínas (por ej.: albúmina o suero fetal bovino) como estabilizante viral, antibiótico y antimicótico, para inhibir la flora que pueda contaminar la muestra. En caso de no contar con tales medios, la alternativa es utilizar medio de transporte Stuart o solución fisiológica. Los hisopos secos no mantienen la infectividad viral por lo que no son aptos para el intento de aislamiento.

Las muestras para aislamiento deben ser enviadas lo antes posible al laboratorio. De lo contrario, se pueden conservar por 1 – 2 días entre 4 – 8°C en heladera. No congelar el material a menos que transcurra más tiempo.

El cierre de cada tubo con las muestras se debe precintarse con tela adhesiva y rotular, indicando el nombre y apellido del paciente, tipo de material y fecha de obtención. Además, se debe adjuntar un resumen de la historia clínica del paciente.

El transporte debe efectuarse en condiciones de refrigeración. Para distancias cortas, se sugieren heladeras portátiles de telgopor y sachets refrigerantes o cubos de hielo contenidos en bolsas plásticas. En el caso de grandes distancias (que excedan las 24 – 48 hs de transporte) se aconseja la utilización de hielo seco.

3. Recolección de muestras para cultivo de virus

A continuación se brinda información más detallada para la obtención de las muestras más empleadas en el diagnóstico virológico.

Materia fecal: tomar una o dos cucharadas en un frasco limpio o estéril de boca ancha. REFRIGERAR. Se puede investigar Adenovirus, Enterovirus.

Líquidos corporales normalmente estériles: en este grupo se incluyen el LCR, líquido pleural, amniótico, sinovial, pericárdico, humor vítreo y otros líquidos orgánicos. Estas muestras no se deben diluir con ningún medio de transporte. Se puede investigar en LCR: Enterovirus, HSV, Parotiditis, virus de la rabia. En Líquido pericárdico: Coxsackie B. REFRIGERAR.

Muestras de biopsia o autopsia: colocar en un frasco estéril con 2 ml de medio de transporte. En su defecto usar solución fisiológica. REFRIGERAR.

Sangre (para antigenemia o viremia): enviar 5-10 ml de sangre anticoagulada con heparina o EDTA recogida en tubo estéril.

Médula ósea: los aspirados de médula ósea deben recolectarse con anticoagulante (EDTA, Citrato de sodio o Heparina) en un tubo estéril. REFRIGERAR. Buscar CMV. No se puede usar la heparina si la muestra también será procesada con la técnica de PCR.

Aspirado nasofaríngeo: introducir una sonda nasogástrica por las fosas nasales hasta la pared posterior de la faringe. Aspirar las secreciones y recoger en recipiente estéril. Con la misma sonda, se aspiran 2 - 3 ml de medio de transporte para bañar dichas secreciones. Investigar Adenovirus, VSR, Influenza, Parainfluenza.

Hisopado nasofaríngeo: Introducir un hisopo en nariz y rotar, pasar otro hisopo por amígdalas y faringe posterior. Colocar en medio de transporte. REFRIGERAR. Investigar ADV, VSR, Influenza, Parainfluenza, Sarampión, Parotiditis, Rinovirus.

Hisopado de endocérvix: Remover el moco de exocérvix con un hisopo y descartar. Introducir otro hisopo 1 cm en el cuello de útero y rotar, colocar en medio de transporte. REFRIGERAR. Investigar HSV, CMV, HPV. Para detección de Herpes simple debe obtenerse también un hisopado vulvar.

Lesión dérmica vesicular: Romper la vesícula y recolectar el fluido con un hisopo. Luego, con el mismo hisopo pasar por la base de la lesión. Colocar en medio de transporte. REFRIGERAR. Investigar Coxsackie A, Echovirus, HSV, VZV.

Orina: Recolectar 10 a 20 ml del chorro medio en recipiente estéril (igual que urocultivo). REFRIGERAR.

Investigar ADV, CMV, HSV, Parotiditis, Rubéola, Sarampión.

Para máxima recuperación se sugieren 2 o 3 muestras en días sucesivos.

Raspado corneal o conjuntival: Debe ser obtenida por un oftalmólogo. Colocar en medio de transporte. REFRIGERAR.

Saliva: 2 ml en recipiente estéril para Coxsackie B. REFRIGERAR. Para el virus de la rabia, recolectar saliva con dos hisopos, en piso anterior de la boca y cerca del conducto de Stenon. Colocar en medio de transporte. REFRIGERAR.

Hisopado rectal: Introducir el hisopo 4 a 6 cm en el recto para obtener materia fecal. Colocar en medio de transporte. REFRIGERAR. Investigar ADV, Enterovirus. No es equivalente a materia fecal para aislamiento viral; se aconseja en proctitis.

Lavado broncoalveolar: 8 a 10 ml en recipiente estéril. REFRIGERAR. Buscar CMV, HSV, ADV.

Lesión conjuntival: Hisopar conjuntiva, realizando la eversión del párpado inferior. Colocar en medio de transporte. REFRIGERAR. Investigar ADV, Coxsackie A, CMV, Enterovirus 70, HSV.

4. Técnicas serológicas

Para técnicas serológicas enviar 2 ml de suero en un tubo con su correspondiente tapón de goma o plástico. Una sola muestra si se estudiará presencia de IgM específica. Si se realizará estudio de IgG por conversión serológica se recomienda realizar el estudio sobre muestras pareadas obtenidas con 10 – 15 días de diferencia.

5. Medios de transporte

Existen numerosas formulaciones de las cuales sólo se mencionan las siguientes:

- ✓ “2-SP”, (Buffer fosfato 0,2 M + sacarosa 0,2 M + 2% suero fetal bovino + gentamicina 20 ug /ml + anfotericina B; PH 7,2)
- ✓ Medio esencial mínimo (MEM) con glutamina y suero fetal bovino al 2% + gentamicina 20 ug / ml + anfotericina B (Medio de mantenimiento).

El medio de transporte se distribuye desde el laboratorio de virología. Se conserva en heladera a 4 – 8°C o mejor congelado por un período no mayor de 60 días a partir de la fecha de preparación, indicado en el rótulo. En el momento de la inoculación el medio deberá estar totalmente descongelado.

6. Procesamiento de muestras para búsqueda de antígenos

- ✓ **Aspirados nasofaríngeos y lavados broncoalveolares**
 - a. Centrifugar 10 min. a 1500 rpm.
 - b. Tomar el pellet celular. Lavarlo para eliminar el moco con PBS pH 7,2.
 - c. Dejar secar a temperatura ambiente. Fijar con acetona 10 min. a 4°C.
- ✓ **Leucocitos polimorfonucleares (PMN)**
 - a. Separo la fracción de PMN de sangre heparina mediante gradientes como Ficoll-Hypaque o Dextran 250 kd al 5 %. Realizar dos lavados con PBS.
 - b. Ajustar la concentración a 10 PMN/ml. Hacer improntas por duplicado en portaobjetos adecuados.
- ✓ **Medula ósea**

Se debe procesar en forma idéntica a la sangre heparinizada.
- ✓ **Biopsias o necropsias**
 - a. Tomar el material con pinza y frotar sobre los pocillos del portaobjetos de forma tal que se adhieran la mayor cantidad de células posibles.

- b. Dejar secar a temperatura ambiente.
- c. Fijar con acetona 10 min a temperatura ambiente.

✓ **Hisopados**

- a. Los hisopos son enviados frecuentemente al laboratorio, y son tomados de distintas fuentes: fauces, faringe, piel, recto, conjuntiva y genitales. Una vez obtenido, introducirlo en un tubo con 2 ml de medio de transporte, quebrando el palillo a una altura que permita el cierre del tubo.
- b. Con los hisopos es posible realizar improntas para búsqueda directa de antígenos. Para ello se deben seguir las siguientes instrucciones:
 - I. Humedecer el hisopo en medio de transporte o en solución fisiológica.
 - II. Tomar la muestra tratando de obtener la mayor cantidad de material posible.
 - III. Repasar el hisopo en por lo menos seis pocillos del portaobjetos.
 - IV. Dejar secar a temperatura ambiente. Fijar con acetona por 10 min a temperatura ambiente. Envolver en papel para su transporte.

7. Procesamiento de las muestras para el cultivo rápido

Antes de inocular las muestras, éstas deben tratarse (por ejemplo, con antimicrobianos) para eliminar agentes no virales como por ej.: bacterias, hongos, toxinas o pH muy ácidos que puedan producir efectos nocivos sobre las líneas celulares inoculadas. Dicho tratamiento no debe alterar la infectividad viral.

✓ **Hisopados**

- a. Agitar el tubo que contiene el hisopo mediante un vortex.
- b. Utilizando pinzas estériles, presionar firmemente el hisopo contra la pared del tubo. Descartar el hisopo.
- c. Centrifugar a 1500 rpm durante 20 min a 4°C
- d. Transferir el sobrenadante a un vial con antibióticos y antimicóticos.

e. Conservar a -70°C.

✓ **Aspirado Nasofaríngeo**

- a. Centrifugar 10 min. a 1500 rpm a 4°C.
- b. Tomar el sobrenadante. Tratarlos con ATB y antimicóticos. Conservar a -70°C.

✓ **Sangre**

- a. Utilizar gradientes de densidad como Ficoll-Hypaque o Dextran 250 Kd al 5% para separar los leucocitos PMN.
- b. Resuspender las células en 2 ml de MEM.

✓ **Medula ósea**

El aspirado de medula ósea recogido con anticoagulante, puede diluirse en un pequeño volumen de medio de transporte, y procesarse igual una muestra de sangre.

✓ **Orina**

Las muestras de orina son comúnmente citotóxicas y ácidas.

Medir pH. Neutralizar si es necesario con ATB y antimicóticos.

✓ **LCR**

Si se sospecha contaminación bacteriana debe tratarse con ATB.

BIBLIOGRAFÍA

Virología Médica. Carballal, G; Oubiña, J. Ed. Corpus. Buenos Aires. 2014.

Manual de Técnicas de Diagnóstico Viroológico Rápido. Sociedad Argentina de Virología. Asociación Argentina de Microbiología. INEI-ANLIS- Dr. Carlos G. Malbrán. 2005.

TRABAJO PRÁCTICO N° 3

TEMA: Detección de ácidos nucleicos. Reacción en cadena de la polimerasa.

INTRODUCCIÓN

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, Polymerase Chain Reaction), es una metodología que consiste en la amplificación enzimática en ciclos repetidos de un fragmento específico de ADN utilizando la enzima ADN polimerasa Termoestable (Taq).

En los últimos años, la PCR se ha convertido en una revolucionaria tecnología que facilita los estudios moleculares en el laboratorio y que abre nuevas perspectivas a la investigación y al diagnóstico médico.

Para poder llevar a cabo esta técnica existe una infraestructura de laboratorio requerida para tal fin. El laboratorio de biología molecular, posee diferentes espacios físicos (Áreas) que son indispensables que se detallan a continuación.

1. Infraestructura de un laboratorio de biología molecular (PCR)

Separación Física





2. Etapas en el procesamiento

a. Requerimientos de la muestra

- Obtención
 - sangre entera anticoagulada con EDTA
 - plasma/suero
 - líquido cefalorraquídeo
 - material de biopsia
 - fluidos corporales
- Conservación
 - dentro de las 24 hs: 2-8°C
 - más de 24 hs congelar a -20°C ó -70°C
- Extracción de los ácidos nucleicos

b. Amplificación

c. Detección

3. Métodos de amplificación de ácidos nucleicos

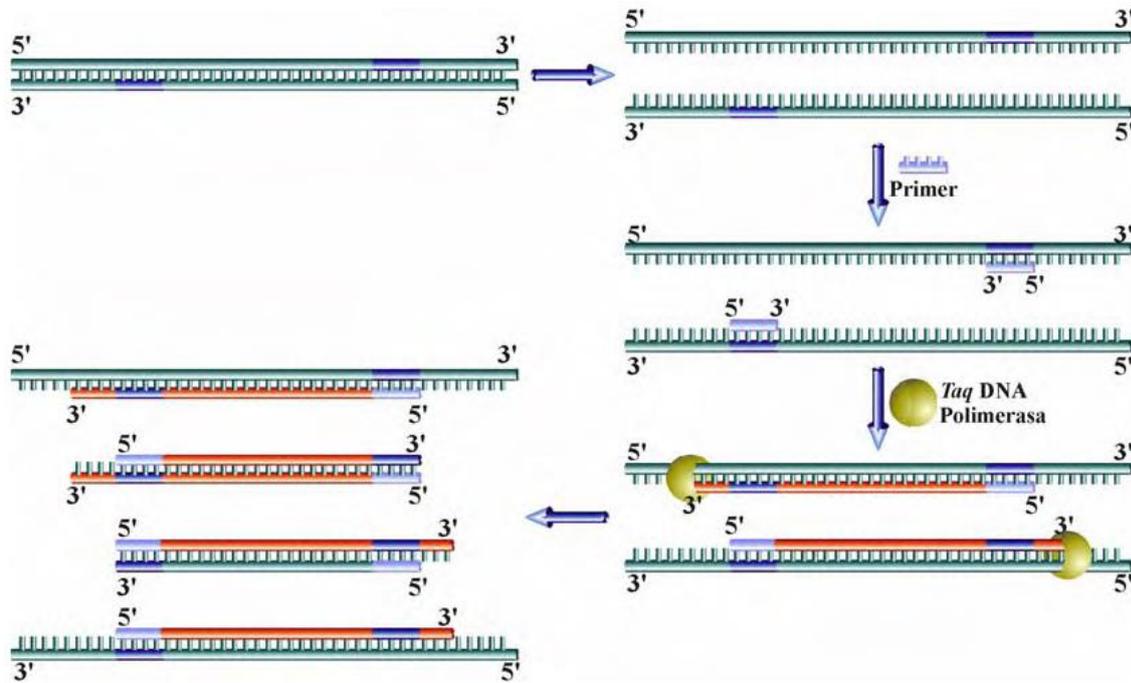
La PCR es una metodología que consiste en la amplificación enzimática en ciclos repetidos, de un fragmento específico de ADN, utilizando la enzima ADN polimerasa termoestable (Taq).

Ventajas y usos:

- Rápida y eficaz.
- Detección de patógenos responsables de enfermedades infecciosas.
- Aplicación a la medicina forense y legal.

Componentes de la reacción de PCR

- Oligonucleótidos (cebador o *primer*): Secuencias cortas de ADN que flanquean el fragmento a amplificar y actúan como iniciadores de la polimerización.
- Tampón (Buffer de reacción): Necesario para crear las condiciones óptimas para la actividad de la ADN polimerasa.
- Enzima ADN polimerasa termoestable.
- Desoxinucleótidos trifosfatos (dNTPs): Sustrato necesario para la formación de la cadena de ADN.
- MgCl₂
- Muestra de ADN o templado (contiene la secuencia a amplificar).

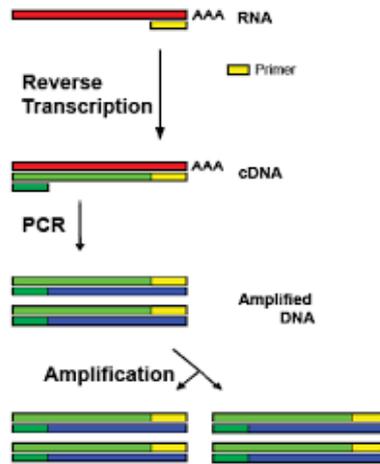


Esquema de la Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

4. Tipos de PCR

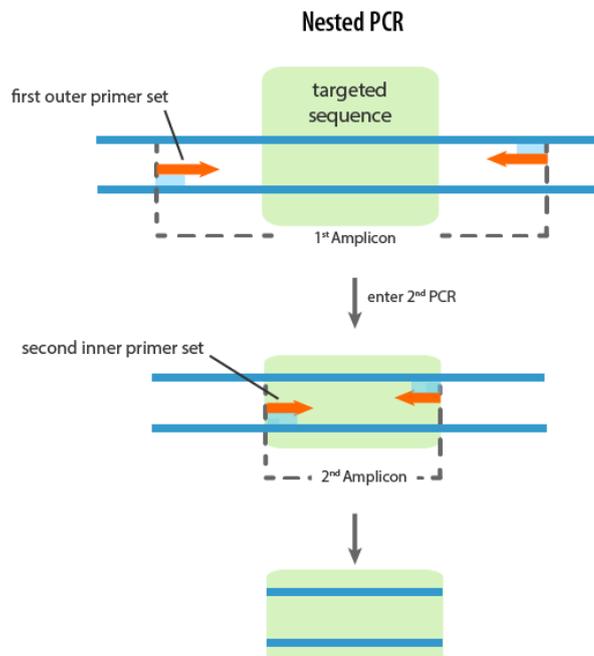
a. Reacción de PCR a partir de ARN (RT-PCR)

El material de partida es ARN, pero como la PCR utiliza una ADN polimerasa, es necesario hacer previamente una copia del ARN a ADNc. Esto se consigue haciendo en una primera etapa una transcripción reversa del ARN. El ADNc obtenido es el sustrato en la reacción de PCR usando cebadores específicos.



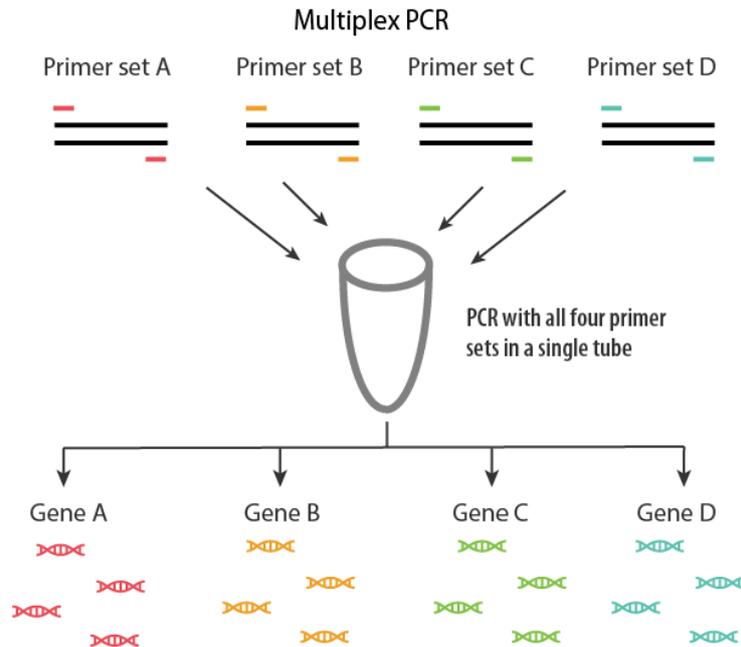
b. PCR anidada o Nested PCR

Es un método para incrementar la sensibilidad y la especificidad de la amplificación. Consiste en realizar una segunda amplificación con otro par de cebadores que se ubican por dentro de la secuencia a amplificar respecto de los cebadores iniciales.



c. PCR Multiplex

Se incluyen dentro de la misma reacción de PCR múltiples pares de cebadores específicos para diferentes dianas, por lo que se produce una co-amplificación de diferentes dianas.

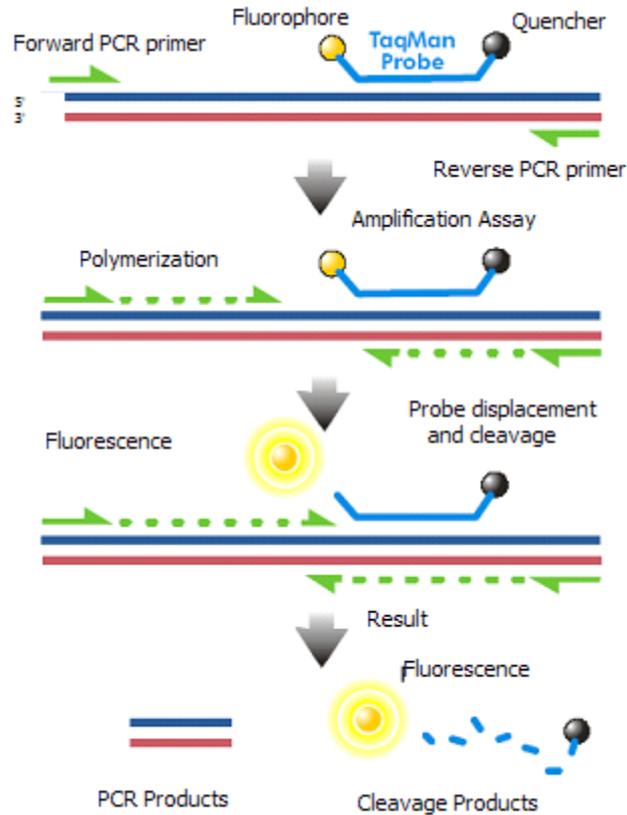


d. Real Time PCR

Es una metodología que permite medir en tiempo real la formación de un producto de PCR, debido a que los procesos de amplificación y detección se producen simultáneamente. Utiliza un fluorómetro adosado a un equipo convencional de PCR y tubos de calidad óptica.

