

2ej  
88



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO**

**FACULTAD DE QUIMICA**

**PRUEBA DE INMUNOFLUORESCENCIA  
PARA TIPIFICAR POLIOVIRUS**

**T E S I S**  
Que para obtener el Título de  
Químico Farmacéutico Biólogo  
p r e s e n t a

**MA. EUGENIA TERESA OROZCO ADAME**



1986



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## I N D I C E

	Página
I. INTRODUCCION	
1.1. Aspectos generales sobre la poliomielitis	1
1.2. Generalidades sobre los polio-virus	4
II. METODOLOGIA	
2.1. Fundamento	9
2.2. Aspectos generales	12
2.3. Variantes de la prueba	15
2.4. Prueba de inmunofluorescencia Indirecta (IFI)	18
2.5. Características del equipo de Microscopía para pruebas de inmuno fluorescencia	24
III. PROCEDIMIENTOS UTILIZADOS	29
IV. RESULTADOS	46
V. CONCLUSIONES	51
VI. BIBLIOGRAFIA	52
VII. APENDICE	56

## I. INTRODUCCION

### Aspectos generales sobre la poliomiелitis.

La poliomiелitis es una enfermedad febril aguda que generalmente se reconoce por el ataque al sistema músculo esquelético, caracterizada por debilidad muscular en extremidades de diversa severidad y extensión. Epidemiológicamente se ha modificado el curso de la enfermedad por el uso de vacunas, en general, la poliomiелitis ha sido controlada en muchos países, pero en regiones en vías de desarrollo aún representa un problema. En base a un estudio retrospectivo de la década pasada, publicado por la Organización Mundial de la Salud (1), dentro de los países americanos, Canadá y Estados Unidos han reducido la incidencia de la enfermedad a unos cuantos casos por año debido a los programas continuos de vacunación; un panorama similar se ha encontrado en Chile, Costa Rica, Panamá, Uruguay y Cuba. Sin embargo, en algunos otros países del continente, tales como Brasil y México se reportaron durante ese periodo un alto número de casos y con poca fluctuación entre cada año, casos que corresponden principalmente a niños no vacunados o vacunados en forma incompleta. Las epidemias de poliomiелitis en poblaciones sin vacunar son principalmente causadas por poliovirus tipo 1; en ciudades con programas de vacunación bien establecidos ciertos casos de parálisis se han asociado con el uso de vacunas atenuadas, particularmente cuando se involucran los poliovirus tipo 2 y 3 (2). Esto ha ocurrido en muy pocos casos, y proporcionalmente al número de individuos inmunizados, su número resulta insignificante.

La parálisis es una complicación poco frecuente en una infección que de otro modo sería trivial. La enfermedad se inicia con un foco infeccioso intestinal caracterizada por

malestar, fiebre, vómito y cefalalgia; en la mayoría de los casos la infección no se extiende más allá del tracto gastrointestinal y se habla entonces de poliomielitis subclínica o asintomática. En ciertos casos se presentan síntomas exacerbados sugestivos de inflamación meníngea que desaparecen sin dejar secuelas, y a este cuadro se le llama poliomielitis abortiva. Aproximadamente en el 0.1% de los casos hay dolor muscular, rigidez y más tarde parálisis flácida por daño neuronal irreversible. Cuando el virus pasa de las astas posteriores de la médula al bulbo raquídeo se presenta la forma "bulbar" que involucra los centros respiratorios y vasomotores y se presenta la muerte por falla respiratoria o cardíaca.

Los factores que determinan la infección son tanto virales como la condición inmunitaria del huésped, en cuyo caso es muy importante la presencia o ausencia de anticuerpos neutralizantes en la sangre; dichos anticuerpos se pueden adquirir en forma pasiva (heredados de la madre o por inyección de gammaglobulina) o activa por infección natural o por la aplicación de vacunas. Los anticuerpos transplacentarios son eliminados paulatinamente a partir del nacimiento, por lo que después de varios meses (6-12) el niño queda desprotegido contra la infección natural. La inmunidad adquirida en forma natural o por medio de vacunación oral con virus atenuados protege al individuo por el resto de su vida; la vacuna inactivada produce una respuesta inmunológica temporal, por lo cual debe ser administrada periódicamente (cada año) para mantenerse protegido contra la infección.

Siendo entéricos en su habitat, los poliovirus se propagan por la vía oro-fecal; después de la penetración del poliovirus al organismo hospedero, se multiplica primero en la faringe y luego en el intestino delgado, estando involucrado el tejido linfoide (amígdalas y placas de Peyer), por

vía sanguínea, el virus puede llegar a la médula espinal y a otras estructuras del sistema nervioso central causando destrucción neuronal, lo que explica que las secuelas sean irreversibles.

La manifestación invariable de infección por poliovirus en el hombre es la eliminación del virus en las heces, que generalmente se inicia una o dos semanas antes de que se presenten síntomas y puede prolongarse tres o cuatro semanas más. Gracias a ello es posible aislar el virus a partir de la materia fecal durante toda la fase excretoria.

### Generalidades sobre los poliovirus.

Los agentes causales de la poliomiелitis pertenecen al grupo de los Picornavirus, que constituyen un grupo muy importante y numeroso de virus patógenos humanos; contienen ARN y son los más pequeños, de ahí su nombre "pico" (pequeño). Este grupo comprende a los enterovirus (encontrados principalmente en el conducto entérico) y a los rinovirus (encontrados generalmente en la nariz); a su vez los enterovirus comprenden los virus de la poliomiелitis, los Coxsackie y los ECHO.

Existen tres serotipos de poliovirus conocidos desde hace muchos años y las cepas prototipo originales fueron denominadas Brunhilde, Lansing y Leon que actualmente se designan como tipos 1, 2 y 3 respectivamente.

Actualmente se considera que los Picornavirus tienen un diámetro promedio de 20 nm, los poliovirus contienen un 20 a 25% de ARN de un solo filamento con un peso molecular de 2.6 millones de daltones, los estudios de difracción con rayos X indican la presencia de una cápside de simetría icosaédrica y 60 capsómeros. Se han encontrado por lo menos tres antígenos diferentes, se sabe desde hace algunos años que las partículas virales infecciosas completas expresan un determinante antigénico D, que sedimenta a 160 S, el antígeno C que se expresa en virus inactivados por calentamiento a 56°C, sedimenta a 80 S y se relaciona con partículas carentes de ARN (3), y el antígeno H relacionado con partículas que contienen ARN infeccioso, sedimenta a 80 S y se obtiene por tratamiento del virus a 50°C por 10 minutos.

Otros autores han demostrado que la radiación con luz ultravioleta sobre el poliovirus intacto da lugar al antí-

geno H. Usando centrifugación en gradiente de sacarosa para caracterizar las partículas subvirales generadas por el tratamiento con luz ultravioleta, estos investigadores (4, 5) mostraron que el efecto de esta radiación sobre el poliovirus fue la pérdida de la infectividad viral, ya que en el estado final la cápside se separa del ARN; en estudios posteriores De Sena y Jarvis (6) encontraron que la irradiación a pH alcalino (7.5-8.5) produce mayores modificaciones en la cápside que la irradiación a pH neutro.

Durante los últimos años, la síntesis de proteínas del poliovirus ha sido objeto de múltiples estudios; se ha demostrado que después de la infección, el ARN viral provoca la síntesis de una proteína larga NCVPOO, y se ha sugerido que dicha proteína contiene la mayor cantidad de la información traducible del virus, si no es que toda. Esta proteína se fragmenta específicamente en precursores primarios de tres distintas clases de proteínas, los precursores primarios son procesados proteolíticamente para producir todas las proteínas "poliovirus-específicas", algunas de las cuales forman la cápside viral (VP4, VP2, VP3 y VP1, las cuales presentan este orden de mapeo) y otras más son de función aún no conocida (7). El conocimiento de la actividad de estas proteasas puede abrir el camino para el desarrollo de una quimioterapia en infecciones por poliovirus y otros picornavirus mediante el uso de inhibidores específicos de los procesos enzimáticos. La determinación de la secuencia del genoma viral puede también contribuir al desarrollo de vacunas con determinantes genéticos optimizados en su antigenicidad; un paso importante en esta dirección es la determinación de la secuencia del genoma del virus atenuado de Sabin tipo 1 (2).

Existe cierta evidencia (2) del papel que juegan las pro

teínas de la cápside viral en la antigenicidad del poliovirus, ya que los polipéptidos VP1, VP2 y VP3 son capaces de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes en animales, aunque en bajos niveles.

Las diferencias bioquímicas e inmunológicas entre los serotipos de poliovirus parecen ser mayores en la porción del genoma que codifica para proteínas estructurales; sin embargo se presenta una amplia reacción cruzada demostrada por inmunoprecipitación y otros estudios inmunológicos de proteínas virales (VP1, VP2 y VP3); también se ha demostrado reacción cruzada de la proteína VP1 de poliovirus con suero específico para otros Picornavirus, por ejemplo virus ECHO 11 y ECHO 16 (2).

El descubrimiento de que los poliovirus pueden ser replicados in-vitro, en tejido no nervioso de primates, abrió una nueva fase en la investigación sobre poliomielitis y en general en la Virología; diversos tipos de cultivo celular humano o de otros primates son satisfactorios para el aislamiento; ya que los poliovirus son altamente citocidas, los efectos citopáticos se desarrollan rápidamente y la destrucción celular se completa en unos cuantos días, de tal forma que las células afectadas se retraen, hay aumento en la refringencia de la membrana, el citoplasma se hace granuloso, hay picnosis y finalmente lisis.

Gracias a los métodos de inmunofluorescencia, muchos investigadores han estudiado la dinámica del desarrollo y distribución de antígenos virales; estos avances, sumados al desarrollo de las técnicas de cultivo de tejidos iniciadas por Robbins, Enders y Weller (8) para la propagación de virus de poliomielitis, han hecho posible un mayor conocimiento de estos importantes agentes patógenos. Por inmunofluorescencia y autoradiografía han sido seguidos los procesos

de multiplicación de virus poliomiélfíticos "in vitro", observándose una intensa síntesis de ARN en la célula seguida por un decremento en la síntesis de proteína celular; - 30 minutos después de estos sucesos el antígeno se encuentra en el citoplasma y 3 a 3.5 horas después de la infección aparece ya en el núcleo (9). Sólo el antígeno H y el antígeno C (termoestable) pueden ser demostrados por inmunofluorescencia, el antígeno D se pierde en el curso de la fijación.