Se basa en el uso de un oligonucleótido que contiene un fluorocromo y un *quencher*. La proximidad de estos dos elementos bloquea la fluorescencia. Cuando éstos se separan en el transcurso de la amplificación, aumenta la emisión de fluorescencia, que es proporcional a la cantidad de ADN formado.

Entre las desventajas que presenta se incluyen la necesidad de una optimización perfecta, el hecho de que no se puede asegurar la especificidad de la reacción, complica el uso de controles internos, y tiene un elevado costo.



5. Protocolo general de una reacción de PCR

Una reacción de PCR se realiza habitualmente en un volumen de 25 a 50µl, en un aparato automático programado (ciclador térmico) para conseguir las temperaturas y los ciclos deseados.

Un ciclo típico de PCR consiste en realizar la desnaturalización a 94° C durante 20 seg., la hibridación de los cebadores con el ADN molde a 55° C durante 20 seg., y la síntesis a 72° C durante 30 seg.

El tiempo de incubación a 72° C (extensión) varía de acuerdo a la longitud de la secuencia a ser amplificada. La temperatura de hibridación o *annealing* depende de la longitud de los cebadores y de su contenido de CG. Si los cebadores tienen una complementariedad perfecta con el templado se usa 55°C para (C+G) < 50%, ó 60°C para (C+G) > 50%.

6. Visualización de ADN: Electroforesis en gel de agarosa

Luego que los ciclos de PCR han terminado, los productos de amplificación se separan por electroforesis en un gel de agarosa teñido con Bromuro de Etidio, GelRed, GelGreen o SYBR Green.

Es un método estándar usado para analizar moléculas de ADN de más de 200 pares de base (pb).

✓ Protocolo corrida electroforética en gel de agarosa

Visualizar el ADN extraído corriendo 5 µl de muestra en pocillos dentro de un gel de agarosa 0.2% en una cuba de electroforesis, usando como buffer de electroforesis TBE 0.5X, y como marcador de peso molecular, 1 Kb. Debe tenerse en cuenta siempre que el volumen de las muestras no debe sobrepasar el volumen de los pocillos del gel.

Antes de sembrar la muestra se le agrega un volumen determinado de colorante (1 µl) de frente (azul de bromofenol) para visualizar la corrida.

La electroforesis se lleva a cabo a 100V durante 1 h a temperatura ambiente; los geles luego se tiñen con Bromuro de Etidio, GelRed, GelGreen o SYBR Green, los cuales se intercalan entre las bases del ADN y son fluorescentes cuando se iluminan con luz ultravioleta.

✓ Reactivos necesarios

- TBE 0.5X buffer (Tris base, ácido bórico, EDTA [0,5 M], pH 8,0)
- 0,2 % agarosa en 5X TBE buffer
- Bromuro de etidio, GelRed, GelGreen o SYBR Green
- Marcador de peso molecular: 1kb; 5. Buffer de corrida.

✓ Preparación del gel de agarosa

- Preparar la cuba de electroforesis con el peine correspondiente.
- Realizar el cálculo necesario para preparar un gel de agarosa 2% (25 ml).
- Pesar la agarosa. Diluir con TBE 5X hasta 25 ml y calentar hasta disolución.

- Dejar enfriar 5 minutos, 1 ul de bromuro de etidio y verter solución de agarosa.
- Dejar solidificar y cubrir el gel con TBE 0.5X.

ACTIVIDAD PRÁCTICA:

1. **Reacción de PCR:** Amplificación del gen hexon de Adenovirus a partir de muestras de orina.

MATERIALES:

- ✓ Buffer 5x
- ✓ MgCl₂
- ✓ Agua bidestilada estéril
- ✓ dNTPs
- ✓ Cebadores: hexAA1885 y hexAA1913
- ✓ Taq polimerasa
- ✓ Micropipetas, Tips, Tubos de PCR, Termociclador.
- ✓ Agarosa, Bromuro de Etidio, TBE buffer 5X, Marcador de PM 1kb, Cuba de electroforesis y analizador de imágenes transiluminador con luz UV.

METODOLOGÍA:

a. El ADN total será extraído mediante la utilización de un kit comercial de acuerdo con las instrucciones suministradas por el fabricante partiendo de la siguiente muestra: orina.

b. Preparar la mezcla de reacción (volumen final 50 ul): Agua bidestilada estéril: 13 µl; buffer 5x: 10 µl; Mg Cl₂: 8 µl; dNTPs: 2 µl (10mM c/dNTP), primer hexAA1885: 3µl; primer hexAA1913: 3µl; Taq Polimerasa: 1µl, y ADN: 10µl.

c. Realizar la PCR usando las siguientes condiciones:

Números de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	7 min
	55	1min
	72	1.5 min
40	94	1 min
	55	1 min
	72	1.5 min
1	4	99hs

2. **Reacción de PCR a partir de ARN (RT-PCR):** Amplificación del gen M del virus influenza A a partir de muestras respiratorias.

MATERIALES:

- ✓ Kit QIAGEN One-step RT-PCR®, recomendado por la OMS.
- ✓ Buffer 5x QIAGEN RT-PCR
- ✓ RT-PCR Enzime Mix
- ✓ ARNasa inhibitor (20 U/μl)
- ✓ Agua bidestilada estéril
- ✓ Cebadores: M30F2/08 y M264R3/08
- ✓ Micropipetas, Tips, Tubos de PCR, Termociclador
- ✓ Agarosa, Bromuro de Etidio, TBE buffer 5X, Marcador de PM 1kb, Cuba de electroforesis y analizador de imágenes transiluminador con luz UV.

METODOLOGÍA:

a. El ARN total será extraído mediante la utilización del kit QIAmp® Viral RNA (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones suministradas por el fabricante partiendo de la siguiente muestra: hisopado nasofaríngeo.

b. Preparar la mezcla de reacción (volumen final 25 ul): Agua bidestilada estéril: 9,5 μl; buffer 5x QIAGEN RT-PCR: 5 μl; dNTPs: 1 μl (10mM c/dNTP), primer M30F2/08:

*Cátedra de Virología
Carrera de Bioquímica*

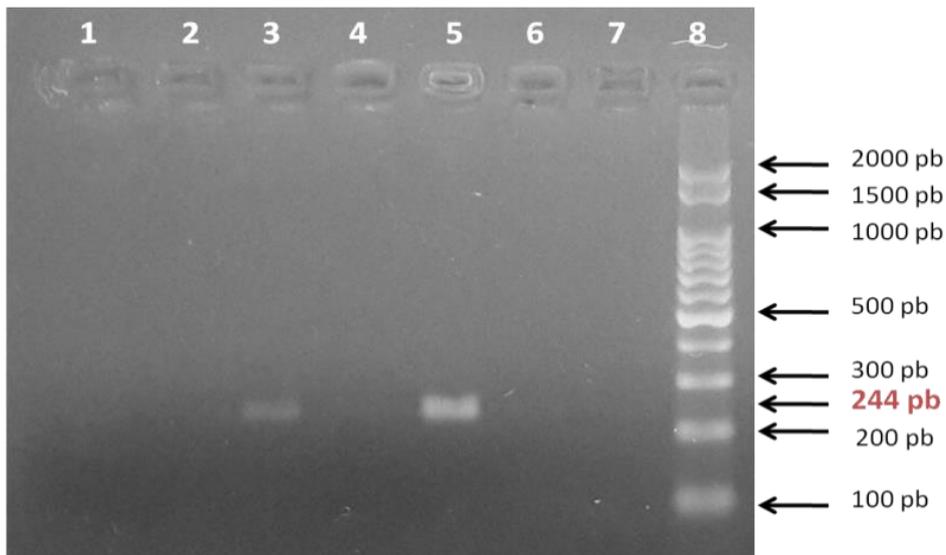
1,5µl; primer M264R3/08: 1,5µl; RT-PCR Enzyme Mix: 1µl, ARNasa inhibitor: 0,5µl, y ARN: 5µl.

c. Realizar la PCR usando las siguientes condiciones:

Números de ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	50	30 min
	95	15 min
45	94	30 seg
	50	30 seg
	72	1min
1	72	10 min
	4	99hs

d. Corrida electroforética durante 60 min a 120 voltios (V). Visualizar los productos de PCR en gel de agarosa al 2%. Usar el marcador de peso molecular 1kb (bandas de 100 a 2000 pb).

e. Una muestra de los resultados que se consiguen:



Electroforesis de los productos de la RT-PCR del gen M. Calle 3 y 5 bandas de 244 pb correspondientes al gen M. calle 8: PM de 1kb.

BIBLIOGRAFÍA

Manual de métodos moleculares para estudios microbiológicos. Merino LA, Giusiano G.
Asoc. Argentina de Microbiología. 1a ed. - Buenos Aires. 2011.

TRABAJO PRÁCTICO N°4

TEMA: Diagnóstico de Infecciones Respiratorias Agudas. Reacciones de Hemaglutinación e Inhibición de la Hemaglutinación.

INTRODUCCIÓN

Hemaglutinación viral

Muchas familias de virus poseen la capacidad de aglutinar glóbulos rojos de diversas especies animales. Esta propiedad, descubierta para el virus de la gripe es utilizada en un método sencillo para cuantificar virus.

Algunas familias, como *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae* y los arbovirus poseen en las espículas de la envoltura, glicoproteínas con capacidad de aglutinar glóbulos rojos, que se denominan hemaglutininas.

El fenómeno básico es la unión de las moléculas de hemaglutinina viral a receptores mucoproteicos presentes en los glóbulos rojos (**Figura 1**). Si la concentración de viriones es suficiente, se formarán múltiples puentes entre ellos y los glóbulos rojos se depositarán en forma de retículo en el fondo del tubo. El borde de este depósito tiene una forma de sierra característica. En cambio, los glóbulos que no fueron aglutinados se depositarán en forma de botón. La lectura de la reacción es visual (**Figura 2**).

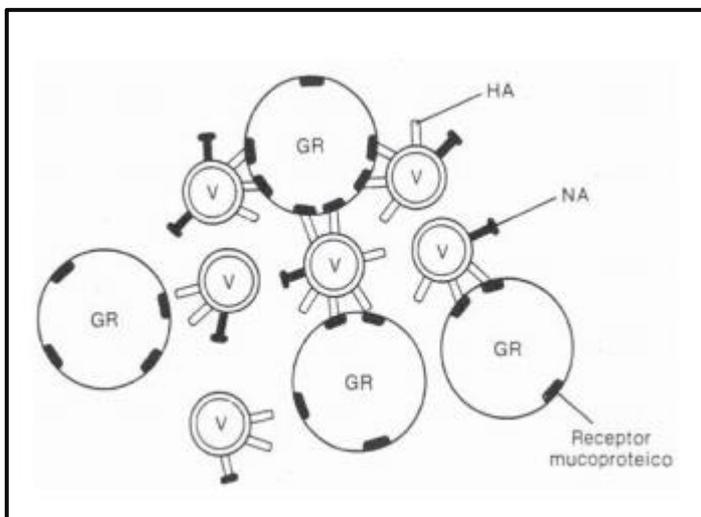


Figura 1. Esquema de hemaglutinación viral.
GR: glóbulo rojo;
V: virión de orthomyxovirus;
HA: hemaglutinina viral;
NA: neuraminidasa.

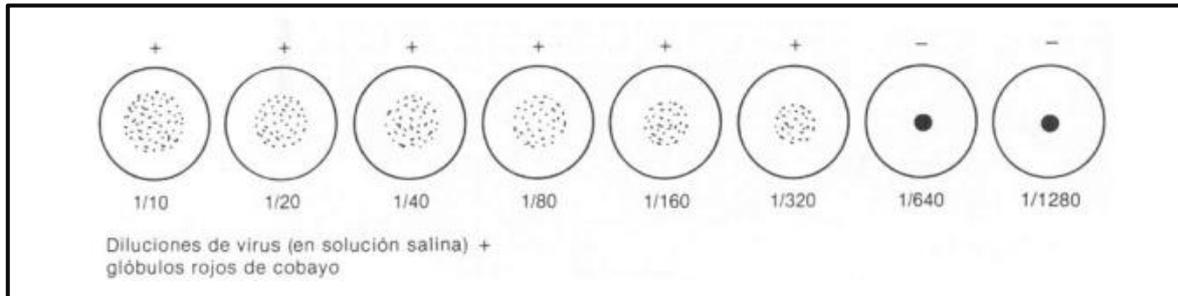


Figura 2. Lectura de una reacción de hemaglutinación. La lectura es visual y la inversa de la última dilución que presenta hemaglutinación completa corresponde al título hemaglutinante.

Habitualmente, se realizan diluciones dobles de la suspensión viral, las que se mezclan con glóbulos rojos. La última dilución que presenta hemaglutinación completa es el título hemaglutinante.

El mecanismo responsable de la hemaglutinación es la unión de las hemaglutininas virales a receptores que se encuentran en la membrana de muchas células y que son especialmente abundantes en los glóbulos rojos. Los receptores son mucoproteínas que contienen ácido N-acetil-neuramínico (NANA). Estos receptores también se encuentran en las células del tracto respiratorio y son los que permiten la adsorción de los mixovirus y paramixovirus.

Inhibición de la hemaglutinación

Si se hace reaccionar un virus con capacidad de hemaglutinación con su anticuerpo específico, éste anulará su capacidad de hemaglutinación por bloqueo de las hemaglutininas presentes en la envoltura del virión. Este fenómeno se llama inhibición de la hemaglutinación y es utilizado con frecuencia como método diagnóstico tanto para identificar virus como para estudios serológicos con el fin de determinar la presencia de anticuerpos específicos inhibidores de la hemaglutinación en el suero del paciente.

ACTIVIDAD PRÁCTICA:

MATERIALES:

Tubos de hemólisis estériles. Tubos de ensayo estériles. Tubos de centrifuga estériles. Pipetas de 10 ml, 5 ml, 1 ml 1/100. Centrifuga. Aglutinoscopio. Baño María a 37 °C y 56 °C.

- ✓ Desinfectantes: alcohol, alcohol iodado, hipoclorito de sodio.
- ✓ Glóbulos rojos humanos “O” Rh + u otro de origen animal.
- ✓ Antígenos: hemaglutininas víricas u otras.
- ✓ Sueros problemas inactivados 30’ a 56 °C; Suero positivo inactivado 30’ a 56°C, Solución fisiológica o Solución Salina Balanceada (SSB); Solución Alsever; Solución de dextrosa gelatina veronal (DGV).
- ✓ Jeringas descartables de 20 o 50 ml estériles. Agujas calibre 12 o 16.

MÉTODO:

A) Obtención de Glóbulos Rojos

1. Obtener glóbulos rojos (GR) Humanos o animales (pollos, gansos, ovejas, etc.) por punción venosa, empleando una jeringa estéril que contenga Alsever (cantidad adecuada según el origen de los GR).
2. Desinfectar el lugar de trabajo.
3. Desinfectar la zona de punción con alcohol iodado y luego con alcohol.
4. Punzar la vena elegida hasta completar el volumen necesario para obtener GR al 50%, homogeneizar bien para evitar coagulación.

B) Lavado de GR y preparación de la suspensión a usar.

1. Lavar los GR tres veces con DGV procediendo de la siguiente manera:
 - a) Centrifugar la sangre obtenida a 2500 rpm durante 10 minutos.

- b) Eliminar cuidadosamente el sobrenadante y agregar igual volumen de DGV (evitar hacer espuma) y volver a centrifugar a 2500 rpm por 10 minutos. Observar si el sobrenadante presenta restos de hemólisis o turbidez.
- c) Repetir el procedimiento hasta obtener un sobrenadante límpido.

2. Preparar la solución madre de GR:

Resuspender el sedimento de GR lavados para obtener una suspensión de concentración 1/10 en solución buffer.

3. Preparar solución de trabajo de GR 0,5% en solución buffer:

Preparar de acuerdo al número de alumnos por ej:

0,5 ml GR 1/10 + 9,5 ml de buffer + 0,5 de plasma.

REACCIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN (Titulación de antígeno viral)

- a) Suspender el antígeno (Ag) problema en dilución $\frac{1}{4}$.
- b) Numerar los tubos a emplear (aprox. 10 tubos de hemólisis) y disponerlos en una gradilla de alambre con fondo de alambre cuadrículado.
- c) Hacer diluciones seriadas al medio, poniendo 0,5 ml de solución fisiológica o buffer en todos los tubos.
- d) Agregar 0,5 ml del Ag ($\frac{1}{4}$) en el primer tubo con la pipeta de 1 ml, y con otra pipeta de 1 ml mezclar y pasar 0,5 ml al tubo N° 2, y así sucesivamente hasta el Tubo N° 9. El tubo N° 10 será control de GR. **Tabla 1.**
- e) Colocar 0,5 ml de GR al 0,5% a todos los tubos y agitar la gradilla completa suavemente por unos segundos.
- f) Dejar en reposo a temperatura ambiente entre 45 y 60 minutos.
- g) Observar el tubo N°10 (Control de GR) desde la parte inferior cada 5 minutos a partir de los 40' y hasta observar sedimentación completa (botón de GR en el fondo del tubo).

Tabla 1. Titulación del antígeno viral

Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Solución fisiológica	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Ag 1/4	0,5									
Pasar		0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	eliminar
GR 5%	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Recíproco de la dilución	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	Control GR
Lectura ejemplo	+	+	+	+	0	0	0	0	0	0

- Al realizar las diluciones mezclar bien (aproximadamente 6 veces) antes de pasar al tubo siguiente. Cambiar de pipeta en cada dilución.
- **Positivo (+):** Observar 1 capa delgada de GR en el fondo del tubo con bordes irregulares, que a veces trepa algo por las paredes y sin botón en el centro.
- Negativo (0): Aspecto igual al control de GR.
- Título del Antígeno viral (Ag): por ej. 1/64.
- 1 unidad hemaglutinante (UHA) está contenida en 0,5 ml de la suspensión viral diluida 1/64.

REACCIÓN DE INHIBICIÓN DE HEMAGLUTINACIÓN (Titulación de Anticuerpos).

- a) Preparar una gradilla con 12 tubos de hemólisis estériles numerados.
- b) Colocar 0,25 ml de solución fisiológica o buffer en todos los tubos menos en el tubo N° 1. **Tabla 2.**

*Cátedra de Virología
Carrera de Bioquímica*

c) Preparación del antígeno viral: Debe contener 4 unidades hemaglutinantes en 0,25 ml. Para ello emplear una suspensión viral 8 veces más concentrada que el título obtenido. Ej: Si el título de la suspensión es 1/64, diluir la suspensión madre 1/8, pero como ya se tiene una dilución madre 1/4, diluirlo 1/2.

d) Diluir el suero problema 1/5. Para ello, poner 0,25 ml de solución fisiológica o buffer en todos los tubos excepto en el 1°.

e) Poner 0,25 ml de suero 1/5 en los tubos 1 y 2, y pasar 0,25 ml del 2° al 3° tubo previamente bien mezclado con la pipeta de 1 ml, tomando el recaudo de no hacer espuma. Hacer lo mismo con los otros tubos hasta el N°8 inclusive y eliminar los 0,5 ml.

f) Agregar 0,25 ml del Ag viral (4 UHA) a todos los tubos excepto los tubos N°9, 10 y 11.

g) Agitar la gradilla. Dejar 10 minutos a temperatura ambiente (20° -25 °C).

h) Agregar 0,5 ml de GR (0,5%) a todos los tubos.

i) **Tubos Controles**

* **Tubo N° 9:** control de suero problema (inactivado 30 min. a 56°C).

Poner 0,25 ml de solución fisiológica + 0,25 ml de suero + 0,5 ml GR 0,5%.

* **Tubo N°10:** control de suero positivo (inactivado 30 min. a 56°C).

Poner 0,25 ml de solución fisiológica + 0,25 ml de suero + 0,5 ml de GR 0,5%.

* **Tubo N° 11:** control de GR 0,5%.

Poner 0,5 ml de solución fisiológica + 0,5 ml de GR 0,5%.

* **Tubo N° 12:** control de Ag viral.

Poner 0,25 ml de solución fisiológica + 0,25 ml Ag viral + 0,25 ml GR 0,5%

Tabla 2. Titulación de anticuerpos

									Controles			
									Suero paciente	Suero (+)	GR	Ag viral
Tubos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Solución fisiológica	---	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
Suero del paciente 1/5	0,25	0,25							0,25	0,25		
Pasar del	----	-----	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25 ⇒ eliminar	-----	-----	-----
Ag viral 1/4	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	-----	-----	-----	0,25
Agitar. Y dejar 10 minutos a temperatura ambiente 20-25°C.												
GR al 0,5%	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Recíproco de la dilución	5	10	20	40	80	160	320	640	-----	-----	-----	-----
Lectura Ej.	0	0	0	M	M	M	M	M	0	0	0	M

BIBLIOGRAFÍA

Virología Médica. Carballal G, Oubiña J. Ed. Corpus. Buenos Aires. 2014.

TRABAJO PRÁCTICO N° 5

TEMA: Hepatitis virales

INTRODUCCIÓN

Diversos agentes infecciosos – como los hongos, protozoarios, bacterias y virus – pueden afectar al hepatocito y por ende, la función hepática.

Los virus reconocidamente hepatotropos más importantes son: virus de hepatitis A (VHA), virus de hepatitis B (VHB), virus de hepatitis C (VHC), virus de hepatitis D (VHD) y virus de hepatitis E (VHE).

También debe mencionarse el virus de Epstein Barr (EBV) y el Citomegalovirus (CMV), en la producción de un cuadro clínico de hepatitis, como así también el virus Herpes Simplex (HSV), sobre todo en neonatos.

VIRUS DE HEPATITIS A (VHA)

La hepatitis por virus A es endémica en todo el mundo, y una de las características de la enfermedad es su presentación en forma de epidemia o brotes aislados.

La principal vía de transmisión es la fecal-oral, y por lo tanto, su epidemiología está relacionada directamente con las condiciones higiénico-sanitarias de la población. El ciclo ano-mano-boca es el principal involucrado, así como también el contacto persona a persona, de manera que el hacinamiento y reuniones de personas, facilitan su propagación.

La hepatitis por virus A es una infección entérica y su diseminación se debe a la excreción de virus en materia fecal por el individuo infectado en la última etapa del período de incubación. Esta virocupria tiene su máxima expresión entre 5 a 10 días de la aparición de síntomas clínicos de enfermedad, y se extiende hasta 5-7 días luego de la aparición de la ictericia o elevación del nivel de actividad de transaminasas.

Diagnóstico:

Puede hacerse por métodos directos o indirectos; el primero basado en la detección del virus en materia fecal, y el segundo en la detección de los anticuerpos específicos contra el virus originados en la respuesta inmune humoral del individuo infectado.

Se puede detectar una infección en la etapa aguda mediante la detección de anticuerpos de clase IgM específicos. Las técnicas más utilizadas son Quimioluminiscencia y variantes de Inmunoensayos.

A los quince o veinte días del inicio del cuadro clínico comienzan a elevarse también los títulos de anticuerpos de clase IgG (aVHA IgG), que permanecerán detectables prácticamente de por vida, constituyendo la cicatriz inmunológica de la infección.

VIRUS DE HEPATITIS B (VHB)

Es un virus envuelto con ADN parcialmente de doble cadena, de distribución mundial, si bien pueden diferenciarse zonas endémicas de alta, media y alta prevalencia.

La principal vía de transmisión para este virus es la parenteral. La otra vía importante es la sexual, se estima que en un 30% de las hepatitis, ésta es la vía involucrada. También es importante la vía de transmisión perinatal sobre todo en zonas endémicas, donde madres con presencia de HBsAg (antígeno de superficie) y HBeAg (marcador de alta replicación viral) en el momento del parto tienen un 90% de probabilidades de transmitir la infección al neonato (4).

Diagnóstico:

Se basa en la detección de las proteínas virales como el HBsAg y el HBeAg (el HBcAg no sale a circulación), y de los anticuerpos específicos contra estos tres antígenos.

Generalmente el anticuerpo contra el HBcAg (aHBc) de clase IgG, permanece detectable prácticamente de por vida, constituyendo la cicatriz inmunológica de la infección, pero no indica resolución o inmunidad, sólo que hubo infección. Si detectamos el Ac de clase IgM (aHBc IgM), nos indicará una infección reciente. La negativización del HBsAg, constituye la primera evidencia del cese de la replicación viral y posterior

resolución de la infección. Con la aparición del Ac contra este Ag (aHBs), tenemos la certeza de resolución e inmunidad.

Cuando la negativización del HBsAg no se produce luego de un período prolongado de evolución (antes se tomaba como límite 6 meses, ahora se evalúa, además, la sintomatología e imagen histológica), podemos sospechar una hepatitis crónica. En estos pacientes la infección no se resuelve y el virus continúa su replicación.

Es muy importante evaluar mediante la detección de los distintos marcadores, el curso de infección y pronóstico.

El diagnóstico serológico se realiza a través de la determinación de Ags y/o Acs específicos antivirales con pruebas de aglutinación de látex, técnicas de ELISA o quimioluminiscencia, utilizando el principio del sándwich simple o el inmunoensayo competitivo.

VIRUS DE HEPATITIS C (VHC)

El virus de la hepatitis C es un virus ARN de simple cadena y polaridad positiva; posee un tiempo de incubación variable, de 4 a 8 semanas, y la mayoría de los pacientes (75-80%) cursa la etapa aguda con una forma subclínica con moderada elevación de las transaminasas. El porcentaje de evolución a cronicidad es mayor que en la infección por el VHB, 50-75% de los casos. Los datos epidemiológicos, lo relacionan fuertemente al desarrollo de cirrosis y carcinoma hepatocelular.

Diagnóstico:

El diagnóstico serológico se basa en la detección de anticuerpos aVHC en el suero del paciente. Se utiliza distintas técnicas de ensayo inmunoenzimático, que detectan Ac de clase IgG. También se han desarrollado pruebas confirmatorias utilizando la técnica de inmunoblotting, inmovilizando las proteínas virales o péptidos sintéticos en nitrocelulosa o nylon, y detectando los Acs específicos por enzimoensayo (LIA o RIBA).

Puede determinarse la carga viral con técnicas de biología molecular; se utiliza para diagnóstico confirmatorio y como factor pronóstico tanto en la evolución como en la

respuesta al tratamiento. El genotipo define el tratamiento y puede predecir la respuesta al mismo.

VIRUS DE HEPATITIS D (VHD)

Es un virus ARN defectivo, que depende de la replicación del VHB para poder infectar y replicarse. Las vías de infección son las mismas que de VHB. La infección puede producirse simultáneamente con el VHB lo que se denomina coinfección, o bien en un paciente con hepatitis crónica por VHB, produciendo sobreinfección (5).

Diagnóstico:

Coinfección:	aHBcIgM (+) + aVHD (+)
Sobreinfección:	aHBcIgM (-) + aVHD (+)

Puede detectarse el Ag de VHD (VHD Ag) brevemente en la infección aguda. Luego se detectan sucesivamente IgM e IgG. La IgM declina rápidamente en la infección autolimitada, pero persiste en la crónica. La IgG puede permanecer de por vida. La detección de ARN viral se emplea como confirmatoria y la carga viral por qPCR es útil para monitoreo del tratamiento.

VIRUS DE HEPATITIS E (VHE)

El agente etiológico es un virus pequeño, desnudo, con ARN de simple cadena de polaridad positiva, que se transmite de modo fecal-oral, es decir, depende de las condiciones higiénico-sanitarias de la comunidad.

Se ha demostrado transmisión por contacto directo con animales infectados y sus heces, por contaminación ambiental e incluso por ingestión de carne de animales infectados como cerdo, jabalí y venado. Se ha sugerido la posibilidad de transfusión parenteral y hay estudios que demuestran la transmisión vertical (6).

Diagnóstico:

El diagnóstico puede hacerse por detección de IgM e IgG con inmunoensayos. En inmunosuprimidos puede utilizarse la detección de ARN en sangre o materia fecal.

ACTIVIDADES PRÁCTICAS:

Objetivos:

1. Comprender el rol del laboratorio en las hepatitis virales.
2. Utilizar las metodologías para diagnóstico y seguimiento, entendiendo los criterios de control de calidad, en el marco de las recomendaciones científicas y legales.
3. Interpretar resultados de la utilización de las diferentes técnicas en conjunto con la clínica y terapéutica actual.

Desarrollo:

1. Comprensión de las metodologías (2 hs).

Las técnicas a utilizar se detallan en el aula virtual. Elaborar una tabla de doble entrada considerando, para cada metodología, los siguientes ítems: en empleo actualmente, nombre del fundamento técnico, qué detecta, esquema resumido de procedimiento, cómo se informa, cómo se interpreta.

2. Aplicación de técnicas y guías clínicas a situaciones en pacientes (3 hs).

Las guías clínicas actualizadas y las situaciones, se detallan en el aula virtual.

Participación del laboratorio en las hepatitis virales:

1. Diagnóstico

1. VHA IgM, VHA IgG
2. HBsAg, aHBc IgM, aHBc IgG, HBeAg, aHBe, aHBs
3. aVHC

2. Seguimiento, monitoreo de terapia

1. Cuantificación de carga viral plasmática de VHB y VHC: qPCR.
2. Genotipo de VHC.

3. Vigilancia epidemiológica

1. Notificación de eventos

Marcadores y algoritmos de diagnóstico de hepatitis

a- (prefijo): anticuerpos.

Anti- (prefijo): anticuerpos.

Ac: anticuerpos.

Ag: antígeno

aVHA IgM: anticuerpos clase IgM anti VHA.

aVHA IgG: anticuerpos clase IgG anti VHA.

HBsAg: Antígeno de superficie de VHB. Previamente conocido como antígeno australiano. Aparece en etapa aguda y se mantiene detectable en la infección crónica.

aHBs: anticuerpo contra el antígeno de superficie de VHB. Aparece en la convalecencia, indica recuperación clínica e inmunidad.

aHBc: anticuerpo contra antígeno core (central) del VHB. Está presente en la etapa aguda, se mantiene en la cronicidad y en la convalecencia.

aHBc IgM: anticuerpo de clase IgM contra el antígeno del core. Es marcador de infección reciente, presente en la etapa aguda en alto título.

HBeAg: antígeno e. Aparece en etapa aguda. Es un marcador de replicación viral e infectividad.

aHBe: anticuerpo contra el antígeno e. Generalmente indica recuperación clínica y buen pronóstico.

ADN VHB: ácido desoxirribonucleico de VHB. Indica replicación e infectividad.

aVHC IgG: anticuerpos clase IgG contra VHC. Indica exposición a VHC.

ARN VHC: ácido ribonucleico del VHC. Indica replicación e infectividad.

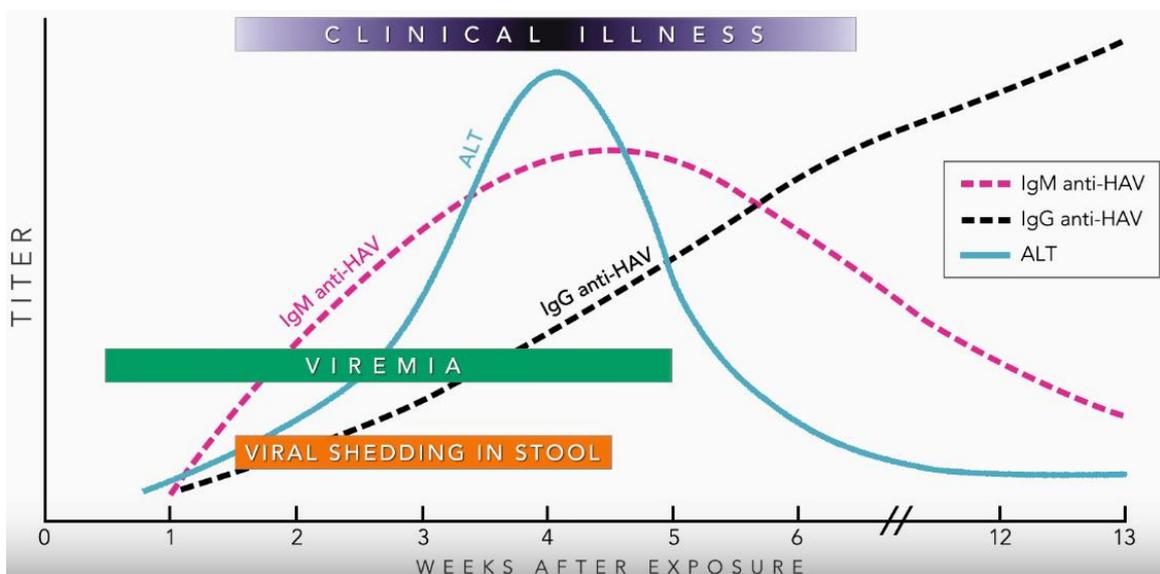
aVHD IgM: anticuerpos clase IgM contra VHD. Presente en etapa aguda. Indica infección actual, aunque puede persistir detectable por meses o años.

aVHD IgG: anticuerpos clase IgG contra VHD. Indica exposición previa, no necesariamente infección actual. Puede persistir detectable por meses o años.

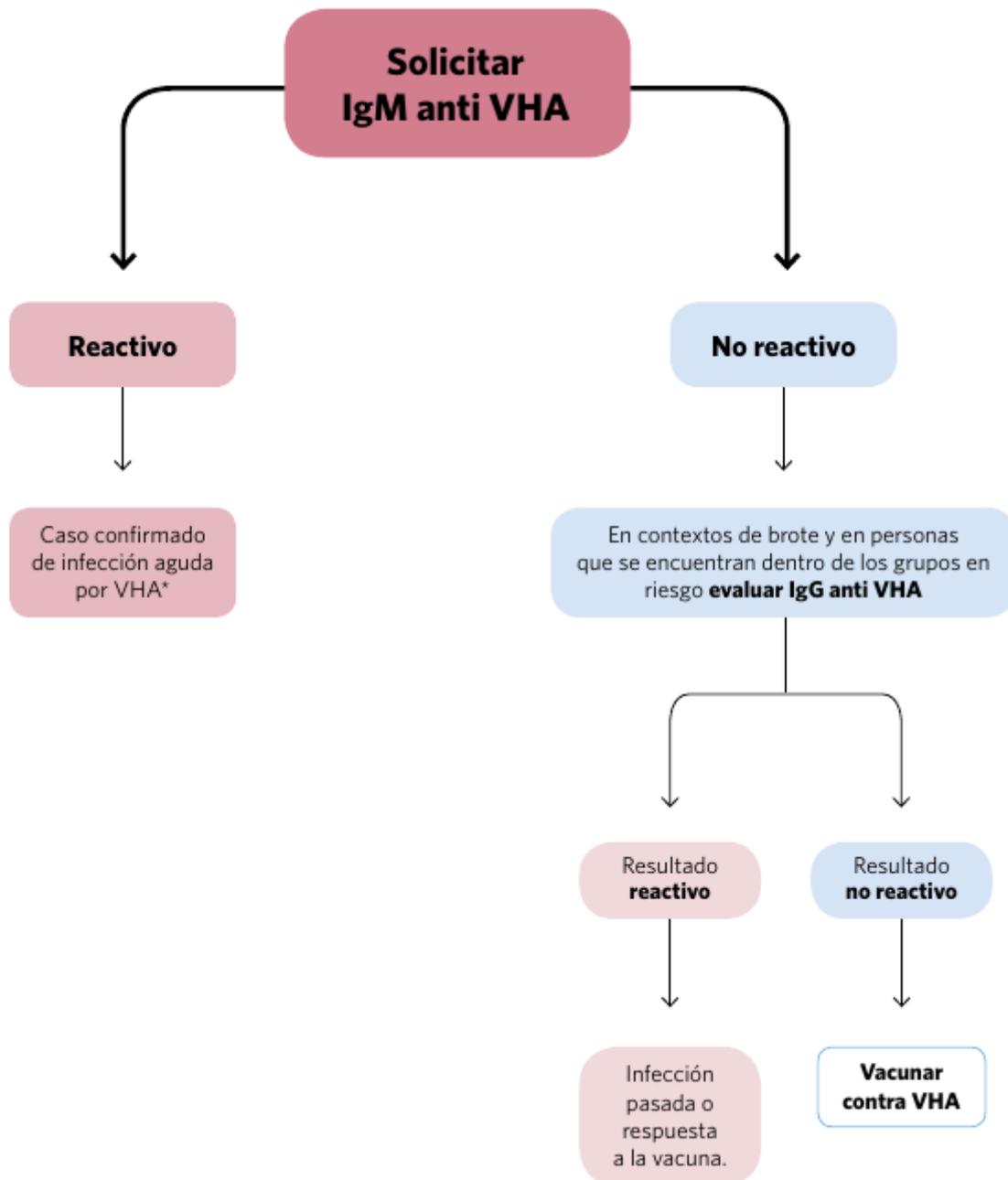
aVHD: anticuerpos totales contra VHD. Indica exposición al virus.

aVHE: anticuerpos totales contra VHE. Indica exposición a VHE.