Recientemente se han empleado diversos métodos para establecer diferencias y relaciones entre los serotipos de poliovirus, tales como mapeo de ARN viral con ribonucleasa T<sub>1</sub>-oligonucleótido, mapeo de ADN celular transcrito a partir de ARN viral, electroforesis en gel de poliacrilamida de polipéptidos virales, y métodos inmunológicos usando anticuerpos monoclonales; el desarrollo en este campo contribuirá a un mayor conocimiento de la estructura viral.

El diagnóstico de laboratorio se basa en el aislamiento del virus y en la demostración de un aumento en el título de los anticuerpos durante el curso de la enfermedad.

Las pruebas que se utilizan habitualmente para el diagnóstico serológico son la prueba de neutralización y la de fijación de complemento. Los anticuerpos neutralizantes aparecen a las tres semanas del inicio de la enfermedad y persisten durante toda la vida; títulos de 1:512 o mayores se presentan en un 70% de los pacientes en los primeros tres meses después del inicio de la enfermedad. Los anticuerpos fijadores de complemento tienen un corto período de duración, por lo que encontrar un título significativo es un indicio de infección reciente.

Durante la fase aguda el virus se presenta en la gargan

ta, pero una vez que la parálisis se manifiesta es más seguro aislarlo de las heces; el aislamiento y la identificación de enterovirus en especímenes clínicos por métodos rutinarios generalmente requiere una semana, y la técnica de anticuerpos fluorescentes ofrece la posibilidad de una identificación más rápida.

La inmunofluorescencia ha sido empleada en el diagnóstico de poliomiелitis en el hombre, bien sea por identificación de anticuerpos circulantes en suero o por detección de virus eliminados en materia fecal; Hatch y col. (10) publicaron una técnica de anticuerpos fluorescentes para la identificación de los tres serotipos de poliovirus, con la cual determinaron el serotipo en un 50% de los casos dentro de las primeras 72 horas después de la inoculación. El resto de los casos requirió un segundo pase en cultivo de células para su posterior identificación; además de la rapidez, el método tiene la ventaja de requerir menos material biológico, particularmente en cuanto a cultivo celular se refiere, y si el método es indirecto sólo es necesario un anticuerpo marcado. Por otra parte, comparando esta metodología con los procedimientos utilizados de rutina como la titulación por neutralización, es bastante simple ya que no se emplean tantos tubos de cultivo y consecuentemente el trabajo se simplifica; sin embargo, se requiere cierta experiencia en el manejo adecuado de la técnica, sin dejar de considerar el costo del equipo.

## II METODOLOGIA

### Fundamento.

Los anticuerpos se unen por un enlace químico estable a compuestos fluorescentes sin sufrir ninguna disminución significativa en sus propiedades inmunológicas específicas; el anticuerpo así marcado se llama conjugado, el cual puede reaccionar posteriormente con el correspondiente antígeno. Si en una preparación está presente un antígeno dado, por ejemplo una sección de tejido, y se cubre con una capa del conjugado correspondiente, ocurre el enlace de las moléculas del anticuerpo fluorescente con dicho antígeno; el exceso de conjugado se elimina por lavados sucesivos, y los sitios de la preparación donde las moléculas de anticuerpo se unieron al antígeno se detectan por la fluorescencia que muestran con una fuente de luz adecuada y un sistema de microscopía de buena calidad.

Para entender el fenómeno de fluorescencia, es necesario revisar ciertos conceptos acerca de la naturaleza de la luz y de los estados de energía en las moléculas. Según la teoría clásica, la luz es considerada como una onda en movimiento, y de acuerdo a la teoría cuántica, como una corriente de unidades discretas de energía; es necesario tomar en consideración ambos conceptos en los eventos involucrados en la fluorescencia.

En su forma más simple, una onda puede ser descrita en términos de su velocidad ( $C$ ), su frecuencia o número de vibraciones por segundo ( $\nu$ ) y su longitud de onda ( $\lambda$ ) o distancia entre dos puntos similares en ondas consecutivas; estos parámetros están relacionados por la ecuación  $c = \nu \lambda$ .

La luz tiene una velocidad de  $3 \times 10^{10}$  cm/seg, por lo que a mayor frecuencia menor longitud de onda; la longitud de

onda se mide en Angstroms ( $1 \text{ \AA} = 1 \times 10^{-8} \text{ cm}$ ) o en nanómetros ( $1 \text{ nm} = 10 \text{ \AA}$ ) la frecuencia ( $\nu$ ) se expresa en  $\text{seg}^{-1}$  ó en términos del número de onda  $\bar{\nu} = 1/\lambda$  cuya unidad es  $\text{cm}^{-1}$ . La luz visible está constituida de radiación con longitud de onda de 400 a 750 nm y constituye una pequeña porción del espectro de radiación electromagnética.

Según la teoría cuántica, la luz se transmite en paquetes discretos de energía llamados cuantos o fotones; la energía de un fotón está dada por la expresión:  $E = h\nu$ , donde  $h$  es la constante de Planck y es igual a  $6.62 \times 10^{-27} \text{ erg seg}$  y  $\nu$  es la frecuencia de la longitud de onda involucrada. De la expresión se deduce que un cuanto de luz de mayor frecuencia (menor  $\lambda$ ) tiene más energía que un cuanto de menor frecuencia.

La absorción y emisión de luz ocurre en unidades cuánticas de energía completas, de modo que si en el curso de un ciclo de absorción-emisión de un material fluorescente se pierde energía, este decremento se manifestará por una longitud de onda mayor de los fotones emitidos y no por una reducción del número de estas unidades.

El modelo atómico de Niels Bohr propone que las moléculas se encuentran en ciertos estados energéticos específicos; el estado basal de energía puede ser modificado por excitación de la molécula, mediante absorción de energía que da como resultado el paso de electrones de orbitales cercanos al núcleo a orbitales alejados del mismo. El átomo excitado llega a ser inestable y tiende a regresar a su estado basal; el paso del estado excitado al estado basal ocurre, en ciertos casos, en un período de tiempo muy corto y es entonces cuando se emite la radiación llamada fluorescente. Mientras la molécula permanece en una condición vibratoria, la radiación fluorescente tendrá un cuanto de

energía menor que la radiación absorbida, y la frecuencia de la emisión será más baja; según Stokes el fenómeno de fluorescencia consiste en una emisión de luz de un color particular por una substancia, cuando es irradiada con luz de un color diferente; dicho fenómeno es muy extenso e implica una porción considerable del espectro electromagnético, de longitud de onda de  $5 \times 10^3$  a  $8 \times 10^3$  Å. Sin embargo en las técnicas de microscopía fluorescente se emplean substancias, que al ser excitadas por radiación ultravioleta o luz visible de alta frecuencia (violeta, azul oscuro) emiten radiación con frecuencia dentro del espectro visible.

### Aspectos Generales.

Es a partir de los trabajos de Coons, Creech y Jones (11) cuando la inmunofluorescencia comienza a desarrollarse con el uso de anticuerpos unidos a compuestos fluorescentes. -- Coons y col. (12) desarrollaron un método en el cual el anticuerpo marcado con fluoresceína, se emplea como un marcador histoquímico específico, basándose en observaciones previas de que la molécula de anticuerpo puede ser conjugada con compuestos químicos simples, sin destruir su capacidad de reaccionar específicamente con su antígeno; desde entonces se han usado una gran cantidad de sustancias como fluorocromos, pero sólo unas pocas han dado resultados satisfactorios. Entre los fluorocromos más comúnmente empleados se encuentran: isotiocianato de fluoresceína (FITC), cloruro de 1-dimetil-amino naftalin-5 sulfo (DIS o DANSYL), lisamina-rodamina B 200 (RB 200 SC), isotiocianato de tetrametil-rodamina (MRITC) y rodamina B isotiocianato (RBITC).

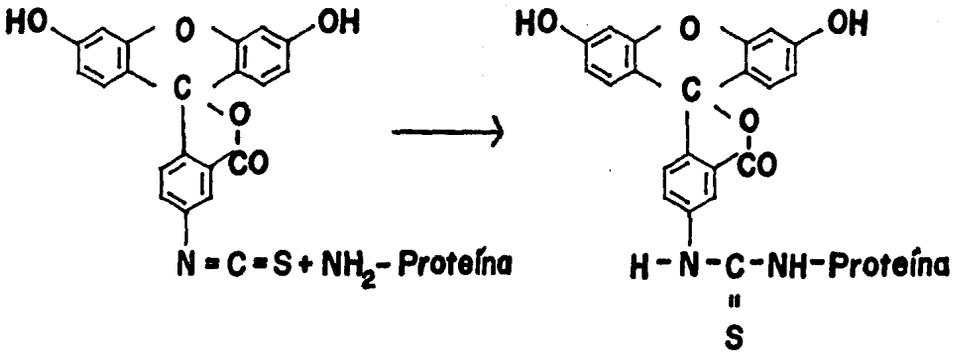
Coons y col. (13) fueron los primeros en usar isocianato de fluoresceína (FIC) para marcar proteínas; además de algunas dificultades en la preparación de este compuesto, el compuesto es inestable ya que se hidroliza fácilmente y reacciona rápidamente con grupos hidroxilo y amino, y ésto conduce a una desnaturalización de las moléculas de anticuerpo (globulinas). Estas desventajas han limitado su uso en inmunofluorescencia y estimularon una serie de estudios para encontrar fluorocromos más adecuados.