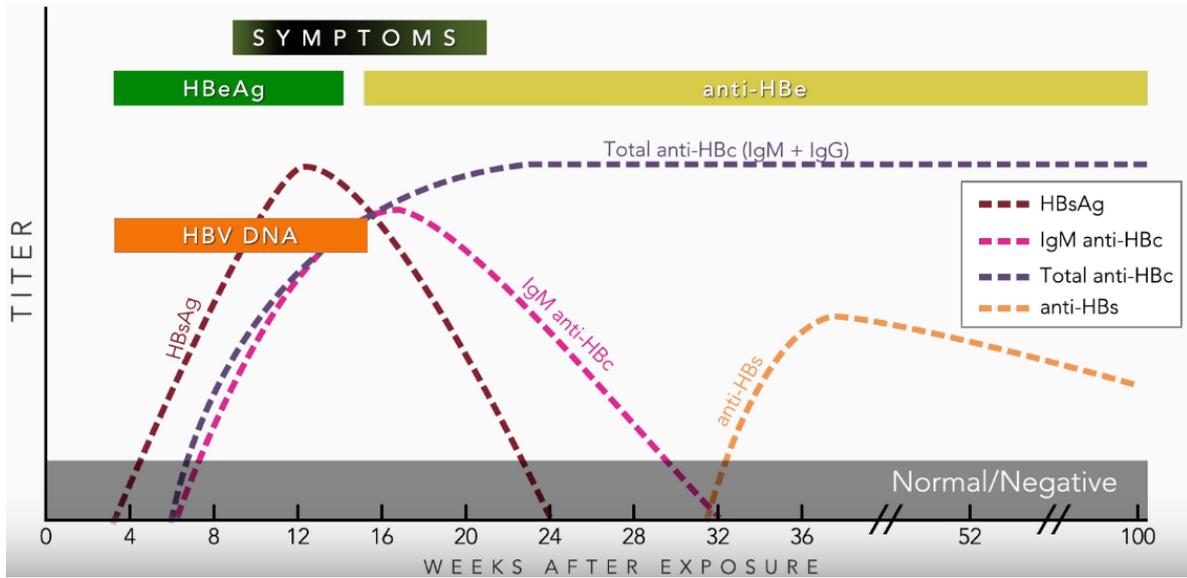
DESARROLLO DE MARCADORES DE INFECCIÓN VIRAL POR VHA (1)



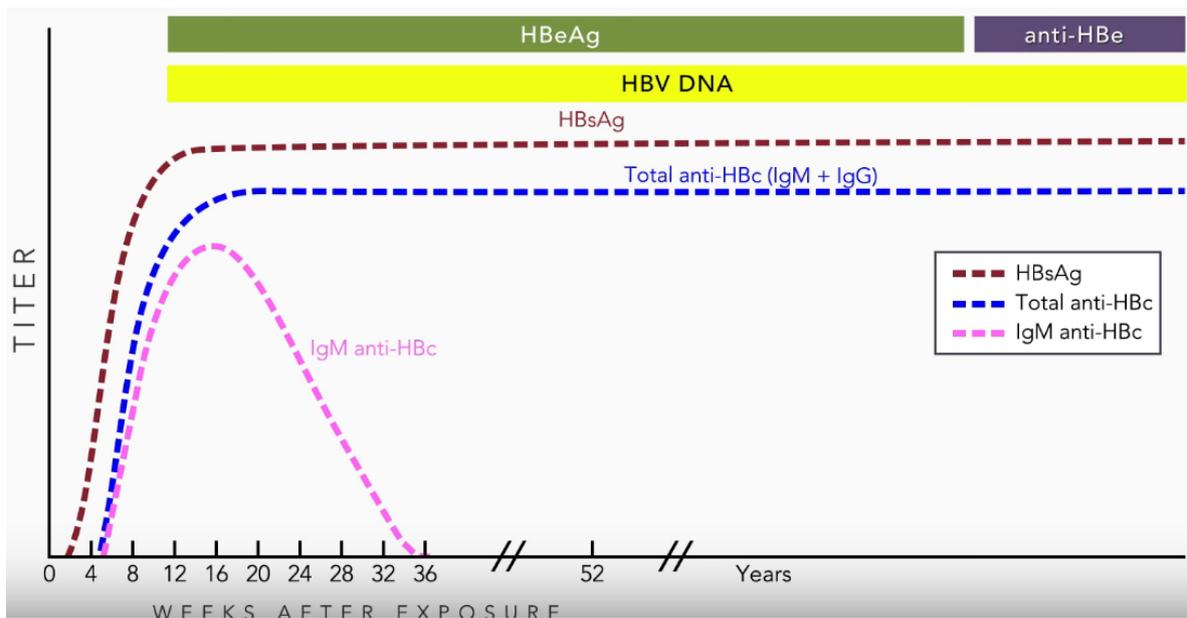
ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO DE VHA (2)



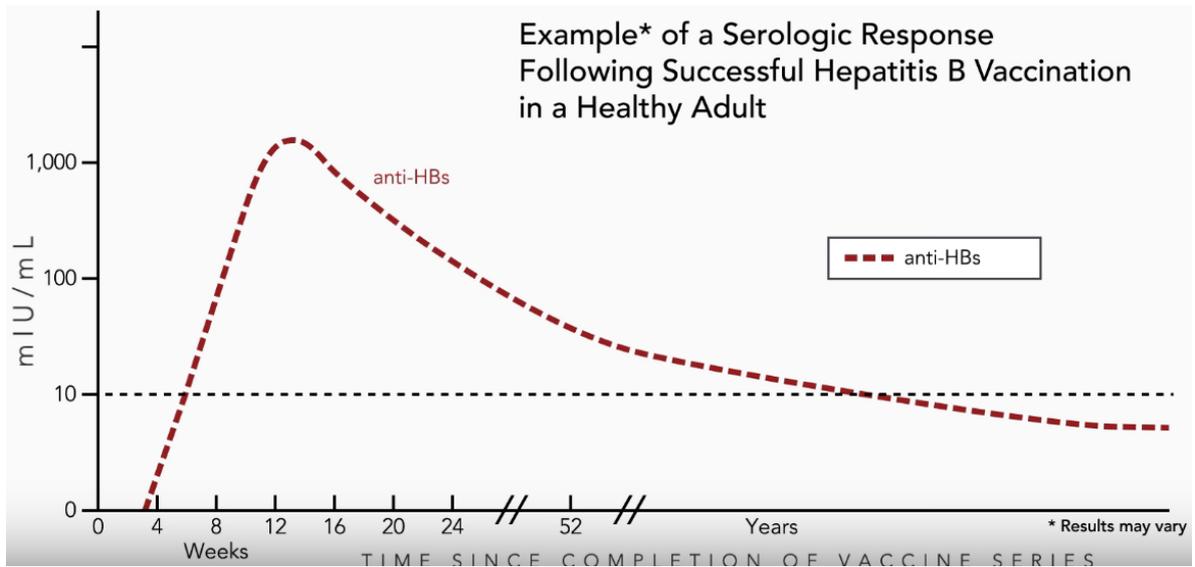
DESARROLLO DE MARCADORES DE INFECCIÓN AGUDA POR VHB (1)



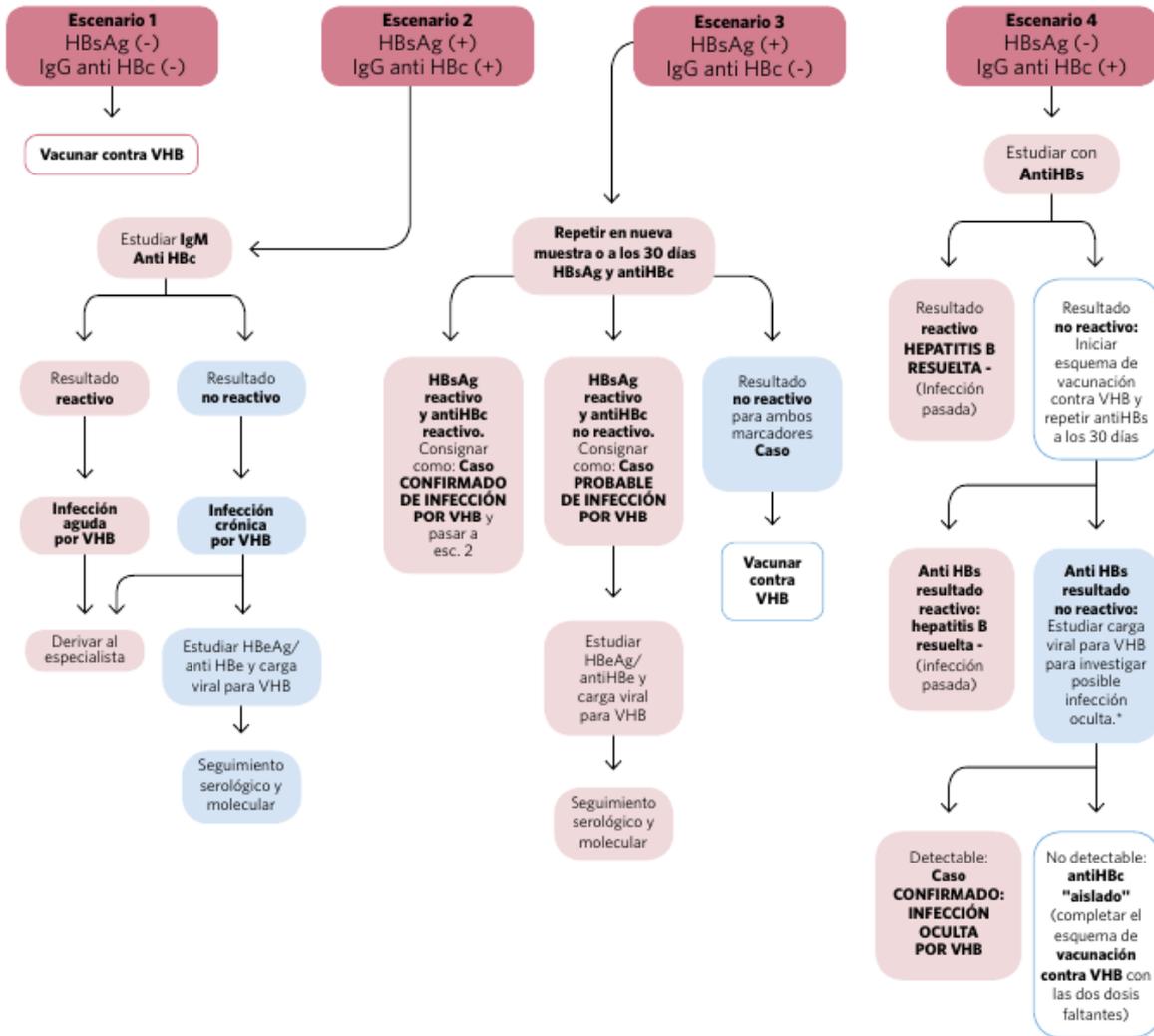
DESARROLLO DE MARCADORES DE INFECCIÓN CRÓNICA POR VHB (1)



DESARROLLO DE MARCADORES DE VHB EN EL PACIENTE VACUNADO (1)



ALGORITMOS DE DIAGNÓSTICO DE VHB (2)



□ **INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS SEROLÓGICOS PARA HEPATITIS B (3)**

Interpretación de los resultados serológicos para hepatitis B		
Marcador	Resultado	Interpretación
HBs Ag Anti core-HB Anti-HBs	No reactivo No reactivo No reactivo	La persona no tiene ni tuvo hepatitis B
HBs Ag Anti-HBc Anti-HBs	No reactivo Reactivo Reactivo	Tiene inmunidad por infección natural a la hepatitis B
HBs Ag Anti core-HB Anti-HBs	No reactivo No reactivo Reactivo	Tiene inmunidad por vacunación contra la hepatitis B
HBs Ag Anti core-HB Anti core-HB IgM Anti- HBs	Reactivo Reactivo Reactivo No reactivo	Infección aguda
HBs Ag Anti core-HB Anti core-HB IgM Anti-HBs	Reactivo Reactivo No reactivo No reactivo	Infección crónica
HBs Ag Anti core-HB Anti-HBs	No reactivo Reactivo No reactivo	Posibles interpretaciones para este resultado: 1. Infección resuelta (lo más frecuente) 2. Falso positivo al anti-HBc (no tiene ni tuvo hepatitis B) 3. Infección crónica oculta 4. Infección aguda en resolución

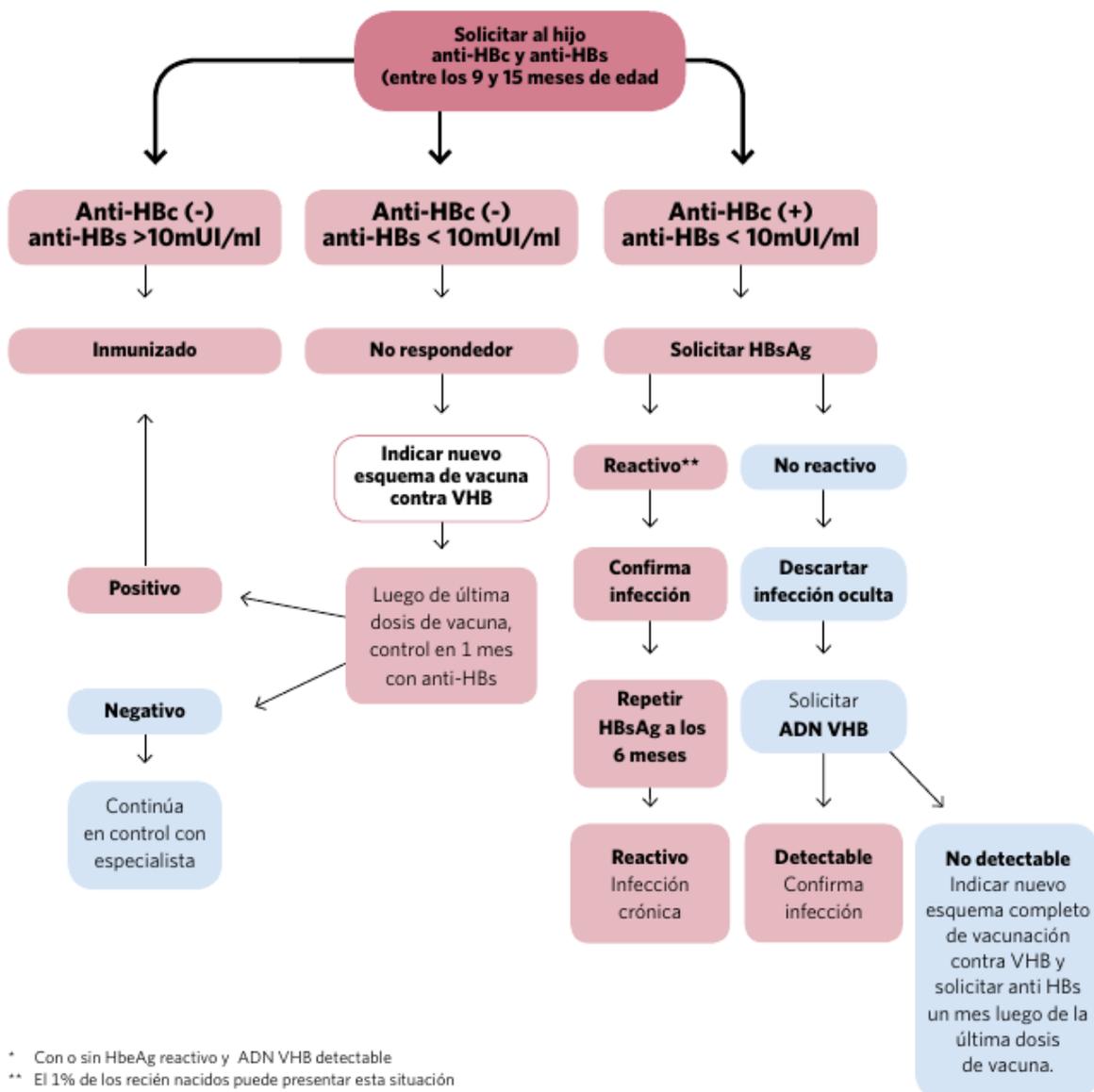
Antígeno de superficie para hepatitis B (HBsAg): se lo utiliza para diagnosticar infección aguda o crónica. La persistencia por más de seis meses indica infección crónica y su desaparición, curación. Cuando este antígeno (Ag) es reactivo, el VHB se puede transmitir de una persona a la otra.

Anticuerpo contra el antígeno de superficie para hepatitis B (anti-HBs): su presencia indica inmunidad para hepatitis B ya sea por exposición natural y curación o por vacunación.

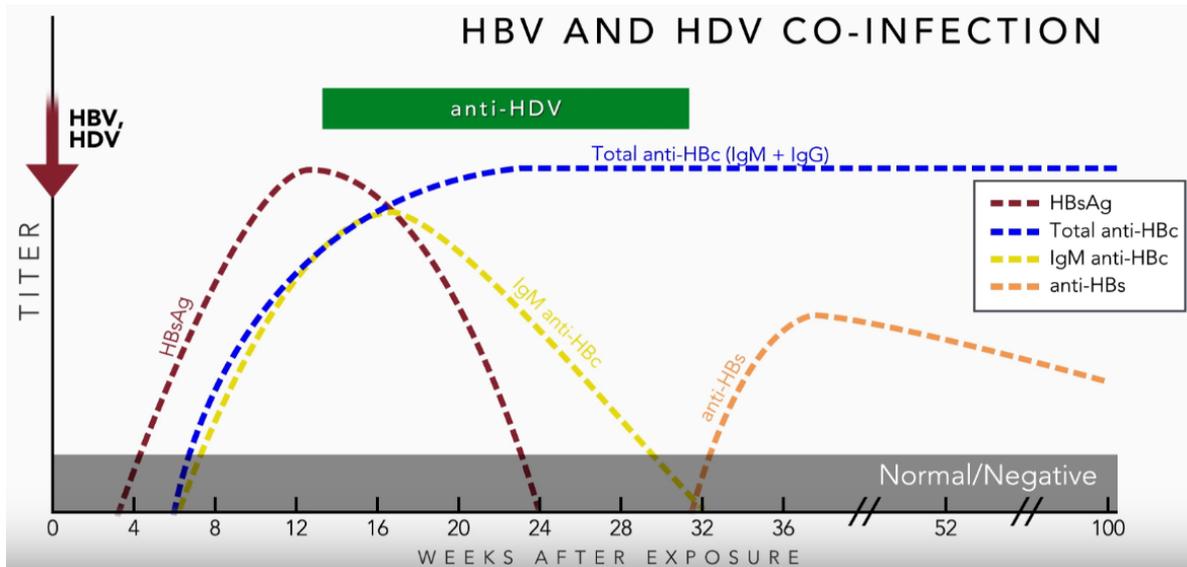
Anticuerpo core para hepatitis B (anti-core HB): indica infección actual o pasada por el virus de la hepatitis B y persiste reactivo de por vida independientemente de la evolución.

Anticuerpo de superficie core IgM para hepatitis B (anti-core HB IgM): indica infección reciente por virus de la hepatitis B. Es detectable durante los primeros seis meses posteriores al contacto inicial con el virus.

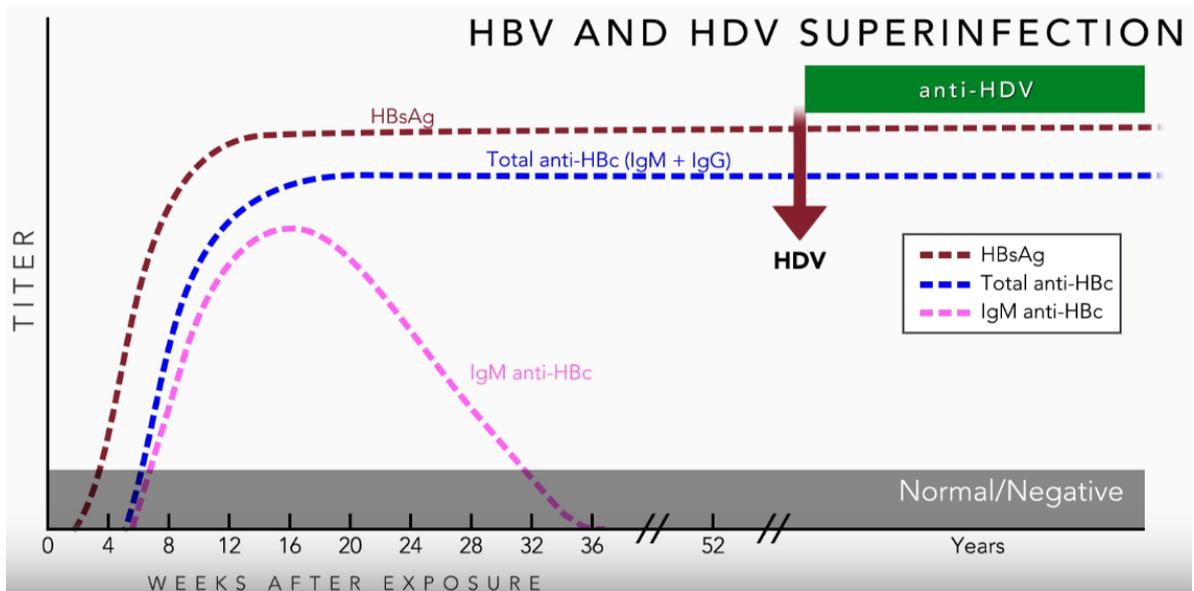
ALGORITMO DE SEGUIMIENTO DE HIJO DE MADRE CON SEROLOGÍA HBsAg POSITIVA (2)



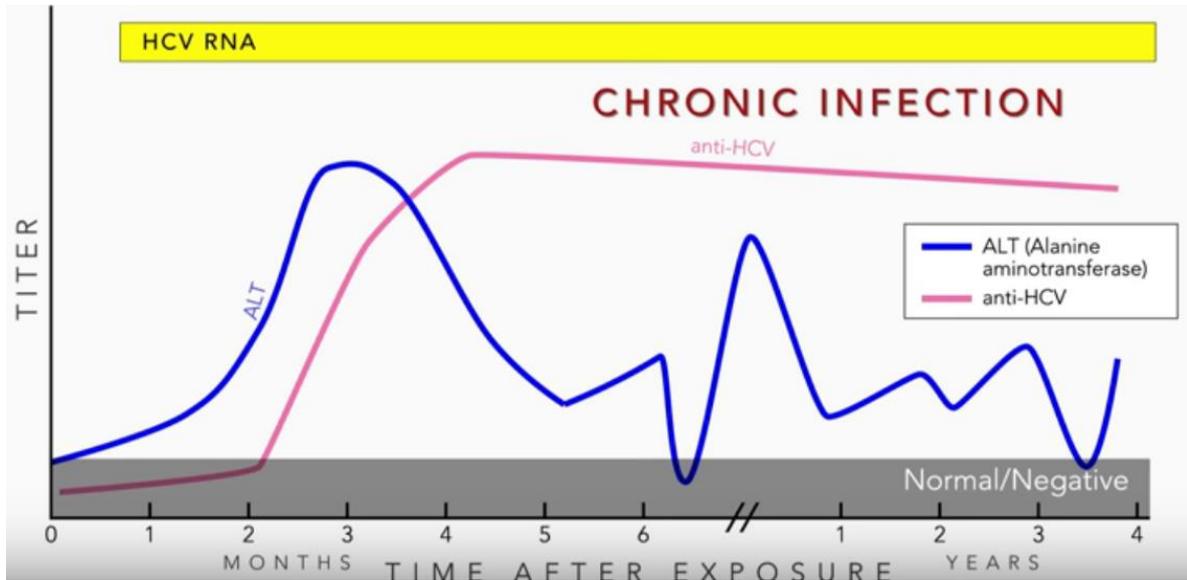
DESARROLLO DE MARCADORES EN LA COINFECCIÓN VHB Y VHD (1)



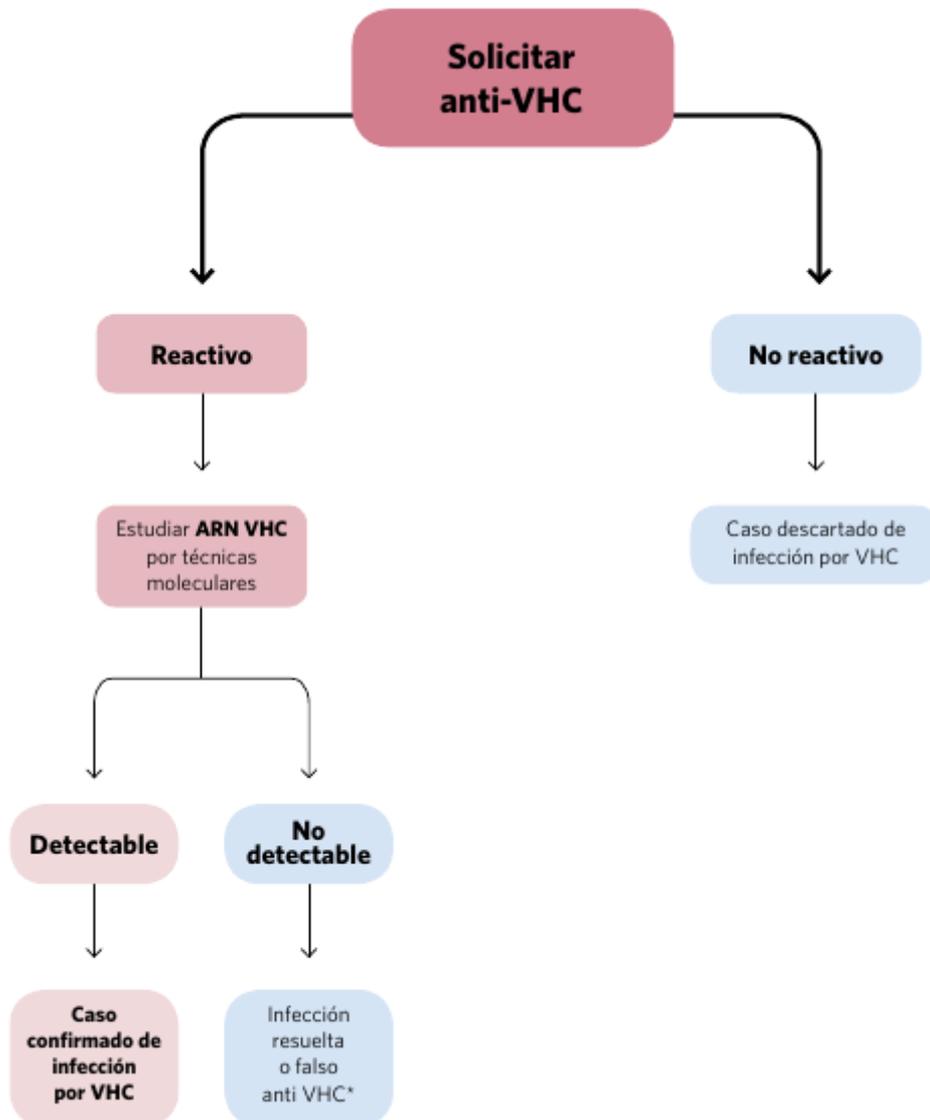
DESARROLLO DE MARCADORES EN LA SOBREENFECCIÓN VHB Y VHD (1)



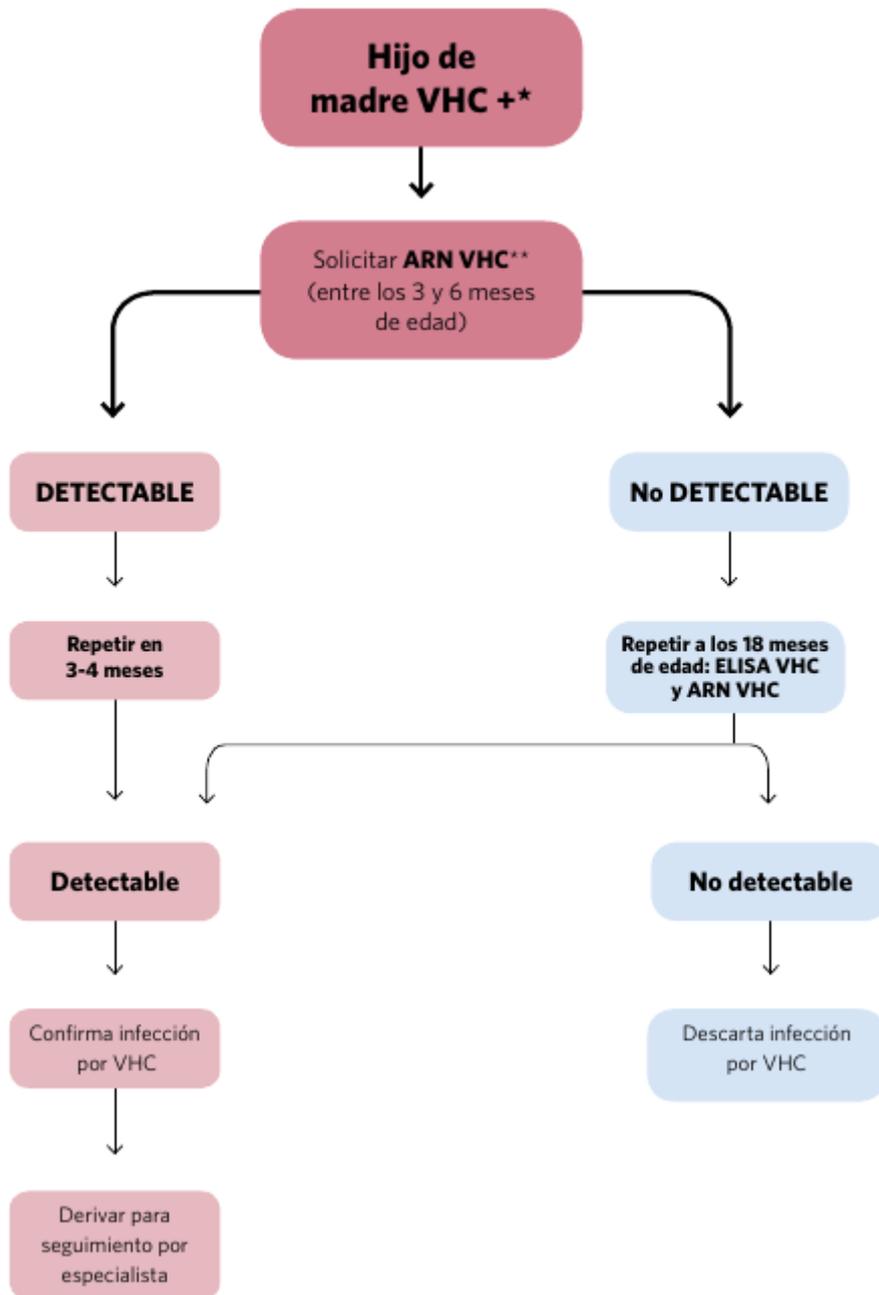
DESARROLLO DE MARCADORES EN LA INFECCIÓN POR VHC (1)



ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO PARA VHC



ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO DE HEPATITIS C EN NIÑOS EXPUESTOS (2)



Vigilancia epidemiológica

Se realiza mediante notificación de casos positivos (nominal y agrupada) en SNVS 2.0 (médico y bioquímico) y notificación de Unidades Centinela (médico, bioquímico y epidemiológico).

BIBLIOGRAFÍA

1. Centers for Disease Control and Prevention. Viral Hepatitis Serology Training [Internet]. serol. 2015 [citado 3 de noviembre de 2018]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/hepatitis/resources/professionals/training/serology/training.htm>
2. Angeleri P, Coronel E, Solari J, Vidiella G, Vulcano S, Bruno M, et al. Hepatitis virales. Guía para los equipos de salud. 2016.
3. Bruno M, Vulcano S, Gaiano A, Kaynar V, Levite V. Prevención de la transmisión perinatal de sífilis, hepatitis B y VIH. Recomendaciones para el trabajo de los equipos de salud. 2016; 86. Disponible en: http://www.msal.gob.ar/images/stories/bes/graficos/0000000853cnt-2016-07_guia-transmission-perinatal.pdf
4. Angeleri P, Pando M, Solari J, Vidiella G. Las hepatitis virales en la Argentina. Ministerio de Salud de la Nación. 2016.
5. Virología Médica. Carballal G, Oubiña JR. 4ta Ed. Editorial Corpus. 2015.
6. Prasadhrathsint K, Stapleton J. Laboratory diagnosis and monitoring of viral hepatitis. Gastroenterol Clin N Am. 2019. Jun; 48(2): 259-279.

TRABAJO PRACTICO N° 6

TEMA: Cultivo de células animales

INTRODUCCIÓN

El cultivo de tejidos animales se inició a comienzos de este siglo (Harrison, 1907, Carrel, 1912), y como su nombre lo indica se basaba en la utilización de fragmentos de tejidos sin disgregar, por lo cual el crecimiento estaba limitado a la periferia de tales fragmentos.

Fue a partir de los años 50 que esta metodología fue desplazada por una explosión en la expansión de los cultivos que utilizan células dispersadas, no obstante, el término “**cultivo de tejidos**” sigue utilizándose como el nombre genérico para todas estas técnicas.

Si bien el cultivo de tejidos se inició con tejidos provenientes de animales de sangre fría, posteriormente hubo un gran estímulo a través de las ciencias médicas en el desarrollo de cultivos a partir de animales de sangre caliente, en los cuales el desarrollo normal y patológico es similar al del hombre.

TIPOS DE CULTIVOS CELULARES

Existen dos tipos básicos de cultivos celulares: los **cultivos primarios** y las **líneas celulares**. Cultivo primario es el primer cultivo *in vitro* de células tomadas directamente del organismo, mientras que la línea celular es un subcultivo del cultivo primario.

Los cultivos primarios conservan el número diploide característico del organismo que le dio origen. Con los sucesivos pasajes se van acumulando alteraciones (mutaciones genéticas) dando un amplio espectro de variaciones celulares tanto genéticas como morfológicas. Cualquier cambio que involucre al complemento cromosómico completo (poliploidía) o a cromosomas individuales (aneuploidía) se denomina heteroploidía.

Comparando el cariotipo primario con el de la línea celular continua, se puede observar que esta última presenta en general un alto grado de aneuploidía.

En la bibliografía se pueden encontrar distintas denominaciones y clasificaciones para los cultivos celulares. Hayflick y Moorhead en 1961, denominaron a los cultivos como primarios, cepas y líneas celulares.

Los **cultivos primarios** son aquellos obtenidos directamente de órganos o tejidos; son diploides e iguales morfológicamente a las células que les dieron origen, conteniendo usualmente una variedad de tipos celulares distintos que reflejan la estructura celular del órgano que les dio origen.

Cepa es aquel cultivo, derivado de uno primario que por sucesivos pasajes permite la selección de un único tipo celular, mantiene la diploidía inicial y presenta alteraciones a nivel genómico que no pueden observarse en el cariotipo sino fisiológicamente.

La **línea celular** derivada de la cepa es heteroploide y presenta una morfología particular, ya sea de tipo epitelial o tipo fibroblástica, según el tejido que le dio origen.

Actualmente se considera que el cultivo recién establecido se denomina **primario**, que es de vida corta y generalmente se pierde en los primeros pasajes. Si el cultivo logra establecerse da origen a una **línea celular continua**, todavía diploide, que puede mantenerse por un número limitado de pasajes (alrededor de 50). Superada esta etapa, se logra una **línea celular continua establecida**, que pierde la diploidía inicial y teóricamente puede mantenerse indefinidamente.

MEDIOS DE CULTIVO

Los medios pueden ser puramente biológicos (extractos embrionarios), semisintéticos (medios sintéticos más suero o albúmina), o absolutamente sintéticos.

Un medio de cultivo debe poseer todos los nutrientes esenciales balanceados cuantitativamente. Se incluye toda la materia prima necesaria para la síntesis de macromoléculas, sustrato para el metabolismo, vitaminas y trazas minerales y una cantidad de iones inorgánicos con funciones catalíticas y fisiológicas.

Los medios de cultivo comúnmente usados tienen una mezcla definida de nutrientes de bajo peso molecular disueltos en una solución salina balanceada. Se denomina nutriente a una sustancia que interviene como sustrato en la biosíntesis.

Los factores que deben considerarse en la preparación de un medio son:

1. Presión osmótica: La presión normal para células de mamífero es 7,6 atm; en general no afecta a las células una variación del 10%. La mayor contribución es del ClNa, sin embargo, también es importante controlar la glucosa y los iones. Las proteínas tienen poco efecto y su concentración puede tener grandes variaciones.

2. pH: El óptimo es 7,2 - 7,8, aunque muchas células toleran un rango de 6,8 - 7,8 (las linfoides son muy sensibles a la alcalinidad). El medio debe contener un buffer para mantener el pH adecuado.

✓ **Buffers:** Bicarbonato/CO₂: el más usado, aunque su capacidad buffer está por debajo del pH óptimo. Este sistema se utiliza frecuentemente aunque en cultivo presenta el problema de que el CO₂ se pierde fácilmente desde el medio, por lo que debe ser suministrado de fuentes externas, ya sea manteniendo una presión parcial mayor que la habitual en la atmósfera (5%), o bien gaseando el medio de cultivo con burbujas de CO₂.

✓ **Hepes:** No se encontró toxicidad para ningún tipo de células, su capacidad buffer está en el rango óptimo.

✓ **Otros:** Tris, glicil-glicina, bases libres de aminoácidos.

Para controlar el pH, se utiliza como indicador el rojo fenol, que tiene color amarillo a pH ácido y vira al rojo cuando aumenta la alcalinidad.

3. Fuente de Energía: está dada por la glucosa, también se utilizan otros azúcares o compuestos simples, piruvato o lactato.

4. Iones Inorgánicos: Intervienen en diversos procesos: Na⁺, K⁺, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Cl⁻, PO₄³⁻, CO₃²⁻.

✓ Regulación de la presión osmótica (Na⁺, K⁺).

✓ Regulación del pH (CO₃²⁻, PO₄³⁻).

✓ Actividades metabólicas y enzimáticas (Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, PO₄³⁻).

✓ Adhesión y esparcimiento de las células en el recipiente (Ca⁺⁺, Mg⁺⁺).

5. Gases: Oxígeno, Dióxido de carbono.

6. Temperatura: Cada cultivo celular tiene un rango de temperatura óptimo para su desarrollo. Generalmente las células de animales de sangre caliente se cultivan a 37°C.

7. Humedad: Considerando que es importante el rápido equilibrio entre el medio de cultivo y la fase gaseosa aire-CO₂, los frascos de cultivo no se cierran herméticamente, por lo que hay que prevenir la evaporación para no variar la osmolaridad deseada. Se puede mantener la cámara de incubación con una humedad relativa cercana a la saturación, utilizando agua a la misma temperatura.

Los elementos mencionados constituyen soluciones salinas balanceadas, son la base de medios más complejos y se utilizan para transporte, procesamiento y lavado de células. Las más comunes son Hanks y Earle.

Los medios de mantenimiento y crecimientos adicionan **nutrientes esenciales:**

1. Aminoácidos: Se requieren para la síntesis de proteínas y de ácidos nucleicos, e incluso pueden actuar en el transporte de iones. Por la ausencia de ciertas enzimas, las células en cultivo no pueden producir todos los aminoácidos necesarios. *In vitro*, son trece los aminoácidos considerados esenciales que no pueden ser producidos por la propia célula. Ciertas células tienen un alto requerimiento de glutamina principalmente las transformadas.

2. Vitaminas: Se requieren principalmente las del grupo B, muchas actúan como coenzimas.

3. Sueros: Numerosos tipos de suero (humano, equino, bovino, etc.) han sido usados como complementos efectivos de los medios de cultivo para promover el crecimiento celular.

La razón de su eficacia es que posee una gran cantidad de componentes con diferentes actividades promotoras del crecimiento. El suero completo posee la mayoría de los nutrientes necesarios para la división celular.

El más usado es el bovino (fetal, de recién nacido o adulto); como puede contener sustancias que interfieren con el crecimiento celular o su uso posterior, se prefiere el de animales pequeños. El suero de animales jóvenes es más efectivo que el de adultos y el suero fetal usualmente es el preferido por carecer de actividad tóxica y de anticuerpos que puedan afectar el uso de los cultivos en experimentación viral. Debe estar controlado para bacterias, hongos, virus, y micoplasmas.

Su concentración puede utilizarse para regular el crecimiento del cultivo.

El **medio de mantenimiento** es usado para cultivar células con su metabolismo en estado basal por largos períodos de tiempo, varios días o aún semanas. Se utiliza el mismo MEM (medio esencial mínimo), con el agregado de concentraciones bajas de suero (2%).

El **medio de crecimiento** es más rico, ya que se usa para activar el ciclo celular a través de la mitosis, incrementándose así el número de células. La concentración de suero puede aumentarse hasta un 10 %.

4. Otros: Hidrolizado de lactoalbúmina, caldo triptosa fosfato, plasma, extractos tisulares.

AGUA:

La calidad del agua es de fundamental importancia en la preparación de todos los reactivos a utilizar. Debe ser desionizada, destilada y esterilizada.

Se usan intercambiadores iónicos que se controlan para verificar ausencia de bacterias y destiladores de vidrio para remover pirógenos y levaduras. Es recomendable el uso de vidrio de borosilicato y goma de siliconas para procesamiento y envase. No debe almacenarse en grandes recipientes porque se contamina fácilmente con *Pseudomonas* sp.

ANTIBIÓTICOS:

Combinados con buenas técnicas de esterilidad ayudan a prevenir contaminaciones.

La gentamicina ofrece ventajas sobre otros antibióticos, especialmente por su actividad sobre algunas especies de Micoplasmas y Pseudomonas, su estabilidad a pH 2 - 10 a 37°C hasta 15 días, y no interfiere con el crecimiento de RNA y DNA virus.

AGENTES DISPERSANTES:

1. Enzimas:

✓ **Tripsina:** es la más utilizada para subcultivos, sola o con agentes quelantes (EDTA), también se usa en cultivos primarios. Proviene de páncreas porcino o bovino y puede ser fuente de contaminación con Micoplasma. Es inactivada por el suero.

✓ **Pronasa:** es muy efectiva en células diploides y primarias, pero no en líneas continuas. No es inactivada por el suero.