Riggs (14) hizo una importante contribución al desarrollo de los métodos de inmunofluorescencia al sintetizar isotiocianato de fluoresceína, un fluorocromo mucho más estable que el FIC y que no causa desnaturalización de las proteínas; el FITC emite una fluorescencia poderosa verde-amarilla, es soluble en soluciones alcalinas pH 8.5-9.0 y suficientemente

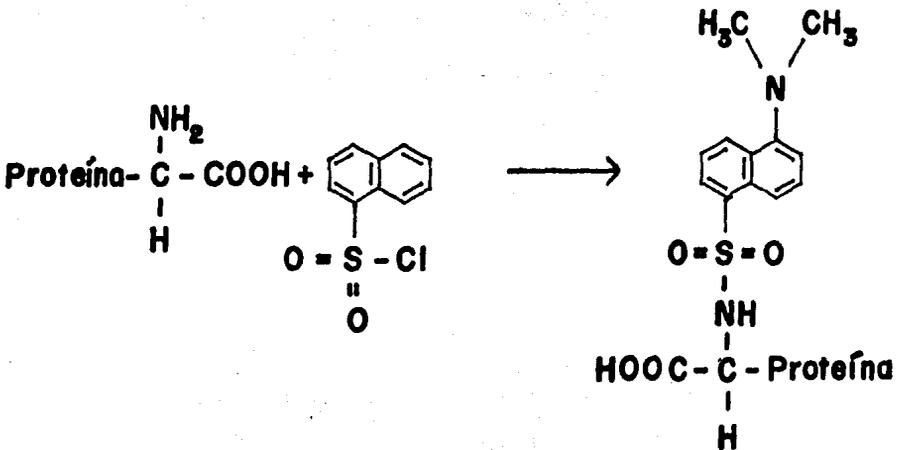
estable cuando se mantiene en frascos herméticamente cerrados y protegidos de la luz. Estas cualidades han producido un uso mayor del FITC y el isocianato se ha descartado -- prácticamente.

Clayton (15) introdujo en las técnicas de inmunofluorescencia un compuesto descubierto previamente por Weber (16) y usado en estudios polarográficos de proteínas; este compuesto es el 1-dimetil amino-naftalin 5 sulfonil cloruro (DIS o DANSYL), emite fluorescencia verde-amarilla, es poco soluble en agua pero se disuelve rápidamente en disolventes orgánicos (etanol, éter, acetona, cloroformo, etc.), es más barato que el isotiocianato de fluoresceína pero se usa en forma más limitada.

En la conjugación de un fluorocromo y una proteína existen grupos químicos reactivos en las moléculas que permiten su unión; en las proteínas estos grupos son grupos amino - terminales de algunos aminoácidos (lisina, ornitina), o -- grupos guanidínicos (arginina), también los grupos carboxílicos terminales de aminoácidos dibásicos (ácido aspártico y glutámico), los grupos fenólicos de tirosina, los grupos sulfonílicos de cisteína, o bien los grupos amino de histidina y triptofano. En el caso del isocianato de fluoresceína el enlace a las proteínas es mediante el grupo carbamido; el isotiocianato de fluoresceína se une a las proteínas por un enlace tiocarbamida y en el caso del DANSYL por medio de un enlace sulfon-amido.



UNION DE ISOTIOCIANATO A PROTEINA



UNION DE DANSYL A PROTEINA

### Variantes de la prueba

Se han desarrollado algunos sistemas para la detección de antígenos o anticuerpos por medio de inmunofluorescencia (IF) como son:

Prueba Directa.- En esta técnica el conjugado se aplica directamente sobre la preparación del antígeno y se revela por medio de su enlace específico al anticuerpo marcado; el antígeno puede ser una bacteria, una célula infectada por un virus, una célula tumoral, etc.; en ciertas condiciones patológicas, como en las enfermedades autoinmunes, ocurre "in vivo" el enlace de los anticuerpos (autoanticuerpos) con los antígenos tisulares, estos anticuerpos (inmunoglobulinas) pueden a su vez servir como antígenos para los conjugados anti-inmunoglobulina y entonces ser demostrados por IF en un corte de tejido. El método directo se emplea principalmente para la detección de antígenos en muestras biológicas o tejidos infectados y para estudios sobre el desarrollo y localización de antígenos virales primordialmente, pero prácticamente no se usa para detectar anticuerpos.

Prueba Indirecta.- Si una preparación del antígeno inicialmente se cubre con una capa de un anticuerpo específico sin marcar, las moléculas de anticuerpo interaccionarán con los determinantes antigénicos correspondientes; dichas moléculas funcionan a su vez como antígeno ante el suero antiglobulina marcada con el fluorocromo, de manera que el antígeno en cuestión es identificado indirectamente mediante los anticuerpos sin marcar que se unen al conjugado, y el complejo fluoresce bajo luz ultravioleta.

Otra modificación de la técnica de IF es la prueba de -

inhibición, utilizada cada vez más para cuantificar anticuerpos en suero y que consiste en lo siguiente: una preparación de antígeno (por ejemplo células infectadas con un virus) se trata con un suero cuyo contenido de anticuerpos específicos se desconoce, posteriormente se lava y se trata con globulina marcada conteniendo anticuerpos conocidos contra el antígeno en cuestión, si ha ocurrido la reacción entre el antígeno y el anticuerpo del suero de prueba; los sitios antigénicos estarán bloqueados y el anticuerpo homólogo marcado no es capaz de actuar, y por consiguiente no se observa fluorescencia. En esta prueba la ausencia de fluorescencia indica una reacción positiva. Se debe incluir un control en la prueba, una preparación de antígeno tratada con suero negativo en la cual la globulina homóloga marcada fluorescerá. La técnica de inhibición se emplea frecuentemente como un control para asegurar la validez de la prueba directa.

Otra técnica en la que se emplea la microscopía de fluorescencia es la tinción de complemento, en la cual la preparación de antígeno se trata con el suero en prueba y complemento de cuyo, después de la incubación la preparación se lava y posteriormente se trata con un suero anti-complemento de cuyo marcado con fluoresceína. Esta técnica tiene la ventaja de requerir solamente un reactivo marcado (el conjugado anti-complemento de cuyo), el que puede ser empleado con una variedad de sistemas antígeno-anticuerpo.

El método indirecto y la tinción de complemento son un poco más sensibles que el método directo, el éxito de ambos depende de la formación de la capa del anticuerpo alrededor del antígeno, lo cual produce una mayor superficie antigénica para la unión de los conjugados. El procedimiento de tinción de complemento se ha encontrado que es más sensible que el método indirecto, sin embargo al introducir

más reactivos biológicos en el sistema es más fácil que se produzcan tinciones no específicas.

### Prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI).

El éxito de la inmunofluorescencia (IF) depende en gran parte de la selección adecuada de materia prima para la preparación de los reactivos fluorescentes; además en las técnicas de inmunofluorescencia es importante considerar dos factores principales: el sistema inmunológico y el sistema óptico.

En relación al sistema inmunológico, el número de componentes varía dependiendo del tipo de prueba y del propósito que se persigue: localización del antígeno o bien búsqueda o cuantificación de anticuerpos.

En el caso del método indirecto, en el cual se emplean conjugados de anticuerpos anti-gammaglobulina capaces de combinarse con el complejo formado entre el antígeno y el anticuerpo específico, es importante considerar los siguientes aspectos: a) el anticuerpo, b) el conjugado c) el material antigénico.

#### a) Anticuerpo.

La producción del anticuerpo o suero inmune comprende los siguientes pasos: purificación del antígeno, inmunización de animales de laboratorio y evaluación del anticuerpo para la conjugación.

El requisito más importante para la preparación de un anticuerpo específico es contar con un antígeno altamente purificado; el grado de pureza tiene una influencia decisiva en la especificidad y en la actividad del anticuerpo (el más significativo criterio de calidad) en el suero inmune a obtener. El aislamiento y la purificación del antígeno resulta en ocasiones muy caro y consume mucho tiempo, pero en muchos casos sólo se requieren algunos miligramos de antígeno para la inmunización y sólo en algunos casos se cuenta -

con antígenos puros comercialmente accesibles; afortunadamente existen varios métodos de fraccionamiento para la purificación de proteínas: a) precipitación con sulfato de amonio, b) precipitación con etanol y c) fraccionamiento por cromatografía de intercambio iónico.

Además de la pureza del antígeno empleado, los siguientes factores tienen una gran influencia en la formación de anticuerpos:

- a) Inmunogenicidad del producto biológico: peso molecular, actividad biológica.
- b) Selección de adyuvantes para reforzar la respuesta inmune por ejemplo: adyuvante completo o incompleto de Freund.
- c) Esquema de inmunización: cantidad de antígeno y adyuvante, frecuencia de las inoculaciones, localización de los inóculos (intramuscular, subcutánea e intravenosa).
- d) Selección de especies animales: se emplean comúnmente cobayos, conejos y carneros; se eligió el conejo por ser el modelo que ha dado mejores resultados de respuesta inmune a inmunógenos y por la conveniencia de su tamaño y fácil manejo.
- e) Elección del momento adecuado para la cosecha del suero inmune.

Para la selección del anticuerpo (y posterior elaboración del conjugado) se requiere que sea de una buena actividad biológica y específico, estos criterios se establecen por medio de pruebas inmunoquímicas. En el caso de la anti globulina que se emplea en el método de tinción indirecta es necesario el análisis por doble difusión en gel de aga-

rosa contra preparaciones de inmunoglobulina purificada y por inmunoelectroforesis.

b) Conjugado.

El principal requisito para los fluorocromos en microscopía de fluorescencia es que tenga una alta emisión de fluorescencia en el espectro visible y un buen contraste de color con la autofluorescencia de fondo. Ultimamente se han empleado algunos fluorocromos como tinción histológica fluorescente pero pocos son adecuados para la unión química a proteínas.

Los criterios para seleccionar un fluorocromo como un marcador fluorescente adecuado, sugeridos por Chadwick y col. (17) y ampliados por Perse (18), son los siguientes:

- 1) El fluorocromo deberá poseer grupos químicos que se puedan unir por medio de enlaces covalentes estables a moléculas de proteínas.
- 2) El material fluorescente sin reaccionar debe ser fácil de eliminar.
- 3) La eficiencia fluorescente del colorante deberá ser alta y disminuir lo menos posible al conjugarse a la proteína.
- 4) El color fluorescente del conjugado deberá ser diferente que el del tejido (fluorescencia de "fondo" o autofluorescencia).
- 5) El conjugado deberá ser estable bajo condiciones normales de almacenaje y no diferir en sus propiedades de la proteína sin conjugar; la proteína conjugada deberá conservar sus características inmunológicas.
- 6) Los procedimientos de conjugación deberán ser simples y

lo más corto posible. Los métodos en los cuales se emplean reactivos estables, inofensivos y poco costosos, son los preferidos.

c) Material antigénico.