✓ **Colagenasa:** actúa sobre el colágeno, causa el menor daño en las células. Se utiliza preferentemente para clonado donde se requiere alta eficiencia de plaqueo.

2. Quelantes:

✓ **Versene (EDTA):** facilita la dispersión quelando los cationes divalentes que estabilizan los puentes intercelulares.

APLICACIONES DE LOS CULTIVOS CELULARES

✓ Posibilitan el estudio de las funciones celulares, tales como: síntesis de proteínas, flujo intracelular de hormonas, enzimas, regulación metabólica, transcripción de DNA, etc.

✓ Evaluaciones toxicológicas: acción de drogas, fármacos, cosméticos, pesticidas, alimentos, detergentes, etc.

✓ Detección de la actividad infecciosa de virus, rickettsias y clamidias, en materiales clínicos.

✓ Preparación de lotes de virus

✓ Preparación de antígenos solubles para ELISA, FC.

✓ Preparación de improntas con células infectadas para detección de anticuerpos específicos en sueros de pacientes.

MANTENIMIENTO DE CÉLULAS EN CULTIVO

Las líneas celulares de **células dependientes de anclaje** son mantenidos en frascos de vidrio o plástico, o en suspensión.

Un cultivo celular, tanto si es un cultivo primario, como una línea celular continua, necesita cambios periódicos de medio y en determinado momento es necesario realizar un subcultivo de las células que proliferan. La frecuencia de repique depende de cada línea celular, la tasa de crecimiento y del metabolismo, también de los medios utilizados, de la temperatura de incubación, etc.

Los cultivos pueden mantenerse casi confluentes disminuyendo el metabolismo celular, sin repicar, cambiando el medio por otro con menos suero o disminuyendo la temperatura por debajo de la óptima. Con este procedimiento se evita la manipulación excesiva del cultivo y el aumento innecesario de números de pasaje.

SUBCULTIVO DE CÉLULAS EN MONOCAPA:

El término subcultivo es sinónimo de pasaje o repique, implica remoción del medio de cultivo y disociación de las células con enzimas o por medios mecánicos, dilución en la cantidad apropiada de medio fresco y traspaso a nuevos recipientes.

Se desprende la monocapa de su soporte con tripsina y se siembra en recipientes de mayor superficie con el objetivo de amplificar la línea.

ACTIVIDAD PRÁCTICA:

Materiales:

- ✓ Monocapa de células
- ✓ Botellas plásticas o de vidrios
- ✓ Pipetas de 5 ml (3)
- ✓ Tripsina-EDTA, o Tripsina 0,25 %
- ✓ Medio de crecimiento (MEM Eagle con 10 %)

Procedimiento:

1. Observar al microscopio el cultivo que se va a repicar para ver si la monocapa es continua uniforme, de morfología normal, etc.
2. Descartar el medio.
3. Utilizando una única pipeta de 5ml, agregar 1; 1 y 2 ml de Tripsina-EDTA.
4. Esperar un minuto; descartar la mayor parte de la solución de tripsina dejando un residuo. Esperar unos minutos más, o poner el frasco a 37°C hasta observar indicios de desprendimiento celular.
5. Resuspender con 5 ml de medio de crecimiento y trasvasar al recipiente de cultivo 1 ml de medio (todo con una pipeta de 5 ml).
6. Diluir a la concentración deseada de células con medio de crecimiento.
7. Rotular: línea, número de pasaje, fecha.
8. Incubar a 37°C.

CONSERVACION DE CÉLULAS POR CONGELACIÓN

En la congelación de células se usan crioprotectores (glicerina o dimetilsulfóxido), sustancias que tienen la capacidad de ligar moléculas de agua y difundir a través de la membrana celular, disminuyendo la formación de cristales de agua y el consiguiente aumento de la concentración salina. Éstos, además son de relativa baja citotoxicidad. Se usan en concentraciones finales que oscilan entre el 5 y el 15 %.

Materiales:

- ✓ Monocapa de células
- ✓ Medio de congelación: MEM 60%, SFB 30%, DMSO 10%
- ✓ Tripsina 0,25%
- ✓ Medio de crecimiento (MC)
- ✓ Criotubos, rieles para criotubos
- ✓ Pipetas estériles (1 y 5 ml)

- ✓ Tubos de hemólisis o tubos de centrifuga estériles con tapón de goma

Procedimiento:

1. Selección de las monocapas a congelar por observación al microscopio invertido.

Las células que se van a congelar deben cumplir ciertos requisitos:

- a. Estar en fase logarítmica de crecimiento (24 - 48 hs de repicadas).
 - b. Presentar una buena morfología.
 - c. Estar libres de contaminación.
2. Tripsinización de la monocapa de células.
 - a. Descartar el medio de la botella.
 - b. Agregar 1, 1 y 2 ml de Tripsina 0,25% precalentada a temperatura ambiente, pipeteando sobre la pared opuesta a aquella donde está adherida la monocapa celular, a fin de no dañar las células.
 - c. Colocar la botella a 37°C hasta desprendimiento de las células.
 - d. Resuspender en 5 ml de MC para disgregación de las células y eliminación de la tripsina (tomar una alícuota 50 o 100 μ l para el recuento de células). Agregar 5 ml de MC y homogeneizar por pipeteo.
 3. Recuento de células viables.
 - a. Limpiar cuidadosamente la cámara de Neubauer y cubreobjetos con etanol 70%, humedecer los bordes de apoyo y colocar el cubre apretando hasta obtener anillos de Newton.
 - b. Mezclar 50 μ l de la suspensión celular con 50 μ l de Azul Tripán 1%. Dejar 5 minutos a temperatura ambiente (factor de dilución: 2).
 - c. Cargar la cámara de Neubauer y contar las células viables (CV) y no viables en los cuadrantes de blancos y se saca un promedio (deben contarse entre 50 y 100 células por dilución).

*Cátedra de Virología
Carrera de Bioquímica*

Cálculos:

Área de la cámara: 9 mm^2

Profundidad de la cámara: 0,1 mm

$1 \text{ ml} = 1 \text{ cm}^3 = 1000 \text{ mm}^3$, 1 factor de conversión para el cálculo de concentración de células/ml será 10.000.

Promedio de CV x dilución (2) x 10.000 = N° de CV/ml de suspensión original

- 4.** Lavado de las células y obtención del pellet celular:
 - a. Las células resuspendidas en MC se dividen en dos tubos de hemólisis (5 y 5 ml).
 - b. Centrifugar 5 min. a 400 rpm.
 - c. Se descarta el medio de crecimiento (volcando directamente). Evitar la resuspensión del pellet de células.

- 5.** Agregado del medio de congelación:
 - a. Agregar el medio de congelación (cantidad necesaria) y resuspender las células.

- 6.** Preparación de las ampollas o criotubos:
 - a. Distribuir ml por cada ampolla conteniendo de 1 a 6×10^6 células viables.
 - b. Rotular las ampollas: tipo de células, N° de pasaje, fecha.
 - c. Dejar 30 minutos a temperatura ambiente, luego 1 - 2 hs a 4°C. A continuación colocarlas en las cañas de aluminio y llevar a -70°C toda la noche, y finalmente a nitrógeno líquido.

DESCONGELACIÓN

Procedimiento:

- a. Colocar la ampolla en baño de agua a 37°C.
- b. Limpiarla con alcohol de 70°C.
- c. Diluir su contenido en la botella de 25 cm², 1:10 con medio conteniendo de 10 a 20 % de SFB.
- d. Incubar inmediatamente a 37°C.

Nota: La descongelación debe ser **rápida**.

BIBLIOGRAFIA:

1. Cultivo de células animales. Guía de Trabajos Prácticos, Cátedra de Virología .UBA.
2. Curso Teórico - Práctico. Cultivo celulares y sus Aplicaciones. Instituto Malbrán. 1996.
3. Cultivo de Tejidos. Un manual práctico. Lustig ES, Nebel AE. 1981.
4. Cultivos celulares y su aplicación en biotecnología. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. Candurra N, Claus J, Coronado S, Coto C. Sup. N° 2. 1994.
5. Culture of Animal Cells. A manual of basic technique. Freshney, R Ian. Fourth Edition. A John Wiley & Sons, Inc., Publication. 2000.

TRABAJO PRACTICO N°7

TEMA: Detección de virus respiratorios: Inmunofluorescencia

INTRODUCCION

Los virus respiratorios son los agentes responsables de la mayoría de las infecciones respiratorias agudas (IRAs) en el ser humano. Las IRAs constituyen más de la tercera parte de las consultas médicas, sobre todo pediátricas, son uno de los motivos más frecuentes de hospitalización en lactantes y niños, son responsables de ausentismo escolar y laboral, y constituyen una causa importante de muerte en el primer año de vida.

Se las puede definir como aquellas infecciones del aparato respiratorio, causadas tanto por virus como por bacterias, que tienen una evolución menor a 15 días y que se manifiestan con síntomas relacionados con el aparato respiratorio, tales como tos, rinorrea, obstrucción nasal, odinofagia, disfonía o dificultad respiratoria, acompañados o no de fiebre. La rinitis, la faringitis, y la otitis media aguda son los cuadros más frecuentes; donde la mayoría de estos cuadros son de origen viral.

La transmisión es principalmente por gotas y por contacto. Presentan un periodo de incubación corto (1 - 4 días). La inmunidad contra estos virus no es completa y son frecuentes las reinfecciones. Las sobreinfecciones bacterianas (otitis, sinusitis, traqueobronquitis y neumonía) suelen ser una complicación frecuente de las infecciones inicialmente virales.

Los principales virus respiratorios humanos se clasifican en diferentes familias: Familia *Orthomyxoviridae*, donde se encuentran los Virus Influenza A, B y C, que causan la Gripe; Familia *Paramyxoviridae*, donde se encuentran los Virus Parainfluenza 1, 2, 3 y 4, que producen IRAs altas y bajas; dentro del género *Pneumovirus* el Virus Sincicial Respiratorio (VSR), que es la causa más frecuente de bronquiolitis en niños menores de 1 año; y el Adenovirus dentro de la familia *Adenoviridae*. En Argentina, constituyen todos ellos Eventos de Notificación Obligatoria de conformidad con lo previsto por Ley 14.465.

Los métodos habitualmente usados para identificar los virus son:

1. Aislamiento Viral: Consiste en la detección e identificación del virus en huevos embrionados o cultivos de células in vitro (MDCK, Hep-2), los cuales son sistemas formado por células provenientes de un órgano o un tejido, normal o tumoral, mantenidas en medios de cultivo de composición química definida y en condiciones de temperatura, pH, aire y humedad controladas. El aislamiento de los virus gripales es indispensable para su análisis antigénico y genómico, que permita su selección en la formulación anual de la vacuna.

2. Inmunofluorescencia (IF): Las técnicas de inmunofluorescencia (IF) se basan en el uso de anticuerpos para marcar un antígeno específico, con un colorante fluorescente (también llamado fluoróforos o fluorocromos), como isotiocianato de fluoresceína (FITC). El fluoróforo permite la visualización del antígeno en la muestra bajo un microscopio de fluorescencia. Distinguimos entre dos métodos IF dependiendo de si el fluoróforo está conjugado con el anticuerpo primario o secundario:

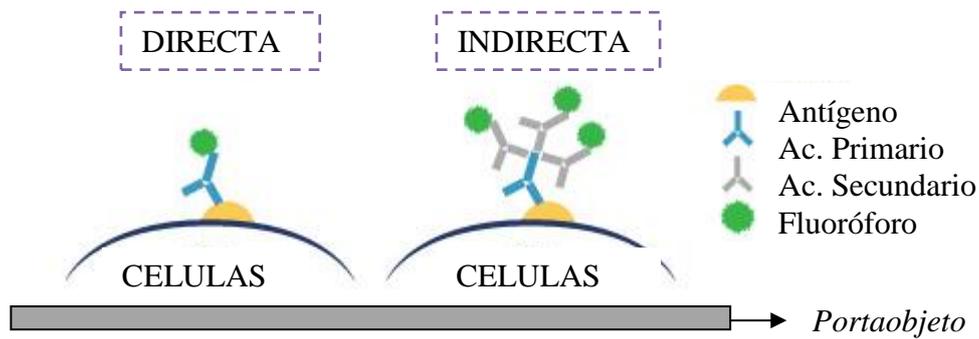
Inmunofluorescencia Directa: utiliza un único anticuerpo dirigido contra el antígeno viral de interés. El anticuerpo primario está directamente conjugado con un fluoróforo.

Inmunofluorescencia Indirecta: utiliza dos anticuerpos. El anticuerpo primario no está conjugado y está dirigido contra el antígeno viral presente en la muestra; y un anticuerpo secundario conjugado con fluoróforo dirigido contra el anticuerpo primario para la detección.

Ambas técnicas permiten la identificación de virus respiratorios en muestras de aspirado nasofaríngeo, hisopado nasal, hisopado faríngeo o estos dos últimos combinados, como así también a partir de cultivos de tejido infectado. Proporcionan resultados rápidos y fiables, aunque requiere un elevado nivel de experiencia para su interpretación y mayor costo. Sensibilidad 80%.

3. Reacción en Cadena de Polimerasa: Es una técnica de diagnóstico molecular, cuyo objetivo es amplificar un fragmento del material genético para identificar al virus. Elevada sensibilidad, alto costo.

Gráfico: Diferencias entre Inmunofluorescencia Directa e Indirecta



1. INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA:

FUNDAMENTO DEL MÉTODO:

Los anticuerpos monoclonales de ratón se unen al antígeno vírico apropiado en la muestra fijada al portaobjetos. El anticuerpo no unido se elimina con solución salina tamponada con fosfato (PBS). Posteriormente se adiciona IgG de cabra anti-ratón marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC), que se une al complejo antígeno-anticuerpo. El anticuerpo marcado no unido se lava con PBS. Al ser excitado con luz ultravioleta, el FITC muestra una fluorescencia de color verde manzana que permite la visualización del complejo mediante microscopia de fluorescencia.

La fluorescencia celular indica positividad de la muestra. Las células no infectadas se tiñen de un color rojo pálido debido a la presencia del colorante de contraste Azul de Evans con el anticuerpo secundario marcado con FITC.

MUESTRAS:

Hisopado nasal y/o faríngeo: Con un hisopo de poliéster o dacrón, se hisopa profundamente la mucosa nasal realizando movimientos rotatorios y luego se introduce en

un tubo con medio de transporte, se rompe el mango del hisopo apoyándolo en el borde del tubo y se descarta el trozo restante; con otro hisopo de poliéster o dacrón, se hisopa ambas amígdalas y la faringe luego se introduce en el mismo tubo con medio de transporte. Se rotula y envía al laboratorio manteniendo la cadena de frío.

Aspirado nasofaríngeo: En pacientes hospitalizados se puede aspirar las secreciones nasofaríngeas con una sonda naso-gástrica conectada a una bomba de vacío o jeringa. Se introduce la sonda en una fosa nasal hasta la parte posterior de la faringe paralelamente al paladar, se activa la bomba de vacío y luego se retira suavemente. Luego, se realiza el mismo procedimiento en la otra fosa nasal, con la misma sonda. Se lava la sonda con 2-3 ml del medio de transporte para descargar el contenido en un tubo cónico. Se rotula y envía al Laboratorio manteniendo la cadena de frío.

Las muestras deben obtenerse dentro de las primeras 72 horas del inicio de los síntomas clínicos, durante la etapa febril. Al transcurrir más tiempo disminuye notablemente tanto la posibilidad de detectar antígeno viral como la de recuperar virus en cultivos celulares.

Las muestras para virus respiratorios corresponden a sustancias infecciosas de **categoría B**, las cuales deben ser adecuadamente envasadas y rotuladas siguiendo las *normas de bioseguridad*.

ACTIVIDAD PRÁCTICA:

A. PREPARACION DE IMPRONTAS

1. Agregar de 2,0 a 2,5 ml de PBS en un tubo cónico estéril de 10 a 15 ml.
2. Sacar la muestra del envase original y colocarla en el tubo con PBS. Resuspender el material de los hisopos girando el mismo y presionando sobre las paredes del tubo; repetir varias veces hasta observar turbidez del preparado, lo que nos indica presencia de células en suspensión.
3. Mezclar agitando en el vórtex o manualmente dando golpes con los dedos.
4. Centrifugar entre 1500 a 2000 rpm, durante 10 minutos.

5. Descartar el sobrenadante y lavar el sedimento celular mediante suave resuspensión en 2,0 a 2,5 ml de PBS.

6. Repetir los pasos 3 a 5 al menos 3 veces.

Si la muestra contiene moco, éste formará una capa sobre el sedimento celular. Retirar cuidadosamente el sobrenadante y el moco con una pipeta Pasteur.

7. Resuspender las células sedimentadas en 0,5 a 1 ml de PBS estéril para obtener una suspensión ligeramente turbia.

8. Tomar 50 µl o una gota de la suspensión celular y disponer sobre los pocillos en los portaobjetos previamente limpios.

9. Esperar a que el portaobjetos se seque al aire totalmente o utilizando estufa de secado a 37°C cuidando que no se resequen las improntas.

10. Fijar los portaobjetos en acetona fría (2 a 8 °C) durante 10 minutos. *No dejar que la acetona se contamine con agua y sales ya que esto puede producir una tinción nebulosa.*

11. Esperar a que los portaobjetos se sequen al aire tras la fijación.

Los portaobjetos deben teñirse lo antes posible. Si es necesario guardarlos, colocar los portaobjetos en un contenedor desecado a 0 - 20 °C.

B. COLORACIÓN Y REVELADO:

1. Agregar una gota del Respiratory Virus Screen (reactivo a utilizar si se procederá a realizar un screening), 15 µl de anticuerpo específico de identificación (en el caso de realizar la inmunofluorescencia directa) o anticuerpo normal de ratón (reactivo de testigo negativo) para cubrir las células.

2. Incubar el portaobjetos a 37 °C durante 30 minutos en cámara húmeda.

3. Enjuagar el portaobjetos suavemente con una piseta de PBS/Tween 20 durante 10 a 15 segundos para eliminar el exceso de solución de anticuerpo monoclonal, *(tener cuidado de dirigir el chorro lejos del pocillo).*

4. Colocar el portaobjetos en una placa de tinción y cubrir con PBS. Enjuagar 2 a 3 veces durante 5 a 10 minutos.

5. Sacudir el exceso de reactivos del portaobjetos y secar cuidadosamente el área que rodea la mancha de células.
6. Agregar una gota de FITC-conjugate (Anti-Mouse IgG) para cubrir las células.
7. Incubar nuevamente el portaobjetos a 37 °C durante 30 minutos en cámara húmeda
8. Repetir los pasos de lavado con solución PBS/Tween 20.
9. Sacudir el exceso de reactivos del portaobjetos y secar cuidadosamente el área que rodea la mancha de células.
10. Agregar medio de montaje acuoso (pH 8,5) y cubrir con un cubreobjetos.
11. Secar el exceso de líquido de los bordes del portaobjetos.

Para obtener mejores resultados, es conveniente examinar los portaobjetos inmediatamente después de preparar. Si los mismos tuvieran que almacenarse después de la tinción, se pueden guardar en heladera, entre 2 y 8°C, en un envase seguro y protegidos de la luz.

C. LECTURA E INTERPRETACIÓN

Examinar los portaobjetos con un microscopio de fluorescencia a 10x en busca de células que presenten fluorescencia y realizar un examen detallado a 40x.