La preparación del material a ser investigado representa uno de los pasos más importantes en la reacción inmunofluorescente; el principal requisito es obtener preparaciones en las que la desorganización morfológica sea mínima, por lo que deben ser preparadas de acuerdo al substrato en el cual se encuentre el antígeno o el anticuerpo, bien sea cultivo microbiano, sangre, exudado, tejido o cultivo celular. En la aplicación de los métodos inmunofluorescentes - en estudios virales, una sola capa de cultivo celular es un excelente material, dicha monocapa se prepara sobre cubreobjetos introducidos en tubos de Leighton, tubos ordinarios o frascos ampul de cultivo, y si se usa un ambiente con CO<sub>2</sub> las células pueden ser cultivadas en cubreobjetos introducidos en cajas de Petri.

La infección del cultivo se lleva a cabo en un estado particular del desarrollo del mismo, en forma tal que las preparaciones al ser procesadas y examinadas al microscopio de fluorescencia no presenten una densidad celular muy grande, ya que ésto impide la individualización celular y en algunas ocasiones las células con fluorescencia llegan a ser confluentes y no se distingue con precisión el sitio de localización del antígeno o el anticuerpo.

Cuando la inmunofluorescencia se aplica al cultivo celular, las preparaciones se fijan antes de la tinción inmunofluorescente; esta fijación comprende tres procesos: adhesión del material antigénico al cubreobjeto, insolubilización del antígeno y permeabilización del substrato antigénico para permitir la penetración del anticuerpo.

Se debe tener especial cuidado en mantener la estructura morfológica de la preparación y la reactividad inmunológica del antígeno. Las moléculas de anticuerpo gammaglobulina empleada en la reacción inmunofluorescente son grandes y penetran a la célula con más dificultad que los colorantes para preparaciones bacteriológicas o histológicas; si el antígeno se encuentra en la superficie la reacción se lleva a cabo fácilmente, pero si el antígeno está en el interior de los elementos morfológicos la reacción no tiene lugar a menos que se facilite el acceso del anticuerpo a las estructuras internas, y es necesario modificar la membrana celular con la ayuda del agente de fijación. Por otro lado, una fijación insuficiente permite, si el antígeno es hidrosoluble, que se separe de la preparación durante la tinción. No se puede usar una serie de agentes de fijación tales como yodo, mercurio y osmio porque pueden causar una pérdida de fluorescencia, otros pueden causar alteraciones en el antígeno de tal manera que pierde su capacidad de unirse específicamente con su correspondiente anticuerpo. La fijación, aunque es un paso muy importante en las técnicas inmunofluorescentes, no ha sido objeto de estudios sistemáticos y las técnicas de fijación que existen son el resultado de experiencias personales de diversos autores; frecuentemente se emplean disolventes orgánicos (acetona y alcohol), otros agentes que tienen un considerable poder de fijación tienen una acción desnaturalizante como son ácido acético, dioxano y butanol. De la gran cantidad de agentes de fijación el que con más frecuencia se aplica en virología es la acetona, y entre otros el alcohol etílico, el alcohol metílico y el formaldehído. La duración de la fijación varía de unos minutos a algunas horas, generalmente son necesarios de 10 a 15 minutos para fijar con acetona fría o a temperatura ambiente y de 30 a 60 minutos con etanol frío. Una fijación muy prolongada (varía horas)

puede dar lugar a alteración del antígeno, principalmente cuando la temperatura no es suficientemente baja (generalmente se usa una temperatura entre 0 y 4°C). Para preparaciones virales se recomienda usar acetona a temperatura ambiente o a -20°C a -70°C según Coons y Kaplan (13) quienes encontraron el formaldehído poco satisfactorio. Las temperaturas muy bajas son necesarias cuando el antígeno puede sufrir alteración, si la fijación ocurre a temperaturas por arriba de -20°C.

Características del equipo de microscopía para pruebas de inmunofluorescencia.

Por principio, cualquier microscopio al que se le pueda adaptar una fuente de luz ultravioleta puede usarse para - microscopía fluorescente; en la actualidad se fabrican microscopios especialmente adaptados para estudios fluorescentes que incluyen fuente de luz y sistema de filtros.

Fuente de luz. - Con el objeto de producir la excitación de los átomos en el fluorocromo, es necesario una fuente de radiación suficientemente potente y con longitudes de onda que comprenda el intervalo de excitación máxima del fluorocromo empleado (496 nm para FITC, 550-560 nm para RB 200 y 330 nm para DANSYL). Inicialmente la fuente de luz fue una lámpara de arco con electrodos de carbón (Carl Zeiss Jena), pero daba una luz débil e inestable; comúnmente se usaron lámparas de mercurio de alta presión que generan luz uniforme y poderosa. Debido a la presión generada (por arriba de 70 atm.) dentro del bulbo emisor de luz ultravioleta, la lámpara se coloca dentro de una cubierta de metal, existiendo en el mercado diferentes tipos de lámparas con varias intensidades y denominaciones; entre las más conocidas se encuentran las siguientes: H BO - 50, 100, 200, 250, 500 W (VEB Berlin y Osram); PEK 200 - 3 (PEK labs, USA) HGK - 200 A (Sylvania Electric Prod., U.S.A.); CS - 150 (Philips Holland); A - H6 (General Electric, U.S.A.).

Las lámparas de xenon o de mercurio y xenon son menos satisfactorias que las de mercurio porque general luz débil en la región del ultravioleta y mucho calor de radiación.

Young y Armstrong (19) usaron una lámpara de cuarzo con vapor de yodo, que alcanza su intensidad máxima rápidamente y genera un espectro continuo cuya mayor parte se encuen

tra en la región del ultravioleta, este tipo de lámpara desplazó a la lámpara de mercurio de alta presión.

Sistema de Filtros.- La luz proveniente de la lámpara comprende un intervalo de radiaciones de diferentes longitudes de onda dentro del espectro electromagnético; además de la radiación ultravioleta se genera infrarroja y visible, y estas últimas son eliminadas mediante un sistema de filtros. Típicamente el sistema incluye filtros primarios o de excitación colocados entre la fuente de luz y la preparación, que sólo permite el paso de luz ultravioleta necesaria para estimular la fluorescencia, y filtros de barrera o secundarios colocados entre la preparación y el ocular, que eliminan la radiación de excitación no absorbida y dejan pasar la luz fluorescente emitida.

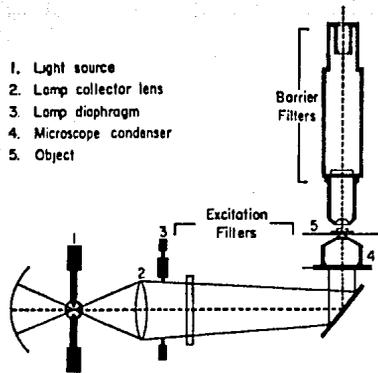


FIG. 8. General arrangement of excitation and barrier filters for fluorescence microscopy.

Filtros de Excitación. - Son una serie de filtros de vidrio suministrados con varios nombres por diferentes fabricantes como Schott (Jena, Mainz), Corning (USA), Klett USA, Chance Pilkington (England).

La excitación de fluorescencia en la preparación puede ser alcanzada sólo por luz ultravioleta (UV) (filtros con transmisión por arriba de 400 nm) o con luz azul UV (filtros con transmisión por arriba de 480 nm).

Las combinaciones de filtros se hacen dependiendo del tipo de iluminación (campo obscuro, claro, etc.) el fluorocromo empleado, la preparación a ser estudiada (frotis, sección de tejido, etc.) y la sensibilidad del material para fotografiar; la casa Reichert de Viena recomienda para sus microscopios de fluorescencia el uso de filtros Schott UG 1/15 mm para condensador de campo obscuro, UG 1/1,5 + BG 12/3 mm para condensador de contraste de fases. La casa Leitz también suministra filtros de varios tamaños y bajo diferentes nombres: filtros UG 1, UG 5 para radiación ultravioleta, GB 3 para luz azul UV y BG 12 para excitación en luz azul; los filtros fabricados por Carl Zeiss (de Jena) son similares a los producidos por Leitz tanto en sus tamaños como en la notación.

Filtros de Protección o de Barrera. - Son usados para eliminar el acceso de radiación al ocular, dejando pasar la luz emitida por el fluorocromo y reteniendo la radiación perjudicial al ojo humano; pueden ser de color verde amarillo, naranja o completamente incoloros. Son producidos por varias casas con nombres diferentes, por ejemplo Carl Zeiss los produce bajo la siguiente notación: GG 4, GG 8, GG 9, GG 10, GG16 que son de color verde amarillo y de la serie OG 1, OG 4 y OG 5 son naranja; también existen filtros incoloros como Wratten 2A y 2B que tienen la ventaja de no

alterar el color específico del fluorocromo.

La radiación producida por la lámpara es seleccionada por los filtros de excitación y el rayo de luz reflejado por un espejo cóncavo o mediante un sistema de prismas; luego es condensado a través de lentes de cuarzo permitiendo el paso de radiación ultravioleta sin aumento de calor, y posteriormente la radiación penetra a través de los lentes del condensador y llega a la preparación.

La selección de sistema condensador depende del fluorocromo empleado, el sistema de filtros, la preparación bajo estudio (seca o húmeda) y las dimensiones del portaobjeto.

Condensador de campo claro.- En microscopía fluorescente se usa con frecuencia un condensador de fondo luminoso del tipo Abbé, cuya apertura amplia así como la calidad de sus lentes permiten el paso de un rayo de luz potente; no se usa para examinar preparaciones con objetivo de inmersión pero se recomienda en el caso de usar portaobjetos con más de 1 mm de grosor, y en ocasiones se usa para fotomicrografías en las que es necesario usar una intensidad de luz muy alta.

Condensador de campo obscuro.- Este tipo de condensador es preferido por algunos investigadores porque da buen contraste en las preparaciones, retiene parte de la luz incidente y sólo penetra al objetivo la radiación de emisión, resultando un buen contraste; la intensidad de la fluorescencia disminuye ligeramente, pero los filtros de excitación usados con estos condensadores son más delgados y esto compensa en parte dicho decremento.

Condensador de contraste.- Es el resultado de la combinación del condensador de campo obscuro con el contraste de fase; con este tipo de condensador la preparación puede -

examinarse en luz ultravioleta y en visible; para la región ultravioleta el condensador es semejante al condensador empleado para el UV claro, mientras que para el espectro visible funciona como un condensador de contraste de fase, por ejemplo: el microscopio Zetopan Binolux II producido por Reichert y el Ortholux Leitz W están provistos de este tipo de condensador. Con dicho condensador el fondo aparece en un color diferente al de la fluorescencia específica, - por lo que el color del fondo debe ser tal que contraste -- con el color específico del fluorocromo; por ejemplo: en el caso de la fluorescencia roja específica del fluorocromo RB 200 la luz visible atraviesa un filtro verde-amarillo y entonces la fluorescencia roja contrastará con el color verde amarillo de los elementos no fluorescentes.

### III PROCEDIMIENTOS UTILIZADOS.

#### A) PREPARACION DEL ANTICUERPO

Purificación del antígeno.- Se empleó el método de precipitación con sulfato de amonio para la obtención de gammaglobulina a partir de suero de caballo.

#### Purificación de gammaglobulina con sulfato de amonio:

1. Adicionar gota a gota 40 ml de solución saturada de sulfato de amonio ( $R_1$ ), a temperatura ambiente, a 80 ml de suero de caballo, con agitación continua.
2. Ajustar la suspensión a un pH de 7.8 con NaOH 1 N.
3. Continuar la agitación durante 3 horas.
4. Centrifugar durante 30 minutos a 3000 rpm a temperatura ambiente.
5. Disolver el precipitado en solución salina isotónica, completando hasta el volumen original de suero.  
La purificación de la gammaglobulina se logra mediante dos precipitaciones más: para la segunda se repitieron los pasos del uno al cinco y para la tercera los pasos del uno al cuatro.
6. Disolver el precipitado obtenido en la tercera precipitación en la mitad del volumen original de solución salina (40 ml).
7. Eliminar el sulfato de amonio mediante diálisis contra solución salina amortiguada con boratos ( $R_2$ ), a una temperatura entre 4°C y 7°C por 24 a 72 horas; para detectar la presencia de aniones sulfato ( $SO_4^{2-}$ ) se emplea solución de  $BaCl_2$  al 10%.

8.- Centrifugar a 4°C durante 30 minutos a 3000 rpm (Se empleó una centrífuga refrigerada Christ modelo III con cabezal - de cuatro lugares).

Para evitar contaminación durante la diálisis se empleó - azida de sodio (0.1 g por cada 100 ml).

## Electroforesis

Para determinar el grado de pureza de la fracción gamma globulina que se empleó como inóculo, se realizó una electroforesis cuya técnica se describe a continuación:

1. Verter en la cámara de electroforesis (5303 Herzel - W Boskamp) solución amortiguadora ( $R_3$ ) hasta la marca correspondiente.
2. Sumergir las tiras de acetato de celulosa en la misma solución ( $R_3$ ) durante 10 a 30 minutos, retirarlas y eliminar el exceso de líquido entre dos hojas de papel filtro, evitando la desecación.
3. Ajustar las tiras de acetato de celulosa en el portatiras, colocar el electrodo maestro y conectarlo a la --fuerza de poder (5303 Herzel - W Boskamp) a una intensidad de 250 volts por 5 minutos.
4. Retirar el electrodo y colocar  $5\lambda$  de la muestra con el aplicador especialmente calibrado.
5. Efectuar el corrimiento electroforético a intensidad - constante de 2 miliamperes y 250 volts durante 25 minutos.
6. Al término del corrimiento electroforético, sumergir - las tiras en la solución colorante ( $R_4$ ) durante 5 minutos.
7. Eliminar el exceso de colorante, y pasar las tiras a la solución de primer lavado ( $R_5$ ) durante 5 minutos.
8. Pasar a la solución de segundo lavado ( $R_6$ ) durante 5 minutos.

9. Pasar a baño de deshidratación (R<sub>7</sub>) con alcohol al 95%, agitando durante 1 minuto y dejando en reposo durante otro minuto.
10. Colocar las tiras en la solución transparentizadora (R<sub>8</sub>) durante 5 minutos, agitando ocasionalmente.
11. Colocar las tiras en un portaobjetos y cortar los extremos de manera que queden justamente del tamaño del portaobjetos, pasar el rodillo suavemente de forma tal que no queden burbujas de aire.
12. Dejar secar a temperatura ambiente durante 1 minuto.
13. Asegurar los extremos de la tira con cinta adhesiva y colocar el portaobjetos en estufa a 60°C durante 20 minutos. Usar estufa bien ventilada para que se eliminen los vapores de acético.

La valoración del correspondiente corrimiento electroforético se realiza con el densitómetro, que es un aparato - dotado de celda fotoeléctrica a la que llega el haz de luz que pasa a través del portaobjetos donde se verifica la absorción, en proporción a la cantidad de colorante fijado a la proteína. El aparato transforma automáticamente las lecturas de absorción en los distintos picos de las fracciones correspondientes, obteniéndose un trazo característico.

Con el objeto de conocer el contenido de proteína de la fracción gammaglobulina purificada de caballo, se procedió a cuantificarla por el método de Lowry.

Determinación de Proteínas.

Método de Lowry.

Preparar una curva de calibración a partir de un estándar de albúmina de 700  $\mu\text{g/ml}$  (albúmina bovina, Fraction V, 96-99 $\%$  Sigma Chemical Company).

El método es el siguiente:

0.4 ml muestra	Adicionar
Blanco: 0.4 ml amortiguador tris (R <sub>9</sub> )	2 ml solución de trabajo (R <sub>10</sub> )
Mezclar y dejar reposar durante 10 minutos a temperatura ambiente.	
	Adicionar 0.2 ml de reactivo de Folin (R <sub>11</sub> )
Dejar reposar 30 a 45 minutos	
Leer a 750 nm en un espectrofotómetro	

Una vez determinada la pureza de la fracción gammaglobulina y conocida su concentración (13.5 mg/ml), se procedió a preparar el inóculo para la inmunización, para lo cual se ajustó la concentración de proteína a 200 µg/ml con solución salina amortiguada con boratos (R<sub>2</sub>).

### Inmunización.

Para la inoculación intramuscular y subcutánea se preparó una emulsión de la fracción gammaglobulina a la concentración de 200 µg/ml y adyuvante completo de Freund en proporción 1:1. En la inoculación intravenosa se aplicó una dosis de 500 µg/ml. Se utilizaron 4 conejos (Nueva Zelanda), entre 2 y 3 Kg de peso.

El esquema de inmunización empleado fue el siguiente:

Día	Región	Vía	Dosis	Volumen total inoculado
0	pierna izq.	intramuscular	200 µg/ml	2 ml
14	pierna der.	intramuscular	200 µg/ml	2 ml
34	peritoneal	intramuscular	200 µg/ml	2 ml
55	vena marginal de la oreja	intravenosa	500 µg/ml	2 ml

Durante la última inoculación se administró un antihistamínico (flumetazona) para prevenir un shock anafiláctico.

Después de 10 días de la inoculación intravenosa se realizó la sangría de prueba en la vena marginal de la oreja del animal, y se determinó la presencia, actividad y especificidad de los anticuerpos mediante inmunoelectroforesis de los sueros obtenidos contra suero total y gammaglobulina de caballo.

Posteriormente, los conejos fueron sangrados a blanco por punción cardíaca.

### Inmunoelectroforesis

El procedimiento consiste en la migración electroforética en medio de agarosa, de la preparación de gammaglobulina purificada y suero total proveniente del animal no inmunizado de la misma especie; después de la migración se coloca entre ambos pozos el anticuerpo a probar, y por difusión se formarán en la placa líneas o arcos visibles en las zonas donde se unen el antígeno y el anticuerpo, de tal forma que las fracciones se distinguen por su posición característica. El método es el siguiente:

1. Disolver 1 g de agarosa en 100 ml de solución amortiguadora de Michaelis ( $R_{12}$ ), con ayuda de calor y agregar 0.2 g de azida de sodio.
2. Sellar los portaobjetos aplicando la solución con un pincel de tal manera que se forme una capa delgada. Dejar solidificar.
3. Aplicar 3 ml de la misma solución procurando que la capa de gel quede lo más uniforme posible.
4. Dejar solidificar y guardar en cámara húmeda, en refrigeración media hora antes de usarse.
5. Perforar las placas en la forma convencional.
6. Colocar el suero total de caballo en el pozo superior y la fracción gammaglobulina en el inferior.
7. Verter en la cámara de electroforesis (5303 Herzel - W Boskamp) solución amortiguadora de Michaelis ( $R_{12}$ ) y colocar las laminillas. Hacer la conexión con tiras de papel Whattman.

8. Efectuar el corrimiento electroforético a 200 volts, por 15 minutos.
9. Al término del corrimiento, colocar en el canal el anticuerpo anti-gammaglobulina obtenido y mantener la laminilla en cámara húmera por espacio de 24 a 72 horas, tiempo en el cual se completa la difusión.

La anti-gammaglobulina de caballo obtenida en conejo, -- que posteriormente se conjugó con el fluorocromo, se obtuvo mediante precipitación con sulfato de amonio de los sueros de conejo; de esta fracción se corrió una electroforesis e inmunoelectroforesis y se determinó concentración de proteínas totales por el método de Lowry.

La concentración de proteínas totales fue de 18 mg/ml y como puede verse en la figura 1 se obtuvo una gammaglobulina de conejo anti-gammaglobulina de caballo de pureza muy satisfactoria.

#### Conjugación con isotiocianato de fluoresceína (FITC).

La conjugación de proteínas con FITC se lleva a cabo a pH 9.0 a 9.5 y la técnica empleada se describe a continuación:

1. Adicionar el FITC seco a una solución que contenga 10 mg/ml de proteína en solución salina isotónica con 10% en volumen de amortiguador de carbonato (R<sub>13</sub>). La relación colorante-proteína utilizada en este trabajo fue de 30 µg/mg.
2. La mezcla se agita cuidadosamente por 2 a 3 horas a temperatura ambiente y el pH se controla entre 9.0 y 9.5 ajustándolo si es necesario con el amortiguador de fosfato trisódico (R<sub>14</sub>).