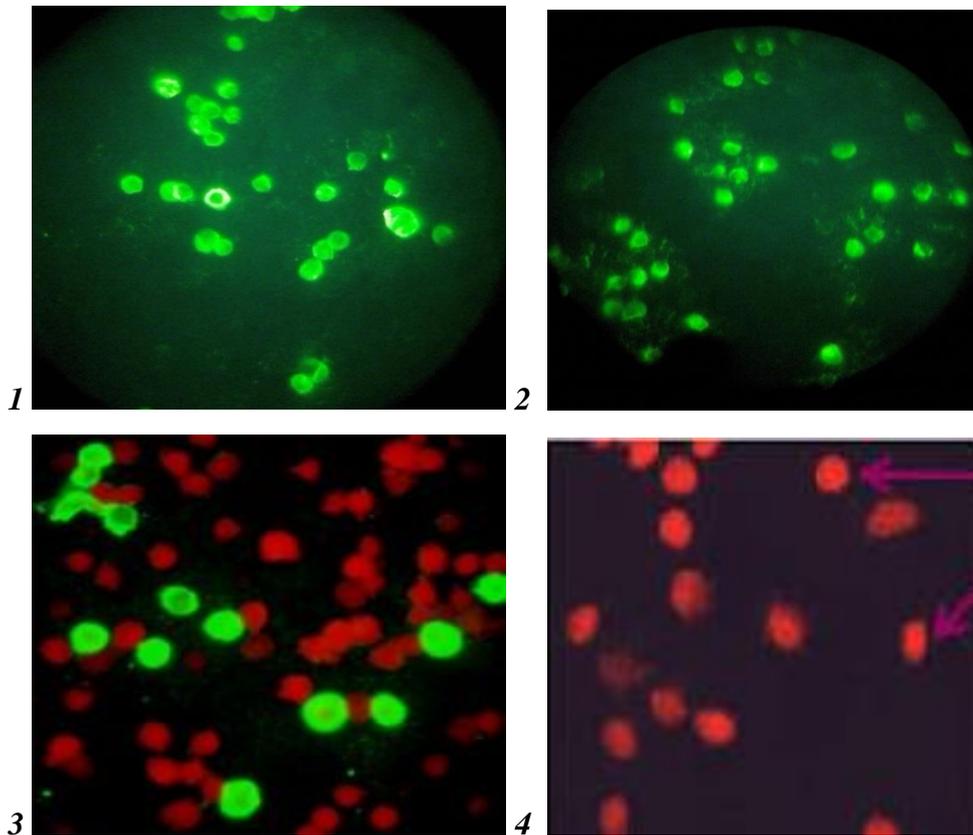
PATRONES DE TINCIÓN

VIRUS RESPIRATORIOS	PATRON DE FLUORESCENCIA
ADV	<i>La fluorescencia es nuclear, citoplasmática o ambas. La tinción nuclear es uniformemente brillante y la citoplasmática es a menudo punteada</i>
FLU A y B	<i>La fluorescencia es nuclear, citoplasmática o ambas. La tinción nuclear es uniformemente brillante y la citoplasmática es a menudo punteada, con inclusiones grandes</i>
PI 1, 2 y 3	<i>La fluorescencia esta confinada al citoplasma, punteada con inclusiones irregulares</i>

VSR

La fluorescencia se localiza en el citoplasma y se asocia a los sincicios. La tinción citoplasmática es punteada con inclusiones pequeñas.

Células Negativas: muestran un color rojo pálido en el citoplasma y un color entre rojo oscuro a casi negro en el núcleo. Coloración debida al colorante de contraste azul de Evans.



Imágenes: 1-2-3 Patrón positivo Influenza A. 4- Patrón Negativo(flechas indican células teñidas de color rojo).

CRITERIOS DE INFORME Y VALIDACIÓN DE LA PRUEBA:

- ✓ 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***.
- ✓ Una muestra que contiene menos de 20 células epiteliales se considera inadecuada, y la ***prueba inválida***.

BIBLIOGRAFÍA

1. WHO. Information for Laboratory Diagnosis of New Influenza A (H1N1) Virus in Humans. World Health Organization. 2009.
2. Light DiagnosticsTM. Respiratory Panel Viral Screening and Identification IFA Kit. Qualitative Identification of Adenovirus, Influenza A, Influenza B, Parainfluenza 1, 2, 3, and Respiratory Syncytial Virus in Cell Culture. EMD Millipore Corporation.
3. Guía de Vigilancia Epidemiológica y Recomendaciones para la prevención y Diagnóstico de las Infecciones Respiratorias Agudas en Argentina. Ministerio de Salud de la Nación Argentina. 2017.

TRABAJO PRÁCTICO N° 8

TEMA: Arbovirus

INTRODUCCION

Los arbovirus tienen una distribución mundial, la mayoría haciendo prevalencia en zonas tropicales y subtropicales. La incidencia de la enfermedad depende de las condiciones climáticas. Son enfermedades endémicas de las zonas selváticas de lluvia tropical y las epidemias ocurren por lo general en zonas templadas después de las lluvias, particularmente proporcionales al aumento de la población de mosquitos.

En la Argentina se ha reconocido la presencia de arbovirus pertenecientes a diversas familias virales y varios de ellos han sido asociados con enfermedad humana. Dentro de la familia *Flaviviridae* se encuentra el virus dengue (DEN) que ha constituido la arbovirosis de mayor importancia en el país desde 1997, habiéndose documentado circulación de los cuatro serotipos virales (DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4) en diferentes provincias y años. Se ha documentado en el pasado la ocurrencia de ciclos selváticos y urbanos del virus de la Fiebre Amarilla (YF) y luego de 40 años, durante el período 2007-2009 se produjo la reemergencia en Argentina de la Fiebre Amarilla Selvática, con intensas epizootias que afectaron las poblaciones de *Alouatta carayá* en las provincias de Misiones y Corrientes, y un grupo de casos humanos en personas que no poseían vacuna antiamarílica en la provincia de Misiones.

El dengue es una enfermedad endémica presente en todas las zonas tropicales y subtropicales del mundo. Se considera la más importante de las arbovirosis en términos de morbilidad, mortalidad e impacto socioeconómico. La prevalencia global del dengue ha aumentado considerablemente en estos últimos años y la enfermedad es ahora endémica en más de 100 países, por lo que afecta potencialmente al 40% de la población mundial. La Organización Mundial de la Salud estima que cada año resultan infectados por el virus del dengue entre 50 y 100 millones de personas, lo que supone entre unos 250.000 y 500.000 enfermos graves y 24.000 fallecimientos.

DIAGNÓSTICO

Puede hacerse por métodos directos o indirectos; el primero: aislamiento del virus mediante cultivo, detección del genoma viral por técnicas moleculares, detección del antígeno del virus, y el segundo: detección de los anticuerpos específicos contra el virus originados en la respuesta inmune humoral del individuo infectado. Las técnicas serológicas más difundidas para el diagnóstico de las infecciones por arbovirus son las técnicas de ELISA.

AISLAMIENTO MEDIANTE CULTIVO

El aislamiento en el laboratorio de los arbovirus a partir de las muestras clínicas se puede realizar mediante técnicas de cultivo celular en los laboratorios con instalaciones de seguridad biológica adecuados para el virus sospechado, requiere disponer de un laboratorio de nivel 3 de bioseguridad. El aislamiento del virus en cultivo, aparte de su interés diagnóstico permite realizar estudios de caracterización biológica, antigénica, molecular y genética de los nuevos virus que hayan sido detectados.

DETECCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Las técnicas moleculares basadas en la detección del genoma vírico han supuesto un enorme avance también en el diagnóstico de las infecciones producidas por los arbovirus, dada la rapidez en la obtención de resultados, su especificidad y sensibilidad. Son consideradas de elección en el diagnóstico rápido en los primeros días de la enfermedad, aunque han de ser complementadas con los resultados procedentes de los métodos serológicos dada la corta viremia que caracteriza a la mayoría de las infecciones producidas por este grupo de virus.

DETECCIÓN DE ANTÍGENO

Las tecnologías basadas en el reconocimiento de un componente vírico (proteína o ácido nucleico) o de la partícula del virus en su totalidad son útiles en etapas tempranas de la infección, antes de que la respuesta inmune haga desaparecer a las partículas víricas, por

lo que la fecha de la toma de muestra, principalmente suero, ha de ser, en general, entre los 5-7 primeros días de inicio de los síntomas.

Los métodos basados en la detección de antígeno presentan la ventaja de permitir obtener un resultado rápido, generalmente en unas pocas horas después de la recepción de la muestra. Sin embargo, estos resultados pueden ser difíciles de interpretar debido a la reactividad antigénica cruzada que existe entre las especies del mismo género vírico como ocurre con los flavivirus (West Nile virus, virus Dengue y virus de la Fiebre Amarilla, entre otros), interpretación de resultados que se complica si distintas especies del mismo género vírico circulan en la misma zona geográfica.

Actualmente, tanto para la detección del DENV como para la de otros *Flavivirus*, el antígeno NS1 suele ser la diana de elección, por tratarse de un antígeno soluble que generalmente se encuentra de forma abundante durante la infección. En este caso, además, los ensayos suelen generar resultados específicos, con niveles muy bajos de reactividad cruzada entre los diferentes *Flavivirus*. En el caso de la detección de la proteína NS1 del DENV puede realizarse desde el día 1 hasta el día 11 de inicio de los síntomas y están disponibles numerosos equipos comerciales basados en técnicas inmunoenzimáticas así como inmunocromatográficas.

DETECCIÓN DE RESPUESTA INMUNOLÓGICA HUMORAL

Desde pocos días después del inicio de los síntomas empieza a ser detectable una respuesta de anticuerpos específicos. En un primer momento son del isotipo IgM, anticuerpos que son de rápida aparición (normalmente entre 5 y 7 días desde el comienzo de la sintomatología) y, en general, de corta duración (2-4 meses), seguidos por anticuerpos del isotipo IgG, que permanecen detectables durante toda la vida. Para muchos de los arbovirus, dado su corto periodo de viremia, la serología basada en la detección de la respuesta de anticuerpos es el método diagnóstico de elección. La muestra más adecuada para hacer el diagnóstico serológico es el suero, aunque en ocasiones se puede realizar sobre muestra de plasma. La detección de IgM es el marcador elegido para el diagnóstico de una infección reciente, en tanto que la respuesta IgG aislada es un indicador de una

infección pasada, o de vacunación en su caso, siendo el marcador de aplicación para estudios de seroprevalencia. Cuando las muestras se toman muy cerca del comienzo de la enfermedad es frecuente la ausencia de respuesta detectable de IgM, por lo que es preciso analizar otra muestra tomada 7-10 días después; analizando las muestras pareadas se confirma la infección demostrando seroconversión de IgG específica.

ELISA IgM

Buena técnica de tamizado para detectar infecciones recientes por *Flavivirus*. No se emplea para determinar serotipo de los virus Dengue.

Los anticuerpos IgM son habitualmente detectados dentro de los 10 primeros días del inicio de los síntomas y pueden permanecer hasta 2-4 meses. Puede presentarse persistencia de los anticuerpos IgM por más de 6 meses, particularmente en infecciones con los flavivirus neurotrópicos.

ELISA IgG

Buena técnica de tamizado para detectar infecciones por *Flavivirus* sin determinación del tiempo de exposición.

Los anticuerpos IgG son detectables habitualmente dentro de las dos primeras semanas luego del inicio de los síntomas y persisten durante toda la vida.

Es poco específico (habitualmente hay reactividad con múltiples antígenos), sobre todo en las infecciones secundarias o secuenciales. Se requiere, en estos casos, procesamiento por técnicas de neutralización NT).

NEUTRALIZACIÓN EN CULTIVOS CELULARES (NT)

Posee buena especificidad. Se requiere el estudio de un par serológico tomado con 10-15 días de diferencia.

En infecciones primarias en general, permite identificar el virus infectante, se requiere una diferencia de al menos 4 títulos entre las dos muestras de suero analizadas.

Altos títulos de anticuerpos neutralizantes para múltiples *Flavivirus* son sugestivos de infecciones secundarias en las que se hace muy difícil identificar el virus infectante mediante esta metodología.

Esta técnica requiere manejo de cultivos celulares, virología básica, colecciones virales de referencia y condiciones especiales de bioseguridad (laboratorio de nivel 3 de bioseguridad).

BIBLIOGRAFÍA

1. Organización Panamericana de la Salud: Diagnóstico y manejo clínico de casos de dengue. http://www.who.int/denguecontrol/resources/guide_diagnosis_dengue/es/
2. Organización Panamericana de la Salud. Dengue. Guías para la atención de enfermos en la región de las Américas.
<http://www.hirrc.org/Gu%C3%ADa%20dengue%20OPS%202016.pdf>
3. Ministerio de Salud Nación Argentina. Guía para el equipo de salud. Diagnóstico de Dengue. <http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000000062cnt-guia-dengue-2016.pdf>
4. Ministerio de Salud Nación Argentina. Guía para la Vigilancia Integrada de Infección por virus Zika.
<http://www.msal.gov.ar/images/stories/ryc/graficos/0000001042cnt-2017-01-25-zika-guia-para-equipos-de-salud.pdf>
5. Organización Mundial de la Salud. Comunicación de riesgos en el contexto del brote de virus de Zika.
http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/204635/WHO_ZIKV_RCCE_16.1_spa.pdf?sequence=1
6. Ministerio de Salud Nación Argentina. Enfermedades infecciosas - fiebre chikungunya. Guía para el equipo de salud.
<http://www.msal.gov.ar/images/stories/bes/graficos/0000000547cnt-guia-equipo-salud-fiebre-chikungunya-2015.pdf>.

TRABAJO PRÁCTICO N° 9

TEMA: Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)

INTRODUCCIÓN

El virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) es miembro de la familia *Retroviridae* subfamilia *Lentivirinae*. Es un virus compuesto por dos copias de ARN de polaridad positiva de simple cadena con aproximadamente 9 kb, asociadas a proteínas y enzimas, rodeadas por una matriz proteica icosaédrica y una envoltura lipoproteica que determina una partícula esférica de 80 a 110 nm. El genoma presenta 3 grupos de genes (*gag*, *pol* y *env*) y otros reguladores. VIH-1 y VIH-2 son antigénica y genéticamente diferentes, con una similitud de 40 a 50%, y ocasionan enfermedad clínicamente similar.

Se acepta que VIH-1 y VIH-2 surgieron por saltos interespecies a partir de especies cercanas de monos, aparentemente en África. Se reconocen hoy cuatro grupos de VIH-1: M (*major*), O (*outlier*), N (no M, no O), y P. El grupo M es responsable la pandemia, con 9 subtipos (A-D, F-H, J, K) y numerosas formas circulantes recombinantes (FCR). A nivel individual además los anticuerpos que se generan al principio de la infección, contra el virus transmitido, ejercen una presión que genera mutantes de escape, cuasiespecies que coevolucionan con la respuesta de anticuerpos del paciente. VIH-2 es endémico sólo en el oeste y centro de África, y se caracteriza por baja tasa de replicación en general, con baja progresión.

Fue reconocido tras un aumento de infecciones oportunistas. Desde 1981 más de 78 millones de personas se han infectado, con más de 35 millones de muertes. Desde entonces la epidemia ha ido cambiando de perfil en algunas regiones, en relación a progresos en relación a interrupción de transmisión y tratamiento. En la actualidad, y con adecuado tratamiento, la expectativa de vida es apenas menor a la de una persona no infectada.

En Argentina se estima que casi 130.000 personas viven con VIH; un 20 % desconoce su diagnóstico y 6 de cada 10 se atienden en el sistema público. Se notifican 5.800 casos por año, 2,5 varones por cada mujer, con medianas de edad de 32 y 33 años respectivamente, con una tasa de diagnóstico de 12,9 por 100.000 habitantes en promedio.

Los diagnósticos tardíos son casi el 42% de los casos, y 4,1 de cada 100 bebés de madres con VIH nacen infectados.

Se transmite por vía sexual, parenteral y vertical (*in utero*, intraparto y por leche materna). El virus se introduce en células con receptores CD4 y CCR5 como correceptores, principalmente linfocitos T, afectando la organización de una respuesta inmune efectiva. Una característica de VIH es la enzima retrotranscriptasa que transcribe ARN a un dúplex de ADN, que luego se integra al genoma celular como provirus, a partir del cual la maquinaria celular sintetiza ARN viral para ARNm y nuevas partículas virales. Los linfocitos T CD4+ se ven alterados cualitativamente y en número. Con el paso del tiempo y sin tratamiento apropiado el paciente aumenta su sensibilidad a infecciones oportunistas progresando al estadio final denominado síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). También se infectan monocitos y macrófagos, que cumplen el rol de reservorio al disminuir el número de LT CD4+. El curso natural de la infección varía según la capacidad del individuo infectado de mantener un recuento alto de LT CD4+ antes del diagnóstico y tratamiento. La virulencia de la población viral que infecta al paciente también juega un rol en la progresión.

El diagnóstico temprano previene el deterioro inmunológico. El diagnóstico parte de la sospecha clínica por las infecciones presentes y sus signos o síntomas, o por antecedentes de exposición al riesgo, aunque el paciente puede ser asintomático según la respuesta inmune y la cepa infectante. El tamizaje diagnóstico se efectúa con la detección de anticuerpos específicos en un algoritmo de sucesivas técnicas de mayor sensibilidad mayor especificidad. La confirmación se basa en la detección del genoma viral; la cuantificación de la carga viral y el recuento de LT CD4+ permiten monitorear el tratamiento, que persigue la supresión viral a largo plazo. Mutaciones o intercambio de virus pueden llevar a la aparición de resistencia al tratamiento, también evaluable por el laboratorio. Por otra parte el laboratorio contribuye al diagnóstico y seguimiento de los oportunistas, alteraciones metabólicas y otras enfermedades malignas como linfomas y cánceres.

En menores de 18 meses el diagnóstico es virológico, debido a la presencia de anticuerpos maternos que no permiten emplear la serología.

Otro rol del laboratorio consiste en la vigilancia de diagnósticos nuevos, en adultos y en hijos de madres viviendo con VIH.

ACTIVIDADES:

Objetivos:

1. Comprender el rol del laboratorio en la infección por VIH.
2. Utilizar las metodologías para diagnóstico y seguimiento, entendiendo los criterios de control de calidad, en el marco de las recomendaciones científicas y legales.
3. Interpretar resultados de la utilización de las diferentes técnicas en conjunto con la clínica y terapéutica actual.

Desarrollo:

- a. Comprensión de las metodologías (2 hs.).

Las técnicas a utilizar se detallan en el aula virtual. Elaborar una tabla de doble entrada considerando, para cada metodología, los siguientes ítems: en empleo actualmente, nombre del fundamento técnico, qué detecta, esquema resumido de procedimiento, cómo se informa, cómo se interpreta.

- b. Aplicación de técnicas y guías clínicas a situaciones en pacientes (3 hs.).

Las guías clínicas actualizadas y las situaciones se detallan en el aula virtual.

Observación: Las guías y recomendaciones se actualizarán periódicamente.

Participación del laboratorio en la infección por VIH

1. Diagnóstico

- 1.1. Niños y adultos: Aplicación del algoritmo de diagnóstico 2013.

- a) Tamizaje:

- Detección de anticuerpos anti VIH-1/2 (3ra generación): aglutinación de partículas (AP), Dot blot, ELISA, MEIA, quimioluminiscencia (QML), inmunocromatografía (IC o test rápido).

- Detección de anticuerpos anti VIH-1/2 más antígenos de VIH-1 (4ta generación): Dot blot, ELISA, IC.

b) Confirmación

- Cuantificación carga viral plasmática de VIH-1: PCR en tiempo real (qPCR), branch DNA (b-DNA).
- Detección de anticuerpos anti VIH-1 (y VIH-2) por método confirmatorio: Western Blot (WB).

1.2. Menores de 18 meses:

- a) Detección de DNA proviral por PCR convencional.
- b) Cuantificación de carga viral plasmática VIH-1: qPCR.