3. Al término de la reacción, el fluorocromo libre se elimina por diálisis contra solución salina amortiguada con boratos ( $R_2$ ) por cinco días.

#### Preparación del material antigénico.

En este trabajo se utilizó la línea celular Hep-2, establecida por Moore, Sabachewsky y Toolan en 1952 (20), esta línea fue obtenida a partir de tumores producidos en ratas destetadas, irradiadas y tratadas con cortisona después de inyectarlas con tejido canceroso de laringe de una mujer de 56 años.

La línea Hep-2 cultivada habitualmente en medio M-199 en base de Earle (medio de Morgan, Morton y Parker) (21) adicionado de 8% de suero fetal de ternera, 1% de mezcla de antibióticos ( $R_{15}$ ) y 0.22% de bicarbonato de sodio, fue adaptada a crecer en medio de Leibovitz con 10% de suero de ternera y 1% de mezcla de antibióticos. La adaptación al medio de Leibovitz (22) tuvo como objeto evitar la necesidad de usar una incubadora con  $CO_2$ , que se requiere en la técnica original a base de cultivos celulares en medios con bicarbonato. La incubación en un ambiente que contenga 5% de  $CO_2$  es indispensable para evitar la alcalinización de los medios amortiguados con un sistema fosfatos bicarbonato.

Una vez adaptada la línea celular después de cinco subcultivos, se procedió a la titulación de los tres tipos de virus de poliomiелitis por el método de microtitulación que se describe a continuación:

#### Método de Microtitulación de virus.

##### Material.

1. Placas desechables de vinilo, con 96 cavidades, fondo -

plano (Linbro). Las placas requieren un tratamiento previo: se sumergen en un recipiente con alcohol etílico Q.P. al 70% durante 24 horas, al término de este lapso se enjuagan con agua de la llave 10 veces y luego con agua destilada 10 veces; después de dejarlas secar perfectamente son colocadas bajo luz ultravioleta, a una distancia no mayor de 40 cm del tubo emisor por 4 horas, a continuación guardar en bolsas nuevas de plástico (colocadas también bajo la lámpara de luz ultravioleta).

2. Micropipetas calibradas de 0.025 ml (Cooke Engineering Co) esterilizables en autoclave.
3. Microdilutores (Linbro) de 0.025 ml, los cuales se esterilizan a la flama.
4. Medio de Leibovitz suplementado con 10% de suero de ternera y 1.0% de mezcla de antibióticos (R<sub>15</sub>).
5. Suspensión de células Hep-2 conteniendo 400 000 células/ml.

Todo el material utilizado debe estar estéril y manejarse con técnica aséptica rigurosa en campana de flujo laminar.

#### Preparación de la suspensión de células.

1. Seleccionar al microscopio la botella que se desea subcultivar (observar que el tejido esté en buenas condiciones y la monocapa completa).
2. Desechar el medio de mantenimiento de la botella.
3. Agregar 1.0 ml de mezcla tripsina-verseno (R<sub>16</sub>).
4. Después de 1 a 2 minutos a temperatura de 37°C decantar

esta tripsina y agregar 0.5 ml de tripsina nueva.

5. Dejar actuar la tripsina hasta que las células estén completamente desprendidas.
6. Agregar 2.5 ml de medio de Leibovitz para disgregar completamente las células por medio de pipeteo enérgico con un bulbo.
7. Una vez que se logra una suspensión unicelular se pasa al conteo de células.

Método de conteo de células:

1. En un tubo de 13 x 100 mm medir 0.2 ml de rojo neutro 1:500 más 0.8 ml de la suspensión celular.
2. Mezclar perfectamente y esperar 5 a 10 minutos.
3. Llenar la cámara de Newbawer (cuenta-glóbulos).
4. Esperar 1 a 2 minutos y contar las células en los cinco cuadros grandes incluyendo las células sobre las líneas de arriba y de la derecha; el núcleo de las células viables se tiñe con el rojo neutro.
5. El cálculo se hace como sigue:

Número de células en los 5 cuadros x 2000 = No. total  
de células/  
ml.

Volumen final a que se debe llevar la dilución inicial  
para tener la concentración celular deseada por ml:

No. de células en los 5 cuadros	X	dilución inicial	X 2000
------------------------------------	---	---------------------	--------

---

No. de células deseadas/ml

Titulación del virus

Se emplearon las cepas vacunales de Sabin por su inocuidad además de que su especificidad correlaciona con las cepas naturales. Las cepas de Sabin se identifican como sigue:

Tipo 1 ----- Lsc, 2ab  
Tipo 2 ----- P 712  
Tipo 3 ----- Leon

Método:

1. Colocar 2 gotas (0.050 ml) del medio de Leibovitz en cada una de las cavidades de la placa, usando una micropipeta de 0.025 ml.
2. Colocar una gota (0.025 ml) de la suspensión viral en las cavidades de la primera fila usando una micropipeta.
3. Sumergir los microdilutores de 0.025 ml en las cavidades de la primera fila y mezclar por rotación de 10 a 15 veces.
4. Pasar los microdilutores a la siguiente fila y mezclar en la misma forma, repetir lo mismo hasta la última fila.
5. Después de mezclar en la última fila, vaciar los microdilutores en un recipiente que contenga fenol, enjuagar en agua destilada, sumergir en alcohol y pasar por la flama hasta el rojo. (Los recipientes contaminados esterilizarlos en autoclave).
6. Adicionar 2 gotas (0.050 ml) de la suspensión de células Hep-2 (400 000 células/ml) a cada una de las cavidades de la placa usando una micropipeta de 0.025 ml.

7. Las placas se cubren con una hoja de plástico transparente flexible (tipo Ega-pack) y se colocan en charolas, cuyo fondo tenga una compresa húmeda; se cubren a su vez con otra charola y se incuban a 37°C durante 7 días.
8. Revisar las condiciones de la célula a los tres y cinco días y al término del período de incubación, observar cada cavidad al microscopio para ver el efecto citopatogénico (ECP) típico de los virus de poliomiélitis. Si las células en una cavidad se retraen, hay aumento en la refringencia de su membrana y su citoplasma se hace granuloso y aún más se lisan entonces esa cavidad se considera positiva.
9. A las cavidades de las dos últimas hileras de la placa, agregar solamente suspensión celular y medio de cultivo con el objeto de tener un control de células.

Cálculo para determinar el título de virus.

Karber (26) y otros autores han desarrollado fórmulas para determinar el 50% en el punto final que representa la dosis que se necesita administrar para que se produzca efecto citopatogénico en el 50% de los cultivos inoculados. La fórmula de Karber es la siguiente:

$$\text{Log título} = - \log \text{ de la dilución más baja} - \left[ \frac{P_1}{T_1} + \frac{P_2}{T_2} + \frac{P_n}{T_n} - 0.7 \right] \log \text{ de la dilución}$$

$P_n$  = Número total de cavidades positivas por cada dilución

$T_n$  = Número total de cavidades utilizadas por cada dilución

Los títulos obtenidos por el método de microtitulación descrito anteriormente fueron:  $10^{-5.6}$  para el tipo 1,  $10^{-7.0}$  para el tipo 2 y  $10^{-6.3}$  para el tipo 3.

Se cultivaron células Hep-2 sobre cubreobjetos introducidos en cajas de Petri con medio de Leibovitz suplementado con 10% de suero de ternera y 1% de mezcla de antibióticos ( $R_{15}$ ). Posteriormente se determinaron las condiciones óptimas de la infección (dilución de la suspensión viral, cantidad de inóculo, tiempo) que mostraron un efecto citopatogénico característico de poliovirus (las células se retraen, hay aumento en la refringencia de su membrana y su citoplasma se hace granuloso) sin causar una destrucción celular completa, obteniéndose los siguientes resultados:

Tipo	Dilución	Cantidad de inóculo (ml)	Tiempo (horas)
1	1:625 ( $10^{-2.8}$ )	0.2	24
2	1:3125 ( $10^{-3.5}$ )	0.2	24
3	1:1024 ( $10^{-3.0}$ )	0.2	24

Prueba de inmunofluorescencia indirecta IFI.

La técnica de inmunofluorescencia indirecta (IFI) se realizó para cada tipo de poliovirus según el siguiente esquema:

Cel. Hep-2		Suero	(conjugado)
infectadas con	+	anti-polio	+
poliovirus 1		tipo 1	anti-gammaglobulina
			marcada con FITC

Cel. Hep-2		Suero	(conjugado)
infectadas con	+	anti-polio	+
poliovirus 1		tipo 2	

Cel. Hep-2		Suero	(conjugado)
infectadas con	+	anti-polio	+
poliovirus 1		tipo 3	

De la misma manera se llevó a cabo con células Hep-2 infectadas con poliovirus tipo 2 y 3 y con células Hep-2 sin infectar.

## Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)

Materiales diversos requeridos:

1. Cultivo de células Hep-2 sobre cubreobjetos infectado con cada tipo de poliovirus.
2. Suero anti-poliovirus, de cada tipo obtenido en caballo (sin marcar).
3. Globulina de conejo-antiglobulina de caballo marcada con isotiocianato de fluoresceína (conjugado).
4. Solución amortiguadora PBS (R<sub>17</sub>).
5. Glicerina diluída 1:10 en PBS.
6. Cajas Petri y pinzas.

Método:

1. Sacar cuidadosamente los cubreobjetos con células infectadas de las cajas de Petri, mediante las pinzas sin dañar la preparación.
2. Colocar los cubreobjetos en una caja Petri que contenga PBS y dejarlos ahí por espacio de 2 a 5 minutos para lavar la preparación.
3. Fijar con acetona a 4°C y lavar nuevamente en PBS.
4. Escurrir la preparación colocando el cubreobjeto en posición casi vertical, a temperatura ambiente procurando que no seque totalmente.
5. Cubrir con suero anti-poliovirus sin marcar e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente, cuidando que no haya desecación (se puede utilizar una pequeña cámara húmeda).

6. Lavar tres veces con PBS.
7. Cubrir cada preparación con el conjugado e incubar por 30 minutos a temperatura ambiente, teniendo cuidado -- nuevamente de evitar la desecación.
8. Lavar tres veces cada preparación con PBS para eliminar el exceso de conjugado.
9. Secar a temperatura ambiente.
10. Montar, invirtiendo cada cubreobjeto sobre un portaobjeto usando glicerina en PBS como medio de montaje.
11. Examinar las preparaciones en el microscopio de fluorescencia. En este trabajo se utilizó un fotomicroscopio - tipo III fabricado por Carl Zeiss (Alemania) provisto - de una lámpara de mercurio H B0 50 W (Osram). El microscopio incluye filtros de excitación G41-204 y G41-211 - para campo oscuro y contraste de fases y filtro de barrera G41-653.

Los sueros anti-poliovirus obtenidos en caballos correspondientes a cada serotipo se emplearon sin fraccionar, - pues según algunos autores (24) el uso de gammaglobulinas en lugar de suero total causa fluorescencia no específica con mayor frecuencia. Inicialmente se probaron tres diluciones de estos sueros para cada tipo de poliovirus: 1:10, 1:20 y 1:40, con el fin de utilizar después la que diera - resultados más satisfactorios. Se observó una buena intensidad de fluorescencia hasta la dilución 1:40 del suero anti-polio 2 y en el caso de los sueros anti-polio 1 y 3 hasta la dilución 1:20.

#### IV RESULTADOS.

El objetivo principal de este trabajo fue el de montar una técnica de inmunofluorescencia para tipificar poliovirus que fuera específica, confiable y rápida; además de la preparación de los reactivos biológicos necesarios en el método, con respecto a esto los resultados fueron bastante satisfactorios, ya que como se demostró por electroforesis e inmunoelectroforesis la anti-gammaglobulina que se conjugó al FITC, presentó un grado de pureza aceptable y una buena actividad de anticuerpos.

Por otra parte la especificidad del conjugado se probó por medio de las pruebas de inmunofluorescencia indirecta de cada serotipo con suero anti-poliovirus heterólogo, y en un control de células Hep-2 sin infectar.

Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

	Suero anti-poliovirus 1	Suero anti-poliovirus 2	Suero anti-poliovirus 3
Células Hep-2 infectadas con poliovirus tipo 1	3+	-	-
Células Hep-2 infectadas con poliovirus tipo 2	-	3+	-
Células Hep-2 infectadas con poliovirus tipo 3	-	-	3+
Células Hep-2 sin infectar	-	-	-

(3+) - fluorescencia intensa

(-) - ausencia de fluorescencia

En cada caso sólo el sistema homólogo mostró fluorescencia

cia significativa (fotomicrografías No. 3, 4 y 5); sin embargo, en el control de células sin infectar se presentó cierta fluorescencia en las pruebas iniciales, por lo que se procedió a lavar las preparaciones con PBS por más tiempo (30 minutos) antes de ser fijadas, y con ésto la fluorescencia desapareció en los controles.

La intensidad de la fluorescencia se incrementó cuando el efecto citopatogénico del virus estaba avanzado, después de 24 horas de infección, como se observa en la fotomicrografía No. 6.

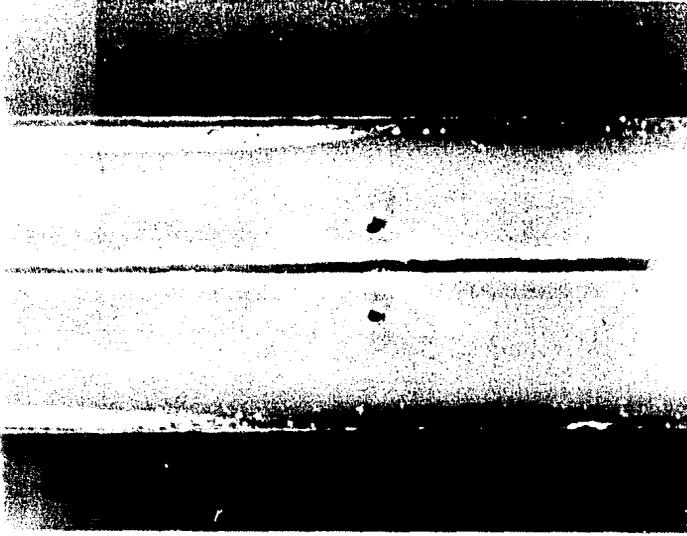
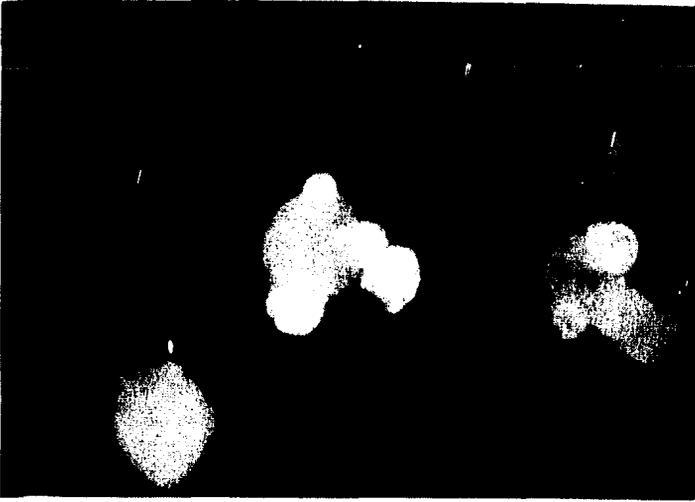


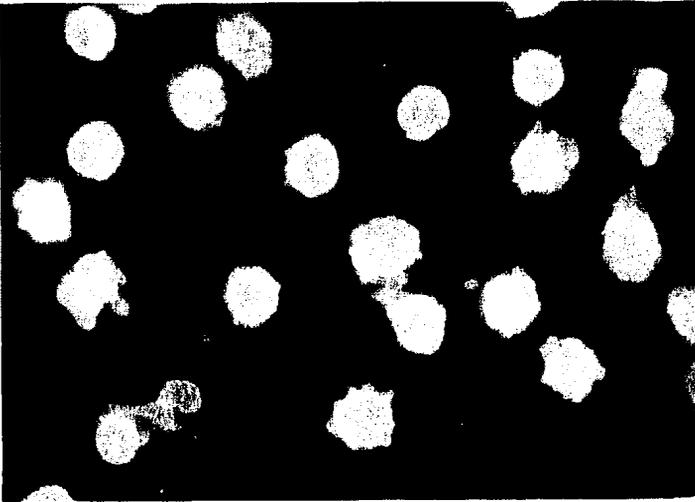
Fig. 1. Inmunoelectroforesis de la preparación de gammaglobulina de conejo anti-gammaglobulina de caballo contra gammaglobulina de caballo y suero total de caballo.



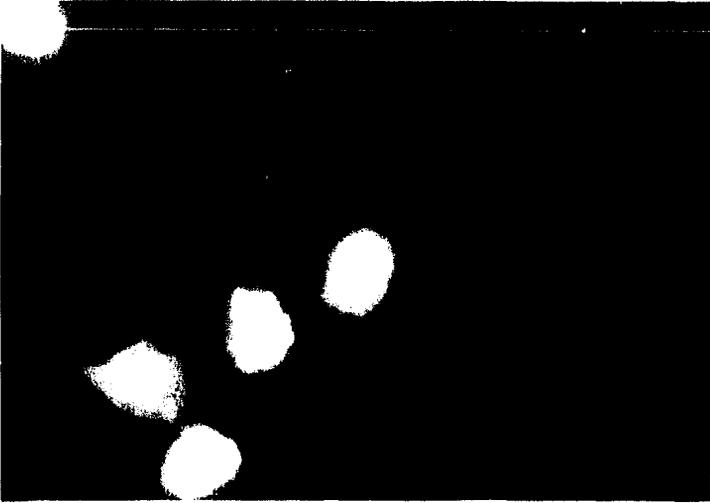
Fig. 2. Control de células Hep-2, sin infectar. (40x)



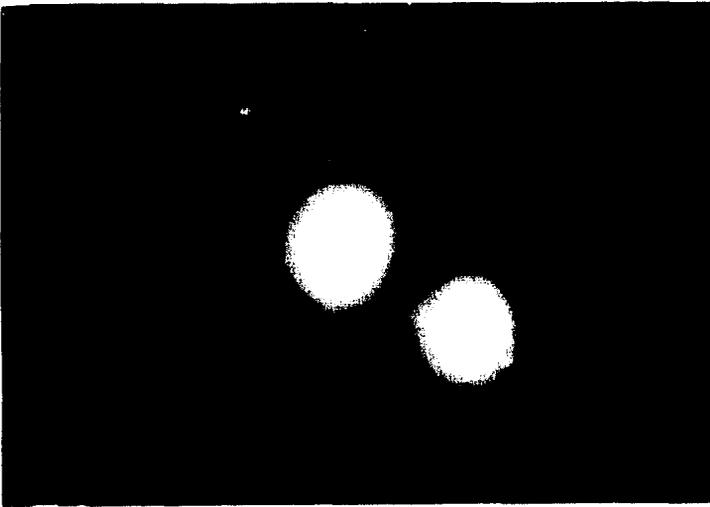
3.- Células Hep-2 infectadas con antígeno poliovirus tipo 3, después de 20 horas de infección (40x).



4.- Células Hep-2 infectadas con antígeno poliovirus tipo 2, después de 22 horas de infección (40x).



5.- Células Hep-2 infectadas con antígeno poliovirus tipo 1, después de 22 horas de infección (40x).



6.- Células Hep-2 infectadas con antígeno poliovirus tipo 1, después de 24 horas de infección (40x).

## V CONCLUSIONES.

La especificidad del conjugado fue satisfactoria, la fluorescencia observada inicialmente en el control de células sin infectar, posiblemente se debió a que las preparaciones contenían alguna sustancia que producía fluorescencia verde amarilla similar a la producida por el FITC, que pudo ser eliminada por un lavado más prolongado.