2. Seguimiento, monitoreo de terapia, decisión de cambio de terapia

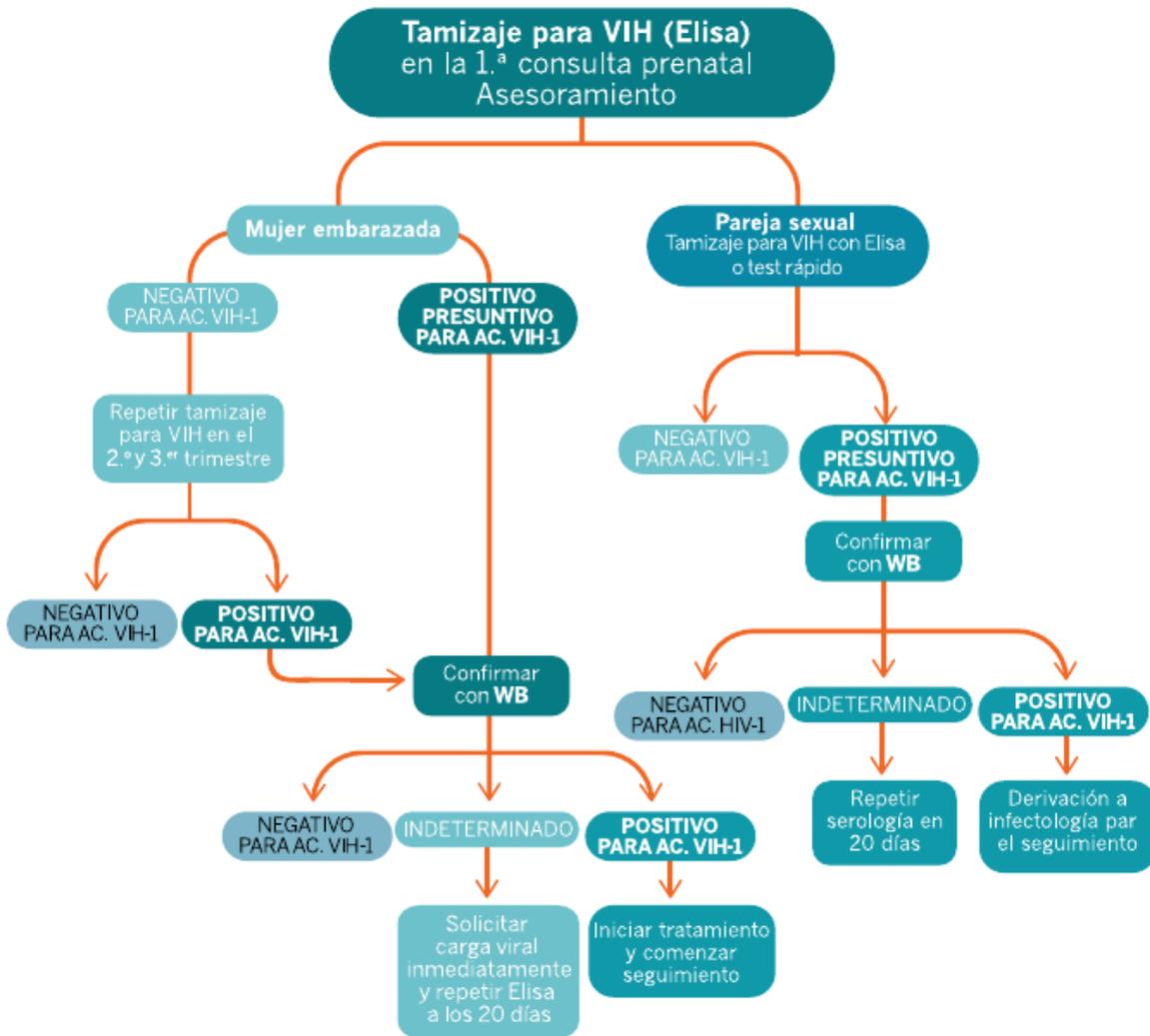
- 2.1. Evaluación de estado inmunitario mediante recuento de linfocitos T CD4+:
Citometría de flujo, citometría de volumen fijo.
- 2.2. Cuantificación de carga viral plasmática VIH-1: qPCR.
- 2.3. Test de resistencia (TDR).
- 2.4. Test HLA B5701.

3. Vigilancia epidemiológica

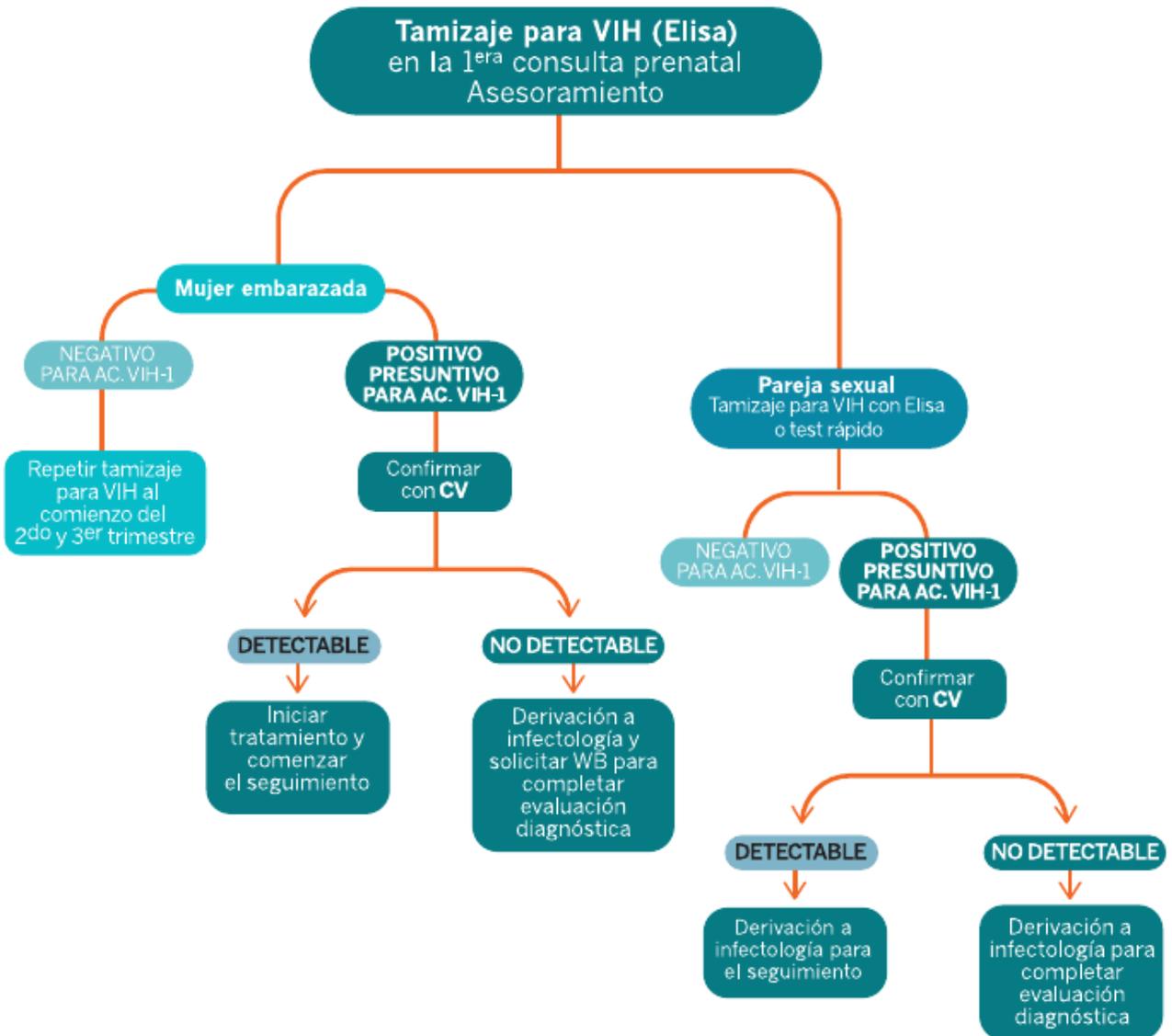
- 3.1. Notificación de eventos

ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO EN ADULTOS Y NIÑOS MAYORES DE 18 MESES

a. Escenario de diagnóstico en embarazada con confirmación por Western Blot (1).



b. Escenario de diagnóstico en embarazada con confirmación por carga viral (2).



ALGORITMO DE DIAGNÓSTICO EN MENORES DE 18 MESES (3).



ALGORITMO Y CRITERIO DIAGNÓSTICO

Niño/a expuesto/a: Nacido/a de una mujer gestante con VIH, a quien todavía no se le ha completado el diagnóstico.

Infección confirmada: Dos pruebas virológicas positivas para VIH en dos muestras consecutivas, independientemente de la edad. Se deberá tener presente que un resultado positivo debe confirmarse inmediatamente con una segunda muestra.

Infección descartada (virologicamente): Al menos una determinación virológica para VIH negativa a las 12 semanas de vida o posterior, en el contexto de niños/as no amamantados/as, sin cuadro clínico relacionado con infección por VIH.

Infección excluida: Una determinación serológica negativa en niños mayores a 12-18 meses (4).

CRITERIOS DE EMPLEO DE ESTUDIOS

Los estudios de tamizaje pueden ser realizados en un centro de baja complejidad (por ej. un test rápido). Un test negativo descarta la infección y solo debe aconsejarse repetir el test si hubo situaciones de exposición durante el período ventana por una exposición reciente reportada o identificada por el profesional de salud. Deben identificarse personas con perfil de riesgo substancial (por ej. personas de poblaciones clave) a las cuales se tiene que aconsejar repetir la prueba con periodicidad.

Si un test de tamizaje es positivo, deben ponerse en marcha un protocolo de confirmación que debe estar bien determinado por cada centro. Idealmente debería hacerse una extracción de sangre en el lugar y enviar la muestra a un laboratorio que pueda procesar un test confirmatorio. De no ser posible, derivar a la persona (ya con un turno protegido) para que se le realice la extracción en un centro de mayor complejidad. Recordar que el testeo debe estar acompañado de asesoramiento (pre y post test), debe ser voluntario, confidencial y requiere consentimiento (5).

*Cátedra de Virología
Carrera de Bioquímica*

Examen y/o prácticas	Al inicio	Cada 6 meses	Al menos 1 vez al año	Al iniciar TARV	Observaciones
Examen clínico	X		X	X	Además, siempre que haya síntomas
TDR	X				Siempre ante fallo terapéutico
Hemograma	X	X		X	Detectar citopenia. Descartar HCV ante plaquetopenia e infección oportunista ante pancitopenia.
Recuento de CD4	X	X	X	X	En PcVIH* estable bajo TARV y CD4 > 350 estable durante un año puede realizarse cada 12 meses.
Carga viral	X	X		X	Luego de 4 a 8 semanas de inicio o cambio de TARV. Cada 3 a 6 meses para confirmar la supresión de la viremia.
HLA B5701	X				Sólo si va a utilizarse abacavir.

***PcVIH:** Paciente VIH positivo.

Otros: Descartar embarazo, realizar perfil hepático, lipídico, glucemia, radiografía de tórax, examen ginecológico.

CRITERIOS DE TRATAMIENTO

El tratamiento antirretroviral (TARV) tiene el objetivo de disminuir la morbi-mortalidad relacionada a la infección por VIH y mejorar la calidad y expectativa de vida de las personas. En la actualidad la recomendación es iniciar el TARV en todas las personas con diagnóstico de VIH independientemente de su estatus inmunológico. Está demostrado que, de instaurarse precozmente, tiene el beneficio de disminuir la posibilidad de transmisión, el riesgo de complicaciones de la infección por VIH y aumentar las probabilidades de elevar el recuento de CD4.

Hay que recordar que si bien son claros los beneficios del inicio precoz (idealmente inmediato) del TARV, excepto en los casos de mujeres embarazadas o en caso de

inmunodepresión severa o presencia de enfermedades marcadoras, el inicio del TARV NO es una urgencia (5).

SÍNDROME DE RESPUESTA INFLAMATORIA SISTÉMICA (SRIS)

Puede ocurrir que pocas semanas después de comenzado el TARV, generalmente (aunque no exclusivamente) en personas con CD4 muy bajos ($< 100/\text{mm}^3$), aparezcan síntomas compatibles con alguna enfermedad oportunista, o que empeoren síntomas presentes antes del comienzo del mismo al tiempo que se observa generalmente reducción de la carga viral y un aumento del recuento de CD4, lo que demuestra la eficacia de tratamiento. A este proceso se lo conoce como síndrome de respuesta inflamatoria sistémica (SRIS) y es consecuencia de la restauración de la respuesta inmune ante la exposición a un antígeno. El diagnóstico del SRIS es clínico (5).

CRITERIOS DE USO DE CARGA VIRAL Y RECuento DE LT CD4+

Carga viral: Es la cuantificación del ARN viral del VIH en plasma y se expresa como número de copias/ mm^3 , y como su logaritmo. No es aconsejable realizar estudios de carga viral durante y hasta las 4 semanas después del tratamiento de infecciones intercurrentes o inmunizaciones dado que se observa frecuentemente carga viral detectable sin repercusión clínica durante este periodo. Según el cuadro clínico puede solicitarse luego de 4-8 semanas del inicio o cambio de TARV. Luego, cada 3 a 6 meses para confirmar la supresión de la viremia. Cuando se controla la eficacia de un nuevo tratamiento, se espera una caída de por lo menos 1 logaritmo en el valor de la carga viral luego de 4 semanas de iniciado el tratamiento. El tratamiento es exitoso cuando se logra la indetectabilidad en dos determinaciones luego de las 24 semanas de tratamiento (5).

Recuento de CD4: es uno de los marcadores más importantes del estado inmunitario y es útil para estadificar la infección, determinar el riesgo de infecciones oportunistas, para la indicación de inmunizaciones y del tratamiento preventivo de infecciones oportunistas. En PcVIH estables bajo TARV con niveles de CD4 > 350 en forma sostenida durante 1 año

con adherencia al TARV y CV suprimida, el monitoreo de CD4 puede realizarse a intervalos de 12 meses, siempre que la CV sea monitoreada cada 6 meses. De no cumplirse estas condiciones se sugiere solicitar recuento de CD4 cada 3-6 meses hasta lograr que sea un PcVIH estable bajo TARV. En personas con recuentos CD4 < a 200/mm³ el monitoreo debe realizarse de manera más frecuente, cada 3-4 meses una vez iniciado el TARV, para guiar el inicio o discontinuación de las profilaxis primarias de infecciones oportunistas (5).

Causas de carga viral detectable (tras haber iniciado tratamiento):

- Fallo virológico: carga viral detectable luego de 24 semanas de TARV en dos oportunidades consecutivas una vez descartadas otras causas (considerar resistencia transmitida).

- BLIP (escape viral transitorio): carga viral detectable (generalmente de bajo nivel) en una muestra aislada que no se repite en las sucesivas muestras (2 cargas consecutivas con diferencia de 1 mes > de 50 copias y menores de 200 copias). Una vez chequeada la adherencia se debe consultar el caso con el centro de referencia.

- Brecha en adherencia: número de tomas en forma adecuada (+/- 2hs de la hora prevista) menor al 90%. Este escenario no permitirá de no modificarse el éxito terapéutico por lo que se deben implementar medidas al momento de sospecharlo o detectarlo.

- Mala absorción: descartar según clínica y estudios complementarios como causa potencial de niveles sub-terapéuticos de drogas en plasma.

- Interacciones farmacológicas: detectar posibles interacciones que generen niveles sub-terapéuticos de drogas en plasma (5).

CRITERIOS DE USO DE TEST DE RESISTENCIA (TDR)

El TDR identifica mutaciones que se asocian con resistencia a fármacos antirretrovirales (ARV) y permite identificar potenciales fármacos activos. El test de resistencia debe realizarse durante la toma del TARV o hasta un máximo de 4 semanas de suspendido el mismo, luego de ese tiempo la utilidad de éste será relativa (5)□. Está

previsto además para el paciente pediátrico al momento del diagnóstico y antes de inicio de tratamiento.

CRITERIOS DE USO DE HLA B5701

Se utiliza si se usará abacavir en el tratamiento. Si es positivo la probabilidad de hipersensibilidad a la droga es elevada, por lo que estaría contraindicada (5).

APLICACIÓN DEL LABORATORIO A LA PROFILAXIS ANTE AGENTES OPORTUNISTAS (5).

Agente	Indicación	Primera opción	Suspensión
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	CD4 < 200 /mm ³ o < 14% o candidiasis orofaríngea	TMP – SMX	CD4 > 200 /mm ³ por más de 3 meses
Encefalitis por <i>Toxoplasma gondii</i>	IgG (+) y CD4 < 100 /mm ³	TMP – SMX	CD4 > 200 /mm ³ por más de 3 meses
<i>Mycobacterium tuberculosis</i> (TB latente)	PPD > 5 mm o contacto con paciente bacilífero, habiendo	Isoniazida + piridoxina	9 meses
Complejo <i>Mycobacterium avium</i> (MAC)	CD4 < 50 /mm ³	Azitromicina Claritromicina	CD4 > 100 /mm ³ por más de 3 meses

APLICACIÓN DEL LABORATORIO EN LA VACUNACIÓN DEL PACIENTE

Vacuna	Requisito	Indicación	Estudio previo	Esquema	Control de respuesta	Re vacunación	Vacunación de convivientes
Influenza	Cualquier recuento de CD4	Universal	No	1 dosis anual. Menores de 9 años: 2 dosis si es primera vez	No	Anual	Si
Neumococo	Idealmente CD4 > 200	Mayores de 2 años	No	1 dosis de conjugada 13 valente IM seguida de 1 dosis de polisacárida 23 valente a las 8 semanas	No	Niños: 2da dosis a los 3 años. Adultos: 2da dosis de polisacárida 23 valente a los 5 años	No
Hepatitis B	CD4 > 200	Universal	AHBsAg > 10, no vacunar. AHBc reactivo con resto de marcadores negativos, descartar infección oculta	3 dosis, 0 – 1 y 6 meses, IM	AHBsAg a los 2 meses. Si es < 10 UI/L, esquema doble dosis.	Dosis de refuerzo si aHBsAg cae a <10 UI/L	
Hepatitis A	CD4 > 200	Universal	Si HAV IgG reactivo, no requiere vacuna	2 dosis, 0 y 6 meses, IM	No	No	No
Doble adultos (DT)	CD4 > 200	Universal	No	1 dosis IM	No	Cada 10 años	No
Triple viral	CD4 > 200	Universal	Si sarampión y rubeola IgG reactivo, no requiere vacuna	2 dosis, 0 y 1 mes, SC	IgG sarampión rubeola	No	Sí
dTPa	CD4 > 200	Universal	No	1 dosis única (en vez de una de las de DT)	No	No	No
VPH (cuadrivalente)	Cualquier recuento	Entre 11 y 26 años. Considerar en HSH hasta los 40 años.	No	3 dosis, 0, 2 y 6 meses, IM	No	No	No

La administración de las siguientes vacunas deberá realizarse con el asesoramiento de especialistas en inmunización (5):

- Vacuna contra Fiebre amarilla.
- Vacuna contra Fiebre hemorrágica.
- Vacuna antipoliomielítica.

VIGILANCIA EPIDEMIOLÓGICA

La vigilancia de ambos eventos, VIH y SIDA, se realiza a través de una ficha de notificación individual y detallada. En relación con la notificación de una infección, quienes deben completar la ficha son los integrantes del equipo de salud cada vez que atiendan por primera vez a una PcVIH, haya sido o no notificada con anterioridad por otro profesional en esa u otra institución. En relación con los casos de SIDA, se deberá notificar en ocasión de la ocurrencia de la primera enfermedad marcadora. Debe tenerse presente que lo que se vigilan son eventos, no personas, por lo que una persona infectada notificada deberá ser re notificada si posteriormente desarrolla una enfermedad marcadora de SIDA. Sólo se notifica el primer evento marcador de SIDA (5).

BIBLIOGRAFÍA

1. Dirección de SIDA y ETS. Ministerio de salud. 2013. Algoritmos diagnósticos para VIH.
2. Dirección de SIDA y ETS. Ministerio de salud. 2016. Prevención de la transmisión perinatal de sífilis, hepatitis B y VIH. Recomendaciones para el trabajo de los equipos de salud. Algoritmos para diagnóstico y tratamiento.
3. Dirección de SIDA y ETS. Ministerio de Salud. 2016. Guía para la atención de niños, niñas y adolescentes con VIH y con exposición perinatal.
4. Dirección de SIDA y ETS. Dirección de Epidemiología. Ministerio de Salud. 2017. HIV Pediátrico (<18 meses). Algoritmo de diagnóstico y notificación a través del SIVILA.
5. Dirección de SIDA, ETS, Hepatitis y TBC. Secretaría de Gobierno de Salud. Ministerio de Salud y Desarrollo Social. 2018. Guía práctica para la atención integral de personas adultas con VIH en el primer nivel de atención.