La prueba de inmunofluorescencia indirecta presenta grandes ventajas en la economía de tiempo y material, técnicamente requiere de pocas manipulaciones y el empleo de bajas cantidades de medio de cultivo celular.

Sin embargo, se considera necesario evaluar el método con especímenes clínicos de sujetos con diagnóstico presuntivo de poliomiелitis; ésto no fue posible realizarlo en el presente trabajo debido a que actualmente los casos que se presentan son escasos.

VI. BIBLIOGRAFIA

1. WORLD HEALTH ORGANIZATION.: "Poliomyelitis in the America, 1979". Bull Pan Am Health Organ 14(4): 402-404, 1980.
2. MINOR P D, KEW O, SCHILD G C.: "Poliomyelitis-epidemiology, molecular biology and immunology". Nature 299: 109-110, 1982.
3. LE BOUVIER G L.: "Poliovirus D and C antigens: Their differentiation and measurement by precipitation in agar". Br J Exp Pathol 40: 452-463, 1959.
4. LE BOUVIER G L.: "The D--> C change in poliovirus particles" Br J Exp Pathol 40: 605-620, 1959.
5. ROLZMAN B, MAYER M M, ROANE P R.: "Immunochemical studies of poliovirus- IV. Alteration of the immunologic specificity of purified poliomyelitis virus by heat and ultraviolet light". J. Immunology 82: 19-25, 1959.
6. DE SENA J, JARVIS D L.: "Modification of the poliovirus capsid by ultraviolet light". Can J Microbiol 27: 1185-1193, 1981.
7. DORNER A J, DORNER L F, LARSEN G R. WIMMER E, ANDERSON C W.: "Identification of the initiation site of poliovirus polyprotein synthesis". J Virol 42 (3): 1017-1028, 1982.
8. ROBBINS F C, ENDERS J F, WELLER TH.: "Cytopathogenic effect of poliomyelitis viruses in vitro on human embryonic tissues". Proc Soc Exp Biol and Med 75: 370-374, 1950.

9. Aurel Feteanu  
LABELLED ANTIBODIES IN BIOLOGY AND MEDICINE  
Abacus Press and Mc Graw Hill International Book Company  
Bucarest, Rumania (1978).
10. HATCH M H, KALTER SS, AJELLO G W.: "Identification of poliovirus isolates with fluorecent antibody". Pro Soc Exp Biol and Med 107: 1-4, 1961.
11. COONS A H, CREECH H J, JONES R N.: "Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group". Proc Soc Exp Biol 47: 200-202, 1941.
12. COONS A H, CREECH H J, JONES R N, BERLINER F.: "The demonstration of pneumococcal antigen in tissues by the use of fluorescent antibody" J Immunology 45: 159-170, 1942.
13. COONS A H, KAPLAN M H.: "Localization of antigen in tissue cells- II - Improvements in a method for the detection of antigen by means of fluorescent antibody". J Exp Med 91: 1-13 1950.
14. RIGGS J L, SEIWALD R J, BURCKHALTER J H, DOWNS C M, METCALF T G.: "Isothiocyanate compounds as fluorescent labeling agents for immune serum". Am J Pathol 34:1081-1092, 1958.
15. CLAYTON R M.: "Localization of embryonic antigens by anti-sera labelled with fluorescent dyes". Nature 174 1059, 1954.
16. WEBER G.: "Polarization of the fluorescence of macromolecules- II- Fluorescent conjugates of ovalbumin and bovine serum albumin". Biochem J 51: 155-176, 1952.

17. CHADWICK C S, MCENTEGART M G, NAIRN R C.: "Fluorescent protein tracers; a trial of new fluorochromes and the development of an alternative to fluorescein". Immunology 1:315-327, 1958.
18. Perse A G E.  
HISTOCHEMISTRY THEORETICAL AND APPLIED.  
Churchill  
London (1960).
19. YOUNG M R, ARMSTRONG J A.: "Fluorescence microscopy with the quartz-iodine lamp". Nature 213: 649-650, 1967.
20. Tomado de: Registry of animal cell lines certified by the cell culture collection committee. First Edition, 1964.
21. MORGAN J F, MORTON H J, PARKER R C.: "Nutrition of animal cells in tissue culture - I.- Initial studies on a synthetic medium. Proc Soc Exp Biol Med 73: 1-8, 1950.
22. LEIBOVITZ A.: "The growth and maintenance of tissue-cell cultures in free gas exchange with the atmosphere". Am J 78: 173-180, 1963.
23. Wick G, Baudner S, Herzog F  
IMMUNOFLUORESCENCE  
Die Medizinische Verlagsgesellschaft Marburg/Lahn.  
Alemania (1978).
24. Nairn R C.  
FLUORESCENT PROTEIN TRACING  
E & S Livingstone LTD  
Edimburg and London (1962).

25. Weir D. M.

HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY. IMMUNOCHEMISTRY  
(volumen 1) Blackwell Scientific Publication. (1960).

26. Rovozzo G C., Burke C. N.

A MANUAL OF BASIC VIROLOGICAL TECHNIQUES.  
Prentice-Hall Biological techniques Series (1973).

27. Goldman M.

FLUORESCENT ANTIBODY METHODS  
Academic Press  
New York and London. (1968).

## VII APENDICE

### REACTIVOS

R<sub>1</sub>- Solución saturada de sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$   
1000 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en 1 litro de agua, se calienta la solución con agitación a 50°C, hasta que la mayor parte de la sal se disuelve, posteriormente se mantiene a temperatura ambiente.

R<sub>2</sub>- Solución salina amortiguada con boratos.

Amortiguador de boratos pH 8.4-8.5:

Acido bórico 6.184 g

$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$  (bórax) 9.536 g

$\text{H}_2\text{O}$  c.b.p. 1000 ml

Para su empleo en la diálisis: mezclar 400 ml de esta solución amortiguadora con 8000 ml de solución salina isotónica.

R<sub>3</sub>- Solución amortiguadora de veronal pH 8.6, Fuerza iónica 0.075.

Acido dietil barbitúrico (barbital) 2.76 g

Dietil-barbiturato de sodio (barbital sódico) 15.40 g

Agua destilada c.b.p. 1000 ml

Solución empleada en la electroforesis: diluir esta solución en agua destilada 1:3 y añadir cristales de timol.

Estabilidad: 2 a 3 semanas a temperatura ambiente.

R<sub>4</sub>- Solución colorante:

Negro amido 5.0 g

Glicerina 150 ml

Acido acético glacial 100 ml

Agua destilada c.b.p. 1000 ml

R<sub>5</sub>- Solución de primer lavado

Metanol	450 ml
Acido acético glacial	100 ml
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

R<sub>6</sub>- Solución de segundo lavado

Acido acético glacial	100 ml
Glicerina	150 ml
Agua destilada c.b.p.	1000 ml

R<sub>7</sub>- Solución deshidratante

Etanol al 95%

R<sub>8</sub>- Solución transparentizadora

Acido acético glacial	300 ml
Etanol	680 ml
Glicerina	20 ml

R<sub>9</sub>- Amortiguador tris HCl 0.04 M, pH 8.0

Solución concentrada A.- Disolver 24.2 g de tris (hidroximetil amino metano (tris, THAM; C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>) 0.2 M  
Solución concentrada B.- Acido clorhídrico 0.2 M  
Mezclar 50 ml de solución A con 26.8 ml de solución B y se afora a 200 ml.

R<sub>10</sub> Solución alcalina de cobre

(Solución de trabajo del método de Lowry)

Reactivo A: sol. al 2% de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en NaOH 0.1 N

Reactivo B: sol. al 0.5% de CuSO<sub>4</sub> .5H<sub>2</sub>O en tartrato de sodio al 1.0%.

Mezclar 50 ml del reactivo A más 1.0 ml del reactivo B

R<sub>11</sub> Reactivo de Folin

Folin Ciocalteus. Phenolreagenz. Merck.

En el método de Lowry se emplea 1 N y se encuentra 2 N

en la presentación comercial, por lo que se diluye volumen a volumen con agua destilada.

- R<sub>12</sub>- Solución amortiguadora de dietilbarbiturato-acetato (solución de Michaelis) pH 8.2 Fuerza iónica 0.05
- |                             |         |
|-----------------------------|---------|
| Dietil barbiturato de sodio | 133.8 g |
| Acetato de sodio            | 88.3 g  |
| Agua destilada c.b.p.       | 1.5 l   |
- Ajustar el pH a 8.2 con HCl 0.1 N  
Para su empleo en la inmunoelectroforesis diluir con agua destilada 2:1.
- R<sub>13</sub>-Solución amortiguadora de carbonato
- Solución A: 2.65 g de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> en 50 ml de agua (aforado)  
Solución B: 4.2 g NaHCO<sub>3</sub> aforar a 100 ml de agua destilada.
- Solución amortiguadora de carbonato al 100%.  
1 volumen de sol. A + 4 volúmenes de sol. B  
para su empleo en la conjugación del FITC con la gamma-globulina diluir con solución salina isotónica en proporción del 10% en volumen:
- 2 ml de sol. A + 8ml de sol. B + 90 ml de NaCl al 0.9%
- R<sub>14</sub>-Solución amortiguadora de fosfato trisódico
- Sol. A: NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.2 M (27.8 g en 1000 ml de agua destilada)  
Sol. B: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 M (53.65 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 6 71.7 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12 H<sub>2</sub>O en 1000 ml de agua destilada)  
5.3 ml de Sol. A más 94.7 ml de sol. B diluido a un total de 200 ml con agua destilada.
- R<sub>15</sub>-Mezcla de antibióticos:
- Penicilina 10 000 U/ml y estreptomicina 10 000 mg/ml diluidas 1:100, de tal forma que se tiene:  
100 U/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomicina.

Esta mezcla se usa en proporción del 1.0% en volumen con los medios de cultivo celular tales como el medio M-199 en base de Earle y el medio de Leibovitz.

R<sub>16</sub>- Tripsina-verseno

Tripsina (1:250)	0.25 g
Verseno (EDTA disódico)	0.02 g
PBS	100 ml

R<sub>17</sub>- PBS:

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
K H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15 g
H <sub>2</sub> O destilada c.b.p.	1000 ml

Esterilizar por autoclave 18 lb por 35 minutos.